

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

УКПШ

№ держреєстрації 0119U100823

Інв. №

Міністерство освіти і науки України
Сумський державний університет (СумДУ)
40007, м. Суми, вул.Римського-Корсакова, 2
тел. (0542) 33-53-39 факс (0542) 33-40-58 e-mail: info@sci.sumdu.edu.ua

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

А.М. Черноус

ЗВІТ
ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

**БІОЛОГІЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ ПЛАЗМОВОЇ
ЕЛЕКТРООКСИДАЦІ ТА ЗОЛЬ-ГЕЛЬ ДЕПОЗИЦІЇ ДЛЯ СТВОРЕННЯ
ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ ПОВЕРХНІ ІМПЛАНТІВ**
(остаточний)

Керівник НДР
д-р мед. наук, професор

М.В. Погорєлов

2021

Рукопис закінчено 20 грудня 2021 р.

Результати роботи розглянуто науковою радою СумДУ, протокол від 23 грудня 2021 р. № 7

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, д.мед.н., професор	()	М.В. Погорелов (реферат; вступ; висновки)
Відповідальний виконавець Старш. наук. співроб. к.мед.н.	()	В.В. Корнієнко (розділи 1, 2, 3, 4)
Наук. співроб. к.фіз-мат.н.	()	Р.В. Вітер (розділ 1)
Мол. наук. співроб.	()	Є.В. Гусак (розділ 2)
Аспірант	()	В.М. Дейнека (розділ 4)
Студент	()	Ю.В. Варава (розділ 2)
Аспірант	()	К.А. Дедкова (розділ 3)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 145 с., 16 табл., 43 рис., 247 джерел.

ЗОЛЬ-ГЕЛЬ ДЕПОЗИЦІЯ, МЕТАЛЕВІ ІМПЛАНТАТИ, НАНОЧАСТОЧКИ, ПЛАЗМОВА ЕЛЕКТРООКСИДАЦІЯ, БІОСУМІСНІСТЬ, LIPSS

Об'єкт дослідження – процеси остеоінтеграція металевих імплантатів.

Предмет дослідження – вивчення функціоналізованої поверхні імплантатів, які отримані із застосуванням плазмової електрооксидзації і та плазмової електрооксидзації і встановлення механізмів взаємодії поверхні з клітинами остеобластичного диферону.

В ході виконання проекту авторами була вдосконалена методика плазмової електрооксидзації поверхні металевих імплантатів з використанням принципово нових розчинів, зокрема $\text{Ca}(\text{HCOO})_2$, $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, H_3PO_4 з додаванням НА та наночасточок оксидів металів. Вперше були розроблені нові режими оксидзації поверхні титан-цирконієвого сплаву з врахуванням сили току, його щільності та часу процесу, виявлені максимальні точки утворення оксидної плівки та залежність топографії поверхні від параметрів процесу оксидзації. Встановлено, що протокол електрооксидзації при напрузі 500 В і густині струму 150 mA/cm^2 (для протоколів з EDTA) може бути оптимальним для отримання поверхневих шарів з високим вмістом фосфатів, а отже, і з високою схильністю до осеоінтеграції. Доведено, що кальцій-фосфатні покриття дозволяють збільшити активність остеогенних клітин, що виявляється у зростанні депозиції кальцію та стимуляції синтезу колагену. Додавання срібла в покриття не призводить до стимулювання проліферації клітин, проте характеризується зростанням синтезу колагену на 2-3 тиждень.

Одержані у роботі дані щодо механізмів формування кальцій-фосфатного покриття імплантатів та біологічної відповіді на різний склад поверхні можуть бути використані у подальших прикладних дослідженнях для створення нових класів дентальних імплантатів для ортопедії та стоматології.

ЗМІСТ

	с.
ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАК, ОДИНИЦЬ І ТЕРМІНІВ.....	8
ВСТУП.....	10
1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	13
2 ХІМІЧНА ТА СТРУКТУРНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПІСКОСТРУМИННОЇ ПОВЕРХНІ ЗУБНИХ ІМПЛАНТІВ З ВИКОРИСТАННЯМ ZrO_2 РІЗНОЇ ФОРМИ	22
2.1 Матеріали і методи.....	22
2.1.1 Матеріали.....	22
2.1.2 Процес піскоструминної обробки	22
2.1.3 Хімічний склад сплаву	23
2.1.4 Оцінка поверхневої ерозії	23
2.1.5 Оптична мікроскопія	23
2.1.6 Скануюча електронна мікроскопія.....	23
2.1.7 Вимірювання шорсткості поверхні	24
2.1.8 Вимірювання контактного кута.....	24
2.1.9 Експеримент на культурах клітин.....	24
2.1.10 Статистична обробка даних	25
2.2 Результати	25
2.2.1 Оптична мікроскопія	25
2.2.2 Хімічний склад поверхні після обробки.....	27
2.2.3 Скануюча електронна мікроскопія.....	28
2.2.4 Контактний кут та шорсткість.....	29
2.2.5 Експеримент на культурах клітин.....	30
2.3 Обговорення	31
3 ВІДПОВІДЬ КЛІТИН І ТКАНИН НА НАНОТЕКСТУРОВАНІ ІМПЛАНТИ Ті6Al4V ТА Zr З ВИКОРИСТАННЯМ ВИСОКОШВИДКІСНИХ ФЕМТОСЕКУНДНИХ ПЕРІОДИЧНИХ ЛАЗЕРНИХ ПОВЕРХНЕВИХ СТРУКТУР.....	33

3.1	Матеріали та методи	33
3.1.2	Налаштування лазера та текстурування поверхні LIPSS.....	33
3.1.3	Характеристика поверхні зразків, оброблених HR-LIPSS	35
3.1.4	Вимірювання контактного кута.....	36
3.1.5	Експеримент на культурах клітин.....	36
3.1.6	Життєздатність клітин.....	36
3.1.7	Модель на тваринах.....	37
3.1.8	Оцінка результатів <i>in vivo</i> з використанням скануючої електронної мікроскопії	38
3.1.9	Статистична обробка даних	38
3.2	Результати	39
3.2.2	Поверхневий хімічний аналіз за допомогою XPS та визначення гідрофільності.....	42
3.2.3	Експеримент на культурах клітин.....	45
3.2.4	Модель на тваринах.....	45
3.3	Обговорення	47
4	КЛІТИННА ВІДПОВІДЬ ОСТЕОБЛАСТІВ НА LIPSS-МОДИФІКОВАНІ Ti- ІМПЛАНТИ	51
4.1	Матеріали та методи	51
4.1.2	Методи.....	51
4.1.3	Експеримент на культурах клітин.....	52
4.1.4	Мікробіологічне дослідження	53
4.2	Результати	54
4.2.1	Морфологія поверхні.....	54
4.2.2	Експеримент на культурах клітин.....	56
4.2.3	Мікробіологічне дослідження	57
5	ВПЛИВ КАЛЬЦІЮ ТА ФОСФОРУ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ КЕРАМІЧНИХ ПОКРИТТІВ НА ТИТАНОВИХ ЗУБНИХ ІМПЛАНТАХ, ОТРИМАНИХ МЕТОДОМ РЕО.....	59
5.1	Матеріали і методи.....	59

5.1.1	Матеріали.....	59
5.1.2	PEO	59
5.1.3	Вимірювання гідрофільності	60
5.1.4	Випробування твердості та міцності.....	60
5.1.5	Скануюча електронна мікроскопія (SEM).....	61
5.1.6	Вимірювання шорсткості поверхні	61
5.1.7	Дифракція рентгенівських променів (XRD).....	61
5.1.8	Рентгенівська фотоелектронна спектроскопія (XPS).....	62
5.1.9	Аналіз електрохімічної корозійної стійкості	62
5.1.10	Інкубація в розчині Рінгера.....	63
5.1.11	Спектроскопія Raman	64
5.1.12	Аналіз біоактивності у модельованій рідині організму (SBF)	64
5.1.13	Аналіз цитотоксичності зразків та життєздатності клітин.....	64
5.1.14	Дослідження адгезії бактерій.....	66
5.1.15	Статистичний аналіз	66
5.2	Результати	66
5.2.1	Напруга проти струму як функція часу	66
5.2.2	Скануюча електронна мікроскопія (SEM).....	67
5.2.3	3D-реконструкція та аналіз EDX.....	70
5.2.4	Аналіз поперечних зрізів.....	71
5.2.5	Рентгенівська фотоелектронна спектроскопія (XPS).....	71
5.2.6	Спектроскопія Raman	74
5.2.7	Дифракція рентгенівських променів (XRD).....	75
5.2.8	Шорсткість і гідрофільність поверхонь PEO	76
5.2.9	Випробування твердості та міцності.....	77
5.2.10	Стійкість до електрохімічної корозії	78
5.2.11	Довгостроковий аналіз корозійної стійкості (у розчині Рінгера)	82
5.2.12	Аналіз біоактивності у модельованій рідині організму (SBF)	83
5.2.13	Аналіз цитотоксичності зразків та життєздатності клітин.....	86
5.2.14	Дослідження адгезії бактерій.....	88

5.3 Обговорення	89
6 ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ КЛІТИН ТА ОСАДЖЕННЯ КОЛАГЕНУ НА ГІДРОКСИАПАТИТНИХ ПОКРИТТЯХ, СТВОРЕНИХ НА ПОПЕРЕДНЬО ОБРОБЛЕНИХ СУБСТРАТАХ	95
6.1 Матеріали і методи.....	95
6.1.1 Синтез гідроксиапатиту.....	95
6.1.2 Нанесення гідроксиапатитних покриттів	95
6.1.3 Характеристика матеріалів	97
6.1.4 Вимірювання контактного кута.....	98
6.1.5 Вимірювання шорсткості поверхні	98
6.1.6 Експерименти на культурі клітин	99
6.1.7 Аналіз продукції колагену	100
6.2 Результати	100
6.2.1 Характеристика матеріалів	100
6.2.2 Вимірювання змочування та шорсткості поверхні	106
6.2.3 Експерименти на культурі клітин	107
6.2.4 Аналіз продукції колагену	109
6.3 Обговорення	110
7 ТІБАЛ4V СКАФФОЛДИ З ПОВЕРХНЕЮ, АКТИВОВАНОЮ ЛУГОМ ДЛЯ ТКАНИННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ.....	112
8.1 Матеріали і методи.....	112
8.1.1 Потрійна періодична мінімальна поверхня та отримання скаффолдів.	112
8.1.2 Обробка поверхні	112
8.1.3 Тест із зануренням у модельовану рідину організму.....	112
8.1.4 Характеризація поверхні	112
8.1.5 Оцінка стану клітин	113
8.2 Результати	113
ВИСНОВКИ.....	118
ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ.....	121

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАК, ОДИНИЦЬ І ТЕРМІНІВ

TiO₂ – оксид титану

Al₂O₃ – оксид алюмінію

CO₂ – оксид вуглеця

ZrO – оксид цирконію

ZnO – оксид цинку

ZrO₂–Y₂O₃–CeO₂– діоксиду цирконію, комплексно стабілізований оксидами ітрію та церію

LIPSS – Laser Induced Periodic Surface Structures (лазер індуковані періодичні поверхневі структури)

PBS – phosphate buffered saline

КК – контактний кут

МСК – мезенхемальні стовбурові клітини

Ti – титан

РЕО – плазмове електролітичне окислення

Са – кальцій

Р – фосфор

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтовою кислотою

НА – гідроксиапатиту

ZrO₂ – діоксид цирконію

SiC – карбїду кремнію

SEM – скануюча електронна мікроскопія

XRD – дифракція рентгенівських променів

XPS – рентгенівська фотоелектронна спектроскопія

EIS – електрохімічна імпедансна спектроскопія

PDP – потенціодинамічна поляризація

ЕЕС – електричні еквівалентні схеми

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

SBF – simulated body fluid

FBS – фетальна бичача сироватка

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

CPE – елементи постійної фази

ТНП – термічно нанесених покриттів

РСА – рентгеноструктурний аналіз

КК – крайовий кут

β -ТКФ – β -трикальцій фосфата

SLM – селективного лазерного плавлення

NPs – наночастинки

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтовою кислотою

U2OS – епітеліальні клітини остеосаркоми кістки людини

UCMSC – мезенхімальні стовбурові клітини пуповини людини

DAPI – 4',6-діамідин-2'-феніліндол дигідрохлорид

PBS – фосфатно-сольовий буферний розчин

SiC – карбїду кремнію

SEM – скануюча електронна мікроскопія

XRD – дифракція рентгенівських променів

XPS – рентгенівська фотоелектронна спектроскопія

FBS – фетальна бичача сироватка

DMEM – модифіковане середовище Дульбекко

ВСТУП

За останні 20 років кількість встановлених зубних імплантів у світі сягла біля 1 мільйона на рік. Клінічний успіх зубної імплантації пов'язують з явищем остеоінтеграції. Геометрія та топографія поверхні імплантів мають вирішальне значення для коротко- та довгострокового успіху імплантації. Ці параметри, у поєднанні з бездоганними хірургічними техніками, є необхідною умовою набуття успішного клінічного результату [1].

Існує два типи реакції кісткової тканини на імплант. Перший тип передбачає формування фіброзної м'якої капсули навколо імпланта. Ця капсула, що складається з волокнистої тканини, не забезпечує належної біомеханічної фіксації і це призводить до клінічної недостатності зубного імплантата. Безпосередній контакт поверхні імплантату та кістки без проміжного шару сполучної тканини є другим типом реакції кісток. Це явище відоме як остеоінтеграція. Зміна мікроструктури поверхні імпланту була метою численних досліджень в останні роки, особливо з появою різноманітних методів для уточнення розміру зерна цих матеріалів до діапазону субмікрон/нано. Розвиток цих методик дозволив створити поверхню з винятковими механічними властивостями [2-4] та підвищеною біологічною сумісністю [5-8].

Відомо, що швидкість і якість остеоінтеграції імплантатів пов'язані з властивостями їх поверхні. Склад, гідрофільність і шорсткість - це параметри, які можуть відігравати певну роль у взаємодії імпланта з оточуючими тканинами.

Існують численні дослідження, які доводять, що шорсткість поверхні імплантів впливає на швидкість остеоінтеграції та біомеханічну фіксацію [9,10]. Шорсткість поверхні можна розділити на три рівні, залежно від масштабу: макро-, мікро- та нанорозмірні топології. Макрорівень передбачає структуру поверхні з інтервалом коливань в діапазоні до десятків мікрон. Ця шкала безпосередньо визначає геометрію імпланта. Численні дослідження показали, що первинну фіксацію та тривалу механічну стійкість імпланту можна покращити за допомогою розвиненої геометрії поверхні [11-13]. Мікрорівень поверхні імпланту

визначається в межах 1–10 мкм. Цей діапазон шорсткості регулює зв'язок між кістковою тканиною та поверхнею імпланту [10,13]. У випадках недостатньої кісткової тканини короткі імпланти, які були розроблені з шорсткою поверхнею, показали кращі клінічні результати порівняно з імплантами з гладкою поверхнею [14,15]. Численні дослідження показали, що шорсткість поверхні в цьому діапазоні забезпечує стабільну інтеграцію імплантів і вищий опір крутного моменту при відкручуванні імпланту в порівнянні з іншими типами геометрії поверхні [10,13]. Ці дослідження встановили, що імпланти з шорсткими поверхнями мають більший контакт з кісткою порівняно з імплантами з більш гладкою поверхнею [9,10]. Тим не менш, на сьогоднішній день не було виявлено жодних клінічних ознак, які демонстрували б перевагу будь-якої конкретної геометрії поверхні імпланту [16].

На сьогоднішній день були розроблені різні методи модифікації поверхні зубних імплантів для покращення їх остеоінтеграції. Ці методи використовують плазмову дію, піскоструминну обробку керамічними частинками, травлення кислотою та анодування.

Модифікація поверхні внутрішньокісткової частини імпланту за допомогою піскоструминної обробки представляла особливий інтерес для нашого дослідження. Метод заснований на впливі поверхні імпланту на тверді керамічні частинки, які проєктуються через насадку з великою швидкістю зі стисненим повітрям. Залежно від розміру, характеристик керамічних частинок та режимів їх проєкції можна отримати поверхні з різними характеристиками. У той же час абразив повинен бути хімічно стійким, біосумісним і не повинен перешкоджати остеоінтеграції імплантів. Існують такі керамічні абразиви: оксид алюмінію, оксид титану та фосфат кальцію. Недоліками перерахованих матеріалів є їх здатність руйнуватися під час зіткнення з поверхнею, що обробляється, можливість включення їх залишків на поверхню імпланту, а також труднощі видалення цих залишків навіть за допомогою ультразвукового очищення, пасивації кислотою і стерилізації. Оксид алюмінію не розчиняється в кислоті, тому його важко видалити з поверхні імпланту. Існують повідомлення про випадки міграції абразивних

частинок у навколишні тканини та їх втручання у процеси остеоінтеграції імплантатів. Наявність абразивних залишків на поверхні імпланта порушує його хімічну гетерогенність, що знижує стійкість до корозії в навколишньому середовищі [17]. Оксид титану також використовується для піскоструминної обробки поверхні імплантів. Частинки оксиду титану із середнім розміром 25 мкм утворюють помірно нерівну поверхню 1–2 мкм. Експериментальні дослідження мікроімплантів в організмі людини показали більш високі остеопровідні здібності поверхонь, оброблених TiO_2 , порівняно з іншими абразивами [12,18–21]. В експерименті з кроликами Wennerberg та ін. [13] довели, що вплив частинок TiO_2 або Al_2O_3 на поверхню імпланту дав аналогічні значення регенерації кісток [22]. Ці дослідження також підтверджують, що модифікація поверхні імпланту із створенням шорсткості збільшує їх механічну фіксацію до кістки.

Незважаючи на існування достатньої кількості методів та технологій обробки поверхні, важливим завданням залишається створення розвиненої поверхні внутрішньокісткової частини імпланту [23]. Оскільки кожен метод має свої переваги та недоліки, пошук методів удосконалення технології з метою підвищення біосумісності імплантатів триває.

1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Переважання в структурі захворюваності хвороб, пов'язаних з віком, підвищення загальної тривалості життя, а також розвиток хірургічних технік, призводять до інтенсивного росту операцій з заміщення кісток та розвитку реконструктивної хірургії у світі. У ЄС більш ніж 1 мільйон артропластичних операцій виконується кожного року та у найближчі роки очікується значне збільшення кількості первинних та повторних артропластичних операцій суглобів [24].

Тим не менш, після проведення хірургічних операцій з заміщення кісток не менше 17,5 % випадків потребують повторного хірургічного втручання [25]. Неповна остеоінтеграція та бактеріальна інфекція представляють найбільшу загрозу для нормального заживлення імпланту. Бактеріальні популяції використовують клітини, що прикріплюються до твердих поверхонь, для виживання, формуючи біоплівки [26]. Ефективний метод для попередження формування біоплівок, це нанесення бактерицидного шару на поверхню матеріалу. Але, в залежності від подальшого застосування матеріалів, цей метод не може забезпечувати достатню ефективність через токсичність та його роль в появі мультирезистентних патогенів [27, 28].

Можливим вирішенням цієї проблеми виступають поверхневі модифікації поверхні, які покращують остеоінтеграцію імплантів або зменшують бактеріальну інфекцію. В останні роки лазерні технології привернули до себе увагу як метод для покращення біосумісності поверхні імплантів. У [29] CO₂ лазер було застосовано для оцінки ролі та впливу заглиблень діаметром 200 мкм на проліферацію MG63 клітин на Ti6Al4V. Автори спостерігали значний вплив поверхні на проліферацію клітин та їх життєздатність. Імпульсний волокновий лазер з довжиною хвилі 1064 нм, що діяв на протязі 10 нсек був використаний у [30] з метою створення заглиблень на NiTi сплаві, таким чином різноманітно спрямовані лінії впливають на проліферацію та орієнтацію мезенхімальних стовбурових клітин людини. Традиційне лазерне текстурування, отримане за допомогою постійного чи

пульсового лазерів, було обмежене у мінімальному розмірі структур за законом дифракції, таким чином, заглиблення на поверхні розмірами менше 10 нм було дуже важко отримати. Тим не менш, в останні роки було розроблено новий підхід, базований на ультракоротких піко- та фемтосекундних лазерних хвилях, що дозволяє створювати на поверхні так звані LIPSS (Laser Induced Periodic Surface Structures – лазер індуковані періодичні поверхневі структури). Ці морфологічні структури характеризуються періодичністю, що менше довжини хвилі лазера, [31], зазвичай до 500-900 нм, таким чином відкриваючи цікаві перспективи для контролювання гідрофобності поверхні [32, 33], для підвищення проліферації та життєздатності клітин [34] та зменшення стійкості поверхні до бактеріальної проліферації [35].

Відмінні механічні властивості, хімічна стійкість та біосумісність дозволяють широко використовувати Ti і Zr, що робить ці метали придатними для застосування в ортопедії та стоматологічній хірургії. Однак близько 7% зубних імплантатів пошкоджуються через 10 років після операції. Втрата імплантату може статися через хірургічну травму, інфікування під час встановлення імплантату чи процесу загоєння та нестабільність імплантату через передчасне навантаження [36]. Близько 50% відмов імплантату визначаються як пізні втрати, які виникають через втрату підтримки кісток [37, 38]. Незважаючи на відповідні механічні властивості для виготовлення протезів, деякі матеріали демонструють втрату інтеграції з тканинами людини [39]. Топографія поверхні є ключовим фактором успішної інтеграції метала у тканини. Процес остеоінтеграції, тобто пряме кріплення імплантату шляхом утворення кісткових тканин без розростання фіброзних тканин на межі кістка/імплантат [40] починається безпосередньо після імплантації з адсорбції білка крові та факторів росту на поверхні імплантату з подальшим приєднанням та проліферацією клітин [41]. Кісткові клітини-попередники, такі як мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) та остеобласти виробляють колаген з подальшою мінералізацією та реконструкцією кісток. У цій парадигмі топографія поверхні та гідрофільність є ключовими параметрами у визначенні взаємодії імплантат/тканина та остеоінтеграції [42].

Хоча цілісність інтерфейсу імпланта та кісткової тканини є важливою, взаємодія між м'якою тканиною ясен/слизовою та імплантатом також повинна враховуватися [43]. Слизова оболонка ротової порожнини забезпечує захист тканини пародонта, включаючи альвеолярну кістку, від бактерій та інших шкідливих подразників, але при порушенні розміщення імплантатів порушується безперервність цього бар'єру [44]. Пряме з'єднання металевого імплантату з м'якими тканинами є критичною проблемою під час з'єднання абатмента в стоматологічній хірургії. Безпосередній зв'язок і наявність проміжків між абатментом та навколишніми м'якими тканинами може призвести до розвитку інфекції та до відмови імпланту [45, 46].

Поверхня імпланту повинна бути модифікована, щоб покращити її біологічну реакцію та сприяти більш швидкому з'єднанню імплант-тканини з більшою ефективністю. А саме, шорсткість імплантів повинна посилювати прикріплення, проліферацію та диференціювання кісткових клітин-попередників, коли імплант контактує з навколишніми тканинами для прискорення прикріплення кісток [47].

Для модифікації поверхні імплантів було розроблено різні методи лікування, включаючи механічну обробку/мікромеханізацію, піскоструминну обробку, травлення кислотою, електрополірування, анодне окислення та розпилення плазмою [48], але все ще не ясно, яка оптимальна топографія для кращої остеоінтеграції. Було показано, що клітинам потрібні порожнини або канавки на поверхні імпланту, еквівалентні або більші за їх розмір, що становить ~ 30 мкм [49]. У випадку з поверхнею Ti, укрупненою піскоструминною обробкою з великою крупною з подальшим кислим травленням це неглибокі простори середнього діаметра 20-30 мкм. Клітини, культивовані на цій поверхні, переважно займали ці порожнини. Wennerberg та ін. на підставі гістологічного дослідження було встановлено, що оптимальна поверхня імплантату показала хвилясті структури із середньою довжиною хвилі 11,6 мкм та з відхиленнями у висоту на 1,4 мкм [50]. З дослідження міжмедулярної імплантації на кроликах було встановлено, що кістковому ре моделюванню більше сприяють пори 200 мкм, створені лазером, порівняно з 10–25 мкм [51]. Hulbert та ін. також спостерігали аналогічний

взаємозв'язок між остеонами і зростанням на пористій поверхні. Дослідження, проведені на керамічних імплантатах, показали, що остеонам потрібні міні-пори, діаметр яких становить від 150 до 200 мкм [52]. Також Лі та співавт. показали, що ріст кісток на розмірі пор 140 мкм дав найкращі результати серед усіх [53]. З іншого боку, Лінец-Батейлон П. виявив, що гладкі поверхні більш привабливі для клітин остеобластів MC3T3 і демонструють значну кращу проліферацію порівняно з піскоструминними імплантатами [54].

Однак було доведено, що поверхні з нанорозмірною шорсткістю мають великі площі поверхні для адсорбування білків та більше місць зв'язування з рецепторами клітинної мембрани [55]. Лай та ін. вказують, що наноструктуроване покриття Ti посилює полімеризацію білка, адгезію остеобластів або osteointegration [56], тоді як поверхні з грубими текстурами збільшують взаємозв'язок субстрат/ тканини та сприяють диференціації остеобластів. Механізми виявлення клітин та реагування на нанотехнології на поверхні імпланту досі незрозумілі. Наприклад, Лівен Лін запропонувала білкам "відчутти" топографію поверхні на нанорозмірному рівні; отже, матеріали з текстурованою поверхнею мікромасштабу можуть бути "шорсткими або ворожими" до клітин, але "гладкими та дружніми" за наявності текстурних поверхонь нанорозмірних матеріалів [57]. Тому внесок наноструктур в інтеграцію тканин імплантів все ще потребує подальшого вивчення та характеристики для того, щоб визначити оптимальний метод обробки поверхні зубних та ортопедичних імплантів.

Незважаючи на більш ніж п'ять десятиліть досліджень у цій галузі, формування однорідних LIPSS залишається проблемою. Механізми утворення LIPSS фемтосекундними лазерними імпульсами ще не повністю зрозумілі, але загальний підхід базується на концепції перешкод між падаючим лазерним променем та поверхневим плазмоном-поляритоном, що збуджується лазером, який підтримується наявністю вільних електронів у металах [58], інтерференційна картина під час лазерного імпульсу складається з періодичних максимумів загальної інтенсивності лазера на інтерфейсі метал-повітря, відбитого відштовхуванням у поверхню металу. Ці LIPSS на металевих поверхнях знайшли

багаторазове застосування в дослідженнях механіки [59], адгезії [60] та гідрофільності [61]. Однак передача технології LIPSS до реальних виробничих та медичних застосувань обмежена кількома технічними проблемами, серед яких головне значення мають контроль за регулярністю, відтворюваністю LIPSS на великих площах поверхні та низький темп виробництва LIPSS.

Хоча, Oktem та ін. запропонував новий метод генерації LIPSS під назвою «нелінійна лазерна літографія» [62]. Однак фізична модель, запропонована авторами, була зосереджена лише на тонких плівках і враховувала їх окислення; крім того, їх підхід забирає багато часу і представляє низький рівень продуктивності. Ці найважливіші проблеми все ще блокують передачу технології фемтосекунд-LIPSS до промисловості та клініки.

Плазмове електролітичне окислення (PEO) стало методом вибору для нанесення твердих, міцних та функціональних покриттів на металеві поверхні [101, 102]. Процес PEO є подібним анодування, з різницею у використанні напруги, достатньо високої, щоб пробити діелектричний бар'єр оксидного шару та розпочати динамічний процес для формування відносно товстих, твердих і пористих поверхневих оксидних шарів. Основними факторами, що визначають успіх PEO, є напруга, щільність струму та вміст електроліту. Для успішної остеointegraції поверхневі шари повинні бути нетоксичними, неімуногенними, стійкими до корозії та біосумісними. Крім того, для поверхні імплантату важливо мати оптимальну кількість гідроксиапатиту, головного мінерального компоненту кісткової тканини [103]. На сьогодні не існує всебічного розуміння процесу PEO на різних субстратах за різних умов, і не побудована вичерпна математична модель його механізму, яка могла б пояснити перетворення електричної енергії в хімічну в процесі PEO [104]. Було показано, що різні компоненти електроліту можуть впливати на утворення оксидних шарів і осадження бажаних компонентів. Раніше електроліти, що містять кальцій і фосфор, використовувались для обробки зразків металів PEO [105] та для включення таких елементів, а саме Ca і P, в біоактивні покриття. Дослідження показали, що електролітні компоненти та їх концентрації відіграють ключову роль у визначенні успіху PEO лікування [106].

Сплав Ti-6Al-4V є широко використовуваним імплантаційним матеріалом завдяки його біосумісності та відмінним механічним властивостям [107]. Однак виділення іонів металів у фізіологічне середовище та відсутність остеокондуктивності все ще є великою проблемою [108]. Отже поверхня імпланта повинна бути оброблена для підвищення стійкості до корозії та біоактивності, утворенням кальцій фосфатних покриттів [109]. Гідроксиапатит $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ є основним мінеральним компонентом кісткової тканини [110], і клінічні дослідження довели, що імпланти кульшового суглоба з ГА покриттям показують надзвичайно високі показники остеоінтеграції (понад 95% за десять років спостереження) [111, 112]. ГА зубні імпланти показали рівень остеоінтеграції від 79 до 96% за вісім років спостереження [113]. Для отримання гідроксиапатиту слід застосовувати різні види методик покриття. Серед них золь-гель [114], магнетронне розпилення [115], осадження імпульсним лазером [116], електрофоретичне осадження [117], електрохімічне осадження [118], плазмове напилення [119, 120]. Деякі з цих методів створюють покриття зі слабкою адгезією до металічної основи, тріщинами, деградацією при довгостроковій імплантації, а також потребують великих температур для синтезу, тривалого часу обробки та мають високу вартість.

Селективне лазерне плавлення - унікальна техніка адитивного виробництва тривимірних (3D) металевих деталей з різними складностями форми. Процес СЛП вимагає високого температурного градієнта, який призводить до мартенситної структури та поверхневої сфероїдизації. Технологія пошарового синтезу (ПС) дозволяє отримувати імплантати з різним топологічним дизайном у різних масштабах (від макро- до наномасштабу) [243]. Такі матеріали зазвичай називають мета-біоматеріалами. Такі скаффолди можуть імітувати натуральні субстрати завдяки регульованій геометрії пор та площі поверхні, які придатні для прикріплення клітин, їх міграції та поділу. Вони також можуть забезпечити вигнуті перегородки на біоміметичних поверхнях, які сприяють формуванню біоморфного середовища, оскільки воно може відокремлювати скупчення клітин, немовби вони були в природному позаклітинному матриці [244].

Аддитивне виробництво відкриває нові можливості для розробки кісткових скаффолдів різної структури, отриманих з широкого спектру металів. Структура, топологія та механічні властивості адитивно виготовлених (AM) метабіоматеріалів все ще перебувають у стадії інтенсивного дослідження [167]. Нова конструкція скаффолда та підвищення біологічної активності його поверхні все ще потребують удосконалення [167–170].

Одним з найпопулярніших матеріалів для виготовлення титанових імплантатів є сплав Ti6Al4V. Його модуль Юнга становить 100–105 ГПа, що перевершує кортикальну (18,6–20,7 ГПа) і трабекулярну (10,4–14,8 ГПа) кістки [171–173]. Невідповідність модуля Юнга спричиняє синдром захисту від стресу з подальшими ускладненнями, пов'язаними з імплантатом, та несправністю імплантату [171,174–177]. Біоінспіровані скаффолди зі структурою потрібної періодичної мінімальної поверхні (TPMS) пропонують можливість керувати механічними властивостями, змінюючи пористість, товщину стінки та розмір клітин AM-пристроїв для вирішення ускладнень синдрому захисту від стресу [170].

TPMS відомі своїми вдосконаленими механічними властивостями з гладкою локальною топологією і не мають шорсткості. Гладкість є результатом принципу мінімізації локальної області, що спричиняє зникнення середньої кривизни та тиску Юнга–Лапласа [178]. Скаффолди з структурою TPMS є вигідними через нульову середню кривизну. Було припущено, що процес росту тканин керується викривленням [179–181]. Це означає, що зростання збільшується з локальною кривизною, що призводить до круглого отвору незалежно від початкової форми субстрату. Крім того, пористі імплантати можуть мати остеокондуктивні властивості, як припускають деякі дослідження [180]. Масообмін та механічні властивості примітивних (P), I-WP (I), гіроїдних (G) та діамантових (D) структур були досліджені F.S.L. Bobbert [181]. Вони показали надзвичайно високу втомну міцність порівняно з іншими структурами AM. (60% їх межі плинності). Крім того, високі властивості масообміну обіцяють високі остеокондуктивні властивості. Незважаючи на численні дослідження [167,168,170,180–186], в яких досліджували масообмін, механічні властивості та поверхневе осадження скаффолдів з

структурою TPMS, необхідні додаткові дослідження, щоб отримати знання про залежність osteoconductive властивостей від мінімальний діаметр пор. Параметр мінімального діаметра пор впливає на ріст тканин, а також на властивості поверхні скаффолда [187]. Попередні дослідження показали успішне застосування конструкцій TPMS в ортопедії та регенерації кісток [181,188–192]. Проте є обмежені дані щодо osteoinductiveness та osteoconductivity щодо мінімального діаметра пор і типів структури TPMS.

Властивості поверхні імплантатів є одним із параметрів, що впливають на біоактивність. Однією з методів підвищення біоактивності є збагачення поверхні імплантату такими елементами, як кальцій і фосфор. Матеріали на основі кальцію та фосфатів, наприклад наностержень гідроксиапатиту та інші, можуть забезпечити додаткову стимуляцію адгезії та проліферації остеогенних клітин [193–197]. Різні аморфні, гідроксиапатитові та брушитові покриття підсилюють адгезію остеобластів, синтез лужної фосфатази (ЛФ) та колагену та посилюють диференціацію MSC [198–201]. Плазмове електролітичне окислення (PEO) є перспективним, точним та ефективним методом формування оксидно-керамічних покриттів на ортопедичних та дентальних імплантатах [202]. PEO дозволяє включати хімічні сполуки, розчинні у воді, або керамічні частинки з анодного розчину. Цей метод може скоротити час і вартість лікування, а також забезпечити міцну адгезію між металевими підкладками та покриттями, які, як було встановлено, стійкі до руйнування під час експлуатації імплантату [203]. Незважаючи на хімічний склад, поверхня PEO може забезпечити додаткові мікропори для посилення клітинних, зокрема, наночастинок срібла, в металевих імплантатах під час процесу PEO [183,204], щоб забезпечити додаткові антибактеріальні властивості. Інфекції, асоційовані з імплантатом, несуть високий ризик безуспішного медикаментозного лікування, особливо утворення стійких бактеріальних біоплівки [205]. Цілеспрямована доставка в зону навколо імплантату сприяє досягненню терапевтичних рівнів концентрації антибактеріальних препаратів [183,206]. Наночастинок срібла виявляють виражену бактерицидну активність для еукаріотичних клітин, що впливає на osteointegration. Ця

властивість сприяла широкому використанню срібла в ортопедії [183,206]. Срібло широко використовується як антибактеріальне покриття завдяки своїм чудовим антимікробним властивостям проти широкого спектру мікробів, включаючи грампозитивні та грамнегативні бактерії [207]. Однак було виявлено, що антибактеріальні покриття AgNP з високою концентрацією срібла також є цитотоксичними та інгібують osteointegration [208,209], тому необхідно збалансувати концентрацію наночасток.

ПЕО титану або його сплавів широко описано в літературі [210,211]; однак, недостатньо інформації про анодування надрукованих скаффолдів СЛП на основі титану [212,213].

2 ХІМІЧНА ТА СТРУКТУРНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПІСКОСТРУМИННОЇ ПОВЕРХНІ ЗУБНИХ ІМПЛАНТІВ З ВИКОРИСТАННЯМ ZrO_2 РІЗНОЇ ФОРМИ

Метою даної роботи було визначення кращого складу та форми абразиву, а також режиму обробки модифікацій піскоструминної обробки ZrO_2 поверхні внутрішньокісткової частини зубного імпланту.

2.1 Матеріали і методи

2.1.1 Матеріали

В експерименті ми використовували сплав KTZ-125 системи цирконію-ніобію ($Zr-2,5 \text{ wt.} \% Nb$), що був отриманий із Остеоплант (OsteopantR&D, Dębica, Польща). Для піскоструминної обробки були підготовлені циліндричні зразки, з діаметром 7 мм, висотою 3 мм. Перед обробкою зразки піддавали механічному шліфуванню та поліруванню. Тетрагональні ($T-ZrO_2$) та кубічні ($C-ZrO_2$) гранули діоксиду цирконію з розміром фракції 250 мкм використовувались як піскоструминний агент (підготовлені в Інституті проблем матеріалознавства, Київ, Україна). Гранули були отримані з порошку нанокристалінового діоксиду цирконію, який був комплексно стабілізований оксидами ітрію та церію ($ZrO_2-Y_2O_3-CeO_2$).

Усі речовини та реагенти для експерименту із культурами клітин були замовлені у Gibco[®], США (Gaithersburg, Меріленд). Первинні культури людських остеобластів отримано від медичної компанії Пауа (Київ, Україна).

2.1.2 Процес піскоструминної обробки

Абразивна обробка поверхні була проведена за допомогою Heraeus Combilabor Kulzer камера CL-FSG94. Діаметр насадки піскоструминного пістолету - 1,2 мм, тиск повітря - 4 та 6 атм, відстань від насадки до поверхні зразка - 1,3 см, а кут бомбардування становив 90° . Час обробки дорівнював 5 с.

2.1.3 Хімічний склад сплаву

Рентгенівський флуоресцентний аналіз (XRF, CarlZeiss, Oberkochen, Німеччина) з використанням спектрометру VRA-20 застосовувався для визначення хімічного складу поверхні до та після піскоструминної обробки.

2.1.4 Оцінка поверхневої ерозії

Для оцінки ерозивного зносу (Er), усі зразки були зважені до та після обробки, далі була використана формула 1:

$$Er = \frac{M_i}{S} - \frac{M_p}{S} \quad 1)$$

де M_i – початкова вага зразка, мг;
 M_p – вага зразка після обробки, мг;
 S – площа зразка, см²

2.1.5 Оптична мікроскопія

Для візуалізації геометричної форми абразиву та для оцінки її ефекту на поверхню зразків сплавів було використано оптичний мікроскоп ZeissAxiovert 40 (Zeiss, Oberkochen, Німеччина), зі збільшенням 50×, 100× та 200×. Аналіз розподілу імплантованих частинок було виконано за допомогою програмного забезпечення для обробки зображень ImageJay (V 2.0).

2.1.6 Скануюча електронна мікроскопія

Для аналізу морфології поверхні після обробки та хімічного складу було використано скануючий електронний мікроскоп Tescan Mira 3LMN (Tescan, Чехія). Використовувалися режими вторинного електрону (режим геометрії поверхні) та відбитого електрону (режим фазового контрасту). У режимі оцінки поверхні зростаючий вольтаж для визначення топографії -10 кеВ, струм електронного пучка - 10А, а діаметр пучка – 0,03 мкм. Вцьому випадку, збільшення було виставлено на

500-30000 разів. Хімічний аналіз поверхні було виконано за допомогою енергодисперсного аналізатора (EDA) EDSOxfordX-max 80 мм² (Oxford-instruments, Oxford, Великобританія) зі зростаючим вольтажем 20 кеВ.

2.1.7 Вимірювання шорсткості поверхні

Значення R_a були з'ясовані за допомогою профілометру Mahr (MahrGmbH, Göttingen, Німеччина). До вимірювання усі зразки були обмиті 96% етанолом в ультразвуковій ванні Emmi-20HC (EMAG, Mörfelden-Walldorf, Німеччина). Довжина вимірювання склала 1,5 мм та була виконана у трьох повторях.

2.1.8 Вимірювання контактного кута

Експерименти по вимірюванню контактного кута (КК) були виконані з використанням базованого на відео оптичного інструменту вимірювання контактного кута (OCA 15 EC, DataPhysics, SanJose, Каліфорнія, США). Дані КК були записані для ультра-чистої води мінімум трьох паралельних зразків.

2.1.9 Експеримент на культурах клітин

Зразки до та після піскоструминної обробки (шість в кожній групі) діаметром 10 мм були простерилізовані у 70% етанолі протягом 3 годин при кімнатній температурі, обмиті у фосфатно буферному розчині двічі, а потім поміщені у 24-лункові планшети. Було використано Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) з L-глутаміном із вмістом пеніциліну 100 одиниць/мл, стрептоміцину – 100 мкг/мл, амфотерицину В – 2,5 мкг/мл, 10% фетальної бичачої сироватки 1,0 нг/мл bFGF було додано до кожної лунки, а потім інкубувалося при 37 °C у зволоженому середовищі із 5 % CO₂. Після 24 годин людські остеобласти висівалися по 10⁴ клітин на зразок у 2 мл DMEM/F-12. Зразки з клітинами інкубувалися при 37 °C з 5% CO₂, а розчин змінювався кожні два дні протягом семиденного періоду. Усі експерименти були виконані у трьох повторях.

Аналіз із Alamar Blue (AB) був використаний для визначення життєздатності клітин на перший, третій та сьомий день після висівання. Розчин прибрали з кожної

лунки та промили PBS (phosphate-buffered saline). 1 мл розчину Alamar Blue™ було додано до кожного матрацу, а потім проінкубовано протягом двох годин. Від кожного матрацу було зібрано по дві аліквоти по 200 мкл розчину AlamarBlue™, а потім виміряно поглинання на спектрофотометрі, з довжиною хвилі 570 та 600 нм.

2.1.10 Статистична обробка даних

Дані були представлені як середні \pm стандартне відхилення. Для оцінки статистичної значимості різниці було використано t-тест Стьюдента для непараметричних даних. Статистична значимість припускається на рівні 95% ($p < 0.05$).

2.2 Результати

2.2.1 Оптична мікроскопія

Як описано вище, ми використали два типи ZrO_2 абразивів – тетрагональної та кубічної форми для піскоструминної обробки. У таблиці 1 указані індивідуальні фізичні характеристики абразивів.

Таблиця 2.1 – Порівняльна характеристика абразивів

Характеристика	Абразив	
	ZrO_2 Тетрагональний	ZrO_2 Кубічний
Щільність, г/см ³	6.0-6.05	6.5-10
Модуль розриву при згинанні, МПа	750-1050	–
Модуль Юнга, ГПа	200-210	–
Твердість по Вікерсу, ГПа	12-13	–
Стійкість до розтріскування, МПа ^{1/2}	8.0-10.0	–
Твердість Моха	–	7.5-8.5

Оптична мікроскопія частинок ZrO показує (рис. 2.1), що абразив на основі Т- ZrO_2 , має закруглену форму з малими гострими виступами по всій поверхні, а частинки С- ZrO_2 мають гострі краї та нерівну поверхню. На основі механічних та

морфологічних параметрів вони можуть представляти різні ефекти для поверхні імплантів в результаті піскоструминної обробки.

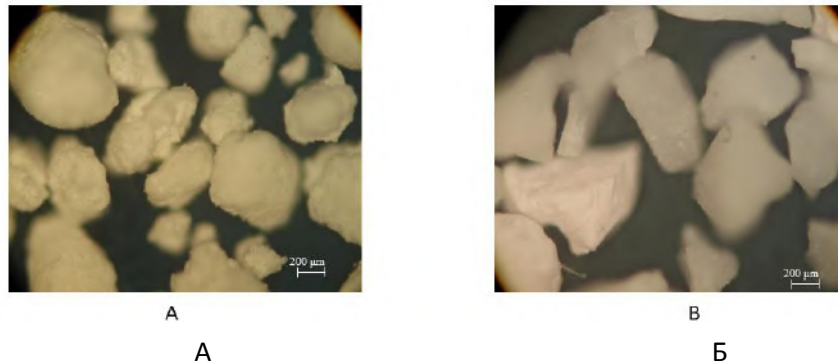


Рисунок 2.1 – Зображення оптичної мікроскопії Т–ZrO₂ (А) та С–ZrO₂ (Б) частинок, що використовувалися для піскоструминної обробки. ×1000

Характеристики поверхні, як і розподіл частинок після піскоструминної обробки з використанням абразиву ZrO, залежать від форми частинок та прикладеного тиску. Імплантація частинок абразиву розміром до 50–100 мкм, є типовою для всіх зразків після піскоструминної обробки. Однак, збільшення тиску від 4 до 6 атм. протягом піскоструминної обробки призводить до поодинокі імплантації частинок 200 мкм до обох типів абразиву. Обробка сплаву порошком Т–ZrO₂ за умов тиску 4 атм. призводить до покриття 24% поверхні абразивними частинками (рис. 2.2 а). Однак, якщо тиск зростає до 6 атм., то розподіл частинок знижується – лише 17% поверхні вкрито частинками ZnO. Для порошку С–ZrO₂, ми виявили протилежну залежність – зростання тиску призводить до зростання розподілу частинок від 14% до 29% (рис. 2.2 в, г).

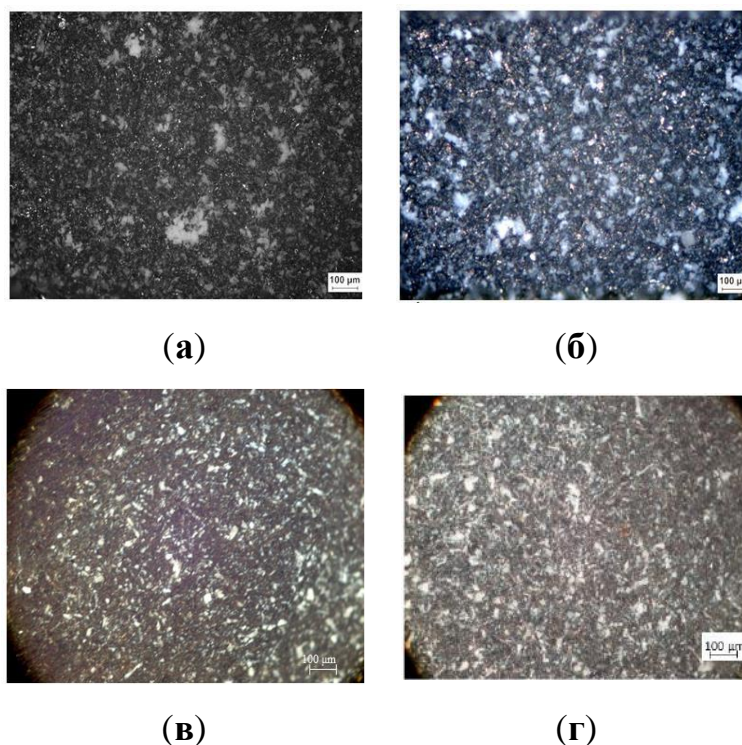


Рисунок 2.2 – Зображення оптичної мікроскопії піскоструминно обробленої поверхні з використанням частинок T-ZrO₂ ((а) 4 атм.; (б) 6 атм.) та C-ZrO₂ ((в) 4 атм.; (г) 6 атм.) ×200

2.2.2 Хімічний склад поверхні після обробки

Хімічний склад інтегрованої поверхні визначався як середнє значення трьох обраних областей. Дані вказують на рівномірну тенденцію до зростання масової частки кисню у зразках, що були оброблені частинками ZrO₂. Це може свідчити (рис. 2.3) про збільшення масової частки кисню після обробки обома типами абразивів ZrO₂. Помітне зниження вмісту базових елементів цирконієво-ніобієвого сплаву у поверхневому шарі вказує на збільшення товщини області з модифікованою поверхнею. В той же час, вміст кисню зростає до масової частки 20, що можливо означає формування щільної оксидної плівки чи додаткове включення кисню після піскоструминної обробки з використанням ZrO₂. Застосування порошку T-ZrO₂ призводить до зростання масової частки кисню до 23%, у порівнянні з C-ZrO₂. Аналіз місцевого хімічного складу було виконано на обраних областях для ідентифікації фаз включення. На рис. 2.3 показані різні типи областей поверхонь зразка після обробки порошком T-ZrO₂ та області хімічного

аналізу. Місцевий аналіз дозволяє ідентифікувати включення частинок абразивів (Spectrum 1), зараження (Spectrum 2), та області поверхні сплаву, що не були значимо пошкоджені (Spectrum 3).

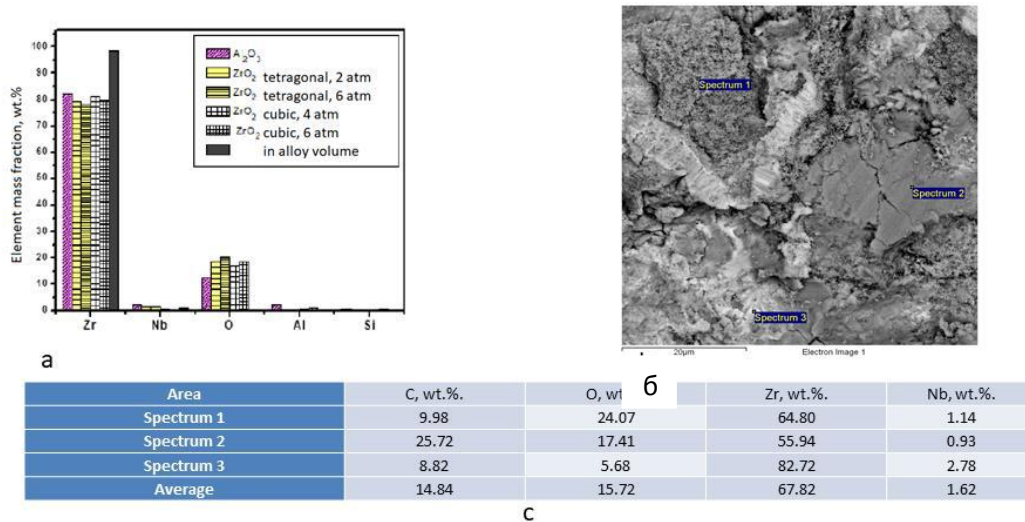


Рисунок 2.3 – Хімічний склад поверхнево шару сплаву в залежності від типу абразиву та режиму обробки. (а) – Рентгенофлуоресцентний аналіз. (б) – Таблиця хімічного аналізу областей поверхні зразка, обробленого Т– ZrO_2 при тиску 6 атм. та (в) – EDX обраних областей (із б)

2.2.3 Скануюча електронна мікроскопія

Аналіз поверхні у режимі вторинного електрона дозволяє спостерігати контраст у висоті, оскільки темні плями відповідають западинам, а світлі плями – підняттям (рис. 2.4). Після обробки сплаву порошком Т– ZrO_2 , формується поверхня з лакунами та виступами близько 50 мкм. Тимне менш, при великому збільшенні, потрібно відмітити, що пори приблизно 0,5 мкм, що сформувалися на поверхні після обробки при тиску в 4 атм., руйнуються коли тиск зростає до 6 атм. (рис. 2.4 в). Очевидно, частинки мають вищу швидкість і більшість частинок взаємодіє з лицьовою стороною не перпендикулярно, а по дотичній, і такі частинки залишають відповідні сліди на поверхні.

Ефект абразиву С– ZrO_2 на поверхню зразка схожий із ефектом абразиву Т– ZrO_2 (рис. 2.4 б, г). При детальному вивченні структури помітно утворення правильних структур розміром 0,5 мкм, але поряд з цим видно також сліди

крупнорозмірних частинок порошку, що взаємодіють з поверхнею при дотичній (рис. 2.4 б). При підвищенні тиску, ці структури перестають формуватися, очевидно, через високу енергію взаємодії (рис. 2.4 г).

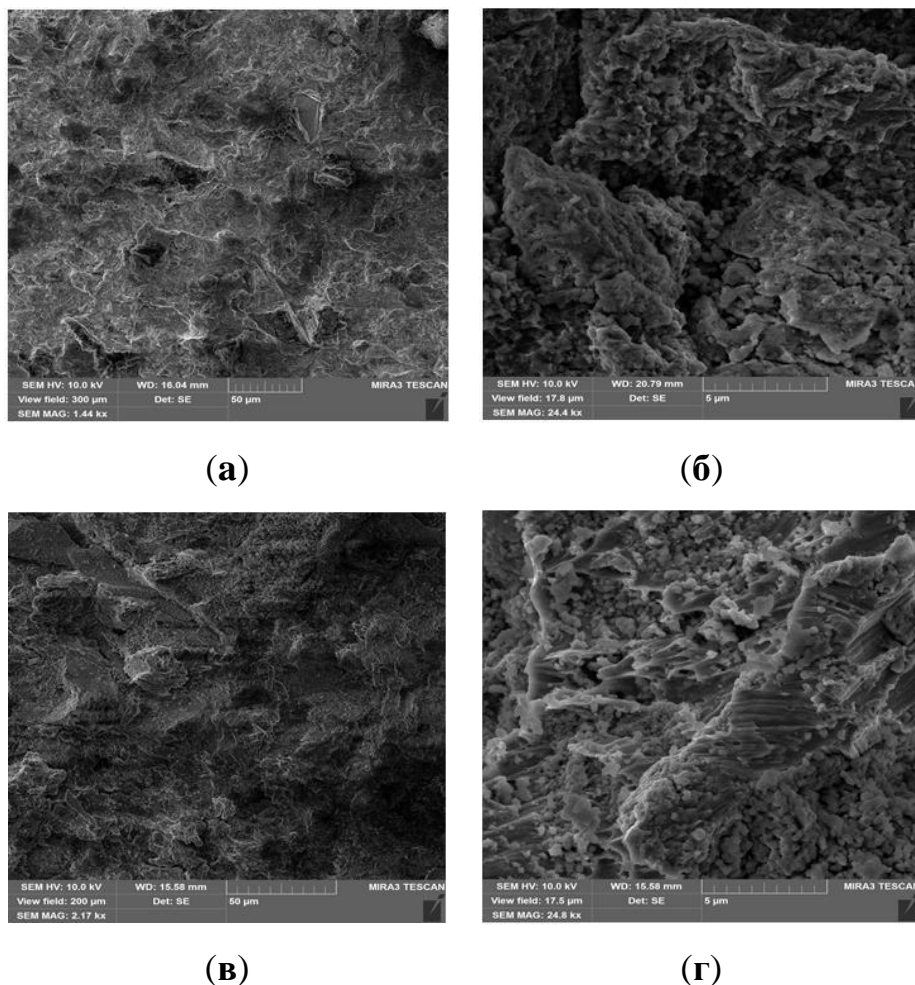


Рисунок 2.4 – Скануюча електронна мікроскопія зразків після піскоструминної обробки з використанням T–ZrO₂ (а,в) та порошку T–ZrO₂ (б,г) в різних режимах:

(а,б) – 5 с із тиском у 4 атм, (в,г) – 5 с із тиском у 6 атм

2.2.4 Контактний кут та шорсткість

Середні значення R_a у всіх експериментальних групах значно зросли у порівнянні із полірованими. Різниці між тисками, використаними для піскоструминної обробки, виявлено не було. Частинки C–ZrO₂ дали значно меншу шорсткість у порівнянні з частинками T–ZrO₂ (таб. 2.2).

КК полірованої поверхні склав $92,17^{\circ} \pm 2,78^{\circ}$ та значно знизився у обох T–ZrO₂ ($76,83^{\circ} \pm 2,63^{\circ}$ та $82,13^{\circ} \pm 5,10^{\circ}$) та у C–ZrO₂, обробленими при 4 атм. ($81,17^{\circ} \pm 4,66^{\circ}$). Порошок кубічного ZrO₂, обробленого при 6 атм., веде до незначного зниження КК до $86,5^{\circ} \pm 3,20^{\circ}$ ($p=0.10$). Небуло виявлено значної різниці у КК між зразками, що були оброблені при різному тиску ZrO₂ однакової форми.

Таблиця 2.2 – Результати вимірювання значень R_a (мкм) та КК (°) після обробки частинками різної форми та різним часом

Параметр	Поліровані	ZrO ₂ Тетрагональні		ZrO ₂ Кубічні	
		4 атм.	6 атм.	4атм.	6 атм.
Значення R_a (мкм)	0.45 ± 0.092	3.57 ± 0.12	3.86 ± 0.35	2.19 ± 0.28	2.76 ± 0.44
КК (°)	92.17 ± 2.78	76.83 ± 2.63	82.13 ± 5.10	81.17 ± 4.66	86.5 ± 3.20

2.2.5 Експеримент на культурах клітин

Тест на життєздатність клітин не показав клітинної токсичності у всіх поверхнях, але прикріплення та швидкість проліферації були значимо різними, в залежності від групи. При порівнянні позитивного контролю – пластик для культури клітин (ТСП), швидкість прикріплення клітин (процент життєздатних клітин) на 1 день була значно ($p \leq 0.001$) нижча у полірованої немодифікованої ZrNbповерхні. Поверхня, що була оброблена частинками T–ZrO₂ показує значно більшу життєздатність клітин, ніж полірована ($p \leq 0.001$) та оброблена частинками C–ZrO₂ ($p=0.023$). Ми не побачили ніякої значної різниці у кількості клітин між зразками, що були оброблені при 4 та 5 атм. (рис. 2.5).

На 3 та 7 день, ми спостерігали проліферацію клітин у всіх зразках, але остеобласти краще проліферують на піскострумінно оброблених поверхнях (рис. 2.5 В, С). Мінімальна кількість клітин була виявлена на полірованих поверхнях через погане прикріплення в 1 день. В обох точках часу не виявлено різниці у життєздатності клітин між поверхнями ТСП та T–ZrO₂. Необхідно відмітити, що на 7 день остеобласти проліферували набагато краще зі значною різницею ($p \leq 0.01$) на

T–ZrO₂ у порівнянні з C–ZrO₂ і без різниці між зразками, що були оброблені при 4 та 5 атм.

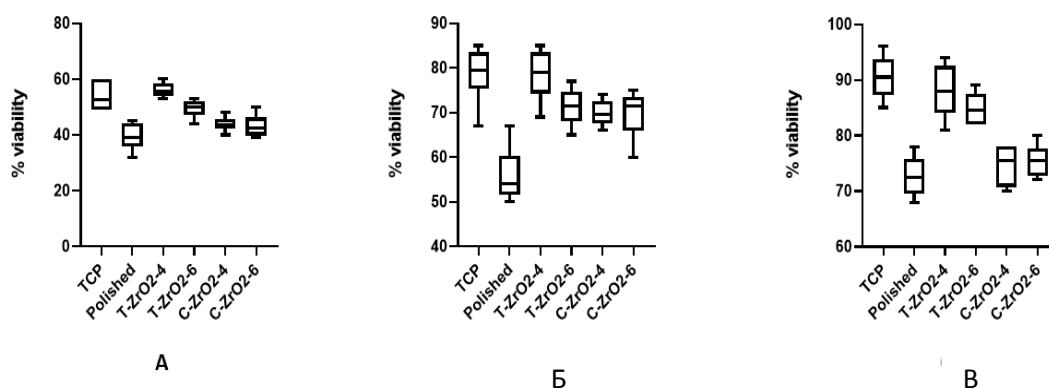


Рисунок 2.5 – Тест на життєздатність клітин людських остеобластів на різних поверхнях у день 1 (А), 3 (Б) та 7 (В); $N=3$

2.3 Обговорення

Топографія та хімія поверхні є обов'язковими параметрами для взаємодії між імплантом та оточуючими тканинами через їх вплив на обмін іонів, поглинання білків, адгезію та взаємодію клітин. Існує багато доказів про те, що шорстка поверхня значно збільшує остеогенні властивості різних матеріалів [63]. Топографія поверхні є ключовим фактором для успішної метало-тканинної інтеграції. Процес прямого закріплення імпланту формуванням кісткової тканини навколо імпланту без росту сполучної тканини на поверхні кістки/імпланту називається остеоінтеграцією [64]. Цей процес починається безпосередньо після імплантації починаючи з абсорбції на поверхні імпланту білків крові та факторів росту з подальшим прикріпленням та проліферацією клітин [65]. Клітини-попередники кісткових клітин, як мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) та остеобласти, продукують колаген із подальшою мінералізацією та ремоделюванням кістки. У цьому випадку, топографія поверхні та гідрофільність є ключовими параметрами у визначенні імплант/тканина взаємодії та остеоінтеграції [66].

Конструкція поверхонь із високою хвилястістю і пористістю у мікромасштабі дозволяє вrostання кісток та індукує сильне з'єднання кісток, тим самим

покращуючи механічний супротив та стабільність імпланта [67]. Були розроблені різні режими обробок для модифікації поверхні імплантів, включаючи машинну/мікромашинну обробку, піскоструминну обробку, травлення кислотою, електрополірування, анодну оксидацію та плазменне напилення [68].

Стабільність поверхні після обробки є ключовим фактором клінічного успіху. Деякі автори [69] знайшли, що більшість невдалих імплантів характеризуються ураженою поверхнею, на якій було знайдено велику кількість вбудованих мікрочастинок Al_2O_3 , так як і рідкоземельних оксидів. Більш того, у кістковій матриці були знайдені іони титану та алюмінію.

У цій статті ми оцінили можливе використання порошку ZrO_2 кубічної та тетрагональної форми для піскоструминної обробки імплантів на основі $ZrNb$ у різних режимах – 4 та 6 атм. Основну увагу приділили стабілізації комплексу цирконію діоксиду з ітріумом та церієм оксидом. Це є необхідним для попередження процесу «старіння», наприклад деструкція біоінертних матеріалів на основі ZrO_2 у живому організмі через неконтрольовану фазову трансформацію тетрагональної модифікації ZrO_2 у моноклінічну модифікацію ZrO_2 у вологому середовищі [70].

Наші дані показують, що застосування ZrO_2 обох форм не вплинуло на хімічний склад імпланта, але додало деяку кількість додаткового кисню, що можливо спричинене вбудуванням ZrO_2 . Хімічна взаємодія металу з абразивом, сильне зчеплення частинок із поверхневим шаром та додаткова оксидація поверхні спостерігаються у поверхневих шарах, що активуються таким чином [68, 72].

Піскоструминна обробка з використанням порошку ZrO_2 тетрагональної форми значно зменшує контактний кут імпланта, що є одним із вирішальних факторів остеоінтеграції. Гідрофільна (КК менше ніж 90°) поверхня може забезпечити кращу абсорбцію білка після процедури імплантації. Експеримент із культурою клітин підтримує ці данні і показав кращу адгезію клітин та їх проліферацію на піскоструминно обробленій поверхні, особливо на субстраті, що був оброблений ZrO_2 тетрагональної форми.

З ВІДПОВІДЬ КЛІТИН І ТКАНИН НА НАНОТЕКСТУРОВАНІ ІМПЛАНТИ Ti6Al4V ТА Zr З ВИКОРИСТАННЯМ ВИСОКОШВИДКІСНИХ ФЕМТОСЕКУНДНИХ ПЕРІОДИЧНИХ ЛАЗЕРНИХ ПОВЕРХНЕВИХ СТРУКТУР

Завданням цього дослідження є оцінка біологічної реакції клітинних моделей *in vivo* та *in vitro*, прикріплених до поверхні зразків Zr та титанових сплавів, наноструктурованих фемтосекундними лазерними імпульсами. Запропонований метод наноструктурування: високорегулярний LIPSS (HR-LIPSS) зберігає якість наноструктур на значній площі нанотекстурованої поверхні при безпрецедентній швидкості обробки близько 15 мм²/с [70, 71], HR-LIPSS поєднує в собі мікронну шкалу LIPSS з низькою просторовою частотою (LSFL) з нанорозмірною шорсткістю і, як очікується, буде дуже сприятливим для остеоінтеграційних процесів. Запропонований підхід, який може гарантувати високу надійність та швидкість пропускну здатності досліджується з точки зору життєздатності та проліферації клітин з метою оцінки потенційних можливостей застосування для хірургічних та зубних імплантатів.

3.1 Матеріали та методи

3.1.1 Матеріали

Титановий сплав 5-титанового типу (Ti6Al4V) та цирконій (Zr, чистота 99,7%) були придбані у Інституту Курдюмова, НАНУ. Стрижні діаметром 10 мм вирізали циліндричними плитами товщиною 2 мм. Згодом поверхні плит механічно відшліфували, що створило наступні параметри шорсткості поверхні (табл. 2.1).

3.1.2 Налаштування лазера та текстурування поверхні LIPSS

HR-LIPSS були відбиті на відшліфованих зразках Ti6Al4V і Zr за допомогою лазерної системи, легованої твердим станом, легованої фаросом Pharos, Pharos. Він подає 213 fs імпульсів при центральній довжині хвилі 1030 нм зі спектральною шириною 15 нм (FWHM). При частоті повторення імпульсу 600 кГц середня

вихідна потужність становить до 20 Вт. Загальна схема налаштування лазерних променів показана на рис. 3.1.

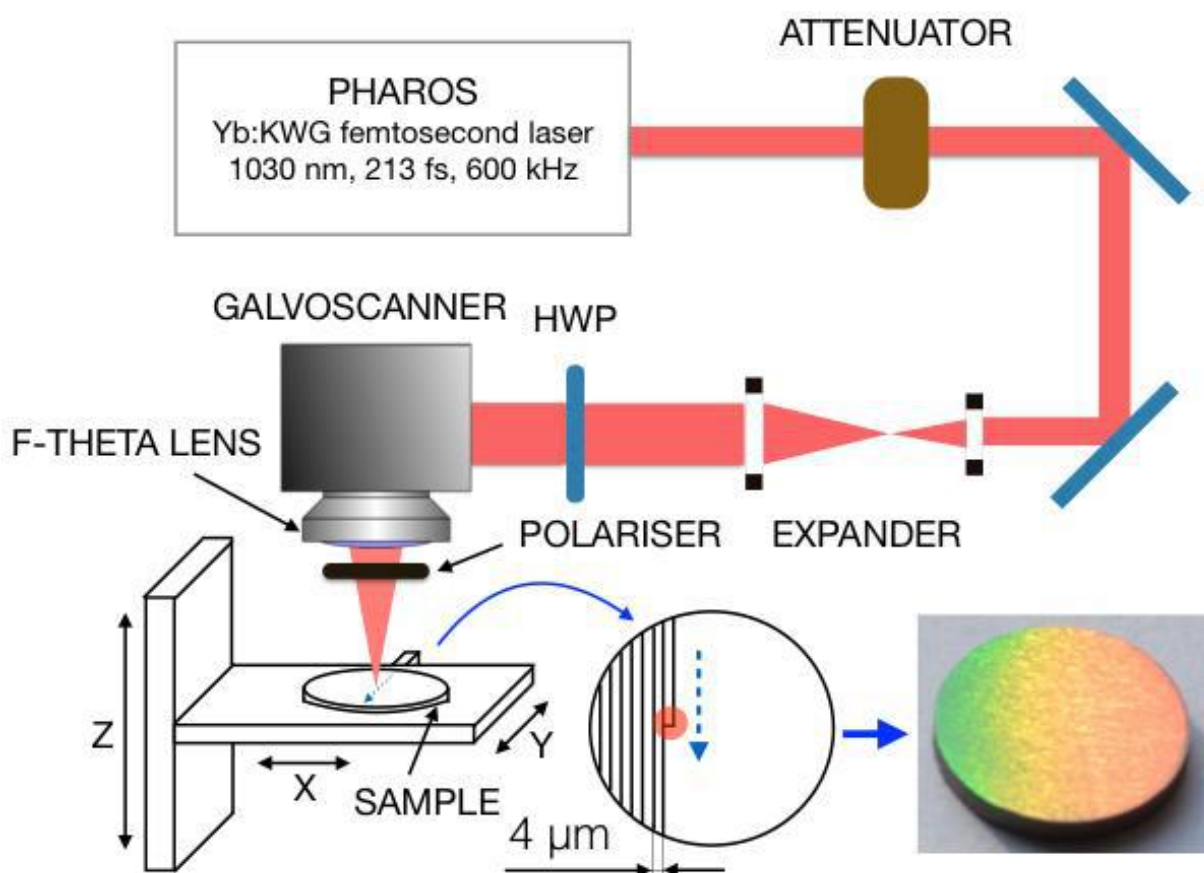


Рисунок 3.1 – Налаштування лазера

Потім лазер був з'єднаний з системою сканування гальванометра (ProSeries Cambridge Technology), оснащеною f-тета-лінзою з фокусною відстані 56 мм, в результаті чого номінальний радіус лазерної плями при $1/e$ інтенсивності 3,67 мкм. Цей параметр дозволяє сканувати металеву поверхню з лінійною швидкістю 3 м/с і еквівалентною швидкістю виробництва близько 900 мм²/хв. Лазерний промінь, орієнтований на зразки, був сканований з двонаправленою стратегією з метою рівномірного покриття всіх круглих зразків. Набір параметрів представлений у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1–Параметри лазера

Матеріал	Середня потужність, mW	Швидкість, мм/с	Крок, мкм	Тривалість пульсації, fs	Частота повторень, kHz	Вплив, J/cm ²
Ti6Al4V	400	3000	4	213	600	1
Zr	400	3000	4	213	600	0.7

Приклад поверхні, обробленої HR-LIPSS на цирконі, показаний на рис. 3.1. Як видно з першого погляду, поверхня виглядає райдужною, що чітко вказує на наявність субмікрометрових періодичних структур. Райдужка розподілена рівномірно, що свідчить про хорошу рівномірність у великих масштабах.

3.1.3 Характеристика поверхні зразків, оброблених HR-LIPSS

Морфологію поверхні досліджували за допомогою зображень вторинних електронів та користувацьких режимів, використовуючи FEI Nova Nano SEM 450 з X-EDS Bruker QUANTAX-200. Поперечні перерізи були отримані та охарактеризовані аналітичною системою подвійного променя FEI Scios ультрависокої роздільної здатності, яка досягла підповерхневого шару за допомогою методики сфокусованого іонного пучка (FIB). Морфологія поверхні була зображена AFM. Шорсткість поверхні виражалася середньоарифметичною висотою (Ra) та максимальною висотою (Rz) відповідно до стандарту ISO 4287 і обчислювалася з п'яти різних профілів. Хімічний склад поверхонь, оброблених лазером, досліджувався за допомогою рентгенівської фотоелектронної спектроскопії (XPS) за допомогою спектрометра КРАТОС XSAM800, що працює в режимі фіксованого аналізатора (FAT). Експериментальні умови та деталі обробки даних були описані в інших роботах [72]. Для обчислення атомних концентрацій використовували коефіцієнти чутливості Ti 2p: 2,098, Al 2p: 0,257, Zr 3d: 2,796, O 1s: 0,736, і C 1s: 0,318.

3.1.4 Вимірювання контактного кута

Експерименти з вимірюванням контактного кута (КК) проводилися за допомогою відеовимірювального приладу для вимірювання кута оптичного контакту (OCA 15 EC, DataPhysics, США). Дані СА були записані для надчистої води для щонайменше трьох паралельних проб.

3.1.5 Експеримент на культурах клітин

Зразки з модифікованими та немодифікованими поверхнями (по 7 в кожній групі) діаметром 10 мм стерилізували 70% етанолом протягом 3 год при кімнатній температурі, двічі промивали PBS та поміщали в 24-лункові планшети. Було використано Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM; Invitrogen, кат. 11960) з доповненням 10% фетальної сировини великої рогатої худоби (FBS; Invitrogen,), 2 мМ L-глутаміну (Invitrogen, кат. № 25030), 0,1 мМ 2-меркаптоетанолу (Сигму, кат. № M7522), 50 од/мл пеніциліну та 50 г/мл стрептоміцину (Invitrogen, кат. № 15070) додавали у кожен лунку та інкубували при 37 °С у зволоженому середовищі з 5% CO₂. Через 24 години HDFa (людські дермальні фібробласти-дорослі) висівали по 10⁴ клітини на зразок у 2 мл DMEM. Зразки з клітинами інкубували при 37 °С з 5% CO₂, а середовище змінювали кожні 2 дні протягом 10-денного періоду культивування. Усі експерименти були триразовими.

3.1.6 Життєздатність клітин

Аналіз Alamar Blue (AB) використовувався для оцінки життєздатності клітин на 3, 7, 10 і 30 день після висіву. Носій видаляли з кожної лунки і промивали PBS. По 1 мл розчину Alamar Blue™ додавали до кожної лунки та інкубували протягом 2 годин. Два аліквоти по 200 мкл розчину Alamar Blue™ збирали з кожного матраца і зчитували на довжині хвилі 570 нм у ридері для отримання базових значень колориметричної абсорбції.

3.1.7 Модель на тваринах

Усі процедури на тваринах були затверджені Комісією з біомедичної етики Сумського державного університету (№ 14/06 від 14.06.2015). До експерименту були залучені 30 лабораторних щурів-чоловіків віком 8-9 місяців. Тварин розміщували при температурі 22 ± 2 °С, протягом 12 год циклу світло/темрява, їжу та воду тварини отримували за потреби. Утримання тварин та експерименти проводились відповідно до Директиви 2010/63/ ЄС Європейського Парламенту та Ради від 22 вересня 2010 року про захист тварин, що використовуються для наукових цілей.

Всі тварини були розділені на дві групи (по 15 в кожній) за типом сплаву:

1. Група 1 (контроль) - сплав Ti (підгрупа 1) та Zr (підгрупа 2) з гладкою полірованою поверхнею;
2. Група 2 - сплав Ti (підгрупа 1) та Zr (підгрупа 1) з модифікованою поверхнею.

Процедура імплантації включала (рис. 3.2): після загальної анестезії (кетамін, 10 мг на кг ваги тварини) та катетеризації периферичних вен, спину тварин голили. Місце хірургічного втручання обробляли розчином С-4 (перекис водню та мурашина кислота), після чого робився поздовжній розріз. Підшкірні тканини відокремлювали від шкіри над лівою лопаткою і імплантати поміщали під шкіру на відстані 1,0 см від розрізу. Перед імплантацією всі зразки стерилізували в 70% етанолі протягом 30 хв і двічі промивали в PBS. Рану закривали простими перерваними швами і накладали асептичну пов'язку.

Після операції всіх тварин утримували в індивідуальних контейнерах для запобігання додаткової травми місця проведення операції. Тварин виводили з експерименту шляхом передозування наркозу (кетамін, 70 мг на 1 кг ваги тварини) через 10 (15 щурів) та 30 (15 тварин) днів після імплантації.

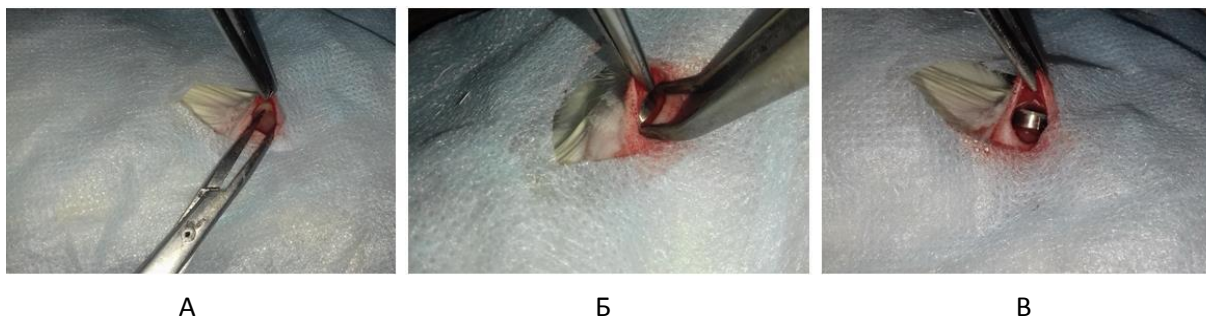


Рисунок 3.2 – Процедура *invivo* для імплантації диска Ti і Zr. А - утворення підшкірної кишені, Б - процедура імплантації та В - положення металевого диска після імплантації.

3.1.8 Оцінка результатів *invivo* з використанням скануючої електронної мікроскопії

Зразки видаляли обережно, щоб запобігти пошкодженню тканин, які покривали імплантати. У разі утворення капсули (2 контрольні проби) їх вирізали, а імплантати видалили. Всі зразки поміщали в 5% формальдегід на 1 год, зневоднювали в розчинах етанолу і сушили у вакуумній установці. Щоб уникнути накопичення поверхневого заряду на поверхні м'яких тканин, всі зразки покривали тонким (30–50 нм) шаром срібла у вакуумній установці VUP-5M (SELMI). Скануючу електронну мікроскопію проводили за допомогою електронного мікроскопа REMMA102 (SELMI).

Для аналізу експериментальних результатів були враховані наступні аспекти:

1. Наявність клітин і волокон на поверхні зразка та їх розподіл;
2. Щільність клітин на 1 мм²;
3. Розмір волокон.

3.1.9 Статистична обробка даних

Для оцінки різниці між групами було використане програмне забезпечення GraphPad Prism 8.0, oneway ANOVA з декількома порівняннями. Статистичну значимість передбачали на рівні достовірності 95% ($p < 0,05$).

3.2 Результати

3.2.1 Морфологічний аналіз

Морфологія HR-LIPSS щодо чистого сплаву Zr та Ti була досліджена з використанням SEM. Зображення (рис. 3) показують, що наноструктури були успішно отримані на всіх оброблених ділянках і вони виглядають однорідно розподіленими та регулярними. На чистому сплаві Zr і Ti немає біфуркацій, хоча очевидні деякі наночастинки перероблених матеріалів. Напрямок нанорозрядів перпендикулярний до лазерної поляризації. Періоди наноструктур складають 800 ± 42 нм для Zr та 820 ± 36 нм для сплаву Ti. Шорсткість зразків, отриманих з профілів AFM, наведена в таблиці 3.2.

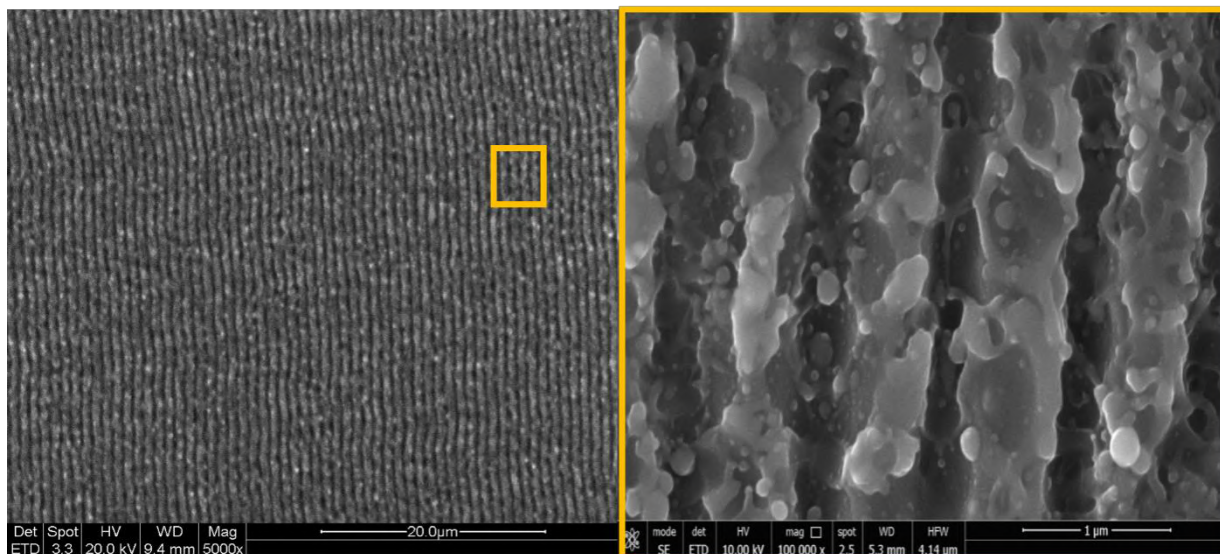
Таблиця 3.2–Параметри шорсткості

Параметри шорсткості, мкм	Відшліфований Ti6Al4V	Відшліфовани Zr	LIPSS на Ti6Al4V	LIPSS на Zr
Ra	0.006	0.007	0.131	0.148
Rz	0.013	0.017	0.316	0.386

На підставі поперечних перерізів FIB, представлених на рисунках 4 та 5 для Zr та Ti6Al4V відповідно, товщина пульсацій в основну масу становить приблизно 300-350 нм для обох матеріалів. Відповідно до SEM-зображень поверхні, регулярність періодичних структур в поперечному перерізі вища для сплаву Ti, ніж для Zr. Що є у відповідності з коефіцієнтом затримки [73] і може бути обумовлено більш коротким періодом плазмоно-поляритонної хвилі на поверхні Ti порівняно з Zr.

Як показано на картах EDX як сплав Ti, так і Zr в глибині поперечного перерізу зразка кисень однаково змішується з титаном (рис. 3.4) і цирконієм (рис. 3.5). Над періодичними структурами на Ti і Zr є видима тонка плівка кисню, що також підтверджується результатами XPS.

a)



б)

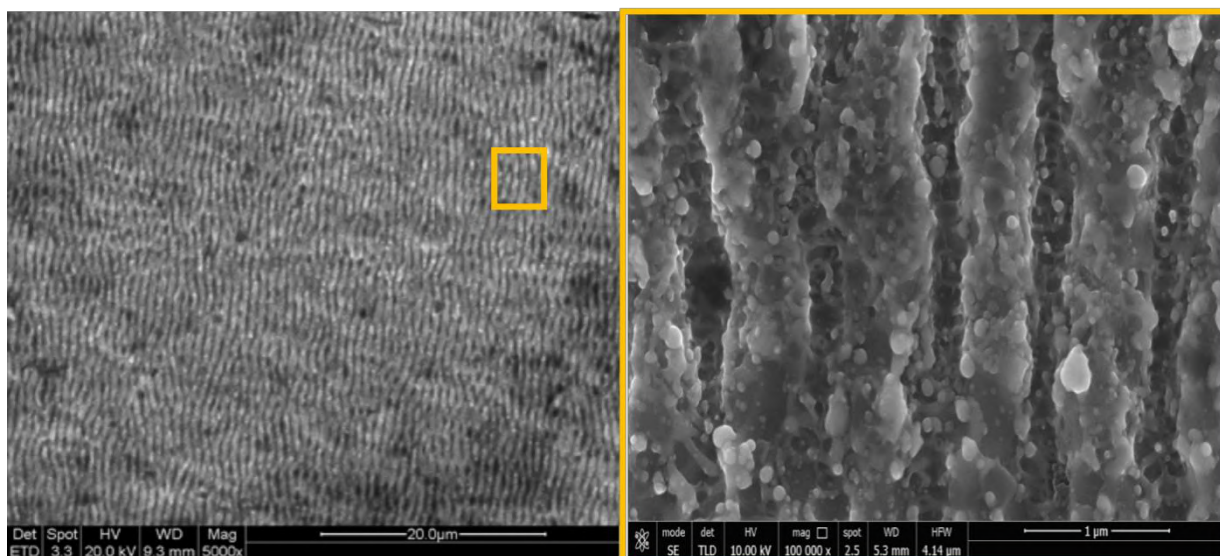


Рисунок 3.3 – Модифіковані поверхні Ti-6Al-4V (а) та Zr (б) періодичними поверхневими структурами (LIPSS)

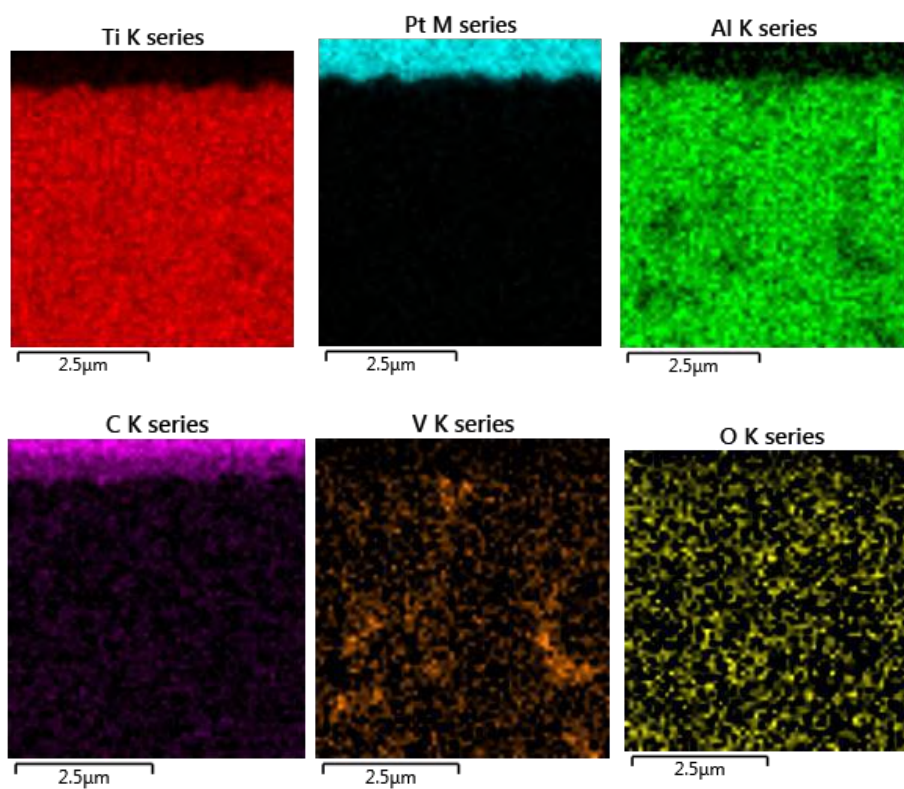
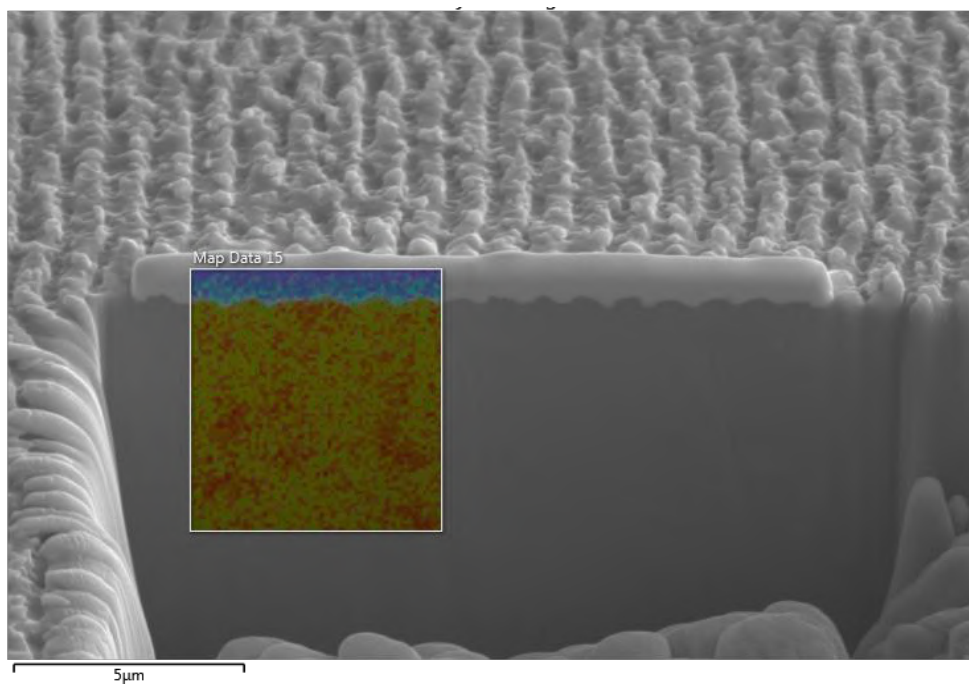


Рисунок 3.4 – SEM-зображення поперечного перерізу FIB із вкладеним EDS-сплавом Ti, модифікованим HR-LIPSS

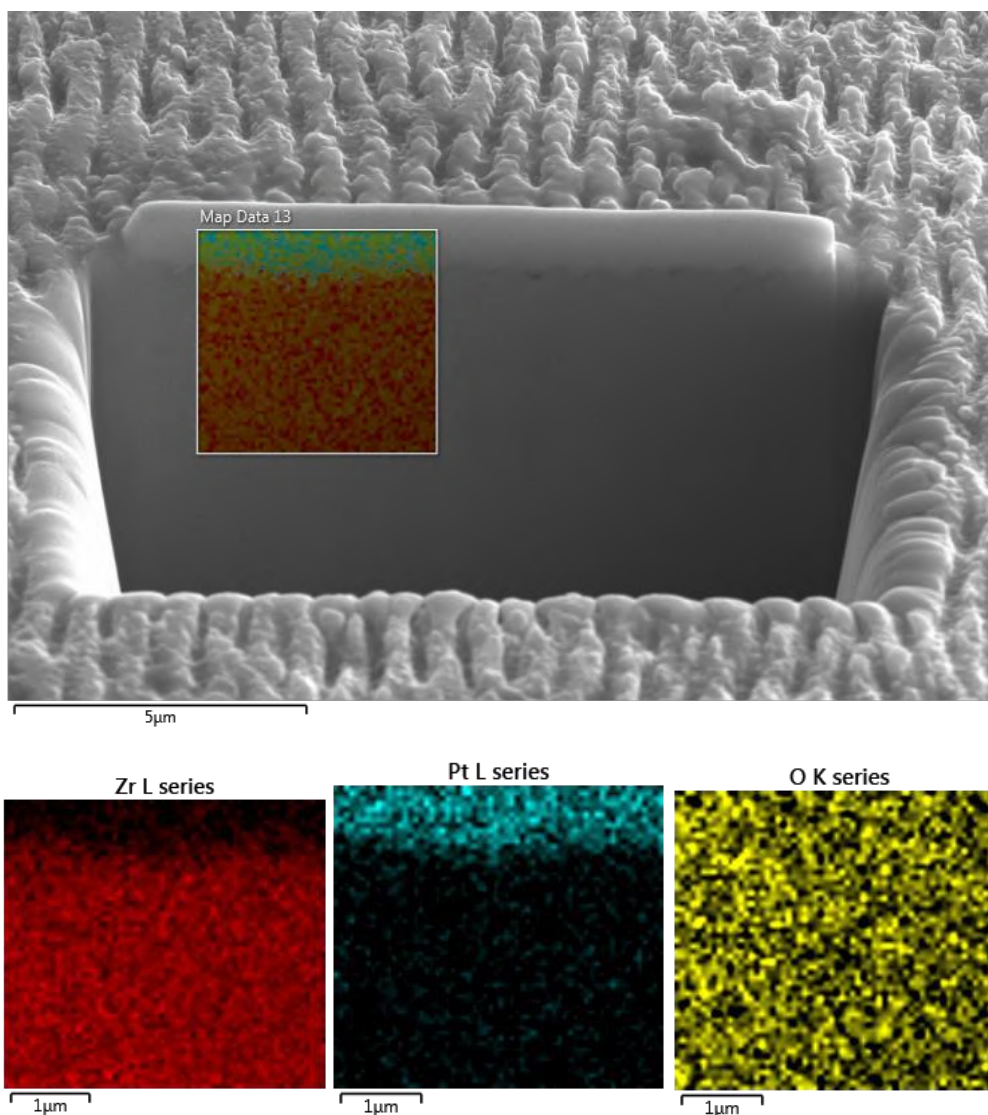


Рисунок 3.5 – SEM-зображення поперечного перерізу FIB з вставкою EDS Zr, модифікованої HR-LIPSS

3.2.2 Поверхневий хімічний аналіз за допомогою XPS та визначення гідрофільності

Хімічний склад оброблених та необроблених поверхонь як сплаву Ti, так і чистого Zr вивчався за допомогою XPS. На рис.3.6 показані цікаві області XPS.

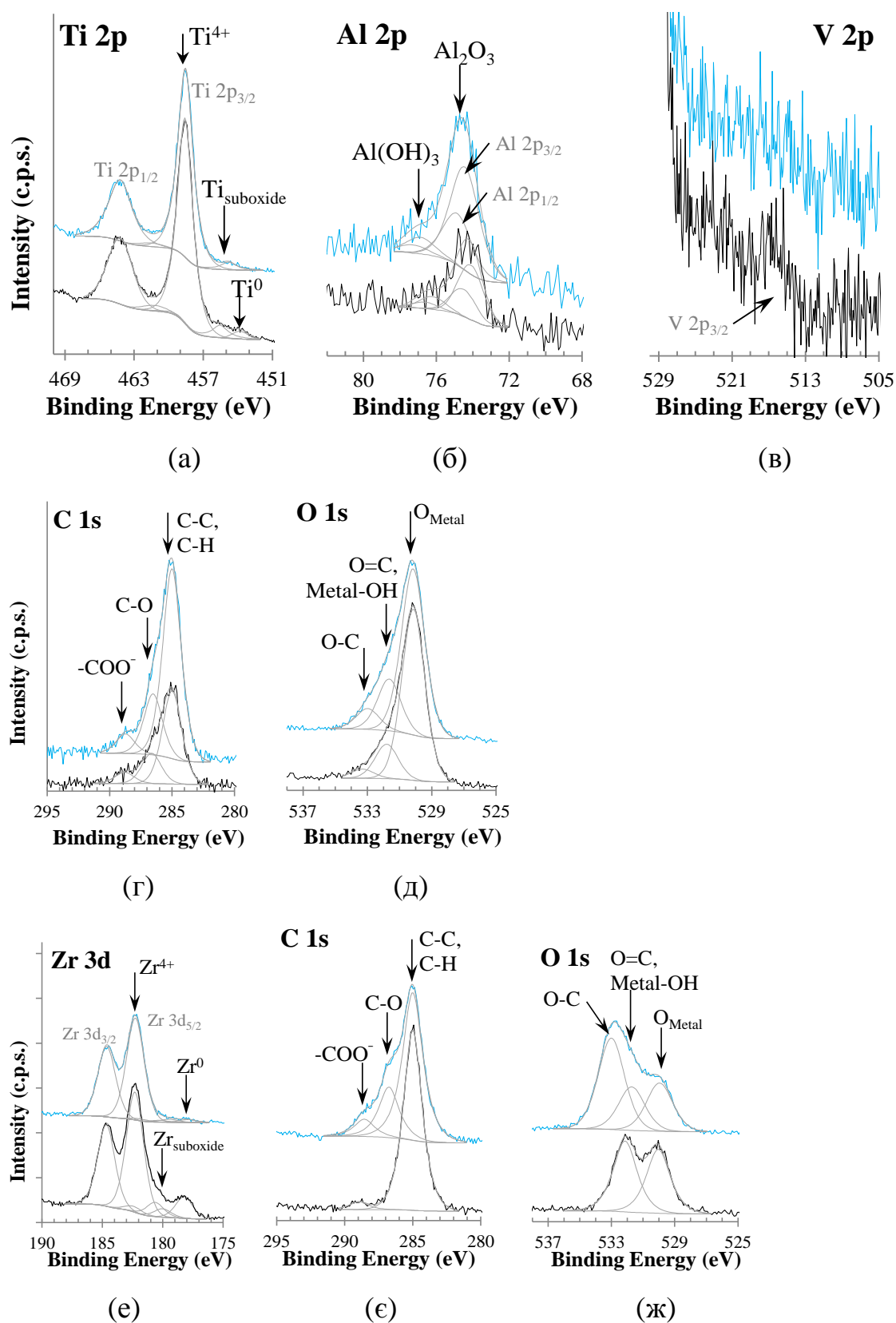


Рисунок 3.6 – Области XPS: Ti-6Al-4V (а-д); ічистий Zr (е-ж). Вгорі (блакитний спектр): оброблена поверхня лазером; дно (чорний спектр): необроблена поверхня

Поверхні складаються, головним чином, з оксидів металів та гідроксидів, зокрема TiO_2 та невеликої кількості $Al_3 + (Al_2O_3 \text{ та } Al(OH)_3)$ у сплаві Ti та ZrO_2 у зразку Zr . Ванадій знаходиться на хвості області $O 1s$ (рис. 3.6 (в)) і ледве виявляється: нечітко визначений пік, близько ~ 517 eV, призначається компоненту V_2O_5 $V 2p_{3/2}$.

У сплаві Ti основний дублет в області $Ti 2p$ (рис. 3.6 (а)) присвоюється TiO_2 , з $Ti 2p_{3/2}$, орієнтованим на рівні $458,6 \pm 0,1$ eV; в необробленій поверхні при менших енергіях зв'язку (BE) піки $Ti 2p_{3/2}$, орієнтовані на $453,8$ і $455,5$ eV, призначаються субоксидам TiO і титану на межі розділу метал/оксид відповідно; після обробки TiO більше не виявляється і відносна кількість Ti субоксидів зменшується. $Al 2p$ (рис. 3.6 (б)) складається з 2 дублетів, піки $Al 2p_{3/2}$ з центром $74,1 \pm 0,2$ eV та $76,2 \pm 0,4$ eV відносяться відповідно до Al_2O_3 та $Al(OH)_3$ або оксигідроксидів. $C 1s$ (рис. 3.6 (г)) виявляє, що деякі види вуглецевих сполук також присутні на поверхні, зокрема аліфатичний вуглець; вуглець, одночасно пов'язаний з кисневою та карбоксилатною групами, призначений для піків у $C 1s$ з центром 285 , $286,6 \pm 0,1$ та $288,8 \pm 0,1$ eV відповідно. На рисунку 3.6 (д), $O 1s$ показує кисень з оксидів металів та гідроксидів, орієнтованих відповідно на $530,1 \pm 0,1$ та $531,8 \pm 0,1$ eV, та органічного кисню, засвідченого піком, відцентрованим при $533,3 \pm 0,2$ eV, віднесеному до кисню, окремо пов'язаного з вуглецю, а також за піком, призначеним для гідроксидів, який також може включати кисень, подвійно пов'язаний з вуглецем.

У чистому цирконієві область $Zr 3d$ необробленого зразка була оснащена 3 дублетами (рис. 3.6 (е)), причому $Zr 3d_{5/2}$ відцентровано у $178,2 \pm 0,2$, $180,0 \pm 0,3$ та $182,3 \pm 0,1$ eV відповідно до ZrO , щонайменше не виявляється після обробки до субоксидів цирконію, найімовірніше, що надходять від інтерфейсу оксидів металу/поверхні, які також знижуються після обробки, і до ZrO_2 (найбільш поширеного). Як і у Ti_6Al_4V , на поверхні чистого Zr виявляються такі ж види вуглецевих сполук (рис. 3.6 (є) та (ж)).

Контактний кут необробленої полірованої поверхні становив $80,66 \pm 5,340$ та $84,31 \pm 6,20$ відповідно у зразках Ti та Zr. Після обробки ЛПСС не впливає на гідрофільність поверхні з кутом контакту 85 ± 40 та 87 ± 50 .

3.2.3 Експеримент на культурах клітин

Не було суттєвої різниці між приєднанням клітин та їх життєздатністю на сплаві Ti та Zr. Флуоресцентні дані вказують на більші показники прикріплення (на 3-й день після посіву клітин) на оброблену поверхню (459 ± 27 - для Ti та 523 ± 12 - для Zr) порівняно з полірованими імплантатами (259 ± 9 та 315 ± 12). Поширення HDFa на контрольних зразках і флуоресценція були значно вищими на 7 день та 10 день порівняно з початковими даними (3 день). Проліферація клітин на обробленій поверхні показала удвічі зростаючу флуоресценцію на 7 та 10 день порівняно з контролем (рис. 3.7).

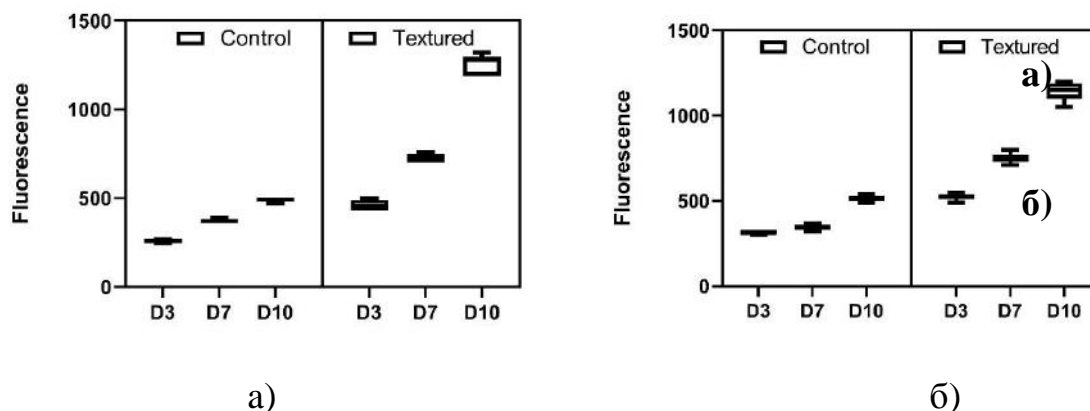


Рисунок 3.7 – Життєздатність клітин HDF та на поверхні Ti (а) та Zr (б) з різною модифікацією поверхні. Середнє значення $\pm SD$ флуоресценції середовища після аналізу відновлення резазурину, що є показником метаболічної активності $N = 3$

3.2.4 Модель на тваринах

Ti та Zr контрольні імпланти (з гладкою поверхнею) не були вкриті клітинами та волокнами через 10 та 30 днів після імплантації (рис.3.8, верхній рядок). Ми спостерігали лише поодинокі хаотичні волокна, але вони можливо прикріпилися до поверхні при видаленні зразків та не мали ніяких зв'язків з металевою поверхнею.

Усі імпланти були вкриті тонкою капсулою, що легко відділялась від них. У порівнянні з групою контролю, усі модифіковані зразки були повністю вкриті сполучнотканинними волокнами та клітинами через 10 днів. Три типи клітин було визначено в експерименті: еритроцити, фібробласти та лейкоцити. Клітини були розташовані на волокнах, які вирогідно абсорбувалися на поверхні металу на першому етапі імплантації. Різниця в кількості та типі клітин між Ti та Zr сплавами знайдено не було (рис.3.8, середній рядок).

Кількість еритроцитів та лейкоцитів була однаковою для обох типів металу. Щільність еритроцитів становила 11.5 ± 2.9 у мм^2 та 13.3 ± 4.3 у мм^2 для Ti та Zr імплантів відповідно; щільність лейкоцитів - 3.6 ± 1.2 та 2.1 ± 0.5 у мм^2 для цих самих зразків. Тим не менш, щільність фібробластів варіювала від 7.4 ± 0.6 у мм^2 для Ti сплавів та 8.8 ± 0.4 у мм^2 для Zr. Волокна, що вкривали модифіковані металеві імпланти були хаотично розподілені на поверхні зразків. Тонкі волокна діаметром менше 2 мкм вкривали усю поверхню та створювали неправильної форми пучки діаметром до 20-30 мкм при поперечному розтині.

Після 30 днів імплантації, модифіковані металеві імпланти були повністю інтегровані з навколишніми тканинами та важко видалялися при проведенні хірургічної маніпуляції. Поверхні імплантів була повністю вкрита сполучнотканинними структурами з високою кількістю волокон. Ніяких специфічних клітин не було виявлено при проведенні скануючої електронної мікроскопії.

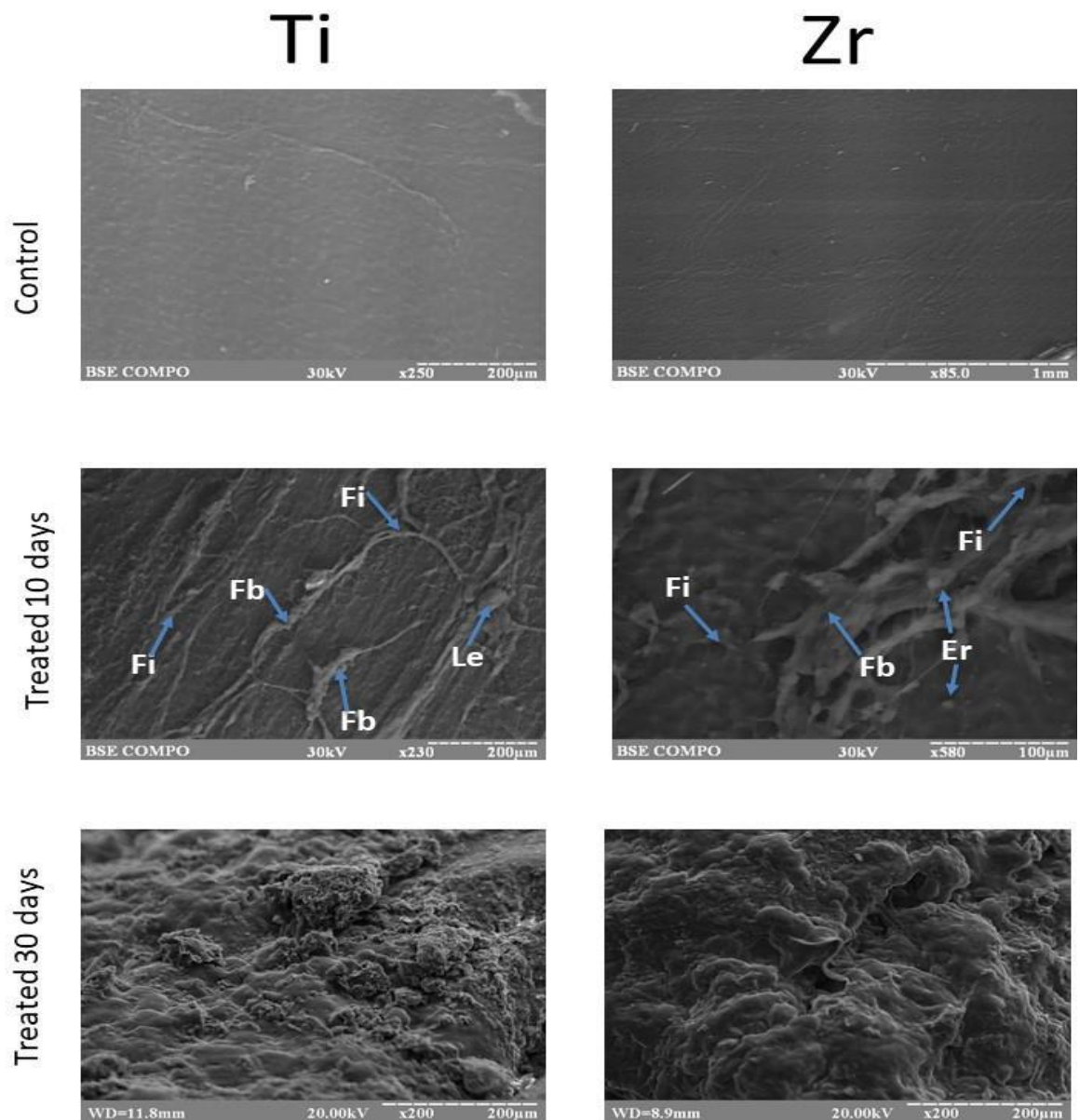


Рисунок 3.8 – Поверхня Ti та Zr сплавів немодифікованих та модифікованих після 10 та 30 днів підшкірної імплантації. Поверхні модифікованих імплантів були вкриті розвиненою мережею сполучної тканини (Fi). Над волокнами ми можемо спостерігати еритроцити (Er), лейкоцити (Le) та фібробласти (Fb)

3.3 Обговорення

Топографія поверхні та її хімічний склад є критичними параметрами взаємодії між імплантом та навколишніми тканинами через іонний обмін, адсорбцію протеїну та клітинну адгезію. Існує багато доказів, що шорсткі поверхні

значимо збільшують інтеграцію тканин з різноманітними матеріалами [74, 75]. Модифікація металевих поверхонь зазвичай застосовується для контролю тканинно-імплантових взаємодій та для прискорення часу загоєння.

Тим не менш, вплив топографії шорстких поверхонь та розмірів нерівностей ще вивчається. Сучасні методи дозволяють створювати поверхні з нано- чи мікроструктурами та різноманітною топографією. Дизайн поверхонь з високою хвилястістю та пористістю у мікророзмірах підтримує вrostання кісткової тканини та стимулює сполучення окремих кісткових елементів між собою, що таким чином покращує механічні властивості та стабільність імплантів [76]. Більшість публікацій демонструють, що розмір нерівностей поверхні вище 25 мкм стимулює адгезію клітин та їх проліферацію, але пори більше 200 мкм в діаметрі сповільнюють формування кісткової тканини у порівнянні з малими порами [77]. Різноманітні типи клітин по різному реагують на мікронерівності поверхні. Dalby et al. продемонстрували, що остеобласти переважно віддають перевагу більш шорстким поверхням, в той час як фібробласти переважають на гладких ділянках [78]. Нерівності або розміри пор від 25 до 150 мкм є більш гідними для клітинної адгезії, проліферації та інтеграції в системі імплант-тканина.

Багато публікації продемонстрували важливість нанодоменів для клітинної адгезії та проліферації [79, 80]. Наноструктури певних розмірів на титанових поверхнях також були здатні стимулювати запальну відповідь та підсилити osteointegraцію [81, 82]. Ці дослідження припускають, що нанорозмірні елементи грають важливу роль для osteointegraції в незалежності від виду мікроструктур на цих поверхнях [38,39]. Незначні зміни нерівностей супроводжуються місцевими змінами у хімічній структурі, не впливаючи на загальну роль структур у біологічному середовищі [83]. Але існують докази зміни механічних властивостей та корозійного опоруматеріалів після нанорозмірної модифікації їх поверхні. Наприклад, титанові нанотрубки до та після відпалювання мають різну стійкість до корозії, а титанові наноплівки мають знижені механічні властивості [84].

Поверхневий хімічний склад також грає важливу роль в адгезії білків. XPS дослідження продемонстрували наявність гідроксильних та карбоксильних груп на

поверхні аналізованих матеріалів після HR-LIPSS модифікації. Ці функціональні групи можуть стимулювати адсорбцію білків на поверхні імпланту, активувати адгезію тромбоцитів та зв'язування фібрину, що призведе до швидшого загоєння імпланту [85].

Хімічні та структурні модифікації можуть впливати на гідрофобність імплантів, але даний експеримент не продемонстрував значних змін контактного кута Ti та Zr зразків.

Експериментальні дані, презентовані в цій роботі, вказують на значне покращення біологічної реакції наноструктурованих поверхонь імплантів у порівнянні з відшліфованими неструктурованими. Можливо, нанотопографія дозволяє швидшу та повноцінну адсорбцію протеїну разом з адгезією клітин [86, 87]. Ми спостерігали у 2 рази більше клітин на поверхні HR-LIPSS модифікованих поверхонь у порівнянні з немодифікованими на 3 день після засівання клітин. До 10 дня спостерігалось підвищення клітинної проліферації на зразках HR-LIPSS групи, та важливо відзначити, що це не залежало від типу металу, що використовувався: Ti чи Zr, тобто саме модифікація поверхні визначала цю властивість. Запропонований механізм клітинної адгезії та проліферації розпочинається з ранньої адгезії протеїну на LIPSS-модифіковані поверхні, що призводить до інтегрин-опосередкованої клітинної передачі сигналів та стимуляції клітинної проліферації.

In vivo експерименти також продемонстрували, що на гладких поверхнях клітинна адгезія не відбувалась порівняно з лазер-наноструктурованими поверхнями. Різні клітинні типи, включаючи фіробастоподібні клітини, мігрують з кров'яного русла та оточуючих тканин на поверхню імплантів, але клітинна адгезія спостерігалась лише на імплантах модифікованої групи. Інші *in vivo* дослідження продемонстрували, що навколо титанових імплантів з гладкою поверхнею накопичується більша кількість колагенових волокон [88]. Прикріпленні клітини, переважно фіробласти, проліферують та утворюють волокна, що інтегрують з поверхнею імпланту. На 30 день після імплантації ми

спостерігали повноцінну інтеграцію наноструктурованої поверхні зі сполучною тканиною та недостатню інтеграції тканини з гладко поверхневими імплантами.

4 КЛІТИННА ВІДПОВІДЬ ОСТЕОБЛАСТІВ НА LIPSS-МОДИФІКОВАНІ Ti-ІМПЛАНТИ

Метою даної роботи було вивчення зв'язку між LIPSS модифікацією поверхні Ti6Al7Nb зразків, проліферацією остеобластів та бактеріальною адгезією *S. aureus*.

4.1 Матеріали та методи

4.1.1 Матеріали

Стержні Ti-6Al-7Nb було розрізано на диски діаметром 10 мм та виствою 5 мм. Половина зразків було механічно поліровано, а інша половина була оброблена піскоструминно, згідно до методів виготовлення сертифікованих протезів та імплантів.

4.1.2 Методи

Зразки було поділено на 6 груп, в кожній по 20 зразків. Лазерні модифікації було проведено за допомогою Coherent Hyper Rapid NX, що діяв з довжиною хвилі 1064 нм та тривалістю пульсової хвилі 8 ps. Поверхні зразків було отримано за Raylase Focusshifter CS сканеру з лінзою, яка мала фокальну відстань 160 мм. Фокусована ділянка, що була виміряна за допомогою променевого аналізатора, мала діаметр близько 30 мкм. Перша обробка була зроблена з пульсовою енергією 16 мкДж та з загальною дозою 27 Дж/см², в той час як умови проведення другої обробки становили: пульсова енергія 32 мкДж, а загальна доза - 270 Дж/см².

Після лазерної обробки усі зразки було приготовлено для біологічного тестування шляхом промивання в ультразвуковій ванні та стерилізації за допомогою гамма-опромінення. Усі культуральні середовища було придбано у Gibco®, США, в той час як бактеріологічні середовища були придбані у HiMedia (Індія). Усі клітинні лінії, що використовувалися в експерименті, належать до колекції СумДУ, а бактеріальні культури було отримано з «Бактеріологічного

музею СумДУ». Експеримент було проведено у Лабораторії, що сертифікована за 2 класом у Медичному Інституті СумДУ.

Таблиця 4.1 – Позначення зразків

	Необроблені	Параметри лазеру Text1	Параметри лазеру Text2
Полірованя	<i>NT-Polished</i>	<i>LIPSS-Text1- Polished</i>	<i>LIPSS-Text2- Polished</i>
Піскоструминні	<i>NT-SB</i>	<i>LIPSS-Text1-SB</i>	<i>LIPSS-Text2-SB</i>

4.1.3 Експеримент на культурах клітин

Клітини вирощували у 75 см² культуральних матрацах за стандартних умов культивування: 5% зволоженого CO² у повітрі та при температурі 37⁰C з оновленням середовища кожні 2-3 дні. Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) з L-глутаміном було використано, до складу якого входило 100 ОД/мл пеніциліну, 100 мг/мл стрептоміцину, 2,5 мг/мл амфотерицину В, 10% бичачої сироватки та 1,0 нг/мл bFGF. Після видалення середовища, остеобласти було засіяно на кожен зразок та позитивний контроль при щільності клітин 2×10⁴ клітин на лунку).

Адгезія остеобластів через 24 години та клітинна проліферація були досліджені за допомогою тесту з резазурином, який зазвичай використовують з метою вивчення життєздатності клітин.

Резазурин (Invitrogen) було додано у кількості, що дорівнювала 10% об'єму кожної лунки. В якості негативного контролю, резазурин було додано до середовища без клітин. В якості позитивного контролю, розчин резазурину було додано до середовища, в якому були клітини, але відсутній зразок імпланту. Культуральні планшети було інкубовано протягом 4 годин при температурі 37⁰C у темряві. Середовище було перенесено до іншого 96-луночного планшету та абсорбцію було виміряно за допомогою Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific) при довжині хвилі 570 nm та 600 nm. Клітинний ріст було оцінено у різні інтервали

часу: 1 день, 3 день та 7 день. Усі експерименти було повторено 7 разів. Процент відновлення резазурину було підраховано згідно протоколу виробника.

4.1.4 Мікробіологічне дослідження

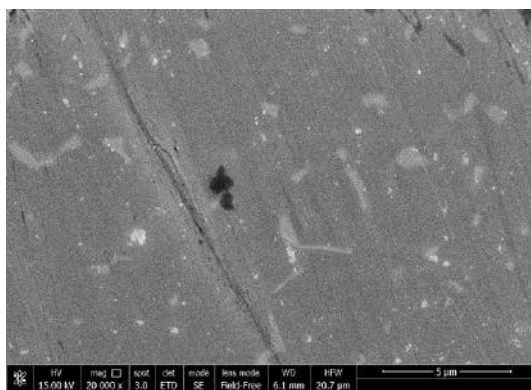
Адгезивні властивості дисків сплавів, що були оброблені різноманітними методами, було вичено на культурах Грам-позитивних бактерій (*S. aureus*, штамм В 918). Бактерії вирощували у поживному агарі при температурі 37 °С протягом 24 годин, потім їх було суспендовано у фізіологічному розчині (0.9 %, w/vNaCl) та ресуспендовано до кінцевої густини 1×10^5 колонієутворюючих одиниць КУО/мл (5 log КУО) у поживному бульйоні згідно стандартів McFarland.

Диски було інкубовано горизонтально з 2,0 ml бактеріальної суспензії у 24-луночному планшеті за статичних умов при температурі 37 °С протягом 2, 4, 6 та 24 годин. Після цього зразки було вилучено за допомогою стерильного пінцету та промито 2,0 ml стерильного фізіологічного сольового розчину тричі для того, щоб відмити вільно-прикріплені бактерії. Потім диски було розміщено у стерильних пробірках з 1 ml стерильного сольового розчину та сонифіковано протягом 1 хвилини у ультразвуковій ванні (B3500S-MT, Bransone Ultrasonics Co., Shanghai, China) з метою відділення прикріплених до поверхні імплантів бактерій. Слідом за цим ми провели визначення кількості колоній на кожному терміні інкубації, використовуючи технологію смугової пластинки, культивуючи 10 мкл сольового розчину аліквоти з пробірок, оброблених ультразвуком, на твердий носій протягом 24 год. Лунки, що мали диски та експериментальні зразки у середовищі без бактеріальної культури, було використано як контроль. Усі експерименти було проведено тричі. Для оцінки різниці між групами ми застосували програмне забезпечення GraphPadPrism 8.0, та однобічне ANOVA з декількома порівняннями. Статистична значимість була оцінена як 95% ($p < 0.05$).

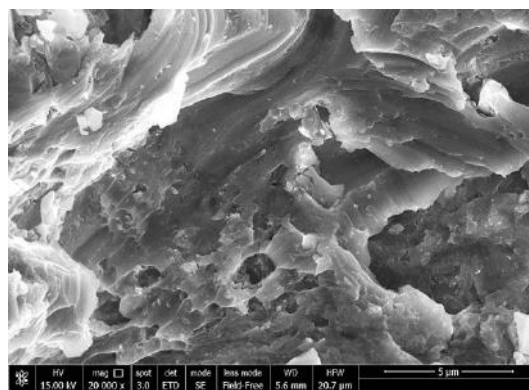
4.2 Результати

4.2.1 Морфологія поверхні

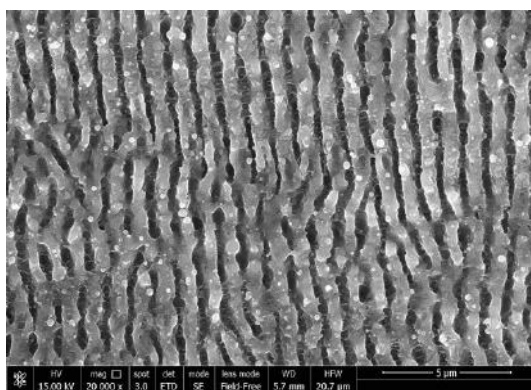
Морфологія отриманих структур на поверхні імплантів була оцінена за допомогою скануючої електронної мікроскопії (рис. 4.1).



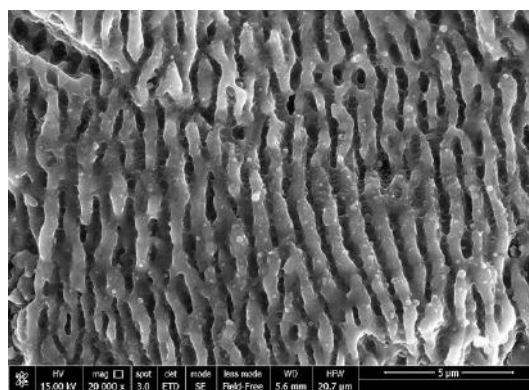
NT-Polished



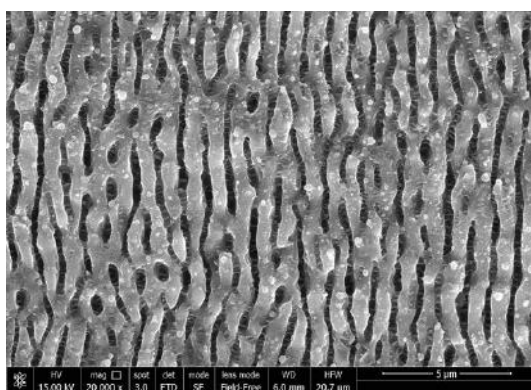
NT-SB



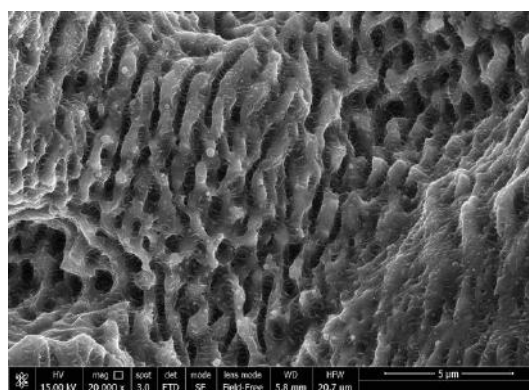
LIPSS-Text1-Polished



LIPSS-Text1-SB



LIPSS-Text2-Polished



LIPSS-Text2-SB

Рисунок 4.1 – SEM фотографії(20000x) поверхньої морфології, отриманої за допомогою різних методів

Фотографії в першому рядку демонструють необроблені поверхні зразків, особливо зображення під назвою *NT-SB* має значну деформацію, утворену внаслідок пошкодження. Визначити середні розміри “долин”, спричинених піскоструминною обробкою, не просто, але вони можуть бути оцінені порядку десятків мікрометрів. Два методи лазерної обробки виглядають досить схожими, і на поверхні шліфованого зразка з деякими роздвоєннями спостерігається досить рівномірний і однорідний розподіл LIPSS. Спрямування контролюється напрямком площини поляризації лазера, що є перпендикулярним до нього. Як можна бачити на рис.4.2 в «долині» LIPSS декілька HSFL (високочастотні High Spatial Frequency LIPSS) розташовані перпендикулярно до інших, з розмірами та періодичністю 100-200 нм. Цей рисунок демонструє наявність наночастинок, які складаються з аблятованих матеріалів, що виникли з плазмової та парової фаз та затверділи після контакту з поверхнею зразка у вигляді розплавленої краплі.

При обробці піскоструминних поверхонь відбувалося перекриття LIPSS структур та вже існуючих морфологічних структур за виключенням пустої та дуже вузької долини, де дифракція блокувала вхід лазерної енергії. Поверхня *LIPSS-Text2-SB* оброблених зразків є гладкою в результаті плавлення, яке відбувається через високу кількість енергії на одиницю поверхні.

В той час як лазерна обробка дає в основному схожі структури, більш детальний аналіз відмінностей у періодичності цих структур наведено в таблиці 4.2.

Таблиця 4.2 – Середня періодичність та відносна дисперсія

	LIPSS-Text1- поліровані	LIPSS-Text2- поліровані	LIPSS-Text1- піскоструминно оброблені	LIPSS-Text2- піскоструминно оброблені
Середня періодичність, нм	959	812	1006	1006
Стандартне відхилення, нм	44	161	317	257

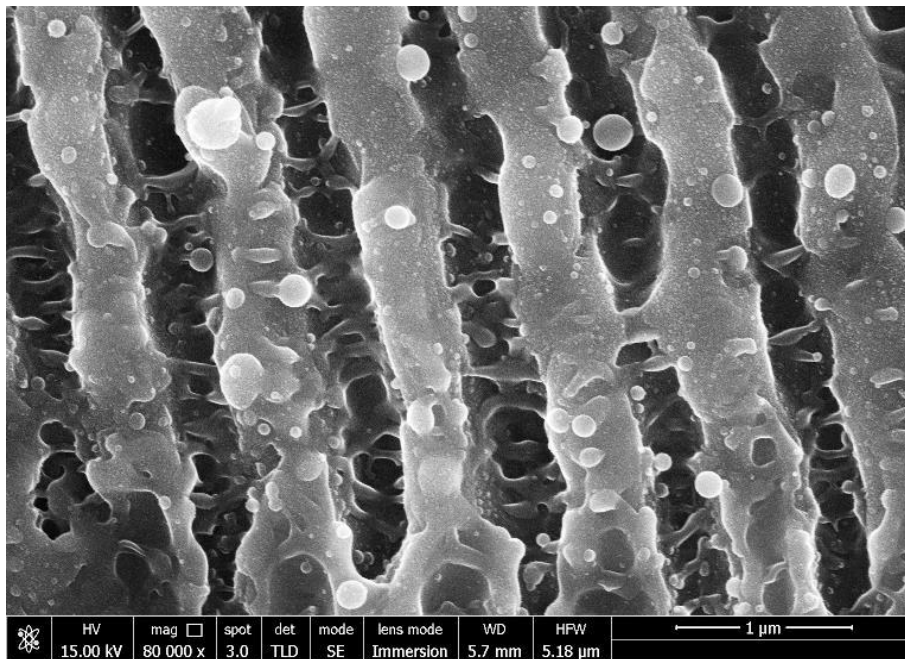


Рисунок 4.2 – Зображення отриманих LIPSS у великому масштабі. HSFL наявні у долинах, а наночастинки утворюються при ре моделюванні поверхні та затримуються на підвищеннях

4.2.2 Експеримент на культурах клітин

Експеримент на культурах клітин не продемонстрував будь-якої клітинної токсичності поверхонь, але ступінь адгезії та проліферації був різним для зразків, оброблених різними методами. Клітинна адгезія на 1 день до полірованих поверхонь була слабкою – $35.29 \pm 1.89\%$ та збільшувалась значно у групі зразків оброблених піскоструминно – $60.43 \pm 2.63\%$. LIPSS модифікація імплантів з первинно полірованою поверхнею в обох режимах призвела до значного підвищення клітинної адгезії до $45.0 \pm 1.91\%$ ($p \leq 0.0001$) (LIPSS-text1-поліровані) та $50.29 \pm 2.87\%$ ($p \leq 0.0001$) (LIPSS-text1-поліровані) але не впливала на адгезію у зразків первинно оброблених піскоструминно (рис. 4.3). Проліфераційний тест на 3 та 7 дні демонструє прогресивний ріст клітин на NT-SB та на усіх LIPSS поверхнях. Варто відмітити, що на 3-й день ніяких значних відмінностей у клітинній життєздатності не було помічено на зразках NT-SB та LIPSS-text1-Polished та LIPSS-text2-Polished. Ми також не знайшли відмінностей між клітинною реакцією до LIPSS первинно полірованих та піскоструминних поверхнях. Можливо

нанотекстурування має головну роль в клітинній адгезії та проліферації. На 7-й день проліферація клітин була інтенсивною на піскоструминних та *LIPSS* поверхнях, але ми не бачили різниці між клітинною життєздатністю *NT-SB* та *LIPSS-text1-Polished*. Кількість життєздатних клітин на *LIPSS-text2-Polished* ($98,71 \pm 1,89$), *LIPSS-text1-SB* ($94,43 \pm 2,99$) та *LIPSS-text2-SB* ($99,29 \pm 1,49$) значно підвищувалась на *NT-Polished*, *NT-SB* та *LIPSS-text1-polished* ($p \leq 0,0001$).

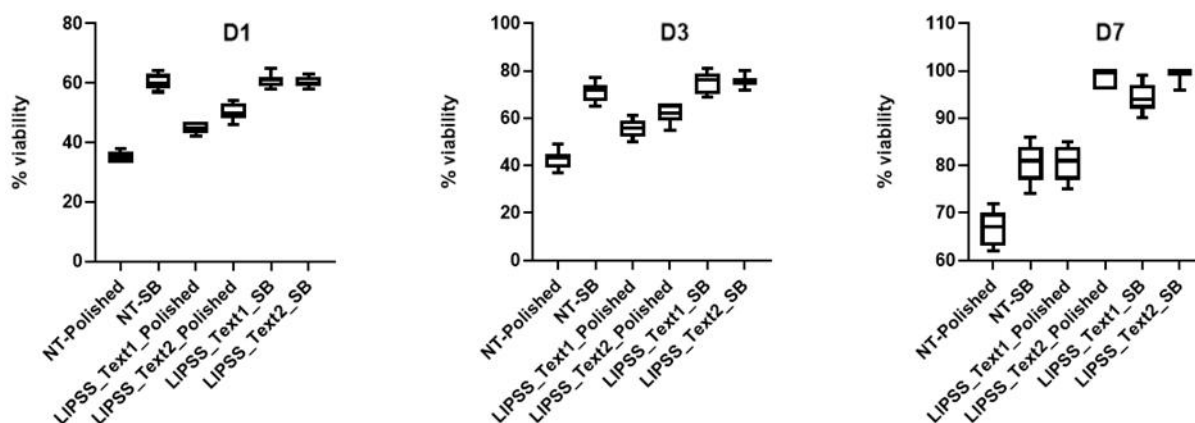


Рисунок 4.3 – Клітинна життєздатність на 1, 3 та 7 дні після засівання остеобластів на необробленій та *LIPSS*-модифікованій *Ti* поверхні

4.2.3 Мікробіологічне дослідження

Жодної бактеріальної клітини не було знайдено на полірованих поверхнях через 2 години, але протягом наступних 24 годин спостерігалась інтенсивна бактеріальна адгезія. *NT-SB* а усі *LIPSS-поліровані* поверхні демонстрували бактеріальну адгезію до $2,0 \log_{10}$ КУО (з початкових $5 \log_{10}$ КУО). *LIPSS-text1-поліровані* поверхні зберігали антиадгезивні властивості протягом незначного часу, а *LIPSS-text2-поліровані* демонстрували значну адгезію бактерій впродовж 4-24 годин (рис. 4.4). Схожі результати ми можемо побачити на *LIPSS-text2-SB* імплантах. В той самий час, *LIPSS-text1-SB* продемонстрували відсутність бактеріальної адгезії у перші 2, 4 та 6 годин та лише довготривала ко-культивація призвела до втрати антиадгезивних властивостей.

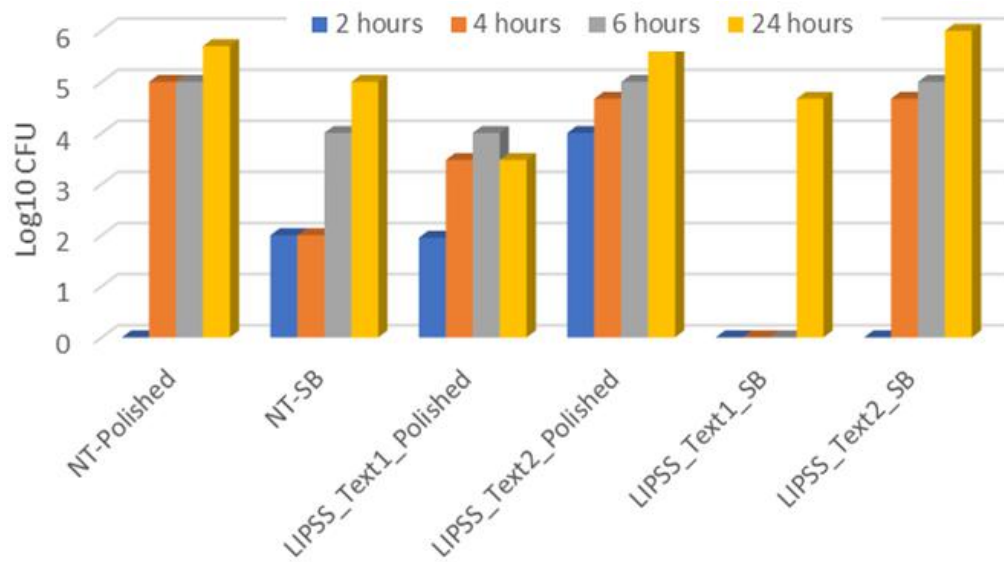


Рисунок 4.4 – Кількість бактеріальних клітин (\log_{10} КУО), адгезованих до поверхні імплантів у різні інтервали часу під час ко-культивування

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

5.1 Матеріали і методи

5.1.1 Матеріали

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

5.1.2 РЕО

Зразки Ti піддавали РЕО з використанням високовольтного джерела живлення KIKUSIU PWR800H (Японія), який керувався за допомогою ПК із програмним забезпеченням Wavy. Першим етапом дослідження було реєстрація кривих $(U, i) = f(t)$, у розчинах різних композицій, як показано в таблиці 5.1. Реєстрацію проводили при трьох різних фіксованих заданих щільностях струму: 50, 100 та 150 mA cm^{-2} . Обробка РЕО була здійснена за допомогою гальваностатичного анодування постійного струму до граничної напруги. Після того, як технологічна напруга досягла граничної напруги, обробку проводили в потенціостатичному режимі. Зразок Ti служив анодом, а титанова сітка - катодом. Кожного разу тривалість процесу становила 5 хвилин. Розчин електроліту (200 мл) під час процесу витримували при 15 °C і постійно перемішували за допомогою магнітної мішалки. Після процесу анодування зразки промивали в проточній воді DEMI (18 $\text{M}\Omega\text{-cm}$, Simplicity Water Purification Systems, Milipore SAS, Molsheim, France), сушили на повітрі та упаковували.

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

Таблиця 5.1 – Перелік електролітних компонентів (концентрації в Моль л⁻¹)

Електроліт	ЕДТА	КН ₂ РО ₄	Ca(OH) ₂	Ca(HCOO) ₂	pH
1	0.017	0.006	0.023		3.73
2	0.034	0.012	0.046		3.82
3	0.017	0.006		0.013	3.18
4	0.034	0.012		0.026	3.24

5.1.3 Вимірювання гідрофільності

Кут контакту між зразком і краплею води вказує на рівень гідрофільності поверхні. Біосумісні поверхні мають бути гідрофільними. Кут контакту нижче 90° означає, що поверхня гідрофільна (змочувана). Кут контакту вимірювали, як описано [121], використовуючи системи вимірювання оптичного контактного кута та аналіз контуру OCA 15 EC (Data Physics, Філдерштадт, Німеччина) та дистильовану воду.

5.1.4 Випробування твердості та міцності

Адгезію оксидного шару, нанесеного на поверхню підкладки Ti під час РЕО, та його механічну стійкість оцінювали використовуючи відкриту платформу, оснащену CSM Micro-Combi-Tester, як описано [122, 123]. Випробування полягало у створенні тріщини за допомогою проникаючого пристрою, алмазного конуса Rockwell, поступово збільшуючи силу навантаження. Критична сила, яка є мірою адгезії, є найменшою силою, яка спричиняє втрату адгезії покриття до основи. Для оцінки значення критичної сили використовували силу тертя та коефіцієнт тертя, а також мікроскопічні спостереження, зроблені за допомогою оптичного мікроскопа,

який є невід'ємною частиною платформи. Випробування проводились із збільшенням сили навантаження від $0,03 \div 25$ N та наступними робочими параметрами: швидкість завантаження 10 Н хв⁻², швидкість ходу столу $1,0$ мм хв⁻², довжина подряпини $2,5$ мм.

5.1.5 Скануюча електронна мікроскопія (SEM)

Використовували тривимірні візуалізацію та енергетично-дисперсійний рентгенівський аналіз (EDX). Для попередньої оцінки морфології поверхні використовували скануючу електронну мікроскопію (Hitachi S-3400N, Токіо, Японія, прискорювальна напруга 15 кВ). 3D-реконструкція та SEM-дослідження вибраних зразків проводились за допомогою скануючого електронного мікроскопа Phenom ProX (прискорювальна напруга 15 кВ). Хімічний склад поверхневого шару аналізували за допомогою енергетично-дисперсійної рентгенівської спектрометрії (EDX, PhenomProX). Поперечний переріз використовували для оцінки товщини шару покриття РЕО, утвореного на підкладці зразків Ті, як описано [109]. Розмір пір розраховували за допомогою програмного забезпечення Image J [124].

5.1.6 Вимірювання шорсткості поверхні

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

5.1.7 Дифракція рентгенівських променів (XRD)

Всі експерименти проводились із використанням дифрактометра X'Pert Philips PW 3040/60, що працював при 30 мА та 40 кВ, оснащеного вертикальним кутоміром та Ейлеровою люлькою. Картина дифракції рентгенівських променів була зареєстрована в області 2θ : 10 - 140 ° з використанням випромінювання $\text{CuK}\alpha_{1,2}$ ($\lambda_{\text{CuK}\alpha 1} = 1.54056$ Å і $\lambda_{\text{CuK}\alpha 2} = 1.54443$ Å) для кута α - $0,25$ градусів. Використовувалися малі кути падіння (α) для падаючого рентгенівського променя, таким чином він використовується для вивчення поверхневих шарів, оскільки проникнення пучка обмежене. Відстані вираховувались в нанометрах. Кут падіння

α фіксований, так що ступінь проникнення рентгенівськими променями у зразок залишається постійною протягом усього вимірювання. При низьких α -кутах падіння рентгенівські промені проникають лише у найповерхневіші шари зразка.

5.1.8 Рентгенівська фотоелектронна спектроскопія (XPS)

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

5.1.9 Аналіз електрохімічної корозійної стійкості

Здатність поверхонь РЕО протистояти корозії досліджували за допомогою електрохімічних методів. Для цього зразки монтували на плоску корозійну камеру (250 мл, Bio-logic, Франція) з корозійним середовищем (розчин Рінгера зі складом: $8,6$ г dm^{-3} NaCl, $0,3$ г dm^{-3} KCl та $0,48$ г dm^{-3} $CaCl_2 \cdot 6H_2O$; Fresenius Kabi, Польща) при 37 °C через ущільнювальне кільце з відкритою поверхнею $0,283$ cm^2 . Розчин Рінгера витримували в інкубаторі при $37,0 \pm 0,5$ °C перед тестуванням, щоб уникнути осадження бульбашок газу при нагріванні в їдкій комірці до температури вимірювання. Триелектродну конфігурацію використовували з електродом порівняння (насичений каломельний електрод - SCE з капіляром Haber-Luggin) та зустрічним електродом (платина). Експерименти проводились із використанням потенціостата-гальваностату PARSTAT 4000A (Ametek, Princeton Applied Research

– Solartron, США – Великобританія). Експериментальна процедура та збір даних здійснювались за допомогою програмного забезпечення VersaStudio версії 2.60.6. Процедура вимірювання включала наступні етапи:

- 1) стабілізація потенціалу розімкнутого контуру (ЕОС) протягом 1 год;
- 2) електрохімічна імпедансна спектроскопія (EIS) при середньоквадратичній амплітуді 10 мВ, в діапазоні частот $39\ 810 \div 0,01$ Гц і 5 балів на декаду (експеримент тривав $35 \div 45$ хв);
- 3) два експерименти з потенціодинамічної поляризації (PDP) після короткого періоду стабілізації (5 хв), які включають поляризацію короткого діапазону при ± 40 мВ проти ЕОС, з метою отримання лінійного опору поляризації (LPR) зразка, при швидкості сканування $1\ \text{мВ хв}^{-1}$ та поляризацію на великій відстані при ± 250 мВ, щоб отримати інформацію про наявність областей Тафеля та щільності струму пасивації, зі швидкістю сканування $10\ \text{мВ хв}^{-1}$.

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

5.1.10 Інкубація в розчині Рінгера

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

5.1.11 Спектроскопія Raman

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

5.1.12 Аналіз біоактивності у модельованій рідині організму (SBF)

Потенційну біоактивність зразків аналізували за стандартною процедурою в імітованій рідині тіла. Анодовані зразки занурювали в SBF, приготований, як описано [125]. Один зразок занурювали в 25 мл розчину SBF, який замінювали кожні 3 дні протягом 4 тижнів. Зразки струшували при 60 об / хв при 37 ° С. Морфологію зразків аналізували через 1, 2, 3 та 4 тижні занурення за допомогою скануючого електронного мікроскопа (Hitachi, TM-3000, прискорювальна напруга = 15 кВ, стан BSE). Для зразкового зразка був проведений аналіз EDX (PhenomProX; прискорювальна напруга = 15 кВ).

5.1.13 Аналіз цитотоксичності зразків та життєздатності клітин

Зразки стерилізували в автоклаві при 121 °С протягом 1 години і поміщали в 24-лункові планшети. Кожну лунку заповнювали 20% фетальною бичачою сироваткою (FBS; Invitrogen,) у Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen, кат. № 11960) і залишали на ніч у клітинному інкубаторі. Ця процедура була виконана для імітації адгезії білка до поверхні імплантату після імплантації. На наступний день розчин FBS видалили і 2 мл DMEM доповнили 10% FBS, 2 мМоль L-глутаміну (Invitrogen, кат. № 25030), 0,1 мМоль 2-меркаптоетанолу (Sigma, кат. № M7522), 50 одиниць на ml^{-1} пеніциліну та 50 g ml^{-1} стрептоміцину (Invitrogen, кат. № 15070) у кожну лунку. Остеобласти щурів (отримані з колекції клітин Сумського державного університету) у кількості 10^5 клітин засівали на

верхню поверхню кожного зразка та інкубували при 37 °C у зволоженому середовищі з 5% CO₂. Поживне середовище змінювали кожні 3 дні протягом 7-денного періоду. Всі експерименти проводились у трьох повторах. Застосовували такі контролі: культура клітин з клітинами без зразка, контрольний зразок - немодифікований відшліфований зразок Ti.

Аналіз редукції резазурину використовували для оцінки життєздатності клітин та швидкості проліферації на 1, 3 та 7 день після клітинного засіву. Середовище видаляли з кожної лунки і двічі промивали PBS. 1 мл середовища з 15 мкг/мл резазурину додавали в кожну лунку та інкубували протягом 4 годин у клітинному інкубаторі. Потім з кожної лунки відбирали три аликвоти по 200 мкл середовища з резазурином, і вимірювали абсорбцію при 570 та 595 нм довжині хвилі у спектрофотометрі (Multiskan FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific). Життєздатність клітин, виражена у відсотках різниці між клітинами зі зразком PEO та контрольними клітинами, розраховували за формулою для вимірювання цитотоксичності або проліферації за допомогою AlamarBlue методу спектрофотометрії (BioRad):
$$\frac{((O2 \times A1) - (O1 \times A2))}{((O2 \times P1) - (O1 \times P2))} \times 100$$
 де O1 - молярний коефіцієнт екстинкції (E) окисленого резазурину при 570 нм (80586), O2 - E окисленого резазурину при 595 нм (117216), A1 - поглинання дослідних лунок при 570 нм, A2 - поглинання дослідних лунок при 595 нм, P1 - поглинання позитивної контрольної лунки (клітини плюс резазурин при відсутності досліджуваного зразка) при 570 нм, P2 - поглинання позитивної контрольної лунки при 595 нм.

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

5.1.14 Дослідження адгезії бактерій

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

5.1.15 Статистичний аналіз

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

5.2 Результати

5.2.1 Напряга проти струму як функція часу

Аналіз кривих $(U, i) = f(t)$ показує, що PEO-процес Ti у ваннах, що містять комбінацію комплексоутворювача (ЕДТА) та гідроксиду кальцію, не дав бажаних результатів (дані не наведені). Криві вказують на нестабільний процес, і

встановлена кінцева напруга не була досягнута протягом 5 хвилин. Збільшення часу процесу також не дало задовільних результатів, оскільки напруга була дуже низькою. Результати були однаковими, незалежно від використовуваної солі кальцію (гідроксиду кальцію або формиату кальцію) як джерела іонів кальцію (дані не наведені). Як і в попередньому випадку, записані криві були "зубчастими", і напруга не піднімалася до встановленого рівня. Однак додавання KH_2PO_4 як джерела Р у розчин призвело до того, що процес РЕО на зразках Ті продовжувався. Кожна з кривих для ванн 1-2 і 3-4 виглядала однаково, незалежно від використовуваної щільності струму. На початку процесу напруга лінійно зростала в залежності від щільності струму. Чим вища щільність струму, тим швидше цей процес тривав. Потім, після досягнення напруги пробою оксидної плівки (процес у режимі РЕО), швидкість наростання напруги зменшувалася і втрачала свій лінійний характер. Напруга пробою оксидної плівки залежала головним чином від хімічного складу використовуваного розчину. На записаних кривих $(U, i) = f(t)$ є точки перетину, при яких змінюється швидкість зростання напруги. Наявність цих точок зумовлена зміною механізму утворення оксидного шару на Ті, а також зміною його фізико-хімічних властивостей (товщини, складу). У цей момент процес почав виявляти електричні розряди (іскри) на поверхні Ті.

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

5.2.2 Скануюча електронна мікроскопія (SEM)

На рисунку 5.1 представлені репрезентативні SEM-зразки титану, піддані РЕО у вибраних розчинах. Вибір параметрів окиснення проводився на основі

раніше зареєстрованих кривих $(U, i) = f(t)$. Зображення аналізували щодо якості отриманих поверхонь, а також можливого використання в якості цільових покриттів на зубних імплантатах. Такі покриття повинні мати пористу структуру без тріщин.

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

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

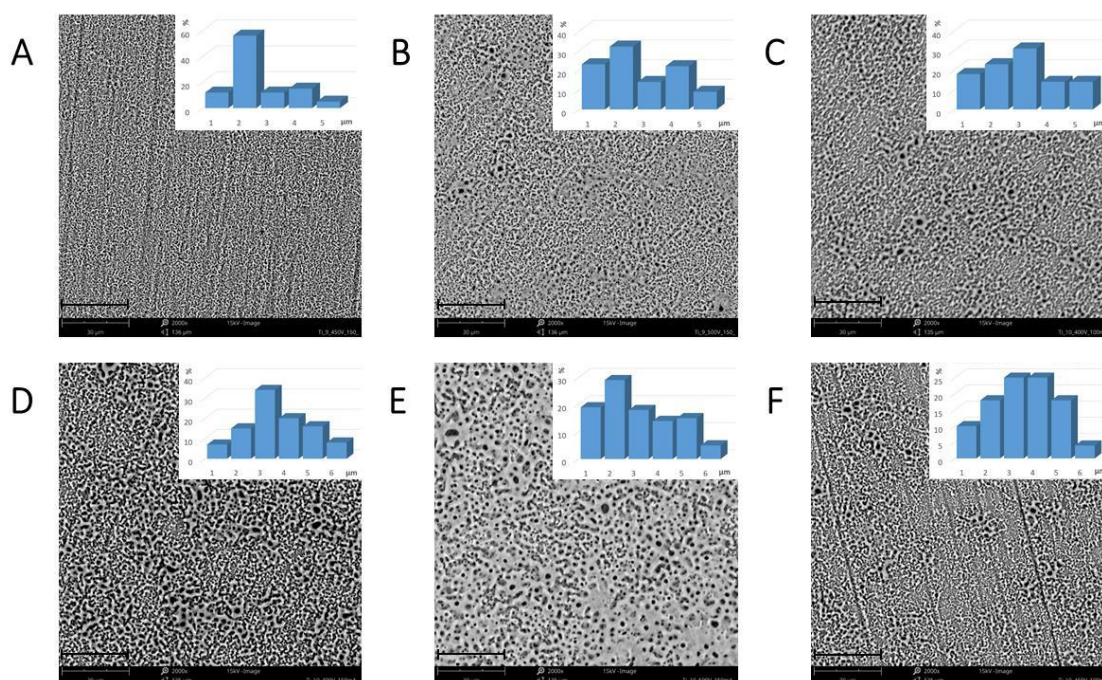


Рисунок 5.1 – Репрезентативні зображення SEM вибраних поверхонь РЕО. Вставки показують розподіл розміру пор у відповідних поверхнях РЕО. А) зразок Ti-1-450-150; В) зразок Ti-1-500-150; С) зразок Ti-2-400-100; D) зразок Ti-2-400-150; Е) зразок Ti-2-450-100; F) зразок Ti-2-500-150. Збільшення x2000, шкала 30 мкм.

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

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

Вставки показують розподіл розміру пор у відповідних зразках. Загальною тенденцією було помітне збільшення розміру пор із збільшенням вольт-амперних характеристик. Зразок Ti-1-450-150 має найменші пори, більшість з яких мають розмір близько 2 мкм. З іншого боку, зразок Ti-2-500-150 демонструє класичний розподіл у формі дзвона, де більшість пор мають розмір 3-4 мкм. Розмір пір та їх морфологія відіграють важливу роль у визначенні біологічних властивостей

імплантатів та їх поверхонь. Повідомлялося, що біоактивні поверхневі покриття, які мають мікропористу структуру із розміром пор 3-4 мкм у середньому діаметрі, такий самий, як у зразку 2-500-150, проявляють високу остеогенну та ангіогенну активність [126].

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

5.2.3 3D-реконструкція та аналіз EDX

Шар РЕО на зразку Ti-1-450-150 був збагачений P і Ca (рис. 5.2), компонентами електроліту (піки з низькою інтенсивністю, видимі в спектрі EDX). У зразку Ti-1-500-150 поверхня є більш розвиненою і пористою на основі Ti-1-450-150, а шар оксиду в більшій мірі збагачений компонентами ванни P і Ca. Піки для кисню та титану, компонентів оксидної плівки, також видно в обох зразках.

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

використовувати для отримання покриттів з найбільшою схильністю до остеоінтеграції.

5.2.4 Аналіз поперечних зрізів

На основі аналізу поперечних зрізів оксидних шарів, отриманих на титані, та їх відображення EDX було встановлено, що незалежно від використовуваних параметрів процесу отримані покриття добре прилипають до основного матеріалу (рис. 5.2). Ми помітили, що відшарування шару іноді спостерігалось лише як артефакт під час підготовки зразків. Товщина покриттів не перевищувала 8 мкм. Найцікавіші результати стосуються картографування оксидних шарів. Цей метод дозволяє визначити розташування вибраних елементів в оксидному шарі. У кожному випадку елементи, що містяться в електролітному розчині (Ca і P), були включені в усю структуру оксидного шару.

5.2.5 Рентгенівська фотоелектронна спектроскопія (XPS)

XPS - це дуже чутлива методика дослідження, яка дозволяє точно визначати концентрацію хімічних елементів на поверхні, а також призначати хімічні стани цих елементів. Дослідження XPS показали, що після обробки PEO поверхня Ti утворює шар, який складається із суміші оксидів та фосфатів. Зразкові спектри зразків Ti-1-450-150 і Ti-2-500-150 після процедури деконволюції, включаючи значення для P2p, Ca2p, C1s, K2p, Ti2p, O1s і N1s, наведені на рисунку 5.3.

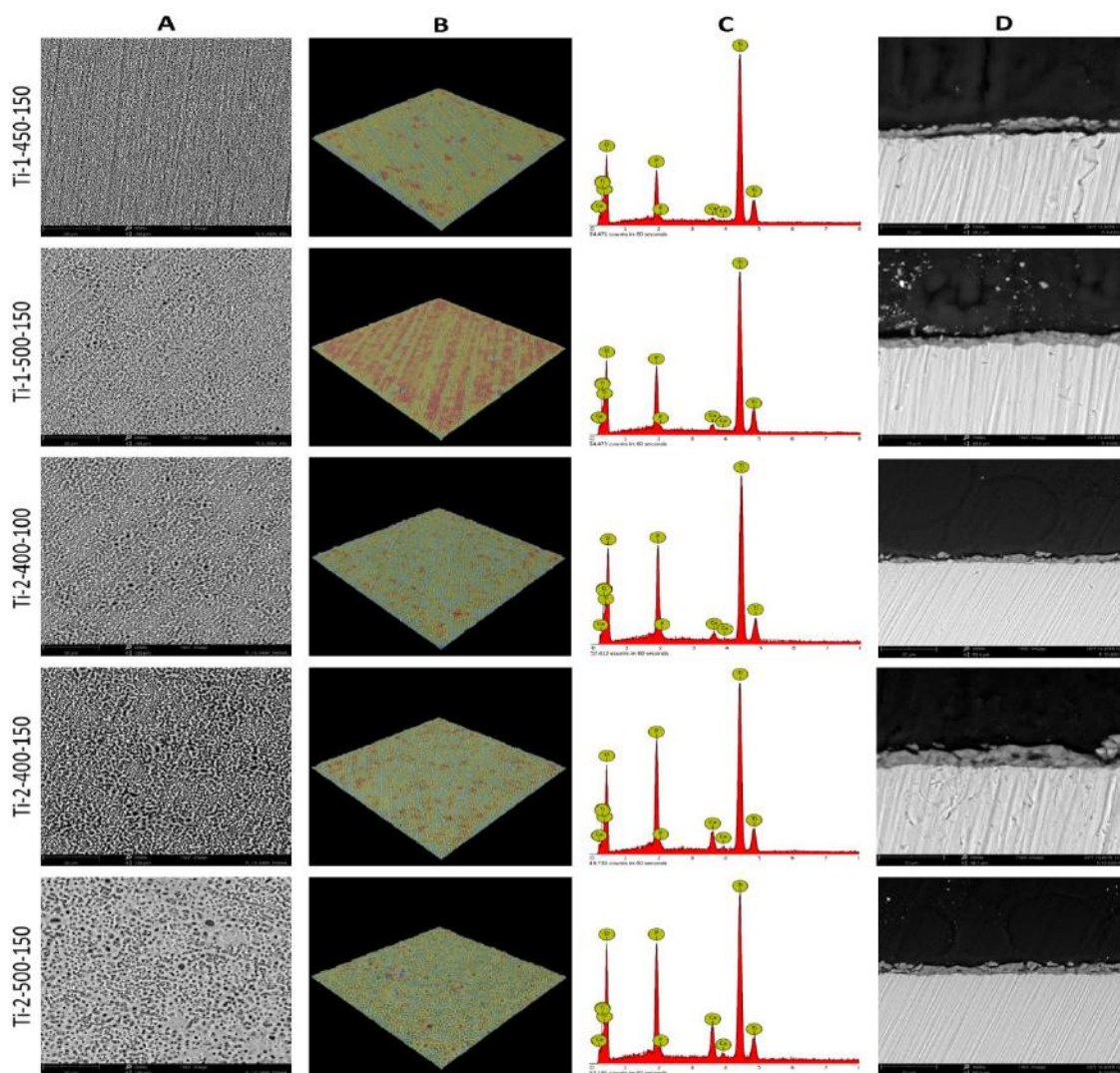


Рисунок 5.2 – А) SEM-зображення зразків Ті, оброблених РЕО, шкала 30 мкм; В) 3D-реконструкції; С) EDX-спектри поверхонь РЕО; D) SEM зображення поперечних зрізів шарів РЕО, шкала 10 мкм

Чотири хімічні стани кисню розділяли в спектрах O1s, записаних для обох зразків. Перший при 531,3 еВ або 531,4 еВ віднесений до кисню у функціональних групах фосфату кальцію (PO_4^{3-}), другий стан при BE 530,2 і 530,4 еВ може бути віднесений Ті в решітці TiO_2 , третій а четвертий стан віднесений зв'язкам $\text{C} = \text{O}$ і CO , другий стан при BE 530,2 і 530,4 еВ може бути віднесений Ті в решітці TiO_2 [127, 128]. XPS-спектри P2p з високою роздільною здатністю показують основний пік при 133,3 і 133,4 еВ, що відповідає хімічним станам фосфату кальцію і компонент при більш високих енергіях зв'язку, що, ймовірно, віднесений фосфату водню (134,4 еВ, HPO_4^{2-}) [129]. Спектри Ca2p підтверджують наявність фосфату

кальцію в шарі, де характерні піки $\text{Ca}2p_{3/2}$ були виявлені при 347,5 та 347,6 еВ. Для зразка Ti-2-500-150 XPS також виявили присутність калію, який асоціювався з групами PO_4^{3-} ($\text{K}2p_{3/2}$ - 292,9 еВ) [130]. Репрезентативні піки $\text{Ti}2p_{3/2}$ при енергії зв'язку 458,8 та 459,1 еВ характерні для Ti у структурі TiO_2 і можуть бути ідентифіковані як $\text{Ti}4+$. Хімічні види азоту також були виявлені в спектрах XPS. Два аналогічні хімічні стани азоту були розділені після деконволюції спектрів $\text{N}1s$ для досліджуваних зразків. Сигнали при 399,9 і 401,1 еВ призначалися аміногрупам (C-NH_2), тоді як другі при 401,9 еВ - амідним групам (C-NH_3^+). Ці висновки також можна побачити в спектрах $\text{C}1s$, де було виділено три стани вуглецю: 284,8 еВ (CC), 286,4 - 286,5 еВ (CO; CN), 288,8 - 288,9 еВ ($\text{O} = \text{C-OH}$, $\text{NC} = \text{O}$).

Як результат, у всіх випробуваних зразках були виявлені лише елементи, пов'язані з процесом РЕО, що вказує на чистоту використовуваного матеріалу. Домішок не виявлено. Єдиним чужорідним елементом був кремній, який був результатом перенесення в процесі подрібнення зразків. Як і очікувалось, найвища концентрація кисню була зафіксована на поверхні зразків. Його вміст становив 40-60% (табл. 5.2). Кисень в основному містився у формі оксиду титану, але також у фосфатній формі та у сполуках з вуглецем. Кисневі та вуглецеві сполуки отримували головним чином із використовуваного комплексоутворювача (ЕДТА). Вміст фосфору становив 8-14%. Р містився лише у фосфатній формі (PO_4^{3-}), як у фосфаті кальцію та калію. Цей елемент отримують з електролітної ванни. Ще один важливий елемент, кальцій, був присутній у кожному з досліджуваних зразків. Його вміст становив 0,5-9%. Кальцій знаходився лише у формі фосфату кальцію. Ця сполука утворилася під час анодного окислення титану. Він походить від комплексу Ca-EДТА . Калій, інший компонент ванни, дуже погано входить в оксидний шар. Його вміст коливався на рівні 0-0,2%, головним чином у фосфатній формі. Титан із вмістом 10-15% містився переважно у оксидній формі. Важливо, що азот також був виявлений в оксидному шарі. Він походить від комплексу Ca-EДТА . Вміст азоту був відносно низьким, не більше 2%, і він був присутнім у формі аміногруп, пов'язаних з вуглецем. Незважаючи на низький вміст, азот може суттєво сприяти поєднанню хімічних факторів, що сприяють біосумісності. У сукупності

ці результати дозволяють припустити, що умови РЕО, використовувані для отримання зразка Ti-2-500-150, були достатніми для отримання біологічно активних поверхневих шарів, які сприяють остеоінтеграції.

Таблиця 5.2 – Кількісна оцінка XPS-аналізу поверхонь РЕО

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

5.2.6 Спектроскопія Raman

Аналіз спектрів Raman дозволяє нам констатувати, чи є на досліджуваних поверхнях добре кристалізований TiO_2 у формі анатазу (вузькі сигнали при 144; 390; 512; 633 cm^{-1}). Для деяких зразків реєстрували широкі сигнали фосфорних груп (260; 800; 1006 та 3132 cm^{-1}) (фосфат кальцію), що свідчить про високу аморфність. На рис. 5.3 показані спектри зразків з різним вмістом фосфатів. Аналіз показав, що поверхні всіх досліджених зразків містять кристалізований TiO_2 у формі анатазу. Крім того, в деяких зразках виявлено, що широкі сигнали фосфорних груп (фосфат кальцію) є високоаморфними. У різних зразках був різний вміст фосфатів. Вміст фосфатних груп по відношенню до діоксиду титану оцінювали шляхом визначення співвідношення I_{1006}/I_{144} (табл. 5.3). Як правило, значення були нижчими для зразків РЕО, отриманих з електролітом 1, і вищими для електроліту 2. Найнижчий вміст фосфатів був зафіксований для зразка Ti-1-500-450, а найвищий для Ti-2-500-150. Ніяких додаткових сигналів від ЕДТА не зареєстровано. Ці результати дозволяють припустити, що протокол РЕО з електролітом 2, напругою 500 В і щільністю струму 150 mAcm^{-2} може бути оптимальним для отримання поверхневих шарів з високим вмістом фосфатів, а отже, з високою схильністю до остеоінтеграції.

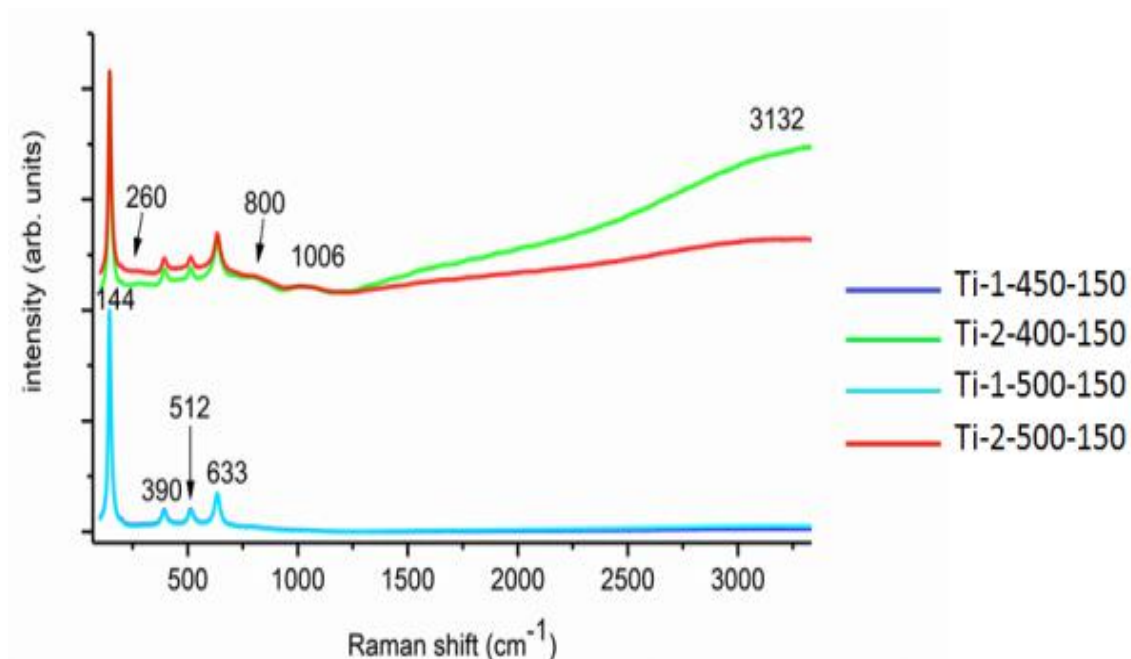


Рисунок 5.3 – Зразки спектрів Raman з різним вмістом фосфатів. Порівняння вмісту фосфатів проводили на основі інтенсивності фосфатних вібрацій 1006 cm^{-1} до TiO_2 144 cm^{-1} для вибраних поверхонь PEO

Таблиця 5.3 – Порівняння вмісту фосфату на основі інтенсивності фосфатних коливань 1006 cm^{-1} до TiO_2 144 cm^{-1}

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

5.2.7 Дифракція рентгенівських променів (XRD)

Дифракційні картини ($\alpha = 0,25$) зразків показують, що шари мають полікристалічний характер. Крім того, для частин зразків (Ti-2-400-100, Ti-2-400-150) видно аморфне "hallo" (рис. 5.4). Якісний фазовий аналіз зразків показує, що

шар складається з TiO_2 [анатаза, с. I41 / amd] (ICDD PDF 01-084-1286) і Ti [альфа-титан, с.г. P63 / mmc] (ICDD PDF 01-089-5009) фази. У разі Ti-10-500-150 зразок TiO_2 [Рутил, с.г. P42 / mmm] (ICDD PDF 04-007-5403) також спостерігається фаза.

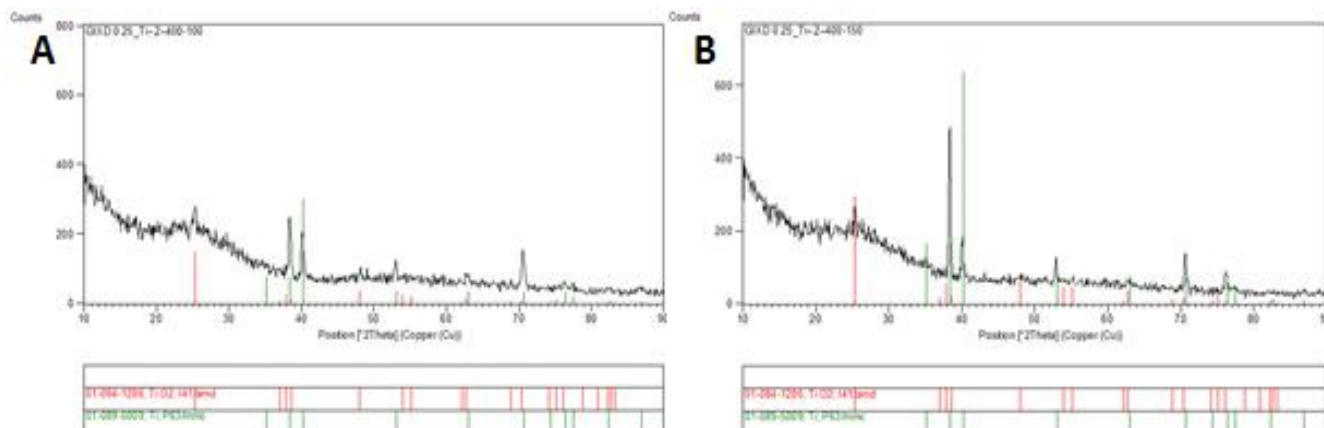


Рисунок 5.4 – Діаграми XRD, що показують А) дані для зразка PEO Ti-2-400-100; В) дані для зразка PEO Ti-2-400-150

5.2.8 Шорсткість і гідрофільність поверхонь PEO

Було виявлено, що шорсткість поверхонь PEO, як правило, вища для електроліту 2 порівняно з електролітом 1, і була найвищою для зразка Ti-2-500-150 (рис. 5.5). Більша шорсткість може сприяти прикріпленню та розмноженню остеогенних клітин [131]. Це показує, що протокол PEO, використаний для генерації зразка Ti-2-500-150, був найбільш оптимальним для формування біоактивних та біосумісних поверхонь на імплантатах Ti зі значною схильністю до остеоінтеграції.

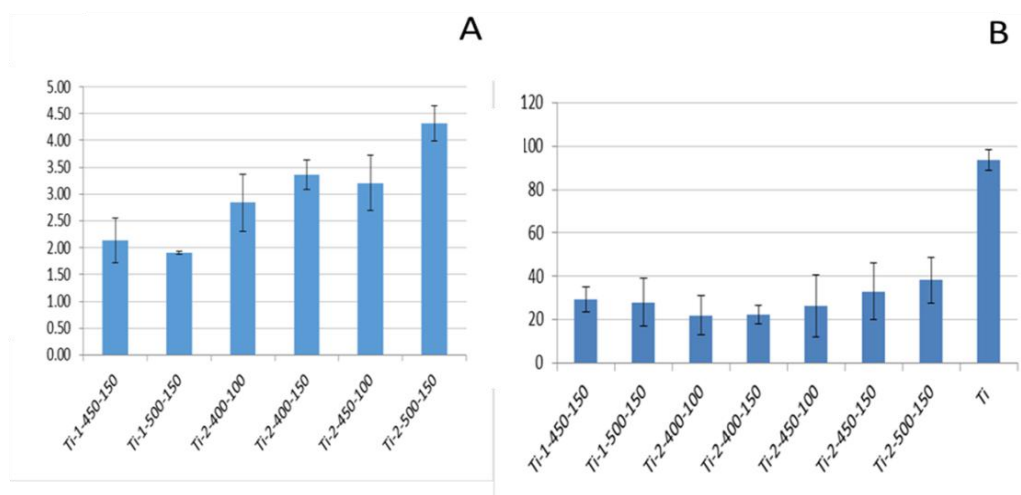


Рисунок 5.5 – Шорсткість вибраних поверхонь, А) (зображена у довільних одиницях) та кут контакту, В) (вимірюється краплею води)

Вимірювання кута контакту показало, що оброблені РЕО поверхні зразків Ті набули значно більшої гідрофільності порівняно з еталонними зразками Ті без будь-якої поверхні РЕО (рис. 5.5). Це свідчить про те, що поверхні, що генеруються РЕО, можна розглядати як більш біологічно активні в порівнянні з необробленим титаном.

5.2.9 Випробування твердості та міцності

Тест є методом для оцінки міжфазного зчеплення шару покриття з основним матеріалом основи. Критичне навантаження L_c - це нормальна сила, прикладена до проникаючого пристрою, що спричиняє міжфазний збій, що корелює з міцністю зчеплення. Неперервна пластична перфорація шару була виявлена в кожному досліджуваному зразку (рис. 5.6 А). Значення критичного навантаження L_{c1} відповідає наступам руйнування клею, коли починається розтріскування; тоді як L_{c2} відповідає початку спалації (розпаду) адгезивного шару. Виявлено різні значення критичної сили L_{c1} та L_{c2} залежно від параметрів РЕО (рис. 5.6 В). Було встановлено, що зразок Ті-2-400-100 мав найсильнішу адгезію зі значенням критичної сили $L_{c2} = 9,01$. У кожному дослідженому зразку не було виявлено акустичного випромінювання, що вказує на те, що керамічні покриття не були

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

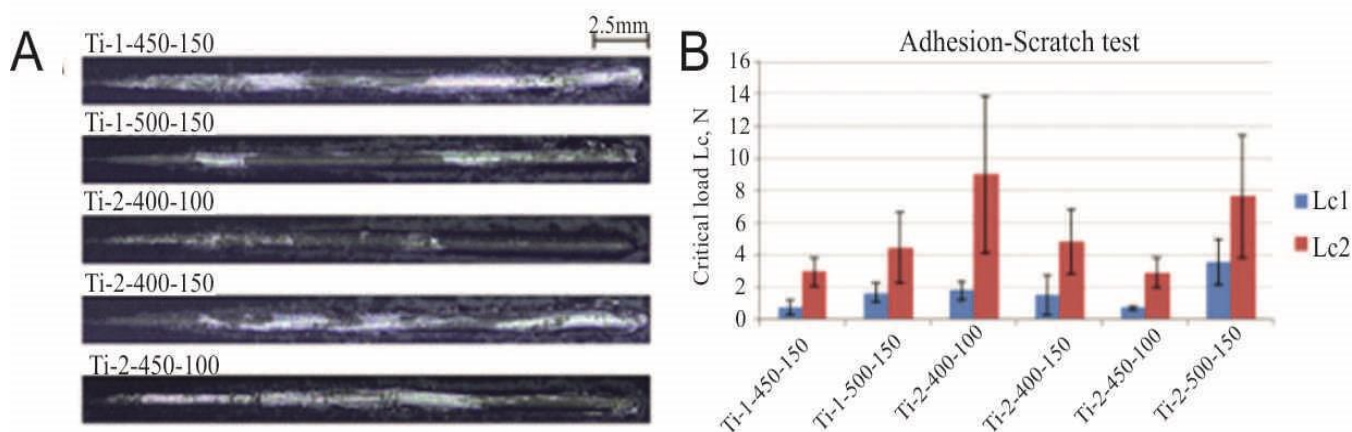


Рисунок 5.6 – Адгезія оксидного шару до підкладки Ті, продемонстрована за допомогою випробування твердості та міцності. А) репрезентативні фотографії подряпин на поверхні оксидних шарів; В) кількісна оцінка результатів

5.2.10 Стійкість до електрохімічної корозії

Для оцінки корозійної поведінки зразків титану, обробленого РЕО, де необроблений титан служив контролем, використовували електрохімічний аналіз корозії. Результати представлені на рисунку 5.7. На діаграмах відображаються за величиною (рис. 5.7 А) та зсувом фаз (рис. 5.7 В) дані імпедансу. Результати показують, що спектр для контрольного зразка (необробленого Ті) характеризується єдиною постійною часу. З іншого боку, спектри обробленого РЕО Ті мали принаймні двічі константи (рис. 5.7 В). Крім того, спектри, виміряні для

цих зразків, мали загальний імпеданс вищий, ніж у контрольного зразка, у всьому досліджуваному діапазоні частот (рис. 5.7 А). Це говорить про те, що покриття покращили корозійну стійкість основи в розчині Рінгера. Більш того, покриття, отримане в розчині 2 має більш антикорозійний характер, ніж те, що було отримане у розчині 1. Ємності апроксимували за допомогою елементів постійної фази (CPE).

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

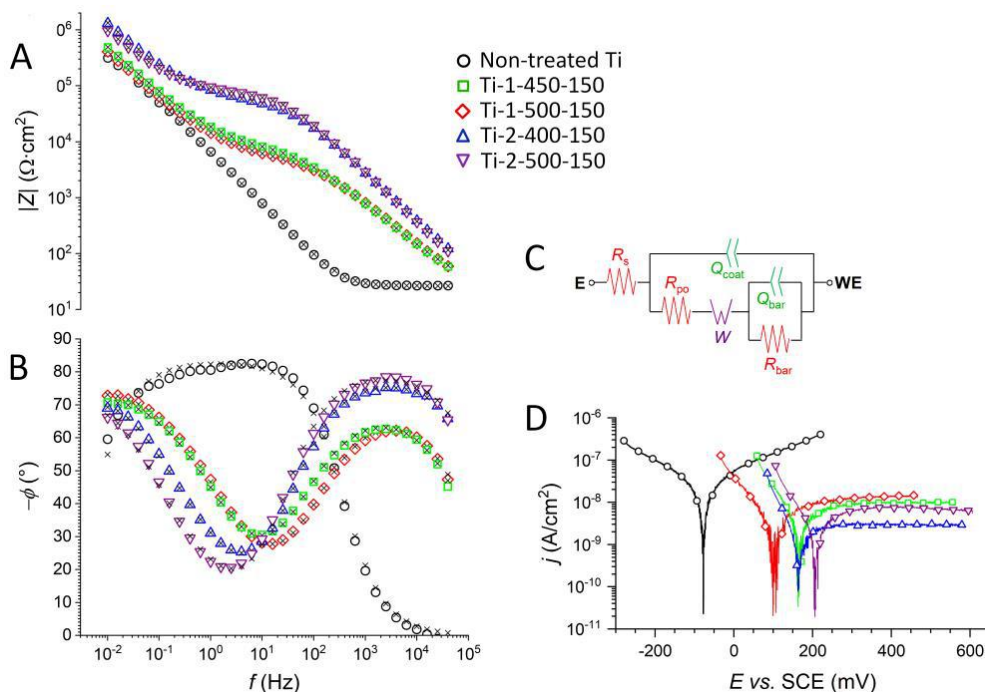


Рисунок 5.7 – Діаграми Воде, що показують А) величину імпедансу ($|Z|$); В) зв'язок негативного фазового кута ($-\phi$) з частотою для необробленого зразка титану та зразків, оброблених РЕО. \times означають бали, розраховані від підгонки експериментальних даних до моделі $R_s(Q_{\text{bar}}R_{\text{bar}})$ для необробленого титану, та ЕЕС, зображеного на С) для зразків, оброблених РЕО; D) криві PDP, записані для необроблених зразків титану та після обробки РЕО.

Швидкість корозії підстиляючого Ті зменшується, оскільки цей опір стає більшим. Q_{bar} апроксимує ємнісні ефекти, що відповідають пасивному оксидному

шару. Реакція імпедансу зразків титану, оброблених РЕО, змодельована з використанням ЕЕС, показаного на рис. 5.7 С. Оскільки оксидні покриття з РЕО мали двошарову природу, слід було враховувати опори, що відповідають характеристичі імпедансу зовнішнього пористого (R_{po}) та внутрішнього бар'єрного (R_{bar}) шарів. Роль Q_{coat} полягала в моделюванні ємності всього покриття (пористий + бар'єрний шари), тоді як Q_{bar} відноситься до ємнісної поведінки внутрішнього бар'єрного шару. Щоб належним чином підігнати експериментальні результати до еквівалентної схеми, потрібно було включити ще один. Причиною цього була неможливість оцінки значення R_{bar} в процесі встановлення. Його значення завжди наближалось до нескінченності, а стандартна похибка, пов'язана з припасуванням, набагато перевищувала 100%. Тому вирішили включити в аналіз елемент напівнескінченної дифузійної схеми імпедансу Warburg (W). Той факт, що такий елемент повинен бути включений в схему, свідчить про те, що процес корозії був обмежений дифузією корозійного середовища через пористу архітектуру покриття [132, 133].

Таблиця 5.4 – Параметри, отримані від підгонки даних до моделі $R_s (Q_{bar}R_{bar})$ у випадку необробленого зразка Ti, та ЕЕС, показаних на рис. 5.7 С для зразків титану, оброблених РЕО

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

Можна зазначити, що n параметрів в ланцюгах коливаються в межах від 0,77 до 1,00, що характерно для ємнісних елементів корозійних систем. Можна відзначити, що зразки Ti-1-450-150 та Ti-1-500-150 мали дуже схожі корозійні властивості, причому останні були менш стійкими. Більше того, опір пористої частини покриття був вищим для зразка PEO-ed при 500 В, що свідчить про те, що або його товщина була більшою, ніж у зразка, обробленого до 450 В, або його пористість була меншою. Ця знахідка відповідає вищому значенню коефіцієнта Варбурга, визначеному для зразка Ti-1-500-150. Як видно з рис. 5.7, параметри придатності (табл. 5.5) зразків, оброблених у розчині 2 показують, що їх корозійна стійкість перевищувала оброблені PEO зразки Ti, отримані у розчині 1. Значення R_{po} для цієї серії зразків були на порядок вищими, ніж для Ti-1-450-150 та Ti-1-500-150. У цьому дослідженні найкращі результати були отримані для зразка Ti-2-400-150. Однак стійкість до корозії інших зразків Ti була незначною мірою гіршою.

Таблиця 5.5 – Дані про корозію, отримані з поляризаційних експериментів, проведених на короткому діапазоні (LPR) і на великому діапазоні (PDP)

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

Після завершення вимірювань зразки пройшли поляризаційні експерименти. Результати сканувань на великих відстанях представлені на рисунку 5.7 D, тоді як параметри корозії, вилучені з експериментів постійного струму, можна знайти в таблиці 5.4. Можна зазначити, що анодна гілка ділянки Тафеля, що відповідає голої поверхні Ti, свідчить про те, що відбувається окислення металу. В таких умовах окислення призводить до пасивації металу [134]. Однак характерне плато, на якому

можна було б оцінити щільність струму пасивації (i_{pas}), не було досягнуто в діапазоні потенціалів, вибраному в цьому дослідженні. Тому в цій роботі i_{pas} було обрано як щільність струму, виміряну на кінцевому потенціалі сканування (при +250 мВ проти ЕОС). Тим не менше, у випадку всіх зразків, оброблених РЕО, плато пасивації було досягнуто майже відразу після проходження через потенціал корозії (рис. 5.7 D). Дотримуючись даних на рис. 5.7 D та таблиці 5.4, можна зробити висновок, що найкращим показником зразка Ті був Ті-2-400-150 (найвищий R_p і найнижчий i_{pas}). Однак стійкість до корозії інших зразків, оброблених РЕО, все ще була набагато вищою, ніж у зразка оголеного Ті. Крім того, E_{cor} цих зразків був зміщений у бік більш позитивних значень щодо контрольних. Загалом, це показує, що корозійна стійкість Ті була покращена за допомогою обробки РЕО, незалежно від обраних умов процесу, з найкращими результатами, отриманими для зразка Ті-2-400-150.

5.2.11 Довгостроковий аналіз корозійної стійкості (у розчині Рінгера)

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

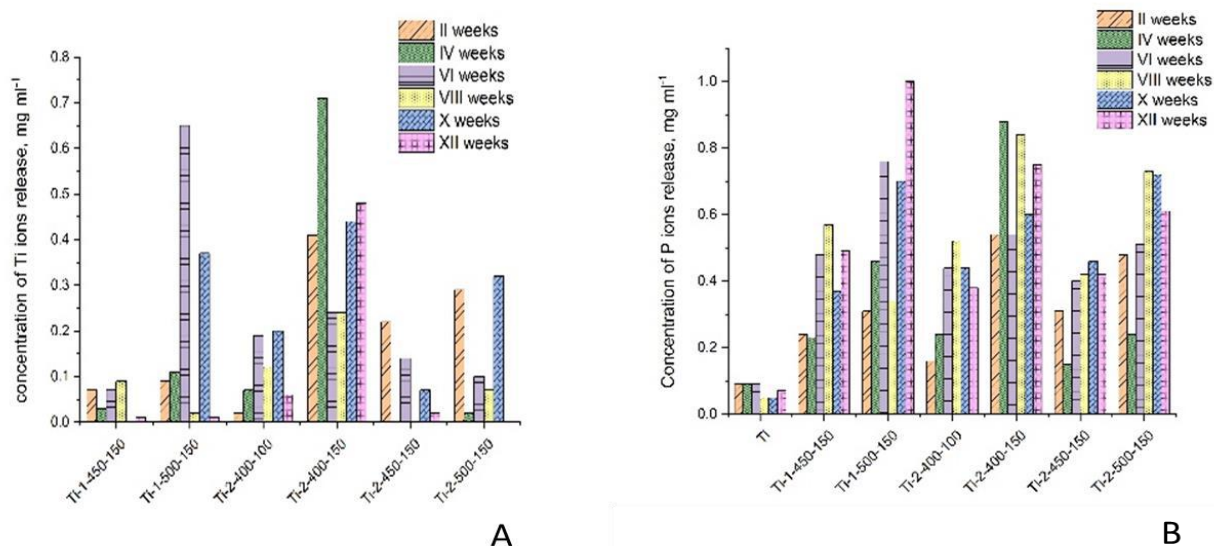


Рисунок 5.8 – Вивільнення специфічних елементів після тривалої інкубації в розчині Рінгера протягом 12 тижнів. Аналітичний аналіз ICP-OES проводили кожні 2 тижні. А) виділення іонів Ti; В) виділення іонів P. Дані показали статистичну значимість при $p < 0,05$.

5.2.12 Аналіз біоактивності у модельованій рідині організму (SBF)

Аналіз імітованої рідини тіла був використаний для відтворення впливу рідин організму на поверхневі шари тестових зразків, генерованих PEO, щодо кристалізації апатитів. Зразки піддавали дії розчину SBF протягом 4 тижнів, а морфологію поверхні спостерігали через кожен тиждень (рис. 5.9). Ми спостерігали такі явища: Ti: як очікувалося, протягом 4 тижнів впливу розчину SBF на поверхні титану не було виявлено збільшення кількості апатиту. Ti-1-450-150 і Ti-1-500-150: після повернення другого тижня впливу на поверхнях зразків було виявлено мінімальні осади, які з часом не збільшувались. Ми дійшли висновку, що ці поверхні стійкі до процесу кристалізації апатитів. Ti-2-400-100: поверхня зразка була повністю покрита шаром апатитів через два тижні впливу. Шар був досить товстим, через кілька тижнів він відшарувався від поверхні зразків. Це свідчить про те, що ця поверхня сприяє кристалізації апатитів.

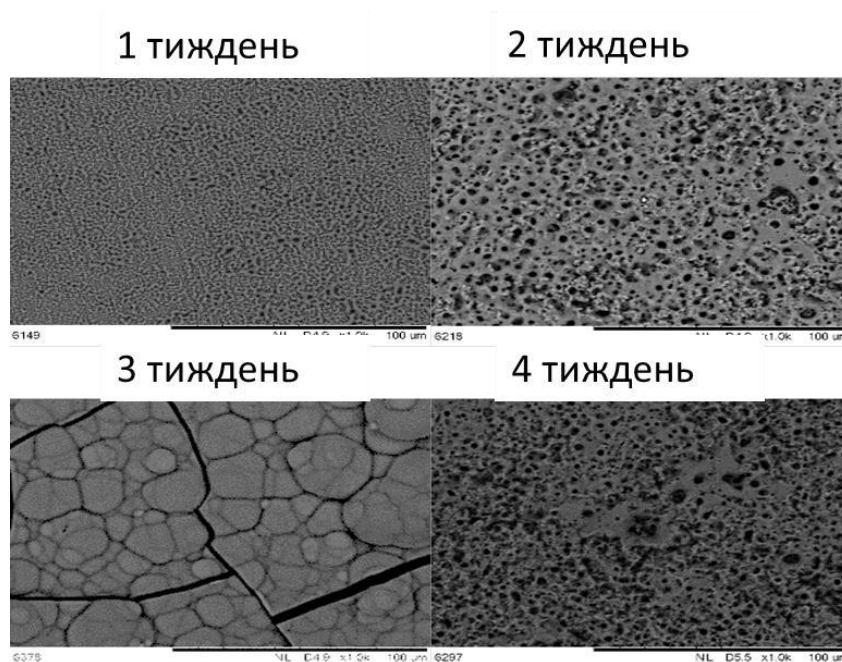


Рисунок 5.9 – Репрезентативні SEM-зображення поверхні зразка Ti-2-400-150 після тесту на біоактивність у розчині SBF, шкала 100 мкм

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

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

Було проведено рентгенографічний аналіз та аналіз EDX на окислених поверхнях титану після інкубації в імітованому фізіологічному розчині. Фазовий склад оцінювали за допомогою XRD-аналізу, за допомогою лампи Cu та нікелевого

фільтра. Зразки Ti-2-400-100 та Ti-2-450-150 були обрані, оскільки попередньо спостерігалось утворення шару апатиту на їх поверхнях після занурення в імітовану рідину тіла. Зображення на рис. 5.10 показує дифрактограми, записані для зразків Ti-2-400-100 (II тиждень) і Ti-2-450-150 (III тиждень), для яких проводиться аналіз фазового складу покриття в 2Theta. Виконано діапазон кутів 20° - 40° . Для зазначених зразків не було зафіксовано характерних дифракційних відбиттів, які чітко вказували б на наявність фази, що містить гідроксиapatит. В інтервалі кутів 25° - 27° 2 Тета та 31° - 34° 2 Тета вказує на наявність аморфної фази, що може свідчити про наявність оксиду титану, а також про утворення аморфної фази, що містить фосфати кальцію в результаті поверхневе занурення в розчин SBF. Крім того, в досліджуваному діапазоні не було зафіксовано жодних сигналів, характерних для оксиду титану в поліморфній формі анатазу або рутилу. Отже можна зробити висновок, що зареєстрована аморфна площа зареєстрована для сформованої частини апатиту. Були записані характерні дифракційні рефлекси, що відповідають титаномісткій фазі. На присутність фосфату кальцію вказує морфологія поверхні, на якій підтверджено утворення апатитового шару за допомогою методу EDX (рис.5.10.). На спектрах добре видно піки від Ca, P та O (O не позначено). Атомне співвідношення кальцію та фосфору (Ca/P) становить близько 1,68. Це значення дуже характерне для гідроксиapatиту. У сукупності ці результати дозволяють припустити, що поверхні РЕО, що утворюються з електролітом 2, можуть мати схильність до утворення гідроксиapatитів у фізіологічних умовах в організмі.

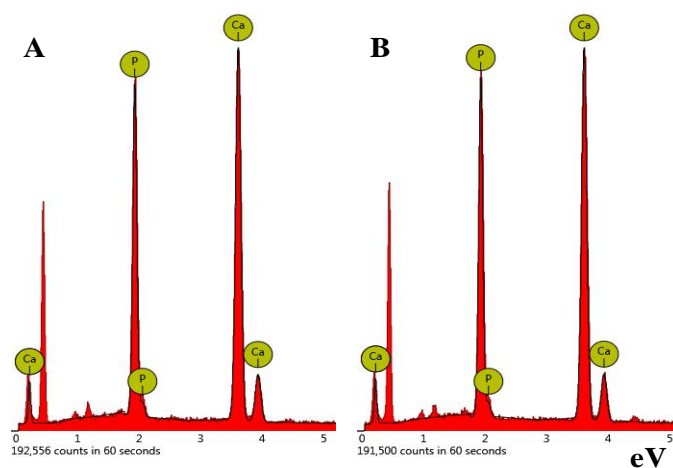


Рисунок 5.10 – Спектри EDX зразків Ti-2-400-100 (А) та Ti-2-450-150 (В) після тесту на біоактивність у розчині SBF

5.2.13 Аналіз цитотоксичності зразків та життєздатності клітин

Аналіз зниження рівня резазурину на 1 день показує насамперед рівень цитотоксичності зразка та прикріплення клітин, оскільки проліферація ще не є інтенсивною протягом цього короткого періоду часу. Як видно з рисунку 5.11, всі досліджувані поверхні PEO були сприятливими для життєздатності клітин і не виявляли жодних ознак цитотоксичності. Клітинне прикріплення було кращим у всіх досліджених зразках PEO порівняно з контролем (полірована поверхня Ti без будь-якого шару PEO). Серед різних тестових зразків зразки Ti-1-450-150, Ti-2-400-100 та Ti-2-500-150 продемонстрували значну перевагу над іншими у прикріпленні клітин наприкінці інкубації одного дня. Не спостерігалось суттєвої різниці між усіма зразками, випробуваними на 3 день. Деякі зразки демонстрували сповільнене зростання через 7 днів інкубації. Можливо, що в цей момент часу умови не були сприятливими через розростання клітин. Ми дійшли висновку, що умови PEO, що використовуються для формування шару Ti-2-500-150, можна вважати придатними для подальших випробувань з метою отримання поверхонь імплантатів з високою схильністю до остеоінтеграції.

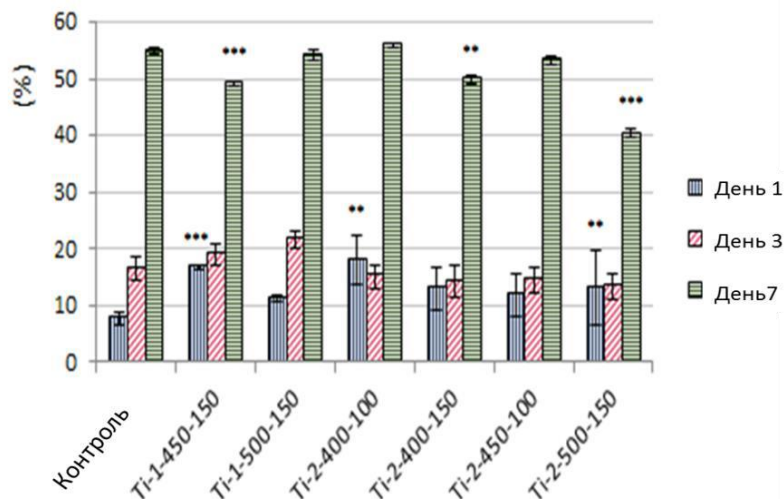


Рисунок 5.11 – Аналіз цитотоксичності/життєздатності клітин. Статистичну значимість оцінювали у порівнянні з контролем кожного моменту часу (значення р після двобічного дворівневого тесту на рівню дисперсію)

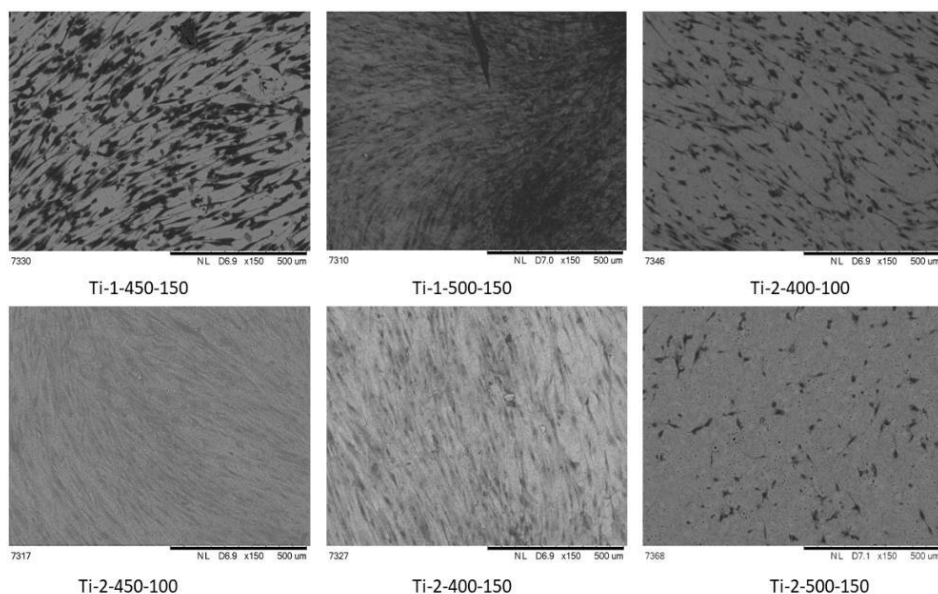


Рисунок 5.12 – Скануюча електронна мікроскопія розподілу остеобластів по експериментальних поверхнях на 7-й день після висіву клітин, шкала 500 мкм

Скануюча електронна мікроскопія демонструє рівномірний розподіл клітин остеобластів на поверхнях зразка (рис. 5.12). Клітини вирівняні та рівномірно розподілені по всіх зразках Ti-1, а також по Ti-2-440-100 та Ti-2-400-150. І Ti-2-400-100, і Ti-2-500-150 мають випадковий розподіл клітин з меншим числом клітин.

Незважаючи на відмінності в розподілі клітин, на обох зразках клітини набули звичайної витягнутої форми та численних контактів. Низька щільність клітин на зразку Ti-2-500-150 на 7 день корелює з даними аналізу відновлення резазурину і може пояснюватися властивостями поверхневої адгезії після засівання остеобластів.

5.2.14 Дослідження адгезії бактерій

Тривалість імплантації зубного імплантату залежить від його здатності протистояти адгезії бактерій на його поверхні з наступною колонізацією та утворенням біоплівки. Метою експерименту з адгезією бактерій було визначити здатність поверхонь, що генеруються PEO, протистояти прилипанню бактеріальних клітин. Адгезію бактерій із використанням золотистого стафілокока визначали через 2, 4, 6 та 24 год впливу мікроорганізму на досліджувані зразки. Після 2 год інкубації було виявлено, що лише Ti-2-400-150 містить значно менше бактерій, що прилипають до поверхні, порівняно з необробленим зразком Ti (рис. 5.13). При дослідженні через 4 та 6 годин не було виявлено суттєвих відмінностей щодо адгезії бактерій до поверхні між усіма досліджуваними зразками та контролем. Однак через 24 години інкубаційного періоду зразки Ti-1-500-150 та Ti-2-400-100 виявили значно менше бактерій, що прилипали до їх поверхні, порівняно з контролем. Підводячи підсумок, ці результати дозволяють припустити, що в експериментальних умовах поверхневий шар, що генерується PEO, на Ti-2-400-150 був ефективним протистояти прикріпленню бактерій протягом короткого періоду, тоді як Ti-2-400-100 і Ti-1-500-150 були ефективними для протистояння бактеріальній адгезії протягом тривалого часу.

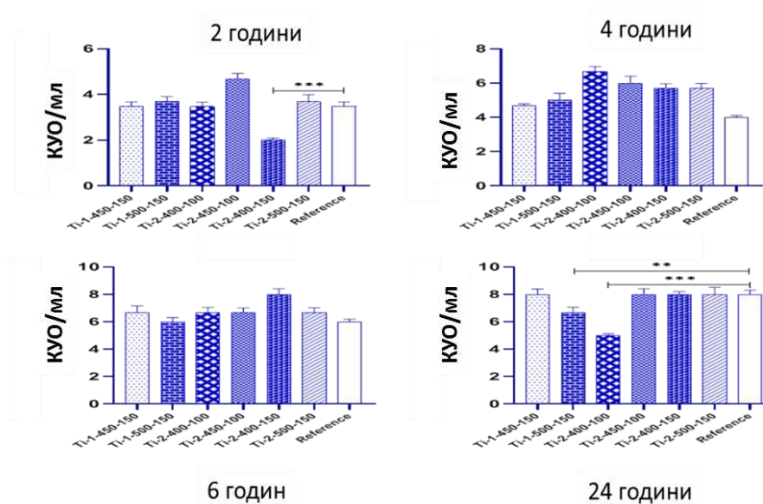


Рисунок 5.13 – Адгезія бактерій. Кількість бактерій прилипало до поверхонь зразків у різні моменти часу інкубації. Дані відображаються як засоби зі значеннями SD. Зірочками позначені значення p , де ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ (односторонній тест ANOVA)

5.3 Обговорення

Нашою метою було знайти простий склад РЕО-електроліту, який може утворити бажаний шар покриття на поверхні імплантатів Ti. Оброблені методом кислотного травлення поверхні Ti не мають шорсткості, придатної для підтримки проліферації клітин [135]. Біоактивні покриття були успішно синтезовані РЕО в електролітах як з основними, так і з кислими значеннями рН [136]. Наявність певних специфічних хімічних груп може призвести до підвищеної схильності до зв'язування певних білків та утворення міцних зв'язків з остеогенними клітинами [137]. Здатність поверхневого покриття підтримувати біологічні функції, наприклад остеоіндукції та остеointegraції, визначається подібністю його структури та хімічного складу до біологічних тканин. Основним мінеральним компонентом кістки є гідроксиапатит, який складається з фосфату Ca, Ca₅(PO₄)₃(OH). Тому, маючи схильність до остеointegraції, поверхневі шари імплантату повинні підтримувати фосфатні групи Ca, що може полегшити зв'язок з кістковою тканиною. Таким чином, ми висунули гіпотезу про те, що фосфат можна додавати до електроліту, використовуючи фосфат калію, KН₂PO₄. Крім того,

електрохімічні параметри (напруга/струм) під час РЕО без KH_2PO_4 не досягали очікуваної стабільної поведінки. Що стосується джерела іонів кальцію для утворення комплексу фосфату кальцію, ми дослідили два варіанти: неорганічне та органічне джерело кальцію, а саме гідроксид кальцію, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ та формиат кальцію $\text{Ca}(\text{HCOO})_2$. Виходячи з наших попередніх спостережень та результатів інших, ми постулювали, що іони кальцію бажано подавати у вигляді великого органічного комплексу. Таким чином, ми забезпечили електролітний розчин етилендіамін тетраоцтовою кислотою, хелатоутворюючим агентом, який зв'язує різні іони металів, і раніше було показано, що він включає оксиди металів у покриття РЕО завдяки утворенню негативно заряджених частинок. Крім того, наявність комплексів метал-ЕДТА призвело до зменшення відкритої пористості в шарі покриття. Також було висловлено припущення, що використання комплексів ЕДТА та металу-ЕДТА в якості електролітних добавок може бути корисним для зменшення дефектів, що утворюються в шарі покриття РЕО, без використання складної форми струму та тривалого часу покриття. Це відповідало запропонованій моделі механізмів осадження фосфатів кальцію в процесі РЕО [138]. Важливим параметром для остеоінтеграції є співвідношення Ca/P у поверхні покриття. Таким чином, ріст ендотеліальних клітин був вищим на покриві з найвищим співвідношенням Ca/P [139]. Крім того, найбільш оптимальні умови росту для остеобластів мали місце при співвідношенні Ca/P близько 1,7 в об'ємних матеріалах Ca-P [140, 141]. Хоча наші РЕО-покриття мають співвідношення Ca/P не вище 0,26, судячи з аналізу XPS, вони проте продемонстрували значну здатність до осадження апатитів під впливом імітованих фізіологічних умов в організмі, що підтверджується зображеннями SEM після інкубації в SBF і підтверджено за допомогою аналізу EDX. Важливо, що аналіз SBF з Ti, що не має покриття, не показав жодного збільшення осаду апатиту після тривалого 4-тижневого впливу в розчині SBF. Навпаки, поверхні РЕО спричиняли стійкі осади апатитів, що часто призводило до самостійного відшарування (розшарування) апатитів, що відбувалося між 3 та 4 тижнями експозиції. Це свідчить про те, що здатність шарів, що генеруються РЕО, викликати випадання апатиту потрібно ретельно

збалансувати для досягнення бажаного покриття, оскільки занадто товстий шар апатитів може порушити механічну стійкість біоактивних поверхонь. Механізм осадження апатитів - це багатоступеневий процес, заснований на специфічній адсорбції іонів Са на негативно зарядженій поверхні та безперервній адсорбції фосфатних іонів на адсорбованому Са. Тут можна зауважити, що результати тестів SBF не завжди були однозначними і іноді мало узгоджувалися з результатами біологічних аналізів, наприклад неактивна поверхня у розчині SBF може виявляти високу активність у біологічних (клітинних) дослідженнях і навпаки. Ці розбіжності вимагають подальших досліджень. Однак загалом наші результати свідчать про те, що покриття з РЕО підвищують схильність імплантатів до остеоінтеграції завдяки підвищеному вмісту Са/Р.

Поверхнево-кістковий інтерфейс імплантату є основою взаємодії між матеріалом і кістковою тканиною [142], а розмір та морфологія пір імплантатів відіграють важливу роль у їх біосумісності. Біоміметичні покриття виявляють свої остеоінтеграційні властивості значною мірою завдяки оптимальному розподілу розмірів пор [143]. Ми показали, що РЕО можна розглядати як метод вибору для отримання мікропористих біоміметичних покриттів завдяки його здатності утворювати пори оптимального розміру. Повідомлялося, що надтонкі (100 нм) пори можуть брати участь у посиленні клітинних реакцій [144]. Загалом, остеоінтеграційна здатність імплантатів залежить від багатьох факторів, включаючи координацію, ковалентний зв'язок, електростатичні взаємодії, водневий зв'язок тощо та здатності, наприклад для підтримки специфічного поглинання білка та утворення філоподій навколишніми клітинами та їх міцного прикріплення до поверхонь [132]. Все ще залишається незрозумілим, які особливості поверхні ефективніше регулюють функції клітин [145]. Однак ми припускаємо, що оптимальні результати для довготривалої стабільності імплантатів, швидше за все, будуть досягнуті за допомогою поєднання обох мікропористих покриттів з макропористою структурою імплантатів, що може бути досягнуто, наприклад виробництво добавок або порошкова металургія [146] з подальшою обробкою РЕО.

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

Іншим важливим параметром для потенційної остеоінтеграції є морфологія і розмір пор. Таким чином, пори розміром менше 120 мкм вважаються значно меншими, ніж ті, що необхідні для проникнення остеобластів [147]. Тому подальші зусилля слід інвестувати у створення біоактивних поверхонь із відповідною пористістю для оптимальних можливостей остеоінтеграції. Крім того, зубні/кісткові імплантати повинні витримувати високі механічні навантаження, і тому вони повинні мати відносно високу міцність на стиск [148-151]. Ми досліджували як механічну стійкість, так і міцність на зчеплення шарів РЕО за допомогою випробування твердості та міцності, і виявили, що процес РЕО забезпечує виготовлення біоактивних поверхонь з необхідними механічними характеристиками.

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

Аналіз XPS підтверджує наш висновок, що РЕО з обраними компонентами електроліту є відносно "чистим" процесом, що дає досить передбачувані результати. Таким чином, було виявлено, що Р існує лише у фосфатній формі (PO₄³⁻), тоді як Са міститься лише у формі фосфату кальцію. Калій, навпаки, був лише незначно включений в оксидні шари. Цікаво, що азот також знаходився на

поверхнях РЕО. Джерелом N була ЕДТА, що ще більше підкреслювало потенційну перевагу присутності цього компонента в електроліті партії. Насправді азот можна розглядати як важливу передумову для підвищення біосумісності та здатності утворювати щільні сполучення з живими тканинами. Цей процес не завжди є простим і ще не до кінця зрозумілим. Так, наприклад, спостереження за ефектом місцево застосовуваного інсуліноподібного фактора росту-I на остеоінтеграцію було без позитивних реакцій через 2 тижні як у остеопоротичних, так і у здорових кроликів [152].

Шари РЕО виявили сприятливу шорсткість поверхонь імплантату. Відомо, що поєднання хорошої шорсткості поверхні та механічних властивостей титану може призвести до успішних імплантацій зубів. Однак біологічні ефекти поверхонь титану не обов'язково пропорційні ступеню шорсткості в остеобластичних культурах або *in vivo* [153]. З іншого боку, шорсткість також може призвести до прикріплення бактерій. Шорсткість наших поверхонь РЕО, як правило, була високою і зростала із збільшенням напруги/струму. Іншим аспектом біосумісності є хімічна стійкість до корозії. Її оцінювали за допомогою електрохімічного аналізу корозії. РЕО з розчином електроліту 2 показав кращу корозійну стійкість порівняно з обробленими РЕО зразками Ti, отриманими в електроліті 1. Це свідчило про те, що стійкість до корозії поверхневих шарів РЕО може бути підвищена шляхом вибору оптимальних параметрів для обробки РЕО. Найвищий рівень стійкості був отриманий за зразком Ti-2-400-150. Довгостроковий аналіз корозійної стійкості також оцінювали шляхом тривалої (12 тижнів) інкубації в розчині Рінгера. Виділення Ti зразками, обробленими РЕО, в аналізі розчину Рінгера можна пояснити тим, що в умовах процесу РЕО під час взаємодії матеріалу зразка з компонентами електроліту та утворення активних хімічних радикалів при високих температури та тиску Ti перетворюється на керамічний матеріал. Він досить інертний, проте здатний повільно реагувати на агресивне середовище живих тканин. Невідповідність між електрохімічним аналізом корозії та корозією у розчині Рінгера частково можна пояснити природою установок аналізу.

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

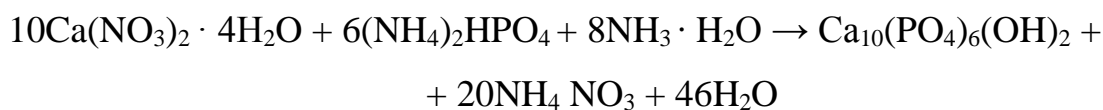
Біосумісність поверхонь PEO була додатково перевірена в аналізі культури клітин з остеобластами щурів. Всі поверхні, що генеруються PEO, не виявляли жодної цитотоксичності. Тоді проліферація клітин залежала головним чином від їх здатності прикріплюватися до субстрата. Загалом, поверхні PEO виявляли сприятливе прикріплення до остеобластів. Це свідчить про те, що обробку PEO можна використовувати для досягнення вищої схильності до osteointegration поверхонь зубних імплантатів Ti і, отже, вищої стійкості імплантатів в довгостроковій перспективі. Однак це також залежить від здатності поверхонь імплантатів протистояти прикріпленню бактеріальних клітин та утворенню біоплівки. Аналіз адгезії бактерій показав, що дійсно можливо знайти баланс між здатністю біоактивних поверхонь підтримувати ріст еукаріотичних клітин, одночасно пригнічуючи прикріплення і ріст бактерій. Однак взаємодія між умовами підтримки прикріплення та розмноження клітин, одночасно заважаючи бактеріям прикріплюватися та утворювати біоплівки, залежить від делікатного балансу і все ще вимагає подальших досліджень.

6 ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ КЛІТИН ТА ОСАДЖЕННЯ КОЛАГЕНУ НА ГІДРОКСИАПАТИТНИХ ПОКРИТТЯХ, СТВОРЕНИХ НА ПОПЕРЕДНЬО ОБРОБЛЕНИХ СУБСТРАТАХ

6.1 Матеріали і методи

6.1.1 Синтез гідроксиапатиту

Синтез стехіометричного гідроксиапатиту забезпечувався такою реакцією:



Окремо готували два різні розчини:

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

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

6.1.2 Нанесення гідроксиапатитних покриттів

В якості основи для термічної обробки використовували зразки Ti-6Al-4V (клас 4) розміром 4,2x3,48x7,98 мм. Зразки для термічно нанесених покриттів (ТНП) попередньо обробляли піскоструминною обробкою 1-2 рази з тиском у 4,5 та 6,5 бар, щоб отримати шорстку поверхню (табл. 6.1). Після піскоструминної обробки застосовували два типи травлення: у 20% розчині щавлевої кислоти, у 20% NaOH або послідовно в обох. Наприкінці, всі зразки обробляли 20% розчином

H_3PO_4 протягом 1 хв. Для контрольної групи, ті самі зразки без попередньої піскострумінної обробки ретельно промивали дистильованою водою з подальшим промиванням етиловим спиртом (табл. 6.1, зразок 9).

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

Таблиця 6.1. – Підготовка зразків

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

В якості катода використовувалася титанова камера, яка містить електроліт, а титанова основа, занурена в електроліт, використовувалася як анод. Ванна з електролітом під час процесу охолоджувалася водою для підтримки температури ванни близькою до кімнатної. Під час процесу розчин електроліту постійно

перемішували за допомогою магнітної мішалки для забезпечення однорідної концентрації електроліту і розсіювання тепла, що виділяється. Після обробки зразки очищали дистильованою водою і сушили на повітрі при кімнатній температурі.

6.1.3 Характеристика матеріалів

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

Структурні компоненти молекул ідентифікували методом інфрачервоною Фур'є спектроскопією з використанням приладу ThermoNicolet Nexus 470, придбаного у Thermo Fisher Scientific (Уолт, Массачусетс, США), оснащеного адаптером ATR. Вимірювання та аналіз спектрів проводилися за допомогою програмного забезпечення, що постачається до приладу. Спектри реєструвалися в спектральному діапазоні $550\text{-}4000\text{ см}^{-1}$ з номінальним дозволом 4 см^{-1} і 32 скануванням для кожного вимірювання. Перед аналізом всі зразки були висушені.

6.1.4 Вимірювання контактного кута

Статичний кут змочування дає цінну інформацію про властивості поверхні. Крайовий кут змочування часто використовується для характеристики змочування поверхні. Статичний контактний кут дає цінну інформацію про гідрофобні властивості поверхні. Експерименти з вимірювання крайового кута (КК) проводили з використанням оптичного приладу на основі відео зйомки для вимірювання крайового кута змочування (OCA 15 EC, Series GM-10-473 V-5.0, Data Physics, Filderstadt, Німеччина). Краплі надчистої води об'ємом близько 0,5 мкл капали на тверду поверхню зразків через шприц при кімнатній температурі. КК розраховувався за допомогою системи освітлення та програмного забезпечення [154]. Було виміряно не менше п'яти різних положень кожної поверхні, і було записано середнє значення. Оптичний аналіз крапель, що звисають з дозуючої голки або поміщених на тверду поверхню, полегшує визначення різних поверхневих і міжфазних показників. Крайовий кут змочування, який крапля рідини встановлює на твердій поверхні, характеризує змочуваність твердого тіла даною рідиною.

Таким чином, змочування титанових стрижнів була визначена кількісно, методом лежачої краплі. Були отримані кути між лінією до краплі на трифазному кордоні тверде тіло/рідина/газ і горизонтальною базовою лінією твердої поверхні. КК (θ) характеризує гідрофільність поверхні при використанні води в якості змочувального агента [155]. Кути контакту з водою нижче 90° позначають поверхню як гідрофільну і вказують на те, що змочування поверхні є сприятливим, і рідина буде поширюватися по великій площі поверхні, в той час як поверхні із кутом контакту з водою більше 90° вважаються гідрофобними і зазвичай означають, що змочування поверхні є несприятливим [156]. Дані КК були записані для води високого ступеню очистки як мінімум для трьох паралельних проб.

6.1.5 Вимірювання шорсткості поверхні

Шорсткість поверхні - це кількісне значення геометричного контуру поверхні. Це було визначено методом тактильного щупа, в якому двомірний

профіль вимірюється механічно шляхом сканування кінчика кантильовера по поверхні [157]. Характеристики шорсткості були отримані більш 10 мм з використанням вимірювача шорсткості поверхні (Surftest SJ-301, Mitutoyo, Kawasaki, Kanagawa, Japan). У відповідності зі стандартами EN ISO 4287: 1999 [158] і DIN 4768 [159] були досліджені наступні параметри шорсткості: середнє арифметичне суми значень профілю шорсткості (R_a), середня висота від піку до западини (R_z).

6.1.6 Експерименти на культурі клітин

Клітини (тип клітин U2OS) вирощували на матрасах з площею поверхні 75 см² за стандартних умов культивування на вологому повітрі, що містить 5% CO₂, при температурі 37 °C з оновленням середовища кожні 2-3 дні [160]. Використовували модифіковану Дульбекко суміш середовища/поживна суміш F-12 (DMEM / F-12) з L-глутаміном, що містить 100 одиниць на мл⁻¹ пеніциліну, 100 мкг/мл⁻¹ стрептоміцину, 2,5 мкг/мл⁻¹ амфотерицина В і 10% фетальну бичачу сироватку. Перед посівом клітин всі зразки стерилізували в автоклаві; кожен зразок поміщали в окрему лунку 24-луночного планшета для культивування клітин і занурювали в DMEM на ніч. На наступний день середовище видаляли, і клітини U2OS висували на кожен зразок і в лунки з необробленими зразками (в якості негативного контролю) при щільності 10⁴ клітин на лунку. Адгезію клітин через 24 години і проліферацію клітин у зразках оцінювали за допомогою колориметричного аналізу Alamar blue, який використовується для вимірювання життєздатності клітин. Alamar blue(Invitrogen) додавали в кількості, що дорівнює 10% від обсягу середовища, в кожному лунку. В якості негативного контролю розчин Alamar blue додавали в лунки, що містять тільки культуральне середовище без клітин. В якості позитивного контролю розчин Alamar blue додавали в лунки, що містять тільки клітини без зразків (контроль ТКФ). Планшети інкубували протягом восьми годин при 37 °C в темряві. Потім середу переносили в інший 96-луночний планшет, і вимірювали оптичну щільність за допомогою планшет-рідера Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Уолт, Массачусетс, США) при довжинах хвиль 570 і

595 нм. Кількість клітин визначали через різні часові інтервали: 1 і 7 днів. Всі експерименти повторювали тричі.

6.1.7 Аналіз продукції колагену

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

6.2 Результати

6.2.1 Характеристика матеріалів

На рисунку 6.1 показані ІЧ-Фур'є спектри гідроксиапатиту, використаного для термічного нанесення покриття.

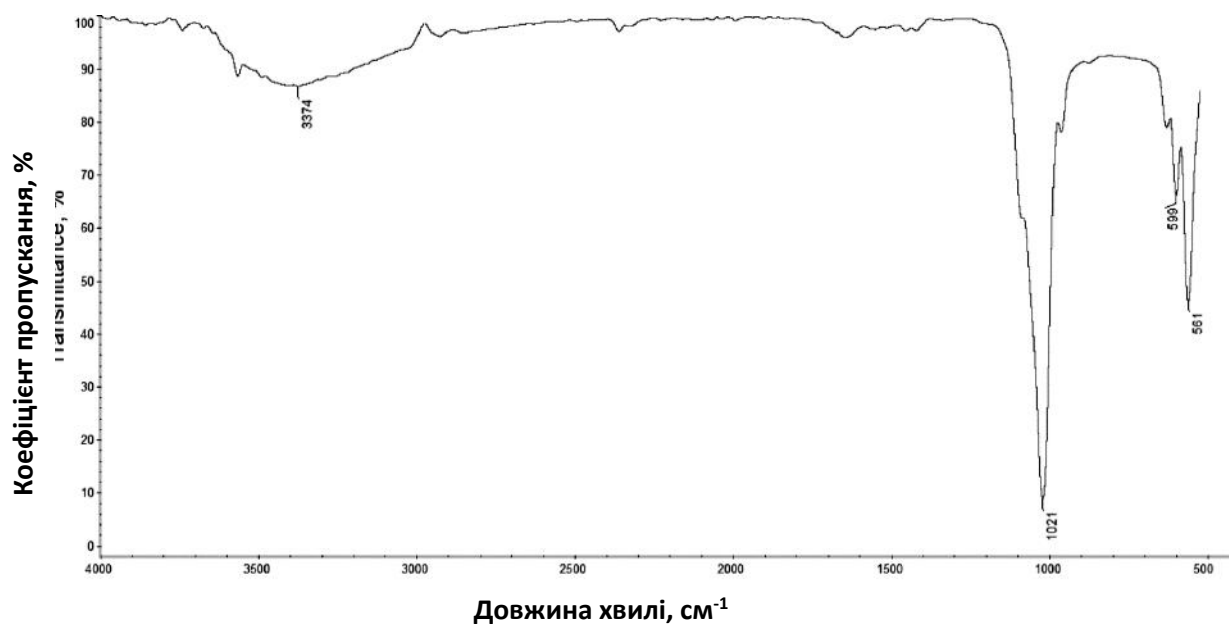


Рисунок 6.1 – ІЧ-Фур'є-спектр ГА, використаного для осадження

Піки поглинання, розташовані при 1092 та 1033 cm^{-1} , походять від асиметричного розтягнення (ν_3) PO_4^{3-} , а при 566 і 603 cm^{-1} були віднесені до вигинових коливань (ν_4) PO_4^{3-} відповідно. Симетричні валентні коливання (ν_1 і ν_2) PO_4^{3-} також спостерігалися при області близько 961 cm^{-1} , в той час як низький гострий пік при 3573 cm^{-1} відповідав валентним коливанням решітки ОН-іонів [160, 161]. Типові смуги ГА, які можна віднести до PO_4^{3-} асиметричного розтягнення розташованому на частоті коливань 1021 cm^{-1} валентному (ν_3), 599-561 cm^{-1} (ν_4), і валентному коливанню О-Н при 3374 cm^{-1} , були виявлені в отриманому зразку гідроксиапатиту.

Результати рентгеноструктурного аналізу (рис. 6.2) показують, що отриманий зразок відповідає гідроксиапатиту (JCPDS 9-0432). Для попередньої обробки використовували свіжоприготовлений гідроксиапатит у вигляді суспензії. Спикання при 900 °С використовували під час рентгеноструктурного дослідження порошку для перевірки наявності β -трикальцій фосфата (β -ТКФ). Відсутність фази β -ТКФ показує, що отриманий гідроксиапатит був стехіометричним. Параметри решітки отриманих зразків представлені в таблиці 6.2.

Таблиця 6.2 – Параметри решітки (а і с) і Xs для ГА в порівнянні зі спеченою при 900 °С і стандартної картою JCPDS

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

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

Попередня хімічна обробка Ті (ступінь 4) не впливає на фазовий склад шару гідроксиapatиту. При попередній кислотній обробці застосовувалися два типи травлення: в 20% щавлевої кислоти, в 20% NaOH або послідовно в обох випадках після піскоструминної обробки. Нарешті, всі зразки були оброблені 20% H₃PO₄ протягом 1 хв.

Морфологія отриманих термічним осадженням гідроксиapatитових покриттів представлена на рис. 6.3. У всіх випадках можна спостерігати однорідні покриття з шорсткою поверхнею. Попередня обробка поверхні дуже впливає на отримані покриття. Морфологія поверхні демонструє неправильну і шорстку структуру з безліччю дрібних отворів, які спостерігаються при великому збільшенні (×2000).

Крім того, спостерігаємо дрібні мікроямки і гострі краї. Характерні розміри представлені в таблиці 6.3.

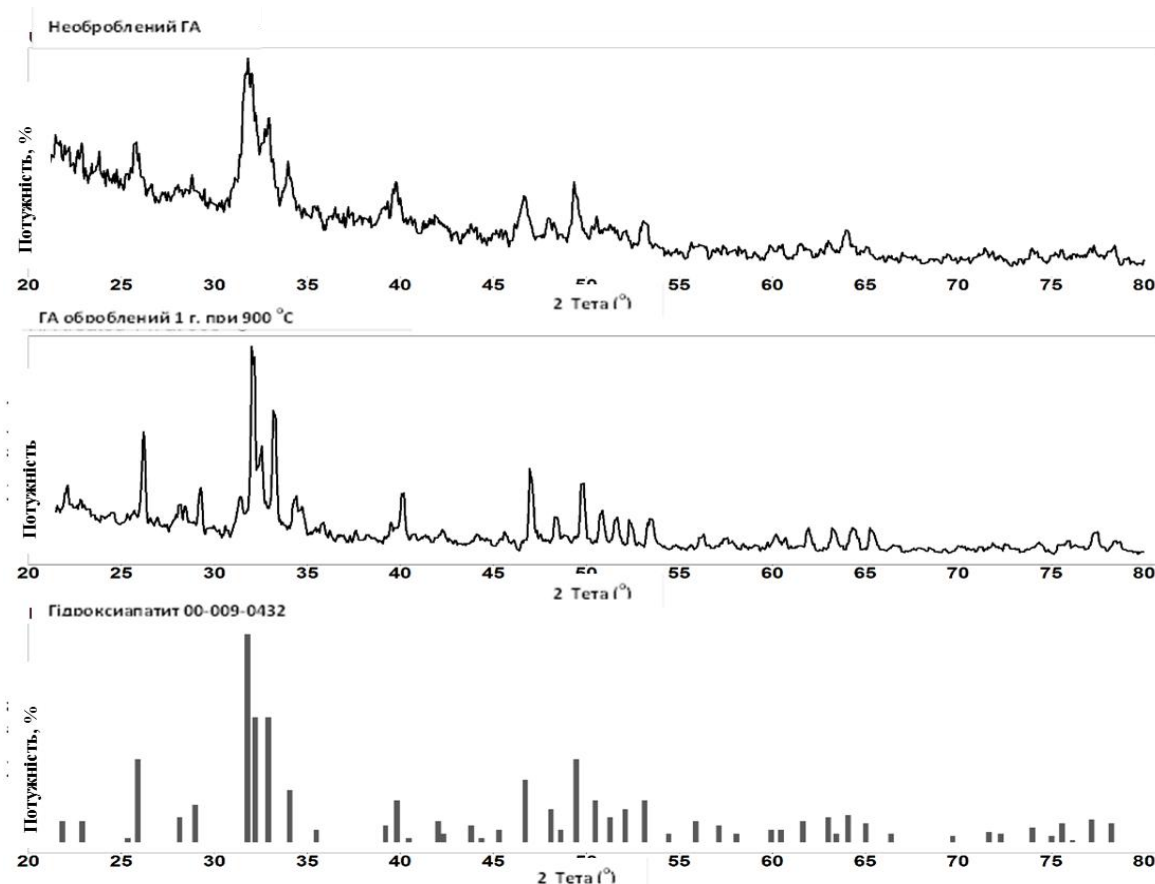


Рисунок 6.2 – РД отриманого і сплавленого при 900 °С порошку ГА

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

Таблиця 6.3 – Розміри частинок ГА і їх розподіл на поверхні

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

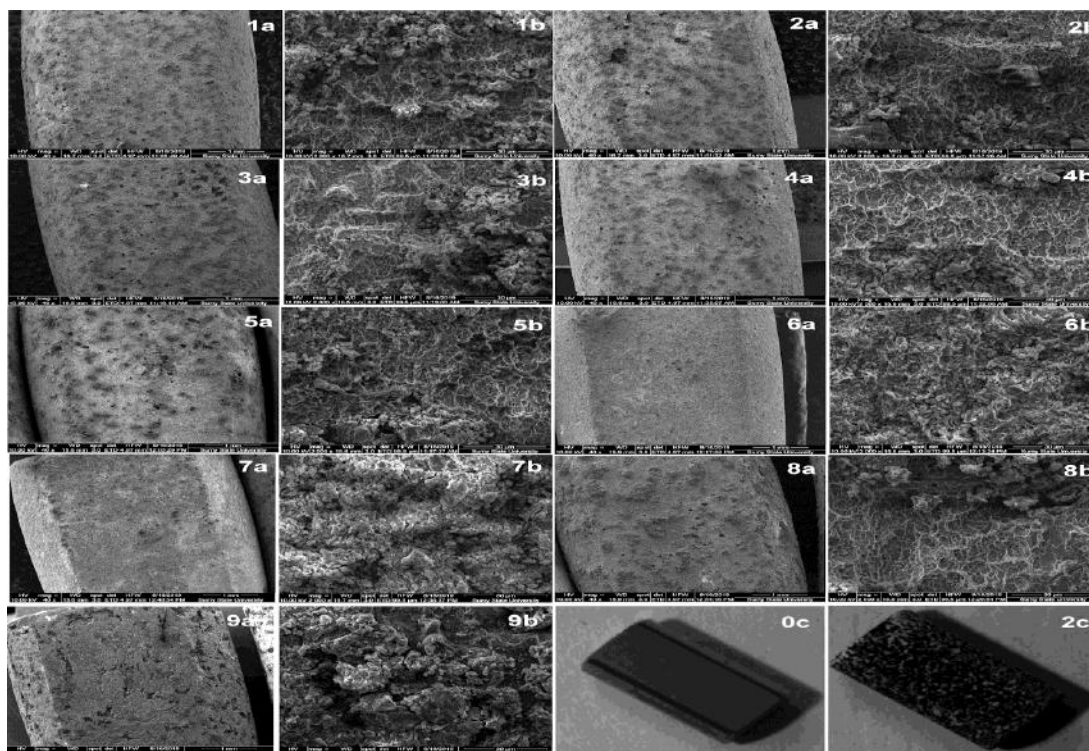


Рисунок 6.3 – Морфологія отриманих зразків 1-9 кальцій-фосфатних покриттів при а) $\times 40$ і б) $\times 2000$ в) загальний вигляд. Зразок 0с - без будь-якої обробки, а зразок 2с - загальний вигляд зразка. Оскільки загальний вигляд для всіх зразків з ГА є практично однаковим, була надана тільки одна фотографія.

Були обрані три різні варіанти попередньої обробки: 20% NaOH (зразки 1, 2), 20% щавлева кислота (зразки 3, 4, 6, 7, 8) і комбінація попередньої обробки 20% щавлевою кислотою 4 г, 20% NaOH 1 г (зразок 5) (рис. 6.4).

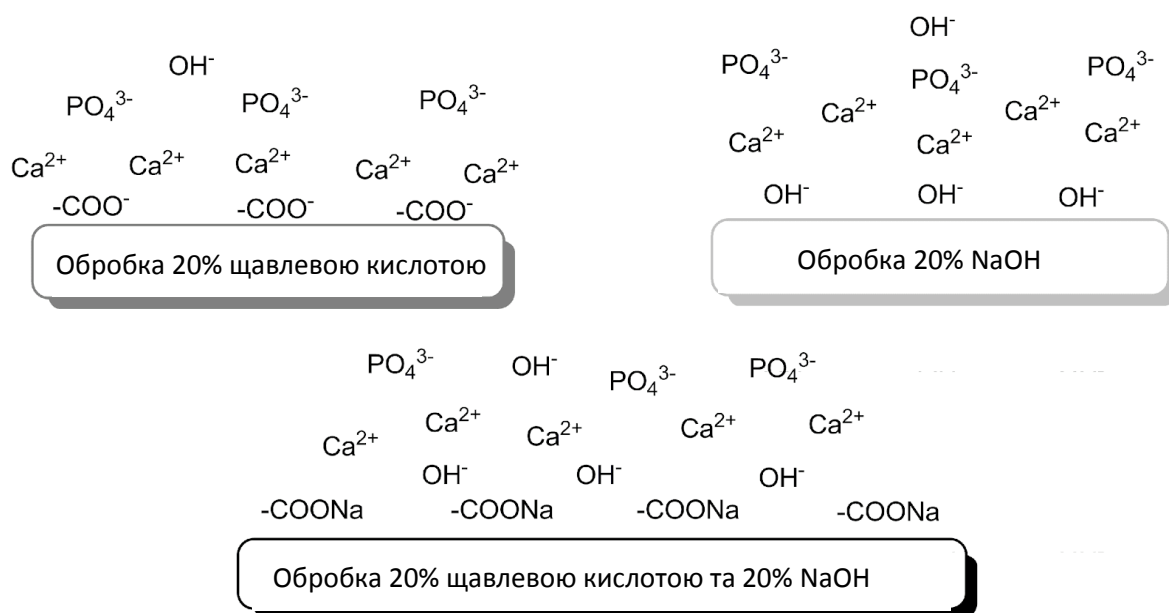


Рисунок 6.4 – Попередня обробка поверхні зразків після піскоструминної обробки кислотою, лугом або їх сумішшю

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

Всі гідроксіапатитові покриття, отримані термічним осадженням, мають однорідні поверхні. Найбільш однорідна поверхня була отримана для зразка 6.

6.2.2 Вимірювання змочування та шорсткості поверхні

Результати вимірювань шорсткості та змочування наведені у Таблиці 6.4 та на Рисунку 6.5.

Таблиця 6.4 – Характеристики шорсткості та змочування отриманих покриттів (1Ra: середнє арифметичне сум всіх значень профілю; 2Rz: середнє значення загальної вимірюної довжини)

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

Результати показали статистично значущу відмінність між значенням шорсткості серед отриманих покриттів ГА. Шорсткість поверхні (таблиця 6.4) відображає інформацію про профілі лінії, отримані за допомогою методу тактильного щупа, відповідно, для покриттів ГА. Слід зазначити, що нанесений шар ГА значно збільшує ($P < 0,0001$) шорсткість поверхні в разі зразків 8 та 9 до 5,37 і 6,51 мкм, в той час як є подібне значення у випадку зразків 2, 4, 5, 6, 7 ГА покриття. Подібність шорсткості поверхні наступних покриттів (Ra) 2,4-2,7 мкм статистично не відрізняється (таблиця 6.4). Відповідні вимірювання шорсткості наведені на рис. 3.6. Було також відзначено, що нанесення покриттів з гідроксиапатиту призвело до збільшення середніх значень Ra для ГА покриттів 1 і 3 з 3,86 до 4,13 мкм ($P < 0,001$). Зразки 3 і 8 з ГА покриттям були отримані методом термічного осадження на поверхню, піддану піскоструминному очищенню,

шляхом попередньої обробки 20% щавлевої кислотою. Значення Ra зразків 2 і 4-7 мають аналогічні значення профілю поверхні, які є відносно нижчими, ніж у зразків 1 і 3 (рис. 6.5). Зразки 2 і 4-7 порівнювали із зразком 8, який показав підвищену шорсткість поверхні (рис. 6.5). Однак серед усіх зразків необроблена поверхня показала більш високі значення Ra і Rz. Це можна пояснити неоднорідним розподілом ГА на плоскій поверхні, в той час як на піскоструминних зразках наночастинки ГА вбудовуються в пори, тому отримана поверхня стає шорсткою.

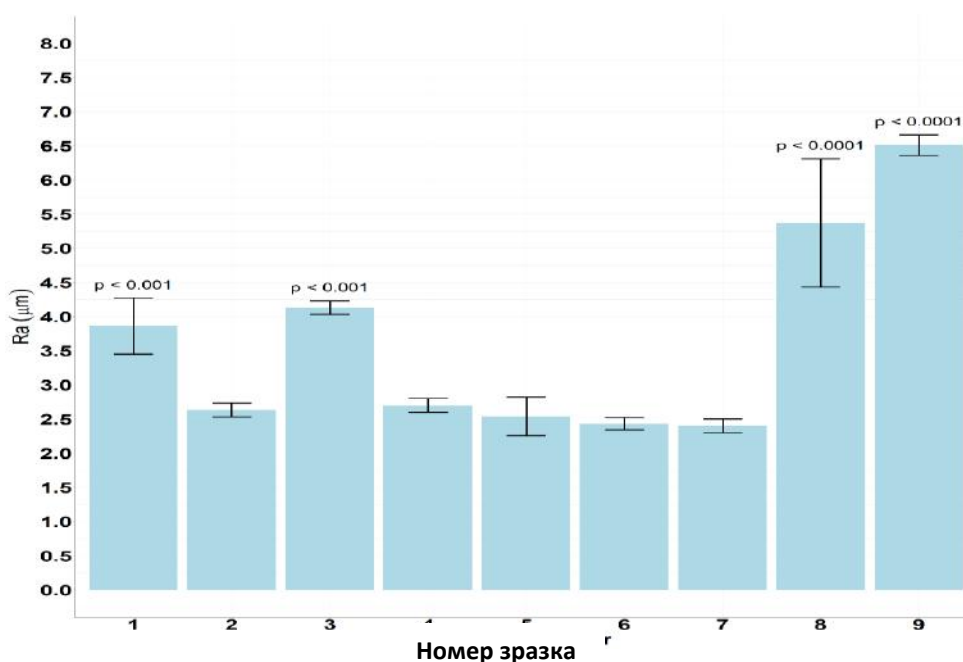


Рисунок 6.5 – Шорсткість поверхні (Ra) покриттів ГА, отриманих методом термічного напилення

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

6.2.3 Експерименти на культурі клітин

Аналіз відновлення резазурином показав задовільну адгезію клітин остеобластів U2OS через 1 день експерименту (рис. 6.6). Немає суттєвої різниці між

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

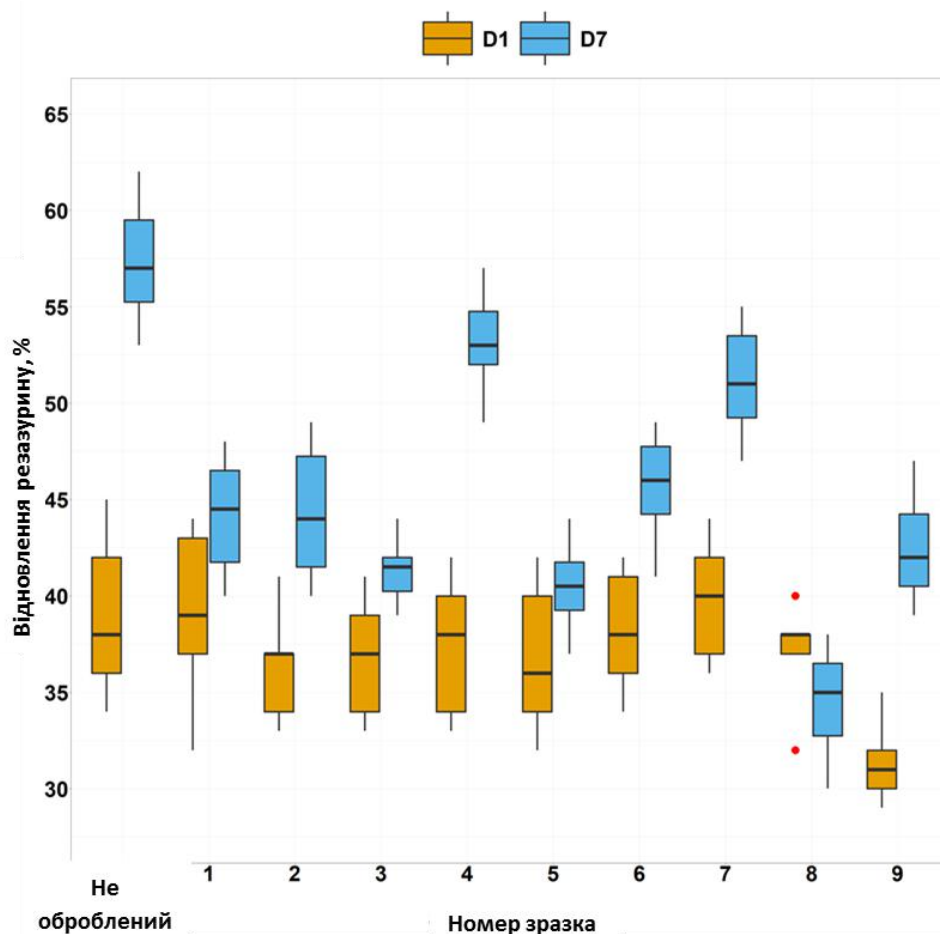


Рисунок 6.6 – Аналіз відновлення резазурину клітинами U2OS через 1 і 7 днів після посіву. Статистична значимість оцінювалася в порівнянні з необробленим (полірованим) зразком Ti (значення p оцінюється після виконання двостороннього тесту дисперсії для двох зразків).

Щоб перевірити гіпотезу про відмінності між D1 і D7, був використаний ANOVA (рис. 6.7). Нормальність була перевірена за допомогою тесту Шапіро-Уїлкі, де результати кожної групи відповідають нормальному розподілу (значення p (D1) = 0,4047798 і (D2) = 0,4719734).

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

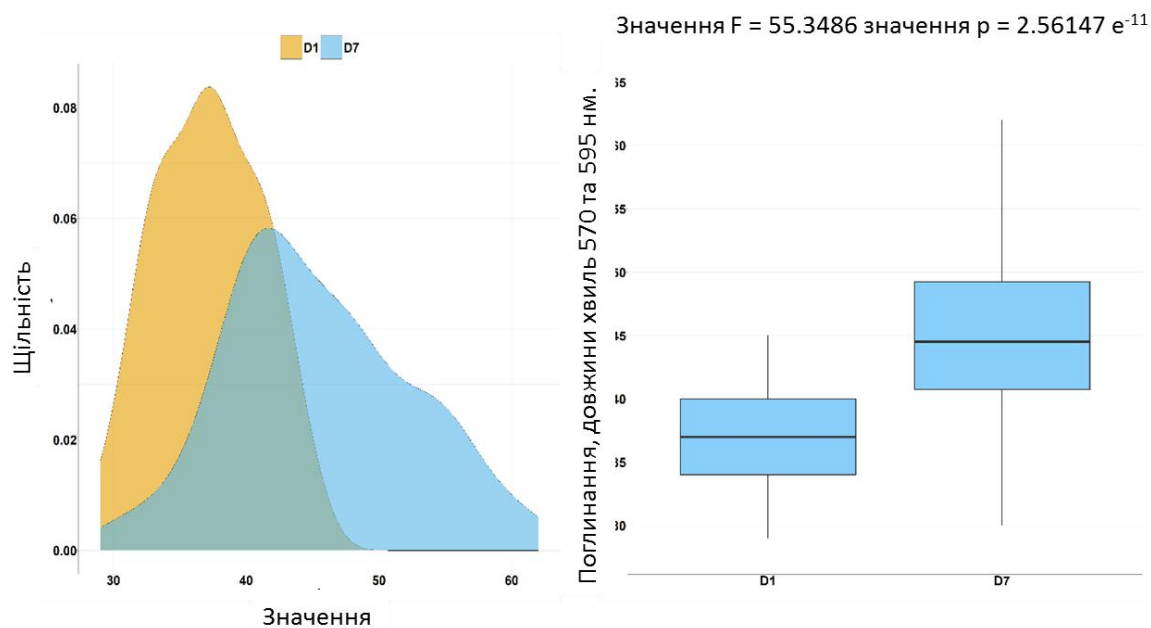


Рисунок 6.7 – Результати аналізу ANOVA: а) розподіл в групах D1 і D7; б) результати дисперсійного аналізу для D1 і D7.

6.2.4 Аналіз продукції колагену

Аналіз продукції колагену може значно оцінити активність клітин в період проліферації, і ми можемо підтвердити низьку продукцію колагену як на

необроблених (полірованих), так і на полірованих ГА поверхнях в порівнянні з ГА поверхнями, підданими піскоструминному очищенню (рис. 6.8).

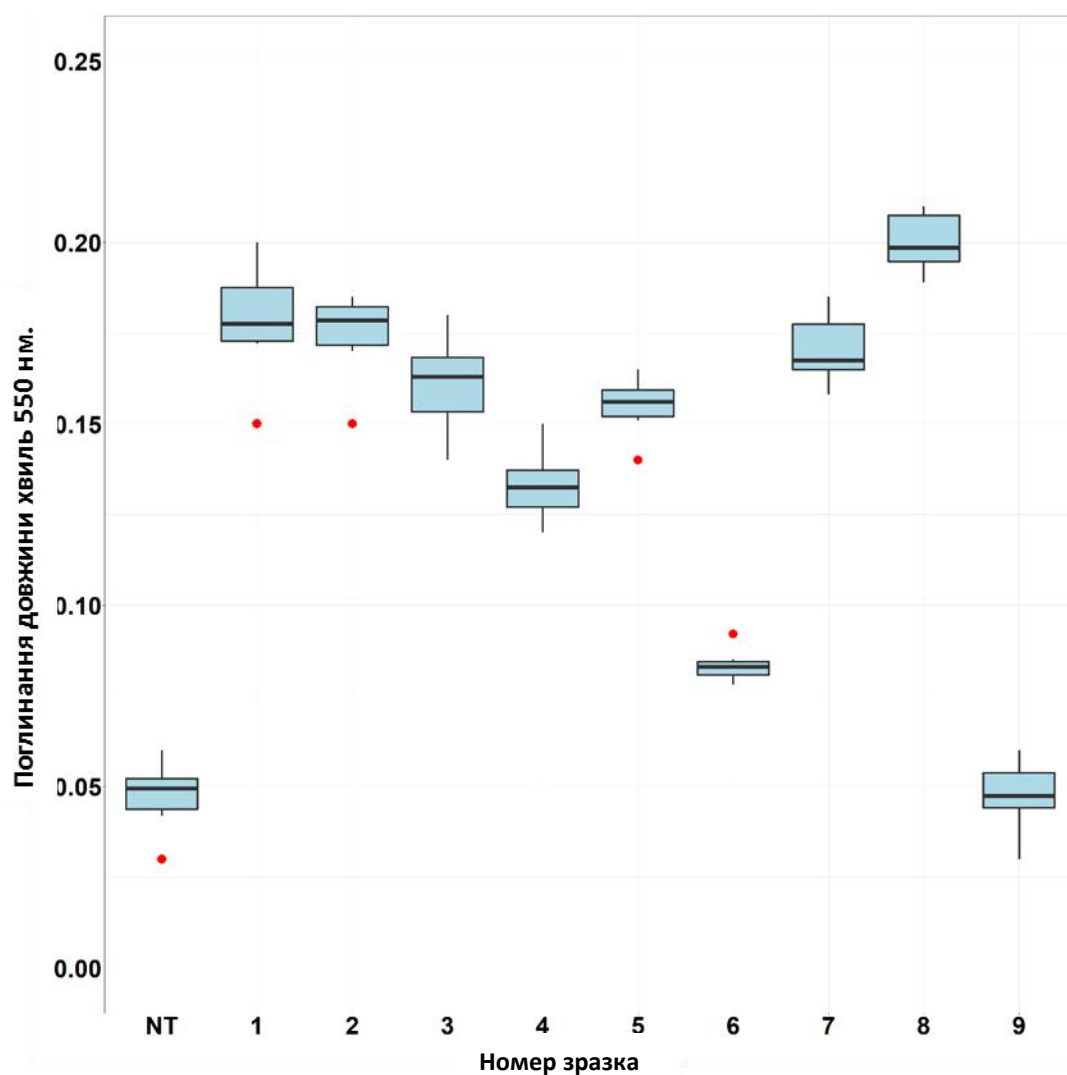


Рисунок 6.8 – Рівень поглинання Sirius Red через 14 днів після посіву клітин U2OS

6.3 Обговорення

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

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

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

Зразок 6 показав значно меншу продукцію колагену протягом двох тижнів культивування в порівнянні з іншою обробленою ГА поверхнею. Однак рівень поглинання Sirius Red все ще вище в порівнянні з контролем (NT і №9). Добре відомо, що вироблення колагену є критичним фактором для успішної інтеграції імплантату [161], і топографія поверхні і хімічний склад повинні впливати на адгезію і активність клітин остеобластів [162]. Підвищення середньої шорсткості було показано (як *in vitro*, так і *in vivo*), що поверхні з більш високим Ra мають більш високу швидкість остеоінтеграції [163, 164]. Крім того, хімічна модифікація, включаючи фосфат кальцію (CaP) або ГА, має високу остеокондуктивних і продемонструвала остеоінтеграційний потенціал *in vivo* [165, 166]. Нарешті, обидві стратегії (наприклад, шорсткість поверхні і біологічно активні покриття) можуть бути об'єднані для досягнення взаємопідсилюючого ефекту. Але кращі стратегії комбінації і роль кожного фактора в остеоінтеграції все ще обговорюються. Наші дані показують, що шорсткість відіграє важливу роль в адгезії і проліферації клітин, але ГА покриття забезпечує додаткові стимули для клітинної активності (синтезу колагену).

7 Ti6Al4V СКАФФОЛДИ З ПОВЕРХНЕЮ, АКТИВОВАНОЮ ЛУГОМ ДЛЯ ТКАНИННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

8.1 Матеріали і методи

8.1.1 Потрійна періодична мінімальна поверхня та отримання скаффолдів.

Зразки виготовлені з медичного сертифікованого DIN EN ISO 22674 порошку Rematitan® CL (Іспринген, Німеччина). Хімічний склад порошок був Ti-90%, Al-6%, V-4%, а інші елементи: N, C, H, Fe та O <1% (мас.%). Зразки з архітектурою ТПМП були зроблені машиною Concept Laser Mlab Cusing R для селективного лазерного плавлення (СЛП) (Ліхтенфельс, Німеччина). Мінімальний розмір пори був 675 мкм.

8.1.2 Обробка поверхні

Зразки Ti6Al4V обробляли ультразвуком в етанолі та дистильованій воді по 10 хв та сушили при 45°C на повітрі. Згодом зразки були хімічно оброблені 5M NaOH при 90°C протягом 6 годин. Після цього, зразки були промиті дистильованою водою тричі для отримання нейтрального рН.

8.1.3 Тест із зануренням у модельовану рідину організму

Здатність відкладення апатиту на пористих скаффолдах до і після лікування досліджували тривалим зануренням у модельовану рідину організму (МРО) із рН 7,40. Кожен зразок був занурений у 50 мл МРО на 7 та 14 днів при 37 °C. Після кожного періоду часу зразки промивали дистильованою водою та сушили на повітрі при 45 °C.

8.1.4 Характеризація поверхні

Мікроструктура скаффолда та морфологія поверхні Ti6Al4V до та після лужної обробки були досліджені методом скануючої електронної мікроскопії (FEI Inspect S50B (SEM, FEI, Брно, Чехія) при розгоні напруги = 25 кВ. Характеристика

змін у морфології поверхні після випробування зануренням у МРО аналізували за допомогою СЕМ. Хімічний склад отриманої поверхні ідентифікували за допомогою СЕМ з енергодисперсійним рентгенівським спектрометром (СЕМ-ЕДР).

8.1.5 Оцінка стану клітин

Скаффолди без обробки та після тесту із занурення у МРО були стерилізовані автоклавуванням, і кожен скаффолд було розміщено в окрему лунку 24-лункової планшетки для культивування клітин. Мезенхімальні стовбурові клітини пуповини людини (UCMSC) були посіяні при щільності 20000 клітин/см². в обсязі 1,5 мл живильного середовища на кожен зразок і в лунки без зразків, як контроль. Лунки, що містять лише середовище служили як негативний контроль. Адгезія клітин та клітинна проліферація у зразках на 1, 3 та 5 добу культивування оцінювали за допомогою аналізу відновлення резазурину, використовуючи колориметричний режим виявлення для оцінки життєздатності клітин.

Флуоресцентний мікроскопічний аналіз проводився для оцінки адгезії клітин на поверхні скаффолду. Зразки були промиті 1x PBS протягом 1 хвилини без струшування. З того часу зразки інкубували з 1: 35.000 4', 6-діамідин-2'-феніліндол дигідрохлорид (DAPI, Roche) в PBS протягом 2 хвилин у темряві, потім промивали 1x PBS протягом 1 хвилини без струшування. Флуоресцентний мікроскоп (мікроскоп Axio Imager A1, Carl Zeiss) використовували для аналізу скаффолдів, поміщених на предметне скло, у каналі DAPI.

8.2 Результати

СЕМ-зображення необроблених скаффолдів Ti6Al4V з елементарною топологією представлено на рис. 7.1. Зовнішній вигляд 3D зразків різноманітні у вертикальному та бічному видах. Аналіз СЕМ показує пов'язану між собою спорову структуру, яка має значення для розростання кісткової тканини. Сфероїдальні візерунки різного розміру покривали поверхню. Ці властивості посилюють зв'язування з кістковою тканиною. Титанові імпланти показали, що гідрофільні

властивості позитивно впливають на поєднання з кісткою, гарантуючи подальше дослідження підтримки та відновлення гідрофільних характеристик.

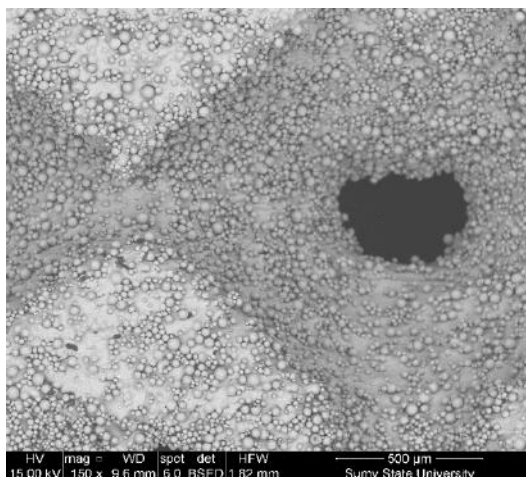


Рисунок 7.1 – СЕМ-мікрофотографії поверхні Ti_6Al_4V

Лужна обробка викликала утворення однорідного поверхневого шару на пористих титанових скаффолдах (Рис. 7.2).

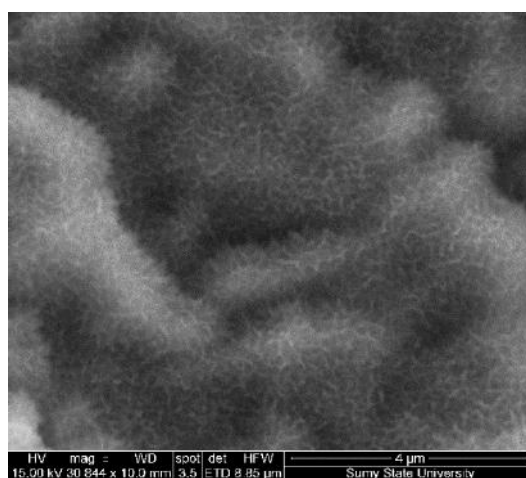


Рисунок 7.2 – СЕМ-мікрофотографії поверхні Ti_6Al_4V після лужної обробки

Аналіз ЕДР показав, що обробка лугом змінила хімічний склад поверхні імплантату (Таблиця 7.1). Лужна обробка призвела до утворення титанату, речовини із зміненим хімічним складом та морфологією поверхні. Отже, лужна обробка титанових поверхонь призводить до хімічної модифікації поверхні, а також модифікації морфології поверхні.

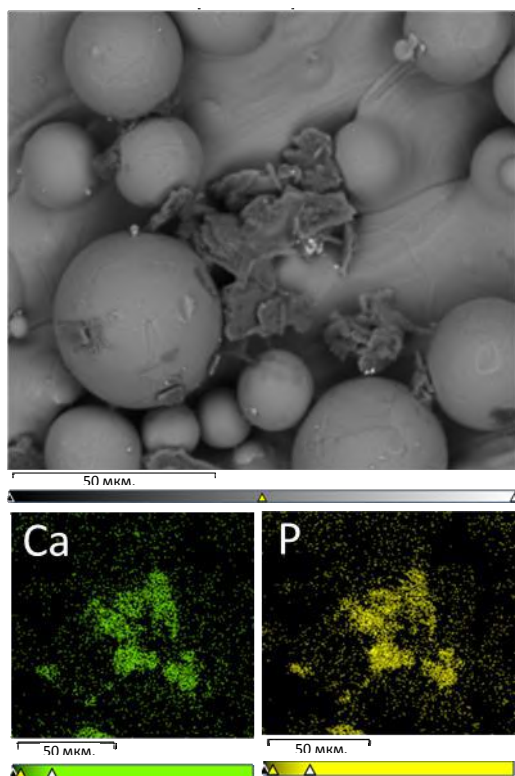


Рисунок 7.3 – СЕМ-мікрофотографії та ЕДР-картування поверхні Ti_6Al_4V після 14-денного випробування зануренням МРО

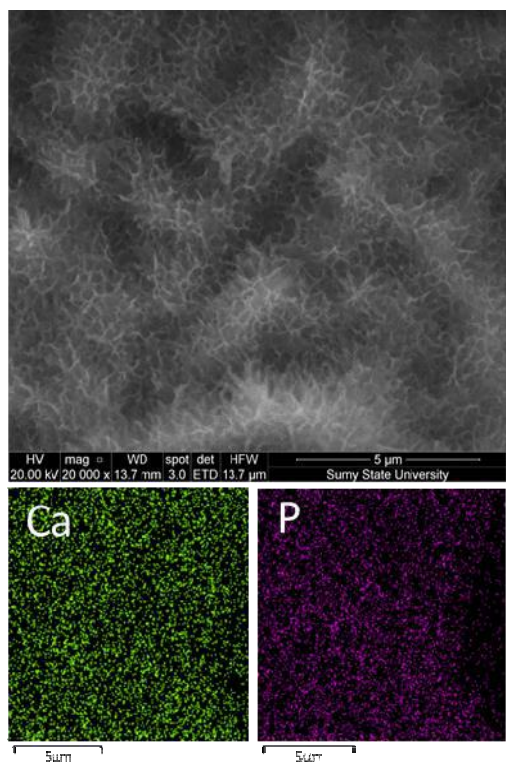


Рисунок 7.4 – СЕМ-мікрофотографії та ЕДР-картування поверхні титанату Ti_6Al_4V через 14 днів випробування зануренням МРО

Елементний ЕДР-аналіз шарів, оброблених лугом, поверхонь титанату показані в таблиці 8.1. Осадження Na на поверхні покриття можна резюмувати як депротонування кінцевих Ti–OH та оксомостикових Ti–OH–Ti з утворенням іонних пар Na–O–Ti. Ключова перевага цієї обробки пов'язана з рівномірним покриттям, що покриває нерівну поверхню пористих імплантатів.

Таблиця 7.1 – Результати ЕДР-аналізу скаффолдів

Елементи, %	Лужна обробка	Тест із зануренням у МРО		
		Ti ₆ Al ₄ V поверхня	Осад	Титанатове покриття
Ti	31.13	54.35	6.06	39.45
Al	0.56	5.49	0.62	5.21
V	2.04	2.08	0.26	0.32
O	56.10	33.08	32.32	54.51
Ca	2.71	-	11.83	1.13
P	-	-	6.86	0.27
Na	0.15	-	1.17	0.20

Тест із зануренням у МРО передбачає утворення відкладень Ca–P. Пориста структура забезпечує міжфазну адгезію між імплантатами та навколишніми тканинами, що дозволяє покращити зчеплення та більш короткий час загоєння.

Тест із занурюванням у МРО виявив утворення відкладень Ca–P, розташованих біля сфероїдів через 14 днів інкубації (Рис. 7.3). Вражаюче, що відкладення Ca–P на лужно-оброблених поверхнях не виявлено (Рис. 8.4). Однак розмір кристалів структур титанату виріс під час інкубації у МРО. ЕДР результати показали включення елементів у титанатовий шар. Ми обумовили, що, оскільки групи Ti–OH негативно заряджені, вони можуть поглинати позитивно заряджені іони Ca²⁺. А позитивно заряджена поверхня, отримана при тривалому зануренні у МРО призводить до поєднання з негативно зарядженими фосфат-іони [247].

Скаффолди мають індивідуальну зовнішню форму та взаємопов'язану пористу структуру. Отже, вони могли створити мікросередовище, яке сприяє

прикріпленню клітин та їх поділу. До того ж, аналіз відновлення резазурину, виявив підвищену проліферацію клітин (Рис. 7.5).

Швидкість проліферації клітин UCMSC була нижчою порівняно з контрольними лунками через велику кількість сфероїдальних утворень. Забарвлення DAPI виявило ріст клітин між утвореннями (Рис. 7.3, нижня панель).

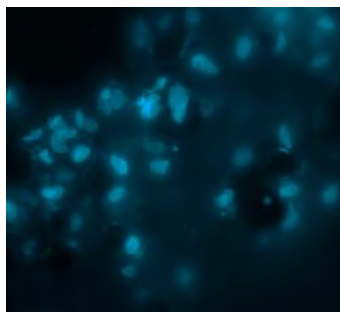
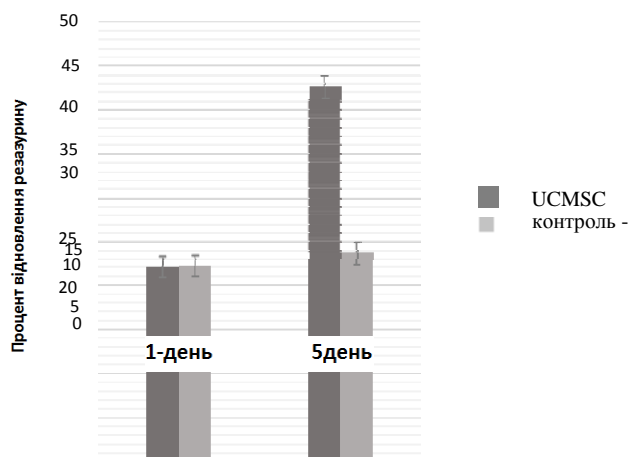


Рисунок 7.5 – Аналіз відновлення резазурину, що демонструє проліферацію UCMSC на 1-й та 5-й дні (верхня панель) та флуоресцентне фарбування DAPI (нижня панель) на обробленій лугом поверхні скаффолду після 14-денного занурення у МРО

ВИСНОВКИ

1. Отримані результати демонструють потенціал використання гранулярних порошків, на основі діоксиду цирконія, як абразивів для створення шорсткої поверхні з низьким контактним кутом. Піскоструминна обробка абразивом не призводить до значної зміни у хімічному складі поверхневого шару сплаву і не потребує подальшого травлення, щоб прибрати частинки абразиву, як у випадку класичного абразиву на основі оксиду алюмінію, що має позитивний ефект на корозивних характеристиках імплантату (біосумісність). Було з'ясовано, що краще використовувати порошок круглої форми гранул ZrO_2 тетрагональної форми, з невеликими гострими виступами по всій поверхні, розміром 250 мкм, при робочому тиску не більше, ніж 4 атм. і часу експозиції 5 с.

2. Результати використання фемтосекундного лазера демонструють високий відсоток клітинного приросту на лазер-наноструктурованих поверхнях у порівнянні з немодифікованими поверхнями. XPS аналіз поверхні продемонстрував, що металеві поверхні є високо-окисленими (металеві оксиди та гідроксиди). Після використання лазера металева фаза стає менш видимою, що можливо відбувається через ріст оксидно/гідроксидного шару та утворення покриття з окисдованих карбоксильних груп. Відсутність залежності клітинної проліферації від типу металу та її залежність від топографії та ступеня оксидації поверхні є підставою припускати, що саме топографія поверхні, а також її хімічний склад мають найзначніший вплив на біологічні процеси у системі імплант-тканина. Цей факт дозволяє використовувати HR-LIPSS метод для модифікації та покращення поверхні дентальних та хірургічних імплантів.

3. Формування лінійних періодичних поверхневих структур на Ti-сплавах підвищує адгезію остеобластів та їх проліферацію. Ступінь проліферації значно підвищується на усіх типах (полірованих та піскоструминно-оброблених) LIPSS поверхонь, що може стимулювати osteointegration медичних імплантів. LIPSS-1 режим перешкоджає бактеріальній адгезії у перші 6 годин після ко-культивування та не впливає на адгезію остеобластів, що може бути використано для розвитку

високоєфективних поверхонь імплантів з остеогенними та антибактеріальними властивостями.

4. Під час РЕО утворюються оксиди Ті та інші реакційноздатні форми сполук Ті. Можна генерувати біоактивні шари з використанням сполук Са і Р на поверхнях імплантів Ті зі збільшеною здатністю до osteointegraції. Розчин електролітного розчину №2 сприяв активній кристалізації апатитів після обробки РЕО імплантів Ті. Однак швидкість кристалізації слід ретельно контролювати, оскільки занадто товсті шари апатиту мають обмежену механічну стійкість. Шари РЕО можуть підвищити електрохімічну стійкість до корозії.

5. РЕО може бути використаний для створення біоактивних поверхонь із покращеними властивостями щодо адгезії еукаріотичних клітин, одночасно пригнічуючи прикріплення та ріст бактерій.

6. Всі зразки після піскоструминної обробки мали шорстку поверхню, але покриття з ГА на зразках без попередньої обробки показали більш високі значення Ra і Rz. Шорсткість відіграє важливу роль в адгезії і проліферації клітин, але ГА покриття забезпечує додаткові стимули для клітинної активності, що виражається в синтезі колагену. Ми можемо підтвердити низьке вироблення колагену як на необроблених (полірованих), так і на полірованих поверхнях з ГА, в порівнянні з поверхнями з ГА після піскоструминної обробки. Аналіз відновлення резазурину показав задовільну адгезію остеобластних клітин U2OS через 1 день експерименту. Немає суттєвої різниці між необробленими полірованими поверхнями і ГА покриттями з попередньою обробкою піскоструминним очищенням.

7. В більшості випадків можна зробити висновок, що поверхні, піддані піскоструминній обробці, попередньо оброблені хімічною обробкою, з нанесеними ГА покриттями, роблять їх більш osteokonduktivними за рахунок збільшення синтезу колагену. Всі виміряні кути змочування були нижче 90 °, що вказує на утворення гідрофільних ГА поверхонь, коли рідина буде поширюватися по великій площі поверхні, що забезпечує їх придатність для біомедичного застосування в стоматології.

8. Механічні параметри 3D скаффолдів з трьома типами потрійних періодичних мінімальних поверхонь і різними мінімальними діаметрами пор і пористістю, які були адитивно виготовлені та функціоналізовані за допомогою плазмового електролітичного окислення та за допомогою наночастинок срібла, відповідали біомеханічним властивостям натуральної кістки, що могло б усунути ризик передчасного руйнування імплантату, викликаного ефектом захисту від напруги.

9. Біоактивне керамічне покриття не впливало істотно на проліферацію клітин, але стимулювало вироблення колагену, важливого параметра для формування нової кістки. Наночастинки срібла, включені в керамічне оксидне покриття, продемонстрували високу антибактеріальну активність проти грамозитивних бактерій і не мали значного впливу на ріст клітин остеобластів і вироблення колагену.

10. Біоактивне покриття, так і тип структури скаффолдів є основними факторами для посилення проліферації клітин. Ці експериментальні результати можуть мати великий вплив на можливості застосування скаффолдів в ортопедії як біоактивних імплантатів.

11. Лужна обробка скаффолдів 3D Ti6Al4V з елементарною топологією ТПМП, які були виготовлені використовуючи СЛП, викликала модифікацію поверхні з утворенням наноіглоподібних структур. Відкладення Са-Р на необроблених зразках після тривалої інкубації в МРО вказує на потенційну біосумісність поверхонь. Прикріплення та проліферація клітин підтверджують біологічну активність поверхні.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Albrektsson, T.; Branemark, P.I.; Hansson, H.A.; Lindstrom, J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop. Scand.* 1981, 52, 155–70
2. Estrin, Y.; Vinogradov, A. Extreme grain refinement by severe plastic deformation: A wealth of challenging science. *Acta Materialia* 2013, 61, 782–817
3. Valiev, R.Z.; Sabirov, I.; Zhilyaev, A.P.; Langdon, T.G. Bulk Nanostructured Metals for Innovative Applications. *JOM* 2012, 64, 1134–1142
4. Valiev, R.Z.; Alexandrov, I.V.; Zhu, Y.T.; Lowe, T.C. Paradox of strength and ductility in metals processed by severe plastic deformation. *J. Mater. Res.* 2002, 17, 5–8
5. Bindu, S.; Sanosh, K.P.; Balakrishnan, A.; Kim, T.N. An in vivo evaluation of ultra-fine grained titanium implants. *J. Mater. Sci. Technol.* 2009, 25, 556–560
6. Estrin, Y.; Ivanova, E.P.; Michalska, A.; Truong, V.K.; Lapovok, R.; Boyd, R. Accelerated stem cell attachment to ultrafine grained titanium. *Acta Biomaterialia*. 2011, 7, 900–906
7. Estrin, Y.; Kasper, C.; Diederichs, S.; Lapovok, R. Accelerated growth of preosteoblastic cells on ultrafine grained titanium. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2009, 90, 1239–1242
8. Valiev, R.Z.; Semenova, I.P.; Latysh, V.V.; Rack, H.; Lowe, T.C.; Petruzelka, J.; Dluhos, L.; Hrusak, D.; Sochova, J. Nanostructured titanium for biomedical applications. *Adv. Eng. Mater.* 2008, 10, B15–B17
9. Cochran, D.L.; Schenk, R.K.; Lussi, A.; Higginbottom, F.L.; Buser, D. Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: A histometric study in the canine mandible. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998, 40, 1–11
10. Wennerberg, A.; Hallgren, C.; Johansson, C.; Danelli, S. A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clin. Oral Implant. Res.* 1998, 9, 11–19

11. Buser, D.; Schenk, R.K.; Steinemann, S.; Fiorellini, J.P.; Fox, C.H.; Stich, H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J. Biomed. Mater. Res.* 1991, 25, 889–902
12. Gotfredson, K.; Wennerberg, A.; Johansson, C.; Skovgaard, L.T.; Hjørting-Hansen, E.; Hjørting-Hansen, E. Anchorage of TiO₂-blasted, HA-coated, and machined implants: An experimental study with rabbits. *J. Biomed. Mater. Res.* 1995, 29, 1223–1231
13. Wennerberg, A.; Albrektsson, T.; Albrektsson, B.; Krol, J.J. Histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. *Clin. Oral. Implants Res.* 1996, 6, 24–30
14. Testori, T.; Wiseman, L.; Woolfe, S.; Porter, S.S. A prospective multicenter clinical study of the Osseotite implant: four-year interim report. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* 2001, 16, 193–200
15. Conner, K.A.; Sabatini, R.; Mealey, B.L.; Takacs, V.J.; Mills, M.P.; Cochran, D.L. Guided Bone Regeneration Around Titanium Plasma-Sprayed, Acid-Etched, and Hydroxyapatite-Coated Implants in the Canine Model. *J. Periodontol.* 2003, 74, 658–668
16. Coulthard, P.; Thomsen, P.; Worthington, H.V. Interventions for replacing missing teeth: Different types of dental implants. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2005, 25, CD003815
17. Aparicio, C.; Gil, F.J.; Fonseca, C.; Barbosa, M.; Planell, J.A. Corrosion behavior of commercially pure titanium shot blasted with different materials and size of shot particles for dental implant applications. *Biomaterials.* 2003, 24, 263–73
18. Ivanoff, C.-J.; Widmark, G.; Hallgren, C.; Sennerby, L.; Wennerberg, A. Histologic evaluation of the bone integration of TiO₂ blasted and turned titanium microimplants in humans. *Clin. Oral Implant. Res.* 2001, 12, 128–134
19. Rasmusson, L.; Kahnberg, K.-E.; Tan, A. Effects of Implant design and surface on bone regeneration and implant stability: An experimental study in the dog mandible. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* 2001, 3, 2–8
20. Gotfredsen, K.; Karlsson, U. A prospective 5-year study of fixed partial prostheses supported by implants with machined and TiO₂-blasted surface. *J. Prosthodont.* 2001, 10, 2–7

21. Rasmusson, L.; Roos, J.; Bystedt, H. A 10-year follow-up study of titanium dioxide-blasted implants. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* 2005, 7, 36–42
22. Abron, A.; Hopfensperger, M.; Thompson, J.; Cooper, L.F. Evaluation of a predictive model for implant surface topography effects on early osseointegration in the rat tibia model. *J. Prosthet. Dent.* 2001, 85, 40–46
23. Shahi, S.; Özcan, M.; Maleki Dizaj, S.; Sharifi, S.; Al-Haj Husain, N.; Eftekhari, A.; Ahmadian, E. A review on potential toxicity of dental material and screening their biocompatibility. *Toxicol. Mech. Methods.* 2019, 15, 1–10
24. L. Leitner et al., Trends and Economic Impact of Hip and Knee Arthroplasty in Central Europe: Findings from the Austrian National Database, *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, p. 4707, Mar. 2018
25. S. Kurtz, F. Mowat, K. Ong, N. Chan, E. Lau, and M. Halpern, Prevalence of Primary and Revision Total Hip and Knee Arthroplasty in the United States From 1990 Through 2002, *JBJS*, vol. 87, no. 7, p. 1487, Jul. 2005
26. A. P. V. Colombo and A. C. R. Tanner, The Role of Bacterial Biofilms in Dental Caries and Periodontal and Peri-implant Diseases: A Historical Perspective,” *J Dent Res*, vol. 98, no. 4, pp. 373–385, Apr. 2019
27. J. A. Lichter and M. F. Rubner, Polyelectrolyte Multilayers with Intrinsic Antimicrobial Functionality: The Importance of Mobile Polycations, *Langmuir*, vol. 25, no. 13, pp. 7686–7694, Jul. 2009
28. A. Kulkarni Aranya, S. Pushalkar, M. Zhao, R. Z. LeGeros, Y. Zhang, and D. Saxena, Antibacterial and bioactive coatings on titanium implant surfaces,” *J Biomed Mater Res A*, vol. 105, no. 8, pp. 2218–2227, Aug. 2017
29. M. Sadeghi, M. Kharaziha, H. R. Salimijazi, and E. Tabesh, Role of micro-dimple array geometry on the biological and tribological performance of Ti6Al4V for biomedical applications, *Surface and Coatings Technology*, vol. 362, pp. 282–292, Mar. 2019
30. R. Zhou, X. Lu, S. Lin, and T. Huang, Laser texturing of niti alloy with enhanced bioactivity for stem cell growth and alignment, *Journal of Laser Micro Nanoengineering*, vol. 12, no. 1, pp. 22–27, 2017

31. I. Gnilitzkiy, T. J.-Y. Derrien, Y. Levy, N. M. Bulgakova, T. Mocek, and L. Orazi, High-speed manufacturing of highly regular femtosecond laser-induced periodic surface structures: physical origin of regularity, *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, p. 8485, Aug. 2017
32. A. Cunha, A. P. Serro, V. Oliveira, A. Almeida, R. Vilar, and M.-C. Durrieu, “Wetting behaviour of femtosecond laser textured Ti–6Al–4V surfaces, *Applied Surface Science*, vol. 265, pp. 688–696, Gennaio. 2013
33. L. Orazi, I. Gnilitzkiy, and A. P. Serro, Laser Nanopatterning for Wettability Applications, *J. Micro Nano-Manuf*, vol. 5, no. 2, pp. 021008-021008–8, Mar. 2017
34. I. Gnilitzkiy, M. Pogorielov, D. Dobrota, R. Viter, L. Orazi, and O. Mischenko, Cell and Tissue Response to Modified by Laser-induced Periodic Surface Structures Biocompatible Materials for Dental Implants, in *Conference on Lasers and Electro-Optics (2016)*, paper AW4O.6, 2016, p. AW4O.6
35. A. Cunha et al., Femtosecond laser surface texturing of titanium as a method to reduce the adhesion of *Staphylococcus aureus* and biofilm formation,” *Applied Surface Science*, vol. 360, pp. 485–493, Jan. 2016
36. Pjetursson, BE, Thoma, D, Jung, R, Zwahlen, M, Zembic, A., 2010. A systematic review of the survival and complication rates of implant-supported fixed dental prostheses (FDPs) after a mean observation period of at least 5 years. *Clin. Oral Implants Res.* 23 (Suppl. 6), 22–38.
37. Manor, Y., Oubaid, S., Mardinger, O., Chaushu, G., Nissan, J., 2009 Characteristics of early versus late implant failure: a retrospective study. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 67, 2649–2652.
38. Berglundh, T., Persson, L., Klinge, B., 2002. A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *J. Clin. Periodontol.* 29 (Suppl. 3), 197–212
39. S. Franz, S. Rammelt, D. Scharnweber, J.C. Simon, Immune responses to implants – A review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials, *Biomaterials.* 32 (2011) 6692–6709

40. P. Branemark, et al., Immune responses to implants - a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials., *Scand J PlastReconstr Surg Suppl.* 16 (1977) 1–132
41. A.F. Mavrogenis, R. Dimitriou, J. Parvizi, G.C. Babis Biology of implant osseointegration. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2009; 9(2): 61-71
42. Xiao J, Zhou H, Zhao L, Sun Y, Guan S, Liu B. The effect of hierarchical micro/nanosurface titanium implant on osseointegration in ovariectomized sheep. *OsteoporosInt.* 2011; 22: 1907-13
43. Wong RL, Hiyari S, Yaghseizian A, Davar M, Casarin M, Lin YL, Tetradis S, Camargo PM, Pirih FQ Early intervention of peri-implantitis and periodontitis utilizing a mouse model. *J Periodontol.* 2018 Feb 19. doi: 10.1002/JPER.17-0541
44. Wolfart S, Wolf K, Brunzel S, Wolfart M, Caliebe A, Kern M. Implant placement under existing removable dental prostheses and its effect on masticatory performance. *Clin Oral Investig.* 2016 Dec; 20(9): 2447-2455
45. Javed F, Hussain HA, Romanos GE. Re-stability of dental implants following treatment of peri-implantitis. *Interv Med Appl Sci.* 2013; 5: 116–121
46. Canullo L, Penarrocha-Oltra D, Soldini C, et al. Microbiological assessment of the implant-abutment interface in different connections: Crosssectional study after 5 years of functional loading. *Clin Oral Implants Res.* 2015; 26: 426–434
47. Wen-Cheng Chen, Ya-Shun Chen, Chia-Ling Ko, Yi Lin, Tzu-Huang Kuo, Hsien-Nan Kuo Interaction of progenitor bone cells with different surface modifications of titanium implant. *Materials Science and Engineering C* 37 (2014) 305–313
48. R. K. Silverwood, P. G. Fairhurst, T. Sjöström, F. Welsh, Y. Sun, G. Li, B. Yu, P. S. Young, B. Su, R. M. D. Meek, M. J. Dalby, P. M. Tsimbouri Analysis of Osteoclastogenesis/Osteoblastogenesis on Nanotopographical Titania Surfaces *Adv. Healthcare Mater.* 2016, 5, 947–955
49. Prevey PS, Loftus EF, Hornbach DJ. *J ASTM Int.* 2006:3
50. Wennerberg A, Hallgren C, Johansson C, Daneli S. *Clin Oral Implant Res* 1998; 9: 11–9

51. Stangl R, Pries A, Loos B, Muller M, Erben RG. *J Biomed Mater Res*. 2004;69A: 444–53
52. Hulbert SF, Young FA, Mathews RS, Klawitter JJ, Talbert CD, Stelling FH. *J Biomed Mater Res* 1970; 4: 433–56
53. Li J, Liao H, Fartash B, Hermansson L, Johnsson. *Biomaterials* 1997;18: 691–6
54. Linez-Bataillon P., Monchau F., Bigerelle M., Hildebrand H.F. In vitro MC3T3 osteoblast adhesion with respect to surface roughness of Ti6Al4V substrates. *Biomolecular Engineering* 19 (2002) 133-141
55. Yun H, Lin CJ, Li J, Wang JR, Chen HB. Low-temperature hydrothermal formation of a net-like structured TiO₂ film and its performance of photogenerated cathode protection. *Appl Surf Sci* 2008;255:2113-7
56. Lai YK, Lin CJ, Wang H, Huang JY, Zhuang HF, Sun L. Superhydrophilic – superhydrophobic micropattern on TiO₂ nanotube films by photocatalytic lithography. *Electrochem Commun* 2008; 10: 387-91
57. Liwen Lin, Hui Wang, Ming Ni, YunfengRui, Tian-Yuan Cheng, Cheng-Kung Cheng, Xiaohua Pan, Gang Li, Changjian Lin Enhanced osteointegration of medical titanium implant with surface modifications in micro/nanoscale structures. *Journal of Orthopaedic Translation* (2014) 2, 35-42
58. M. Birnbaum, Semiconductor surface damage produced by ruby lasers, *J. Appl. Phys.* 36, 3688 (1965)
59. Gnilitzkyi, I. Pavlov, F. Rotundo, L. Orazi, C. Martini, and F. Ömerİlday, “Nonlinear laser lithography for enhanced tribological properties”, *CLEO: AM2K.2* (Optical Society of America) (2015)
60. Rotella G., Orazi L., Alfano M., Candamano S., Gnilitzkyi I., Innovative high-speed femtosecond lasernano-patterning for improved adhesive bonding of Ti6Al4V titanium alloy. *CIRP-JMST*. 18, 101-106 (2017)
61. Cunha, A. Paula Serro, V. Oliveira, A. Almeida, R. Vilar, M.-C. Durrieu, Wetting behaviour of femtosecond laser textured Ti-6Al-4V surfaces, *Applied Surface Science* 265, 688-696 (2013)

62. Oktem, I. Pavlov, S. Ilday, H. Kalaycioglu, A. Rybak, S. Yavas, M. Erdogan, and F. O. Ilday, Nonlinear laser lithography for indefinitely large-area nanostructuring with femtosecond pulses, *Nature Photonics*, 7, 897-901 (2013)
63. Cunha, A.; Elie, A.-M.; Plawinski, L.; Serro, A.P.; Botelho do Rego, A.M.; Almeida, A.; Urdaci, M.C.; Durrieu, M.-C.; Vilar, R. Femtosecond laser surface texturing of titanium as a method to reduce the adhesion of *Staphylococcus aureus* and biofilm formation. *Appl. Surf. Sci.* 2016, 360, 485–493
64. Shevchenko, A.V.; Dudnik, E.V.; Tsukrenko, V.V.; Ruban, A.K.; Red'ko, V.P.; Lopato, L.M. Microstructural design of bioinert composites in the ZrO_2 – Y_2O_3 – CeO_2 – Al_2O_3 – CoO system. *Powder Metall. Metal Ceram.* 2013, 51, 724–733
65. Alonso-Pérez, R.; Bartolomé, J.F.; Ferreiroa, A.; Salido, M.P.; Pradíes, G. Original vs. non-original abutments for screw-retained single implant crowns: An in vitro evaluation of internal fit, mechanical behaviour and screw loosening. *Clin. Oral Implant. Res.* 2018, 29, 1230–1238
66. Duan, S.; Shi, X.; Mao, M.; Yang, W.; Han, S.; Guo, H.; Guo, J. Investigation of the Oxidation Behaviour of Ti and Al in Inconel 718 Superalloy During Electrosag Remelting. *Sci. Rep.* 2018, 8, 5232
67. Branemark, P.I.; Hansson, B.O.; Adell, R.; Breine, U.; Lindström, J.; Hallén, O.; Ohman, A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Suppl.* 1977, 16, 1–132
68. Mavrogenis, A.F.; Dimitriou, R.; Parvizi, J.; Babis, G.C. Biology of implant osseointegration. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 2009, 9, 61–71
69. Xiao, J.; Zhou, H.; Zhao, L.; Sun, Y.; Guan, S.; Liu, B.; Kong, L. The effect of hierarchical micro/nanosurface titanium implant on osseointegration in ovariectomized sheep. *Osteoporos. Int.* 2011, 22, 1907–1913
70. Wu, S.; Liu, X.; Yeung, K.W.K.; Guo, H.; Li, P.; Hu, T.; Chung, C.Y.; Chu, P.K. Surface nano-architectures and their effects on the mechanical properties and corrosion behavior of Ti-based orthopedic implants. *Surf. Coat. Technol.* 2013, 233, 13–26
71. Silverwood, R.K.; Fairhurst, P.G.; Sjöström, T.; Welsh, F.; Sun, Y.; Li, G.; Yu, B.; Young, P.S.; Su, B.; Meek, R.M.; Dalby, M.J.; Tsimbouri, P.M. Analysis of

osteoclastogenesis/osteoblastogenesis on nanotopographical titania surfaces. *Adv. Healthc. Mater.* 2016, 5, 947–955

72. Gnilitzkiy, T. J.-Y. Derrien, Y. Levy, N. M. Bugakova, T. Mocek and L. Orazi, "High-speed, highly regular femtosecond laser printing of laser-induced periodic surface structures on metals: physical origin of the regularity", *Scientific Reports*, 7, 8485 (2017)

73. A. Cunha, A.-M. Elie, L. Plawinski, A.P. Serro, A.M. Botelho do Rego, A. Almeida, M.C. Urdaci, M.-C. Durrieu, R. Vilar, Femtosecond laser surface texturing of titanium as a method to reduce the adhesion of *Staphylococcus aureus* and biofilm formation. *Applied Surface Science*, 360B, 25, 485-493 (2016). (DOI: 10.1016/j.apsusc.2015.10.102)

74. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater* 2007; 23: 844–54

75. Shuilin Wu, Xiangmei Liu, Kelvin W.K. Yeung, HuanGuo, Penghui Li, Tao Hu, C.Y. Chung, Paul K. Chu Surfacenano-architectures and their effects on the mechanical properties and corrosion behavior of Ti-based orthopedic implants. *Surface & Coatings Technology* 233 (2013) 13–26

76. Stangl R, Pries A, Loos B, Müller M, Erben RG. Influence of pores created by laser superfinishing on osseointegration of titanium alloy implants. *J Biomed Mater Res A* 2004; 69: 444–53

77. Tobias P. Kunzler, Tanja Drobek, Martin Schuler, Nicholas D. Spencer Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients *Biomaterials* 28 (2007) 2175–2182

78. Dalby MJ, McCloy D, Robertson M, Agheli H, Sutherland D, Affross-man S, Oreffo ROC. Osteoprogenitor response to semi-ordered and random nanotopographies. *Biomaterials* 2006;27:2980–7

79. Lamers E, Walboomers XF, Domanski M, teRiet J, van Delft FC, Luttge R, Winnubst LA, Gardeniers HJ, Jansen JA. The influence of nanoscale grooved substrates on osteoblast behavior and extracellular matrix deposition. *Biomaterials* 2010; 31: 3307–16

80. Domanski M, Luttge R, Lamers E, Walboomers XF, Winnubst L, Jansen JA, Gardeniers JGE. Submicron-patterning of bulk titanium by nanoimprint lithography and reactive ion etching. *Nanotechnology* 2012;23, 065306/1-12
81. Prodanov L, Lamers E, Domanski M, Luttge R, Jansen JA, Walboomers XF. The effect of nanometric surface texture on bone contact to titanium implants in rabbit tibia. *Biomaterials*. 2013; 34: 2920–7
82. Tran N, Webster TJ. *Nanotechnology for bone materials*. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2009; 1: 336–51
83. Wennerberg A, Albrektsson T. On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2010; 25: 63–74
84. Ricardo Tejero, Eduardo Anitua, Gorka Orive. Toward the biomimetic implant surface: Biopolymers on titanium-based implants for bone regeneration. *Progress in Polymer Science* 39 (2014) 1406–1447
85. Shuilin Wu, Xiangmei Liu, Kelvin W.K. Yeung, Huan Guo, Penghui Li, Tao Hu, C.Y. Chung, Paul K. Chu. Surface nano-architectures and their effects on the mechanical properties and corrosion behavior of Ti-based orthopedic implants. *Surface & Coatings Technology* 233 (2013) 13–26
86. A.F. Mavrogenis, R. Dimitriou, J. Parvizi, G.C. Babis. Biology of implant osseointegration. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2009; 9(2): 61-71
87. Park JY, Gemmell CH, Davies JE. Platelet interactions with titanium: modulation of platelet activity by surface topography. *Biomaterials* 2001; 22: 2671–82
88. Kikuchi L, Park JY, Victor C, Davies JE. Platelet interactions with calcium-phosphate-coated surfaces. *Biomaterials* 2005;26:5285–95
89. Buser, D.; T. von Arx, C. ten Bruggenkate; Weingart, D. Clinical oral implants research, 11 Suppl. 2000, 1, 59-68.
90. Darcey, J.; Eldridge, D. Dental historian : Lindsay Club newsletter. 2016, 61, 75-92.
- Block, M.S. *J Oral Maxillofac Surg*. 2018, 76, 11-26
91. Hafezeqoran, A.; Koodaryan, R. *BioMed research international*. 2017, 2017, 9246721
92. Afrashtehfar, K.I.; Del Fabbro, M. *The Journal of prosthetic dentistry*. 2019

93. Albrektsson, T.; Chrcanovic, B.; Molne, J.; Wennerberg, A. *European journal of oral implantology*, 11 Suppl. 2018, 1, S37-S46
94. Lugovskoy, A.; Lugovskoy, S. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*. 2014, 43, 527-532
95. Chouirfa, H.; Bouloussa, H.; Migonney, V.; Falentin-Daudre, C. *Acta Biomater*. 2019, 83, 37-54
96. Insua, A.; Monje, A.; Wang, H.L.; Miron, R.J. *J Biomed Mater Res A*. 2017, 105, 2075-2089
97. Gupta, A.; Rathee, S.; Suman, T.; Ahire, M.; Madhav, M.S. Chauhan, *Contemporary clinical dentistry*. 2018, 9, 597-600
98. Smeets, R.; Stadlinger, B.; Schwarz, F.; Beck-Broichsitter, B.; Jung, O.; Precht, C.; Kloss, F.; Grobe, A.; Heiland, M.; Ebker, T. *BioMed research international*. 2016, 2016, 6285620
99. Annunziata, M.; Guida, L. *Frontiers of oral biology*. 2015, 17, 62-77
100. Matykina, E.; Arrabal, R.; Skeldon, P.; Thompson, G.E.; *Acta Biomater*. 2009, 5, 1356-1366
101. Tanase, C.E.; Golozar, M.; Best, S.M.; Brooks, R.A. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019, 176, 176-184
102. Kulkarni Aranya, A.; Pushalkar, S.; Zhao, M.; LeGeros, R.Z.; Zhang, Y.; Saxena, D. *J Biomed Mater Res A*. 2017, 105, 2218-2227
103. Chen, Q.; Li, W.; Ling, K.; Yang, R. *Materials (Basel, Switzerland)*. 2019, 12
104. Pereira, B.L. ; da Luz, A.R.; Lepienski, C.M.; Mazzaro, I.; Kuromoto, N.K.; *J Mech Behav Biomed Mater*. 2018, 77, 347-352
105. Marques Ida, S.; da Cruz N.C.; Landers, R.; Yuan, J.C.; Mesquita, M.F.; Sukotjo, C.; Mathew, M.T.; Barao, V.A. *Biointerphases*. 2015, 10, 041002
106. Rack, H.J.; Qazi, J.I. *Titanium alloys for biomedical applications*, *J. Mat. Sci. Eng. C*. 2006, 26, 1269–1277. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2005.08.032>
107. Faghihi-Sani, M.A.; Arbabi, A.; Mehdinezhad-Roshan, A. *Crystallization of hydroxyapatite during hydrothermal treatment on amorphous calcium phosphate layer*

- coated by PEO technique, *J. Ceramics International*. 2013, 39, 1793–1798. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.08.026>
108. Heimann, R.B. The challenge and promise of low-temperature bioceramic coatings, in: *J. Surf. Coat. Technol.* 2016, 301, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2015.12.082>
109. Ferraris, S.; Yamaguchi, S.; Barbani, N.; Cazzola, M.; Cristallini, C.; Miola, M.; Vernè, E.; Spriano, S. Bioactive materials: In vitro investigation of different mechanisms of hydroxyapatite precipitation, *J. Acta Biomaterialia* 2020, 102, 468–480. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.11.024>
110. Singh, G.; Sharma, N.; Kumar, D.; Hegab, H. Design, development and tribological characterization of Ti–6Al–4V/hydroxyapatite composite for bio-implant applications, *J. Mat. Chem. Phys. V.* 2020, 243, 122662. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2020.122662>
111. Epinette, J. A.; Toni, A.; Willmann, G.; Eds. *Bioceramics in joint arthroplasty*, Georg Thieme, Stuttgart, New York. 2001, 84–91
112. Creugers, N.; The survival of hydroxyapatite-coated implants is questioned, *Evidence-based Dentistry* 3. 2002, 3, 77–78. <https://doi.org/10.1038/sj.ebd.6400129>
113. Domínguez-trujillo, C.; Peón, E.; Chicardi, E.; Pérez, H.; Rodríguez-ortiz, J.A.; Pavón, J.J. Sol-gel deposition of hydroxyapatite coatings on porous titanium for biomedical applications, *J. Surf. Coat. Technol.* 2018, 333, 158–162. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2017.10.079>
114. Ivanova, A.A.; Surmeneva, M.A.; Surmenev, R.A.; Depla, D. Structural evolution and growth mechanisms of RF-magnetron sputter-deposited hydroxyapatite thin films on the basis of unified principles, *J. Appl. Surf. Sci.* 2017, 425, 497–506. <https://doi:10.1016/j.apsusc.2017.07.039>
115. Nishikawa, H.; Hasegawa, T.; Miyake, A.; Tashiro, Y.; Komasa, S.; Hashimoto, Y. Effect of laser fluence and ambient gas pressure on surface morphology and chemical composition of hydroxyapatite thin films deposited using pulsed laser deposition, *J. Appl. Surf. Sci.* 2018, 427, 458–463. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.08.129>

116. Drevet, R.; Ben Jaber, N.; Fauré, J.; Tara, A.; Ben Cheikh Larbi, A.; Benhayoune, H. Electrophoretic deposition (EPD) of nano-hydroxyapatite coatings with improved mechanical properties on prosthetic Ti6Al4V substrates, *J. Surf. Coat. Technol.* 2016, 301, 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2015.12.058>
117. He D.H.; Wang, P.; Liu, P.; Liu, X.K.; Ma, F.C.; Chen, X.H.; Li, W.; Du, J.D.; Zhao, J.; HA Coating Fabricated by Electrochemical Deposition on Modified Ti6Al4V Alloy, *J. Surf. Coat. Technol.* 2016, 301, 6–12. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2015.12.082>
118. Huang, H.; Lan, P.-H.; Zhang, Y.-Q.; Li, X.-K.; Xing, Z.; Yuan, C.-F.; Zheng, X.-B.; Guo, Z. Surface characterization and in vivo performance of plasma-sprayed hydroxyapatite-coated porous Ti6Al4V implants generated by electron beam melting, *J. Surf. Coat. Technol.* 2015, 283, 80–88
119. Levingstone, T.J.; Ardhaoui, M.; Benyounis, K.; Looney, L.; Stokes, J.T.; Plasma sprayed hydroxyapatite coatings: understanding process relationships using design of experiment analysis, *J. Surf. Coatings Technol.* 2015, 283, 29–36
120. Pereira, B. L.; Beilner, G.; Lepienski, C. M.; Szameitat, E. S.; Chee, B. S.; Kuromoto, N. K.; Luis dos Santos, L.; Mazzaro, I.; Alves Claro, A.P. R.; Nugent, M. J.D. Oxide coating containing apatite formed on Ti-25Nb-25Ta alloy treated by Two-Step Plasma Electrolytic Oxidation, *J. Surf. Coat. Technol.* 2020, 382, 125224. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2019.125224>
121. Kazek-Kesik, A.; Kalembe-Rec, I.; Simka, W. *Materials* (Basel, Switzerland). 2019, 12
122. Rajesh, P.; Muraleedharan, C.V.; Komath, M.; Varma, H. *J Mater Sci Mater Med.* 2011, 22, 1671-1679
123. Kusakabe, S.; Rawls, H.R.; Hotta, M. *Dent Mater.* 2016, 32, e55-62
124. Rueden, C.T.; Schindelin, J.; Hiner, M.C.; DeZonia, B.E.; Walter, A.E.; Arena, E.T.; Eliceiri, K.W. *BMC Bioinformatics.* 2017, 18, 529
125. Kokubo, T. *Acta Materialia.* 1998, 46, 2519-2527
126. Mortazavi, G.; Jiang, J.; Meletis, E.I.; *Applied Surface Science.* 2019, 488, 370-382

127. Pisarek, M.; Roguska, A.; Andrzejczuk, M.; Marcon, L.; Szunerits, S.; Lewandowska, M.; Janik-Czachor, M. *Applied Surface Science*. 2011, 257, 8196-8204
128. Sowa, M.; Parafiniuk, M.; Mouzêlo, C.M.S.; Kazek-Kęsik, A.; Zhidkov, I.S.; Kukharenko, A.I.; Cholakh, S.O.; Kurmaev, E.Z.; Simka, W. *Electrochimica Acta*. 2019, 302, 10-20
129. Chastain, J.; Moulder, J.F. Physical Electronics Inc., Eden Prairie, Minnesota, USA. 1995
130. Jemat, A.; Ghazali, M.J.; Razali, M.; Otsuka, Y. *BioMed research international*. 2015, 2015, 791725
131. Mohedano, M.; Matykina, E.; Arrabal, R.; Pardo, A.; Merino, M.C. *Dent Mater*. 2014, 30, e28-40
132. Marques, I.D.; Barao, V.A.; da Cruz, N.C.; Yuan, J.C.; Mesquita, M.F.; Ricomini-Filho, A.P.; Sukotjo, C.; Mathew, M.T. *Corrosion science*. 2015, 100, 133-146
133. Khan, M.A.; Williams, R.L.; Williams, D.F. *Biomaterials*. 1996, 17, 2117-2126
134. de Souza, V.Z.; Manfro, R.; Joly, J.C.; Elias, C.N.; Peruzzo, D.C.; Napimoga, M.H.; Martinez, E.F. *International journal of implant dentistry*. 2019, 5, 41
135. Chung, C.J.; Su, R.T.; Chu, H.J.; Chen, H.T.; Tsou, H.K.; He, J.L. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013, 101, 1023-1030
136. Polo-Corrales, L.; Latorre-Esteves, M.; Ramirez-Vick, J.E. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2014, 14, 15-56
137. Rafieerad, A.R.; Ashra, M.R.; Mahmoodian, R.; Bushroa, A.R. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*. 2015, 57, 397-413
138. Etminanfar, M.R.; Khalil-Allafi, J.; Montaseri, A.; Vatankhah-Barenji, R. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*. 2016, 62, 28-35
139. Best, S.; Sim, B.; Kayser, M.; Downes, S. *J Mater Sci Mater Med*. 1997, 8, 97-103
140. Monchau, F.; Hivart, P.; Genestie, B.; Chai, F.; Descamps, M.; Hildebrand H.F.; *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*. 2013, 33, 490-498

141. Zhao, Q.M.; Li, X.K.; Guo, S.; Wang, N.; Liu, W.W.; Shi, L.; Guo, Z. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*. 2020, 110, 110682
142. Li, J.; Cui, X.; Hooper, G.J.; Lim, K.S.; Woodfield, T.B.F. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2020, 105, 103671
143. Gui, N.; Xu, W.; Abraham, A.N.; Myers, D.E.; Mayes, E.L.H.; Xia, K.; Shukla, R.; Qian, M. *J Biomed Mater Res A*. 2018, 106, 2020-2033
144. Wang, Q.; Hong, Y.B.; Huang, M.D.; Wang, Q.M.; Teng, W. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*. 2020, 110, 110688
145. Prado, R.F.; Esteves, G.C.; Santos, E.L.S.; Bueno, D.A.G.; Cairo, C.A.A.; Vasconcellos, L.G.O.; Sagnori, R.S.; Tessarin, F.B.P.; Oliveira, F.E.; Oliveira, L.D.; Villaca-Carvalho, M.F.L.; Henriques, V.A.R.; Carvalho, Y.R.; De Vasconcellos, L.M.R. *PLoS One*. 2018, 13, e0196169
146. Aparicio, C.; Ginebra, M.-P. Woodhead Publishing. 2016, pp. 482
147. Prasad, S.; Wong, R.C.W. *Oral Science International*. 2018, 15, 48-55
148. Prasad, S.; Suresh, S.; Hong, K.L.; Bhargav, A.; Rosa, V.; Wong, R.C.W. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2020, 103, 103548
149. Mishchenko, O.; Ovchynnykov, O.; Kapustian, O.; Pogorielov, M. *Materials*. 2020, 13, 1306
150. Lopez-Quiles, J.; Forteza-Lopez, A.; Montiel, M.; Clemente, C.; Fernandez-Tresguerres, J.A.; Fernandez-Tresguerres, I.; *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2019, 24, e652-e658
151. Saruta, J.; Sato, N.; Ishijima, M.; Okubo, T.; Hirota, M.; Ogawa, T.; *Int J Mol Sci*. 2019, 20
152. Yanovska, A.; Kuznetsov, V.; Stanislavov, A.; Danilchenko, S.; Sukhodub, L. Synthesis and characterization of hydroxyapatite-based coatings for medical implants obtained on chemically modified Ti6Al4V substrates, *Surface & Coatings Technology* 2011, 205, 5324–5329. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2011.05.040>
153. Strnad, G.; Chirila, N.; Petrovan, C.; Russu, O. Contact angle measurement on medical implant Titanium-based biomaterials, *Procedia Technology*. 2016, 22, 946–953. <https://doi.org/10.1016/j.protcy.2016.01.094>

154. Yuan, Y.; Randall, Lee T. Contact angle and wetting properties, in: Bracco, G.; Holst, B.; (Eds.). *Surface Science Techniques, Springer Series in Surface Sciences 51*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2013, 1–34. ISBN 978-3-642-34242-4
155. Bhushan, B. *Modern Tribology Handbook, Two Volume Set 1st Edition*, in: Bhushan, B.; (Eds.), CRC Press, 2000, 1760. ISBN 9780849384035. <https://doi.org/10.1201/9780849377877>
156. EN ISO 4287:(1999) Geometrical product specifications (GPS) – surface texture: profile method – terms, definitions, and surface texture parameters. International Organization for Standardization. Geneva: ISO, 1997. - 36 p
157. DIN 4768:(1990) Determination of values of surface roughness parameters Ra, Rz, Rmax using electrical contact (stylus) instruments; concepts and measuring conditions. Published by: Deutsches Institut für Normung E.V. (DIN), 3 p
158. Huang, T. H.; Yang, C. C.; Ding, S. J.; Yan, M.; Chou, M. Y.; Kao, C. T. Biocompatibility of human osteosarcoma cells to root end filling materials *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* 2005, 72B, 140–145. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30137>
159. Yanovska, A.; Kuznetsov, V.; Stanislavov, A.; Husak, E.; Pogorielov, M.; Starikov, V.; Bolshanina, S.; Danilchenko, S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite-gelatine composite materials for orthopedic application, *J. Mat. Chem. Phys.* 2016, 183, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2016.08.006>
160. Bee, S.-L.; Mariatti, M.; Ahmad, N.; Yahaya, B. H.; Abdul Hamid, Z. A. Bio-CAM 2017 Effect of the calcination temperature on the properties of natural hydroxyapatite derived from chicken bone wastes, *Materials Today: Proceedings.* 2019, 16, 1876–1885. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.06.064>
161. Huang, S.; Ulloa, A.; Nauman, E.; Stanciu, L. Collagen Coating Effects on Fe-Mn Bioresorbable Alloys, *J. Orthop. Res.* 2020, 38(3), 523–535. <https://doi.org/10.1002/jor.24492>
162. Pereira, H.F.; Cengiz, I.F.; Silva, F.S.; Reis, R.L.; Oliveira, J.M. Scaffolds and coatings for bone regeneration, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2020, 31(3), 27. doi: 10.1007/s10856-020-06364-y

163. Tavakoli, J.; Khosroshahi, M.E. Surface morphology characterization of laser-induced titanium implants: lesson to enhance osseointegration process, *Biomed. Eng. Lett.* 2018, 8(3), 249-257. doi: 10.1007/s13534-018-0063-6
164. Gnilitzkyi, I.; Pogorielov, M.; Viter, R.; et al. Cell and tissue response to nanotextured Ti6Al4V and Zr implants using high-speed femtosecond laser-induced periodic surface structures. *J. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.* 2019, 21, 02036. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102036>
165. Burtscher, S.; Krieg, P.; Killinger, A.; Al-Ahmad, A.; Seidenstücker, M.; Latorre, S.H.; Bernstein, A. Thin Degradable Coatings for Optimization of Osteointegration Associated with Simultaneous Infection Prophylaxis, *Materials (Basel).* 2019, 12(21), 25. doi: 10.3390/ma12213495
166. Su, Y.; Cockerill, I.; Zheng, Y.; Tang, L.; Qin, Y.X.; Zhu, D. Biofunctionalization of metallic implants by calcium phosphate coatings, *J. Bioact. Mater.* 2019, 4, 196-206. doi: 10.1016/j.bioactmat.2019.05.001
167. A.A. Zadpoor, Mechanical performance of additively manufactured meta-biomaterials, *Acta Biomater.* 85 (2019) 41–59, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.12.038>
168. H. Montazerian, M.G.A. Mohamed, M.M. Montazeri, S. Kheiri, A.S. Milani, K. Kim, M. Hoorfar, Permeability and mechanical properties of gradient porous PDMS scaffolds fabricated by 3D-printed sacrificial templates designed with minimal surfaces, *Acta Biomater.* 96 (2019) 149–160, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.06.040>
169. A. Boddupalli, D. Akilbekova, K.M. Bratlie, Poly-l-arginine modifications alter the organization and secretion of collagen in SKH1-E mice, *Mater. Sci. Eng. C* 106 (2020) 110143, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110143>
170. S. Vijayavenkataraman, L.Y. Kuan, W.F. Lu, 3D-printed ceramic triply periodic minimal surface structures for design of functionally graded bone implants, *Mater. Des.* 108602 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2020.108602>
171. E. Chicardi, C.F. Gutierrez-González, M.J. Sayagués, C. García-Garrido, Development of a novel TiNbTa material potentially suitable for bone replacement implants, *Mater. Des.* 145 (2018) 88–96, <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2018.02.042>

172. J.Y. Rho, R.B. Ashman, C.H. Turner, Young's modulus of trabecular and cortical bone material: ultrasonic and microtensile measurements, *J. Biomech.* 26 (1993) 111–119, [https://doi.org/10.1016/0021-9290\(93\)90042-D](https://doi.org/10.1016/0021-9290(93)90042-D)
173. J. Breme, E. Eisenbarth, V. Biehl, Titanium and its alloys for medical applications, in: *Titan. Titan. Alloy*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG, 2005, pp. 423–451, <https://doi.org/10.1002/3527602119.ch16>
174. M.I.Z. Ridzwan, S. Shuib, A.Y. Hassan, A.A. Shokri, M.N.M. Ibrahim, Problem of stress shielding and improvement to the hip implant designs: a review, *J. Med. Sci.* 7 (2007) 460–467, <https://doi.org/10.3923/jms.2007.460.467>
175. H. Ibrahim, S.N. Esfahani, B. Poorganji, D. Dean, M. Elahinia, Resorbable bone fixation alloys, forming, and post-fabrication treatments, *Mater. Sci. Eng. C* 70 (2017) 870–888, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.069>
176. A. Shypylenko, A.V. Pshyk, B. Grze'skowiak, K. Medjanik, B. Peplinska, K. Oyoshi, A. Pogrebnjak, S. Jurga, E. Coy, Effect of ion implantation on the physical and mechanical properties of Ti-Si-N multifunctional coatings for biomedical applications, *Mater. Des.* 110 (2016) 821–829, <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2016.08.050>
177. A.D. Pogrebnjak, C.-H. Kong, R.F. Webster, R.D. Tilley, Y. Takeda, K. Oyoshi, O. V. Bondar, V.V. Buranich, S.V. Konstantinov, L.S. Baimoldanova, M. Opielak, P. Zukowski, P. Konarski, Antibacterial effect of Au implantation in ductile nanocomposite multilayer (TiAlSiY)N/CrN coatings, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 11 (2019) 48540–48550, <https://doi.org/10.1021/acsami.9b16328>
178. T. Femmer, A.J.C. Kuehne, M. Wessling, Estimation of the structure dependent performance of 3-D rapid prototyped membranes, *Chem. Eng. J.* 273 (2015) 438–445, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.03.029>
179. S.J.P. Callens, R.J.C. Uyttendaele, L.E. Fratila-Apachitei, A.A. Zadpoor, Substrate curvature as a cue to guide spatiotemporal cell and tissue organization, *Biomaterials.* 232 (2020) 119739, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119739>
180. M.D. Vlad, E. Fernandez Aguado, S. G'omez Gonz'alez, I.C. Ivanov, E.V. S'indilar, I. Poata, A.S' , Iencean, M. Butnaru, E.R. Avad'anei, J. L'opez L'opez, Novel titanium-apatite hybrid scaffolds with spongy bone-like micro architecture intended for

spinal application: in vitro and in vivo study, *Mater. Sci. Eng. C* 110 (2020) 110658, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110658>

181. F.S.L. Bobbert, K. Lietaert, A.A. Eftekhari, B. Pouran, S.M. Ahmadi, H. Weinans, A. A. Zadpoor, Additively manufactured metallic porous biomaterials based on minimal surfaces: a unique combination of topological, mechanical, and mass transport properties, *Acta Biomater.* 53 (2017) 572–584, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.02.024>

182. S. Bose, S.F. Robertson, A. Bandyopadhyay, Surface modification of biomaterials and biomedical devices using additive manufacturing, *Acta Biomater.* 66 (2018) 6–22, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.11.003>

183. M. Croes, S. Bakhshandeh, I.A.J. van Hengel, K. Lietaert, K.P.M. van Kessel, B. Pouran, B.C.H. van der Wal, H.C. Vogely, W. Van Hecke, A.C. Fluit, C.H.E. Boel, J. Alblas, A.A. Zadpoor, H. Weinans, S. Amin Yavari, Antibacterial and immunogenic behavior of silver coatings on additively manufactured porous titanium, *Acta Biomater.* 81 (2018) 315–327, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.051>

184. D. Melancon, Z.S. Bagheri, R.B. Johnston, L. Liu, M. Tanzer, D. Pasini, Mechanical characterization of structurally porous biomaterials built via additive manufacturing: experiments, predictive models, and design maps for load-bearing bone replacement implants, *Acta Biomater.* 63 (2017) 350–368, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.09.013>

185. Y. Li, W. Li, F.S.L. Bobbert, K. Lietaert, J.H. Dong, M.A. Leeftang, J. Zhou, A. A. Zadpoor, Corrosion fatigue behavior of additively manufactured biodegradable porous zinc, *Acta Biomater.* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.02.001>

186. D. Singh, A.J. Harding, E. Albadawi, F.M. Boissonade, J.W. Haycock, F. Claeysens, Additive manufactured biodegradable poly(glycerol sebacate methacrylate) nerve guidance conduits, *Acta Biomater.* 78 (2018) 48–63, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.07.055>

187. G. Hannink, J.J.C. Arts, Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: what is optimal for bone regeneration? *Injury.* 42 (2011) S22–S25, <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.06.008>

188. N. Jiang, Z. Guo, D. Sun, Y. Li, Y. Yang, C. Chen, L. Zhang, S. Zhu, Promoting osseointegration of Ti implants through micro/Nanoscaled hierarchical Ti phosphate/Ti oxide hybrid coating, *ACS Nano* 12 (2018) 7883–7891, <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b02227>
189. J.W.C. Dunlop, F.D. Fischer, E. Gamsjager, P. Fratzl, A theoretical model for tissue growth in confined geometries, *J. Mech. Phys. Solids*. 58 (2010) 1073–1087, <https://doi.org/10.1016/j.jmps.2010.04.008>
190. A.A. Zadpoor, Bone tissue regeneration: the role of scaffold geometry, *Biomater. Sci.* 3 (2015) 231–245, <https://doi.org/10.1039/C4BM00291A>
191. L. Li, J. Shi, K. Zhang, L. Yang, F. Yu, L. Zhu, H. Liang, X. Wang, Q. Jiang, Early osteointegration evaluation of porous Ti6Al4V scaffolds designed based on triply periodic minimal surface models, *J. Orthop. Transl.* 19 (2019) 94–105, <https://doi.org/10.1016/j.jot.2019.03.003>
192. M.J. Olszta, X. Cheng, S.S. Jee, R. Kumar, Y.-Y. Kim, M.J. Kaufman, E.P. Douglas, L. B. Gower, Bone structure and formation: a new perspective, *Mater. Sci. Eng. R. Rep.* 58 (2007) 77–116, <https://doi.org/10.1016/j.mser.2007.05.001>
193. A. Turlybekuly, A.D. Pogrebnyak, L.F. Sukhodub, L.B. Sukhodub, A. S. Kistaubayeva, I.S. Savitskaya, D.H. Shokatayeva, O.V. Bondar, Z. K. Shaimardanov, S.V. Plotnikov, B.H. Shaimardanova, I. Digel, Synthesis, characterization, in vitro biocompatibility and antibacterial properties study of nanocomposite materials based on hydroxyapatite-biphasic ZnO micro- and nanoparticles embedded in alginate matrix, *Mater. Sci. Eng. C* 104 (2019) 109965, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109965>
194. A. Pogrebnyak, L. Sukhodub, L. Sukhodub, O. Bondar, M. Kumeda, B. Shaimardanova, Z. Shaimardanov, A. Turlybekuly, Composite material with nanoscale architecture based on bioapatite, sodium alginate and ZnO microparticles, *Ceram. Int.* 45 (2019) 7504–7514, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.01.043>
195. A.D. Pogrebnyak, L.F. Sukhodub, L. Sukhodub, O.V. Bondar, A. Turlybekuly, ZnO doped nanosized composite material based on hydroxyapatite and sodium alginate matrix, in: *Adv. Thin Film. Nanostructured Mater. Coatings*, 2019, pp. 361–368, https://doi.org/10.1007/978-981-13-6133-3_35

196. A. Haider, D.L. Versace, K.C. Gupta, I.K. Kang, Pamidronic acid-grafted nHA/PLGA hybrid nanofiber scaffolds suppress osteoclastic cell viability and enhance osteoblastic cell activity, *J. Mater. Chem. B* 4 (2016) 7596–7604, <https://doi.org/10.1039/C6TB02083F>
197. S. Kwak, A. Haider, K.C. Gupta, S. Kim, I.K. Kang, Micro/Nano multilayered scaffolds of PLGA and collagen by alternately electrospinning for bone tissue engineering, *Nanoscale Res. Lett.* 11 (2016) 323, <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1532-4>
198. J. Niu, G. Yuan, Y. Liao, L. Mao, J. Zhang, Y. Wang, F. Huang, Y. Jiang, Y. He, W. Ding, Enhanced biocorrosion resistance and biocompatibility of degradable Mg–Nd–Zn–Zr alloy by brushite coating, *Mater. Sci. Eng. C* 33 (2013) 4833–4841, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.08.008>
199. I. Bajpai, D.Y. Kim, J. Kyong-Jin, I.-H. Song, S. Kim, Effect of water-glass coating on HA and HA-TCP samples for MSCs adhesion, proliferation, and differentiation, *Biomed. Res. Int.* 2016 (2016) 1–8, <https://doi.org/10.1155/2016/9758729>
200. J. Zhao, K.H. Hwang, W.S. Choi, S.J. Shin, J.K. Lee, Biological behavior of osteoblast cell and apatite forming ability of the surface modified Ti alloys, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 16 (2016) 1541–1544, <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.11909>
201. J. Zhou, X. Wang, L. Zhao, Antibacterial, angiogenic, and osteogenic activities of Ca, P, Co, F, and Sr compound doped titania coatings with different Sr content, *Sci. Rep.* 9 (2019) 14203, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50496-3>
202. A. Kazek-Kęsik, I. Kalembe-Rec, W. Simka, Anodization of a medical-grade Ti-6Al-7Nb alloy in a Ca(H₂PO₄)₂-hydroxyapatite suspension, *Materials (Basel)* 12 (2019) 3002, <https://doi.org/10.3390/ma12183002>
203. X. Lu, M. Mohedano, C. Blawert, E. Matykina, R. Arrabal, K.U. Kainer, M. L. Zheludkevich, Plasma electrolytic oxidation coatings with particle additions – a review, *Surf. Coat. Technol.* 307 (2016) 1165–1182, <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2016.08.055>

204. P. Zhang, Z. Zhang, W. Li, Antibacterial coating incorporating silver nanoparticles by microarc oxidation and ion implantation, *J. Nanomater.* 2013 (2013) 1–8, <https://doi.org/10.1155/2013/542878>
205. R.O. Darouiche, Treatment of infections associated with surgical implants, *N. Engl. J. Med.* 350 (2004) 1422–1429, <https://doi.org/10.1056/NEJMra035415>
206. G.-J.A. ter Boo, D.W. Grijpma, T.F. Moriarty, R.G. Richards, D. Eglin, Antimicrobial delivery systems for local infection prophylaxis in orthopedic- and trauma surgery, *Biomaterials.* 52 (2015) 113–125, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.020>
207. S. Prabhu, E.K. Poulouse, Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects, *Int. Nano Lett.* 2 (2012) 32, <https://doi.org/10.1186/2228-5326-2-32>
208. M. Breisch, V. Grasmik, K. Loza, K. Pappert, A. Rostek, N. Ziegler, A. Ludwig, M. Heggen, M. Epple, J.C. Tiller, T.A. Schildhauer, M. Koller, C. Sengstock, “Bimetallic silver-platinum nanoparticles with combined osteo-promotive and antimicrobial activity, *Nanotechnology* (2019), <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ab172b>
209. R. Zhang, P. Lee, V.C.H. Lui, Y. Chen, X. Liu, C.N. Lok, M. To, K.W.K. Yeung, K.K. Y. Wong, Silver nanoparticles promote osteogenesis of mesenchymal stem cells and improve bone fracture healing in osteogenesis mechanism mouse model, *Nanomedicine* (2015), <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.07.016>
210. M. Kaseem, S. Fatimah, N. Nashrah, Y.G. Ko, Recent progress in surface modification of metals coated by plasma electrolytic oxidation: principle, structure, and performance, *Prog. Mater. Sci.* 100735 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2020.100735> (in press)
211. K. Rokosz, T. Hryniewicz, Ł. Dudek, Phosphate porous coatings enriched with selected elements via PEO treatment on titanium and its alloys: a review, *Materials* 13 (2020) 2468, <https://doi.org/10.3390/ma13112468>
212. Z. Gorgin Karaji, R. Hedayati, B. Pouran, I. Apachitei, A.A. Zadpoor, Effects of plasma electrolytic oxidation process on the mechanical properties of additively

- manufactured porous biomaterials, *Mater. Sci. Eng. C* 76 (2017) 406–416, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.079>
213. P. Xiu, Z. Jia, J. Lv, C. Yin, H. Cai, C. Song, H. Leng, Y. Zheng, Z. Liu, Y. Cheng, Hierarchical micropore/Nanorod apatite hybrids in-situ grown from 3-D printed macroporous Ti6Al4V implants with improved bioactivity and osseointegration, *J. Mater. Sci. Technol.* 33 (2017) 179–186, <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2016.05.013>
214. P. Joly, G.N. Duda, M. Schone, P.B. Welzel, U. Freudenberg, C. Werner, A. Petersen, Geometry-driven cell organization determines tissue growths in scaffold pores: consequences for fibronectin organization, *PLoS One* 8 (2013), e73545, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073545>
215. V. Karageorgiou, D. Kaplan, Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis, *Biomaterials.* 26 (2005) 5474–5491, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.02.002>
216. A.H. Schoen, *Infinite Periodic Minimal Surfaces Without Self-intersections*, Cambridge, MA, United States, 1970
217. E.A. Lord, A.L. Mackay, Periodic minimal surfaces of cubic symmetry, *Curr. Sci.* 85 (2003) 346–362
218. K. Leśniak-Ziołkowska, A. Kazek-Kęsik, K. Rokosz, S. Raaen, A. Stolarczyk, M. Krok-Borkowicz, E. Pamuła, M. Gołda-Cępa, M. Brzywczy-Włoch, W. Simka, Electrochemical modification of the Ti-15Mo alloy surface in solutions containing ZnO and Zn₃(PO₄)₂ particles, *Mater. Sci. Eng. C* 115 (2020) 111098, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111098>
219. O. Oleshko, I. Liubchak, Y. Husak, V. Korniienko, A. Yusupova, T. Oleshko, R. Banasiuk, M. Szkodo, I. Matros-Taranets, A. Kazek-Kęsik, W. Simka, M. Pogorielov, In vitro biological characterization of silver-doped anodic oxide coating on titanium, *Materials (Basel)* 13 (2020) 4359, <https://doi.org/10.3390/ma13194359>
220. C. Yan, L. Hao, A. Hussein, P. Young, Ti–6Al–4V triply periodic minimal surface structures for bone implants fabricated via selective laser melting, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 51 (2015) 61–73, <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.06.024>

221. Z. Fan, H. Feng, Study on selective laser melting and heat treatment of Ti-6Al-4V alloy, *Results Phys.* 10 (2018) 660–664, <https://doi.org/10.1016/j.rinp.2018.07.008>
222. X. Tan, Y. Kok, W.Q. Toh, Y.J. Tan, M. Descoins, D. Mangelinck, S.B. Tor, K. F. Leong, C.K. Chua, Revealing martensitic transformation and α/β interface evolution in electron beam melting three-dimensional-printed Ti-6Al-4V, *Sci. Rep.* 6 (2016) 26039, <https://doi.org/10.1038/srep26039>
223. B. Wysocki, P. Maj, A. Krawczynska, K. Roźniatowski, J. Zdunek, K. J. Kurzydłowski, W. Świędzowski, Microstructure and mechanical properties investigation of CP titanium processed by selective laser melting (SLM), *J. Mater. Process. Technol.* 241 (2017) 13–23, <https://doi.org/10.1016/j.jmatprotec.2016.10.022>
224. R. Havaldar, S. Pilli, B. Putti, Insights into the effects of tensile and compressive loadings on human femur bone, *Adv. Biomed. Res.* 3 (2014) 101, <https://doi.org/10.4103/2277-9175.129375>
225. S. Durdu, O.F. Deniz, I. Kutbay, M. Usta, Characterization and formation of hydroxyapatite on Ti6Al4V coated by plasma electrolytic oxidation, *J. Alloys Compd.* 551 (2013) 422–429, <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2012.11.024>
226. R.C. Barik, J.A. Wharton, R.J.K. Wood, K.R. Stokes, R.L. Jones, Corrosion, erosion and erosion–corrosion performance of plasma electrolytic oxidation (PEO) deposited Al_2O_3 coatings, *Surf. Coat. Technol.* 199 (2005) 158–167, <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2004.09.038>
227. D. Krishnamurti, The Raman spectrum of rutile, *Proc. Indian Acad. Sci. - Sect. A.* 55 (1962) 290–299, <https://doi.org/10.1007/BF03045870>
228. G.A. Tompsett, G.A. Bowmaker, R.P. Cooney, J.B. Metson, K.A. Rodgers, J. M. Seakins, The Raman spectrum of brookite, TiO_2 (Pbca, $Z = 8$), *J. Raman Spectrosc.* 26 (1995) 57–62, <https://doi.org/10.1002/jrs.1250260110>
229. V. Stengl, T.M. Grygar, J. Henych, M. Kormunda, Hydrogen peroxide route to Sn-doped titania photocatalysts, *Chem. Cent. J.* 6 (2012) 113, <https://doi.org/10.1186/1752-153X-6-113>
230. T. Ohsaka, F. Izumi, Y. Fujiki, Raman spectrum of anatase, TiO_2 , *J. Raman Spectrosc.* 7 (1978) 321–324, <https://doi.org/10.1002/jrs.1250070606>

231. I. Martina, R. Wiesinger, M. Schreiner, Micro-Raman characterisation of silver corrosion products: instrumental set up and reference, *E-Preservation Sci.* 9 (2012) 1–8
232. M.L.A. Temperini, G.I. Lacconi, O. Sala, Raman spectroscopy investigation of the silver oxide/silver electrode, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 227 (1987) 21–28, [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(87\)80062-1](https://doi.org/10.1016/0022-0728(87)80062-1)
233. O. Oleshko, V. Deineka, Y. Husak, V. Korniienko, O. Mishchenko, V. Holubnycha, M. Pisarek, J. Michalska, A. Kazek-Kęsik, A. Jakobik-Kolon, W. Simka, M. Pogorielov, Ag nanoparticle-decorated oxide coatings formed via plasma electrolytic oxidation on ZrNb alloy, *Materials (Basel)* 12 (2019) 3742, <https://doi.org/10.3390/ma12223742>
234. S. Kyrylenko, F. Warchoń, O. Oleshko, Y. Husak, A. Kazek-Kęsik, V. Korniienko, V. Deineka, M. Sowa, A. Maciej, J. Michalska, A. Jakobik-Kolon, I. Matuła, M. Basiaga, V. Hulubnycha, A. Stolarczyk, M. Pisarek, O. Mishchenko, M. Pogorielov, W. Simka, 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* 119 (2021) 111607, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111607>
235. M. Sowa, M. Parafiniuk, C.M.S. Mouzêlo, A. Kazek-Kęsik, I.S. Zhidkov, A. I. Kukhareenko, S.O. Cholakh, E.Z. Kurmaev, W. Simka, DC plasma electrolytic oxidation treatment of gum metal for dental implants, *Electrochim. Acta* 302 (2019) 10–20, <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2019.02.024>
236. H.J. Robinson, A.E. Markaki, C.A. Collier, T.W. Clyne, Cell adhesion to plasma electrolytic oxidation (PEO) titania coatings, assessed using a centrifuging technique, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 4 (2011) 2103–2112, <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.07.009>
237. E. Tamjid, A. Simchi, J.W.C. Dunlop, P. Fratzl, R. Bagheri, M. Vossoughi, Tissue growth into three-dimensional composite scaffolds with controlled micro-features and nanotopographical surfaces, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 101 (2013) 2796–2807, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34584>

238. A. Scarano, V. Perrotti, L. Artese, M. Degidi, D. Degidi, A. Piattelli, G. Iezzi, Blood vessels are concentrated within the implant surface concavities: a histologic study in rabbit tibia, *Odontology*. 102 (2014) 259–266, <https://doi.org/10.1007/s10266-013-0116-3>
239. M. Paolo, M. Santos, B. Cimatti, N. Gava, M. Riberto, E. Engel, Osteointegration of porous absorbable bone substitutes: a systematic review of the literature, *Clinics*. 72 (2017) 449–453, [https://doi.org/10.6061/clinics/2017\(07\)10](https://doi.org/10.6061/clinics/2017(07)10)
240. C.E. Tanase, M. Golozar, S.M. Best, R.A. Brooks, Cell response to plasma electrolytic oxidation surface-modified low-modulus β -type titanium alloys, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 176 (2019) 176–184, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.12.064>
241. M.J.P. Biggs, R.G. Richards, M.J. Dalby, Nanotopographical modification: a regulator of cellular function through focal adhesions, *Nanomedicine* 6 (2010) 619–633, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.01.009>
242. J.A. Sanz-Herrera, P. Moreo, J.M. García-Aznar, M. Doblare, On the effect of substrate curvature on cell mechanics, *Biomaterials*. 30 (2009) 6674–6686, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.08.053>
243. R. Rahmani, M. Antonov, L. Kollo, Y. Holovenko, and K. G. Prashanth, “Mechanical behavior of Ti6Al4V scaffolds filled with CaSiO₃ for implant applications,” *Appl. Sci.*, vol. 9, no. 18, 2019
244. C. Yan, L. Hao, A. Hussein, and P. Young, “Ti-6Al-4V triply periodic minimal surface structures for bone implants fabricated via selective laser melting,” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 51, pp. 61–73, 2015
245. A. Myakinin, et al., “In vitro evaluation of electrochemically bioactivated Ti6Al4V 3D porous scaffolds,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 121, 2021
246. M. Cuellar-Flores, et al., “Effects of alkaline treatment for fibroblastic adhesion on titanium,” *Dent. Res. J. (Isfahan)*, vol. 13, no. 6, pp. 473–477, 2016
247. Y. Luo, Y. Jiang, J. Zhu, J. Tu, and S. Jiao, “Surface treatment functionalization of sodium hydroxide onto 3D printed porous Ti6Al4V for improved biological activities and osteogenic potencies,” *J. Mater. Res. Technol.*, vol. 9, no. 6, pp. 13661–13670, 2020