

УДК 616.314-089.843-091.8]:615.465:620.3-022.513.2(047.31)

УКПП

№ 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.ф.-м.н., професор

А.М. Черноус

ЗВІТ

ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

**БІОЛОГІЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ ПЛАЗМОВОЇ
ЕЛЕКТРООКСИДАЦІЇ ТА ЗОЛЬ-ГЕЛЬ ДЕПОЗИЦІЇ ДЛЯ СТВОРЕННЯ
ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ ПОВЕРХНІ ІМПЛАНТІВ**

(проміжний)

Керівник НДР,
д.мед.н., професор

_____ М.В. Погорелов

Суми – 2019

Рукопис закінчено 6 грудня 2019 р.

Результати роботи розглянуто науковою радою, протокол № _____ від _____ р.

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, Заступник директора з наукової роботи МІ СумДУ 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)
Студент	()	І. В. Любчак (розділ 3)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 62 с., 6 табл., 17 рис., 88 джерел.

ЗОЛЬ-ГЕЛЬ ДЕПОЗИЦІЯ, МЕТАЛЕВІ ІМПЛАНТАТИ, НАНОЧАСТОЧКИ ПЛАЗМОВА ЕЛЕКТРООКСИДАЦІЯ

Об'єкт дослідження – процеси остеоінтеграція металевих імплантатів.

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

Для досягнення поставленої мети були визначені наступні завдання:

1. Визначення режимів плазмової електрооксидациі та робочих розчинів для отримання функціональної поверхні імплантатів.

2. Використання золь-гель методу для осадження нанокompозитів HA, TiO₂-HA та ZnO-HA на поверхні металевих сплавів.

3. Осадження HA, TiO₂-HA та ZnO-HA золь-гель методом на поверхні сплавів, модифікованих методом плазмової електрооксидациі.

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

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

6. Узагальнення результатів дослідження з точки зору можливості створення імплантатів з покращеними остеоінтеграційними властивостями

Методи дослідження:

- визначення режимів та робочих розчинів для проведення електрооксидациі поверхні металевих сплавів;

- осадження нанокompозитів HA, TiO₂-HA та ZnO-HA на поверхні металевих сплавів;

- осадження HA, TiO₂-HA та ZnO-HA золь-гель методом на поверхні сплавів, модифікованих методом плазмової електрооксидациі.

В результаті виконання роботи отримані регламенти проведення електрооксидації поверхні та золь-гель депозиції з використанням наночасточок TiO_2 , ZnO . Описані залежності процесів формування покриття від параметрів розчину, режимів та часу проведення процесу. Визначені особливості розподілу наночасточок на поверхні імплантатів та їх фізико-хімічні характеристики.

ЗМІСТ

	С.
Перелік скорочень, умовних познач, одиниць і термінів	6
ВСТУП	7
1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	10
2 ХІМІЧНА ТА СТРУКТУРНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПІСКОСТРУМИННОЇ ПОВЕРХНІ ЗУБНИХ ІМПЛАНТІВ З ВИКОРИСТАННЯМ ZrO_2 РІЗНОЇ ФОРМИ	15
2.1 Матеріали і методи	15
2.1.1 Матеріали	15
2.1.2 Процес піскоструминної обробки	15
2.1.3 Хімічний склад сплаву	16
2.1.4 Оцінка поверхневої ерозії	16
2.1.5 Оптична мікроскопія	16
2.1.6 Скануюча електронна мікроскопія	16
2.1.7 Вимірювання шорсткості поверхні	17
2.1.8 Вимірювання контактного кута	17
2.1.9 Експеримент на культурах клітин	17
2.1.10 Статистична обробка даних	18
2.2 Результати	18
2.2.1 Оптична мікроскопія	18
2.2.2 Хімічний склад поверхні після обробки	20
2.2.3 Скануюча електронна мікроскопія	20
2.2.4 Контактний кут та шорсткість	20
2.2.5 Експеримент на культурах клітин	23
2.3 Обговорення	24
3 ВІДПОВІДЬ КЛІТИН І ТКАНИН НА НАНОТЕКСТУРОВАНІ ІМПЛАНТИ Ti6Al4V ТА Zr З ВИКОРИСТАННЯМ ВИСОКОШВИДКІСНИХ ФЕМТОСЕКУНДНИХ ПЕРІОДИЧНИХ ЛАЗЕРНИХ ПОВЕРХНЕВИХ СТРУКТУР	26
3.1 Матеріали та методи	26

3.1.1	Матеріали	26
3.1.2	Налаштування лазера та текстурування поверхні LIPSS	26
3.1.3	Характеристика поверхні зразків, оброблених HR-LIPSS	28
3.1.4	Вимірювання контактного кута	29
3.1.5	Експеримент на культурах клітин	29
3.1.6	Життєздатність клітин	29
3.1.7	Модель на тваринах	30
3.1.8	Оцінка результатів <i>in vivo</i> з використанням скануючої електронної мікроскопії	31
3.1.9	Статистична обробка даних	31
3.2	Результати	32
3.2.1	Морфологічний аналіз	32
3.2.2	Поверхневий хімічний аналіз за допомогою XPS та визначення гідрофільності	35
3.2.3	Експеримент на культурах клітин	38
3.2.4	Модель на тваринах	38
3.3	Обговорення	40
4	КЛІТИННА ВІДПОВІДЬ ОСТЕОБЛАСТІВ НА LIPSS-МОДИФІКОВАНІ ТІМПЛАНТИ	44
4.1	Матеріали та методи	44
4.1.1	Матеріали	44
4.1.2	Методи	44
4.1.3	Експеримент на культурах клітин	45
4.1.4	Мікробіологічне дослідження	46
4.2	Результати	46
4.2.1	Морфологія поверхні	46
4.2.2	Експеримент на культурах клітин	47
4.2.3	Мікробіологічне дослідження	50
	ВИСНОВКИ	52
	ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ	54

ПЕРЕІК 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

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 проектується через насадку з великою швидкістю зі стисненим повітрям. Залежно від розміру, характеристик керамічних частинок та режимів їх проекції 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 імплантів. 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 крупою 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 МС3Т3 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 Ті посилює полімеризацію білка, адгезію остеобластів або остеointegraцію [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 "відчути" 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 імплантатів.

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.

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 ($Zr-2,5 \text{ wt.}\% \text{ Nb}$), що був отриманий із Остеоплант (OsteoplantR&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 ImageJau (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 профілометра Mahr (MahrGmbH, Göttingen, Німеччина). До вимірювання усі зразки були обмиті 96% етанолом в ультразвуковій ванні Emmi-20HC (EMAG, Mörfelden-Walldorf, Німеччина). Довжина вимірювання складала 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 та 1,0 нг/мл bFGF було додано до кожної лунки, а потім інкубувалося при 37 °С 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 °С 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 першій, 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 Стюдента 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 пікоструминної 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, МПам ^{1/2}	8.0-10.0	–
Твердість Моха	–	7.5-8.5

Оптична мікроскопія частинок ZrO показує (рис. 2.1), що абразив на основі $T-ZrO_2$, має закруглену форму з малими гострими виступами по всій поверхні, а частинки $C-ZrO_2$ мають гострі краї та нерівну поверхню. На основі механічних та морфологічних параметрів вони можуть представляти різні ефекти для поверхні імплантів в результаті пікоструминної обробки.

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 $T-ZrO_2$ 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 $C-ZrO_2$, ми виявили протилежну залежність – зростання тиску призводить до зростання розподілу частинок від 14% до 29% (рис. 2.2 в, г).

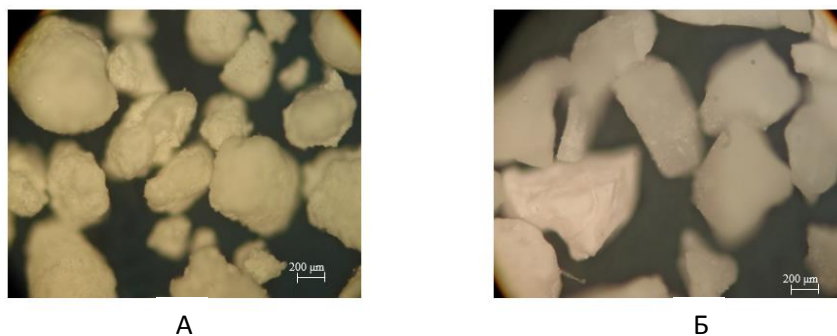
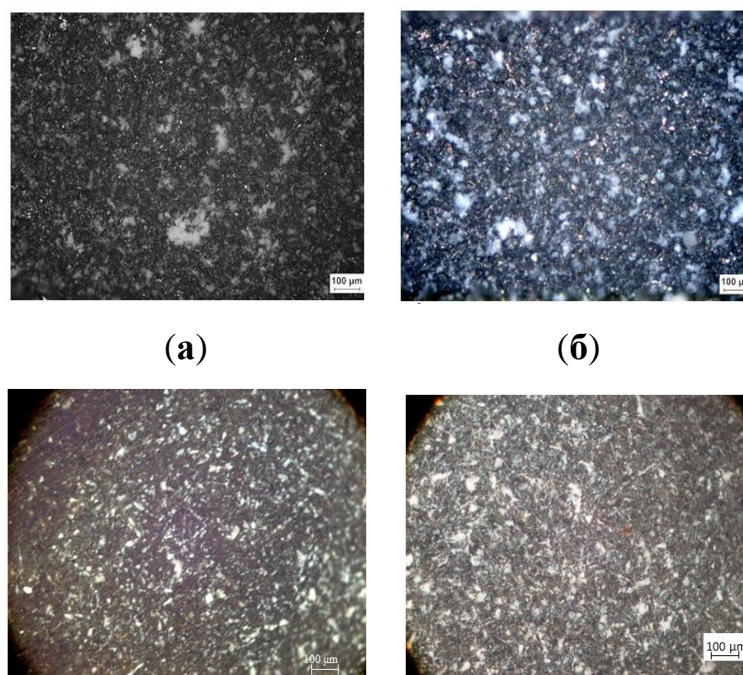


Рисунок 2.1—Зображення оптичної мікроскопії $T-ZrO_2$ (А) та $C-ZrO_2$ (Б) частинок, що використовувалися для піскоструминної обробки. $\times 1000$



(в)

(г)

Рисунок 2.2— Зображення оптичної мікроскопії піскоструминно обробленої поверхні з використанням частинок Т–ZrO₂ ((а) 4 атм.; (б) 6 атм.) та С–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 Т–ZrO₂ призводить до зростання масової частки кисню до 23%, у порівнянні з С–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 Т–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).

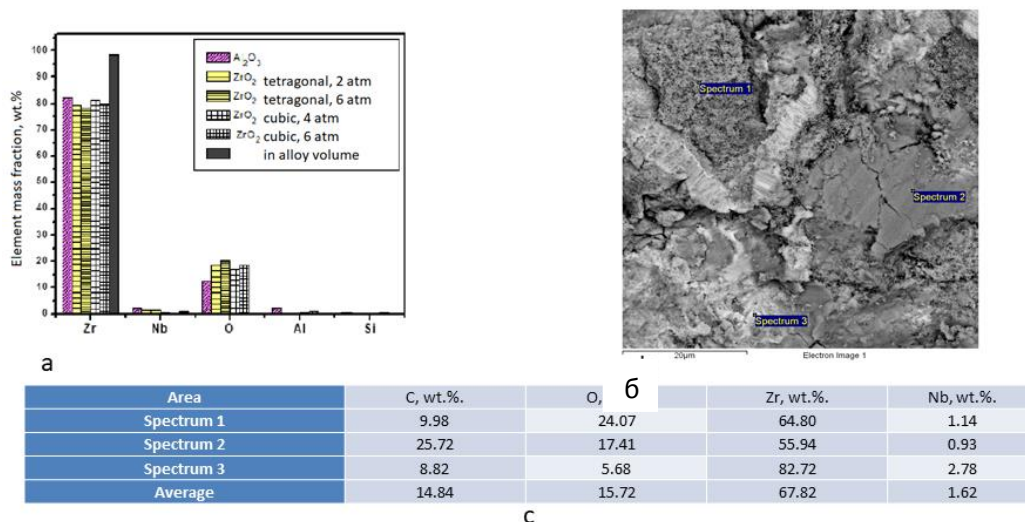


Рисунок 2.3 — Хімічний склад поверхнього шару сплаву в залежності від типу абразиву та режиму обробки. (а) — Рентгенофлуоресцентний аналіз. (б) — Таблиця хімічного аналізу областей поверхні зразка, обробленого Т–ZrO₂ при тиску 6 атм. та (в) — EDX обраних областей (із б)

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–ZrO₂, 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–ZrO₂ на поверхню зразка схожий із ефектом абразиву Т–ZrO₂ (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).

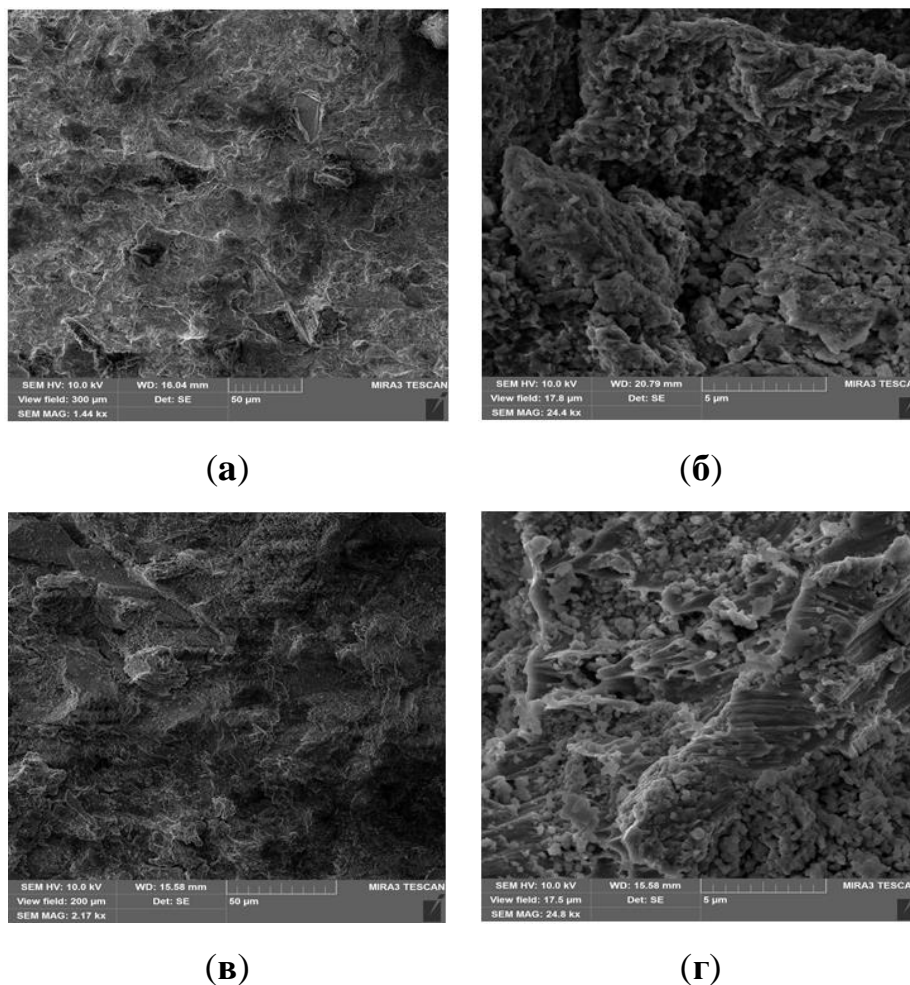


Рисунок 2.4 — Скануюча електронна мікроскопія зразків після пікоструминної обробки з використанням $T-ZrO_2$ (а,в) та порошку $T-ZrO_2$ (б,г) в різних режимах: (а,б) — 5 с із тиском у 4 атм, (в,г) — 5 с із тиском у 6 атм

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 пікоструминної обробки, виявлено не було. Частинки $C-ZrO_2$ дали значно меншу шорсткість у порівнянні з частинками $T-ZrO_2$ (таб. 2.2).

КК полірованої поверхні склав $92,17^\circ \pm 2,78^\circ$ та значно знизився у обох $T-ZrO_2$ ($76,83^\circ \pm 2,63^\circ$ та $82,13^\circ \pm 5,10^\circ$) та $C-ZrO_2$, обробленими при 4 атм. ($81,17^\circ \pm 4,66^\circ$). Порошок кубічного ZrO_2 , 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 ZrO_2 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 Т–ZrO₂ показує значно більшу життєздатність клітин, ніж полірована ($p \leq 0.001$) та оброблена частинками С–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 піскоструминно 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 Т–ZrO₂. Необхідно відмітити, що на 7 день остеобласти проліферували набагато краще зі значною різницею ($p \leq 0.01$) на Т–ZrO₂ у порівнянні з С–ZrO₂ і без різниці між зразками, що були оброблені при 4 та 5 атм.

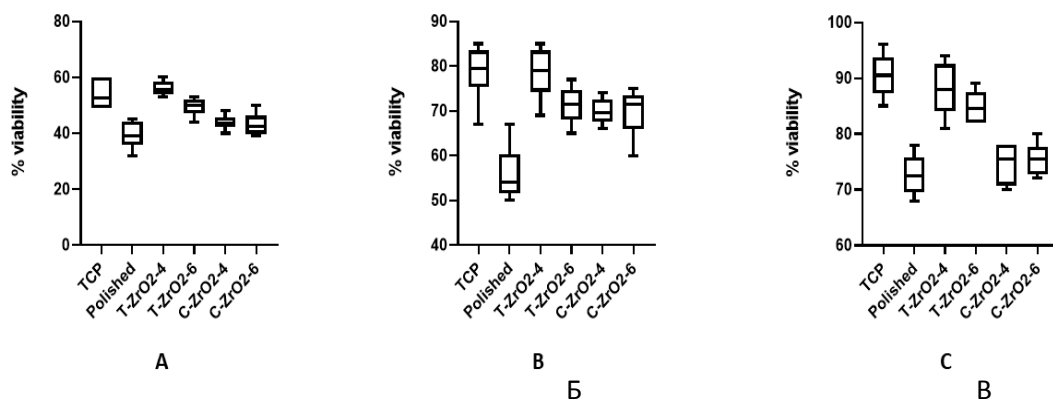


Рисунок 2.5 — Тест на життєздатність клітин людських остеобластів на різних поверхнях у день 1 (А), 3 (Б) та 7 (В); $N=3$

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 імпланта без росту сполучної тканини на поверхні кістки/імпланту називається остеоінтеграцією [64]. Цей процес починається безпосередньо після імплантації починаючи з абсорбції на поверхні імпланта 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.

3 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 $15 \text{ мм}^2/\text{с}$ [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.

3.2 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

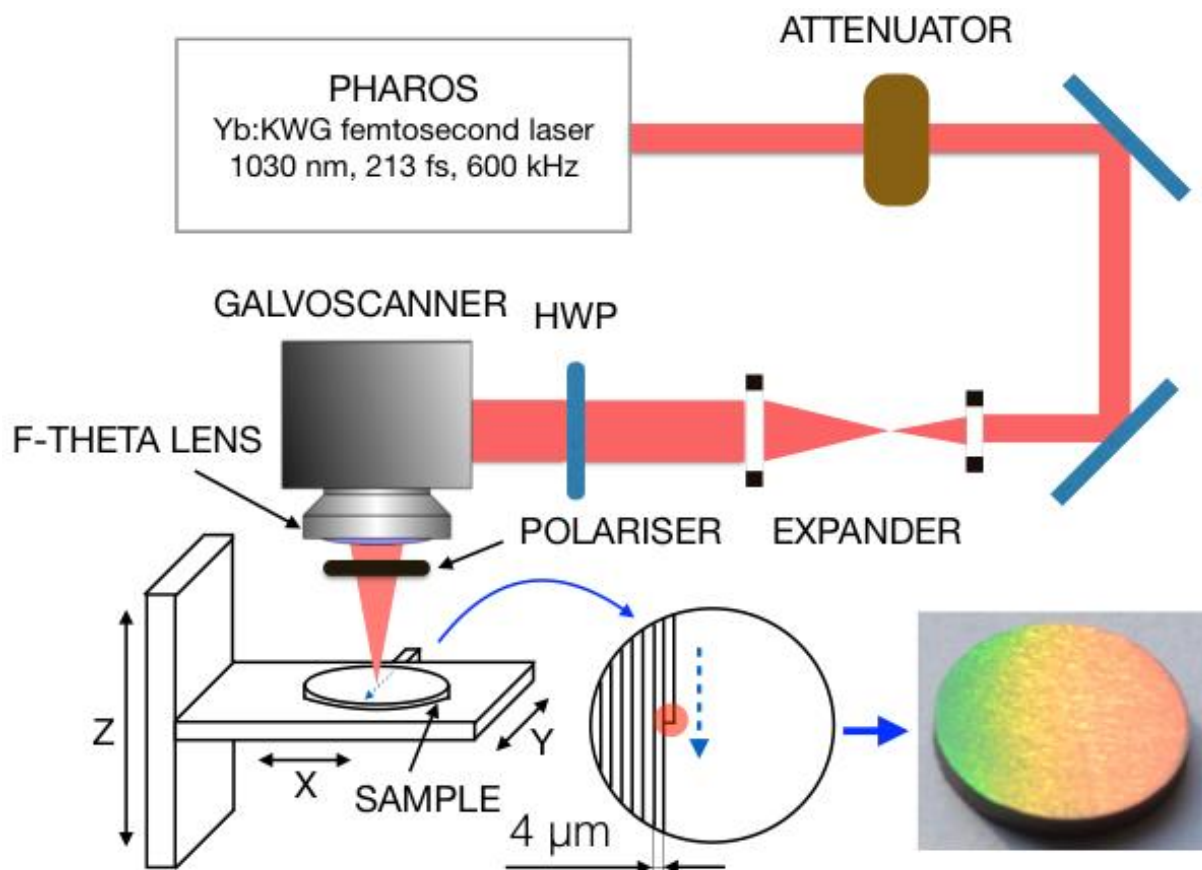


Рисунок 3.1 — Налаштування лазера

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 KRATOS 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-глютаміну (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 матрацаї 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 °C, 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.

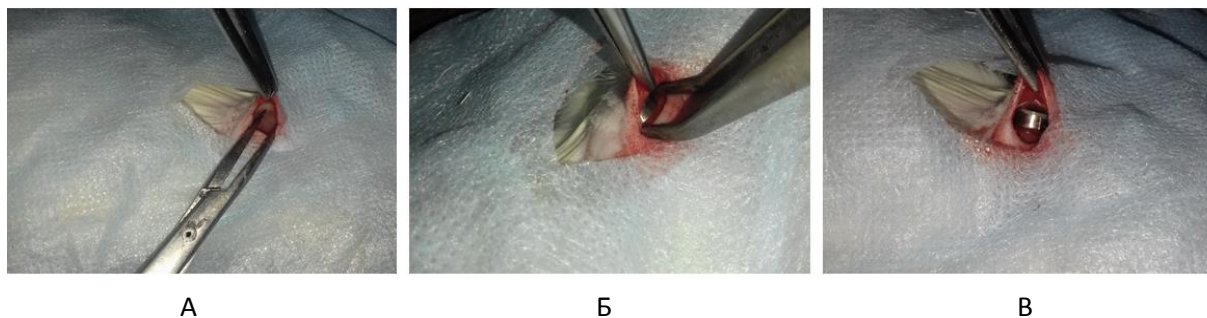


Рисунок 3.2 — Процедура *in vivo* для імплантації диска Ti і Zr. А - утворення підшкірної кишені, Б - процедура імплантації та В - положення металевого диска після імплантації.

3.1.8 Оцінка результатів *in vivo* 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

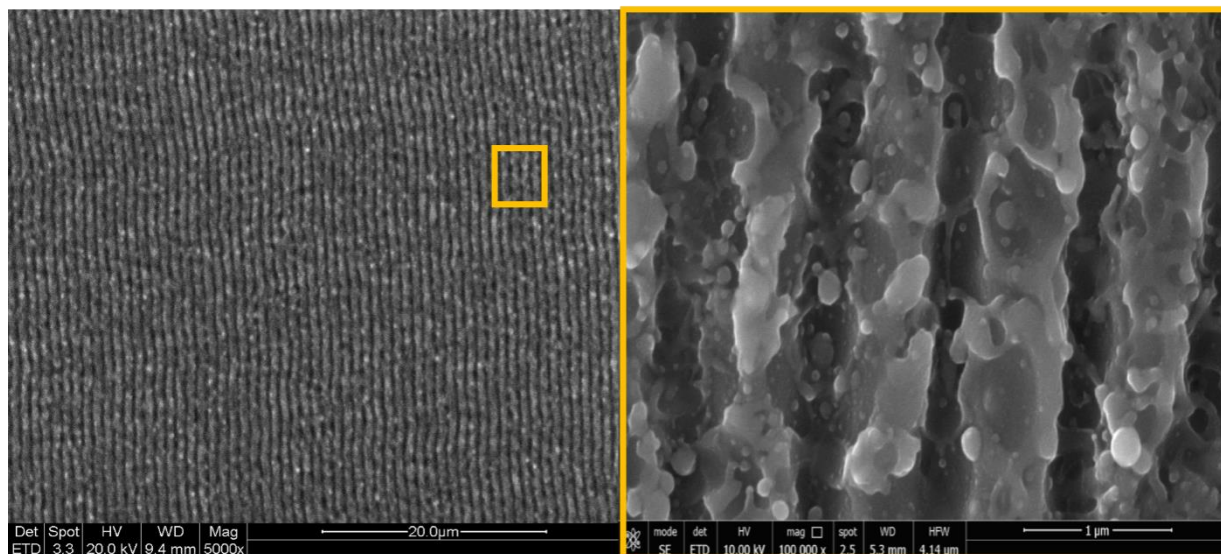
Морфологія HR-LIPSS щодо чистого сплаву Zr та Ti була досліджена з використанням SEM. Зображення (рис. 3) показують, що наноструктури були успішно отримані на всіх оброблених ділянках і вони виглядають однорідно розподіленими та регулярними. На чистому сплаві Zr і Ti немає біфуркацій, хоча очевидні деякі 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)

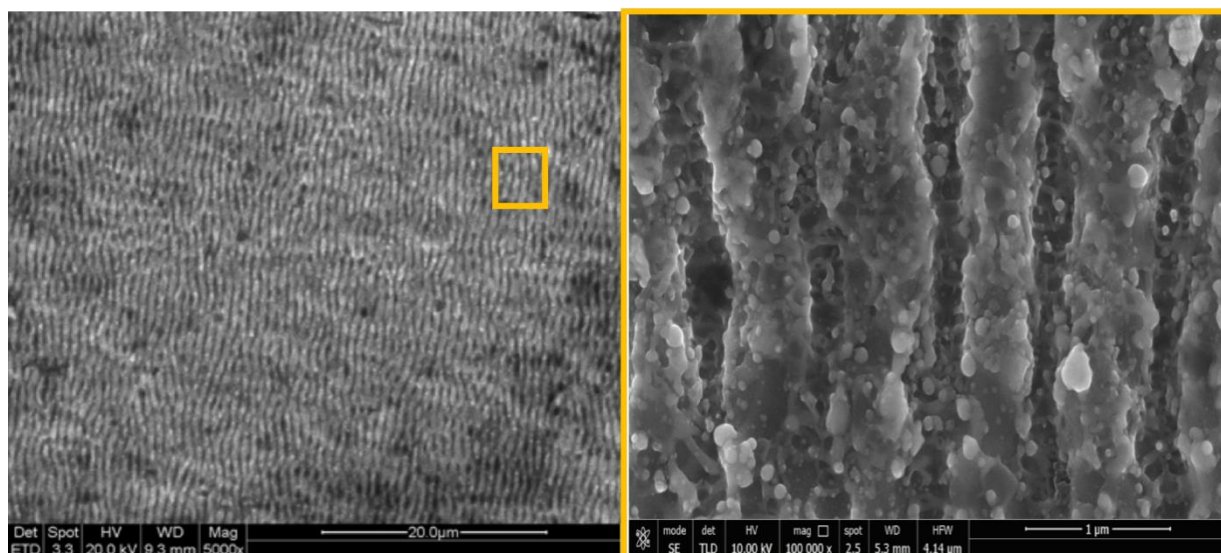


Рисунок 3.3 — Модифіковані поверхні Ti-6Al-4V (а) та Zr (б) періодичними поверхневими структурами (LIPSS)

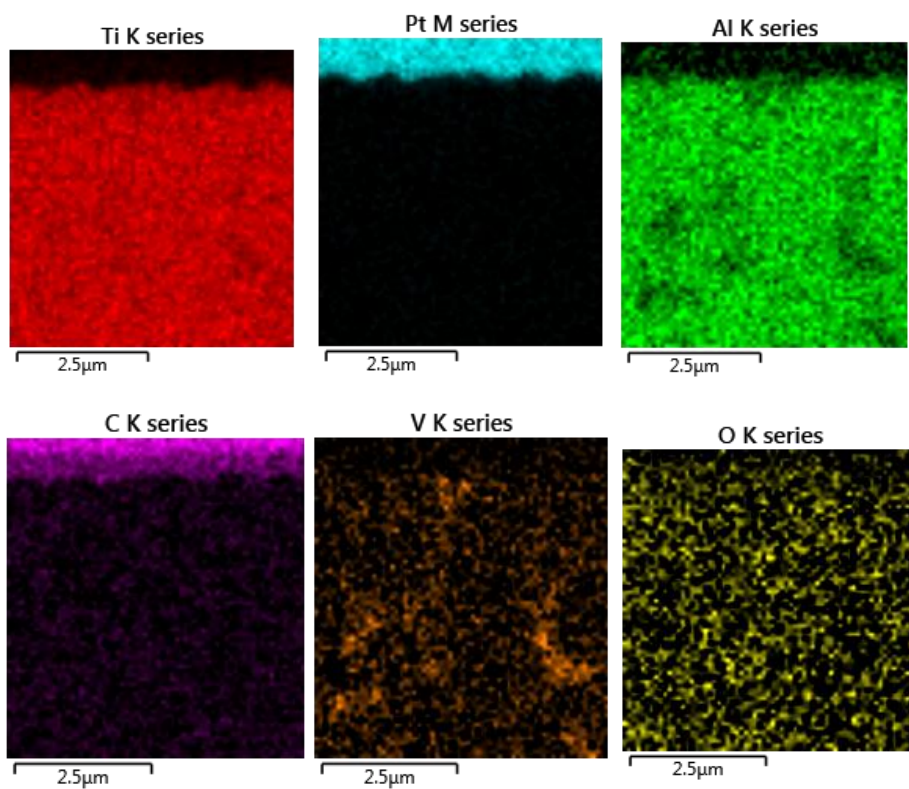
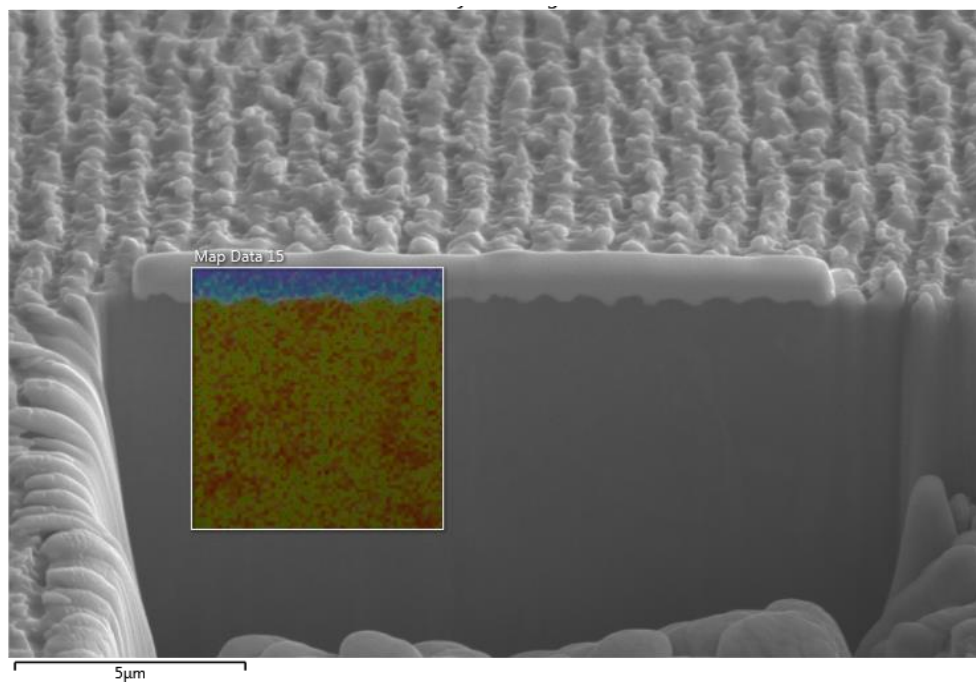


Рисунок 3.4 — SEM-зображення поперечного перерізу FIB із вкладеним EDS-сплавом Ti, модифікованим HR-LIPSS

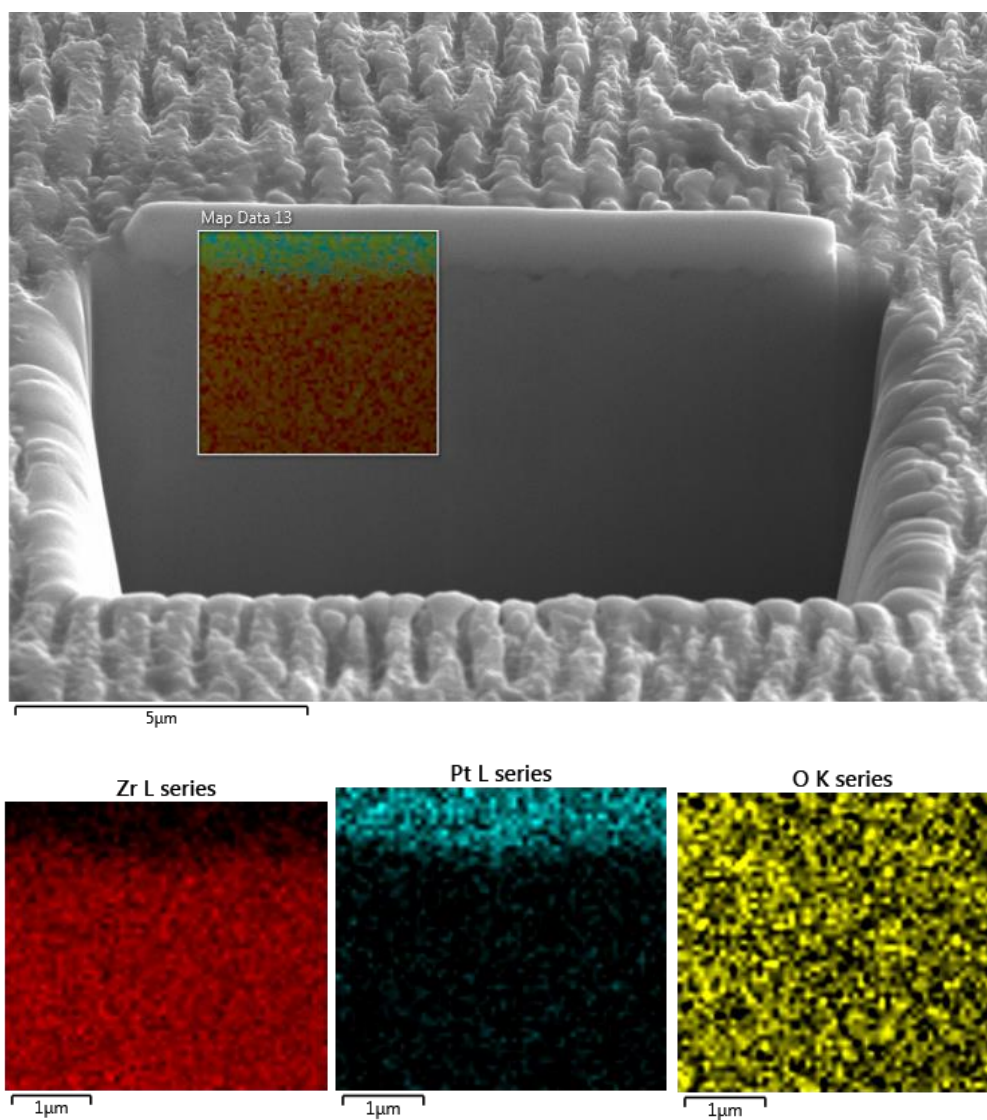


Рисунок 3.5 — SEM-зображення поперечного перерізу FIB з вставкою EDS Zr, модифікованої HR-LIPSS

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.

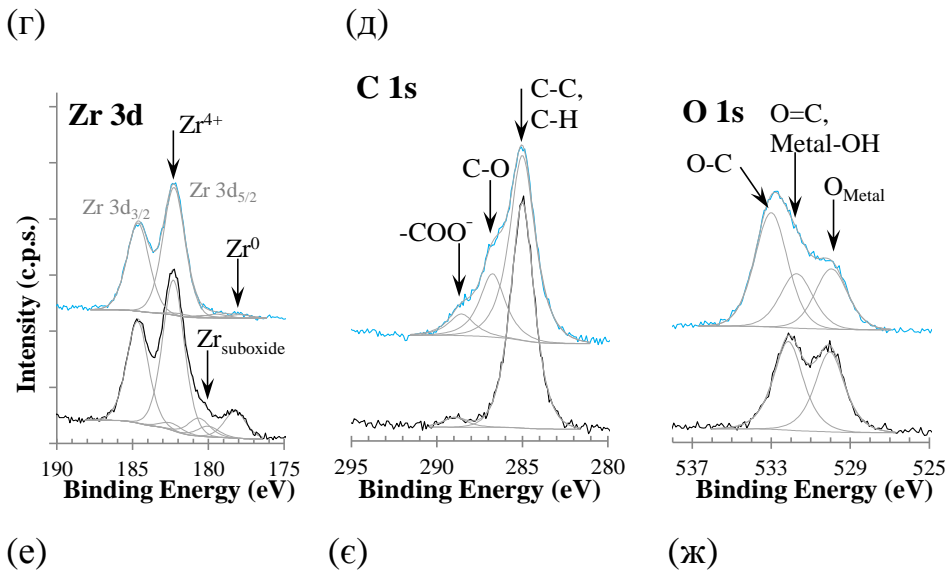
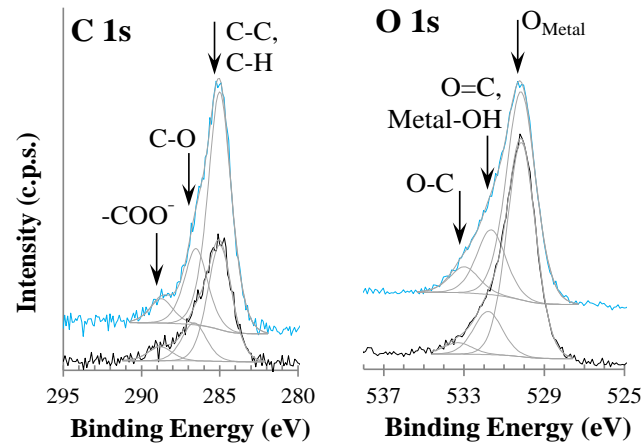
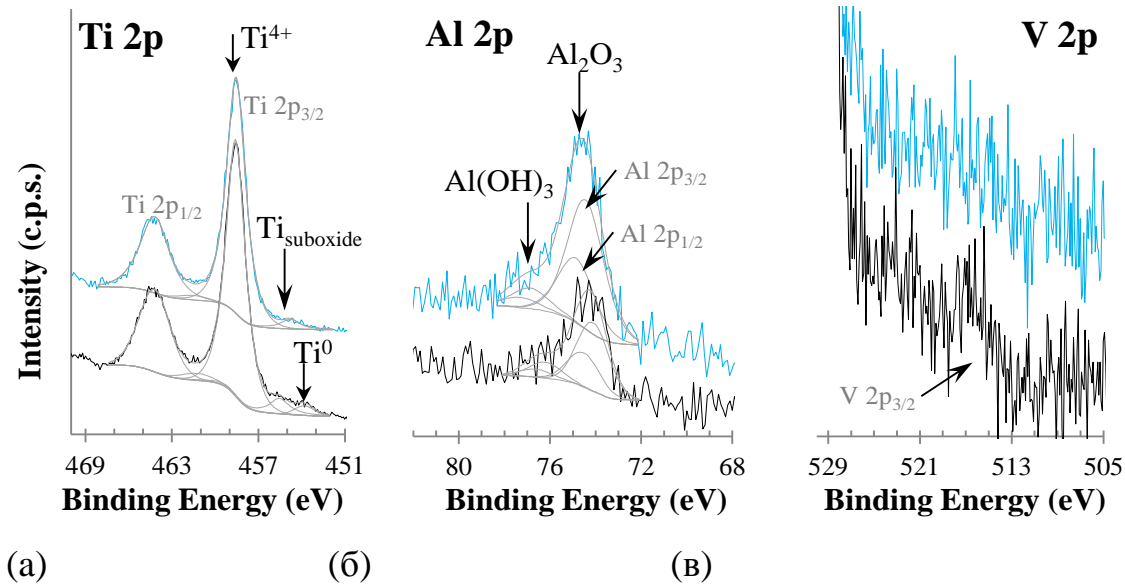


Рисунок 3.6 — Области XPS: Ti-6Al-4V (а-д); ічистий Zr (е-ж). Вгорі (блакитний спектр): оброблена поверхня лазером; дно (чорний спектр): необроблена поверхня

Поверхні складаються, головним чином, з оксидів металів та гідроксидів, зокрема TiO_2 та невеликої кількості $\text{Al}_3 + (\text{Al}_2\text{O}_3 \text{ та } \text{Al}(\text{OH})_3)$ у сплаві Ti та ZrO_2 у зразку Zr . Ванадій знаходиться на хвості області $\text{O } 1s$ (мал. 6 (в)) і ледве виявляється: нечітко визначений пік, близько ~ 517 eV, призначається компоненту V_2O_5 $\text{V } 2p_{3/2}$.

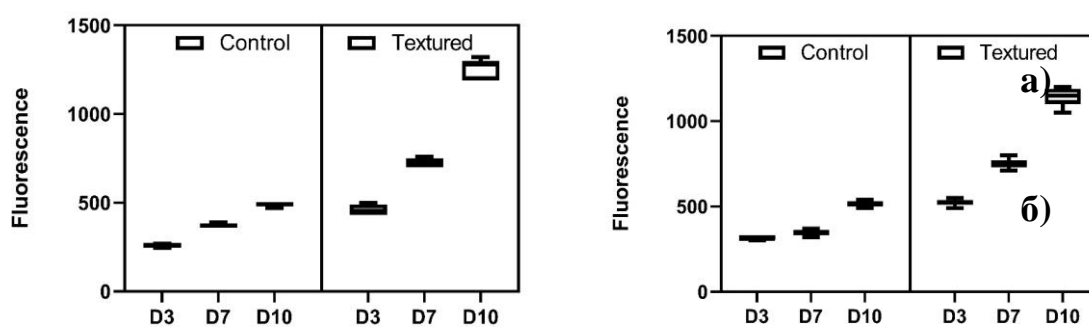
У сплаві Ti основний дублет в області $\text{Ti } 2p$ (рис. 6 (а)) присвоюється TiO_2 , з $\text{Ti } 2p_{3/2}$, орієнтованим на рівні $458,6 \pm 0,1$ eV; в необробленій поверхні при менших енергіях зв'язку (BE) піки $\text{Ti } 2p_{3/2}$, орієнтовані на 453,8 і 455,5 eV, призначаються субоксидам TiO і титану на межі розділу метал/оксид відповідно; після обробки TiO більше не виявляється і відносна кількість Ti субоксидів зменшується. $\text{Al } 2p$ (мал. 6 (б)) складається з 2 дублетів, піки $\text{Al } 2p_{3/2}$ з центром $74,1 \pm 0,2$ eV та $76,2 \pm 0,4$ eV відносяться відповідно до Al_2O_3 та $\text{Al}(\text{OH})_3$ або оксигідроксидів. $\text{C } 1s$ (рис. 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 $\text{C } 1s$ з центром 285, $286,6 \pm 0,1$ та $288,8 \pm 0,1$ eV відповідно. На малюнку 6 (д), $\text{O } 1s$ 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 $\text{Zr } 3d$ необробленого зразка була оснащена 3 дублетами (рис. 6 (е)), причому $\text{Zr } 3d / 2$ відцентровано у $178,2 \pm 0,2$, $180,0 \pm 0,3$ та $182,3 \pm 0,1$ 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 $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$, на поверхні чистого Zr виявляються такі ж види вуглецевих сполук (рис. 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).



a)

б)

Рисунок 3.7 — Життєздатність клітин HDFa 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 металевією 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. Різниці 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.

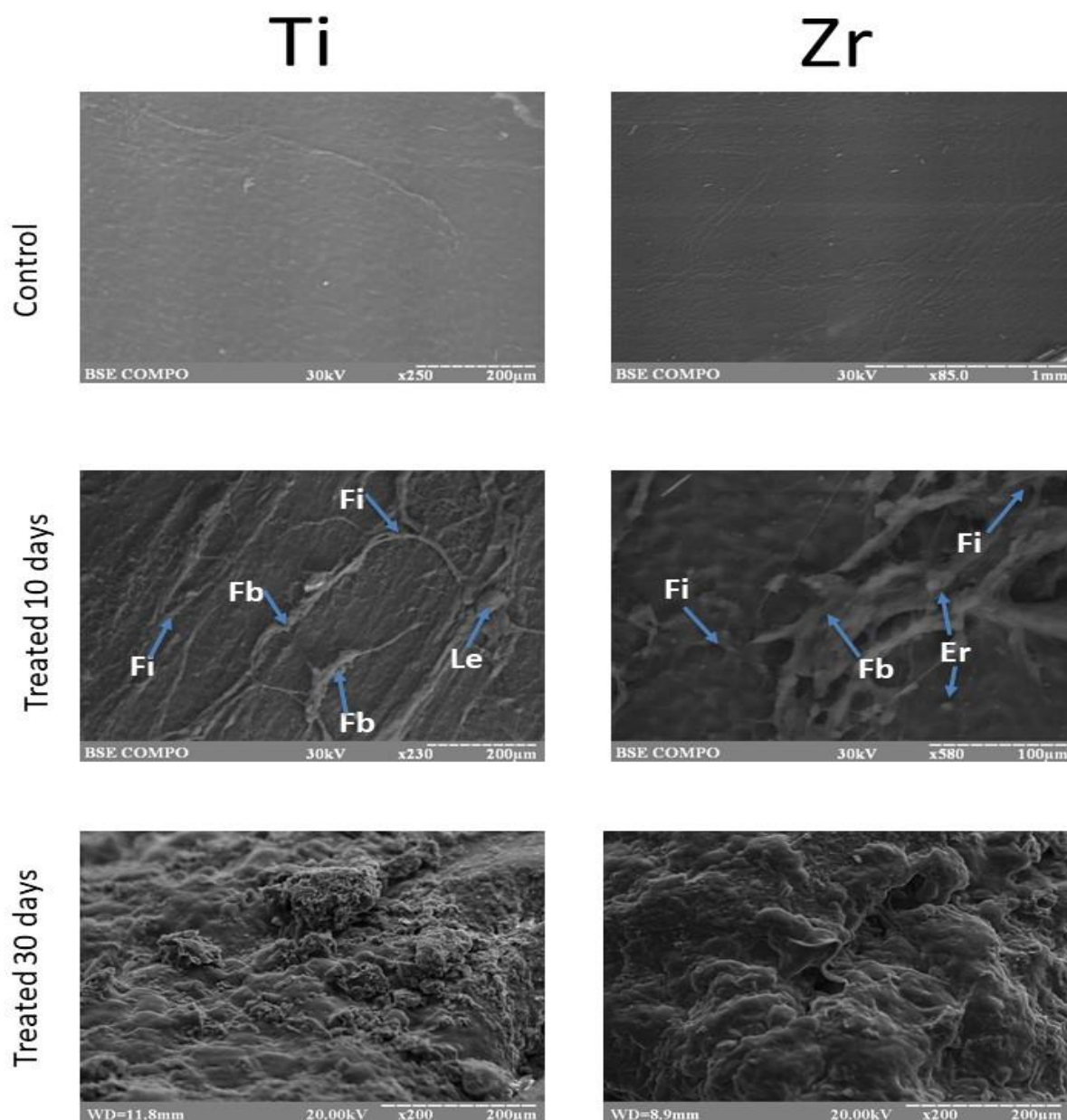


Рисунок 3.7 — Поверхня ТітаиZr сплавів немодифікованих та модифікованих після 10 та 30 днів підшкірної імплантації. Поверхні модифікованих імплантів були вкриті розвинутою мережею сполучної тканини (Fi). Над волокнами ми можемо спостерігати еритроцити (Er), лейкоцити (Le) та фібробласти (Fb)

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 вистотою 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 мм 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 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 37⁰С 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 амфотерицинуВ, 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, резаурин 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 37⁰С 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

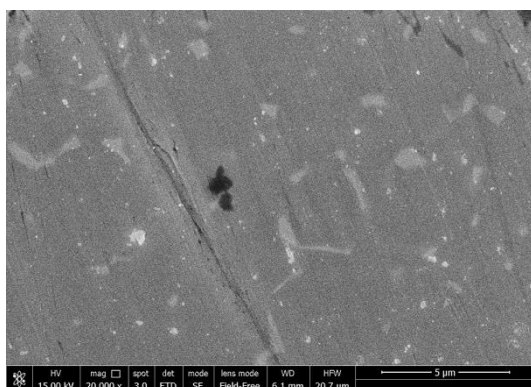
Адгезивні властивості дисків сплавів, що були оброблені різноманітними методами, було вичено на культурах Грам-позитивних бактерій (*S. aureus*, штамм В 918). Бактерії вирощували у поживному агарі при температурі 37 °С протягом 24 годин, потім їх було суспендовано у фізіологічному розчині (0.9 %, w/v NaCl) 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 GraphPad Prism 8.0, та однобічне ANOVA з декількома порівняннями. Статистична значимість була оцінена як 95% ($p < 0.05$).

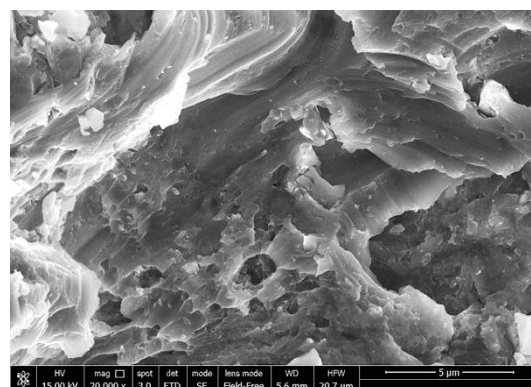
4.2 Результати

4.2.1 Морфологія поверхні

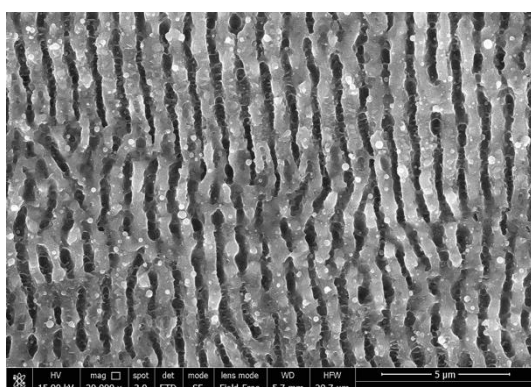
Морфологія отриманих структур на поверхні імплантів була оцінена за допомогою скануючої електронної мікроскопії (рис. 4.1).



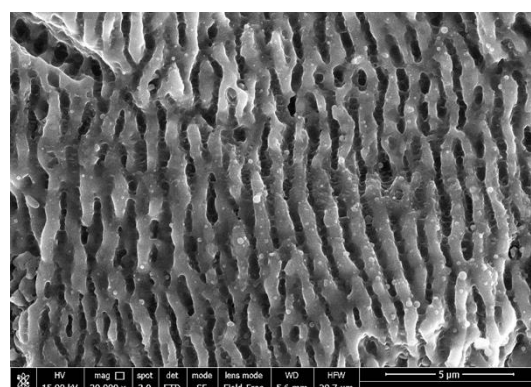
NT-Polished



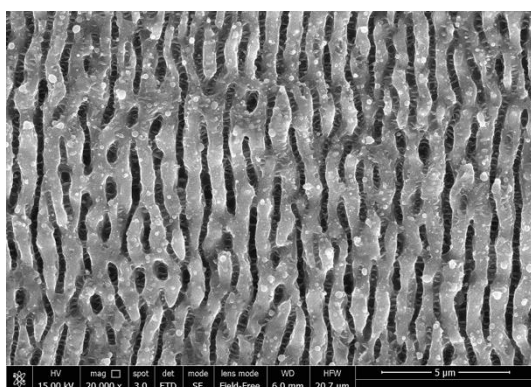
NT-SB



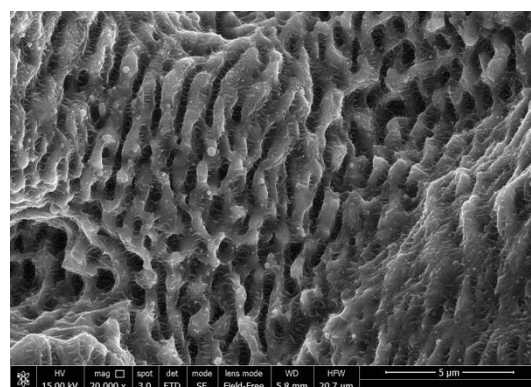
LIPSS-Text1-Polished



LIPSS-Text1-SB



LIPSS-Text2-Polished



LIPSS-Text2-SB

Рисунок 4.1 — SEM фотографії(20000x) поверхневої 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, непросто, 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 абатованих 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

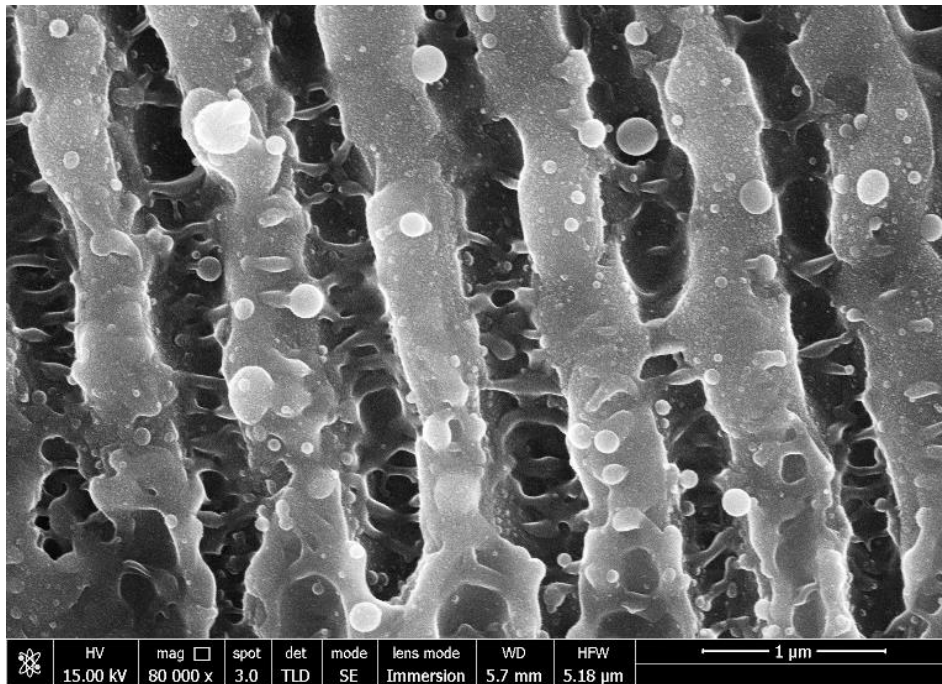


Рисунок 4.2 — Зображення отриманих LIPSS у великому масштабі. HSFL наявні у долинах, а наночастинки утворюються при ре моделюванні поверхні та затримуються на підвищеннях

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* ($p \leq 0,0001$).

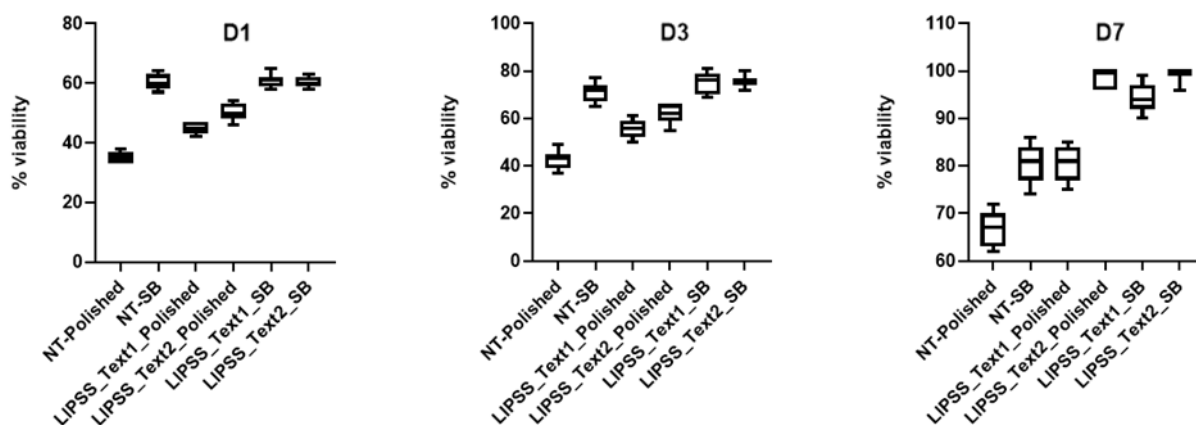


Рисунок 4.3 — Клітинна життєздатність на 1, 3 та 7 дні після засівання остеобластів на необробленій та *LIPSS*-модифікованій *Ti* поверхні

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.

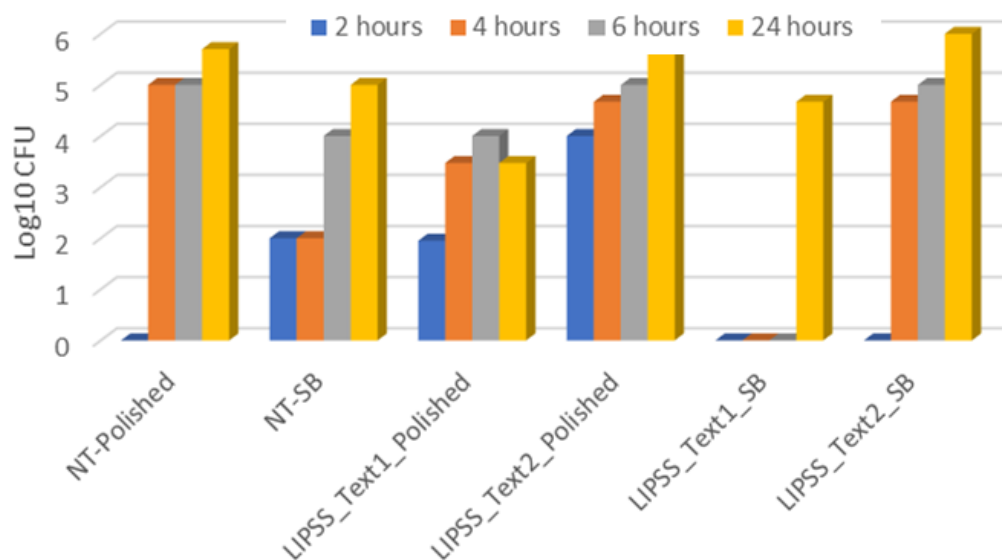


Рисунок 4.4 — Кількість бактеріальних клітин (\log_{10} КУО), адгезованих до поверхні імплантів у різні інтервали часу під час ко-культивування

ВИСНОВКИ

1. Отримані результати демонструють потенціал використання гранулярних порошоків, 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-наноstrukturованих 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 osteointegraцію 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.

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. Gnilitzkyi, 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. Gnilitzkyi, 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. Gnilitzkyi, 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, Yaghsezian 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, Yunfeng Rui, 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. Ömer İlday, “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 laser nano-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.; Ferreira, 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 Electroslag 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. Gnilytskyi, 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. *DentMater*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 alloyimplants. *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 andrandomnanotopographies. *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 extracel-lular matrix deposition. *Biomaterials* 2010; 31: 3307–16
80. Domanski M, Luttge R, Lamers E, Walboomers XF, WinnubstL,Jansen JA, Gardeniers JGE. Submicron-patterning of bulk titaniumby nanoimprint lithography and reactive ion etching. *Nanotechnol-ogy* 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, HuanGuo, 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