



POLITECHNIKA ŚLĄSKA
WYDZIAŁ INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ

Mgr inż. Ada ORŁOWSKA

ROZPRAWA DOKTORSKA

***Funkcjonalizacja powierzchni wysokoporowatego implantu
międzykręgowego wytworzonego metodą przyrostową***

Promotor: dr hab. inż. Janusz SZEWCZENKO, prof. PŚ

Promotor pomocniczy: dr inż. Wojciech KAJZER

ZABRZE 2024

Podziękowania

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania mojemu promotorowi **dr hab. inż. Januszowi Szewczenko, prof. PŚ** za cierpliwość, nieocenioną pomoc udzieloną w trakcie przygotowania pracy, wsparcie merytoryczne oraz wskazywanie drzewi, a czasem okna, przez które mogłam wkroczyć w świat nauki

Dziękuję pracownikom i doktorantom Katedry Biomateriałów i Inżynierii Wyrobów Medycznych wydziału Inżynierii Biomedycznej Politechniki Śląskiej za pomoc w prowadzeniu badań, poszerzanie horyzontów oraz wymianę doświadczeń. Szczególne podziękowania kieruje do mojego promotora pomocniczego **dr inż. Wojciecha Kajzera**, za cenne uwagi i wsparcie szczególnie w ostatniej fazie przygotowania pracy

Dziękuję **prof. dr hab. inż. Wojciechowi Simce** za wsparcie merytoryczne oraz cenne rady dotyczące przygotowania publikacji naukowych

Chcę wyrazić głęboką wdzięczność osobom, dzięki którym zakres prowadzonych badań mógł być tak szeroki. W szczególności chciałabym podziękować **dr hab. inż. Katarzynie Nowińskiej** z Politechniki Śląskiej, **dr hab. Katarzynie Jelonek**, **dr hab. Joannie Jaworskiej** oraz **dr inż. Marcinowi Godzierzowi** z CWPW-PAN w Zabrze oraz **dr inż. Michałowi Kamińskiemu** z KIT IPS w Eggenstein-Leopoldshafen

Serdeczne podziękowania dla firmy **ChM Sp. z o.o.** za wydrukowanie próbek wykorzystywanych w pracy

Dziękuję rodzinie, szczególnie **mgr inż. Halinie Walentyńskiej** oraz **mgr inż. Jolancie Marzec-Walentyńskiej** za możliwość bycia inżynierką w trzecim pokoleniu oraz **dr hab. inż. Ryszardowi Walentyńskiemu** za inspirację do podjęcia kariery akademickiej

Największe podziękowania kieruje do **Eli, Wojtka i Sławka**.
To dla was chcę, by dzięki nauce świat stawał się lepszy

Streszczenie

Wdrażanie do zastosowań medycznych wyrobów produkowanych przy użyciu technologii przyrostowych stwarza konieczność opracowywania metod modyfikacji powierzchni adekwatnych do ich specyfiki. Wysokoporowate implanty kręgosłupowe z Ti6Al4V zapewniają lepsze efekty terapeutyczne dzięki możliwości trwałego połączenia ich z kością. Konieczne jest jednak opracowanie metod modyfikacji powierzchniowych w celu poprawy ich interakcji z organizmem.

Celem pracy było opracowanie hybrydowej metody modyfikacji powierzchni wysokoporowatego implantu międzykręgowego, która pozwoli na poprawę funkcjonalności implantu w kontekście jego krótko- i długoterminowej interakcji z organizmem. Praca obejmuje: opracowanie postaci próbek, które odzwierciedlają specyfikę wysokoporowatych implantów międzykręgowych, weryfikację ich własności po wytworzeniu technologią SLM oraz opracowanie modyfikacji z wykorzystaniem metod elektrochemicznych i biodegradowalnych powłok polimerowych.

Postać próbek opracowano zgodnie z kryteriami określonymi na podstawie przeglądu literatury. Zaprojektowany implant charakteryzował się otwartą strukturą oraz wysoką porowatością przy równoczesnym zapewnieniu możliwości łatwego manipulowania podczas implantacji oraz wytrzymałości mechanicznej adekwatnej do planowanego zastosowania.

Ocena wstępna wytworzonych próbek obejmowała badania mające na celu określenie dokładności odwzorowania zaprojektowanego implantu oraz jego podstawowych parametrów takich jak porowatość rzeczywista, wytrzymałość mechaniczna i struktura materiału. Po pozytywnej ocenie próbki poddano modyfikacjom elektrochemicznym z wykorzystaniem utleniania anodowego (UA) i plazmowego utleniania elektrolitycznego (PEO).

Modyfikacje elektrochemiczne miały na celu wytworzenie na powierzchni implantu stabilnej warstwy tlenkowej. Modyfikowane implanty oceniono pod względem jednorodności, topografii i składu chemicznego powierzchni, zwilżalności oraz własności korozyjnych i degradacji w symulowanych warunkach tkankowych. Po analizie wyników do dalszych modyfikacji wytypowano próbki po PEO, które charakteryzowały się hierarchiczną topografią powierzchni, która w procesie modyfikacji została wzbogacona o Ca i P, ograniczonym wydzieleniem Ti, Al i V do symulowanego środowiska tkankowego oraz stabilnymi właściwościami korozyjnymi.

Próbki po PEO w kolejnym etapie modyfikacji pokryto powłoką biodegradowalnego polimeru. Zastosowano 3 rodzaje powłok: chitozan (Cht) oraz chitozan z dodatkiem berberyny w niskim (ChtBBR low) i wysokim (ChtBBR high) stężeniu. Powłoki naniesiono metodą zanurzeniową.

Warstwy polimerowe posiadały niejednorodny charakterem wynikający z agregacji polimeru w zagłębieniach wokół ziaren osadzonego proszku, którego obecność wynikała z zastosowanej technologii wytwarzania. Mimo to, powłoki korzystnie wpłynęły na zwilżalność powierzchni implantów, która po pokryciu polimerem wykazywała charakter hydrofilowy oraz znacznie ograniczała ilości jonów metali przenikających do środowiska. Powłoki charakteryzowały się długim procesem całkowitej degradacji >6 tygodni, a warianty wzbogacone substancją czynną przedłużonym uwalnianiem substancji do środowiska. Badania cytotoxyczności wykazały pozytywny wpływ warstwy Cht i ChtBBR low na żywotność komórek fibroblastów. Wysokie stężenie berberyny wykazywało działanie toksyczne.

W toku badań za najbardziej korzystny wariant uznano ten modyfikowany poprzez plazmowe utlenianie elektrochemiczne z naniesioną powłoką chitozanu bez dodatku substancji czynnej. Zastosowana modyfikacja zapewniła znaczące ograniczenie ilości jonów metali przenikających do środowiska, hydrofilową powierzchnię oraz dobre warunki do proliferacji komórek.

Zaplanowany plan badań wykonano w pełnym zakresie. Uzyskane wyniki mogą przyczynić się do rozwoju terapii medycznych kręgosłupa w odcinku szyjnym i pozytywnie wpłyną na zdrowie oraz jakość życia pacjentów.

Summary

The implementation of products manufactured using additive technologies for medical applications creates the need to develop methods to modify their surfaces to the specificity of the application. High-porosity spinal implants with Ti6Al4V provide better therapeutic effects due to the possibility of permanent bone connection. However, it is necessary to develop methods for surface modification to improve their interaction with the body.

The purpose of the study was to develop a hybrid method for modifying the surface of a highly porous intervertebral implant, which will improve implant functionality in the context of its short- and long-term interaction with the body. The work includes the development of sample forms that reflect the specificity of highly porous intervertebral implants, the verification of their properties after fabrication with SLM technology, and the development of modifications using electrochemical methods and biodegradable polymer coatings.

The samples were formed according to criteria determined on a basis of the review of the literature. The designed implant was characterized by an open structure and high porosity, ensuring the possibility of easy manipulation during implantation and a mechanical strength appropriate for the planned application.

The initial evaluation of the samples produced included tests aimed at determining the precision of the reproduction of the designed implant and its basic parameters, such as actual porosity, mechanical strength, and material structure. After positive evaluation, the samples were electrochemically modified using anodic oxidation (UA) and plasma electrolytic oxidation (PEO).

Electrochemical modifications were intended to create a stable oxide layer on the implant surface. Modified implants were evaluated in terms of homogeneity, surface topography and chemical composition, wettability, corrosive properties, and degradation under simulated tissue conditions. After the analysis of the results, samples after PEO were selected for further modifications, which were characterized by a hierarchical surface topography, which was enriched with Ca and P in the modification process, limited release of Ti, Al, and V into the simulated tissue environment, and stable corrosive properties.

In the next stage of modification, the PEO samples were covered with a coating of biodegradable polymer. Three types of coatings were used: chitosan (Cht) and chitozan with the addition of berberine at low (ChtBBR low) and high (ChtBBR high) concentrations. The coatings were applied by immersion.

The polymer layers had a heterogeneous character resulting from the aggregation of the polymer in the cavities around the grains of the deposited powder, the presence of which resulted from the manufacturing technology used. Despite this, the coatings had a positive effect on the wettability of the implant surface, which after coating with polymer showed a hydrophilic character and significantly reduced the amount of metal ions penetrating the environment. The coatings were characterized by a long process of complete degradation >6 weeks, and variants enriched with the active substance with prolonged release of the substance into the environment. Cytotoxicity studies have shown a positive effect of the Cht and ChtBBR low layers on fibroblast cell viability. High concentrations of berberine showed toxic effects.

During the research, the most beneficial variant was found to be the one modified by plasma electrochemical oxidation with a chitosan coating without the addition of the active substance. The applied modification ensured a significant reduction in the amount of metal ions that penetrate the environment, a hydrophilic surface, and good conditions for cell proliferation.

The planned research plan was carried out in full. The results may contribute to the development of medical therapies for the cervical spine and will have a positive impact on the health and quality of life of patients.

Spis treści

PODZIĘKOWANIA	3
STRESZCZENIE	5
SUMMARY	7
SPIS TREŚCI	8
I. WPROWADZENIE	10
II. PRZEGLĄD LITERATUROWY	12
1. Budowa i fizjologia tkanki kostnej	12
1.1. Przebudowa tkanki kostnej	14
1.2. Proces osteointegracji tkanki kostnej z implantem	17
2. Problematyka zwyrodnień w obrębie kręgosłupa	19
2.1. Strategie leczenia zwyrodnień w obrębie kręgosłupa	21
2.1.1. Implanty ceramiczne	25
2.1.2. Implanty metalowe	25
2.1.3. Implanty polimerowe	27
2.1.4. Implanty kompozytowe	27
2.1.5. Wysokoporowate implanty drukowane	28
3. Druk 3D w medycynie	30
3.1. Selektywne topienie laserowe w medycynie	31
3.2. Regulacje i bezpieczeństwo wykorzystanie druku 3D w medycynie	36
4. Implanty tytanowe stosowane w chirurgii kręgosłupa	38
4.1. Charakterystyka tytanu i jego stopów	38
4.2. Wpływ własności powierzchniowych stopów tytanu na ich interakcje z organizmem	41
4.2.1. Skład chemiczny warstwy powierzchniowej	42
4.2.2. Topografia powierzchni	44
4.2.3. Zwilżalność	46
4.3. Metody modyfikacji i funkcjonalizacja powierzchni implantów	47
z Ti6Al4V wytwarzanych addytywnie	47
4.3.1. Metody elektrochemiczne	48
4.3.1.1. Utlenianie anodowe	49
4.3.1.2. Plazmowe utlenianie elektrolityczne	50
4.3.2. Powłoki polimerowe	50
4.3.2.1. Chitozan	51
4.3.2.2. Berberyna	52
5. Podsumowanie przeglądu literatury	54
III. CZĘŚĆ BADAWCZĄB	57
1. Cel pracy	57
2. Materiał do badań	57
2.1. Opracowanie implantu	57
2.2. Wytworzenie implantu	60
3. Metodyka badań	60
3.1. Algorytm postępowania	60
3.2. Zastosowane metody modyfikacji oraz przygotowanie próbek do badań	63
3.2.1. Funkcjonalizacja powierzchni z wykorzystaniem metod elektrochemicznych	63
3.2.2. Funkcjonalizacja powierzchni z wykorzystaniem	64
biodegradowalnej powłoki polimerowej	64
3.2.3. Sterylizacja	66
3.2.4. Przygotowanie zglądów metalograficznych	66
3.2.5. Ekspozycja na środowisko imitujące środowisko tkankowe	66
3.3. Metodyka prowadzenia badań	66
3.3.1. Ocena porowatości rzeczywistej	66

3.3.1.1. Pomiar gęstości materiału metodą hydrostatyczną	67
3.3.1.1. Pomiary porowatości z wykorzystaniem piknometrii helowej	67
3.3.2. Mikrotomografia komputerowa	68
3.3.3. Ocena własności mechanicznych	68
3.3.4. Ocena mikroskopowa	69
3.3.4.1. Mikroskopia świetlna	69
3.3.4.2. Skaningowa Mikroskopia elektronowa	69
3.3.5. Profilometria optyczna	69
3.3.6. Analiza składu chemicznego EDS	70
3.3.7. Analiza składu chemicznego XPS	70
3.3.8. Analiza składu fazowego XRD	70
3.3.9. Ocena własności korozyjnych	71
3.3.10. Ocena jonów uwalnianych do środowiska	71
3.3.11. Pomiary zwilżalności	72
3.3.12. Ocena kinetyki uwalniania substancji czynnej	72
3.3.13. Ocena cytotoksyczności	72
4. Wyniki badań	74
4.1. Ocena wstępna - metodyka i analiza wyników	74
4.1.1. Ocena zgodności wymiarowej	74
4.1.2. Mikrotomografia komputerowa	76
4.1.3. Struktura metalograficzna	76
4.1.4. Porowatość rzeczywista	77
4.1.5. Ocena wytrzymałości mechanicznej	78
4.2. Funkcjonalizacja powierzchni z wykorzystaniem metod elektrochemicznych	78
4.2.1. Ocena mikroskopowa	78
4.2.2. Topografia powierzchni	81
4.2.3. Skład chemiczny warstwy powierzchniowej	82
4.2.4. Analiza składu fazowego XRD	85
4.2.5. Ocena własności korozyjnych	86
4.2.6. Ocena uwalniania jonów metali do środowiska	86
4.2.7. Zwilżalność	87
4.2.8. Podsumowanie	88
4.2.9. Analiza składu XPS	90
4.3. Funkcjonalizacja powierzchni próbek z wykorzystaniem biodegradowalnej	91
powłoki polimerowej	91
4.3.1. Ocena morfologii wytworzonej warstwy	91
4.3.2. Ocena własności korozyjnych	94
4.3.3. Ocena jonów metali uwalnianych do środowiska	95
4.3.4. Pomiary zwilżalności	96
4.3.5. Kinetyka uwalniania berberyny	96
4.3.6. Ocena cytotoksyczności	97
5. Dyskusja	100
6. Wnioski	109
LITERATURA:	110

I. Wprowadzenie

Rozwój cywilizacji pozwala na wydłużanie się życia i zmianę struktury wieku w społeczeństwie. Stanowi to wyzwanie dla medycyny i inżynierii biomedycznej, ponieważ wzrasta liczba pacjentów, przy równoczesnym wzroście poziomu ich potrzeb i oczekiwań. Ukierunkowanie medycyny na jej personalizację stwarza potrzebę opracowywania rozwiązań dedykowanych nie pod daną jednostkę chorobową, a dokładną specyfikę określonego przypadku medycznego. Nadzieją dla rozwoju medycyny spersonalizowanej są technologie przyrostowe, które coraz częściej znajdują zastosowania kliniczne.

Jednym z najczęściej występujących schorzeń w obrębie układu mięśniowo-szkieletowego jest zwyrodnienie krążka międzykręgowego. Proces jego degradacji wynika z fizjologicznego starzenia się tkanek jednak może być on pogłębiany przez nadmierne obciążanie kręgosłupa wynikające np. z siedzącego trybu życia. Zmiany zwyrodnieniowe w obrębie krążka międzykręgowego mogą niekorzystnie wpływać na organizm i komfort życia, ponieważ kompresja, deformacja i relokacja dysku może powodować ucisk na okoliczne struktury tkankowe, w tym tkanki układu nerwowego. Ucisk opon i korzeni rdzeniowych, a w skrajnych przypadkach rdzenia kręgowego może wiązać się z przewlekłym bólem, drętwieniem, a nawet zaburzeniami czucia i pogłębiającym się niedowładem kończyn. W przypadku długotrwałego bólu i znacznych problemów neurologicznych, konieczne jest zastosowanie leczenia operacyjnego mającego na celu przywrócenie fizjologicznej wysokości pomiędzy kręgami i odbarwienie struktur nerwowych.

Najczęściej stosowaną techniką leczenia operacyjnego jest wytworzenie fuzji kręgów (spondylodeza) poprzez zastąpienie uszkodzonego krążka międzykręgowego implantem lub autoprzeszczepem kostnym. Pomyślność zastosowanej terapii w dużym stopniu zależy od specyfiki wykorzystanego implantu. Implanty w postaci autoprzeszczepu kości mimo korzystnych z punktu widzenia osteointegracji właściwości nie znajdują szerokiego zastosowania szczególnie u osób starszych, u których może występować osteoporoza. Najczęściej, stosuje się implanty wykonane z PEEK, którego właściwości mechaniczne są bardzo zbliżone do właściwości tkanki kostnej, jednak charakteryzują się słabą osteointegracją oraz skłonnością do tworzenia biofilmu. Rozwiązaniem coraz częściej znajdującym zastosowanie kliniczne są implanty międzykręgowe wytworzone np. z Ti6Al4V metodami przyrostowymi. Dzięki zastosowaniu technologii przyrostowych

możliwe jest wytworzenie wysokoporowatego implantu o własnościach niemożliwych do osiągnięcia przy użyciu tradycyjnych metod wytwarzania. Wytworzona struktura porowa zapewnia przestrzeń do przerostu tkanki w głąb implantu przy równoczesnym zapewnieniu odpowiedniej sztywności i wytrzymałości mechanicznej.

Implanty z Ti6Al4V wytwarzane przyrostowo charakteryzuje się dobrą biokompatybilnością i własnościami osteokondukcyjnymi jednak ze względu na zawartość Al i V wymagają stosowania modyfikacji powierzchniowych, poprawiających ich interakcji z organizmem. Mimo wysokiej dokładności metod przyrostowych wytworzone implanty charakteryzują się wysokim rozwinięciem powierzchni co dodatkowo utrudnia ich modyfikację. Ograniczony dostęp do powierzchni wewnętrznych stanowi wyzwanie dla procesu modyfikacji, który powinien zapewnić uzyskanie jednorodnej powierzchni o korzystnych właściwościach w całej objętości implantu.

W pracy podjęto próbę opracowania metody modyfikacji powierzchni wysokoporowatego implantu międzykręgowego, która zapewni poprawę jego własności osteointegracyjnych. W celu zapewnienia krótko- i długoterminowych korzyści zastosowano dwuetapową modyfikację z wykorzystaniem metod elektrochemicznych i biodegradowalnych powłok polimerowych. Opracowana jednorodna powłoka wytworzona w procesie utleniania anodowego i plazmowego utleniania elektrolitycznego miała na celu zapewnienie trwałego działania barierowego i korzystnych właściwości powierzchni dla długoterminowej osteointegracji. Dodatkowa powłoka polimerowa miała na celu wspomaganie osteointegracji w jej początkowej fazie poprzez zapewnienie warunków korzystnych do adhezji i proliferacji komórek. Badania prowadzono wyłącznie na specjalnie zaprojektowanych i wytworzonych próbkach, które odzwierciedlają specyfikę rzeczywistych implantów międzykręgowych. Dzięki temu uzyskane wyniki mają wysoki potencjał aplikacyjny.

II. Przegląd literaturowy

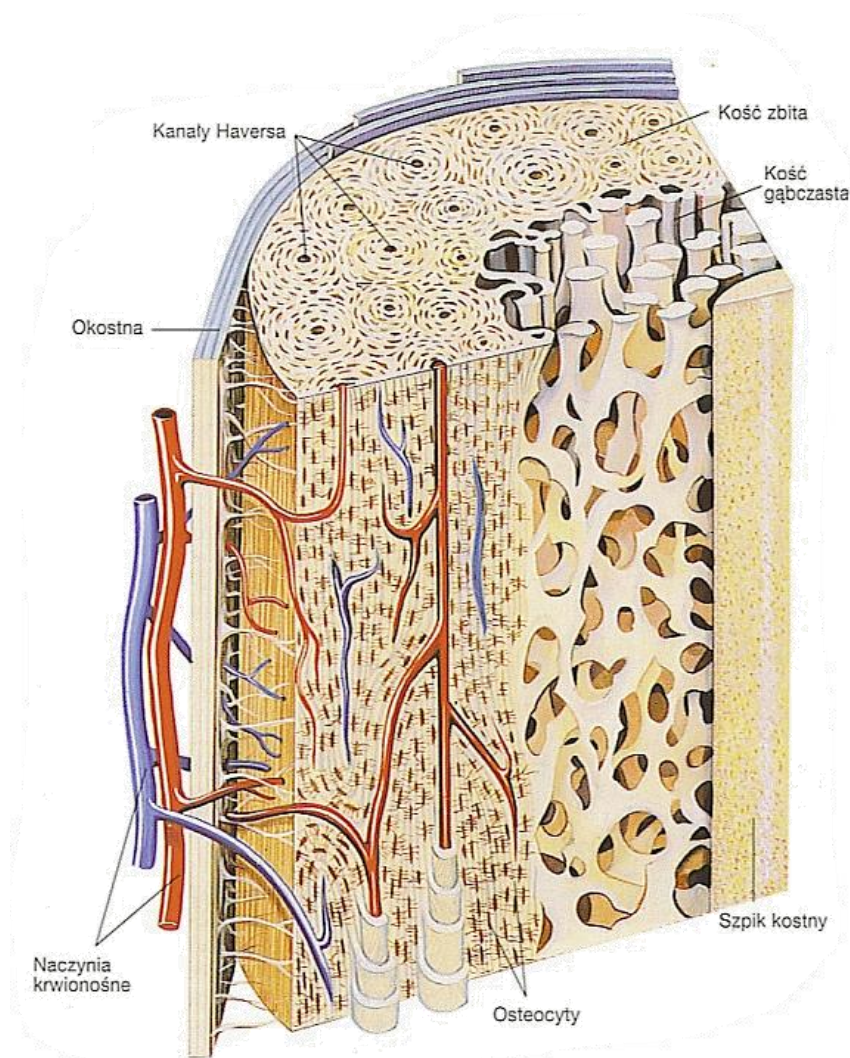
1. Budowa i fizjologia tkanki kostnej

Układ ruchu stanowi jeden z najbardziej rozbudowanych układów w organizmie człowieka. Głównym zadaniem narządu ruchu jest kontrola motoryki poszczególnych kończyn, a także ochrona ważnych narządów takich jak płuca i mózg czy magazynowanie minerałów. Układ ruchu jest złożony z tkanki kostnej i chrzęstnej oraz ścięgien więzadeł i mięśni, które charakteryzują się bardzo zróżnicowanymi własnościami oraz funkcjami. Główną częścią narządu ruchu jest szkielet zbudowany z tkanki kostnej. Pozostałe tkanki łączą poszczególne kości oraz pozwalają na przenoszenie obciążeń między nimi. Porównując do standardowych materiałów inżynierskich budowa tkanki kostnej jest bardzo złożona. Ze względu na skomplikowany kształt poszczególnych kości, ich zróżnicowane umiejscowienie i funkcję w organizmie, konieczność zapewnienia odpowiedniej sztywności oraz plastyczności, odporności na uszkodzenia i możliwości samoleczenia tkanka kostna charakteryzuje się niejednorodną, wielofazową i anizotropową strukturą. Wszystko to powoduje, iż choć pozornie zastąpienie tkanki kostnej implantem wydaje się proste, to stanowi ono niezwykle wyzwanie dla inżynierii biomedycznej.

Traktując tkankę kostną jako materiał inżynierski należy ją zakwalifikować jako materiał kompozytowy złożony ze związków hydroksyapatytowych (HAp) i kolagenu z dodatkiem proteoglikanów, białek niekolagenowych i wody. Najogólniej przyjmuje się, że składniki nieorganiczne odpowiadają za własności wytrzymałościowe, natomiast organiczne za własności plastyczne kości. Choć tkanka kostna występuje u wszystkich kręgowców, jej specyficzna budowa zależna jest od konkretnego gatunku, wieku, płci oraz umiejscowienia w organizmie. Z makroskopowego punktu widzenia tkanka kostna jest materiałem niejednorodnym, porowatym i anizotropowym. Istotnym jest fakt, że charakteryzuje się hierarchiczną strukturą, w której zmiany na poziomie nanometrycznym wpływają na ostateczne własności danej kości [1], [2], [3].

Lokalne własności tkanki kostnej są ściśle związane z jej miejscową porowatością, która w obrębie jednej kości może się zmieniać w sposób ciągły od 5 do 95%. W warunkach rzeczywistych wyróżnia się zazwyczaj 2 rodzaje tkanki kostnej – wysokoporowatą kość gąbczastą (beleczkowatą) oraz niskoporowatą kość zbitą (korową) (Ryc.1.). Kość gąbczasta charakteryzująca się porowatością na poziomie 50-95% występuje zazwyczaj w kościach prostopadłościennych, płaskich oraz w centralnych częściach kości długich. System otwartych porów wypełniony jest szpikiem, który pełni

funkcję krwiotwórczą. Macierz kostna w kości gąbczastej ma postać połączonych płytek i beleczek o grubości ok. 200 μm . Układ poszczególnych beleczek jest złożony i ściśle powiązany ze sposobem obciążania danej struktury kostnej – układ macierzy kostnej kształtowany jest przez organizm w taki sposób, aby zapewnić optymalne własności mechaniczne przy równoczesnym zachowaniu jak najmniejszej masy kości. Kość zbita charakteryzuje się porowatością na poziomie 5-10%. W przeciwieństwie do kości gąbczastej, komórki kości zbitej układają się w ściśle określony sposób tworząc cylindryczne struktury zwane osteonami, których średnica wynosi ok. 200 μm . Większość wolnych przestrzeni w zbitej macierzy kostnej stanowią cylindryczne pory wypełnione naczyniami krwionośnymi, które umożliwiają odżywianie tkanki kostnej [3], [4].



Ryc. 1 Schemat budowy kości [5]

1.1. Przebudowa tkanki kostnej

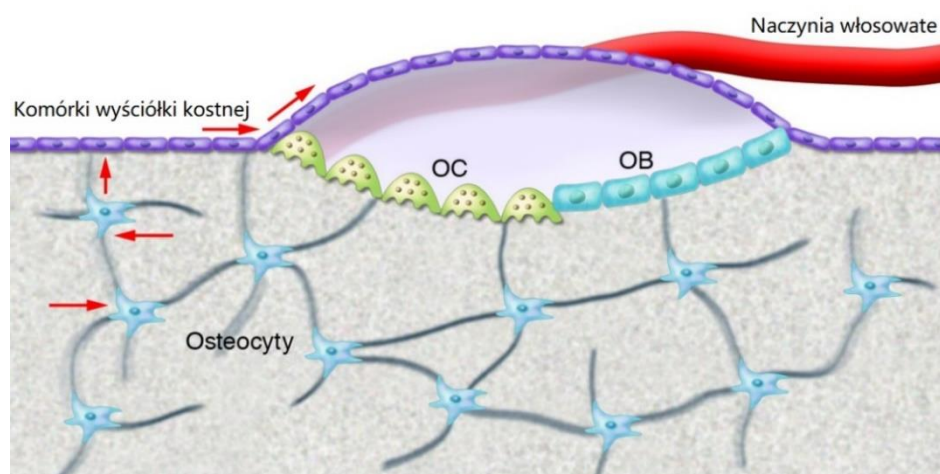
Choć w makroskopowym ujęciu szkielet jest narządem statycznym, na poziomie mikroskopowym charakteryzuje się wysoką dynamiką zmian, która wynika ze zmieniających się warunków obciążeniowych, wzrostu oraz skończonej żywotności poszczególnych komórek budujących kość. W początkowej fazie rozwoju organizmu tkanka kostna charakteryzuje się grubowłóknistą strukturą, w której włókna kolagenowe nie są uporządkowane. Tkanka gruboziarnista występuje w organizmie w czasie jego dynamicznego rozwoju tj. do ok. 5 roku życia a następnie stopniowo zastępowana jest tkanką drobnowłóknistą, w której włókna kolagenowe są skierowane zgodnie z kierunkiem wzrostu kości. Dojrzała struktura drobnowłóknista zapewnia wyższą wytrzymałość tkanki, ale powoduje znaczny spadek dynamiki jej przebudowy i wzrostu. U dorosłych osobników tkanka gruboziarnista występuje jedynie w kosteczkach słuchowych, w szwach i stykach ścięgien z kością oraz podczas procesu gojenia się ran takich jak złamania czy pęknięcia kości [5], [6].

Czynniki wpływające na procesy wzrostu, przebudowy oraz samonaprawy kości są złożone i wynikają z fizjologicznych wzorców organizmu oraz czynników mechanicznych i hormonalnych występujących w organizmie. O ile proces wzrostu i modelowania występuje głównie w dzieciństwie, a proces samonaprawy jedynie w przypadku wystąpienia urazów, to proces przebudowy jest stały i odgrywa fundamentalną rolę w funkcjonowaniu organizmu [4].

Przebudowa kości zachodzi powierzchniowo w obrębie beleczek kości gąbczastej oraz osteonów kości zbitej. Proces przebudowy nie jest przeprowadzany indywidualnie przez poszczególną komórkę, ale przez grupę komórek, które Frost [4], [6] określił jako „podstawowa jednostka wielokomórkowa” (ang. Basic Multicellular Units – BMUs) (Ryc.2.). BMU postępuje w zdefiniowanej sekwencji procesów A-R-F (aktywacja – resorpcja – formowanie). Ze względu na zróżnicowane procesy inicjowane podczas procesu przebudowy kości w obrębie BMUs można wyodrębnić poszczególne komórki, które odpowiedzialne są za poszczególne funkcje [4], [6], [7]:

- Osteoblasty (OC) – zróżnicowane komórki mezenchymalne odpowiedzialne za wytwarzanie kości
- Osteoklasty (OB) – wielojądrzaste komórki makrofagowe odpowiedzialne za usuwanie kości poprzez kwasową demineralizację kości oraz enzymatyczne rozpuszczanie kolagenu

- Komórki wyściółki kostnej – nieaktywne osteoblasty, które osiadają na powierzchni kości, gdy proces przebudowy jest nieaktywny. Komórki te mogą być jednak aktywowane przez czynniki chemiczne i/lub mechaniczne
- Osteocyty – nieaktywne osteoblasty osadzone w wewnętrznej części macierzy kostnej. Niektórzy autorzy sugerują, iż posiadają one własności mechanosensoryczne. Na podstawie zbieranych bodźców inicjują one proces przebudowy kości[3], [4], [8].

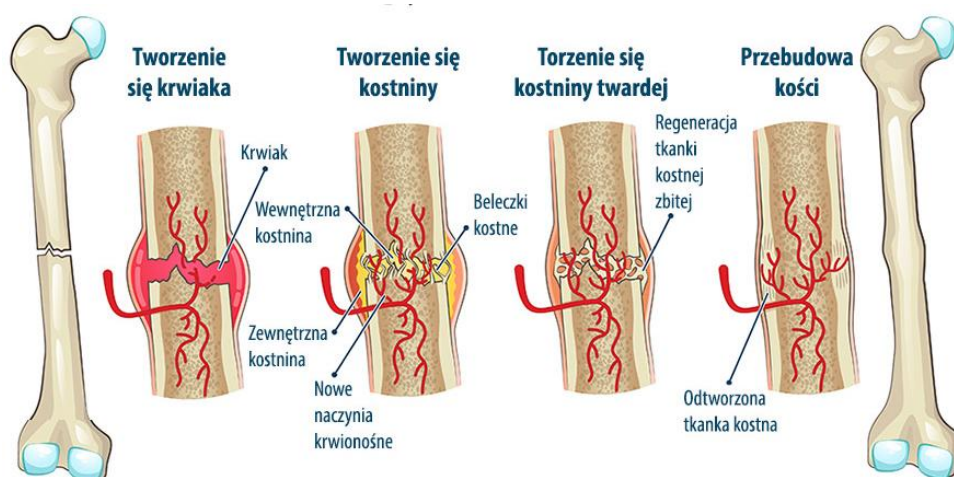


Ryc.2. Schemat BMUs w miejscu przebudowy kości. Czerwone strzałki wskazują kierunek przepływu sygnału stymulującego przebudowę tkanki kostnej generowany przez osteocyty[8]

Procesy samonaprawy kości, a więc jej odbudowy w przypadku wystąpienia urazu powodującego przerwanie ciągłości tkanki kostnej, stanowią jeden z najbardziej niezwykłych procesów biologicznych zachodzących w organizmie. Odbudowa ciągłości kości, powstała wskutek złamania, procesu chorobowego czy interwencji chirurgicznej aktywuje procesy kostnienia zbliżone do procesów występujących w trakcie kształtowania zarodka w życiu płodowym. Proces uzupełniania ubytków kostnych może przyjmować formę kostnienia śród chrzęstnego (wytworzenie chrząstki, która stopniowo wapnieje i przekształca się w tkankę kostną), śródbłonkowego (tworzenie tkanki kostnej bezpośrednio przez osteoblasty) lub pozycyjnego (sekwencja A-F-R przez BMUs) [4], [5].

W zależności od rozmiaru ubytku kostnego można wyróżnić gojenie pierwotne i wtórne. Gojenie pierwotne występuje w przypadku powstania stabilnej wąskiej szczeliny i polega na próbie bezpośredniego uformowania się tkanki kostnej. W przypadku większych ubytków, w których poszczególne fragmenty kości nie mają zapewnionej wystarczającej stabilności następuje gojenie wtórne, które składa się z szeregu stopniowo pokrywających się etapów (Ryc.3.) [3], [4], [9]:

- Tworzenie się krwiaka – uszkodzone naczynia krwionośne w obrębie naruszonej tkanki kostnej powodują napływ krwi do złamania. Makrofagi usuwają martwą tkankę i inicjują migrację niezróżnicowanych komórek mezenchymalnych do rany tworząc grubowłóknistą tkankę (kalus).
- Tworzenie kostniny – komórki mezenchymalne pod wpływem czynników biologicznych i mechanicznych różnicują się w chondrocyty, osteoblasty i fibroblasty. Poszczególne komórki zaczynają syntezować charakterystyczną dla siebie macierz zewnątrzkomórkową. Puste przestrzenie wypełniane są stopniowo grubowłóknistą tkanką kostną, która przesuwana jest w głąb kalusa. W centralnej części kalusa w procesie chondrogenyzy tworzona jest chrząstka.
- Twardnienie kostniny – tkanka chrzęstna wypełniająca kalus dojrzewa i degraduje inicjując osteogenezę, podczas której następuje ostateczna odbudowa unaczynienia tkanki. Kostnienie chrzęstne trwa, aż całość chrząstki zastąpiona zostanie kością a miejsce ubytku kostnego uzyska pełną stabilność i wystarczającą sztywność.
- Przebudowa kości – po całkowitym skostnieniu i zabliznieniu się rany inicjowane są procesy przebudowy tkanki, mające na celu przywrócenie pierwotnej struktury i kształtu kości. Powrót kości do stanu sprzed urazu jest bardzo długi i trwa ok rok. Po jego zakończeniu przebudowa kości trwa nadal w sposób fizjologiczny.



Ryc.3. Schemat etapów wtórnego gojenia kości [10]

Procesy leczenia złamań są ważnym obszarem badań w ramach inżynierii biomedycznej. W ostatnich latach wielu badaczy stworzyło teorie i modele symulacyjne, które pozwalają na lepszą stymulację zrostów kostnych i dobór odpowiedniej terapii. W modelach tych często wykorzystuje się modele matematyczne oparte na elementach skończonych, co pozwala korelować lokalne naprężenia i odkształcenia, ciśnienie

hydrostatyczne czy ilość odpowiednich komórek i związków tworzących macierz zewnątrzkomórkową (kolageny, proteoglikany, minerały, woda) w miejscu złamania z dynamiką procesów kościotwórczych [11], [12], [13], [14], [15], [16], [17], [18].

1.2. Proces osteointegracji tkanki kostnej z implantem

Gdy uszkodzenie tkanek jest zbyt duże, by procesy samonaprawcze mogły przywrócić sprawność organizmu konieczne jest czasowe lub trwałe zastąpienie ubytku elementem implantowanym. Wprowadzenie implantu, a więc ciała obcego do tkanki, wpływa znacząco na procesy kościotwórcze. Żeby implant spełniał swoją funkcję, musi stworzyć bezpośrednie funkcjonalne i strukturalne połączenie z żywą tkanką kostną [19], [20]. Aby osteointegracja była trwała połączenie implant-kość musi nastąpić zarówno na płaszczyźnie biomechanicznej jak i chemicznej. Połączenie chemiczne między tkanką kostną, a implantem następuje bezpośrednio po wprowadzeniu go do organizmu. Polega na bezpośredniej interakcji materiału z substancjami występującymi w okalających tkankach. Wśród materiałów charakteryzujących się wysoką osteokonduktywnością warto wymienić tytan, który adsorbuje na powierzchni jony wapnia, magnezu oraz fluoru oraz ceramikę hydroksyapatytową, która ze względu na podobieństwo chemiczne do tkanki kostnej wiąże się z nią chemicznie. Wiązania chemiczne są bardzo słabe, głównie ze względu na nieznaczną grubość połączenia oraz ciągłe mikroruchy obciążanego fizjologicznie implantu. Choć połączenie chemiczne nie jest trwałe, jego charakter i rodzaj interakcji implantu z płynami ustrojowymi wpływa znacząco na dalszy rozwój osteointegracji [21]. Połączenie biomechaniczne (interlocking) jest procesem długotrwałym i polega na mechanicznym połączeniu implantu z kością poprzez wrastanie tkanki w powierzchnię implantu. Mimo, iż w ujęciu makroskopowym technika implantacyjna wymaga jak najlepszego dopasowania kształtu implantu do uzupełnianego ubytku, aby połączenie było trwałe dopasowanie poszczególnych struktur musi nastąpić na poziomie mikroskali. Co więcej, ze względu na wzajemne oddziaływanie implantu z tkanką w początkowej fazie osteointegracji dochodzi do czasowej resorpcji tkanki kostnej, co powoduje pogorszenie stabilizacji zespolenia. Dopiero odbudowa świeżej tkanki kostnej w nowych warunkach obciążeniowych pozwala na wtórną stabilizację i powstanie trwałego połączenia [22].

Dokładny przebieg osteointegracji zależy od wielu czynników. Przebiega on dynamicznie i wieloetapowo. Własności powierzchni wszczepianego materiału mają znaczący wpływ na odpowiedź tkankową. Reakcję tkanki można podzielić na fazę niekomórkową oraz komórkową. Faza niekomórkowa rozpoczyna się bezpośrednio po

zetknięciu implantu z płynami ustrojowymi, od adsorpcji protein na wszczepiony materiał. Na jej przebieg mają wpływ zarówno własności materiału tj. chropowatość, zwilżalność, topografia, powierzchniowy ładunek elektryczny jak i środowisko tkankowe tj. pH, skład jonowy, temperatura, grupy funkcyjne białek i pozostałych substratów w okolicy okołowszczepowej. Początkowo do powierzchni implantu przyłączane są małe, szybko dyfundujące proteiny, które stopniowo zastępowane są dużymi białkami o silnym powinowactwie do powierzchni wszczepu. Białka te charakteryzują się obecnością kwasu arginiloglicylazaparinowego (RGD), który ze względu na adhezję i własności hemotaktyczne promuje późniejszą adhezję osteoblastów i wpływają na dojrzewanie i mineralizację macierzy zewnątrzkomórkowej [23], [24].

W kolejnej fazie do powierzchni implantu przyłączane są zewnątrzkomórkowe białka macierzy oraz białka błony komórkowej i cytoszkieletu, które indukują późniejszą odpowiedź komórkową w postaci migracji i różnicowania komórek. Przebieg tej fazy uwarunkowany jest siłami jonowymi oraz siłami Van der Waalsa [23]. Na tym etapie implant otoczony jest macierzą złożoną z kolagenu, glikoprotein, proteoglikanów i czynników wzrostu, które nie tylko stanowią rusztowanie dla komórek umożliwiając im przyłączanie się i dalszą organizację, ale również mediator sygnałów biologicznych, umożliwiając komunikację między komórkami i poszczególnymi białkami macierzy [23], [25].

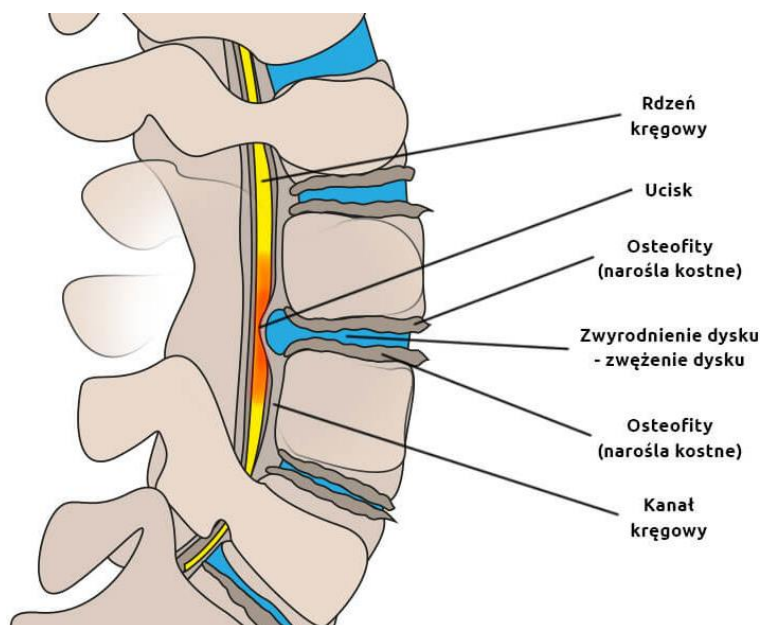
Gdy do komórek osteocytów zaczynają napływać odpowiednie sygnały inicjowana jest faza komórkowa, którą można podzielić na okresy przyłączania, adhezji, migracji, proliferacji i różnicowania komórek. Pod wpływem sił jonowych i sił Van der Waalsa komórki przyłączają się do powierzchni materiału. Najbardziej krytycznym momentem procesu osteointegracji jest moment adhezji komórek do powierzchni implantu, a więc bezpośredniego kontaktu z materiałem, który następuje już kilka godzin po wszczepieniu implantu w kość. Udział w adhezji biorą zarówno receptory błon komórkowych (integryny) jak i zewnątrzkomórkowe białka matriksu (kolagen, fibronektyna, laminina, vitronektyna) oraz cytoszkieletu (aktyna, talina i vinkulina). Interakcje między materiałem a poszczególnymi białkami, a także ilość komórek, które trwale przylgną do powierzchni decydują o późniejszej proliferacji i różnicowaniu komórek, a tym samym o pomyślności osteointegracji [26], [27].

Po zakończeniu etapu adhezji następuje migracja i proliferacja komórek. Komórki stopniowo zasiedlają całą powierzchnię implantu i zaczynają różnicować. W przypadku implantów wysokoporowatych komórki stopniowo zasiedlają wnętrze

rusztowania. Ostatnią fazą osteointegracji jest tworzenie niezmineralizowanej macierzy zewnątrzkomórkowej. W skafoldach wypełnienie porów macierzą umożliwia równomierną proliferację komórek wewnątrz porów dzięki czemu całość implantu przerasta tkanką kostną. Gdy wytworzona macierz dojrzewa następuje jej stopniowa mineralizacja [23], [24], [28].

2. Problematyka zwyrodnień w obrębie kręgosłupa

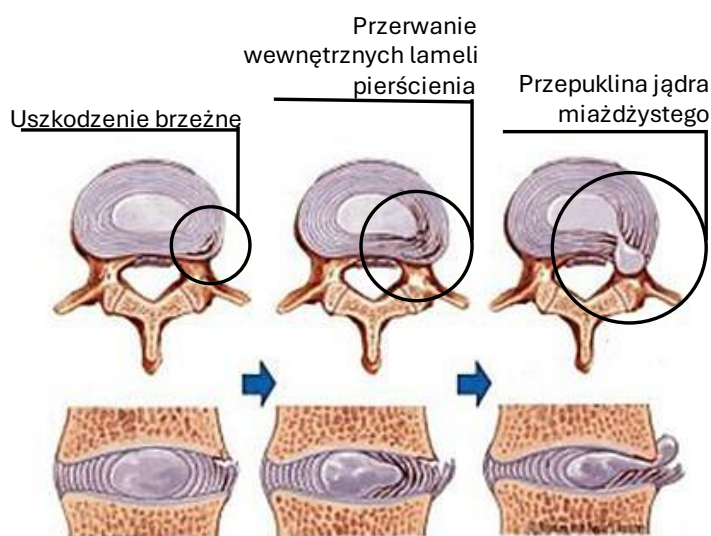
Zmiany zwyrodzeniowe kręgosłupa (Ryc.4) są bardzo powszechne i stanowią ponad połowę rozpoznań medycznych w obrębie układu mięśniowo-szkieletowego. Dane medyczne z USA wykazują, że rocznie rejestrowanych jest ponad 15 mln nowych przypadków zmian w obrębie kręgosłupa takich jak zwyrodnienie krążka międzykręgowego, kręgozmyk czy dyskopatia [29]. Równocześnie szacuje się, że wśród całej populacji aktualnie na ból kręgosłupa skarży się 4-33% populacji [30]. Badania przesiewowe wykorzystujące obrazowanie medyczne wykazują, że zmiany zwyrodzeniowe nie od razu prowadzą do pogorszenia jakości życia pacjentów, ponieważ zwłaszcza w początkowej fazie mogą nie dawać objawów bólowych, jednak z czasem pogłębiają się wpływając znacząco na jakość życia [31], [32].



Ryc.4. Schemat kręgosłupa z widocznym zwyrodnieniem dysku [38]

Choroby układu mięśniowo-szkieletowego są najczęstszą przyczyną silnego, długotrwałego bólu oraz niepełnosprawności fizycznej [30]. Zmiany w obrębie kręgosłupa prowadzą bowiem do dalszej deformacji kolejnych kręgów, która spowodowana jest nieprawidłowym przenoszeniem obciążeń, zwężenia kanału kręgowego, kompresji tkanek

oraz ucisku nerwów. To zaś może prowadzić do zmian neurologicznych jak na przykład brak stabilności w obrębie kręgosłupa, drżenie i drętwienie kończyn, ograniczenie czucia oraz niedowład [30], [31], [33], [34]. Mimo ciągłego rozwoju medycyny, wzrostu świadomości pacjentów oraz rozwoju nieoperacyjnych technik leczenia zmian zwyrodnieniowych kręgosłupa przekładających się na lepszą profilaktykę tych schorzeń, liczba wykonywanych zabiegów operacyjnych wciąż wzrasta [35], [36]. W latach 1998 – 2014 w USA wzrost ten wynosi aż 118 % [35], [37].



Ryc.5. Proces tworzenia się przepukliny międzykręgowej (na podstawie [39])

Fragmentem kręgosłupa szczególnie narażonym na zmiany zwyrodnieniowe jest odcinek szyjny. Chociaż odcinek ten zbudowany jest jedynie z 7 najmniejszych kręgów przedzielonych 6 krążkami międzykręgowymi charakteryzuje się on niezwykłą ruchomością i wysokim ryzykiem wystąpienia zmian patologicznych. Ze względu na konieczność zapewnienia odpowiedniego podparcia i stabilizacji głowy poszczególne kręgi w odcinku szyjnym cechują się różną ruchomością wynikającą z ich kształtu oraz umiejscowienia. Wraz z wiekiem i nadmiernym obciążaniem struktur w obrębie kręgosłupa szyjnego może dochodzić do uszkodzeń i zwyrodnień szczególnie w obrębie krążków międzykręgowych. Krążki, umożliwiające ruch pomiędzy kręgami fizjologicznie stanowią aż 22% długości tego odcinka kręgosłupa. Wraz z wiekiem w wyniku fizjologicznego starzenia się organizmu oraz w wyniku urazów dochodzi do ich spłaszczenia i dehydratacji, co przekłada się na gorszą amortyzację kręgów i może prowadzić do uszkodzeń korzeni nerwowych generując objawy bólowe oraz problemy neurologiczne. Degradacja krążka międzykręgowego jest procesem wieloetapowym (Ryc.5.). W początkowej fazie krążek

ulega protruzji polegającej na spłaszczeniu i systematycznym uwypukleniu się krążka. Zmiany te nasilają nieodpowiednie obciążanie w obrębie kręgosłupa prowadząc do dalszych uszkodzeń, które mogą skutkować całkowitym przerwaniem ciągłości pierścienia włóknistego, a w przypadkach skrajnych nawet znacznego przemieszczenia całego dysku bądź poszczególnych kręgów względem siebie (kręgozmyk). Postępujące zwyrodnienie krążka prowadzi do zmian innych struktur w obrębie kręgosłupa tj. więzadła czy wyrostków stawowych. Generowane w ten sposób zmiany anatomiczne stopniowo zwiększają ucisk na korzenie nerwowe i rdzeń kręgowy [40], [41].

2.1. Strategie leczenia zwyrodnień w obrębie kręgosłupa

Jedną z najpopularniejszych technik leczenia schorzeń kręgosłupa jest fuzja kręgów pozwalająca na przywrócenie prawidłowego układu i stabilizację kręgów [29], [42]. W roku 2020 w samych USA zabieg dysektomii w odcinku szyjnym ze stabilizacją obejmował ok. 153 000 przypadków, a prognozy przewidują dalszy wzrost do niemal 175 000 zabiegów w roku 2040 [36]. Wzrost ten wynika w dużej mierze z wydłużania się życia i zmiany struktury wiekowej w społeczeństwie, ale także aktualnych trendów w ortopedii, w której zabieg fuzji kręgów wypiera inne techniki operacyjne związane z leczeniem tego typu schorzeń [35], [36], [37].

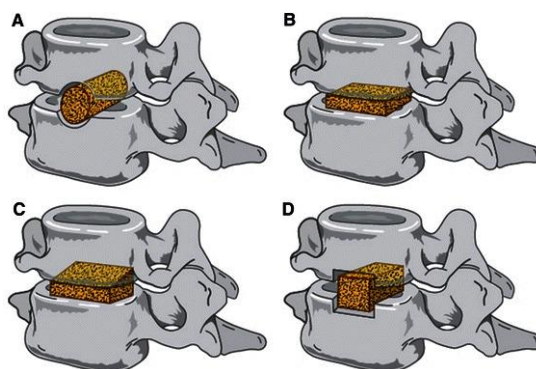
Aby wytworzyć fuzję kręgów konieczne jest wytworzenie warunków umożliwiających przerost tkanki kostnej między dwoma stabilizowanymi kręgami. Konieczne jest oczyszczenie przestrzeni międzykręgowej z uszkodzonego dysku, a także częściowe usunięcie blaszki granicznej stanowiącej powierzchnie styku tkanki kostnej kręgu z krążkiem międzykręgowym. Ze względu na konieczność zachowania odpowiedniej wysokości między poszczególnymi kręgami w oczyszczonej przestrzeni międzykręgowej należy wprowadzić implant zapewniający podparcie tkanek do czasu zagojenia się przestrzeni międzykręgowej tkanką kostną [41].

Wygenerowanie fuzji kręgów (spondylodeza), jako technika leczenia bólu w obrębie kręgosłupa została zapoczątkowana w 1891 r. przez dr B.E Harda, który unieruchomił zwichnięte kręgi w odcinku szyjnym poprzez sztywne owinięcie wyrostków kolczystych za pomocą srebrnego drutu. Choć pierwszy zabieg wymagał reoperacji ze względu na obłuzowanie drutu, pozwolił on na czasową redukcję bólu u pacjenta [29], [43]. Technika ta nie zyskała dużej popularności, jednak zapoczątkowała poszukiwania metody umożliwiającej stabilizację kręgów. Wykazano bowiem, że unieruchomienie ich

w odpowiednim ułożeniu umożliwia stałe usunięcie bólu odczuwanego przez pacjenta znacząco wpływając na jakość jego życia. Istotnym ograniczeniem był jednak brak odpowiednich materiałów, ponieważ stosowane pręty, druty i śruby w środowisku tkankowym ulegały szybkiej degradacji. To zaś przekładało się nie tylko na szybką utratę stabilności wytwarzanych układów implant – kość, ale również prowadziło do lokalnych i ogólnoustrojowych reakcji zapalnych spowodowanych kontaktem tkanek z produktami korozji [29], [43], [44].

Równoległe do założeń współczesnej inżynierii biomedycznej i związanej z nią nauki o biomateriałach rozwijała się transplantologia. W roku 1905 dzięki badaniom Ch. C. Guthrie dowiedziono, że reakcja na przeszczepianą tkankę w znacznym stopniu zależy od jej pochodzenia. Tkanka pobrana od samego biorcy i wszczepiona w innym miejscu w organizmie pacjenta nie tylko była lepiej przyjmowana przez organizm, ale także skutecznie podejmowała fizjologiczne funkcje. Odkrycie to pozwoliło na zróżnicowanie przeszczepów na auto- i heterogennych [45], [46]. Naukowcy zaczęli wówczas myśleć o tkance jako o materiale, który jest obecny w organizmie człowieka, a który pod wpływem fizjologicznych procesów może ulec regeneracji. Na przełomie pierwszej i drugiej połowy XX w. chirurdzy zaczęli wprowadzać do oczyszczonej z krążka międzykręgowego przestrzeni międzykręgową autoprzeszczep pobrany najczęściej z grzebienia biodrowego bądź kości strzałkowej w celu uzyskania zrostu kostnego stabilizującego kręgi [29], [33], [43], [44]. Zabieg fuzji kręgów z wykorzystaniem przeszczepu kości (Ryc.6.), choć przeszedł wiele modyfikacji, stosowany jest nadal i uważany jest za jeden ze złotych standardów leczenia zwyrodnień kręgosłupa [47]. Zastosowanie tkanki kostnej pobranej od pacjenta charakteryzuje się bardzo dobrą reakcją organizmu, szybką fuzją kręgów ze względu na bardzo dobre warunki osteokondukcyjne oraz odpowiednimi własnościami mechanicznymi dzięki bardzo zbliżonej wytrzymałości mechanicznej tkanki kostnej pobranej do tkanki zastępowanej. Równocześnie z tym zabiegiem wiąże się wiele ograniczeń wynikających z zastosowania przeszczepu autogenego. Pobranie fragmentu kości powoduje wiele krótko- i długoterminowych powikłań w miejscu pobrania tj. ból, możliwość uszkodzenia okolicznych nerwów i powstania infekcji czy wystąpienia złamania bądź deformacji ze względu na czasowe osłabienie i utratę ciągłości tkanki. Co więcej, mimo odpowiednich własności mechanicznych tkanki kostnej przeszczepione fragmenty kości mogą ulec zniszczeniu bądź osiadaniu pod wpływem działania

fizjologicznych obciążeń w miejscu wszczepienia. Ponadto autoprzeszczep obciążony jest wysokim ryzykiem powstania stawu rzekomego [29], [31], [33], [43], [44], [48], [49].



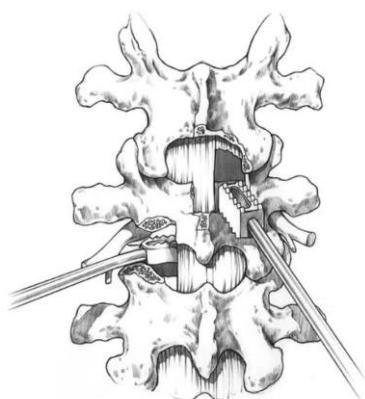
Ryc.6. Kliny kostne używane do wytworzenia fuzji kręgów[31]

W celu wykluczenia powikłań wynikających z pobrania tkanki do wytworzenia fuzji kręgów podjęto liczne próby zastąpienia przeszczepu autogennego przeszczepem allogennym bądź ksenogennym. Problemem okazały się ograniczone zasoby dawców, możliwość przeniesienia choroby od dawcy do biocy, wpływ warunków przechowywania na własności wszczepu oraz utrudniona sterylizacja materiału szczególnie w porównaniu do materiałów syntetycznych czy metalowych [31], [50]. Badania prowadzone na allo- i ksenoprzeszczepach wykazywały niższą osteokondukcję i osteoindukcję w porównaniu do przeszczepów autogennych. To zaś przekładało się na wydłużenie procesu fuzji, częstsze osiadanie implantu oraz częstszą konieczność wykonania reoperacji [31], [32], [47], [50], [51], [52].

Mimo często satysfakcjonujących efektów klinicznych przy stosowaniu przeszczepów kości, ograniczenia wynikające z ich specyfiki uniemożliwiają stosowanie ich na szeroką skalę. Rozwój nauki o biomateriałach pozwoliła na poszukiwanie substytutów przeszczepów kostnych i oparcie leczenia zwyrodnień kręgosłupa poprzez fuzję kręgów wykorzystującą implanty wytworzone z różnego rodzaju biomateriałów. Dużą zaletą wykorzystania elementów zaprojektowanych i wytworzonych z biomateriałów nad przeszczepami kostnymi jest większa kontrola nad ostatecznymi własnościami wszczepianego elementu oraz ich dostępność [53].

Implanty międzykręgowe mogą być wprowadzane do organizmu w różny sposób. Standardowo możliwe jest wytworzenie fuzji poprzez wprowadzenie implantu w miejsce zdegradowanego krążka między kręgowego z dostępu tylnego (PLIF – ang. posterior lumbar interbody fusion), bocznego (TLIF - transforaminal lumbar interbody fusion) oraz przedniego (ALIF – ang. anterior lumbar interbody fusion). Kształt implantu zależy od

sposobu jego implantacji (Ryc.8). Początkowo fuzje kręgów z wykorzystaniem implantów wykonywano głównie z dostępu tylnego. Dostęp ten jest problematyczny głównie ze względu na konieczność operowania w okolicy worka oponowego i korzeni rdzeniowych. Co więcej, zabieg fuzji kręgów ma zastosowanie głównie w odcinku szyjnym i lędźwiowym, w których występuje lordoza. W celu zapewnienia jak najlepszego odtworzenia pozycji spoczynkowej kręgosłupa implanty często wyprofilowane są w kształt klina, którego implantacja z dostępu tylnego jest utrudniona. Procedurę PLIF (Ryc.7.) można stosować jednostronnie lub dwustronnie wykorzystując 1 lub 2 podłużne implanty (Ryc.8B).



Ryc.7 Schemat przedstawiający wprowadzenie imlantu międzykręgowego z dostępu tylnego[54]



Ryc.8. Przykładowe implanty międzykręgowe stosowane w procedurze A – TLIF, B- PLIF, C - ALIF[55]

Dostęp boczny umożliwia ograniczenie operowania w pobliżu korzeni rdzeniowych i worka oponowego, choć w momencie wprowadzania implantu konieczne jest pewne przesunięcie worka do linii przyśrodkowej. TLIF bazuje na implantach „bananowych” (Ryc.8A), które podpierają kręgi obustronnie. W procedurze tej konieczne jest stosunkowo małe pole operacyjne.

Dojście przednie, ma zastosowanie przy zabiegach jednopoziomowych lub w przypadku operacji rewizyjnych po zabiegu TLIF. Przedni dostęp pozwala na operowanie z dala od struktur nerwowych, jednak wymaga dostępu przeztrzewnego co zwiększa ryzyko wystąpienie urazu trzewnego bądź naczyniowego. ALIF umożliwia wykonanie pełnej dysektomii i rozległego usunięcia blaszki granicznej co wspomaga osteointegrację implantu. Implanty do ALIF pozwalają na stabilniejsze osadzenie implantu w kręgosłupie poprzez umieszczenie w ich konstrukcji śruby lub samoblokujących ostrzy [54], [56], [57].

2.1.1. Implanty ceramiczne

Materiały ceramiczne, do których zaliczane są hydroksyapatyty (HA), fosforan wapnia (CaP), fosforan trójwapniowy (TCP) i bioszkło, ze względu na wysokie powinowactwo chemiczne do kości stosowane są w implantologii jako substytuty kości [58]. Związki wapnia i fosforu będące głównym budulcem matrycy mineralnej tkanki kostnej, stanowią prawie 70% kości.[59]. Biomateriały ceramiczne stwarzają dobre warunki do adhezji i proliferacji komórek, dzięki czemu zapewniają dobrą osteokondukcję i osteointegrację [60], [61]. Apatyty obecne na powierzchni ceramiki bioaktywnej wchodzą w bezpośrednią interakcję z kością dzięki czemu macierz kostna może zespolić się z nimi [62]. Implanty ceramiczne w postaci klinów bądź płytek wykonanych z ceramiki porowatej mogą być wykorzystywane w chirurgii kręgosłupa jako substytut autoprzeszczepu kości. Rusztowania ceramiczne wytworzone z ceramiki bioresorbowalnej o strukturze amorficznej wykazują wysoką bioaktywność – materiał ulega resorpcji, równocześnie stymulując przerost tkanki kostnej [63]. Mimo zbliżonych własności mechanicznych do kości, biomateriały ceramiczne charakteryzują się ~5-krotnie wyższą wytrzymałością na ściskanie, ~2-krotnie wyższą wytrzymałością na zginanie jednocześnie posiadają 2÷5-krotnie niższej odporności na pękanie [62], [63], [64]. To zaś przekłada się na stosunkową wysoką awaryjność implantów ceramicznych. Implanty kręgosłupowe wykonywane z biomateriałów ceramicznych mogą ulegać zapadnięciu, osiadaniu bądź pęknięciu. W przypadku uszkodzenia implantu potrzebna jest reoperacja, ponieważ uszkodzony implant nie zapewnia zachowania odpowiedniej wysokości między kręgami, a oderwane fragmenty implantu mogą migrować stwarzając zagrożenie uszkodzenia okolicznych tkanek, w tym uszkodzenie rdzenia kręgowego. Dodatkowo, mimo sprzyjających warunków do osteokondukcji, obserwuje się wytwarzanie tkanki włóknistej wokół implantów, szczególnie w przypadku jego rozdrobnienia na mniejsze fragmenty [42], [52], [58], [65]

2.1.2. Implanty metalowe

Biomateriały metalowe znajdują szerokie zastosowanie w ortopedii, w tym w chirurgii kręgosłupa, ze względu na swoje własności: wysoką wytrzymałość mechaniczną, niski koszt materiału oraz szerokie możliwości kształtowania i modyfikacji właściwości, w tym powierzchniowych [66]. Początkowo implanty metalowe stosowane w leczeniu zwyrodnień kręgosłupa skupiały się głównie na stabilizacji kręgow

z wykorzystaniem systemu prętów i śrub umieszczanych na tylnej ścianie kręgosłupa (Ryc.6.). Stanowiły one samodzielne układy bądź dodatkowe wzmocnienie w przypadku zastosowania auto- lub alloprzeszczepu kości wprowadzonego na miejsce uszkodzonego krążka międzykręgowego [29], [67]. Stabilizacja tylna z wykorzystaniem prętów i płytek znajduje uzasadnienie jako rozwiązanie czasowe mające na celu dodatkową stabilizację w czasie wytwarzania fuzji między stabilizowanymi kręgami [67], jednak wiąże się z niefizjologicznym przenoszeniem obciążeń, co długoterminowo prowadzi do degradacji innych segmentów kręgosłupa pacjenta [68], [69]. Systemy stabilizacji kręgów z wykorzystaniem prętów, mimo iż wykorzystują standardowe wyroby implantacyjne utrudniają dostosowanie systemu stabilizacji ściśle pod konkretnego pacjenta. Pręty proste bądź profilowane doginane są najczęściej w trakcie operacji co wiąże się z wprowadzeniem naprężeń do materiału. Wpływa to znacząco na wytrzymałość mechaniczną prętów, szczególnie na wytrzymałość zmęczeniową, co zwiększa ich awaryjność [70]. Doginanie prętów bardzo często powoduje również powstawanie karbów oraz uszkodzenia warstwy powierzchniowej implantu, co obniża ich odporność korozyjną [70], [71], [72].



Ryc.6. System stabilizacji kręgosłupa oparty na śrubach i prętach[73]

Biomateriały metalowe stosowane są również do wytwarzania implantów kręgosłupowych w postaci klatek międzykręgowych. Ze względu na konieczność trwałej ekspozycji na środowisko tkankowe, implanty tego typu mogą być wytwarzane jedynie z materiałów metalowych przeznaczonych na implanty stałe takich jak tytan i jego stopy (Rozdział 4), stopy tantalum czy stopy magnezu, które mogą resorbować w organizmie pacjenta [69], [74], [75], [76]. Ze względu na wyższą sztywność materiałów metalowych w stosunku do własności mechanicznych tkanki kostnej niezalecane jest stosowanie metalowych implantów litych.

2.1.3. Implanty polimerowe

Biomateriały polimerowe wykorzystywane w medycynie stanowią dużą grupę materiałów o bardzo zróżnicowanych właściwościach. Do głównych zalet polimerów można zaliczyć łatwość ich kształtowania zarówno na poziomie makro (kształt implantu) jak i mikro (struktura, porowatość), przewidywalną resorpcję, dostępność oraz niską immunogenność [69], [77].

Spośród polimerów stabilnych w środowisku tkankowym, materiałem najczęściej wykorzystywanym do wytwarzania implantów międzykręgowych jest polieteroeteroketon (PEEK). PEEK charakteryzuje się wysoką trwałością, stabilnością właściwości mechanicznych w środowiskach wodnych oraz modułem Younga zbliżonym do naturalnej kości. Ważną cechą tego polimeru jest również radioprzezierność, która z jednej strony umożliwia dobre obrazowanie tkanki kostnej przerastającej wokół implantu, brak powstawania artefaktów w obrazach TK i MRI oraz wysoką odporność radiacyjną pozwalającą na kilkukrotną sterylizację promieniami gamma. Utrudnia to jednak wykrycie uszkodzenia implant oraz kontrolowanie jego położenia w przypadku relokacji [69], [78], [79]. Główną wadą implantów wykonanych z PEEK jest ich słaba integracja z tkanką kostną ze względu na ograniczoną adhezję komórek kostnych do polimeru. W badaniach wykazano również skłonność do tworzenia biofilmu na powierzchni PEEK co dodatkowo ogranicza fuzję [42].

W chirurgii kręgosłupa PEEK wykorzystywany jest również do wytwarzania półsztywnych prętów. Dzięki wysokiej bioobojętności oraz właściwościom mechanicznym zbliżonym do właściwości kości pręty z PEEK mogą ściślej przylegać do kręgosłupa zapewniając porównywalną stabilność co pręty z tytanu i jego stopów przy zachowaniu bardziej fizjologicznego przenoszenia obciążeń przez kręgosłup. Dzięki temu rzadziej dochodzi do uszkodzeń w obrębie nieleczonych segmentów kręgosłupa sąsiadujących z stabilizowanym fragmentem [69], [71]

2.1.4. Implanty kompozytowe

Złożone wymagania stawiane implantom międzykręgowym oraz brak idealnego materiału, który łączyłby wszystkie zalety poszczególnych rozwiązań skłania naukowców i producentów implantów do opracowywania hybrydowych rozwiązań kompozytowych, które mogą łączyć zalety różnych materiałów niwelując jednocześnie ich wady. Jednym z najczęściej stosowanych połączeń jest wytworzenie rdzenia implantu z PEEK i połączenie

go z płytkami krańcowymi wykonanymi z tytanu (Ryc.9.). Połączenie to pozwala na uzyskanie korzystnych własności mechanicznych dla rdzenia implantu oraz lepszą osteointegrację płytki krańcowej ze stabilizowanymi kręgami. Rozwiązanie to jednak nie jest idealne, ponieważ takie połączenie materiałów może ulegać rozwarstwieniu [31], [69], [80].



Ryc.9. Przykładowy implant kompozytowy wykonany z PEEK i płytek tytanowych[31]

2.1.5. Wysokoporowate implanty drukowane

Od nowoczesnych implantów międzykręgowych oczekuje się by ich stosowanie ograniczyło liczbę powikłań będących następstwem zabiegu spondylodezy. Konieczne jest więc zapewnienie szybkiej osteointegracji z wytworzenie fuzji kręgów. Aby to osiągnąć konieczne jest zapewnienie dobrych własności powierzchniowych implantu przy równoczesnym uzyskaniu korzystnych warunków pod względem biomechanicznym. Aktualnie badania ukierunkowane są na doskonalenie technologii addytywnych, które otwierają nowe perspektywy dla opracowywania zaawansowanych implantów wysokoporowatych. Choć implanty wytwarzane addytywnie nadal są obiektem wielu badań coraz częściej znajdują rzeczywiste zastosowanie kliniczne [29], [31], [64], [81].

Drukowane, metalowe implanty kręgosłupowe pozwalają na uzyskanie dobrych warunków do osteointegracji dzięki wykorzystaniu tytanu i jego stopów. Zastąpienie litej konstrukcji strukturą porowatą umożliwia uzyskanie metamateriału, którego własności mechaniczne wynikają nie tylko z właściwości materiału, ale również jego makrostruktury. Sztywność implantów wysokoporowatych wykonanych z Ti6Al4V jest bardzo zbliżona do własności tkanki kostnej. Dzięki temu możliwe jest ograniczenie efektu ekranowania niekorzystnie wpływającego na remodeling tkanki kostnej. Wolne przestrzenie przy odpowiedniej strukturze skafoldu umożliwiają penetrację tkanki w głąb implantu. Dzięki temu uzyskiwany interlocking jest bardzo stabilny, a wytworzona wewnątrz implantu tkanka kostna uniemożliwia jego rotacje i przemieszczanie. Mimo, iż implanty tego typu stosowane są klinicznie, a pierwszy implant kręgosłupowy wytworzony addytywnie został wszczepiony ponad 15 lat temu środowisko naukowe nie jest zgodne co do parametrów

jakimi powinien charakteryzować się wysokoporowaty implant międzykręgowy. Abstrahując od kwestii materiałowych i potencjalnych modyfikacji pozwalających na poprawę biokompatybilności implantu, (co zostanie omówione w kolejnych rozdziałach) najistotniejszym zagadnieniem związaną z wysokoporowatymi implantami drukowanymi jest charakterystyka ich porowej struktury [11], [82], [83], [84], [85].

Struktura wytworzonych porów oraz ich wielkość determinuje dynamikę procesów osteointegracyjnych. Przestrzeń wewnątrz implantu musi być zaprojektowana w taki sposób, aby możliwa była nie tylko penetracja osteocytów w głąb implantu, ale również zapewniona była przestrzeń do dojrzewania tkanki kostnej o właściwej budowie i waskularyzacji. Jednocześnie implant musi charakteryzować się odpowiednimi własnościami mechanicznymi. Ze względu na szerokie możliwości jakie dają technologie addytywne teoretycznie możliwe jest projektowanie implantów, które, podobnie jak tkanka kostna, charakteryzowałyby się losowym ukształtowaniem porów o różnych rozmiarach. To podejście praktycznie uniemożliwia prowadzenie badań i ilościową analizę wpływu poszczególnych czynników na uzyskane wyniki terapeutyczne. Stąd implanty wysokoporowate oparte są zazwyczaj na rusztowaniach zbudowanych na cyklicznie powtarzających się komórkach elementarnych. Architektura tych komórek oraz ich wielkość determinuje ostateczne własności wytwarzanych implantów [28], [85], [86], [87], [88], [89].

Analiza literatury dotyczącej rusztowań kostnych nie dostarcza jasnej odpowiedzi na pytanie o optymalny rozmiar porów zapewniających dobry przerost tkanki kostnej. Podaje się, że rozmiar porów umożliwiający tworzenie się tkanki w ich wnętrzu zawiera się w przedziale od 100 do 600 μm [90]. Badania przeprowadzone przez Taniguchi N. i in. [91] na rusztowaniach o rozmiarach porów 300, 600 i 900 μm wykazały, że struktury o mniejszych porach (300 μm) mogą ograniczać dojrzewanie tkanki kostnej i zmniejszać wiązanie między tkanką a implantem. Mniejszej siły wiązania było również widoczne dla największych porów (900 μm). Zjawisko ograniczonego tworzenia się dojrzałej tkanki kostnej w porach o większych średnicach zostało również zaobserwowane przez innych badaczy. Miało to związek z opóźnionym tworzeniem się macierzy zewnątrzkomórkowej pozwalającej na wytwarzanie dojrzałej tkanki. W większości przytoczonych badań najlepsze efekty uzyskiwane były dla porów z zakresu 400-600 μm [28], [85], [87], [92], [93]. Jednak badania zespołu B. Chang [94] przyniosły inne wnioski – sugerują one, że użycie mniejszych porów (188 μm) może przełożyć się na szybszą inicjację procesów tworzenia kości. Wyniki te są podobne do badań LN. Teixeira [95], które wykazują

znacznie wyższą ekspresję komórek przy użyciu bardzo małych porów (62 μm). Tutaj jednak należy wziąć pod uwagę, że krótkoterminowe korzyści wynikające z samego rozpoczęcia integracji implantu z kością nie mogą być preferowane nad długoterminowymi korzyściami wynikającymi z zapewnienia odpowiedniego odżywienia i unaczynienia powstającej tkanki.

3. Druk 3D w medycynie

Obiecującą technologią produkcyjną dla rozwoju medycyny jest druk 3D stanowiący jedną z najważniejszych technologii XXI wieku [96]. Druk 3D, do którego zalicza się wiele technologii wytwarzania addytywnego, oferuje szeroki zakres dostępnych materiałów i ostatecznych właściwości wytwarzanych elementów. Dlatego znajduje on zastosowanie przy wytwarzaniu zarówno modeli anatomicznych wykorzystywanych podczas nauki, treningu lekarskiego czy planowaniu operacji, ale również wyrobów medycznych takich jak ortezy i protezy, narzędzia chirurgiczne i stomatologiczne, implanty kostne i stomatologiczne, rusztowania tkankowe, modele tkanek, opatrunki czy nośniki leków [82], [97], [98], [99], [100], [101]. Ważnym aspektem związanym z drukiem 3D jest duża łatwość wprowadzania modyfikacji w ramach wytwarzanego elementu. Dzięki temu możliwa jest nie tylko produkcja seryjna, ale również produkcja małoseryjna lub wręcz spersonalizowana. Możliwe jest więc wytwarzanie zarówno implantów klasycznych produkowanych w pewnym typoszeregu, mających na celu zaspokojenie potrzeby szerokiej grupy pacjentów, ale również implantów spersonalizowanych projektowanych dla konkretnego pacjenta [100], [102].

Istotą wytwarzania przyrostowego jest warstwowe tworzenie fizycznego elementu na podstawie numerycznego pliku opisującego geometrię 3D stworzonego z wykorzystaniem oprogramowania 3D-CAM lub inżynierii odwrotnej. Addytywny sposób wytwarzania pozwala na produkcję elementów o skomplikowanym kształcie oraz złożonej strukturze wewnętrznej, które przy użyciu tradycyjnych technik wytwarzania wymagałyby wieloetapowej obróbki i/lub łączenia wielu wytworzonych elementów [96], [101], [103].

Mimo wielu zalet technologii przyrostowe obarczone są również wadami i ograniczeniami, które mimo ciągłego rozwoju technologii przyrostowych stanowią wyzwanie zarówno dla naukowców jak i producentów. Niezależnie od wybranej technologii druku 3D wytworzone elementy wymagają obróbki poprocesowej mającej na celu oczyszczenie wytworzonego przedmiotu z konstrukcji podporowych i niezwiązanego

w trakcie procesu przyrostowego materiału oraz nadanie elementowi ostatecznych własności materiałowych [96]

Własności wyrobów wytwarzanych przyrostowo zależą od wybranej technologii oraz dobranego do niej materiału. Termin technologie przyrostowe obejmuje szeroką gamę technik wytwarzania, w których element produkowany jest stopniowo, poprzez warstwowe nakładanie, spajanie bądź utwardzanie materiału. Zgodnie z normą ISO/ASTM DIS 52900 wśród technologii przyrostowych można wyróżnić[96]:

- fotopolimeryzacje objętościową,
- wytłaczanie warstwowe materiału,
- selektywne spajanie sproszkowanego materiału,
- ukierunkowane stapianie dostarczonego materiału,
- warstwowy nadruk płynnego materiału,
- spajanie sproszkowanego materiału płynnym spoiwem,
- laminacje warstwową.

3.1. Selekttywne topienie laserowe w medycynie

Rozwój medycyny nierozdzielnie związany jest z rozwojem technologii wytwarzania, które umożliwiają wdrażanie nowych rozwiązań do zastosowań klinicznych. Implanty wytwarzane tradycyjnymi technologiami tj. odlewnictwo, obróbka ubytkowa czy obróbka plastyczna, charakteryzują się udowodnionym bezpieczeństwem stosowania i skutecznością. Mimo ciągłego doskonalenia techniki te, nie zapewniają wystarczających możliwości wytwarzania elementów o bardzo złożonym kształcie i strukturze. Co więcej, charakteryzują się wysokimi kosztami wytwarzania związanymi z koniecznością dostosowywania osprzętu i narzędzi, co jest szczególnie istotne w przypadku produkcji małoseryjnej lub jednostkowej. Ukierunkowanie rozwoju medycyny na jej personalizację, a więc jak najlepsze dopasowanie techniki leczenia do potrzeb konkretnego pacjenta wymaga przekierowania produkcji implantów z technologii tradycyjnych na technologie addytywne tj. druk 3D, a w szczególności selektywne spajanie sproszkowanego materiału[96].

W kontekście zastosowań biomedycznych porównując do technologii tradycyjnych SLM charakteryzuje się:

- możliwością szybkiego prototypowania i wykonania wyrobu próbnego o cechach właściwych dla docelowego wyrobu w celu walidacji projektu przed rozpoczęciem produkcji wieloseryjnej.
- krótszym cyklem życia produktu, łatwym wdrażaniem modyfikacji bez konieczności adaptacji używanych urządzeń i narzędzi oraz stosunkowo krótką ścieżką technologiczną pozwalającą na uzyskanie gotowego produktu.
- możliwością produkcji małoseryjnej lub jednostkowej oraz personalizacji pojedynczych wyrobów
- prawie nieograniczonymi możliwościami, jeśli chodzi o kształt wytwarzanych elementów, w tym skomplikowanych, ściśle zaprojektowanych struktur porowych, rusztowań i metamateriałów niemożliwych do wytworzenia technikami tradycyjnymi
- małą ilością odpadów nierecyklingowalnych i niskim zużyciem materiałów w trakcie procesu [83], [103], [104], [105].

Własności elementów wytwarzanych SLM determinowane są przez własności przetwarzanego materiału w postaci proszku oraz parametrów procesu spiekania. Modyfikując parametry procesu można zmieniać końcowe własności elementu na pożądane dla danego wyrobu (Tab.1.) [104], [105].

Tab.1. Parametry procesu SLM i materiału wyjściowego determinujące własności wytwarzanego elementu [105]

Materiał wyjściowy	Drukarka SLM
<ul style="list-style-type: none"> • Maksymalna wielkość cząstek • Rozkład wielkości cząstek • Kształt i morfologia cząstek • Skład chemiczny • Przewodność cieplna • Absorpcyjność • Odbicie • Ciepło właściwe • Temperatura topnienia • Lepkość • Napięcie powierzchniowe • Zanieczyszczenia 	<ul style="list-style-type: none"> • Typ lasera • Moc lasera • Prędkość skanowania • Gęstość linii skanowania • Grubość warstwy • Rozmiar plamki wiązki laserowej • Materiał podłoża • Temperatura podłoża • Środowisko w komorze roboczej • Przepływ gazu

Mnogość parametrów możliwych do modyfikacji oraz charakterystyka procesu spiekania sprawia, że proces SLM nie jest pozbawiony wad. Gradienty termiczne oraz szybkie krzepnięcie metalu konieczne do wytworzenia drukowanego elementu może

skutkować powstawaniem faz nierównowagowych i naprężeń resztkowych oraz specyficznej orientacji ziaren wewnątrz materiału. To zaś bezpośrednio przekłada się na własności wytworzonego elementu: chropowatość powierzchni, gęstość, mikrostrukturę oraz anizotropowe własności mechaniczne zależne od położenia i orientacji obiektu w komorze podczas jego wytwarzania. W trakcie procesu spajania topiony materiał łączy się dzięki siłom kapilarnym oraz grawitacji bez dodatkowego ciśnienia co utrudnia uzyskanie pełnej gęstości materiału bez porów wewnętrznych.

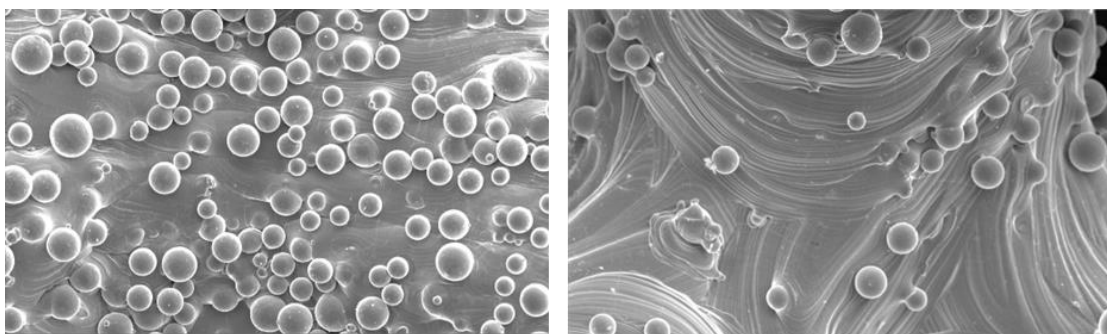
Obecność mikroporów wynika m.in. z obecności wtrąceń oraz niejednorodnej rozpuszczalności pierwiastków stopowych w przetwarzanym materiale. W przypadku stopów, w których występują znaczące różnice między temperaturą topnienia poszczególnych pierwiastków może dojść do dużej niejednorodności materiału w docelowym wyrobie co może się przekładać na zwiększoną awaryjność oraz możliwość powstawania deformacji. Dla przykładu, badania Pesode'a i Barve'iego [107] wykazały, że w przypadku stopu $Ti_{24}Zr_4Nb_8Sn$ w trakcie proces spajania SLM może dochodzić do odparowywania cyny, która charakteryzuje się znacząco niższą temperaturą topnienia i parowania niż pozostałe pierwiastki. W przypadku zastosowania stopów zawierających pierwiastki o wysokich temperaturach topnienia konieczne jest zastosowanie wyższej mocy i gęstości lasera. To zaś przekłada się na poszerzenia jeziora przetopu co ogranicza dokładność wydruku oraz powoduje konieczność zwiększenia grubości pojedynczej warstw. W przypadku zbyt dużej energii dostarczanej przez laser może dodatkowo dochodzić do tworzenia się żużlu, który wpływa na jednorodność i ciągłość materiału oraz pogarsza jakość powierzchni. Badania zespołu Li [106] wykazały również, że wraz ze wzrostem mocy lasera, nawet przy zachowaniu tej samej gęstości energii zwiększa się anizotropia materiału i pogarszają się własności mechaniczne [106], [107], [108]. W kontekście inżynierii biomedycznej powoduje to ograniczenia rzeczywistej dostępności materiałów możliwych do wykorzystania na implanty wytwarzane technologią SLM.

Stop $Ti6Al4V$ o temperaturze topnienia $<1700^{\circ}C$ charakteryzuje się dobrą biokompatybilnością, jednak ze względu na obecność Al i V środowiska naukowe sugerują konieczność jego zastąpienia stopami nowszych generacji [109], [110], [111], [112]. Na rynku dostępne są takie stopy jak np. Ti-Nb-Zr, Ti-Nb-Ta-Zr, Ti-Nb-Mo-Zr, Ti-Mo-Zr, jednak wszystkie one oparte są na pierwiastkach charakteryzujących się wysoką temperaturą topnienia $>2500^{\circ}C$. Analiza literatury, szczególnie w zakresie implantów stosowanych w praktyce klinicznej wykazuje, że $Ti6Al4V$ jest głównym materiałem wykorzystywanym do wytwarzania wysokoporowatych implantów ortopedycznych [113],

[114], [115], [116]. Ma to związek zarówno z możliwościami technologicznymi, ale również ze względami ekonomicznymi i dostępnością materiału. Warto zauważyć, że lite elementy wykonane z $Ti_{24}Zr_{4}Nb_8$ czy $Ti_{13}Nb_{13}Zr$ mają zbliżone własności mechaniczne do kości. Jednakże w przypadku wysokoporowatych struktur o porach dostatecznie dużych, by zapewnić tkance kostnej odpowiednie warunki do przerostu w głąb implantu ich wytrzymałość mechaniczna może okazać się zbyt niska, a sprężystość niedopasowana do własności tkanki kostnej. Tymczasem w badaniach udowodniono, że implanty wytworzone z $Ti6Al4V$ o odpowiedniej porowatości, mogą charakteryzować się własnościami mechanicznymi odpowiadającymi własnościom tkanki kostnej [86], [89], [117]

Cechą charakterystyczną dla technologii proszkowych jest obecność nie w pełni stopionych cząstek proszku na powierzchni wytwarzanych elementów (Ryc.10.). Ułożenie cząstek jest przypadkowe, ponieważ wynika ze specyficznego rozmieszczenia ziaren o skończonej gradacji wewnątrz komory roboczej w trakcie procesu. Miejsca koncentracji ziaren oraz gęstość ich występowania zależy od kierunku przepływu ciepła w miejscach przetapiania materiału proszkowego oraz ułożenia i orientacji poszczególnych płaszczyzn do których mogą przylec nieprzetopione ziarna. Ponieważ ziarna połączone są z powierzchnią poprzez ich częściowe wtopienie w drukowany element ich usunięcie jest trudne. Można je usunąć poprzez obróbkę powierzchniową wykorzystującą metody [105], [118], [119]:

- mechaniczne – piaskowanie, bębnowanie, polerowanie;
- chemiczne – trawienie;
- elektrochemiczne tj. polerowanie elektrochemiczne;
- fizyczne – polerowanie magnetyczne lub obróbka cieplna.



Ryc.10. Powierzchnie skafoldu wytworzonego z $Ti6Al4V$ w technologii SLM. Lewe zdjęcie: powierzchnia wewnętrzna, nieprostopadła do płaszczyzny wydruku. Prawe zdjęcie: powierzchnia górna równoległa do płaszczyzny wydruku[120]

Obecność nie w pełni przetopionego proszku jest najbardziej problematyczna w przypadku skafoldów. Cząstki osiadające na powierzchni wpływają na rzeczywiste światło poszczególnych porów obniżając rzeczywistą porowatość implantów. Ze względu na złożony kształt i ograniczone możliwości penetracji utrudnione jest również usunięcie ziaren i uzyskanie jednakowej powierzchni w całej objętości próbki. Warto mieć również na uwadze, że w przypadku skafoldów charakteryzujących się stosunkowo niską średnicą belek, w porównaniu do pojedynczych cząstek osadzonych na powierzchni skafoldu procesu usuwania osadzonego proszku może skutkować obniżeniem wytrzymałości mechanicznej całego rusztowania. Badania zespołu Surmeneva [121] wykazały, że choć polerowanie elektrolityczne pozwoliło na usunięcie ziaren z belek w całej objętości skafoldu zabieg ten spowodował spadek wytrzymałości na ściskanie badanych próbek o prawie 20%. Pyka [122], [123] wraz z zespołem opracował protokół trawienia chemicznego skafoldów wykonanych z Ti6Al4V, który pozwolił na usunięcie cząstek z całej objętości próbki. W badaniach tych również wykazano, że trawienie w znaczący sposób wpływa na kształt i grubość belek co wiązało się z 20- 30% utratą sztywności skafoldów.

Badania Pyki[124] prowadzone w warunkach *in vitro* wykazały, iż wygładzenie powierzchni z wykorzystaniem metod chemicznych pozwoliło na bardziej jednorodną proliferację komórek na powierzchni skafoldu. Potwierdzają to badania Pattanayaka [125], który oprócz trawienia chemicznego zastosował wyżarzanie w temperaturze 1300°C. Choć zespół Fukuda [92] potwierdził dobrą proliferację komórek na podłożu Ti6Al4V przy zastosowaniu podobnej obróbki post-produkcyjnej, w badaniach tych nie były prowadzone pomiary dla niemodyfikowanej grupy kontrolnej stąd nie można stwierdzić na ile zastosowana modyfikacja wpłynęła na odpowiedź komórkową. Tu warto zwrócić uwagę, że zastosowanie obróbki termicznej w celu ujednoczenia struktury powierzchni może negatywnie wpływać na pozostałe parametry materiałowe modyfikowanego implantu. Choć ze względu na szybkie chłodzenie materiału w trakcie procesu SLM obróbka termiczna gotowych wyrobów jest konieczna, standardowo jest ona prowadzona w temperaturze 700- 800°C[66]. Zgodnie z badaniami zastosowanie wyższych temperatur może obniżać wytrzymałość mechaniczną, ciągliwość materiału oraz twardość. Badania Orłowskiej[120], [126] nie wykazały wpływu obróbki termicznej na topografię powierzchni. Równocześnie w badaniach tych potwierdzono zmianę struktury oraz spadek plastyczności skafoldów poddanych procesowi wyżarzania w wyższych temperaturach.

Mimo przedstawionych powyżej badań konieczność usunięcia cząstek podczas obróbki post-produkcyjnej jest dyskusyjna. Badania zespołów Thomasena i Biemonda [127], [128] nie wykazały różnic w proliferacji komórek przy zastosowaniu modyfikacji powierzchniowej. Co więcej w badaniach Wall'a wykazano, że chemiczna modyfikacja powierzchni próbek wytworzonych z wykorzystaniem technologii SLM, powodująca zmianę kąta zwilżalności powierzchni bez ingerencji w jej chropowatość również polepszyła odpowiedź komórkową osteocytów i zapewniła ich lepszą integrację z powierzchnią oraz późniejszą proliferację. Istotną hipotezą może więc okazać się ta przedstawiona w pracy Ponedera [129], zgodnie z którą istnieje pewna wartość graniczna chropowatości, która determinuje zdolność osteocytów do prawidłowej proliferacji na powierzchni implantów wytwarzanych addytywnie [86], [130].

Pomimo licznych badań dotyczących metod modyfikacji powierzchni elementów wytwarzanych SLM, w szczególności skafoldów przeznaczonych do zastosowań medycznych w publikacjach przedstawiających wyniki badań prowadzonych *in vitro* oraz badań klinicznych brakuje często danych dotyczących obróbki post-produkcyjnej obejmującej więcej zabiegów niż czyszczenie ultradźwiękowe oraz wyżarzanie [28], [91], [114], [131], [132], [133], [134]. Alternatywę dla oczyszczania powierzchni z nie w pełni przetopionych ziaren w procesie SLM może stanowić modyfikacja elektrochemiczna powierzchni, która pozwala nie tyle usunąć ziarna, co przebudować całą warstwę powierzchniową. W przypadku zastosowania wysokoprądowych modyfikacji w postaci plazmowego/mikrołukowego utleniania elektrolitycznego dochodzi do lokalnego wzrostu temperatury, powstawania plazmy i przetapiania materiału. Dzięki temu granice cząstek osadzonych na powierzchni ulegają ponownemu spieczeniu, co zmniejsza prawdopodobieństwo występowania wadliwych połączeń. Równocześnie na powierzchni modyfikowanych w ten sposób elementów powstaje warstwa pasywna o zmienionych własnościach i potencjalnie lepszej biofunkcjonalności [116], [135], [136], [137].

3.2. Regulacje i bezpieczeństwo wykorzystanie druku 3D w medycynie

Proces wdrażania wyrobów medycznych na rynek oraz dopuszczenie ich do zastosowań klinicznych jest ściśle określony przez przepisy i regulacje. W Polsce zasady te regulowane są przez Ministerstwo Zdrowia oraz Europejską Agencję Leków na podstawie ustaw i rozporządzeń krajowych, jak również dyrektyw i rozporządzeń europejskich. Przed dopuszczeniem produktu do zastosowań medycznych konieczne jest przeprowadzenie procedury oceny zgodności właściwej dla danego wyrobu, sporządzenie

deklaracji i uzyskanie certyfikatu zgodności oraz umieszczenie na wyrobie znaku CE. Dokładny proces oceny zgodności ściśle zależy od rodzaju certyfikowanego produktu, który klasyfikowany jest w zależności m.in. od zastosowania, miejsca i całkowitego czasu użycia, potencjalnego kontaktu z określonymi tkankami czy płynami ustrojowymi oraz ewentualnego sposobu zasilania lub pełnionej funkcji pomiarowej [138], [139]. O ile dla wyrobów najniższej klasy ocenę zgodności może przeprowadzić producent, dla wyrobów wyższych klas proces ten musi być prowadzony przez jednostkę notyfikowaną. Ocena zgodności przeprowadzana jest na podstawie norm określonych dla danego wyrobu. Głównym dokumentem określającym wymogi stawiane wyrobom medycznym jest rozporządzenie MDR 745 wydane przez Parlament Europejski w 2017 roku.

Mimo, iż wyroby medyczne wytwarzane metodami przyrostowymi stosowane są klinicznie od wielu lat, a pierwsze wysokoporowate drukowane implanty kręgosłupowe zostały wszczepione do organizmu prawie 15 lat temu [29] nadal brakuje jasnych wytycznych związanych z szczególną oceną bezpieczeństwa ich stosowania. Tyczy się to głównie implantów spersonalizowanych, elementów produkowanych w sposób zdecentralizowany, drukowanych implantów hybrydowych oraz biodruku. Abstrahując od trudności związanych z klasyfikacją niektórych wyrobów medycznych wytwarzanych addytywnie [140], głównym problemem związanym z opracowaniem szczegółowych wytycznych dotyczących sposobu ich certyfikacji jest stały rozwój technologii przyrostowych oraz mnogość czynników mogących wpłynąć na ostateczne własności produkowanego implantu. Ostateczne własności elementów wytwarzanych addytywnie mogą zależeć nie tylko od zastosowanego materiału, postaci konstrukcyjnej oraz parametrów wytwarzania takich jak gęstość i energia wiązki laserowej, prędkość skanowania czy wysokość warstwy, ale również orientacji elementu podczas wytwarzania, wilgotności środowiska czy specyficznego ułożenia poszczególnych ziaren materiału spiekanego podczas procesu druku 3D [140], [141]. Ostatecznie przyjęto, że wyroby medyczne spersonalizowane i wykorzystywane w przypadku leczenia chorób rzadkich zwolnione są z konieczności nadania im znaku CE, który przyznawany jest elementom produkowanym masowo.

Unikalny proces wytwarzania implantów drukowanych, szczególnie w przypadku implantów spersonalizowanych lub przeznaczonych do leczenia chorób rzadkich, niesie za sobą nowe wyzwania w zakresie opracowania norm i regulacji umożliwiających kontrolę wysokich wymagań stawianych wyrobom medycznym. W Stanach Zjednoczonych Agencja ds. Żywności i Leków (FDA) w roku 2016 wprowadziła dyrektywę “Technical

consideration for additive producing medical device” opisującą konieczność bardziej szczegółowej kontroli własności implantów wytwarzanych addytywnie szczególnie w zakresie zgodności wymiarowej, wykończenia powierzchni oraz własności mechanicznych. Kontrola ta powinna być prowadzona w oparciu o próbkę kontrolną, której uzyskanie w przypadku jednostkowego wyrobu może być problematyczne lub niemożliwe. Możliwość wytwarzania przyrostowego specyficznych rozwiązań dla wąskiej grupy pacjentów wymaga określenia wytycznych, które pozwolą na opracowanie nie tyle sposobu oceny konkretnego wyrobu spełniającego wszystkie wymogi, lecz certyfikacji samego procesu, który zapewniłby wytworzenie wyrobu o określonych własnościach spełniających wymagania.

Aktualnie wyroby medyczne wytwarzane addytywnie mogą być oceniane w oparciu o standardowe normy tj. ISO 10993 (*Biologiczna ocena wyrobów medycznych*), ISO 13485 (*System zarządzania jakością dla wyrobów medycznych*), ISO 5900-52950 (*Produkcja addytywna – Zasady ogólne*). Dodatkowo ISO jest w trakcie wdrażania normy ISO/DIS 5092(en) (*Additive manufacturing for medical — General principles — Additive manufacturing of non- active implants*), która dedykowana będzie ściśle dla wyrobów wytwarzanych przyrostowo, jednak w obliczu ciągłej zmiany i rozwoju technologii przyrostowych może okazać się niewystarczająca [139], [140], [141], [142].

4. Implanty tytanowe stosowane w chirurgii kręgosłupa

4.1. Charakterystyka tytanu i jego stopów

Tytan i jego stopy, szczególnie Ti6Al4V stanowią jedne z najczęściej stosowanych biomateriałów metalowych. Do zastosowań medycznych wprowadzony zostały w połowie XX w. i z powodzeniem znajdują zastosowanie w wielu dziedzinach medycyny m. in. W ortopedii (endoprotezy stawowe, płytki i wkręty kostne, implanty kostne, w tym implanty kręgosłupowe, gwoździe śródszpikowe), stomatologii (wszczepy filarowe, implanty zębowe, protezy i mosty stomatologiczne) i kardiologii (stenty, zastawki serca, pompy). W porównaniu do innych materiałów metalowych charakteryzują się wysoką odpornością korozyjną, niską gęstością, dobrą biogodnością oraz dobrymi własnościami mechanicznymi. Dodatkowo obecność implantów tytanowych w organizmie pozwala na stosowanie diagnostyki obrazowej tj. MRI i TK dzięki dobrej widoczności fluoroskopowej, własnościom paramagnetycznym oraz niskim prawdopodobieństwie powstawania artefaktów [66], [143].

Tytan występuje w dwóch odmianach alotropowych α i β . Odmiana α , stabilna w temperaturze $<882^{\circ}\text{C}$ charakteryzuje się strukturą heksagonalną A3. Powyżej tej temperatury struktura tytanu przekształca się w odmianę β o sieci regularnej, przestrzennie centrowanej. Odmiana β występuje aż do temperatury topnienia (1668°C). Gęstość tytanu zależy od udziału poszczególnych odmian alotropowych i czystości wynosząc od 4,3 do $4,5\text{g}/\text{cm}^3$. Czysty tytan jest trudny do uzyskania. Norma ASTM B265 wyróżnia 5 gatunków tytanu (Grade 1-4 oraz 7), które różnią się domieszkami pierwiastków żelaza ($0,2\div 0,05\%$), azotu ($0,03\div 0,05\%$) oraz tlenu ($0,05\div 0,035\%$). Mimo niskiej zawartości tych pierwiastków mają one znaczący wpływ na właściwości mechaniczne określonego stopu – w zależności od ich dokładnego udziału wytrzymałość na rozciąganie (R_m) może wynosić od 240 do 550 MPa, a granica plastyczności ($R_{p0,2}$) od 170 do 480 MPa. Ze względu na utrudnioną ocenę dokładnego udziału pierwiastków, szczególnie azotu i tlenu w stopie, to właśnie właściwości mechaniczne pozwalają na określenie klasy tytanu [144], [145].

Dla stopów tytanu, struktura w stanie równowagi stanowi kryterium podziału pozwalające na klasyfikację stopów. Stopy te można podzielić na trzy rodzaje – jednofazowe α lub β oraz dwufazowe $\alpha+\beta$. Struktura w stanie równowagi zależy w głównej mierze od obecności i procentowego udziału poszczególnych pierwiastków stopowych. Wśród pierwiastków stabilizujących fazę α należy wymienić Al, Ge oraz O, N i C. Pierwiastki stabilizujące fazę β można podzielić na pierwiastki izomorficzne (V, Nb, Mo, Ta), eutektoidalne (Cu, Mn, Cr, Fe, Co, Ni, Si) oraz pseudoizomorficzne (Ru, Re, Rh, Ir). Ze względu na różny wpływ poszczególnych grup pierwiastków na właściwości materiałów pożądane są stopy zawierające pierwiastki izomorficzne, które umożliwiają stabilizację fazy β nawet w temperaturze 25°C . Pierwiastki eutektoidalne wykazują mniejszą stabilność i w warunkach wolnego chłodzenia mogą ulegać rozpadowi eutektoidalnemu. W stopach tytanu występują również takie pierwiastki jak Sn, Ge, Zr, Hf i Th, jednak nie mają one wpływu na strukturę α/β . Dodatkowo dokładne właściwości stopów i ich strukturę można kształtować za pomocą odpowiedniej obróbki cieplnej i plastycznej. Struktura α i β charakteryzują się odmiennymi właściwościami. W medycynie szczególnie pożądane są materiały o strukturze $\alpha+\beta$, które zapewniają większą wytrzymałość na rozciąganie, lepszą odporność zmęczeniową oraz odporność korozyjną [66], [146], [147].

Tytan i jego stopy można formować z wykorzystaniem obróbki ubytkowej, plastycznej oraz z wykorzystaniem metod addytywnych. Jednakże z uwagi na niską skrawalność oraz wysoką twardość preferowana jest obróbka plastyczna na ciepło i zimno lub coraz częściej technologie przyrostowe. W przypadku obróbki plastycznej na zimno

możliwe jest uzyskanie dwukrotnego wzrostu wytrzymałości mechanicznej. Obróbkę termiczną pozwalającą na rekrytalizację i usunięcie skutków zgniotu prowadzi się zazwyczaj w temperaturze 700- 800 °C, a obróbkę plastyczną na ciepło w temperaturach 750-1000°C.

Tytan charakteryzuje się wysoką reaktywnością i wysokim powinowactwem do tlenu szczególnie w temperaturze powyżej 120°C. Posiada on zdolność do samopasywacji podczas której powierzchnia materiału ściśle pokrywa się związkami tlenkowymi. TiO_2 stanowiący główny, choć nie jedyny składnik w tworzącej się warstwie pasywnej charakteryzuje się wysoką stabilnością, dzięki czemu tytan i jego stopy są odporne na korozję. Dodatkowo w warstwie pasywnej obecne są Ti_2O_3 i TiO , a w przypadku stopów również tlenki niektórych pierwiastków stopowych [66], [148].

Spośród stopów tytanu dostępnych komercyjnie $Ti6Al4V$ znajduje najszersze zastosowanie w medycynie. Stop ten używany jest szczególnie często w ortopedii do wytwarzania implantów kostnych i stawowych. $Ti6Al4V$ jest stopem dwufazowych $\alpha+\beta$. Nadaje się on do obrabiania plastycznego przez kucie, prasowania, walcowania i ciągnięcia, a także z powodzeniem przetwarzany jest z wykorzystaniem prozkowych metod addytywnych tj. SLM (ang. Selective Laser Melting), DMLS (ang. Direct Metal Laser Sintering), EDM (ang. Electron Beam Melting). Ze względu na wysoką reaktywność z gazami atmosferycznymi, szczególnie tlenem, przetwarzanie $Ti6Al4V$ wymaga obecności gazów ochronnych, a obróbka plastyczna musi odbywać się w kontrolowanych warunkach zapewniających czystość warstwy wierzchniej przetwarzanego materiału [66], [148]. Mimo udowodnionej biokompatybilności, wysokiej odporności korozyjnej, dobrej obrabialności i korzystnych własności mechanicznych zwłaszcza w porównaniu ze stopami innych metali stosowanych w medycynie naukowcy zgłaszają zastrzeżenia dotyczące wykorzystania tego materiału do zastosowań medycznych. Wynika to głównie z obecności glinu i wanadu, których obecność w organizmie może mieć niekorzystne skutki lokalne i ogólnoustrojowe. Wanad jest pierwiastkiem cytotoksycznym i może prowadzić do zaburzeń neurologicznych. Obecność glinu może powodować zmiękczenie kości, uszkadzać komórki nerwowe oraz wpływać na aktywność enzymów i neuroprzekaźników, które mogą skutkować pojawieniem się chorób mózgu i naczyń krwionośnych [109], [110], [149]. Obecnie na rynek, w tym rynek medyczny wdrażane są inne stopy tytanu, które charakteryzują się podobnymi lub lepszymi własnościami mechanicznymi oraz lepszą odpornością korozyjną przy jednoczesnym wykluczeniu pierwiastków szkodliwych. Wśród nich na szczególną uwagę zasługuje $Ti13Nb13Zr$, który wykazuje całkowitą

biotolerancję i Ti35Nb5TaZr o najbardziej zbliżonych do tkanki kostnej własnościach mechanicznych.

Mimo potencjalnych zagrożeń wynikających z obecności w stopie pierwiastków szkodliwych oraz licznych badań nad stopami nowszych generacji dla medycyny nie zauważa się na razie tendencji do wykluczania Ti6Al4V z użycia na implanty. Spowodowane jest to dobrą dostępnością i konkurencyjnością cenową, ale także zdecydowanie lepszymi możliwościami technologicznymi zapewniającymi łatwiejsze kształtowanie implantów z wykorzystaniem technologii addytywnych (Rozdział 3.2) [114], [115]. Alternatywą dla zastąpienia Ti6Al4V jako materiału jest modyfikacja jego w powierzchni pozwalająca na wytwarzanie powłok i warstw barierowych zapewniających ograniczenie bądź całkowite wykluczenie dyfundowania szkodliwych pierwiastków do organizmu [116], [123], [127], [134], [135], [137], [150], [151].

4.2. Wpływ własności powierzchniowych stopów tytanu na ich interakcje z organizmem

Z punktu widzenia inżynierii biomedycznej czynnikiem decydującym o własnościach użytkowych i funkcjonalności implantów są jego własności powierzchniowe. Odpowiedź biologiczna ściśle zależy od interakcji na granicy implant – tkanka. Własności powierzchniowe są zależne od użytego materiału oraz sposobu wykonania elementu. Można je jednak zmieniać poprzez odpowiednie modyfikacje umożliwiające nadanie korzystniejszych cech powierzchniowych bądź wytworzenie warstwy barierowej między materiałem a środowiskiem zewnętrznym [152], [153]. Dzięki temu możliwe jest udoskonalenie biomateriału poprzez kształtowanie jego powierzchni w celu nadania jej określonego składu chemicznego i fazowego, struktury, określonej porowatości i topografii, twardości, odporności korozyjnej czy cech tribologicznych. Końcowe własności powierzchniowe nadawane implantom muszą spełniać wymagania wynikające z pełnionej przez dany implant funkcji oraz miejsca implantacji. Zazwyczaj dąży się do tego, aby wytworzone warstwy były jednorodne, charakteryzowały się wysoką adhezją do podłoża i stabilnością, a w przypadku powłok resorbowalnych kontrolowaną degradacją w środowisku tkankowym. Zastosowana modyfikacja powierzchniowa nie może wpływać na kształt implantu, a końcowa postać produktu po zastosowaniu wszystkich modyfikacji musi być możliwa do sterylizacji [66]

Proces integracji żywych komórek z implantem jest procesem złożonych. Jego specyficzny przebieg determinowany jest przez złożone własności powierzchniowe,

a ostateczna wynik z szeregu reakcji biologicznych zachodzących po wprowadzeniu implantu do organizmu (Rozdział.1.2.).

4.2.1. Skład chemiczny warstwy powierzchniowej

Skład chemiczny warstwy powierzchniowej jest jedną z kluczowych własności w kontekście interakcji implantu z organizmem. Obecność określonych pierwiastków oraz złożonych z nich związków wpływa na wiele własności powierzchniowych, a w konsekwencji własności użytkowych. Skład chemiczny wpływa na reakcję komórek na podłoże, determinuje własności elektryczne oraz określa pierwiastki, które potencjalnie mogą dyfundować z implantu do środowiska. Mimo, iż implanty, szczególnie implanty stałe, muszą charakteryzować się bardzo wysoką odpornością korozyjną, odporność ta jest zawsze skończona. W przypadku implantów tytanowych jest to szczególnie istotne, ponieważ jony metali mogą mieć niekorzystny wpływ na działanie organizmu zarówno lokalnie jak i ogólnoustrojowo. Jony metali mogą hamować lub pobudzać czynność białek enzymatycznych, które decydują o procesach immunologicznych i metabolicznych. Mogą być one uwalniane samoczynnie w wyniku procesów korozyjnych lub na skutek tarcia o inne elementy metalowe lub tkanki np. tkankę kostną. Uwalnianie i gromadzenie się pierwiastków metalicznych może prowadzić do pojawienia się w organizmie metalozy lub aseptycznego obłuzowania implantu. Aktywność metali z płynach ustrojowych i tkankach jest zależna od ich stężenia, dlatego istotna jest ich kontrola [67], [153], [157].

W biomateriałach metalowych wykorzystywane są pierwiastki metaliczne o różnym działaniu. Ich interakcja w dużym stopniu zależna jest od ich rozpuszczalności w tkankach oraz płynach ustrojowych. Ocena pierwiastków wchodzących w skład biomateriałów metalowych skupia się głównie na ocenie ich toksyczności. Poszczególne pierwiastki metaliczne można podzielić na toksyczne, średnio toksyczne oraz nietoksyczne. W badaniach Clarke'a i Hiskmana wykazano współzależność zwiększonych ubytków korozyjnych w roztworach fizjologicznych ze spadkiem biotolerancji. Steineman wykazał związek między biotolerancją, a odpornością korozyjną wynikającą z oporu polaryzacyjnego. Na tej podstawie możliwe jest wyróżnienie metali i ich stopów toksycznych, obojętnych dla organizmu oraz grupę pośrednią, która może być wykorzystana do zastosowań medycznych pod warunkiem wytworzenia na ich powierzchni warstwy pasywnej [149], [158], [159]. Wśród pierwiastków metalicznych wchodzących w skład stopów tytanu zaliczamy:

Tytan (obojętny) - stanowi główny pierwiastek wykorzystywany do produkcji implantów kostnych. Zaliczany jest do pierwiastków biogodnych, niewywołujących reakcji negatywnych ze strony organizmu. Wpływa na reaktywność osteoklastów stymulując ich różnicowanie. Nie wykazano jego wpływu na procesy metaboliczne w organizmie. Może jednak alergizować, a wzbudzona w ten sposób reakcja okołowszczepowa może skutkować obluzowaniem się implantu.

Niob, Tantal i Cyrkon (obojętny) zaliczane są do grupy pierwiastków nietoksycznych. Ich obecność nie wykazuje negatywnego wpływu na tkanki i są tolerowane nawet w dużych ilościach.

Glin (pośredni) - fizjologicznie nie uczestniczy w procesach biologicznych. W postaci Al_2O_3 jest dobrze tolerowany w organizmie. Przy dużych stężeniach w formie jonowej powoduje usztywnienie naczyń krwionośnych, bóle mięśni i rozmiękczenie kości mogące skutkować zwiększoną podatnością na złamania. Może również agregować w tkankach układu nerwowego powodując schorzenia o charakterze demencyjnym (choroba Alzheimera).

Wanad (toksyczny) - wykazuje działanie toksyczne nawet w niskich stężeniach. Jako produkt korozji w postaci V_2O_5 wykazuje rozpuszczalność w płynach ustrojowych, co umożliwia jego przenikanie do tkanek. Ma działanie neurogenne, może powodować stany zapalne, ból i osteolizę [67], [149], [159].

W przypadku wykorzystania $Ti6Al4V$ jako biomateriału, aby wykluczyć negatywny wpływ toksycznych pierwiastków konieczne jest tworzenie warstw i powłok barierowych, które uniemożliwią uwalnianie niekorzystnych produktów degradacji. W przypadku implantów kostnych, ze względu na konieczność przenoszenia dużych obciążeń, wytworzone warstwy muszą charakteryzować się wysoką wytrzymałością mechaniczną oraz brakiem skłonności do delaminacji. Dodatkowo, w celu aktywacji procesów kościotwórczych warstwy powierzchniowe mogą być wzbogacane w takie pierwiastki jak **wapń** i **fosfor**, które ze względu na powinowactwo chemiczne względem tkanki kostnej mogą wspomagać działanie lecznicze implantu. Ca i P są głównymi pierwiastkami występującymi w kości. Powierzchnie pokryte tymi pierwiastkami wykazują bioaktywność działając dwutorowo. Wapń i fosfor obecny w podłożu sprzyjają osteokondukcji poprzez sprzyjanie adhezji komórek. Podczas uwalniania tych pierwiastków do środowiska tkankowego może dojść do aktywacji osteoblastów i osteoklastów co przyspiesza regenerację tkanki kostnej. Uwolniony Ca i P może również stanowić materiał budulcowy w trakcie kształtowania się tkanki kostnej [160], [161], [162], [163], [164].

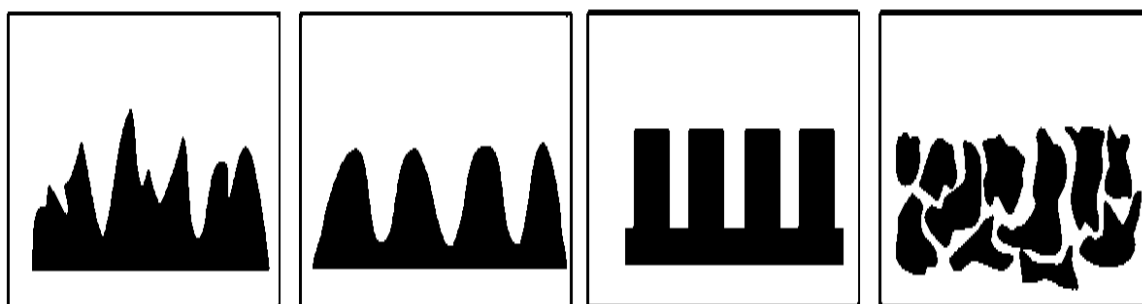
Budowa chemiczna warstwy powierzchniowej determinuje charakter potencjału elektrycznego implantu. Potencjał elektryczny wynikający z obecności określonych związków i relacji między nimi wpływa na potencjalny proces integracji implantu z tkanką. Różnica potencjałów między materiałem a środowiskiem tkankowym reguluje proces pierwotnej integracji komórek z powierzchnią [155], [156].

4.2.2. Topografia powierzchni

Rozwinięcie powierzchniowe determinuje interakcję komórek z powierzchnią oraz potencjał do jej integracji z otaczającymi tkankami. Choć dotychczas prowadzone badania potwierdzają, że topografia powierzchni wpływa na adhezję, proliferację i migrację komórek, dokładny związek między poszczególnymi parametrami topografii powierzchni nadal jest nie do końca zbadany. Wynika to z wysokiej złożoności topografii, która przy podobnych parametrach chropowatości może charakteryzować się odmienną morfologią (Ryc.11.). Odpowiednio sparametryzowana topografia wpływa na adhezję komórek oraz kształtowanie ich późniejszego zachowania związanego z ich wzrostem, różnicowaniem oraz migracją, a także aktywnością enzymatyczną i metaboliczną. Stopień rozwinięcia powierzchni implantów tytanowych determinuje jakość ich biomechanicznego kontaktu. W warunkach laboratoryjnych możliwe jest kształtowanie tempa wzrostu, kierunku migracji oraz namnażania się komórek. W warunkach rzeczywistych implantów badanych na modelach zwierzęcych i stosowanych klinicznie kształtowanie procesu osteointegracji z wykorzystaniem topografii jest niezwykle złożone. Wynika to z wielu zintegrowanych czasoprzestrzennie procesów biofizycznych, których relacje nadal są badane [86], [122], [124], [130], [164], [165].

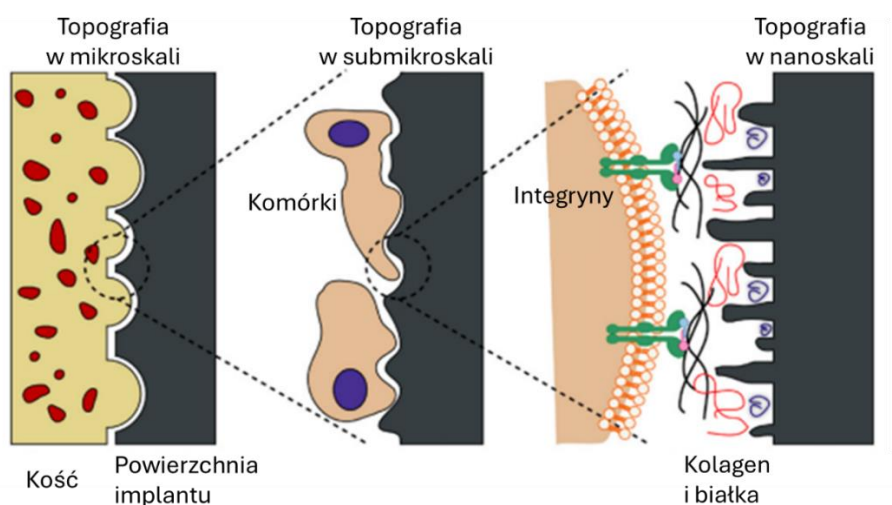
Jednym z podstawowych parametrów stosowanych do oceny topografii powierzchni jest chropowatość. Pozwala ona między innymi na ilościową ocenę różnicy między najniżej i najwyżej położonymi punktami na badanej powierzchni. Choć ilościowa informacja dotycząca amplitudy i średniego odchylenia od wartości środkowej poziomu powierzchni jest istotna z punktu widzenia oceny topografii powierzchni nie jest ona wystarczająca do dobrego scharakteryzowania materiału szczególnie w kontekście zastosowań medycznych. Dokładne relacje między poszczególnymi wgłębieniami, ich regularność, ukierunkowanie, kształt są kluczowe podczas integracji implantu z tkanką. Głównym problemem przy ocenie topografii jest fakt, iż powierzchnie o podobnej chropowatości mogą diametralnie różnić się morfologią powierzchni. Na ryc.11. przedstawiono przykład czterech

powierzchni charakteryzujących się zblizoną wartością Ra przy bardzo zróżnicowanym charakterze morfologii poszczególnych powierzchni [130], [166].



Ryc.11. Przykładowe topografie powierzchni o zblizonym Ra i zróżnicowanej morfologii [166]

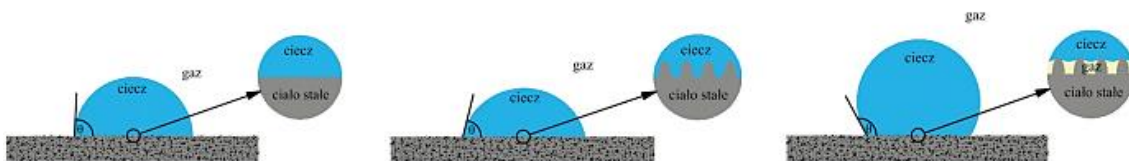
W przypadku dążenia do osteointegracji w oparciu o liczne badania uznaje się, że szorstkie powierzchnie lepiej indukują adhezję osteoblastów. Co więcej, chropowata powierzchnia jest korzystna z punktu widzenia proliferacji, syntezy macierzy zewnątrzkomórkowej koniecznej do prawidłowego dojrzewania komórek i tworzenia zdrowej, dojrzałej tkanki. Wyniki badania Anselme'a i Bigerelle'iego [25], [26], [27], [130] wykazały, że o ile niskie amplitudy chropowatości mogą ułatwiać rozprzestrzenianie się osteocytów po powierzchni, większa chropowatość powodowała większą aktywność i siłę adhezji, co w dłuższej perspektywie może korelować z lepszą długoterminową osteointegracją powierzchni z tkanką [130], [167], [168], [169], [170]. Badania sugerują również, że hierarchiczny charakter powierzchni (Ryc.12), w którym wykazana jest zarówno mikro- jak i nanochropowatość może stymulować osteocyty do większej ekspresji [171], [172]. Lepsza adhezja komórek kostnych i ich ekspresja przekłada się na szybsze dojrzewanie tkanki kostnej co wykazały badania zespołu Li [174].



Ryc.12. Hierarchiczna struktura powierzchni promująca osteointegrację [172]

4.2.3. Zwilżalność

Ważnym parametrem powierzchniowym wpływającym na reakcję organizmu na implant jest jego zwilżalność. Zwilżalność określa zdolność określonej cieczy do utrzymania kontaktu z powierzchnią ciała stałego. Zachowanie cieczy na powierzchni zależy od relacji sił spójności działających w ramach cieczy oraz siły adhezji, a więc sił przyciągających cieczy do powierzchni. Siły spójności są charakterystyczne dla danego płynu i wynikają z jej składu chemicznego, gęstości czy temperatury. Na powierzchniach hydrofilowych siły spójności są przeważane przez swobodną energię powierzchniową ciała stałego. Ponieważ pierwotny proces adhezji komórkowej rozpoczyna właśnie presorpcja wody, hydrofilowy lub hydrofobowy charakter powierzchni znacząco wpływa na proces osteointegracji. Choć z reguły przyjmuje się, że chropowatość powierzchni $Ra < 0,5 \mu\text{m}$ nie wpływa na pomiar zwilżalności, to jednak dokładna topografia powierzchni może wpływać na wartość wyznaczanych kątów zwilżania [174].



Ryc.13. Przykładowa kropla osadzona na materiale dla materiału gładkiego, chropowatego w układzie jednorodnym i chropowatego w układzie niejednorodnym [174]

W przypadku pewnego rozwinięcia powierzchni wyznaczone kąty zwilżania mogą się od siebie różnić w zależności od topografii powierzchni w danym punkcie (Ryc.13.). Co istotne, w przypadku osadzania kropli na powierzchni chropowatej możemy mieć do czynienia z dwoma układami. W układzie jednorodnym ciecz penetruje wszystkie nierówności i pory powierzchniowe. W układzie niejednorodnym powierzchnia stanowi niejako układ dwufazowy składający się z ciała stałego i uwięzionego wewnątrz mikroporów powierzchniowych powietrza. W przypadku materiałów chropowatych, dla których topografia powierzchni może mieć wpływ na wyznaczone kąty zwilżania stosuje się modele aproksymacyjne Wenzela i Cassie-Baxtera. Ich stosowanie dla rzeczywistych pomiarów jest jednak problematyczne i wymaga zastosowania stosunkowo dużej kropli, której wielkość zależy od skali chropowatości powierzchni [174], [175].

Mimo wielu badań mających na celu określenie wpływu poszczególnych parametrów powierzchniowych, szczególnie chemii powierzchni, topografii powierzchni i zwilżalności rzeczywista ocena wpływu pojedynczego czynnika jest bardzo trudna, lub wręcz

niemożliwa do wykonania. Procesy technologiczne mające na celu zmianę topografii wpływają na inne parametry, ponieważ wchodząc w interakcję z powierzchnią mogą wpływać na pozostałe parametry, których wypadkowa określa przydatność zastosowanej modyfikacji do zamierzonego zastosowania. Należy również mieć na uwadze, że tkanka kostna wykazuje również charakter anizotropowy, a jej złożona struktura współoddziaływać z powierzchnią implantu na wielu poziomach [167], [176]. Badanie wpływu modyfikacji na własności użytkowe implantu jest kluczowe z punktu widzenia dalszego rozwoju inżynierii biomedycznej. Rozwój ten daje nadzieję na opracowywanie jeszcze lepszych rozwiązań dla medycyny wpływając na poprawę jakości życia ludzi.

4.3. Metody modyfikacji i funkcjonalizacja powierzchni implantów z Ti6Al4V wytwarzanych addytywnie

Stop tytanu Ti6Al4V, choć charakteryzuje się dobrymi własnościami i udowodnioną biokompatybilnością ze względu na obecność glinu i wanadu wymaga opracowywania metod modyfikacji w celu poprawy jego własności użytkowych. W literaturze można odnaleźć liczne badania dotyczące metod modyfikacji tego materiału. Warto jednak pamiętać, że aby zaproponowana modyfikacja rzeczywiście wpływała na funkcjonalność danego implantu powinna być odpowiednio dopasowana do potrzeb konkretnego wyrobu medycznego oraz funkcji jaką ma on pełnić.

Nowoczesne techniki modyfikacji powierzchni pozwalają na wytwarzanie warstw powierzchniowych o korzystnym składzie chemicznym i fazowym oraz mikrostrukturze, określonym współczynniku tarcia, kontrolowanej topografii powierzchni i porowatości, wysokiej odporności korozyjnej i wytrzymałości tribologicznej. Stosowane modyfikacje powierzchni można podzielić na kilka grup w zależności od czynnika, który pozwala na nadanie nowych cech powierzchniowych dla modyfikowanego wyrobu. Do głównych metod modyfikacji powierzchniowych dedykowanych dla implantów ze stopów tytanu wykonanych z wykorzystaniem technologii addytywnych/SLM należą:

- 1. Metody mechaniczne** tj. szlifowanie, polerowanie, piaskowanie czy bębnowanie. Polegają one na mechanicznym usunięciu części materiału w celu uzyskania określonego rozwinięcia powierzchni. Metody mechaniczne wykorzystują różnego rodzaju ścierniwa w celu wytworzenia powierzchni o określonej topografii zapewniającej lepszą przyczepność lub ograniczoną adhezję określonych cząstek. Często wykorzystywane są do przygotowania powierzchni pod dalsze modyfikacje powierzchniowe. Mimo, iż metody te można stosować do

obróbki poprodukcyjnej elementów drukowanych przyrostowo, w przypadku złożonych struktury (takiej jak np. skafoldy) mają one ograniczone zastosowanie ze względu na brak możliwości dostatecznej penetracji ścierniwa w głąb porowej struktury [177].

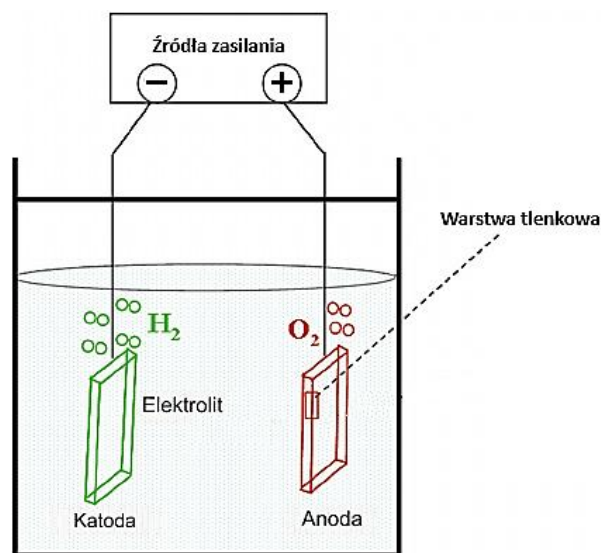
2. **Metody chemiczne** – wykorzystują różnego rodzaju substancje chemiczne pozwalające na modyfikację powierzchni takie jak kwasy, zasady i H_2O_2 . Pozwala to na wytwarzanie warstw tlenkowych i tytankowych, które wpływają na biokompatybilność, bioaktywność i indukowane procesy osteointegracyjne. **Obróbka stężonymi kwasami** pozwala na usunięcie zanieczyszczeń powierzchniowych i zgorzelin. Ze względu na agresywny charakter działania może być stosowana do obróbki postprodukcyjnej elementów wytwarzanych addytywnie w celu usunięcia z powierzchni nie w pełni przetopionego proszku przytwierdzonego do powierzchni wydruku. Może ona wpływać na wytrzymałość mechaniczną modyfikowanych elementów, szczególnie w przypadku elementów wysokoporowatych oraz stanowić inhibitor procesów korozyjnych [122], [125], [177].
3. **Metody elektrochemiczne** - zostaną opisane w kolejnym Rozdziale 4.3.1

4.3.1. Metody elektrochemiczne

Metody elektrochemiczne polegają na osadzeniu powłoki lub wytworzeniu warstwy powierzchniowej z wykorzystaniem roztworu elektrolitycznego na drodze reakcji utleniania i redukcji. Wymagają one obecności zewnętrznego pola elektrycznego o dużej gęstości. W zależności od parametrów procesu oraz zastosowanych kąpeli można wyróżnić konwencjonalne osadzanie elektrolityczne, osadzanie elektroforetyczne, utlenianie anodowe (UA) oraz plazmowe utlenianie elektrolityczne (PEO – ang. plasma electrolytic oxidation) zwane również utlenianiem mikrołukowym (MAO – ang. micro-Arc oxidation). Obecność różnicy potencjałów między elektrodą a modyfikowaną próbką pozwala zwiększyć adhezję osadzanych cząstek oraz zwiększyć kontrolę procesu tworzenia się warstwy powierzchniowej o określonych właściwościach. W procesie bardzo istotną rolę pełnią elektrody, których kształt i wielkość musi być odpowiednio dobrana do wielkości, kształtu i rodzaju przeprowadzanego procesu [177], [178], [179].

4.3.1.1. Utlenianie anodowe

Proces utleniania anodowego pozwala na wytwarzanie warstw tlenkowych na powierzchni modyfikowanego elementu. Proces polega na stymulowanym tworzeniu się warstwy tlenkowej na powierzchni poprzez kontrolowany przepływ prądu przez elektrodę i próbkę w środowisku elektrolitycznym, gdzie materiał modyfikowany stanowi anodę, a elektroda, zazwyczaj platynowa, katodę (Ryc.14.). Warstwy tlenkowe wytwarzane w ten sposób charakteryzują się znacznie większą grubością w stosunku do warstwy pasywnej, która osadza się na powierzchni tytanu na drodze samopasywacji. Powłoki TiO_2 wytwarzane podczas utleniania pozwalają na zachowanie połysku powierzchni oraz zmianę jej koloru.



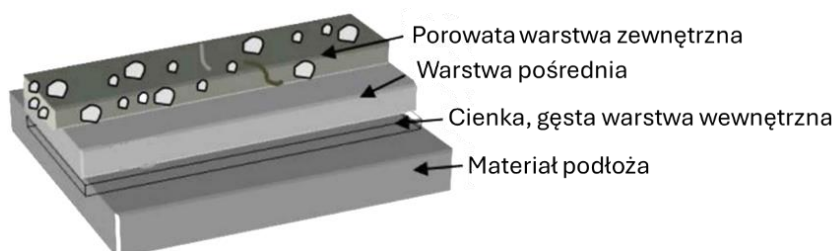
Ryc.14. Schemat procesu utleniania anodowego (na podstawie [180])

Głównymi parametrami, które kontrolują końcową postać warstwy powierzchniowej są parametry prądowe tj. napięcie i natężenie, zastosowane środowisko elektrolityczne (zazwyczaj mocno kwasowe) oraz czas procesu. Istotny jest również stan powierzchni, ponieważ w przypadku niejednorodnego podłoża wynikającego np. ze zmiennej topografii wytworzona powłoka może być niejednorodna o czym świadczy jej zróżnicowane wybarwienie. W przypadku utleniania anodowego próbek wytwarzanych addytywnie wytworzona warstwa może się różnić w zależności od kierunku wydruku poszczególnych płaszczyzn. Utlenianie anodowe pozwala na wytwarzanie gładkich powłok nie wpływających na kształt i topografie powierzchni, jednak w przypadku wydłużonych czasów modyfikacji możliwe jest również wytworzenie nanorurek charakteryzujących się wysoką twardością. Proces utleniania anodowego pozwala na poprawę odporności

korozyjnej, estetyki oraz biokompatybilności elementu. Metoda ta jest również wykorzystywana jako modyfikacja wstępna mająca na celu poprawę przyczepności innych powłok [112], [135], [136], [137], [171], [177], [181].

4.3.1.2. Plazmowe utlenianie elektrolityczne

Szczególną odmianą utleniania anodowego jest plazmowe utlenianie elektrolityczne. W procesie tym wykorzystywane są prądy o znacznie wyższym napięciu i natężeniu przy jednoczesnej możliwości wykorzystania nisko stężonych roztworów o zasadowym pH, w których możliwe jest osadzenie dodatkowych związków np. hydroksyapatytów. Zastosowanie wysokich prądów pozwala na uzyskanie przebiecia tworzącej się w początkowej fazie warstwy pasywnej powodując wybicia elektronów i tworzenie się wiązki plazm. Wytworzenie plazmy na powierzchni powoduje częściowe przetopienie wierzchniej warstwy materiału, który cyklicznie zastygają w kontakcie z elektrolitem. Wytworzona w ten sposób powłoka charakteryzuje się gradientową strukturą, dużą twardością, wysoką adhezją, odpornością na zużycie cierne i obecnością licznych porów powierzchniowych (Ryc.15.). PEO pozwala na poprawę właściwości osteokondukcyjnych materiału dzięki możliwości wbudowania w powierzchnie np. związków fosforowapniowych oraz wytworzeniu hierarchicznej struktury. Dodatkowo poprawia odporność korozyjną i stabilizuje strukturę podłoża poprzez częściowe jej przetopienie pozwalające m.in. na ograniczenie „efektu szyjkowania” charakterystycznego dla powierzchni wytworzonych w technologii SLM lub modyfikowanego z wykorzystaniem procesu spiekania i natryskiwania.



Ryc.15. Schemat budowy powłoki wytworzonej plazmowym utlenianiem anodowym [181]

4.3.2. Powłoki polimerowe

Jedną z technik poprawy własności użytkowych implantów metalowych jest powlekanie ich polimerem, który ma na celu ograniczenie kontaktu materiału metalowego z tkanką. Powłoki polimerowe mogą być nanoszone różnymi technikami m.in. metodą zanurzeniową, natryskiem ultradźwiękowym, powlekaniami wirowym lub z wykorzystaniem

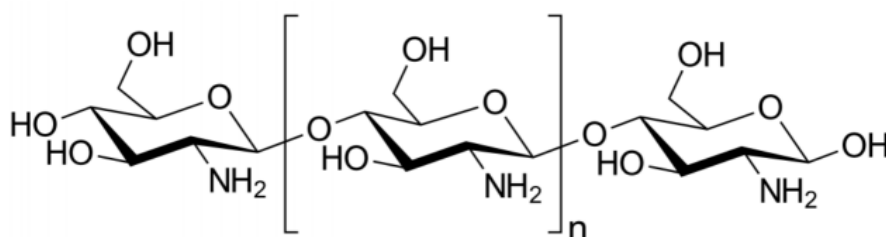
elektroforezy. Możliwe jest stosowanie polimerów niebiodegradowalnych i biodegradowalnych, a ich wybór zależy od oczekiwanego wpływu na modyfikowaną powierzchnię. Powłoki wykonane z polimerów niebiodegradowalnych mają na celu stałe zabezpieczenie powierzchni metalowej przed działaniem środowiska tkankowego oraz poprawę ich własności tribologicznych. W przypadku implantów czasowych, które po zakończeniu leczenia należy usunąć z organizmu, pozwalają na uzyskanie bardzo gładkiej powierzchni o niskiej zwilżalności, która zapobiega integracji implantu z tkankami. Powłoki biodegradowalne stosowane są w celu czasowego ograniczenia kontaktu metalu z tkanką. Jest to szczególnie istotnie w pierwszych fazach leczenia, które determinują skuteczność zastosowanego leczenia. Polimery biodegradowalne, oprócz poprawy odporności korozyjnej, zmiany zwilżalności czy ograniczenia uwalniania jonów metali do środowiska mogą stanowić matrycę dla leków i substancji czynnych, które mogą niwelować procesy zapalne, działać antyseptycznie lub odżywczo dla tkanek, które wymagają regeneracji po wprowadzeniu implantu do organizmu [182], [183], [184].

4.3.2.1. Chitozan

Jednym z najczęściej stosowanych polimerów biodegradowalnych stosowanych do modyfikacji implantów jest chitozan. Jest on biopolimerem zaliczanym do grupy polisacharydów. Pozyskuje się go z chityny zawartej w skorupach stawonogów m.in krewetek, krabów lub kryli na drodze deacetylacji chemicznej lub enzymatycznej. Występować może w dwóch postaciach: homopolimeru. ($\beta(1\rightarrow4)$ -2-amino-2deoksy-D-glukopiranozy) i kopolimeru ($\beta(1\rightarrow4)$ -2-amino-2deoksy-D-glukopiranozy lub $\beta(1\rightarrow4)$ -2-acetomido-2-deoksy-D-glukopiranozy)(Ryc.16.). Warunki przeprowadzania deacetylacji wpływają na jego strukturę krystaliczną, masę cząsteczkową oraz stopień acetylacji, który związany jest z poziomem pozostałości lipidów, protein, barwników oraz soli mineralnych w materiale. Biologiczna aktywność, technologiczna użyteczność oraz czystość chemiczna chitozanu zależy od własności chityny, która ze względu na biologiczne pochodzenie może charakteryzować się pewnymi defektami wynikającymi z obecności zanieczyszczeń pochodzenia organicznego i nieorganicznego [185], [186].

Pochodzenie chityny wpływa na właściwości pozyskiwanego z niej chitozanu, a stopień jej deacetylacji może wpływać na uzyskiwaną masę cząsteczkową, wytrzymałość mechaniczną oraz właściwości hydrofilowe, a także rozpuszczalność, skłonność do pęcznienia i stabilność. Chitozan może ulegać degradacji na drodze utleniania, hydrolizy, fotodegradacji, biodegradacji pod wpływem enzymów lub na skutek działania ciepła

i ultradźwięków. Jest rozpuszczalny w środowisku o niskim pH. W środowisku tkankowym w warunkach *in vivo* degradowe pod wpływem lizozymu oraz hydrolizy reszt acetylowanych. Szybkość degradacji jest odwrotnie proporcjonalna od krystaliczności oraz stopnia acetylacji. Homopolimery chitozanu wykazują niską szybkość degradacji, a ich proces degradacji w organizmie może trwać wiele miesięcy. Odpowiednia modyfikacja chemiczna chitozanu np. z użyciem izobutyli lub aldehydu glutarowego może regulować szybkość degradacji w warunkach *in vivo* [186], [187], [188], [189], [190], [191], [192], [193].



Ryc.16. Wzór strukturalny homopolimeru chitozanu[185]

Chitozan jest materiałem nietoksycznym i wykazuje wysoką biokompatybilność dzięki czemu znajduje szerokie zastosowanie w medycynie. W badaniach wykazano, że ma działanie antyseptyczne i przeciwzapalne. Powłoki wytworzone z chitozanu pozwalają na poprawę zwilżalności biomateriałów oraz na poprawę osteointegracji i osteokondukcji. Ze względu na niską wytrzymałość mechaniczną oraz stosunkowo szybką degradację w środowisku tkankowym wykorzystywany jest głównie w materiałach kompozytowych jako osnowa dla HAp, krzemionki lub węglanu wapnia, materiał do powlekania innych biomateriałów w celu poprawy ich biokompatybilności oraz jako nośnik leków i substancji czynnych. Mimo, iż powłoki chitozanowe nie wykazują bardzo wysokiej stabilności w środowisku tkankowym, pozwalają na wydłużenie uwalniania substancji czynnej. Dodatkowo z chitozanu można wytwarzać bioaktywne opatrunki, które stymulują uszkodzone tkanki do regeneracji [186], [189], [194], [195], [196], [197].

4.3.2.2. Berberyna

Berberyna jest alkaloidem izochinowym występującym w roślinach z tj. berberys zwyczajny (*Berberis vulgaris*), berberys indyjski (*Berberis aristata*), cynowód chiński (*Coptis chinensis*) i mahonia pospolita (*Mahonia aquifolium*). Badania wykazują, iż wykazuje szeroką aktywność biologiczną, dlatego poszukiwane są sposoby jej wykorzystania w medycynie. Berberyna wykazuje działanie przeciwbakteryjne przeciw

gronkowcowi złocistemu (*Staphylococcus aureus*) i przeciwgrzybicze dla grzybów z rodzaju *Candida*, *Aspergillus* i *Cryptococcus*. Dodatkowo może działać przeciwzapalnie hamując tworzenie się cytokin prozapalnych. Wpływa na procesy metaboliczne w organizmie poprzez poprawę wrażliwości na insulinę i redukcję poziomu cholesterolu we krwi. W medycynie chińskiej berberyna wykorzystywana była do leczenia schorzeń układu kostnego m.in. osteoporozy. Pozytywny wpływ berberyny na gęstość, mikrostrukturę oraz mineralizację tkanki kostnej zostały potwierdzone w badaniach *in vivo* na modelach zwierzęcych [198], [199], [200]

Głównym problemem jest niska biodostępność berberyny. Substancja ta wykazuje niskie wchłanianie jelitowe co utrudnia jej zastosowanie. Poszukiwane są alternatywne drogi dostarczenia berberyny do organizmu. Ze względu na wpływ tej substancji na komórki osteocytów oraz działanie przeciwzapalne i przeciwbakteryjne korzystnym podejściem jest dostarczenie substancji bezpośrednio do miejsca planowanego leczenia. Wykorzystywane są w tym celu cementy kostne, rusztowania polimerowe wytwarzane na drodze elektropięczenia oraz powłoki polimerowe z dodatkiem berberyny jako substancji czynnej nanoszone na implanty. Podejście to pozwala nie tylko na dostarczenie berberyny bezpośrednio w miejsce działania, ale również może zapewnić wydłużenie uwalniania substancji co wydaje się konieczne z punktu widzenia długotrwałego procesu regeneracji kości [197], [201], [202], [203].

5. Podsumowanie przeglądu literatury

Dzięki rozwojowi medycyny oraz poprawiającym się warunkom życia ludzie żyją coraz dłużej, a struktura wieku społeczeństwa się zmienia. Paradoksalnie sprawia to, że wyzwania przed jakim staje medycyna i inżynieria biomedyczna stają się coraz większe, ponieważ konieczne jest opracowanie odpowiednich technik leczenia dla coraz szerszej i coraz bardziej wymagającej grupy pacjentów.

Choroby zwyrodnieniowe kręgosłupa zaliczane są do chorób cywilizacyjnych, a w przeciągu życia w bólem kręgosłupa boryka się prawie każdy [30]. Szeroki dostęp do stale udoskonalanych technologii przyrostowych pozwala na rozwój medycyny poprzez dostarczenie narzędzi umożliwiających produkcję implantów o własnościach niemożliwych do uzyskania przy wykorzystaniu technologii tradycyjnych [104], [105]. Wdrożenie nowych technologii do zastosowań medycznych nie jest jednak zadaniem prostym, ponieważ konieczne jest zapewnienie odpowiednich standardów i norm bezpieczeństwa, które przekładają się na skuteczność stosowanych terapii, ograniczając prawdopodobieństwo wystąpienia powikłań.

Implanty wytwarzane technologiami addytywnymi znajdują zastosowanie kliniczne od ponad 15 lat, jednak specjalistyczne normy dotyczące sposobu ich badania i certyfikacji nadal są dopracowywane i pozostają na etapie wdrażania [140], [141], [142]. Mimo, iż implanty produkowane addytywnie wytwarzane są z materiałów, które z powodzeniem stosowane są w medycynie, a ich własności są doskonale udokumentowane w licznych badaniach klinicznych zmiana sposobu przetwarzania materiału wpływa na ich własności – stąd konieczne jest prowadzenie dalszych badań. Tyczy się to zarówno badań nad przebadanymi już biomateriałami, na których własności wpływa proces wytwarzania addytywnego, ale również badań nad sposobami modyfikacji implantów, których wytworzenie jest możliwe dopiero dzięki zastosowaniu właśnie technologii przyrostowych [53], [123], [129], [151], [204].

Szczególnym zainteresowaniem naukowców oraz medyków cieszą się implanty wysokoporowate stosowane w ortopedii, które dzięki otwartej strukturze mają szansę na doskonałą integrację ze strukturami tkankowymi podczas procesu leczenia [75], [81], [82], [83], [90]. Otwarta struktura, choć zapewnia przestrzeń dla tkanek umożliwiając wytworzenie stabilnego połączenia implant-tkanka stanowi wyzwanie, szczególnie w aspekcie modyfikacji ich powierzchni. Właściwości powierzchniowe determinują reakcję organizmu na implant. Z tego powodu uzyskanie jednorodnej, korzystnej z punktu

widzenia odpowiedzi komórkowej powierzchni jest kluczowe dla zapewnienia sukcesu terapeutycznego [152], [153].

Wśród biomateriałów wykorzystywanych do wytwarzania wysokoporowatych implantów kostnych na szczególną uwagę zasługuje Ti6Al4V. Mimo, że dostępne są inne stopy tytanu, które charakteryzują się lepszą biokompatybilnością (np. Ti13Nb13Zr) lub dopasowaniem pod względem własności mechanicznych (np. Ti35Nb5TaZr) analiza literatury związanej z klinicznie wszczepianymi implantami wykazuje, że Ti6Al4V jest praktycznie jedynym biomateriałem, z którego technologią SLM wytwarzane są implanty kręgosłupowe [114], [115]. Wynika to z względów ekonomicznych, ale także lepszych właściwości technologicznych tego stopu wynikających z niższej temperatury topnienia niż przytoczone materiały alternatywne. W przypadku wytwarzania SLM niższa temperatura topnienia przekłada się na możliwość spiekania materiału z większą dokładnością co jest kluczowe w przypadku wytwarzania struktur wysokoporowatych. Choć możliwe, że w przyszłości rozwój technologii addytywnych pozwoli na poszerzenie bazy biomateriałów stosowanych klinicznie, to aktualnie konieczne jest zapewnienie lepszej biokompatybilności implantom ze stopu Ti6Al4V przez modyfikację powierzchni oraz poprawę własności mechanicznych przez kształtowanie struktury porowej.

Specyfika implantów wysokoporowatych stwarza znaczne ograniczenia a zakresie możliwości modyfikacji ich powierzchni. Ze względu na wysokie gradienty temperatur oraz określoną strefę wpływu ciepła obecną podczas spajania materiału proszkowego wiązką lasera implanty wytwarzane addytywnie charakteryzują się ukierunkowaniem struktury materiału oraz wysoką chropowatością wynikającą z obecności na ich powierzchni nie w pełni przetopionego proszku [205]. O ile strukturę materiału może ujednolicić z wykorzystaniem obróbki termicznej ujednolicenie topografii powierzchni w całej objętości struktury wysokoporowej jest problematyczne. Stosowanie standardowych metody obróbki mechanicznej używanych dla elementów litych nie jest możliwe ze względu na konieczność dostarczenia ścierniwa do wewnętrznej części skafoldu. Stosowanie polerowania i trawienia chemicznego w celu ujednolicenia powierzchni może powodować znaczące obniżenie wytrzymałości mechanicznej i odporności korozyjnej implantów [121], [122]. Opracowanie metod modyfikacji umożliwiających uzyskanie jednorodnej powierzchni o własnościach korzystnych z punktu widzenia organizmu pozostaje nierozwiązanym problemem, przed którym stoi inżynieria biomedyczna.

III. Część badawcza

1. Cel pracy

Szerokie zastosowania w medycynie wytwarzanych metodami addytywnymi, wysokoporowatych implantów kręgosłupa wymaga opracowania metod modyfikacji powierzchni adekwatnych do ich specyfiki. Ze względu na złożoną strukturę porów, ograniczony dostęp do powierzchni wewnętrznych oraz relatywnie niskiej grubości pojedynczych belek tworzących strukturę szkieletu konieczne jest dobranie odpowiednich metod i parametrów, które pozwolą na uzyskanie jednorodnego efektu dla całej powierzchni implantu, która ma mieć kontakt z tkanką.

Celem pracy jest opracowanie hybrydowej metody modyfikacji powierzchni wysokoporowatego implantu międzykręgowego wytworzonego metodą przyrostową ze stopu tytanu poprawiającej jego funkcjonalność.

Teza pracy: Opracowanie hybrydowej metody modyfikacji powierzchni wysokoporowatego implantu międzykręgowego pozwoli na poprawę jego funkcjonalności poprzez wytworzenie warstwy barierowej o korzystnych właściwościach fizycznych i chemicznych umożliwiających ograniczenie przenikania jonów metali do środowiska, stymulujących proliferację i aktywność metaboliczną komórek oraz odpowiednie warunki do osteointegracji.

2. Materiał do badań

Materiał do badań stanowiły zaprojektowane i wydrukowane w technologii 3D próbki ze stopu tytanu odzwierciedlające rzeczywisty implant międzykręgowy stosowany do leczenia dyskopatii odcinka szyjnego (C4-C5).

2.1. Opracowanie implantu

Postać konstrukcyjną implantu zaprojektowano w programie Autodesk INVENTOR Professional 2019. Proces projektowania wymagał określenia kryteriów, których spełnienie było konieczne, aby z wykorzystaniem technologii addytywnej wytworzyć próbki odzwierciedlające rzeczywistą specyfikę implantów wysokoporowatych.

Wymagania stawiane projektowanym próbkom są następujące:

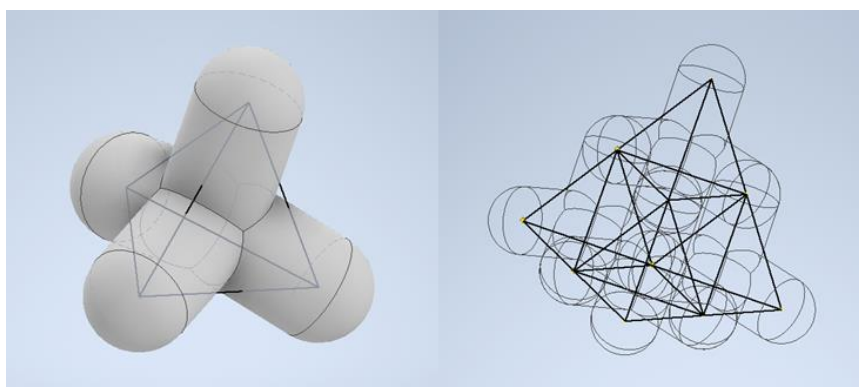
- zastosowana struktura porowata musi zapewnić otwartość implantu. Wszystkie pory muszą być otwarte, a połączenia między poszczególnymi porami muszą być dostatecznie duże, aby zapewnić możliwość penetracji tkanki kostnej. Wielkość

zaprojektowanych porów powinna wynosić 600 μm . Wielkość porów po wytworzeniu powinna być $\geq 400 \mu\text{m}$.

- wybrana struktura porowa musi uwzględnić możliwości technologiczne wynikające z dobranej metody wytworzenia implantu. Średnica belek tworzących makrostrukturę wewnątrz implantu powinna stanowić co najmniej 10-krotność maksymalnej średnicy ziaren proszku stosowanego do wytworzenia próbek.
- należy uwzględnić ograniczenia wynikające ze specyfiki metod addytywnych opierających się na technologiach proszkowych, w szczególności konieczność zastosowania struktur podporowych, związanych z budowaniem krawędzi niepodpartych, równoległych do powierzchni stolika roboczego oraz nieuniknionych rozbieżności między zaprojektowaną porowatością całkowitą, a porowatością rzeczywistą.
- w projekcie należy uwzględnić wzmocnioną ramkę na krawędziach implantu oraz elementy umożliwiające łatwe manipulowanie elementem podczas implantacji.
- zewnętrzne warstwy zaprojektowanej struktury porowej powinny minimalizować traumatyzację tkanek po wprowadzeniu implantu do organizmu. Zewnętrzne krawędzie powinny być zaokrąglone, a powierzchnie, które bezpośrednio stykają się z tkanką kostną po implantacji powinny zapewniać równomierne podparcie.
- zaprojektowany implant powinien charakteryzować się wytrzymałością mechaniczną uniemożliwiającą uszkodzenie implantu pod wpływem fizjologicznych obciążeń występujących w miejscu implantacji. Korzystnym byłoby wytworzenie implantu, którego sztywność byłaby zbliżona do sztywności tkanki kostnej.

Kształt oraz wymiary próbek dobrano na podstawie danych katalogowych (ChM sp. z o.o.). Makrostrukturę implantu zaprojektowano w oparciu o dane literaturowe (Rozdział I.2.1.5). Zaprojektowaną strukturę porowatą oparto na siatce diamentowej bazującej na czworościanie foremny (Ryc.17.) Siatka ta zapewnia uzyskanie sferycznych porów o szerokich połączeniach. Średnicę belek tworzących strukturę porową określono na 600 μm przy założeniu, że próbki będą wytwarzane z proszku o wielkości $\leq 50 \mu\text{m}$. Długość belek dobrano tak, aby wielkość pojedynczego pora wynosiła $\text{Ø}600 \mu\text{m}$. Ze względu na konieczność zapewnienia dobrego odwzorowania zastępowanych struktur tkankowych kąt pomiędzy powierzchnią górną i dolną określono na 5° , co odzwierciedla

fizjologiczną krzywiznę kręgosłupa. Chcąc równocześnie zapewnić regularną makrostrukturę powierzchni stykających się z tkanką kostną w ich obrębie zastosowano regularną siatkę diamentową dostosowując strukturę porowatą w jej centralnej części poprzez odpowiednie wydłużenie belek. Podczas dostosowywania centralnej części siatki poszczególne pory modyfikowano tak, by nie stworzyć porów zamkniętych bądź porów o średnicy mniejszej niż 600 μm .



Ryc.17. Komórka elementarna struktury porowej

W celu zapewnienia większej sztywności oraz regularnej zewnętrznej bryły elementu wokół implantu zamodelowano ramkę o przekroju 600x500 μm . Dodatkowo zabudowano przednią powierzchnię implantu i umieszczono w niej specjalne skośne zagłębienia umożliwiające stabilne uchwycenie implantu za pomocą szczypców. Zabudowana ściana stanowiła stabilne podłoże do wytworzenia struktury porowej w centralnej części implantu.

Przed wytworzeniem próbek zweryfikowano wytrzymałość mechaniczną zaprojektowanych implantów z wykorzystaniem metod numerycznych. Wstępne analizy przeprowadzono w programie AutoDESK Inventor Professional 2019, a następnie wykonano analogiczne analizy w środowisku ANSYS 2021. W celu przeprowadzenia symulacji numerycznej opracowany model komputerowy implantu dyskretyzowano z wykorzystaniem tetragonalnego dziesięciowęzłowego elementu skończonego typu SOLID187. Warunki brzegowe określono w taki sposób, aby dolna powierzchnia implantu była unieruchomiona, natomiast do górnej powierzchni przykładana była siła ściskająca o wartości maksymalnej 1500N, co odpowiada obciążeniu przekraczającemu obciążenie fizjologiczne występujące w odcinku szyjnym kręgosłupa. Przeprowadzone analizy nie wykazały obecności miejsc, w których występowałyby koncentracja naprężeń. Wyznaczone maksymalne naprężenia zredukowane dla największej założonej siły ściskającej nie przekraczały wytrzymałości na ściskanie stopu Ti6Al4V [206], [207], [208], [209].

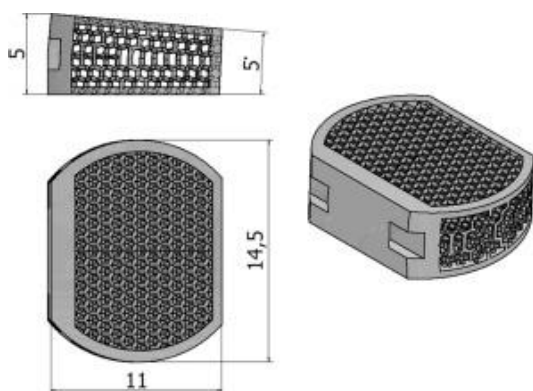
2.2. Wytworzenie implantu

Próbki, w postaci zaprojektowanych implantów, zostały wytworzone w ChM sp. z o.o. na drukarce 3D SLM-250 Metal (SLM Solution Group AG) z proszku Ti6Al4V (Tab.2.) do zastosowań medycznych o gradacji $<50\mu\text{m}$ (TLS Technik GmbH).

Tab.2. Skład chemiczny proszku Ti6Al4V (Ti Grade 23) użytego do wytworzenia próbek [210]

	<i>Al</i>	<i>V</i>	<i>Fe</i>	<i>O</i>	<i>C</i>	<i>N</i>	<i>H</i>	<i>Y</i>	<i>Ti</i>
[%]	5,5-6,5	3,5-4,5	$\leq 0,25$	$\leq 0,13$	$\leq 0,08$	$\leq 0,05$	$\leq 0,012$	$\leq 0,005$	Reszta

Wydrukowane próbki wyżarzono w temperaturze 920°C przez 4h, a następnie czyszczono w izopropanolu w płuczce ultradźwiękowej. Na Ryc.18. przedstawiono model zaprojektowanego implantu (A) oraz zdjęcie wytworzonej próbki (B).



Ryc.18A. Model zaprojektowanego implantu.



Ryc.18B. Zdjęcie próbki wytworzonej metodą SLM na podstawie projektu

3. Metodyka badań

3.1. Algorytm postępowania

Realizacja zdefiniowanych celów badawczych wymagała opracowania planu i metodyki badań oraz określenia kryteriów oceny poszczególnych etapów. Prace badawcze podzielono na 3 etapy, które obejmowały kolejno:

- a) ocenę wstępną wytworzonych próbek,
- b) funkcjonalizację powierzchni próbek z wykorzystaniem metod elektrochemicznych oraz ocenę wpływu przeprowadzonej modyfikacji elektrochemicznej na ich właściwości
- c) funkcjonalizację powierzchni próbek po wybranej modyfikacji elektrochemicznej z wykorzystaniem biodegradowalnej powłoki polimerowej oraz ocenę wpływu powłoki na własności implantu.

W celu określenia rzeczywistych własności wytworzonych próbek oraz wpływu zastosowanych modyfikacji na własności skafoldów wszystkie pomiary prowadzone były na próbkach w postaci wysokoporowatych implantów międzykręgowych zaprojektowanych i wytworzonych z Ti6Al4V metodą SLM. Choć podejście to stanowiło wyzwanie oraz pewne ograniczenia dotyczące stosowania różnych metod badawczych to pozwoliło ono na określenie rzeczywistych właściwości wytworzonych i modyfikowanych powierzchniowo wysoko porowatych implantów międzykręgowych.

Ad. a) Ocena wstępna obejmowała badania mające na celu określenie jakości wytworzonych próbek oraz ich własności w stanie wyjściowym. Stanowiła ona punkt odniesienia dla dalszych badań. Ocena wstępna obejmowała:

- ocenę mikroskopową wraz z oceną zgodności wymiarowej wytworzonych próbek z wykorzystaniem mikroskopii świetlnej oraz mikro-tomografii komputerowej,
- ocenę porowatości rzeczywistej z wykorzystaniem piknometrii helowej oraz metody obliczeniowej bazującej na pomiarach hydrostatycznych,
- ocenę własności mechanicznych w oparciu o statyczną próbę ściskania,
- ocenę struktury materiału na podstawie badań metalograficznych.

Ad b) Funkcjonalizacja powierzchni próbek z wykorzystaniem metod elektrochemicznych, obejmująca utlenianie anodowe (**UA**) oraz plazmowe utlenianie elektrolityczne (**PEO**), miała na celu wytworzenie trwałej, stabilnej warstwy pasywnej na powierzchni implantu w całej objętości próbki. Wytworzona warstwa pasywna miała stanowić warstwę barierową dla jonów metali mogących dyfundować z materiału do środowiska oraz podłoże o korzystniejszych własnościach z punktu widzenia integracji implantu z tkanką kostną. Zgodnie z danymi przedstawionymi w przeglądzie literaturowym kluczowymi czynnikami wpływającymi na osteointegrację implantów są topografia oraz chemia powierzchni i wynikające z niej własności tj. potencjał korozyjny czy zwilżalność. W celu określenia wpływu zastosowanych modyfikacji na własności implantu przeprowadzono badania obejmujące:

- ocenę morfologii powierzchni z wykorzystaniem mikroskopii cyfrowej, skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM, ang. *Scanning Electron Microscope*) oraz profilometrii optycznej,
- ocenę składu chemicznego na podstawie spektroskopii rentgenowskiej z dyspersją energii (EDS – ang. *Energy Dispersive Spectroscopy*)

- ocenę struktury materiału w oparciu o metodę dyfraktometryczną (XRD – ang. X-ray Diffraction)
- ocenę potencjału korozyjnego próbek w stanie wyjściowym oraz po długotrwałej ekspozycji na symulowane środowisko tkankowe z wykorzystaniem metody potencjostatycznej,
- pomiar stężenia jonów metali przenikających do roztworu w trakcie ekspozycji na symulowane środowisko tkankowe, z wykorzystaniem metody emisyjnej atomowej spektrometrii z indukcyjnie sprzężoną plazmą (ICP-AES ang. Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry)
- ocenę zwilżalności metodą siedzącej kropli z wykorzystaniem goniometru optycznego.

Dobór parametrów zastosowanego procesu UA oraz PEO oparto na analizie literaturowej oraz badaniach własnych [84], [135], [179], [211], [212], [213], [214], [215]. Głównym kryterium podczas doboru parametrów procesu była możliwość wytworzenia jednorodnej warstwy wierzchniej w całej objętości próbki w tym w obrębie otwartej struktury porowej[135].

Na podstawie przeprowadzonych badań oceniono wpływ UA oraz PEO na własności zaprojektowanych i wytworzonych implantów. Wybór ostatecznej modyfikacji elektrochemicznej pozwalającej na funkcjonalizację powierzchni implantu dokonano na podstawie kryteriów określonych w Tab.3. Oceny dokonano w odniesieniu do próbek w stanie wyjściowym (SW).

Tab.3. Zestawienie kryteriów oceny przydatności zastosowanej modyfikacji elektrochemicznej

Kryterium oceny	Oczekiwany wpływ na powierzchnie	Ocena*
Topografia powierzchni	Jednorodna topografia w całej objętości próbki	+++
	Ograniczenie liczby ziaren obecnych na powierzchni	+
	Wytworzenie mikroporów na powierzchni	++
Zwilżalność	Poprawa zwilżalności	+
	Własności hydrofilowe	++
Skład chemiczny powierzchni	Obecność warstwy tlenkowej	+
	Ograniczenie ilości V i Al w warstwie wierzchniej	++
	Obecność Ca i P w warstwie wierzchniej	+
Własności korozyjne	Stabilny czasowo potencjał korozyjny (E_{ocp})	+
Degradacja	Ograniczenie ilości jonów metali przenikających do środowiska	++
	Dostarczenie do środowiska jonów Ca/P	+

*ilość „+” określa poziom istotności poszczególnych kryteriów

Dla ostatecznie dobranego wariantu modyfikacji elektrochemicznej, który podczas oceny uzyskał większą liczbę punktów wykonano dodatkowe badanie składu chemicznego warstwy z wykorzystaniem rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronów (XPS- ang. X-ray Photoelectron Spectroscopy).

Ad c) Funkcjonalizację powierzchni z wykorzystaniem biodegradowalnej powłoki polimerowej przeprowadzono dla najlepszego wariantu zastosowanej modyfikacji elektrochemicznej. Wytworzenie powłoki polimerowej na implancie miało na celu ograniczenie kontaktu metalowego implantu z tkanką bezpośrednio po implantacji. W oparciu o literaturę założono, że zastosowanie takiej powłoki pozwoli na ograniczenie ilości jonów metali przenikających z implantu do środowiska, dostarczenie związków i substancji czynnych korzystnych z punktu widzenia organizmu oraz zmianę własności powierzchni implantu tj. zwilżalności i potencjału korozyjnego. Badania próbek pokrytych polimerem obejmowały:

- ocenę morfologii powierzchni i jednorodności naniesionych powłok z wykorzystaniem SEM i EDS,
- ocenę potencjału korozyjnego próbek w stanie wyjściowym oraz po długotrwałej ekspozycji na środowisko imitujące środowisko tkankowe w wykorzystaniem metody potencjostatycznej,
- pomiar stężenia jonów metali przenikających do roztworu w trakcie ekspozycji na środowisko imitujące środowisko tkankowe, z wykorzystaniem metody ICP-AES,
- ocenę zwilżalności metodą goniometryczną,
- ocenę kinetyki uwalniania substancji czynnej metodą spektrofotometryczną,
- ocenę cytotoksyczności próbek przed i po pokryciu biopolimerem metodą kolorymetryczną.

3.2. Zastosowane metody modyfikacji oraz przygotowanie próbek do badań

3.2.1. Funkcjonalizacja powierzchni z wykorzystaniem metod elektrochemicznych

Funkcjonalizacja powierzchni z wykorzystaniem metod elektrochemicznych przeprowadzona została w celu wytworzenia trwałej warstwy tlenkowej zabezpieczającej implant przed działaniem środowiska tkankowego oraz ograniczającej kontakt tkanki z materiałem metalowym. [136], [216].

Przed przystąpieniem do modyfikacji próbki oczyszczono w płuczce ultradźwiękowej wg protokołu: 5 min woda demineralizowana, 5 min środek odtłuszczający, 5 min woda

demineralizowana, 5 min aceton, 5 min woda demineralizowana. Próbek nie suszono przed przystąpieniem do modyfikacji elektrochemicznej.

Utlenianie anodowe przeprowadzono z wykorzystaniem 2 płaskich elektrod platynowych umieszczonych po obu stronach próbki. Do zawieszenia próbki w elektrolicie wykorzystano drut z Ti6Al4V, który zgrzano z płaską powierzchnią modyfikowanych próbek. Proces utleniania anodowego przeprowadzono z wykorzystaniem elektrolitu Titan Color (POLIGRAT GmbH) (kwas fosforowy + kwas siarkowy, pH 0,5÷0,6, temperatura 20±2°C) przy parametrach prądowych $U = 97V$, $I = 50mA$ [216] przez 120 s, który mierzono po ustabilizowaniu się napięcia w układzie. W badaniu wykorzystano zasilacz prądu stałego Kikusui PAS500-18.

Plazmowe utlenianie elektrolityczne przeprowadzono z wykorzystaniem platynowej elektrody dookólnej. Próbki montowano za pomocą obustronnie ostro zakończonego wygiętego drutu z Ti6Al4V mocowanego poprzez obustronne osadzenie cienkich końców w strukturze porowej. Próbki polaryzowano anodowo. Proces **PEO** przeprowadzono z wykorzystaniem 0,5M roztworu podfosforanu wapnia ($Ca(H_2PO_2)_2$). W trakcie modyfikacji rozwór był stale mieszany mieszadłem magnetycznym oraz chłodzony za pomocą płaszcza wodnego do temperatury 5°C. Modyfikację przeprowadzono używając zasilacza wysokiego napięcia Kikusui PWE 800H sterowanego komputerowo za pomocą programu Wavy. Parametry prądowe zostały dobrane na podstawie badań wstępnych ($U = 250\div 300 V$, $I = 0,9\div 1,8 A$, prąd DC/impulsowy prostokątny/narastający, wypełnienie 20÷100%) [135]. Ostatecznie w procesie wykorzystano impulsowy prąd stały (sygnał prostokątny, 20% wypełnienia, częstotliwość 0,4Hz) przy parametrach prądowych $U = 250 V$, $I = 0,9 A$ dla całkowitego czasu modyfikacji 600 s.

Próbki po utlenianiu anodowym i plazmowym utlenianiu anodowym oczyszczano w płuczce ultradźwiękowej wg protokołu: 5 min woda demineralizowana, 5 min aceton, 5 min woda demineralizowana. Próbki pozostawiono do wyschnięcia w warunkach normalnych.

3.2.2. Funkcjonalizacja powierzchni z wykorzystaniem biodegradowalnej powłoki polimerowej

Funkcjonalizację powierzchni z wykorzystaniem biodegradowalnej powłoki polimerowej przeprowadzono dla jednego wariantu modyfikacji elektrochemicznej, który charakteryzował się najlepszymi własnościami z punktu widzenia osteointegracji.

Do przygotowania powłoki użyto chitozanu w postaci niskomolekularnego proszku o stopniu decylacji $\geq 75\%$ (Sigma-Aldrich). Jako substancję czynną użyto berberyny w postaci

sproszkowanego chlorku berberyny (Sigma-Aldrich). Na badane implanty nałożono 3 warianty powłok:

- **Cht** – powłoka chitozanowa bez dodatku substancji czynnej;
- **ChtBBR low** - powłoka chitozanowa z dodatkiem berberyny o niskim stężeniu (stosunek wagowy chitosan:berberyna – 300:1) (50 mg/l) [202];
- **ChtBBR high** – powłoka chitozanowa z dodatkiem berberyny o wysokim stężeniu (stosunek wagowy chitosan:berberyna – 4:1)(3750 mg/l)[203].

Roztwory użyte do wytworzenia powłok przygotowano poprzez rozpuszczenie chitozanu i berberyny w 2% kwasie octowym. W naczynkach wagowych odmierzono po 1,5 g chitozanu w postaci proszku korzystając z precyzyjnej wagi analitycznej ($\Delta m=0,0001g$). W zlewkach szklanych przygotowano po 100 ml wody demineralizowanej do której dodano 2 ml stężonego kwasu octowego ($\geq 99\%$). Roztwory wymieszano korzystając z mieszadła magnetycznego. Chitozan umieszczono w butelkach szklanych, a następnie zalano 100 ml przygotowanego 2% kwasu octowego. W butelkach umieszczono mieszadła magnetyczne, a następnie szczelnie je zamknięto i mieszano przez 24h. W naczynkach wagowych odmierzono odpowiednie ilości berberyny (**ChtBBR high** – 0,375g, **ChtBBR low** – 0,005g), które dodano do butelek z przygotowanym 1,5% roztworem chitozanu. Roztwory mieszano do uzyskania jednorodnej mieszaniny.

Przed przystąpieniem do nakładania powłoki każdą z próbek zważono na wadze analitycznej RADWAG AS 160/C/2. Przygotowane roztwory naniesiono na próbki korzystając z metody zanurzeniowej. Dokładny sposób nakładania oraz czas inkubacji dobrano na podstawie badań własnych i analizy literatury [202], [203], [217]. Próbki umieszczono w naczynkach 24 dołkowych w taki sposób, aby opierały się na zabudowanej przedniej ścianie implantu. Następnie za pomocą pipety do porowatej części próbki wtłoczono dwukrotnie 0,2 ml przygotowanych roztworów w celu wstępnego zwilżenia powierzchni. Do każdego z dołków za pomocą automatycznej pipety powoli wlało 2,5 ml roztworu chitozanu lub chitozanu z dodatkiem berberyny. Płytki zamknięto i zabezpieczono parafilmem, a następnie umieszczono na 5 min. na stoliku wibracyjnym w celu usunięcia potencjalnych pęcherzyków powietrza. Próbki inkubowano w roztworach z rozpuszczonym polimerem przez 24h. Po tym czasie za pomocą pipety automatycznej usunięto roztwory polimeru z dołków, a następnie wyjęto próbki i pozostawiono do wysuszenia w powietrzu o wymuszonym obiegu. Próbki suszono w temp 25°C przez 4h. Ze względu na własności berberyny próbki przechowywano i modyfikowano w warunkach o ograniczonej ekspozycji na światło. Wysuszone próbki

zważono w celu określenia masy naniesionego polimeru, a następnie przekazano do sterylizacji radiacyjnej.

3.2.3. Sterylizacja

Wytworzone i modyfikowane próbki przed przystąpieniem do badań sterylizowano radiacyjnie wiązką wysokoenergetycznych elektronów (25kGy).

3.2.4. Przygotowanie zglądów metalograficznych

Próbki w stanie wyjściowym zainkludowano w żywicy PolyFast (Struers) używając urządzenia Struers CitoPress-20. Próbki ułożono w taki sposób, by uzyskać zgląd powierzchni prostopadłej i równoległej względem płaszczyzny wydruku. Zainkludowane próbki szlifowano automatycznie papierem ściernym o gradacji 120, 320, 600, 800 i 1200, a następnie wypolerowano na suknie polerskim z użyciem OP-S SUSPENSION (Struers). Zglądy wytrawiono w 8% HF.

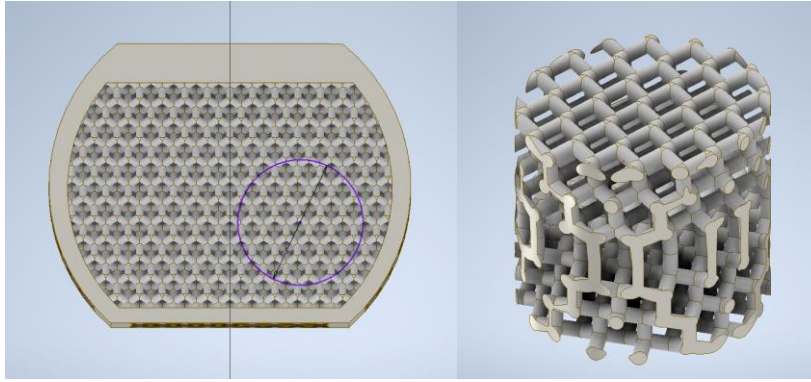
3.2.5. Ekspozycja na środowisko imitujące środowisko tkankowe

W celu zbadania wpływu środowiska na badane implanty próbki eksponowano na warunki imitujące środowisko tkankowe. Próbki z wszystkich badanych wariantów umieszczono w szczelnych pojemnikach wypełnionych 100 ml PBS (0,14 M NaCl, 2,7 mM KCl, 0,01 M PO₄³⁻, pH 7,4) i przetrzymywano w 37°C przez 2, 4 oraz 6 tygodni. Dalszym badaniom poddano zarówno inkubowane próbki jak i roztwór, w którym były przetrzymywane.

3.3. Metodyka prowadzenia badań

3.3.1. Ocena porowatości rzeczywistej

Pomiary rzeczywistej porowatości miały na celu sprawdzenie dokładności wydruku oraz weryfikację otwartej struktury wytworzonych porów. Porowatość rzeczywistą wyznaczono na podstawie metody obliczeniowej bazując na pomiarach hydrostatycznych oraz na piknometrii helowej. Ze względu na skomplikowany kształt próbki jako objętość pozorną oraz teoretyczną porowatość i objętość rzeczywistą przyjęto wartości wyznaczone w programie INVENTOR 2019 dla zaprojektowanego modelu. Z uwagi na obecność ramki oraz litej części, która wpływała na wyznaczaną porowatość określono również porowatość dla samej struktury porowej, którą wyznaczono dla 3 losowych cylindrycznych wycinków skafoldu (Ryc.19.). Wartości tej nie weryfikowano doświadczalnie.



Ryc.19. Cylindryczny wycinek skafoldu, użyty do wyznaczenia porowatości dla centralnej części skafoldu

3.3.1.1. Pomiar gęstości materiału metodą hydrostatyczną

Gęstość materiału wyznaczono na podstawie pomiarów przeprowadzonych na wadze laboratoryjnej Axis ATZ320 wyposażonej w zestaw do pomiaru gęstości (Axis) z użyciem wody demineralizowanej w temperaturze 20°C dla 5 losowo wybranych próbek. Wartość gęstości cieczy przyjęto jako $1,00 \frac{g}{cm^3}$. Na podstawie masy próbek w powietrzu oraz w wodzie demineralizowanej wyznaczono gęstość rzeczywistą materiału korzystając z zależności:

$$\rho = \frac{m_p}{m_p - m_c} * \rho_c \quad (1),$$

gdzie:

m_p – masa próbki w powietrzu [g]

m_c – masa próbki w cieczy [g]

ρ – gęstość badanego materiału $[\frac{g}{cm^3}]$

ρ_c – gęstość cieczy $[\frac{g}{cm^3}]$

Wyznaczoną wartość gęstości porównano z wartością gęstości podanej przez producenta proszku Ti6Al4V użytego do wydruku, która wynosiła 4,43 g/cm³. Bazując na wyznaczonej gęstości oraz masie próbek wyznaczono objętość próbek.

Porowatość rzeczywistą określono na podstawie wyznaczonych objętości korzystając z zależności:

$$P[\%] = \left(1 - \frac{V_{poz}}{V_{rz}}\right) * 100\% \quad (2)$$

3.3.1.1. Pomiary porowatości z wykorzystaniem piknometrii helowej

Próbki zważono na wadze analitycznej RADWAG AS 160/C/2 (d=0,1mg). Pomiary porowatości metodą piknometrii helowej przeprowadzono dla 8 losowych próbek na urządzeniu 1305 Micromeritics®. Dla każdej z próbek wykonano 10 niezależnych pomiarów

objętości rzeczywistej próbek. W oparciu o wyznaczoną objętość pozorną obliczono porowatość rzeczywistą wytworzonych implantów.

3.3.2. Mikrotomografia komputerowa

Mikrotomografię komputerową przeprowadzono z użyciem urządzenia ProCon X-Ray CT-Compact (System Casp). Badania przeprowadzono przy użyciu lampy 130 kV, rozdzielczość $0,05\mu\text{m}$ i czasie ekspozycji 2s. dla 3 losowych próbek. Otrzymane przekroje oceniono wykorzystując oprogramowanie Slicer 3D.

3.3.3. Ocena własności mechanicznych

Ocena wytrzymałości mechanicznej miała na celu weryfikację czy wyprodukowany implant charakteryzuje się wystarczającą wytrzymałością mechaniczną pozwalającą na przenoszenia fizjologicznych obciążeń występujących w odcinku szyjnym kręgosłupa. Ponieważ próbki charakteryzowały się brakiem równoległości powierzchni górnej i dolnej konieczne było opracowanie specjalnych uchwytów umożliwiających ściskanie próbki (Ryc.20). Z powodu specyfiki układu obciążania pomiary prowadzone były do osiągnięcia siły ściskającej 750 N, co odpowiada sile znacząco przekraczającej wartości siły występujące fizjologicznie w odcinku szyjnym [208], [209]. Statyczną próbę ściskania prowadzono na maszynie MTS Criterion Model 43 w warunkach normalnych ($T=20^{\circ}\text{C}$) przy prędkości ściskania 1mm/min. Do analizy mierzonych wartości naprężeń w funkcji odkształceń wykorzystano uproszczony model, w którym pole powierzchni przekroju poprzecznego wyznaczone zostało względem zewnętrznych krawędzi próbki ($P = 1,43\text{mm}^2$), natomiast jako wysokość początkową przyjęto średnią wysokość implantu ($h = 4,5\text{ mm}$).



Ryc.20. Zdjęcie uchwytów stosowanych w badaniach

3.3.4. Ocena mikroskopowa

3.3.4.1. Mikroskopia świetlna

Obserwacje mikroskopowe prowadzono na mikroskopie cyfrowym Keyence VHX-5000 wyposażonym w kamerę o rozdzielczości 1600x1200 o progresywnym systemie skanowania i czujnik obrazu z matrycą 1/1,8 CMOS. Obserwacje prowadzono korzystając z obiektywu o zakresie powiększeń 20-200x. Mikroskopię świetlną wykorzystano do oceny zgodności wymiarowej wytworzonych implantów oraz oceny wielkości porów dla próbek w stanie wyjściowym oraz poddanych modyfikacji elektrochemicznej.

3.3.4.2. Skaningowa Mikroskopia elektronowa

Obserwacje mikroskopowe z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) prowadzono na urządzeniu TESCAN VEGA wyposażonym w wolframową katodę. Obserwacje prowadzono z wykorzystaniem detektora SE przy napięciu wzbudzenia 5-25 keV. Podczas badań dokonano oceny struktury metalograficznej przygotowanych zglądów, zgodnie z ISO/ASTM 52908:2023 i ISO 20160:2006 oraz oceny morfologii powierzchni. Badania próbek w stanie wyjściowym i po obróbce elektrochemicznej wykonano dla powierzchni zewnętrznych oraz przekrojach, co miało na celu ocenę powierzchni wewnętrznych implantów. Z powodu obaw o degradację powłok polimerowych podczas przygotowania przekrojów implantów obserwacje próbek z powłoką polimerową przeprowadzono jedynie dla powierzchni zewnętrznych.

3.3.5. Profilometria optyczna

Topografię powierzchni w stanie wyjściowym oraz po obróbce elektrochemicznej oceniono wykorzystując profilometr 3D Surface Metrology Microscope Leica DCM8. Uzyskane obrazy przetworzono w programie Leica Map. Pomiary chropowatości prowadzono w obrębie belek tworzących strukturę porową oraz płaskiej ramki wykorzystując obiektyw 50x. Pomiary prowadzono globalnie dla obszaru 132x175µm dla którego wyznaczono wartość **Sa** (średnie arytmetyczne odchylenie profilu od powierzchni średniej). Dodatkowo w celu oceny jednorodności mikrochropowatości powierzchni przeprowadzono pomiary dla małych obszarów w ramach pojedynczych ziaren osadzonego proszku (Ø20 µm) oraz fragmentów litych belek niepokrytych ziarnami (20x30 µm) dla których wyznaczono parametry **Sa** oraz **Ra** (średnie arytmetyczne odchylenie profilu od linii średniej) i **Rz** (wysokość chropowatości

według dziesięciu punktów profilu). Dla pomiarów prowadzonych w obrębie pojedynczych ziaren korzystano z korekcji sferycznej.

3.3.6. Analiza składu chemicznego EDS

Skład chemiczny warstwy powierzchniowej określono na podstawie analizy EDS wykonanej podczas obserwacji SEM. Analizę przeprowadzono korzystając z detektora Xplore EDS (OXFORD instruments) przy energii wzbudzenia 20keV i natężeniu prądu 1nA. Pomiary prowadzono punktowo oraz powierzchniowo. Do analizy składu chemicznego wykorzystano program AZtecOne, w którym na podstawie zmierzonych widm określono wagowy udział poszczególnych pierwiastków w warstwie wierzchniej oraz określono ich rozkład w badanym obszarze.

3.3.7. Analiza składu chemicznego XPS

Analizę składu chemicznego warstwy wierzchniej z wykorzystaniem metody XPS wykonano dla jednego, najlepszego wariantu modyfikacji elektrochemicznej, którą wykorzystano w dalszych badaniach związanych nakładaniem warstwy polimerowej.

Bezpośrednio przed pomiarem próbki płukano w acetonie w płuczce ultradźwiękowej przez 10 min. i pozostawiano do wyschnięcia. Skład chemiczny powierzchni próbek analizowano za pomocą spektroskopii fotoelektronów rentgenowskich (XPS). Pomiary wykonywano w instrumencie XPS (SPECS, Niemcy) podłączonym do klastra ultrawysokiej próżni (ciśnienie bazowe 10^{-8} Pa), wyposażonym w niemonochromatyczne źródło promieni rentgenowskich XR-50 Mg K α ($\hbar\omega = 1253,6$ eV), analizator PHOIBOS 150 i działko zalewowe FG 20 do kompensacji efektów ładowania. Widmo pomiarowe XPS zbierano przy energii przejścia 50 eV i krokach energii 0,5 eV. Dodatkowo zebrano widma o wysokiej rozdzielczości dla określonych pasm przy energii przejścia 20 eV i krokach energii 0,03 eV. Analizę ilościową przeprowadzono za pomocą programu CasaXPS (wersja 2.3.25PR1.0, Casa Software Ltd) [218].

3.3.8. Analiza składu fazowego XRD

Badania XRD przeprowadzono przy użyciu dyfraktometru D8 Advance (Bruker, Karlsruhe, Niemcy) z anody Cu-K α ($\lambda=1,54$ Å) pracującej przy napięciu 40 kV i natężeniu prądu 40 mA. Szybkość skanowania wynosiła 0,60°/min. przy kroku skanowania 0,02° w zakresie od 5° do 90° 2 Θ . Identyfikację dopasowanych faz wykonano przy użyciu programu DIFFRAC.EVA z wykorzystaniem bazy danych Crystallography Open Database (COD),

natomiast dokładne parametry sieci i współrzędne atomowe dopasowanych faz obliczono przy użyciu udokładnienia Rietvelda w programie TOPAS 6, w oparciu o teorię Williamsona-Halla [219], [220]. Do opisu profili linii dyfrakcyjnych przy udokładnieniu Rietvelda wykorzystano funkcję pseudo - Voigta. Parametry R_{wp} (ważony współczynnik R), R_{exp} (oczekiwany współczynnik R) i GOF (dobroć dopasowania) zostały użyte jako kryteria numeryczne jakości dopasowania dyfraktogramów obliczonych do eksperymentalnych danych dyfrakcyjnych [221]. Kształty pików, parametry sieci, rozmiar krystalitów i odkształcenie sieci zostały obliczone jednocześnie [219], [220], [222].

3.3.9. Ocena własności korozyjnych

Badania korozyjne przeprowadzono przy użyciu potencjostatu Auto-LAB PGSTAT 302 i oprogramowania NOVA 2.0 (Metrohm). Pomiary wykonano w celi elektrochemicznej o pojemności 0,25 dm³. Jako medium pomiarowe użyto roztworu PBS (0,14 M NaCl, 2,7 mM KCl, 0,01 M PO₄³⁻, pH 7,4). W układzie pomiarowym badane próbki stanowiły anodę. Jako elektrodę pomocniczą użyto drut platynowy, a jako elektrodę odniesienia nasyconą elektrodę Ag/AgCl z (KCl)=3 mol/l (Metrohm). Z powodu złożonego kształtu próbki niemożliwiałego jednoznaczne wyznaczenie jej pola powierzchni a zarazem gęstości prądu w pracy zrezygnowano z przeprowadzenia badań potencjodynamicznych. Potencjał korozyjny wyznaczano przez 3h.

Badania prowadzono dla próbek: w stanie wyjściowym i poddanych modyfikacjom bezpośrednio po wytworzeniu/modyfikacji oraz eksponowanych przez 2, 4 i 6 tygodni na symulowane środowisko tkankowe.

3.3.10. Ocena jonów uwalnianych do środowiska

Ocenę uwalniania jonów metali przeprowadzono z użyciem metody spektroskopii emisyjnej plazmy na urządzeniu ICP-AES JY 2000 na roztworach PBS, w których inkubowano próbki. Podczas pomiarów dla wszystkich próbek oznaczono ilość jonów Ti, Al. i V oraz dodatkowo stężenia Ca i P dla próbek po PEO oraz pokrytych polimerem. W badaniach wykorzystano materiały wzorcowe firmy Merck. Uzyskane wyniki przeliczono na ilość jonów uwalnianych z określonej powierzchni próbki. Jako powierzchnię przyjęto wartość wyznaczoną na podstawie modelu ($P=18,8 \text{ cm}^2$).

3.3.11. Pomiary zwilżalności

Pomiary zwilżalności przeprowadzono na goniometrze optycznym (Möller-Wedel Optical) w temperaturze pokojowej. Ze względu na rozbudowaną topografię powierzchni i makrostrukturę materiału pomiary ograniczono do wyznaczenia kąta zwilżania dla wody oraz roztworu PBS, niestety nie wyznaczono wartości swobodnej energii powierzchniowej. Krople o objętości 1,5 μl osadzano na powierzchni górnej/dolnej w obrębie belek tworzących strukturę porową i ramki oraz na powierzchni bocznej. Kąt zwilżania oznaczano 10 s po osadzeniu kropli na powierzchni. Na każdym z badanych obszarów osadzano po 3 krople dla 3 próbek dla każdego z badanych wariantów.

3.3.12. Ocena kinetyki uwalniania substancji czynnej

Kinetykę uwalniania substancji czynnej przeprowadzono dla grupy próbek pokrytych powłoką polimerową z dodatkiem substancji czynnej: **ChtBBR low** i **Cht BBR high**. Oceniano ilości berberyny uwalnianej z powierzchni implantów do roztworu PBS, imitującego środowisko tkankowe. Próbki inkubowano w szczelnych szklanych fiolkach wypełnionych 5 ml PBS w temperaturze 37°C. Próbki przekładano do kolejnych fiolek wypełnionych świeżym medium w rosnących interwałach czasowych (dla wysokiego stężenia $\Sigma t = 1\text{h}, 3\text{h}, 6\text{h}, 12\text{h}, 24\text{h}, 36\text{h}, 2\text{d}, 3\text{d}, 5\text{d}, 7\text{d}, 10\text{d}, 14\text{d}, 21\text{d}, 30\text{d}, 45\text{d}$; dla niskiego stężenia $\Sigma t = 1\text{d}, 4\text{d}, 14\text{d}, 30\text{d}, 45\text{d}$). Pomiary prowadzono przez 45 dni.

Ilość berberyny określono na podstawie pomiarów spektrofotometrycznych wykonanych na spektrofotometrze Spark 10 M, TECAN dla długości fali 228 μm . Do wyznaczenia stężenia berberyny w badanych roztworach inkubacyjnych użyto krzywej kalibracyjnej wyznaczonej na podstawie pomiarów przeprowadzonych dla roztworów o znanym stężeniu berberyny. Wyznaczone stężenia przeliczono na masę berberyny uwalnianej do środowiska w kolejnych okresach.

3.3.13. Ocena cytotoksyczności

Analizę cytotoksyczności przeprowadzono zgodnie z normą ISO 10993-5 z użyciem fibroblastów mysich (L-929; ATCC) hodowanych na pożywce Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) z dodatkiem 10 surowicy bydlęcej (FBS) 100 U/ml penicyliny i 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycyny oraz 10mM HEPES o pH 7.3. Hodowle prowadzono w 37°C w przy 5% CO_2 .

Ze względu na postać próbek pomiary prowadzono w oparciu o ekstrakty pozyskane poprzez 24 h inkubację wysterylizowanych radiacyjnie próbek w pożywce EMEM (3 ml/cm²) w 37°C.

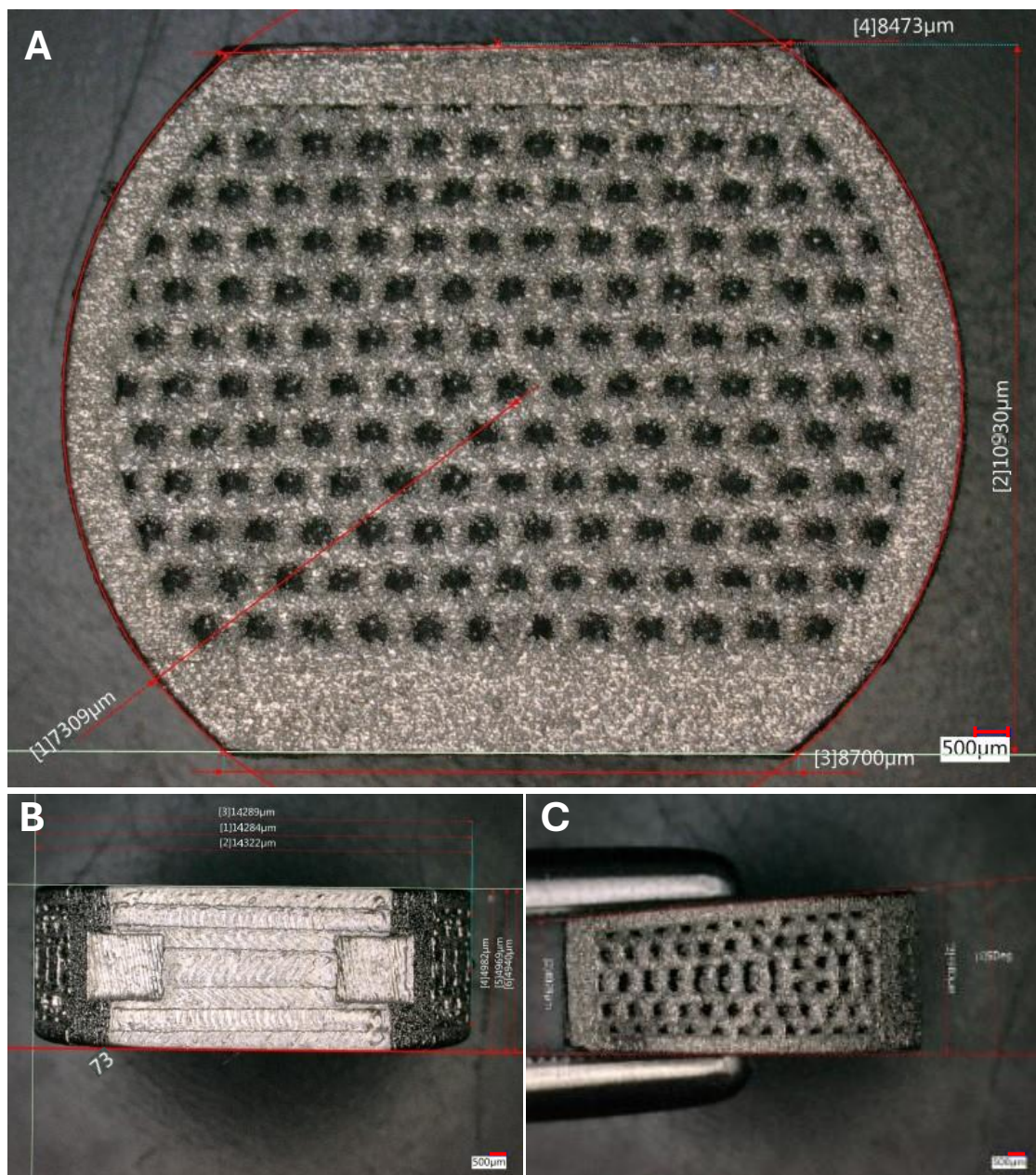
W celu przeprowadzenia pomiarów cytotoksyczności na płytkę 96 dołkową wysiano 100 µl zawiesiny komórek o gęstości 4*10⁴ komórek/ml uzyskanych z hodowli. Po 24h z hodowli usunięto pożywkę, którą zastąpiono ekstraktem z inkubowanych próbek. W eksperymencie użyto 100% ekstraktu oraz jego rozcieńczeń (2x, 4x, 8x, 16x, 32x). Dodatkowo jako kontrolę dodatnią (K+) użyto pożywkę z dodatkiem PVC, a jako kontrolę ujemną (K-) standardową pożywkę EMEM. Komórki inkubowano w ekstraktach przez 72 h. Żywotność komórek oceniono kolorymetrycznie z użyciem testów Cell Counting Kit-8 (CCK- 8) oraz *In Vitro* Toxicology Assay Kit, Sulforhodamine B based (SRB). Dla uzyskanych wyników przeprowadzono analizę statystyczną w programie Statistic 10,0 stosując jednoczynnikową analizę wariacji ANOVA (p<0,05) [223], [224], [225].

4. Wyniki badań

4.1. Ocena wstępna - metodyka i analiza wyników

4.1.1. Ocena zgodności wymiarowej

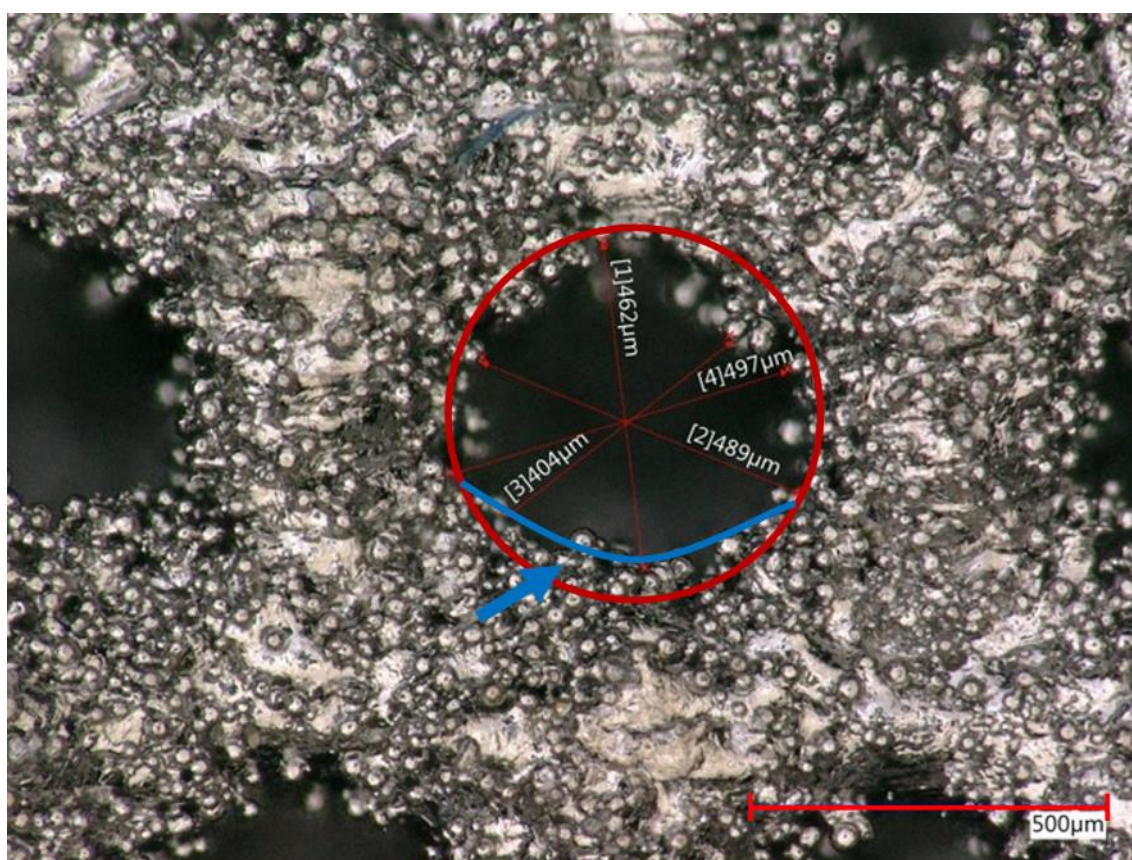
Obserwacje mikroskopowe wykazały wysoką zgodność wymiarów wytworzonych próbek z zaprojektowanym modelem. Różnice między wymiarami rzeczywistymi określonymi na podstawie obserwacji mikroskopowych a wyznaczonymi dla modelu są $<1\%$. Kąt zawarty między płaszczyzną dolną i górną dokładnie odpowiadał wartości z modelu. Wytworzone próbki charakteryzowały się dużą powtarzalnością (Ryc.21.).



Ryc.21. Zdjęcia mikroskopowe wytworzonego implantu wraz z wymiarami, mikroskop świetlny

Na całej powierzchni próbek widoczne były liczne ziarna nie w pełni przetopionego proszku użytego w procesie ich wytwarzania co wynikało z ograniczeń technologicznych metody SLM. Topografia powierzchni była jednorodna w całej objętości implantu. Nie zaobserwowano znaczących różnic między poszczególnymi płaszczyznami wydruku. Jediną powierzchnią, która charakteryzowała się odmienną morfologią była przednia, zabudowana ściana implantu (Ryc.21B). Powierzchnia ta stanowiła podstawę podczas procesu wytwarzania. Na powierzchni tej nie występuje nie w pełni przetopiony proszek, ponieważ został on usunięty mechanicznie wraz z podporami koniecznymi do wytworzenia wydruku.

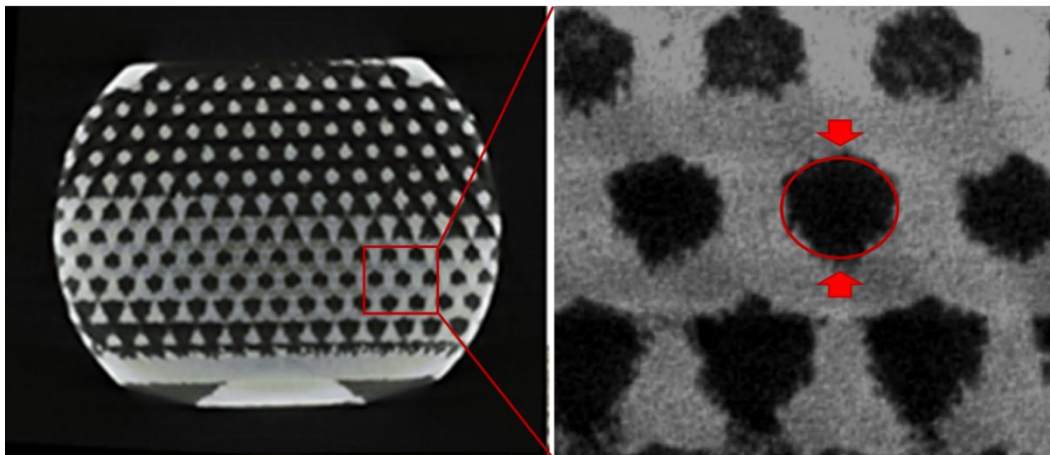
Szczegółowa analiza pojedynczych porów wykazała nieznaczne spłaszczenie sferycznych porów w obrębie wytworzonej struktury porowej (Ryc.22.). Średnica porów zależnie od ich umiejscowienia w obrębie implantu wynosiła 400-600 μm . Pory charakteryzowały się miejscami mniejszą średnicą niż zamodelowane $\text{\O}600 \mu\text{m}$. Ze względu na nieregularne rozłożenie ziaren osadzonych na powierzchni wokół porów wyznaczone średnice w obrębie jednego pora były zmienne, a najmniejsze wartości wyznaczano zazwyczaj wzdłuż osi prostopadłej do płaszczyzny wydruku.



Ryc.22. Przykładowe zdjęcie mikroskopowe pora w obrębie wytworzonej struktury skafoldu. Na niebiesko zaznaczono spłaszczenie wytworzonego pora, mikroskop świetlny

4.1.2. Mikrotomografia komputerowa

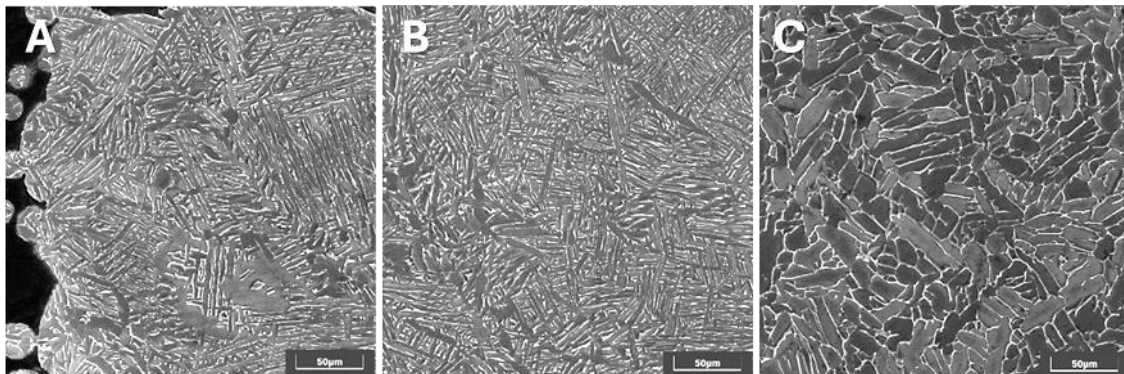
Skany uzyskane dzięki mikrotomografii potwierdziło otwarty charakter wytworzonej struktury. Uzyskane zdjęcia poszczególnych przekrojów wykazały jednolitą geometrię wytworzonych porów oraz belek w całej objętości próbki. Uwidocznione przekroje belek charakteryzowały się nieznacznym wydłużeniem w osi Z (prostopadłej do płaszczyzny wydruku) (Ryc.23.). W obrazach mikro-CT nie wykazano obecności zamkniętych porów, nieciągłości materiału w obrębie belek czy też fragmentów luźnego materiału uwięzionego wewnątrz struktury skafoldu.



Ryc.23. Przykładowy przekrój próbki zrekonstruowany na podstawie CT

4.1.3. Struktura metalograficzna

W oparciu o normę ISO 20160:2006 oceniono strukturę implantów porównując ją do wzorców. Dla wszystkich przekrojów zaobserwowano dwufazową strukturę $\alpha+\beta$ charakterystyczną dla stopu Ti6Al4V (Ryc.24.). Obserwacja ta dotyczy struktur materiału w części litej jak i porowej.



Ryc.24. Struktury metalograficzne ujawnione dla przygotowanych zglądów, SEM
A – struktura metalograficzna prostopadła do płaszczyzny wydruku w obrębie belki,
B – struktura metalograficzna prostopadła do płaszczyzny wydruku w obrębie ramki,
C – struktura metalograficzna równoległa do wydruku w obrębie ramki

Szczegółowa analiza struktur wykazała jej zróżnicowanie zależne od płaszczyzny obserwacji. Strukturę w płaszczyźnie poprzecznej (równoległej do płaszczyzny wydruku) przyporządkowano do wzorca A4, natomiast strukturę podłużną (prostopadłą do płaszczyzny wydruku) do wzorca A3. Rozbieżność między strukturą materiału drukowanego w poszczególnych płaszczyznach jest charakterystyczna dla elementów wytwarzanych technologią SLM i wynika ze specyfiki procesu wytwarzania.

4.1.4. Porowatość rzeczywista

Przeprowadzone pomiary wykazały zbliżoną wartość gęstości materiału wyznaczoną na podstawie pomiarów hydrostatycznych i gęstości litego Ti6Al4V podanej przez producenta materiału (Tab.4.). Wartości porowatości badanych próbek wyznaczone obiema metodami były zbliżone. Zgodnie z przewidywaniami rzeczywista porowatość badanych próbek była niższa niż ta wynikająca z modelu, jednak nie wykazano znaczących różnic między porowatością poszczególnych próbek. Rozbieżności między porowatością zaprojektowanego modelu, a porowatością rzeczywistą wynikają ze zwiększonej grubości belek tworzących strukturę porową. Spowodowane jest to ograniczoną dokładnością metody SLM. Mimo rozbieżności porowatość wytworzonych struktur uznano za satysfakcjonującą. Ocena porowatości modelu przeprowadzona dla cylindrycznych wycinków wykazała, że porowatość w obrębie struktury porowej jest o ponad pkt. 10% większa niż wyznaczana dla całego implantu. Niestety ze względu na postać próbek niemożliwe było ocenienie rzeczywistej porowatości samej struktury porowej dla wytworzonych implantów.

Tab.4. Parametry związane z gęstością i porowatością wytworzonych implantów wyznaczone na podstawie zaprojektowanego modelu, pomiarów hydrostatycznych i piknometrii helowej

		Wg modelu	Waga hydrostatyczna	Piknometria helowa	Wg modelu dla cylindrycznego wycinka
Objętość pozorna	[mm ³]	676,7			93,5
Objętość rzeczywista	[mm ³]	232,7	338,6(27)	344,9(73)	21,3(5)
Porowatość	[%]	65,6	50,0(4)	49,0(10)	76,6
Gęstość	[g/cm ³]	4,43	4,37(10)	4,36(8)	

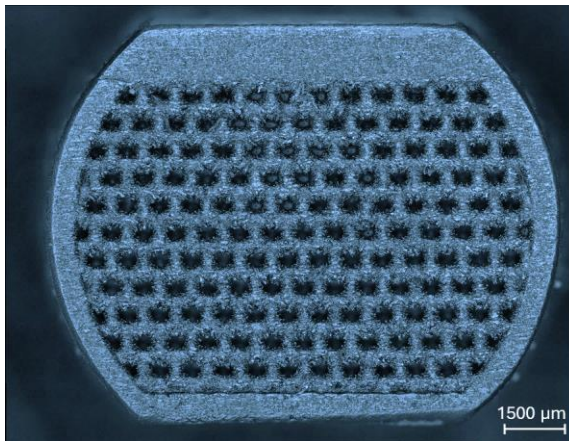
4.1.5. Ocena wytrzymałości mechanicznej

Badane próbki wykazywały liniową zależność naprężenia w funkcji odkształcenia w całym zakresie pomiarowym. Podczas pomiarów nie osiągnięto wartości granicy plastyczności dla stopu Ti6Al4V. Obserwacje próbek po pomiarach nie wykazały ich deformacji. Na tej podstawie stwierdzono, że wytrzymałość mechaniczna dla zaprojektowanych implantów jest adekwatna dla ich planowanego zastosowania [226].

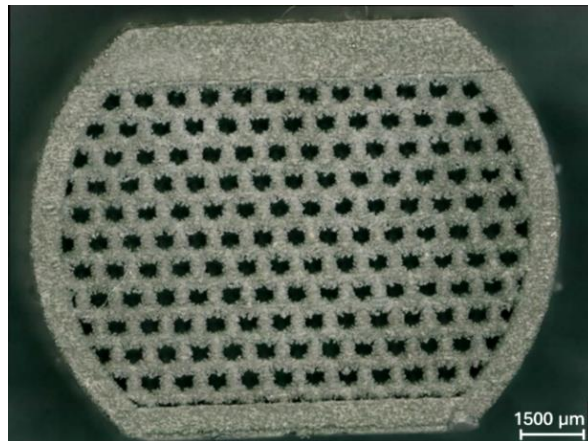
4.2. Funkcjonalizacja powierzchni z wykorzystaniem metod elektrochemicznych

4.2.1. Ocena mikroskopowa

Obserwacje makroskopowe próbek po procesie UA i PEO wykazały zróżnicowany wpływ tych zabiegów na zabarwienie ich powierzchni. (Ryc.25.). Utlenianie anodowe spowodowało zmianę zabarwienia powierzchni na jasno niebieską przy jednoczesnym zachowaniu połysku próbek. Próbki poddane PEO charakteryzowały się matową, ciemnoszarą powierzchnią.

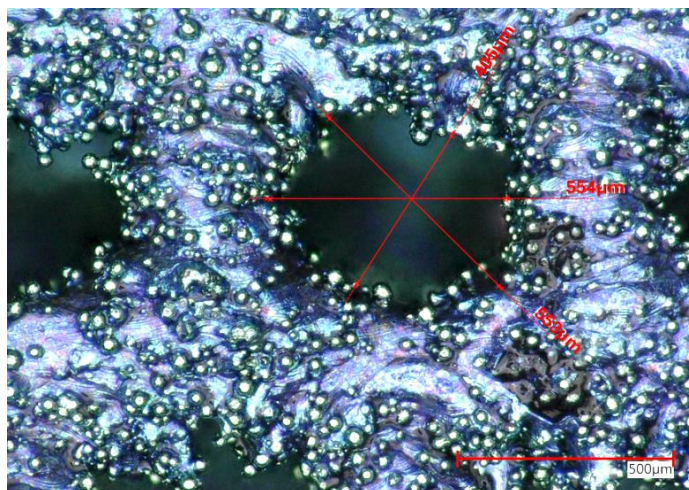


Ryc.25A. Zdjęcie mikroskopowe powierzchni implantu poddanego UA, mikroskop świetlny



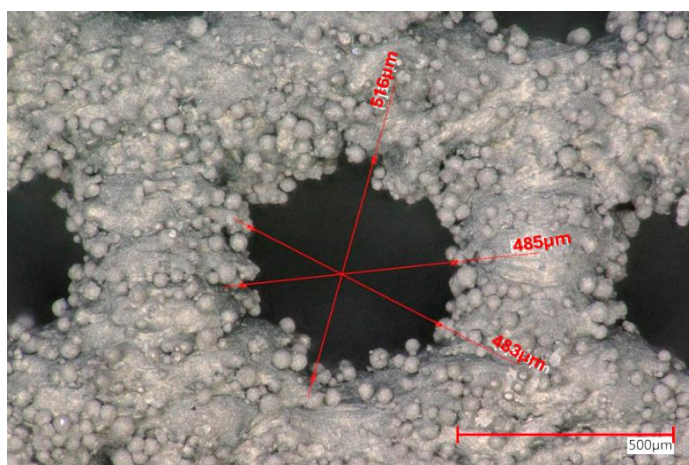
Ryc.25B. Zdjęcie mikroskopowe powierzchni implantu poddanego PEO, mikroskop świetlny

Obserwacje z wykorzystaniem mikroskopii świetlnej ujawniły zróżnicowany wpływ przeprowadzonych zabiegów na topografię powierzchni implantów. Utlenianie anodowe nie wpłynęło na morfologię powierzchni próbek, w szczególności nie wpłynęło na ilość osadzonych na niej ziaren nieprzetopionego proszku. Nie zaobserwowano również zmiany wielkości pojedynczych porów tworzących otwartą strukturę skafoldu (Ryc.26.).



Ryc.26. Zdjęcie mikroskopowe struktury porowej implantu poddanego **UA**, mikroskop świetlny

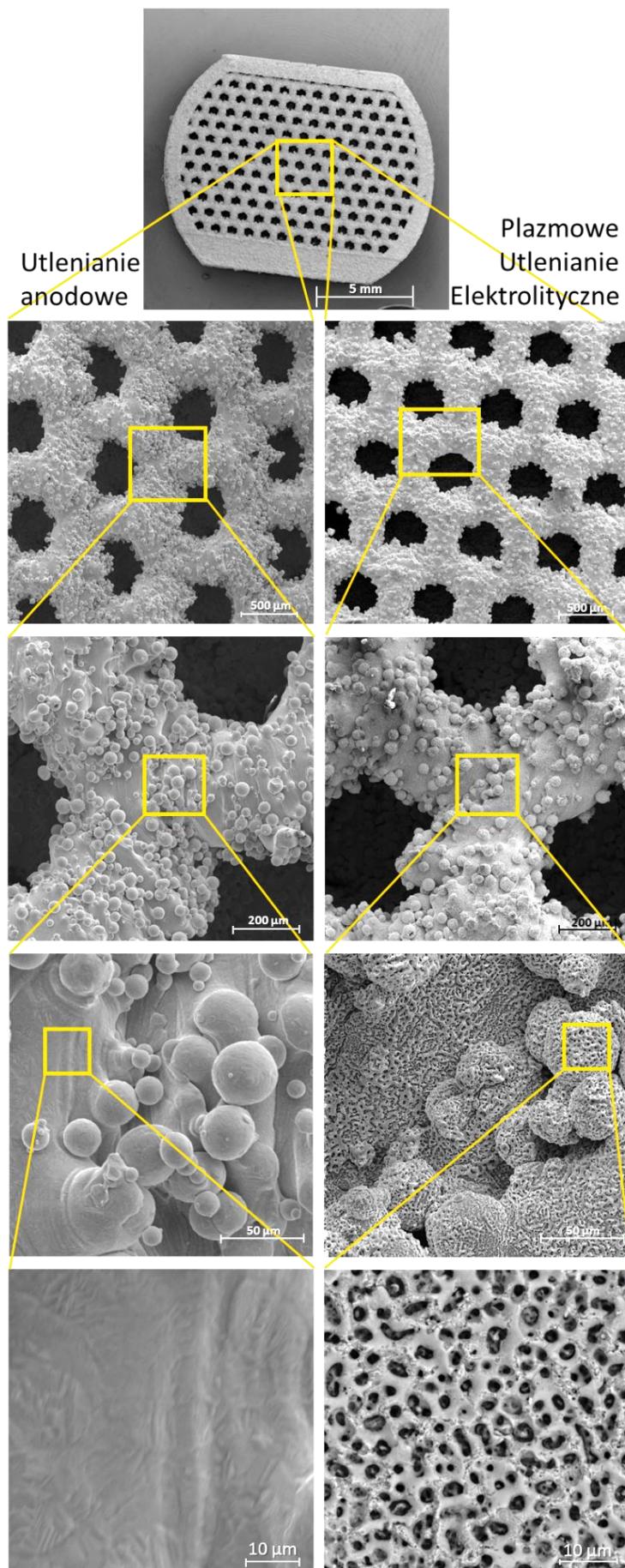
Dla próbek poddanych zabiegowi **PEO** zaobserwowano nieznaczny spadek ilości nieprzetopionego proszku osadzonego na powierzchni poszczególnych belek, jednak wielkość pojedynczych porów tworzących strukturę skafoldów pozostała niezmienną (Rys.27.).



Ryc.27. Zdjęcie mikroskopowe struktury porowej implantu poddanego **PEO**, mikroskop świetlny

Obserwacje z wykorzystaniem SEM potwierdziły brak wpływu **UA** na strukturę powierzchni (Ryc.30.). Pomimo, iż powierzchnia charakteryzowała się wysokim rozwinięciem wynikającym z technologii wytwarzania i obecnością licznych ziaren nieprzetopionego proszku na powierzchni materiał w obrębie pojedynczych ziaren oraz litych belek charakteryzował się dużą gładkością w porównaniu do powierzchni po **PEO**.

Plazmowe utlenianie elektrolityczne spowodowało zmianę morfologii powierzchni poprzez wytworzenie na niej licznych mikroporów, które występowały zarówno w obrębie belek jak i pojedynczych ziaren nieprzetopionego proszku (Ryc.28.). Wytworzoną strukturę można uznać za hierarchiczną. Mimo, że mikropory charakteryzowały się wysokim nieuporządkowaniem ich wielkość i charakter był jednorodny w całej objętości próbki.



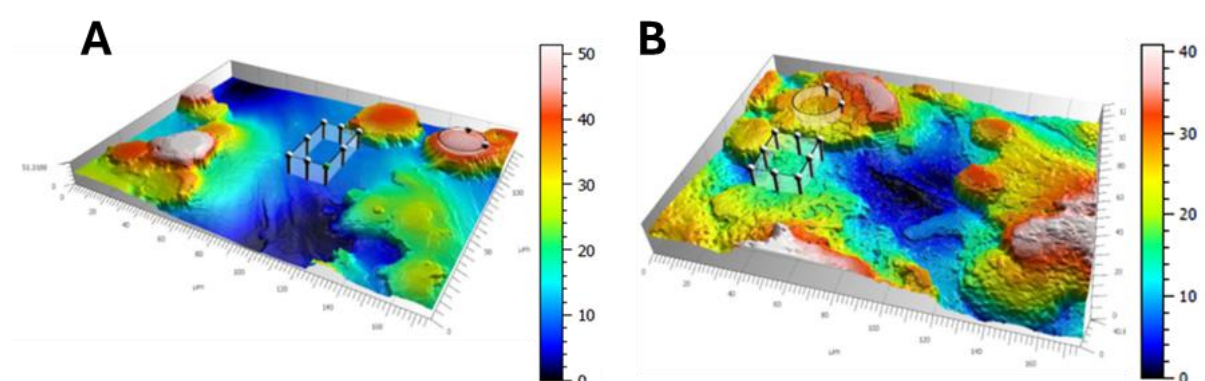
Ryc.28. Powierzchnia próbek poddanych UA i PEO, SEM

4.2.2. Topografia powierzchni

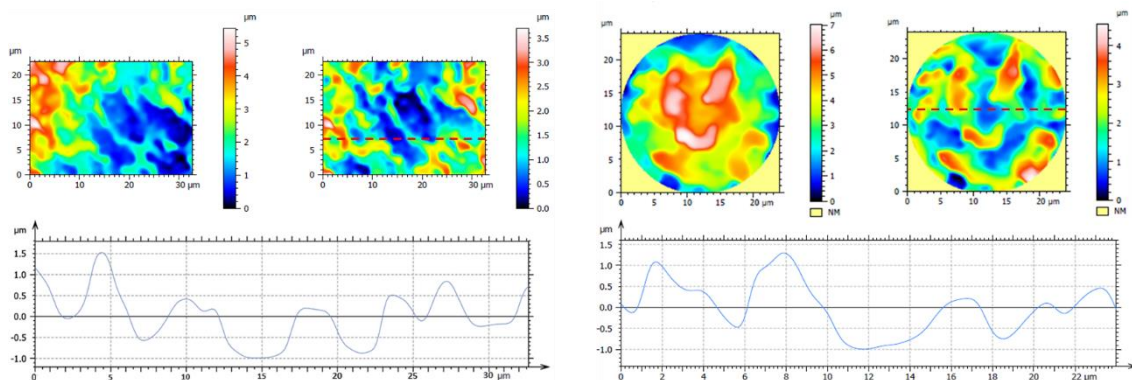
Pomiary chropowatości wykazały duże rozwinięcie powierzchni wytworzonych próbek (Tab.5., Ryc.29.). Wartość parametru chropowatości **Sa** wyznaczanego globalnie dla próbek w stanie wyjściowym wynosiła $\sim 10 \mu\text{m}$. Nawet w obrębie teoretycznie płaskiej ramki powierzchnia charakteryzowała się wysoką falistością oraz obecnością licznych ziaren proszku osadzonego na powierzchni.

Utleniania anodowe implantów nie wpłynęło na chropowatości ich powierzchni. Wyznaczone parametry zarówno globalnie jak i dla małych obszarów dla **SW** i **UA** były bardzo zbliżone (Ryc.29A.). Pomiary mikrochropowatości dla tych próbek wykazały wysoką lokalną gładkość powierzchni oraz brak znaczącej różnicy między wyznaczanymi profilami chropowatości dla obszarów w ramce skafoldu oraz pojedynczych belek.

Proces **PEO** spowodowało wytworzenie licznych mikroporów powierzchniowych przy równoczesnym zmniejszeniu chropowatości mierzonej globalnie (Ryc.29B.). Badania prowadzone dla małych obszarów w obrębie pojedynczych ziaren oraz litego materiału belek pomiędzy ziarnami, wykazały jednorodny charakter wytworzonej warstwy tlenkowej (zaznaczone obszary na ryc. 29). Przy zastosowaniu korekcji kształtu pojedyncze mikropory na sferycznych ziarnach charakteryzowały się podobnym kształtem, szerokością i głębokością do mikroporów w obrębie litych belek. Na podstawie wyznaczonych profili chropowatości badanych dla małych obszarów określono głębokość i szerokość pojedynczego mikropora na $0,5\text{-}2,5 \mu\text{m}$ (Ryc. 30).[210]



Ryc.29. Mapa topografii powierzchni z zaznaczonymi obszarami dla których wyznaczono lokalną chropowatość po procesie **UA** (A) oraz **PEO** (B)



Ryc.30. Przykładowe profile chropowatości wyznaczone dla małych obszarów w obrębie powierzchni poddanej PEO

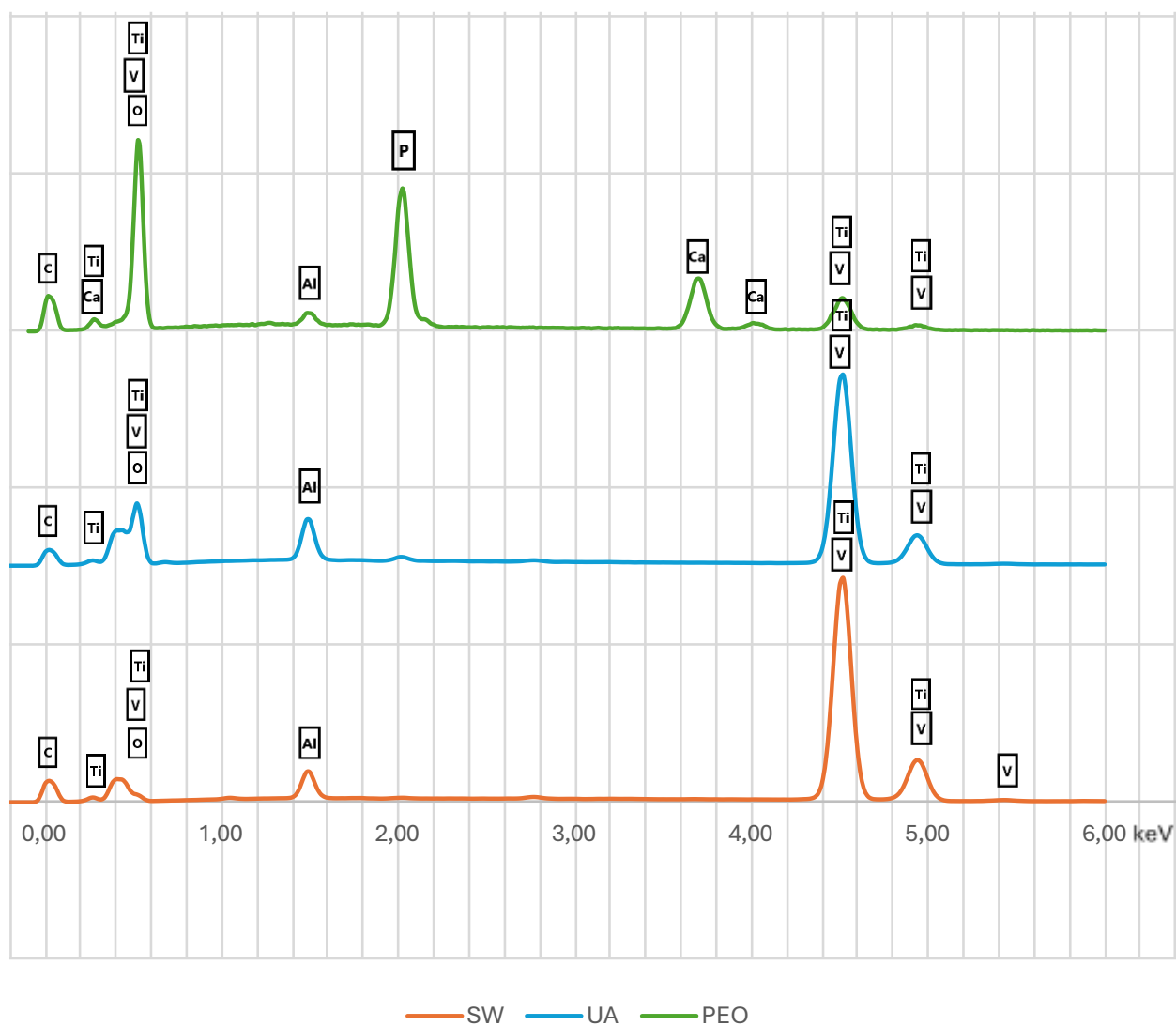
Tab.5. Zestawienie parametrów topografii powierzchni wyznaczonych dla próbek w stanie wyjściowym (SW), utlenionych anodowo (UA) i oraz poddanych plazmowemu utlenianiu elektrolitycznemu (PEO)

	SW			UA			PEO		
	Globalnie	W obrębie belki	W obrębie ziarna	Globalnie	W obrębie belki	W obrębie ziarna	Globalnie	W obrębie belki	W obrębie ziarna
Ramka									
Sa [μm]	10,20	0,20	0,20	9,82	0,21	0,18	8,45	0,59	0,69
Rz [μm]		0,24	0,24		0,23	0,23		1,66	0,93
Ra [μm]		0,05	0,05		0,05	0,06		0,39	0,22
Belki									
Sa [μm]	8,80	0,37	0,28	8,93	0,42	0,30	7,84	0,53	0,52
Rz [μm]		0,14	0,13		0,13	0,15		0,55	0,40
Ra [μm]		0,03	0,03		0,03	0,03		0,16	0,10

4.2.3. Skład chemiczny warstwy powierzchniowej

Analiza składu chemicznego warstw wierzchnich wykazała, iż składa się ona z pierwiastków stopowych, tlenu, węgla oraz w przypadku PEO pierwiastków wchodzących w skład stosowanej kąpieli. Zastosowane modyfikacje elektrochemiczne spowodowały wytworzenie warstwy tlenkowej na powierzchni badanych implantów. Ze względu na rozbudowaną topografię powierzchni oraz specyfikę pomiarów EDS wyznaczone składy chemiczne warstwy wierzchniej należy traktować półilościowo, w szczególności w odniesieniu do procentowego udziału węgla czy tlenu.

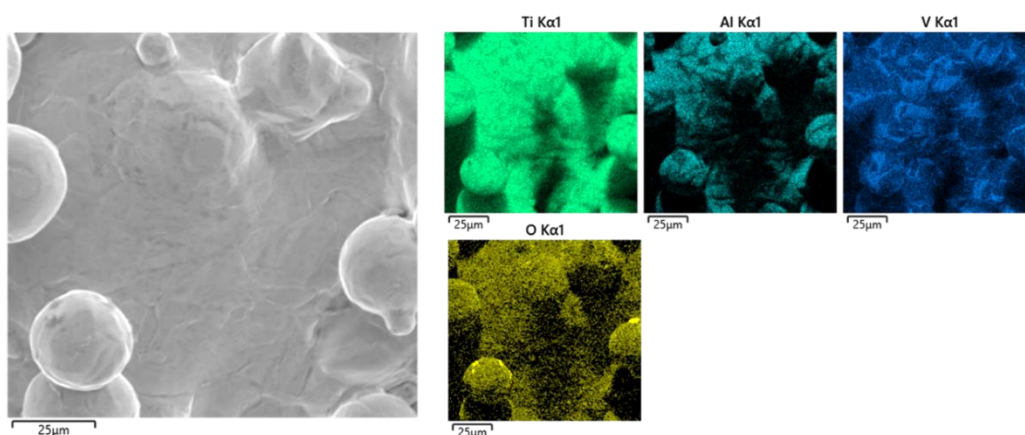
Wytworzone w procesie **UA** warstwy charakteryzują się mniejszą zawartością V w porównaniu do stopu, natomiast w warstwach wytworzonych w procesie **PEO** stwierdzono zmniejszenie udziału zarówno V jak i Al. Warstwy wierzchnie próbek poddanych **PEO** zostały dodatkowo wzbogacone o wapń i fosfor, pochodzące z kąpieli elektrolitycznej. Analiza rozkładu poszczególnych pierwiastków (Ryc.31., Ryc.32., Tab.6.) wykazała, że wytworzone powłoki są jednorodne. Badania prowadzone na powierzchniach wewnętrznych, do których dostęp zapewniło przecięcie próbek nie wykazywały znaczących różnic w składzie chemicznym warstwy wierzchniej w porównaniu do powierzchni zewnętrznych skafoldów.



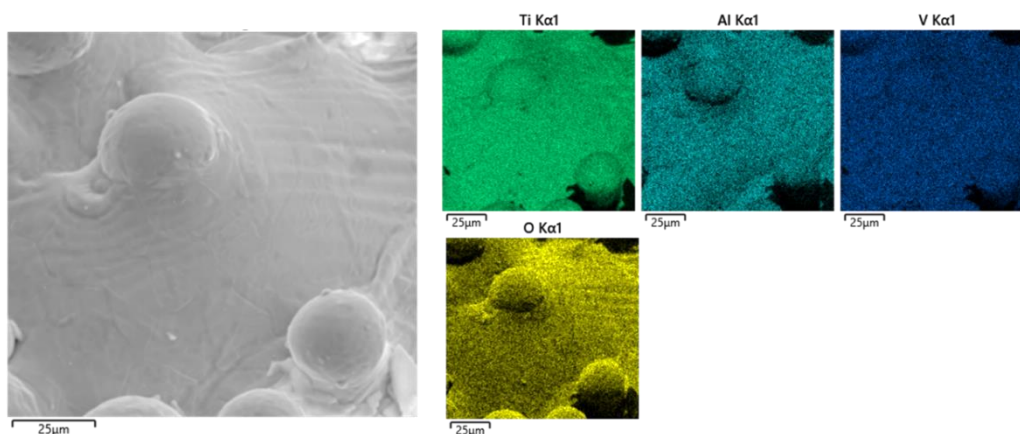
Ryc.31. Widmo EDS dla próbek **SW** i poddanych modyfikacji **UA** i **PEO**

Tab.6. Skład chemiczny warstwy powierzchniowej próbek **SW**, **UA** i **PEO** określony na podstawie zmierzonego widma EDS

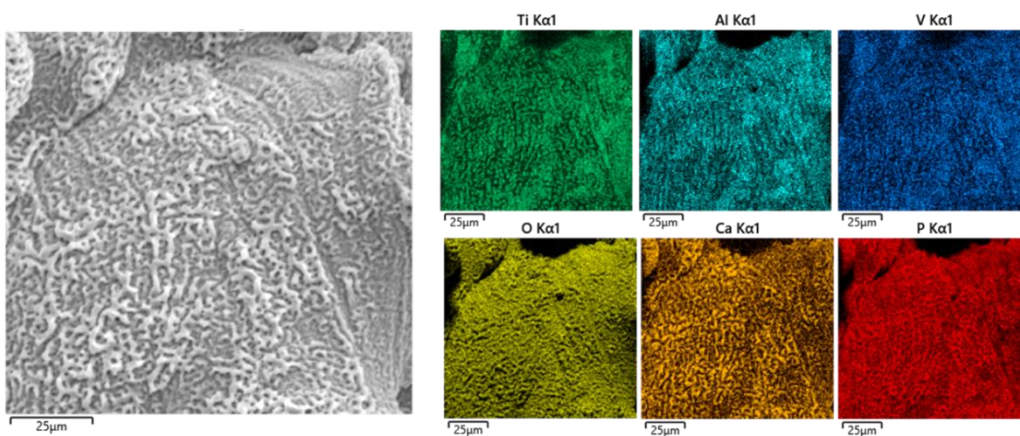
	Ti	Al	V	O*	C*	Ca	P
SW	86,2	3,0	6,2	3,4	1,1	-	-
UA	58,3	3,5	1,9	35,2	1,1	-	-
PEO	23,2	1,1	1,0	39,3	1,8	17,6	16,0



Ryc.32A. Mapa EDS rozkładu pierwiastków dla próbek w stanie wyjściowym, SEM



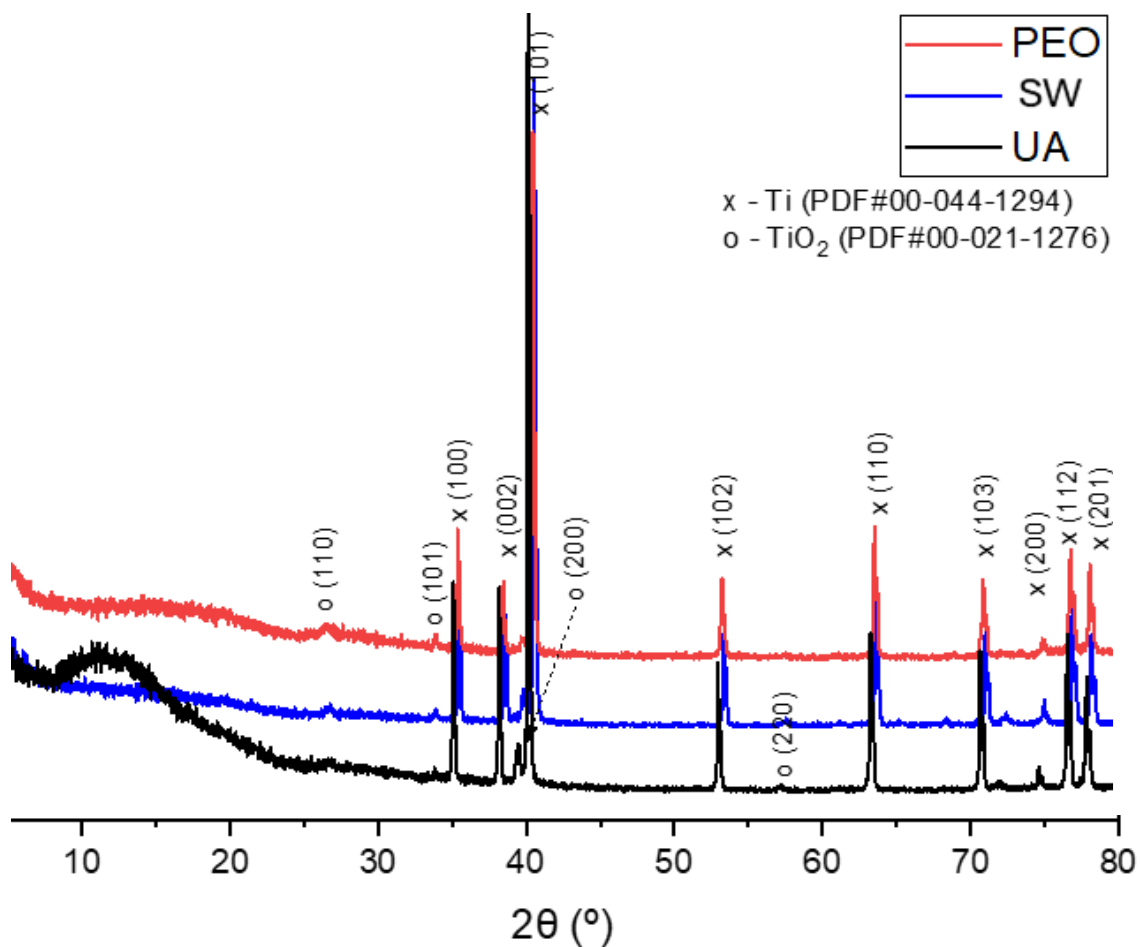
Ryc.32B. Mapa EDS rozkładu pierwiastków dla próbek **UA**, SEM



Ryc.32C. Mapa EDS rozkładu pierwiastków dla próbek **PEO**, SEM

4.2.4. Analiza składu fazowego XRD

Uzyskane wyniki w postaci dyfraktogramów pozwoliły na analizę składu fazowego badanych próbek. Uzyskane wzory XRD są zgodnie z oczekiwanym dyfraktogramem charakterystycznym dla stopów tytanu wytwarzanego metodą SLM (Ryc.33.). Widmo XRD dla **SW** jest charakterystyczne dla czystego fazowo tytanu o strukturze heksagonalnej z niewielką ilością (poniżej 2%) tlenku rutylu (TiO_2). Dyfraktogramy dla próbek po modyfikacji **PEO** charakteryzują się obecnością niewielkiego amorficznego halo co może świadczyć o obecności amorficznego tlenku na powierzchni rusztowania. W widmie dla **UA** również zaobserwowano amorficzne halo o większej intensywności. Parametry sieci określone na podstawie udokładnienia Rietwiela świadczą o wpływie zastosowanych modyfikacji na strukturę krystaliczną co potwierdza skuteczność przeprowadzonych modyfikacji. **UA** spowodowało wzrost wielkości kryształitów przy zmniejszeniu odkształceń sieci, natomiast **PEO** zmniejszenie wielkości kryształitów przy zwiększonych odkształceniach (Tab.7.).



Ryc.33. Dyfraktogram dla stopu tytanu drukowanego w technologii SLM w stanie wyjściowym i po modyfikacji **PEO** i **UA**

Tab. 7. Wybrane parametry strukturalne faz krystalicznych wyznaczone metodą udokładnienia Rietvelda; wartości w nawiasach oznaczają współczynnik zmienności, a nie odchylenie standardowe

<i>Próbka</i>	Faza (grupa przestrzenna)	Parametry sieci, ICDD, Å	Obliczone parametry sieci, Å	Wielkość krystalitów, nm	Odształcenie sieci, %
<i>SW</i>	α -Ti (<i>P6₃/mmc</i>)	a = b = 2,95, c = 4,68	a = b = 2,925, c = 4,673	160 (5)	0,131 (5)
<i>UA</i>	α -Ti (<i>P6₃/mmc</i>)	a = b = 2,95, c = 4,68	a = b = 2,925, c = 4,674	191 (9)	0,113 (6)
<i>PEO</i>	α -Ti (<i>P6₃/mmc</i>)	a = b = 2,95, c = 4,68	a = b = 2,926, c = 4,681	145 (6)	0,147 (6)

4.2.5. Ocena własności korozyjnych

Przeprowadzone badania potencjostatyczne dla próbek w stanie wyjściowym oraz modyfikowanych elektrochemicznie wykazały zróżnicowany wpływ zastosowanych modyfikacji na ich potencjał obwodu otwartego E_{ocp} (Tab.8.). Próbki nie poddane ekspozycji na roztwór PBS i niemodyfikowane powierzchniowo charakteryzował E_{ocp} bliski 0 V, próbki utleniane anodowo posiadały E_{ocp} dodatni, a poddane plazmowemu utlenianiu elektrolitycznemu potencjał ujemny. Inkubacja próbek w środowisku imitującym środowisko tkankowe spowodowała zmianę potencjału korozyjnego wszystkich badanych próbek na ujemny. Próbki po **PEO** charakteryzowały się największą stabilnością wyznaczonych potencjałów korozyjnych.

Tab.8. Średnie potencjały E_{ocp} wyznaczone dla badanych próbek bezpośrednio po modyfikacji oraz po inkubacji w środowisku imitującym środowisko tkankowe

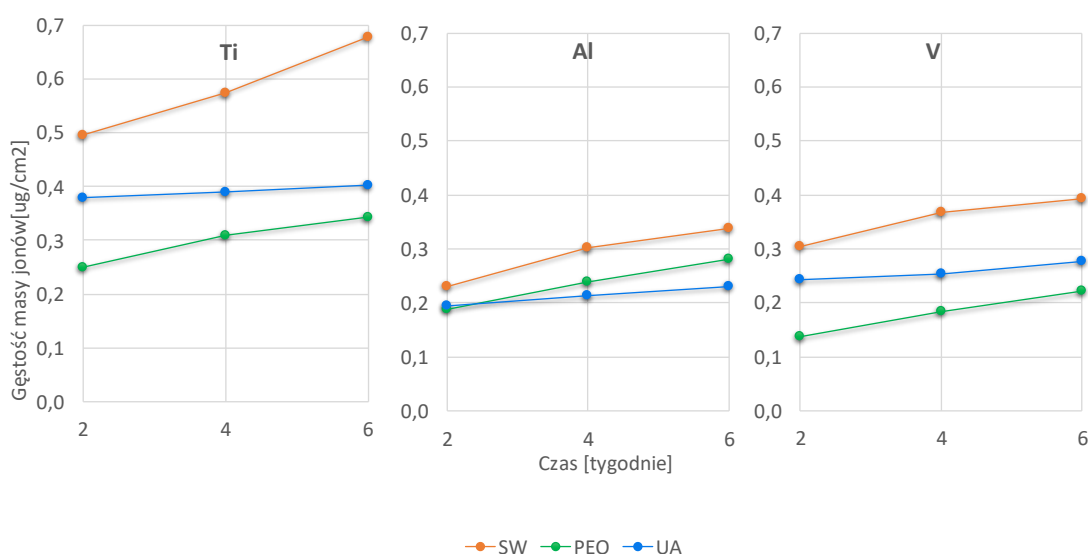
Czas inkubacji w PBS	Stan wyjściowy	Utlenianie anodowe	Plazmowe utlenianie elektrolityczne
0 tyg	-11(19)	403(29)	-533(16)
2 tyg	-468(11)	-551,0(60)	-540,7(64)
4 tyg	-430,0(33)	-547(18)	-541,7(89)
6 tyg	-415,0(20)	-568(12)	-519,0(53)

4.2.6. Ocena uwalniania jonów metali do środowiska

Pomiary wykazały ograniczenie ilości jonów metali w roztworach, w których inkubowane były badane implanty poddane zaproponowanym modyfikacją elektrochemicznym (Ryc.34.). Próbki poddane **UA** i **PEO** wykazywały nawet dwukrotny spadek ilości jonów Ti, Al i V uwolnionych do środowiska, co było najbardziej widoczne w przypadku jonów tytanu. Pomiary stężenia Ca i P dla roztworów, w których inkubowane były

próbki nie wykazały obecności Ca we wszystkich badanych próbach. Jedynie dla próbek po **PEO** oznaczono niewielką ilość P w roztworze po 6 tygodniach inkubacji.

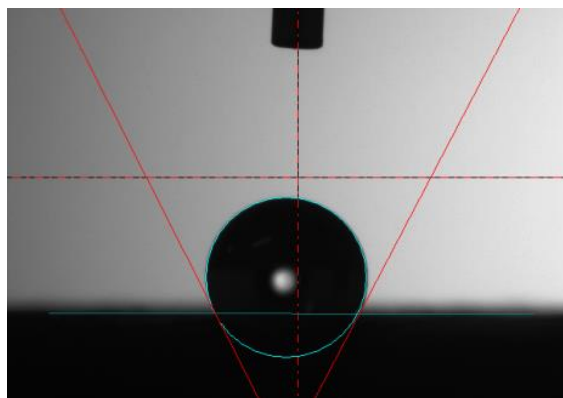
Stężenie jonów poszczególnych pierwiastków przeliczono na gęstość masy jonów uwalnianych z powierzchni całkowitej próbki, której wartość określono na podstawie modelu komputerowego ($18,8 \text{ cm}^2$). Dla wszystkich badanych próbek największy wyrzut pierwiastków metalicznych zauważany był w pierwszych 2 tygodniach. Porównując wpływ metod modyfikacji na otrzymane wyniki wykazano, że **PEO** w większym stopniu ograniczyło przenikanie jonów Ti i V, jednak modyfikacja **UA** lepiej zabezpieczyła powierzchnie przed przenikaniem Al.



Ryc.34. Gęstość masy jonów uwalnianych z powierzchni implantów do roztworu w funkcji czasu ekspozycji

4.2.7. Zwilżalność

Pomiary zwilżalności wykazały silnie hydrofobowy charakter implantów w stanie wyjściowym. Zastosowane modyfikacje elektrochemiczne spowodowały spadek wyznaczanych kątów zwilżania. Próbki utleniane anodowo charakteryzowały się silną hydrofilowością – osadzana kropla dla wszystkich badanych obszarów rozplýwała się bezpośrednio po kontakcie kropli z podłożem. Próbki po **PEO**, choć charakteryzowały się mniejszym kątem zwilżania niż **SW** nadal wykazywały charakter hydrofobowy (Ryc.35.). Wyznaczane kąty zwilżania dla PBS były mniejsze niż te wyznaczane dla wody, jednak zarówno dla próbek w stanie wyjściowym, jak i **PEO** były $\geq 90^\circ$ (Tab.9.).



Ryc.35. Kropla wody osadzonej na powierzchni próbki po **PEO**

Tab.9. Zestawienie kątów zwilżania wyznaczanych dla implantów **SW**, **UA** i **PEO**

	Stan wyjściowy	Utlenianie anodowe	Plazmowe utlenianie elektrolityczne
Woda demineralizowana			
Skafold	134,7(35)	0	125,8(10)
Ramka	131,4(34)	0	122,80(70)
Ściana boczna	129,3(42)	0	117,00(80)
Roztwór PBS			
Skafold	95,5(42)	0	87,3(60)
Ramka	102,3(35)	0	100,3(35)
Ściana boczna	96,2(28)	0	90,3(26)

4.2.8. Podsumowanie

Przeprowadzone **UA** i **PEO** na badanych próbkach odzwierciedlających rzeczywiste implanty międzykręgowe pozwoliło na wytworzenie warstwy tlenkowej w całej objętości próbki. Obecność warstwy została potwierdzona w badaniach z mikroskopowych z analizą EDS prowadzoną dla powierzchni zewnętrznych oraz wewnętrznych w obrębie otwartej struktury porowej. Warstwy tlenkowe wytworzone **UA** i **PEO** mimo zbliżonego składu chemicznego miały odmienny charakter.

UA nie wpłynęło na topografię powierzchni. Wytworzenie warstwy tlenkowej pozwoliło na znaczącą zmianę zwilżalności oraz własności korozyjnej próbek. Próbki **UA** były skrajnie hydrofilowe co uniemożliwiało osadzenie kropli cieczy na ich powierzchni. Mierzony potencjał obwodu otwartego dla próbek bezpośrednio po modyfikacji był dodatni, jednak zmieniał się on na ujemny już po 2 tygodniach ekspozycji na warunki imitujące środowisko tkankowe.

Wytworzona warstwa tlenkowa pozwoliła na ograniczenie ilości jonów metali przenikających z materiału do otoczenia.

PEO pozwoliło na uzyskanie hierarchicznej struktury powierzchni dzięki wytworzeniu licznych mikroporów powierzchniowych znacząco wpływających na lokalną chropowatość materiału. Powierzchnie próbek po PEO charakteryzowały się nieznacznym ograniczeniem ilości ziaren nieprzetopionego proszku osadzonych na nich. Zastosowanie modyfikacji pozwoliło na nieznaczną poprawę zwilżalności powierzchni, jednak zarejestrowane kąty zwilżania dla obu cieczy były nadal $\geq 90^\circ$. Wyznaczone potencjały obwodu otwartego podczas pomiarów potencjostatycznych dla próbek PEO były najbardziej stabilne i przyjmowały zbliżone wartości niezależnie od ekspozycji na określone warunki środowiskowe. Wytworzona warstwa znacząco ograniczyła ilość jonów metali przenikających do otoczenia. Choć w procesie udało się wbudować Ca i P do warstwy powierzchniowej nie wykazano dostarczenia Ca do otoczenia, a ilość uwalnianego P była bardzo niska.

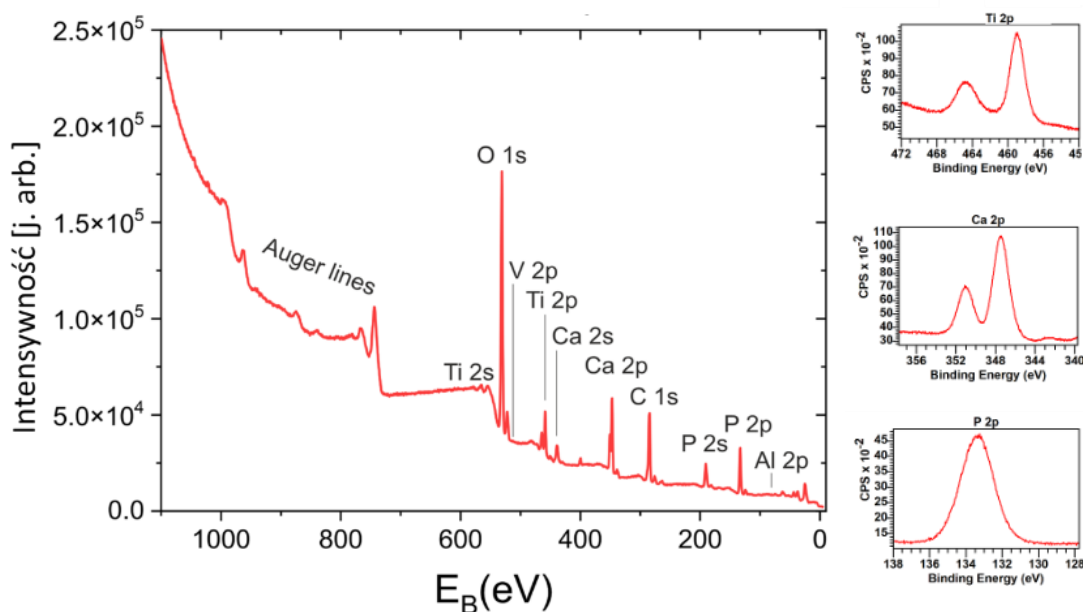
W oparciu o przeprowadzoną ocenę wpływu zastosowanych modyfikacji elektrochemicznych na funkcjonalność i własności użytkowe implantu (Tab.10.) uznano, że modyfikacja PEO zapewnia lepsze właściwości w kontekście jego przewidywanego zastosowania.

Tab.10. Zestawienie oceny wpływu zastosowanych modyfikacji w oparciu o przeprowadzone badania

Kryterium oceny	Oczekiwany wpływ na powierzchnie	UA	PEO
Topografia powierzchni	Jednorodna topografia w całej objętości próbki	+++	+++
	Ograniczenie liczby ziaren obecnych na powierzchni	-	+/-
	Wytworzenie mikroporów na powierzchni	-	++
Zwilżalność	Poprawa zwilżalności	+	+
	Własności hydrofilowe	++	-
Skład chemiczny powierzchni	Obecność warstwy tlenkowej	+	+
	Ograniczenie ilości V i Al w warstwie wierzchniej	++	++
	Obecność Ca i P w warstwie wierzchniej	-	+
Własności korozyjne	Stabilny czasowo potencjał korozyjny (E_{kor})	+/-	+
Degradacja	Ograniczenie ilości jonów metali przenikających do środowiska	++	++
	Dostarczenie do środowiska jonów Ca/P	-	-/+
SUMA:		11,5	14

4.2.9. Analiza składu XPS

Analiza XPS została przeprowadzona na próbkach poddanych PEO. Zmierzone widma XPS wykazały obecność O, Ca i P na powierzchni implantu co potwierdza wytworzenie się warstwy tlenkowej wzbogaconej o związki obecne w roztworze, w którym modyfikowane były próbki. Porównując wyniki analizy XPS z wynikami uzyskanymi dla analizy EDS wykazano znacznie wyższy udział O i P w warstwie powierzchniowej. Co istotne oznaczony udział V na powierzchni był znacząco niższy, na poziomie granicy detekcji.



Ryc.36. Widmo XPS dla próbek PEO wraz z wysokorozdzielczymi widmami XPS wyznaczone w zakresach charakterystycznych dla Ti, Ca i P

Na podstawie analizy zmierzonych widm określono skład chemiczny obszaru przypowierzchniowego badanego implantu (Tab.11.). Dublety obserwowane dla Ti i Ca są charakterystyczne dla tych pierwiastków (Ryc. 36.) Analiza pików, szczególnie ich szerokości (FWHM > 2) i asymetrii, sugeruje wieloskładnikową naturę obserwowanych linii widmowych. Położenie pików Ti wskazuje na brak nieutlenionego Ti na powierzchni i obecność Ti(III)Ox i Ti(IV)Ox. Położenie pików P 2p i Ca 2p może sugerować obecność HAp, fosforanów i tlenków wapnia na powierzchni. W analizie pominięto udział węgla uznając go za zanieczyszczenie wynikające z przechowywania próbek w środowisku atmosferycznym.

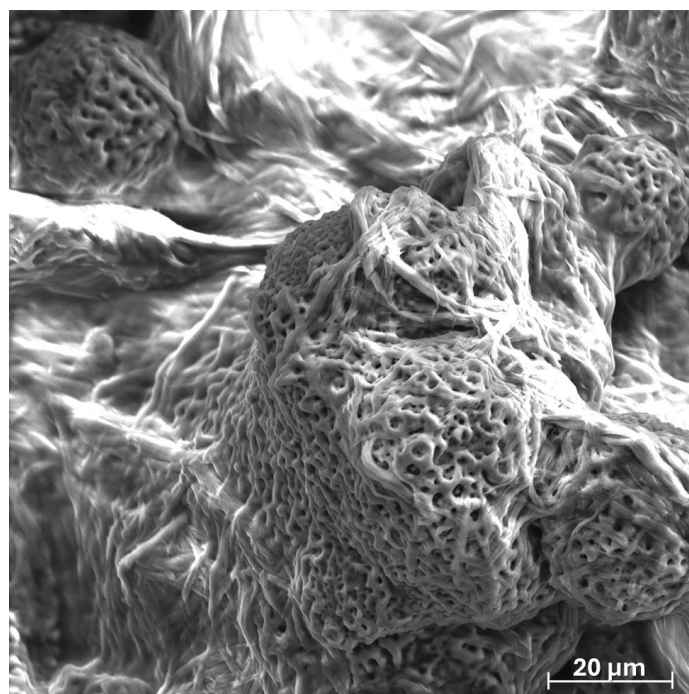
Tab.11. Skład chemiczny warstwy powierzchniowej wytworzone w procesie PEO określony na podstawie XPS

	Ti	Al	V	O	Ca	P
%At	4,68	1,01	0,03	60,47	11,14	22,68-
Pozycja [eV]	456,5	513,5	74,5	531,0	347,0	133,0

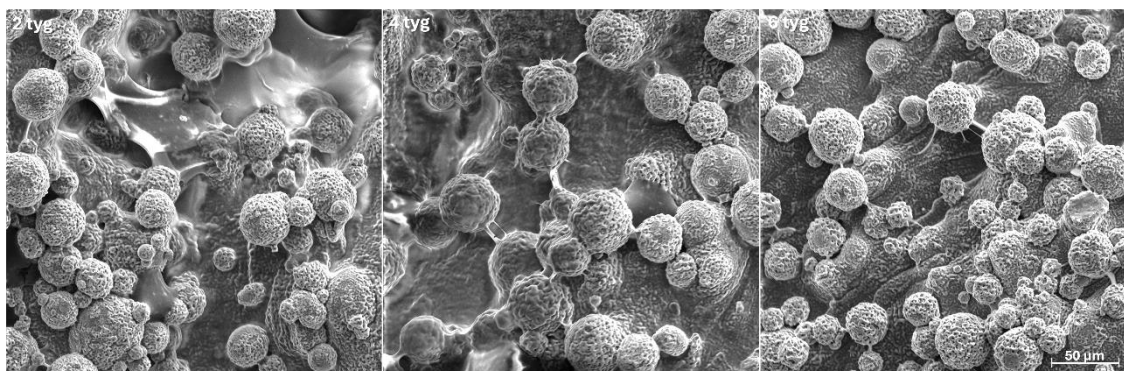
4.3. Funkcjonalizacja powierzchni próbek z wykorzystaniem biodegradowalnej powłoki polimerowej

4.3.1. Ocena morfologii wytworzonej warstwy

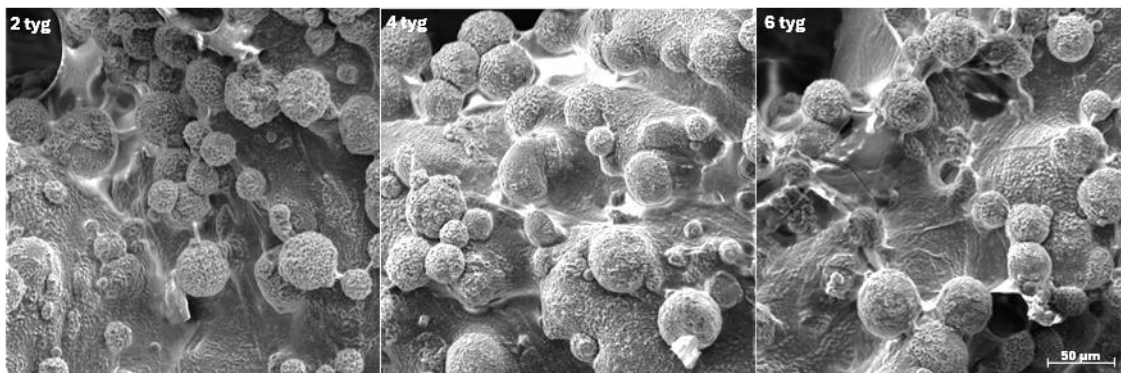
Obserwacje SEM wykazały niejednorodny charakter naniesionej warstwy. Złożona topografia próbek wynikająca zarówno z metody wytwarzania jak i zastosowanej modyfikacji powierzchniowej spowodowała koncentrację nakładanego polimeru w zagłębieniach szczególnie w okolicach ziaren osadzonych na powierzchni implantów (Ryc.37.). Wytworzone powłoki chitozanowe z dodatkiem berberyny charakteryzowały się włóknistą strukturą, która zanikała wraz ze wzrostem czasu inkubacji (Ryc.38B., Ryc.38C.). Chitozan bez dodatku substancji czynnej w postaci berberyny charakteryzował się jednorodną strukturą (Ryc.38A).



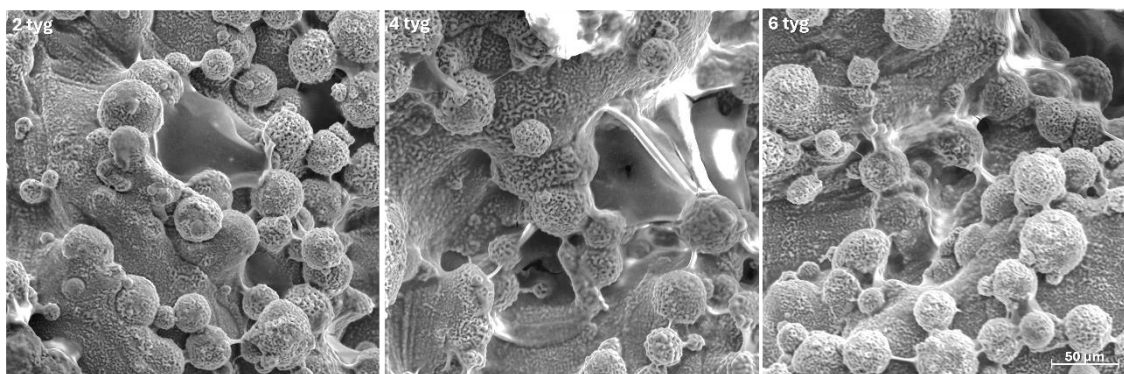
Ryc.37. Przykładowe zdjęcie implantu pokrytego powłoką *ChtBBR high*, SEM



Ryc.38A. Powierzchnia implantów modyfikowanych *PEO* pokrytych *Cht* po 2 4 i 6 tygodniach inkubacji w PBS w 37°C, SEM



Ryc.38B. Powierzchnia implantów modyfikowanych **PEO** pokrytych **ChtBBR low** po 2 4 i 6 tygodniach inkubacji w PBS w 37°C, SEM

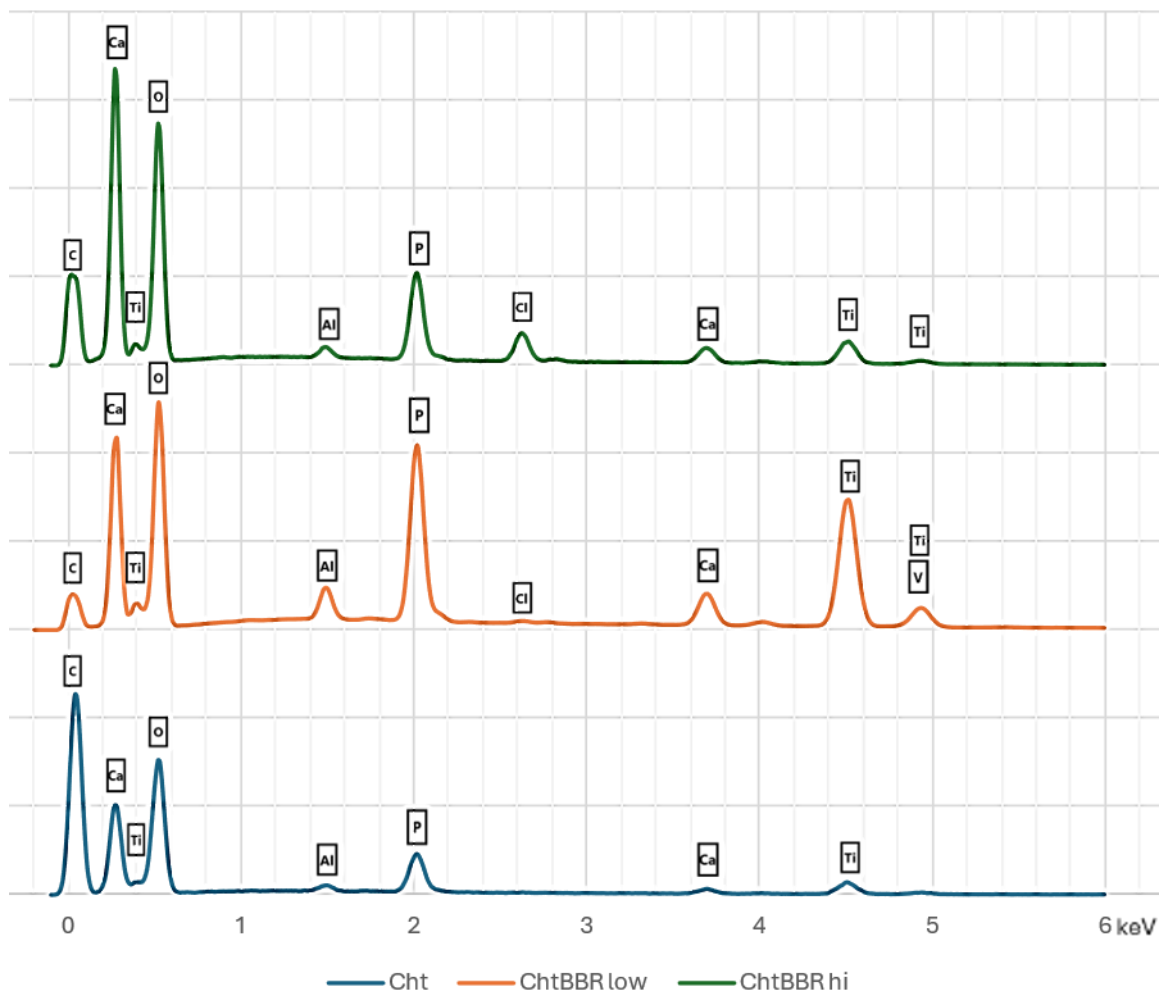


Ryc.38C. Powierzchnia implantów modyfikowanych **PEO** pokrytych **ChtBBR high** po 2 4 i 6 tygodniach inkubacji w PBS w 37°C, SEM

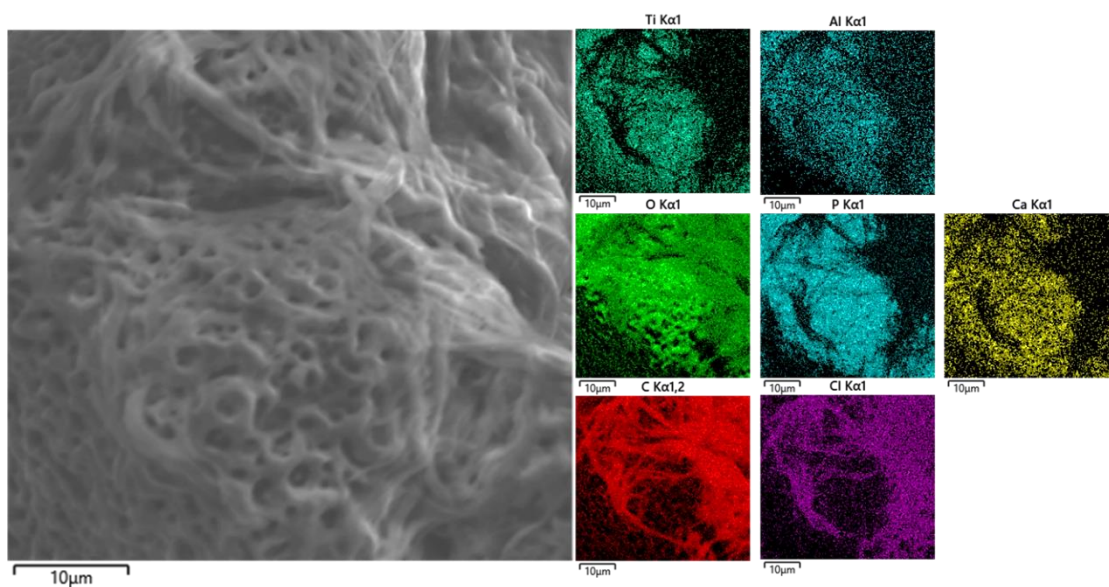
Mimo dużego rozwinięcia podłoża analiza EDS wykazała obecność polimeru na całej powierzchni badanych implantów. Choć ze względu na specyfikę pomiarów EDS dla pierwiastków lekkich uzyskanych wyników nie można traktować jako wyniki ilościowe, analiza jakościowa i półilościowa potwierdziła obecność warstwy polimerowej na całej badanej powierzchni (Ryc.39., Tab.12.). Analogicznie do pomiarów prowadzonych w ramach badań dotyczących zastosowanych modyfikacji elektrochemicznych dokładna analiza widm EDS była utrudniona ze względu na złożoną topografię próbek (Ryc.40.). Mimo długiej ekspozycji na środowisko PBS polimer osadzony na powierzchni badanych implantów był widoczny nawet po 6 tygodnia inkubacji (Ryc.38.).

Tab.12. Skład chemiczny warstwy wierzchniej próbek SW, UA i PEO określony na podstawie spektrum EDS

	Ti	Al	V	O*	C*	Ca	P	Cl
Cht	12,5	0,8	-	40,2	36,8	2,1	7,6	
ChtBBR low	18,5	1,1	0,7	34,9	35,1	2,3	7,3	0,1
ChtBBR high	10,4	0,5	-	29,1	47,1	3,0	6,8	3,2



Ryc.39. Widmo EDS próbek pokrytych powłoką polimerową



Ryc.40. Zdjęcie SEM w przykładowym rozkładem pierwiastków obecnych w warstwie wierzchniej próbki **ChtBBR high**, SEM

Pomiary zmiany masy próbek po pokryciu warstwą polimerową wykazały wysoką powtarzalność masy polimeru osadzającego się na powierzchni modyfikowanych implantów (Tab.13.). Mimo niejednorodnego charakteru osadzanych powłok polimerowych wyznaczana masa była zbliżona dla wszystkich próbek pokrytych daną powłoką. Zaobserwowano również, że dodatek berberyny pozwolił na osadzenie większej ilości polimeru. Pomiary masy próbek przeprowadzone po sterylizacji radiacyjnej wykazały brak wpływu sterylizacji na uzyskane wyniki.

Tab.13. Zestawienie średniej masy polimeru osadzone na powierzchni implantów

Masa naniesionej warstwy polimerowej [mg]		
Cht	ChtBBR low	ChtBBR high
8,2(3)	8,4(4)	15,4(5)

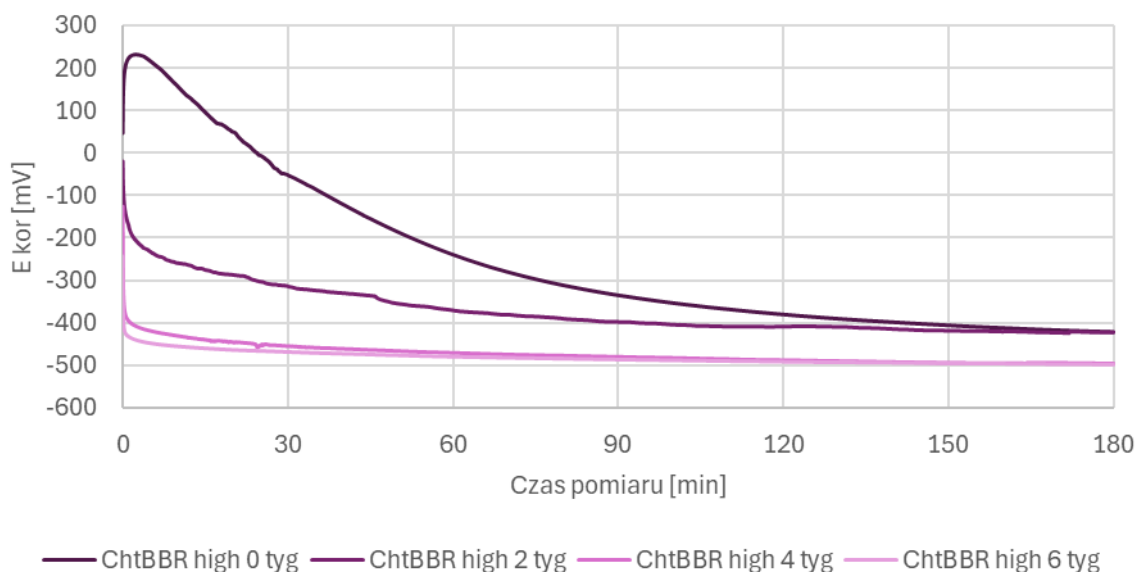
4.3.2. Ocena własności korozyjnych

Badania potencjostatyczne prowadzone na próbkach pokrytych polimerem wykazały wpływ zastosowanych modyfikacji na wartości potencjałów obwodu otwartego E_{OCP} . Próbki w stanie wyjściowym (nie eksponowane na PBS) dla wszystkich badanych wariantów charakteryzowały się dodatnim potencjałem E_{OCP} w początkowym etapie pomiaru, jednak ostateczna wartość wyznaczana po 3h była ujemna (Ryc.41., Tab. 14).

Wraz z czasem ekspozycja na roztwór PBS obserwowano zmniejszenie wartości potencjału E_{OCP} . Wyniki dla poszczególnych wariantów po 4 i 6 tygodniowej inkubacji były zbliżone do wartości potencjału wyznaczonego dla próbek po **PEO**.

Tab.14. Średnie potencjały E_{OCP} próbek w powłokami polimerowymi w stanie wyjściowym oraz po inkubacji w PBS

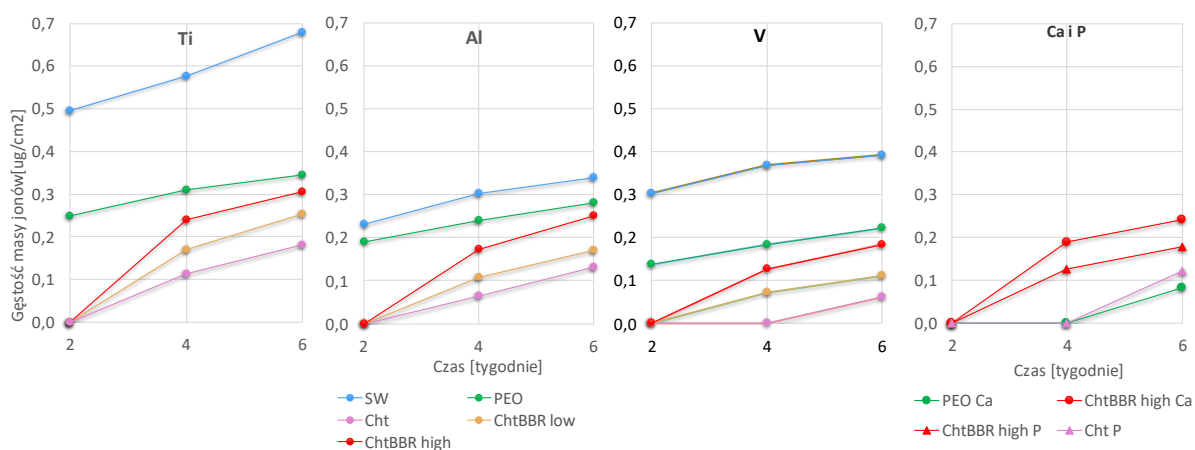
Czas inkubacji w PBS	Cht	ChtBBR low	ChtBBR high
0 tyg	-172,3(99)	-410(16)	-422(25)
2 tyg	-327(81)	-424(37)	-387(35)
4 tyg	-473(30)	-459(17)	-509(14)
6 tyg	-430(31)	-478(12)	-494,8(45)



Ryc.41. Przykładowy wykres potencjału E_{OCP} w funkcji czasu dla próbek **ChtBBR high** eksponowanych na PBS

4.3.3. Ocena jonów metali uwalnianych do środowiska

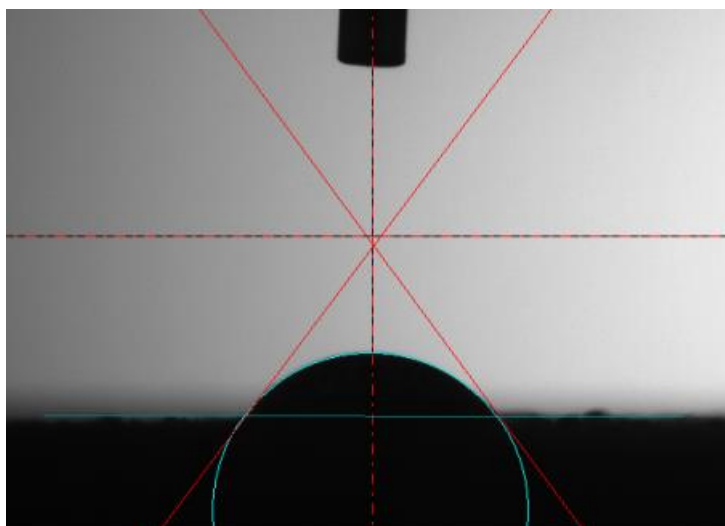
Naniesienie polimeru na powierzchnie badanych implantów pozwoliło na znaczące ograniczenie ilości jonów uwalnianych do środowiska (Ryc.42.). Wszystkie badane warianty naniesionej powłoki chitozanu zapobiegły przeniknięciu Ti, Al i V do środowiska w pierwszych 2 tygodniach. Najlepsze właściwości barierowe, ograniczające przenikanie jonów metali powierzchni posiada powłoka chitozanowa bez dodatku berberyny **Cht**. Pomiar stężenia Ca i P w roztworach inkubacyjnych wykazały nieznaczne ilości tych pierwiastków uwolnionych z powierzchni **ChtBBR high** oraz **Cht** (Ryc.42.).



Ryc.42. Wykresy przedstawiające ilości jonów Ti, Al i V oraz Ca i P uwalnianych z powierzchni modyfikowanych implantów do środowiska

4.3.4. Pomiary zwilżalności

Wytworzone powłoki polimerowe niezależnie od miejsca badania na implancie cechowały się hydrofilowością. Dla obu badanych cieczy kąt zwilżania były $\leq 90^\circ$ (Ryc.43., Tab.15.). Największą zwilżalnością charakteryzowała się powłoka **ChtBBR high**, najmniejszą **Cht**. Ponadto zaobserwowano, iż zwilżalność powłok różniła się nieznacznie zależnie od miejsca pomiaru oraz zastosowanej cieczy.



Ryc.43. Przykładowe zdjęcie kropli wody osadzonej na powierzchni pokrytej **ChtBBR high**

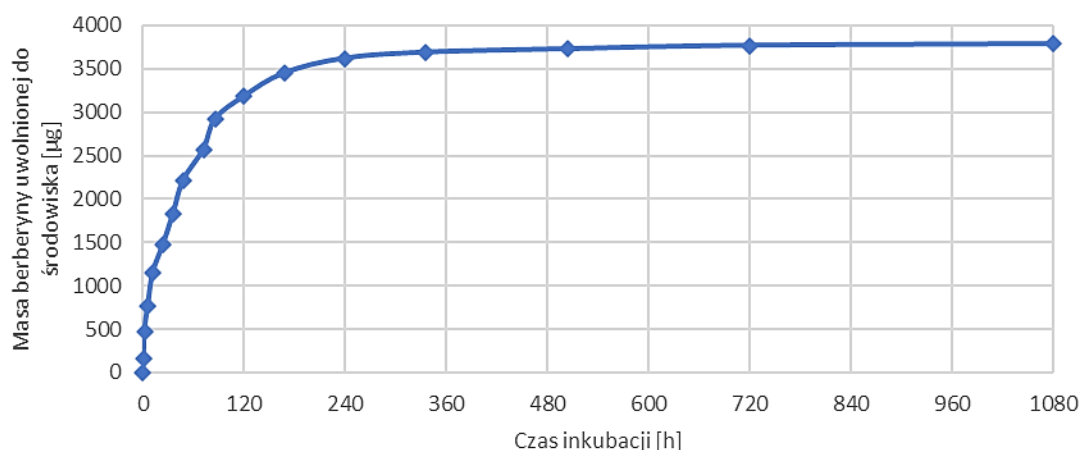
Tab.15. Zestawienie kątów zwilżania wyznaczanych dla implantów SW, UA i PEO

	Cht	ChtBBR low	ChtBBR high
Woda demineralizowana			
Skafold	82,4(52)	78,3(55)	53,8(62)
Ramka	86,3(62)	81,2(48)	59,1(48)
Ściana boczna	82,1(45)	80,9(52)	64,1(58)
Roztwór PBS			
Skafold	80,6(37)	76,3(48)	57,6(12)
Ramka	81,2(41)	80,2(39)	60,0(35)
Ściana boczna	82,3(41)	80,3(40)	58,3(39)

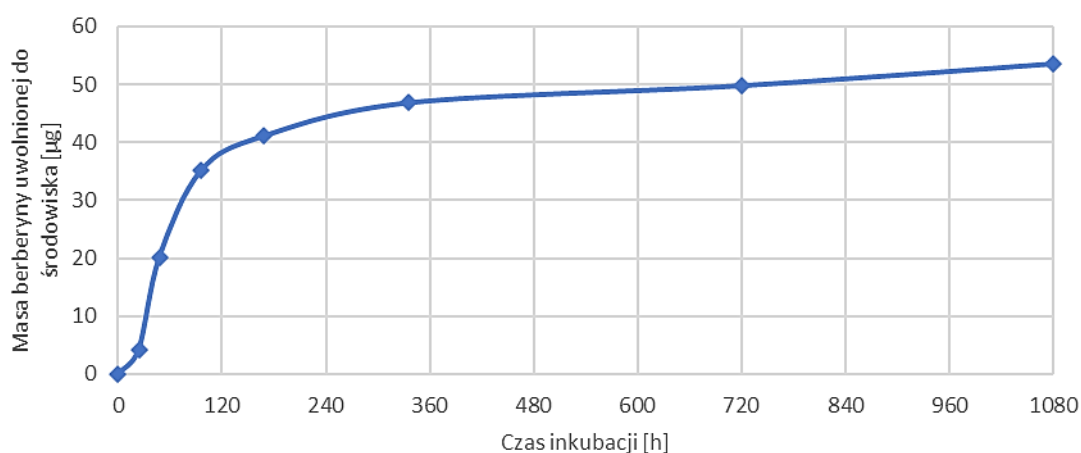
4.3.5. Kinetyka uwalniania berberyny

Badania spektrofotometryczne wykazały zmienną w czasie kinetykę uwalniania berberyny do środowiska (Ryc.44.). Kształt wykresów kumulowanej ilości berberyny do

środowiska dla obu zastosowanych modyfikacji jest do siebie zbliżony mimo znacznej różnicy między całkowitą ilością berberyny osadzonej na powierzchni implantów i wynikającej z niej bezwzględnej ilości berberyny. Największy wyrzut substancji zaobserwowano w pierwszych 4 dniach. Choć uwalnianie substancji czynnej stopniowo malało, między 30 a 45 dniem ekspozycji nadal wykazano uwalnianie berberyny do środowiska dla obu zaproponowanych modyfikacji.



Ryc.44A. Wykres kumulowany ilości berberyny uwalnianej do środowiska dla **ChtBBR high**



Ryc.44B. Wykres kumulowany ilości berberyny uwalnianej do środowiska dla **ChtBBR**

4.3.6. Ocena cytotoksyczności

Cytotoksyczność implantów w warunkach *in vitro* zbadano zgodnie z normą ISO 10993- 5. Żywotność komórek inkubowanych w obecności ekstraktów uzyskanych poprzez inkubację modyfikowanych implantów oceniano przy użyciu testu kolorymetrycznego. Test Cell Counting Kit-8 (CCK-8) charakteryzuje się dużą czułością i umożliwia określenie liczby żywych komórek w testach cytotoksyczności przy użyciu WST-8 (2-(2-metoksy-4-nitrofenylo)-3-(4-nitrofenylo)-5-(2,4-disulfonofenylo)-2H tetrazolium, sól monosodowa), który

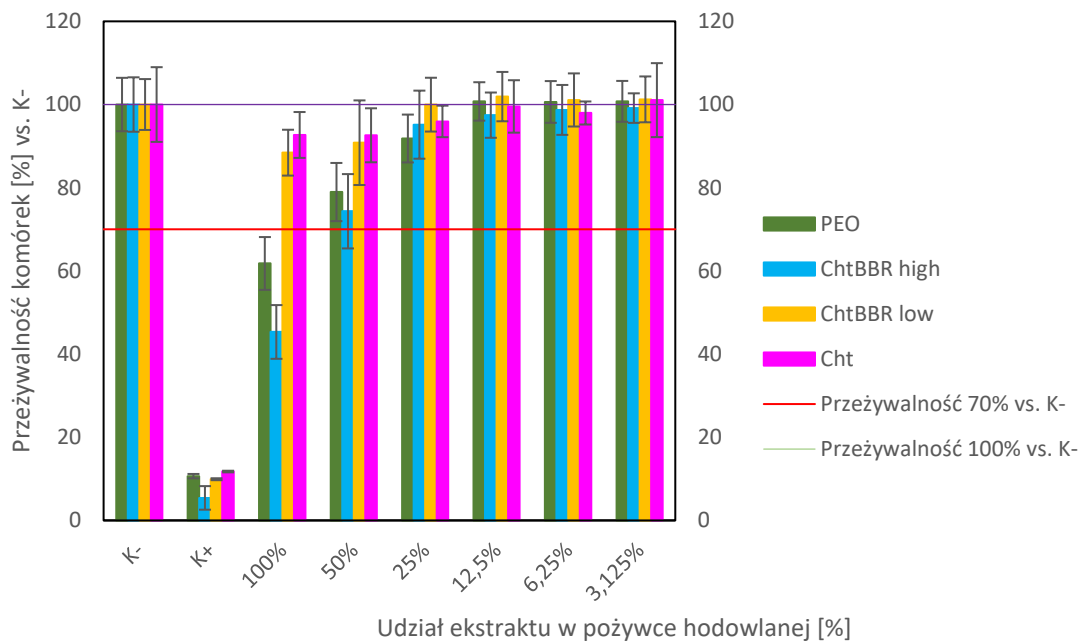
jest redukowany przez dehydrogenazy komórkowe do pomarańczowego formazanu. Ilość wytwarzanego formazanu jest wprost proporcjonalna do liczby żywych komórek. Proliferację komórek oceniono przy pomocy testu SRB. Test SRB polega na pomiarze całkowitej biomasy poprzez barwienie białek komórkowych sulforodaminą B. Test ten zapewnia lepszą liniowość w odniesieniu do liczby komórek i wyższą czułość w porównaniu z powszechnie stosowanym testem kolorymetrycznym tetrazolowym (MTT) do badania cytotoksyczności *in vitro*.

Na Ryc. 45A. przedstawiono ocenę cytotoksyczności na podstawie aktywności metabolicznej fibroblastów, na Ryc.45B. na podstawie proliferacji komórek. Zgodnie z normą w obu badaniach określono wartości graniczne przeżywalności komórek na poziomie 70% (granica cytotoksyczności) oraz 100% względem wartości wyznaczonej dla kontroli ujemnej (K-) prowadzonej z wykorzystaniem czystej pożywki hodowlanej

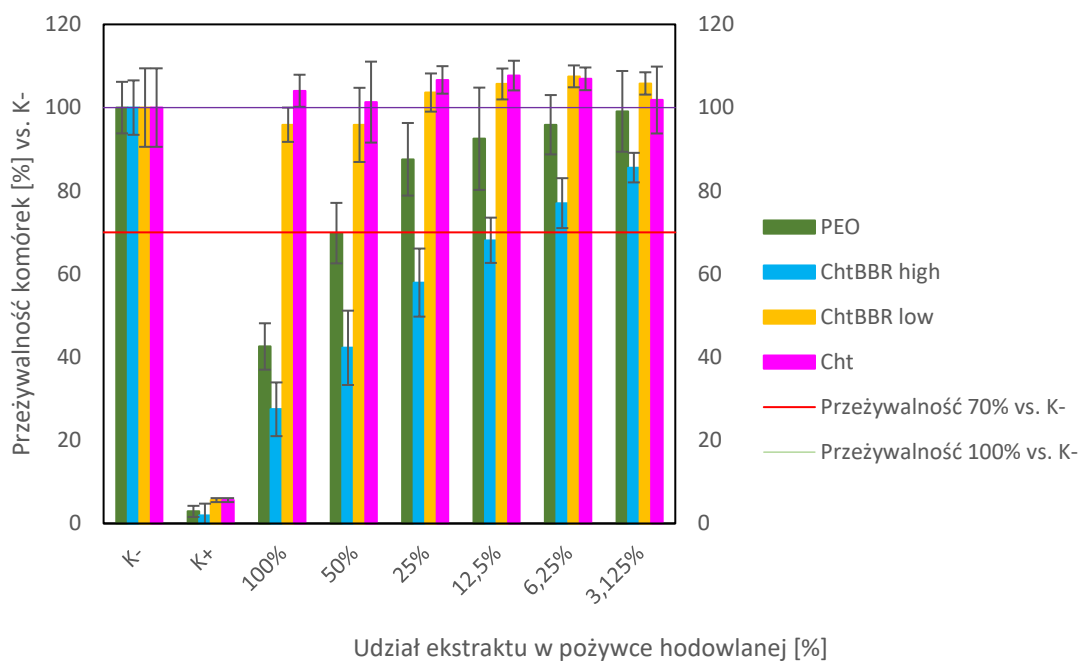
Badania potwierdziło wpływ proponowanych modyfikacji na przeżywalność komórek fibroblastów. Implant poddany modyfikacji elektrochemicznej **PEO** wykazał cytotoksyczne działanie na fibroblasty mysie przy ekspozycji komórek na 100% ekstraktu. W przypadku 2- krotnego rozcieńczenia ekstraktu pozyskanego z próbek po **PEO** efekt cytotoksyczny już nie występował zarówno w badaniu proliferacji jak i aktywności metabolicznej fibroblastów. Dalsze rozcieńczenia ekstraktu z **PEO** pozytywnie wpłynęły szczególnie na aktywność metaboliczną badanych komórek.

Wyniki pomiarów cytotoksyczności dla próbek pokrytych warstwą chitozanu i chitozanu z berberyną wykazały, że berberyna w wyższych stężeniach negatywnie wpływa na proliferację fibroblastów wykazując działanie cytotoksyczne. Próbkę **ChtBBR high** powodowały obniżony metabolizm komórek przy kontakcie z 100% ekstraktem. Choć metabolizm przy 50% stężeniu ekstraktu był widocznie niższy niż wartości dla pozostałych badanych wariantów wyznaczona przeżywalność komórek była >70%. W badaniu proliferacji konieczne było aż 16-krotne rozcieńczenie ekstraktu, by badana przeżywalność komórek potwierdziła brak działania cytotoksycznego.

Wyniki uzyskane podczas oceny cytotoksyczności dla próbek **Cht** i **ChtBBR low** były zbliżone do siebie. Obecność chitozanu oraz chitozanu z berberyną w niskim stężeniu pozytywnie wpłynęła na przeżywalność komórek. Proliferacja komórek dla wszystkich badanych stężeń ekstraktu dla **Cht** była większa niż wyznaczona dla K-, jednak największy metabolizm komórek oznaczano dla 12,5%, a największa proliferacja dla 6,25% udziału ekstraktu z **ChtBBR low** w pożywce hodowlanej



Ryc.45A. Wpływ ekstraktu uzyskanego z modyfikowanych implantów na aktywność metaboliczną mysich fibroblastów w porównaniu z grupą kontrolną (komórki hodowane w standardowych warunkach) (* $p < 0.05$).



Ryc.45B. Wpływ ekstraktu uzyskanego z implantów polimerowych pokrytych warstwą chitozanu z berberyną na proliferację mysich fibroblastów w porównaniu z grupą kontrolną (komórki hodowane w standardowych warunkach) (* $p < 0.05$).

5. Dyskusja

W pracy przedstawiono badania modyfikacji powierzchniowej zaprojektowanego wysokoporowatego implantu międzykręgowego wytworzonego metodą SLM. Zaproponowany sposób modyfikacji miał na celu hybrydowe poprawienie własności użytkowych implantu poprzez modyfikację elektrochemiczną pozwalającą na wytworzenie trwałej powłoki tlenkowej o własnościach sprzyjających osteointegracji oraz biodegradowalnej powłoki polimerowej mającej na celu czasowe poprawienie właściwości implantu w początkowej fazie po wszczępieniu, która to jest kluczowa w odpowiedzi organizmu na implant.

Badania prowadzone były wyłącznie na próbkach w postaci odzwierciedlającej rzeczywiste implanty międzykręgowo. Próbkę zaprojektowano opierając się na kryteriach, będących wynikiem krytycznej analizy literatury, które określały preferowaną wielkość (600 μm) i kształt (otwarte, sferyczne) porów, konieczność zapewnienia odpowiedniej wytrzymałości mechanicznej i równomiernego podparcia struktur tkankowych po umieszczeniu w organizmie oraz możliwość łatwego manipulowania implantem podczas wprowadzania do kręgosłupa. W projekcie uwzględniono również wymagania wynikające z dobranej technologii wytwarzania SLM to jest grubość belek tworzących strukturę porową wynikającą ze średnicy ziaren proszku wykorzystanego do produkcji elementu oraz konieczność zastosowania struktur podporowych. Przed wyprodukowaniem implantów przeprowadzono analizy numeryczne z wykorzystaniem metody elementów skończonych w celu weryfikacji wytrzymałości mechanicznej zaprojektowanych implantów. Prowadzenie badań na próbkach w postaci rzeczywistych implantów pozwoliło na ocenę rzeczywistego wpływu zastosowanych modyfikacji na drukowane implanty wysokoporowate, dzięki czemu opracowane metody modyfikacji ich powierzchni mają większy potencjał aplikacyjny od powszechnie stosowanych w tego typu badaniach litych próbkach płasko równoległych.

Próbki wytworzono ze stopu Ti6Al4V w technologii SLM. Badania implantów z wykorzystaniem XRD potwierdziły dwufazową strukturę $\alpha+\beta$ stopu Ti6Al4V, a na podstawie wyników statycznej próby ściskania stwierdzono, że wytrzymałość mechaniczna na ściskanie zaprojektowanych implantów jest wystarczająca dla obciążeń występujących w odcinku szyjnym kręgosłupa. Wytworzona struktura porowa oparta na czworościanie foremnym zapewniła wytworzenie sferycznych lekko spłaszczonych porów. Przeprowadzone badania mikroskopowe, pomiary porowatości i mikrotomografia komputerowa potwierdziły brak zamkniętych porów oraz luźnych struktur uwieczonych wewnątrz skafoldu. Wyznaczone parametry porowatości były zauważalnie mniejsze niż zaprojektowane w modelu i wynosiły

odpowiednio 49÷50% i 65%. Ze względu na postać próbki niemożliwe było określenie porowatości w obrębie samej struktury porowej, która w przypadku modelu była o ponad 10 punktów procentowych większa niż wyznaczona dla całej próbki. Wynikało to z obecności ramki oraz litej ściany przedniej implantu. Bazując na danych literaturowych rozbieżność między porowatością wynikającą z modelu, a rzeczywistą, wyznaczoną doświadczalnie była spodziewana [91]. Choć metody przyrostowe charakteryzują się wysoką dokładnością wymiarową w przypadku wytwarzania struktur porowatych obserwuje się rozbieżność w grubości poszczególnych belek. Wynika to z tzw. zjawiska „z- offset” polegającego na występowaniu określonej strefy wpływu ciepła generowanego przez wiązkę laserową wykorzystywaną do spajania materiału proszkowego, co powoduje pełne lub częściowe przetapianie się nadmiarowego materiału szczególnie poniżej niepodpartych belek równoległych do płaszczyzny wydruku. W badaniach Plessisa i Yadroitsava [205] zaobserwowano, że możliwe jest ograniczenie tego efektu poprzez odpowiednią rotację drukowanych rusztowań względem płaszczyzny wydruku tak, by poszczególne belki były pochylone o odpowiedni kąt w stosunku do płaszczyzny wydruku. O ile w przypadku skafoldów o regularnej strukturze jest to możliwe, o tyle w przypadku rzeczywistych wyrobów takich jak implanty może okazać się problematyczne. Zastosowana struktura porowa musi przede wszystkim odpowiednio wpisywać się w kształt produkowanego implantu przy równoczesnym zapewnieniu jej odpowiednich właściwości mechanicznych i odpowiedniej przestrzeni dla przerostu tkanki w głąb struktury porowej [28], [85], [91], [94].

Pomiary pojedynczych porów w ramach wytworzonej struktury wykazały, że ich wielkość oscyluje w granicach 400-600 μm . Mierzone wartości są więc mniejsze niż wynikające z modelu, jednakże mieszczą się w oczekiwanym zakresie. Mimo licznych publikacji dotyczących wpływu wielkości porów na potencjał osteointegracyjny skafoldów wytwarzanych z tytanu aktualny stan wiedzy nie pozwala na określenie optymalnej wielkości porów. Zgodnie z danymi omówionymi w rozdziale I.2.1.5 zastosowanie mniejszych porów, <200 μm może skutkować wyższą ekspresją osteocytów i ich lepszą adhezją w początkowej fazie osteointegracji, co wynika z większej powierzchni styku implantu w tkankę [94], [95]. Jednakże, większe pory sprzyjają dojrzewaniu tkanki zapewniając odpowiednią przestrzeń do wytwarzania macierzy zewnątrzkomórkowej oraz unaczynienia [28], [85], [87], [92], [93]. Pory o wielkości ≥ 900 μm mogą natomiast powodować opóźnienie wytwarzania macierzy zewnątrzkomórkowej, co spowalnia tworzenie dojrzałej tkanki kostnej [91]. Zgodnie z badaniami Tsurugu'a [226] wielkość porów ~ 400 μm stanowi wartość graniczną,

umożliwiająca nie tylko penetrację osteocytów w głąb porów, ale również odpowiednią waskularyzację powstałej tkanki.

Modyfikacje elektrochemiczne mające na celu wytworzenie stabilnej warstwy tlenkowej zapewniającej długoterminowy wpływ na potencjał osteointegracyjny i biokompatybilność implantów przeprowadzono z wykorzystaniem utleniania anodowego (UA) oraz plazmowego utleniania elektrolitycznego (PEO). Parametry procesu UA dobrano na podstawie literatury [216], natomiast parametry PEO dobrano na podstawie badań własnych [135]. Efektem zastosowania w procesie PEO parametrów procesu stosowanych do modyfikacji litych elementów było wytwarzanie we wnętrzu otwartej struktur porowej niejednorodnej warstwy powierzchniowej, która powodowała zmniejszenie się światła porów ograniczając potencjał osteointegracyjny implantów. Ostatecznie dobrane parametry prądowe procesu zapewniały wytworzenie jednorodnej warstwy powierzchniowej w całej objętości zaprojektowanego implantu.

Pomiary chropowatości potwierdziły wysokie rozwinięcie powierzchni wytworzonych implantów. Wysoka chropowatość i falistość wynikająca z obecności nie w pełni przetopionego proszku na powierzchni jest charakterystyczna dla implantów wytwarzanych przyrostowo, a wyznaczone wartości $Sa = 8-10 \mu m$ są z godne z danymi katalogowymi dla stopu wykorzystywanego w procesie SLM [210]. Uzyskiwaną topografię powierzchni można modyfikować poprzez dobór parametrów wydruku [227], [228] lub stosowanie modyfikacji powierzchniowych wpływających na morfologię powierzchni. Zaproponowane modyfikacje elektrochemiczne wykazały odmienny wpływ na topografię próbek. UA nie wpłynęło na morfologię powierzchni, a wytworzona warstwa tlenkowa charakteryzowała się dziedziczeniem topografii. PEO pozwoliło na uzyskanie hierarchicznej struktury powierzchni poprzez wytworzenie licznych mikroporów przy jednoczesnym zachowaniu rozwinięcia wynikającego z obecności sferycznych ziaren osadzonych na powierzchni. Topografia powierzchni była jednorodna w całej objętości implantu i zachowywała swój charakter nawet na pojedynczych ziarnach osadzonego proszku. Głębokość pojedynczych mikroporów oscylowała w zakresie 0,5-2,5 μm . Badania prowadzone przez Anselme i Bigerelle [26], [27] sugerują, że pory o głębokości 0,6 i 1,2 μm zapewniają odpowiednią chropowatość promującą adhezję osteocytów. Powszechnie uważa się, że rozbudowana topografia sprzyja osteointegracji [129], [167], [168], [169], [170]. Choć rozwinięcie powierzchni wynikające z obecności nie w pełni przetopionego proszku na powierzchni implantów jest dyskusyjne jego usunięcie np. poprzez trawienie chemiczne może znacząco obniżyć wytrzymałość mechaniczną oraz odporność korozyjną implantu [121], [122].

Jedną z kluczowych własności implantów jest skład chemiczny warstwy wierzchniej, która wchodzi w bezpośrednią interakcję z organizmem. Skład chemiczny wpływa nie tylko na odpowiedź komórkową, ale także determinuje jakie pierwiastki mogą przenikać z materiału do tkanek. Pomimo, iż stop Ti6Al4V znajduje szerokie zastosowanie w medycynie, w tym na implanty stałe [113], [114], [115], i jest uważany za biokompatybilny, zastrzeżenia wciąż budzi obecność w jego składzie wanadu i glinu, które przenikając do organizmu mogą powodować różnego rodzaju niepożądane skutki uboczne [109], [110], [149]. Przeprowadzone badania oparte na analizie EDS wykazały, że obie zastosowane modyfikacje elektrochemiczne wpłynęły korzystnie na skład chemiczny warstwy wierzchniej. Warstwy tlenkowe wytworzone dzięki **UA** i **PEO** spowodowały znaczący spadek Al i V w warstwie wierzchniej implantu. Pomiar przeprowadzone dla próbek przeciętych potwierdziły jednorodność wytworzonej warstwy wierzchniej w całej objętości próbki. Szczegółowa analiza XPS próbek poddanych **PEO** wykazała, że procentowy udział V na powierzchni obniżył się $<0,05\%$. Korzyści wynikające z ograniczenia udziału Al i V w warstwie wierzchniej zostały potwierdzone w badaniu ilości jonów uwalnianych do PBS w trakcie ekspozycji na symulowane środowisko tkankowe. Po 6 tygodniach inkubacji pomiary wykazały spadek gęstości masy jonów Ti, Al i V dla **UA** o odpowiednio 40, 32 i 30%, a dla **PEO** o 50, 17 i 43%.

Analiza EDS i XRD potwierdziła, że **PEO** umożliwiło wbudowanie Ca i P w wytworzoną warstwę tlenkową. Zjawisko to nie wystąpiło w przypadku **UA**. Dzięki zastosowaniu prądów o wysokim napięciu i natężeniu w trakcie **PEO** modyfikowana warstwa wierzchnia ulega częściowemu, lokalnemu przetopieniu, które pozwala na wymieszanie się materiału stopowego ze składnikami kąpieli, w której przeprowadzany jest proces [116], [214]. Lokalne przetapianie materiału w obrębie powierzchni może być korzystne w kontekście obecności ziaren osadzonych na niej w trakcie procesu wytwarzania SLM. Badania sugerują, że proces **PEO** może wpływać na wadliwe połączenia proszku osadzonego na powierzchni polepszając jego integrację z podłożem [136], [137]. Wyznaczony w pomiarach EDS i XPS stosunek Ca/P w wytworzonej powłoce **PEO** (odpowiednio ~ 1 i $\sim 0,5$) znacząco różni się od stosunku charakterystycznego dla HAp występującego w tkance kostnej ($\text{Ca/P}=1,67$). Rozbieżność wyznaczanego stosunku Ca/P dla poszczególnych metod może sugerować nierównomierne rozłożenie poszczególnych pierwiastków w wytworzonej warstwie. Stosunek Ca/P może wpływać na dyfuzję pierwiastków do środowiska – zgodnie z danymi literaturowymi rozpuszczalność fosforanów wapnia jest odwrotnie proporcjonalna do stosunku Ca/P. Niższa wartość Ca/P może przekładać się na wzrost ilości jonów wydzielanych do środowiska i lokalne zmiany pH, które mogą mieć wpływ na adhezję białek i komórek wpływając na skuteczność

procesu osteointegracji [229]. Choć sprawdzano obecność Ca i P w roztworach, w których inkubowane były modyfikowane próbki, dla próbek poddanych **PEO** stwierdzono obecność niewielkiego stężenia P dopiero po 6 tygodniach.

Pomiary zwilżalności wykazały hydrofobowy charakter wytworzonych implantów w stanie wyjściowym. Zastosowanie modyfikacji elektrochemicznej polepszyło zwilżalność próbek. Implanty po **UA** okazały się skrajnie hydrofilowe – osadzenie kropli okazało się niemożliwe, ponieważ krople rozpląwały się bezpośrednio po kontakcie z powierzchnią. Próbki po **PEO** choć charakteryzowały się mniejszym kątem zwilżania niż **SW** nadal zachowywały charakter hydrofilowy zarówno dla wody destylowanej, jak i roztworu PSB, przy czym kąty wyznaczone dla PBS wynosiły $\sim 90^\circ$. Ze względu na rozbudowaną topografię powierzchni próbek zrezygnowano z wyznaczenia swobodnej energii powierzchniowej.

Przeprowadzone badania potencjostaticzne wykazały zróżnicowany wpływ przeprowadzonych modyfikacji elektrochemicznych na wyznaczone wartości potencjału obwodu otwartego. Próbki **UA** charakteryzowały się potencjałem dodatni, a **PEO** ujemny. Pomiary potencjostaticzne prowadzone dla próbek eksponowanych na symulowane środowisko tkankowe posiadały potencjał ujemny, przy czym wartości E_{ocp} próbek **PEO** charakteryzowały się największą stabilnością.

Na podstawie przeprowadzonych badań dokonano oceny zaproponowanych modyfikacji elektrochemicznych. Opracowano kryteria obejmujące ocenę: topografii powierzchni, składu chemicznego, zwilżalności, własności korozyjnych i degradacji w symulowanym środowisku tkankowym (Tab.10.). Na podstawie przyjętych kryteriów uznano, że bardziej korzystne właściwości powierzchni uzyskano dla próbek **PEO**, głównie ze względu na wytworzenie hierarchicznej struktury porów, stabilność własności korozyjnych oraz obecność Ca i P w warstwie wierzchniej.

Drugi etap modyfikacji polegał na pokryciu implantu po **PEO** powłoką polimerową mającą zapewnić poprawę właściwości powierzchni w początkowej fazie osteointegracji implantu z tkanką. Implanty modyfikowane **PEO** pokryto warstwą chitozanu. Badania przeprowadzona dla 3 wariantów powłok: chitozan bez dodatku substancji czynnej (**Cht**) oraz chitozan z dodatkiem berberyny jako substancji czynnej w niskim (**ChtBBR low**) i wysokim (**ChtBBR high**) stężeniu. Stężenie berberyny dobrano w oparciu o literaturę, zgodnie z którą zastosowane stężenia zapewniały poprawę regeneracji tkanki kostnej [202], [203]. Warstwy polimerowe nałożono na implanty po **PEO** metodą zanurzeniową.

Naniesione powłoki polimerowe charakteryzowały się niejednorodną morfologią wynikającą ze zwiększonej agregacji materiału polimerowego w okolicach ziaren osadzonych

na powierzchni wydrukowanych implantów. Ekspozycja na symulowane środowisko tkankowe powodowała degradację warstwy i jej stopniowe rozpuszczanie. Zanikanie powłoki było widoczne w pierwszej kolejności na płaskich otwartych powierzchniach oraz górnych powierzchniach osadzonych ziaren. W miejscach agregacji polimeru występujących na granicach powierzchni belek i osadzonych ziaren po 6 tygodniach ekspozycji nadal widoczna była obecność materiału polimerowego.

Zastosowanie warstwy polimerowej wpłynęło korzystnie na ograniczenie ilości jonów metali przenikających do PBS. Po dwutygodniowej inkubacji implantów z powłokami polimerowymi, w roztworze nie stwierdzono jonów metali. Najlepszymi właściwościami barierowymi charakteryzował się powłoka Cht, dla której odnotowano najmniejsze stężenia pierwiastków metalicznych przenikających do roztworu, a jony wanadu stwierdzono dopiero po 6 tygodniach inkubacji w stężeniu o 85% mniejszym niż w przypadku próbek w stanie wyjściowym.

Obecność warstw polimerowych poprawiła zwilżalność implantów. Najlepszą zwilżalnością charakteryzowały się próbki **ChtBBR high** dla których kąt zwilżania wynosił $\sim 60^\circ$. Powierzchnie hydrofilowe wzmacniają wczesne etapy osteointegracji poprzez ułatwienie presorpcji wody zawartej w płynach ustrojowych. W kontekście implantów wysokoporowatych konieczne jest zapewnienie dobrej penetracji płynów do wnętrza implantu po jego wprowadzeniu do organizmu. Co ciekawe, zbyt wysoka energia powierzchniowa może utrudniać migrację i proliferację komórek. Równocześnie z badań wynika, że o ile w początkowej fazie osteointegracji zwilżalność powierzchni może znacząco wpływać na procesy komórkowe zachodzące na powierzchni, to parametr ten nie odgrywa ważnej roli w dalszym procesie osteointegracji. Istotnym jest również, że oprócz wspomaganie początkowej adhezji komórek powierzchnie hydrofilowe charakteryzują się również wyższą trombogennością, która może zaburzać proces gojenia po wprowadzeniu implantu do organizmu [28], [230], [231].

Mimo braku jednorodności wytworzonych powłok, bazując na uzyskanych wynikach zmian zwilżalności i ograniczenia ilości jonów uwalnianych do środowiska wytworzone powłoki uznano za korzystne z punktu widzenia ich funkcjonalności w organizmie. Zastosowanie powłoki pozwoliło na uzyskanie hydrofilowej powierzchni implantu i znaczące ograniczenie, a w początkowych tygodniach całkowicie wykluczenie wydzielania pierwiastków metalicznych do środowiska.

Przeprowadzone badania cytotoksyczności wykazały niekorzystny wpływ próbek **PEO** na fibroblasty hodowane w 100% ekstraktach. Obniżenie stężenia ekstraktu do 50 % pozwoliło

na poprawę przeżywalności komórek do poziomu świadczącego o braku działania cytotoksycznego. Zastosowanie powłoki **Cht** i **ChtBBR low** pozwoliło na znaczne poprawę przeżywalności komórek. Dla tych wariantów modyfikacji nie zaobserwowano działania cytotoksycznego. Mimo, iż dla 100% ekstraktów najlepsze wyniki osiągnięto dla próbek **Cht**, największe wartości przeżywalności komórek w porównaniu do K- wynikające z ich aktywności metabolicznej oraz proliferacji uzyskano odpowiednio dla 12,5% i 6,25% ekstraktu **ChtBBR low**. Możliwe więc, że przy zastosowaniu niższego stężenia berberyny w wytworzonej warstwie możliwe jest uzyskanie jeszcze większych korzyści z punktu widzenia odpowiedzi komórkowej. Badany wariant z zastosowaniem wysokiego stężenia berberyny **ChtBBR high** okazał się cytotoksyczny. Przeżywalność komórek na poziomie 70% została osiągnięta dopiero przy obniżeniu udziału ekstraktu **ChtBBR high** do 6,25%. W badaniach Huanga [203], na podstawie których dobrano wysokie stężenie berberyny zastosowana powłoka chitozanowa z dodatkiem berberyny przy stosunku wagowym 4:1 nie wykazywała działania cytotoksycznego jednak badania te prowadzone były na osteocytach z linii MG63. Dodatkowo, w badaniach tych wykazano działanie przeciwbakteryjne zaproponowanej powłoki. Różnice w uzyskanych wynikach mogą więc świadczyć o zróżnicowanym wpływie berberyny na komórki osteocytów i fibroblastów.

Ważnym aspektem związanym z zastosowaniem powłoki chitozanowej z dodatkiem berberyny jest kinetyka uwalniania substancji czynnej. Mimo zastosowania 2 skrajnie różnych stężeń berberyny oraz różnicy w bezwzględnej ilości oznaczonej substancji, która przeniknęła do otoczenia kinetyka dla oby stężeń była bardzo zbliżona. Dla obu powłok wykazano wysoki wyrzut berberyny utrzymany w 4 pierwszych dniach inkubacji oraz utrzymujące się uwalnianie berberyny pomiędzy 30 a 45 dniem pomiarów. W badaniach nad berberyną często obserwuje się szybki wyrzut substancji, przy czym spadek kinetyki uwalniania berberyny do środowiska często następuje już w pierwszych 12 h ekspozycji na środowisko [203], [232], [233], [234]. Kinetykę uwalniania berberyny można kształtować poprzez odpowiedni dobór technologii łączenia z materiałem matrycowym oraz odpowiedni dobór materiału matrycy polimerowej. W badaniach Ma [202] uzyskano liniowe wydzielanie się berberyny do środowiska przy zastosowaniu matrycy z polikartolaktanu i kolagenu typu I. W omawianych badaniach wykazano korzystny wpływ obecności berberyny na regenerację tkanki kostnej, przy zastosowaniu stężenia 50ug/l.

Podsumowując uzyskane wyniki można uznać, że najbardziej korzystne własności uzyskano dla próbek poddanych modyfikacji **PEO** pokrytych powłoką z chitozanem (**Cht**). Wytworzone implanty charakteryzują się otwartą strukturą oraz wysoką porowatością.

Zastosowana modyfikacja **PEO** pozwoliła na funkcjonalizację powierzchni poprzez wytworzenie stabilnej powłoki tlenkowej charakteryzującej się hierarchiczną strukturą powierzchni wzbogaconej o Ca i P przy ograniczeniu udziału Al i V. Zastosowanie hybrydowej powłoki wytworzonej poprzez modyfikację elektrochemiczną oraz biodegradowalną powłokę polimerową pozwoliło na znaczące ograniczenie ilości jonów przenikających do środowiska wykluczając uwalnianie najbardziej szkodliwego wanadu przez ≥ 4 tygodnie. Próbki poddane **PEO** i pokryte chitozaniem charakteryzują się dobrą zwilżalnością i stabilnym potencjałem korozyjnym podłoża po **PEO**. Implanty nie wykazywały działania cytotoksycznego na fibroblasty. Choć niskie stężenia berberyny mogłyby wpływać korzystnie na proliferację komórek wymaga to dalszych badań związanych z wpływem zastosowanej modyfikacji na osteocyty. Ocena degradacji wytworzonej powłoki polimerowej oraz pomiary kinetyki uwalniania substancji czynnej świadczą o długoterminowej degradacji wytworzonych powłok polimerowych co daje nadzieję na możliwość osadzania w nich również innych substancji czynnych.

Zaplanowany plan badań wykonano w pełnym zakresie. Uzyskane wyniki potwierdzają sformułowaną tezę. Hybrydowa modyfikacja wysokoporowatego implantu wytworzonego metodą przytostową wykorzystująca plazmowe utlenianie elektrochemiczne oraz biodegradowalną powłokę polimerową pozwoliła na wytworzenie warstwy barierowej o korzystnych własnościach fizycznych i chemicznych umożliwiających ograniczenie przenikania jonów metali do środowiska, stymulację proliferacji komórek oraz warunki sprzyjające osteointegracji. Cel pracy został osiągnięty, a uzyskane wyniki mogą przyczynić się do rozwoju inżynierii biomedycznej w zakresie klinicznie stosowanych modyfikacji powierzchniowych implantów drukowanych.

6. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski i spostrzeżenia:

1. Zaprojektowane wysokoporowate implanty wytworzone w technologii SLM z Ti6Al4V charakteryzują się otwartą strukturą, wysoką porowatością oraz rozwiniętą topografią powierzchni wynikającą z obecności nie w pełni przetopionego proszku na całej powierzchni implantu.
2. Warstwa powierzchniowa wytworzona w procesie utleniania anodowego nie wpływa na topografię powierzchni. Wytworzona warstwa tlenkowa charakteryzuje się wysoką gładkością oraz hydrofilowością.
3. Plazmowe utlenianie elektrolityczne wysokoporowatych implantów pozwala na wytworzenie hierarchicznej struktury powierzchni, wbudowanie w wytworzoną warstwę wierzchnią P i Ca, poprawię zwilżalność powierzchni.
4. Zastosowane modyfikacje elektrochemiczne ograniczają ilość jonów metali przenikających do środowiska. Zastosowanie hybrydowej modyfikacji elektrochemicznej z powłoką polimerową zapobiegło wydzielaniu jonów metali w pierwszych tygodniach ekspozycji na symulowane środowisko tkankowe.
5. Powłoki chitozanowe nanoszone na wysokoporowate implanty poddane modyfikacji PEO metodą zanurzeniową charakteryzują się niejednorodną strukturą wynikającą z agregacji materiału polimerowego w sąsiedztwie proszku osadzonego w trakcie SLM na powierzchni implantu. Degradacja powłok chitozanowej trwa >6tygodni.
6. Powłoka chitozanowa bez dodatku berberyny oraz z berberyną o niskim stężeniu (stosunek wagowy 300:1) pozytywnie wpływają na odpowiedź komórkową poprzez wspomaganie proliferacji oraz aktywności metabolicznej fibroblastów. Berberyna w wysokich stężeniach wykazuje działanie cytotoksyczne.
7. Powłoki chitozanowe z dodatkiem berberyny naniesione na wysokoporowate implanty o otwartej strukturze charakteryzują się zmienną kinetyką i wydłużonym czasem uwalniania substancji czynnej.

Literatura:

- [1] S. Weiner and H. D. Wagner, "The material bone: Structure-mechanical function relations," *Annual Review of Materials Science*, vol. 28, no. 1, pp. 271–298, 1998, doi: 10.1146/annurev.matsci.28.1.271.
- [2] C. Lerebours, C. D. L. Thomas, J. G. Clement, P. R. Buenzli, and P. Pivonka, "The relationship between porosity and specific surface in human cortical bone is subject specific," *Bone*, vol. 72, pp. 109–117, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.bone.2014.11.016.
- [3] S. C. Cowin, Ed., *Bone Mechanics*. CRC Press.
- [4] R. Bruce, M. David, B. Burr, N. A. Sharkey, and D. P. Fyhrie, *Skeletal Tissue Mechanics*. New York: Springer, 2015.
- [5] M. Doblaré, J. M. García, and M. J. Gómez, "Modelling bone tissue fracture and healing: A review," *Eng Fract Mech*, vol. 71, no. 13–14, pp. 1809–1840, 2004, doi: 10.1016/j.engfracmech.2003.08.003.
- [6] S. Khosla, J. J. Westendorf, and M. J. Oursler, "Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 118, no. 2, pp. 421–428, Feb. 2008, doi: 10.1172/JCI33612.
- [7] L. E. Lanyon, "Calcified Tissue International Osteocytes, Strain Detection, Bone Modeling and Remodeling," *Calcif Tissue Int*, no. 1, pp. 102–107, 1993.
- [8] T. L. H. Donahue, T. R. Haut, C. E. Yellowley, H. J. Donahue, and C. R. Jacobs, "Mechanosensitivity of bone cells to oscillating fluid flow induced shear stress may be modulated by chemotransport," *J Biomech*, vol. 36, no. 9, pp. 1363–1371, Sep. 2003, doi: 10.1016/S0021-9290(03)00118-0.
- [9] B. McKibbin, "The biology fracture healing in long bones," *J Bone Joint Surg*, vol. 60B, no. 2, pp. 150–162, 1976.
- [10] "https://fizjoterapeuty.pl/fizjologia/etapy-zrostu-kosci.html."
- [11] A. Boccaccio *et al.*, "Finite Element Method (FEM), Mechanobiology and Biomimetic Scaffolds in Bone Tissue Engineering," *Int. J. Biol. Sci*, vol. 7, no. 1, pp. 112–132, 2011, [Online]. Available: <http://www.biolsci.org112>
- [12] T. N. Gardner, T. Stoll, L. Marks, S. Mishra, and M. Knothe Tate, "The influence of mechanical stimulus on the pattern of tissue differentiation in a long bone fracture * an FEM study," *J Biomech*, vol. 33, pp. 415–425, 2000.
- [13] L. E. Claes and C. A. Heigele, "Magnitudes of local stress and strain along bony surfaces predict the course and type of fracture healing," *J Biomech*, vol. 32, pp. 255–266, 1999.
- [14] D. Lacroix, I. P. J. Prendergast, I. G. Li, and D. Marsh, "Biomechanical model to simulate tissue differentiation and bone regeneration: application to fracture healing,\" *Med. Biol. Eng. Comput*, vol. 40, pp. 14–21, 2002.
- [15] U. Simon, P. Augat, M. Utz, and L. Claes, "A numerical model of the fracture healing process that describes tissue development and revascularisation," *Comput Methods Biomech Biomed Engin*, vol. 14, no. 1, pp. 79–93, 2011, doi: 10.1080/10255842.2010.499865.
- [16] C. Ament and E. P. Hofer, "A fuzzy logic model of fracture healing,\" *J Biomech*, vol. 33, pp. 961–968, 2000.
- [17] P. J. Prendergast, R. Huiskes, and K. Soballes, "Biophysical stimuli on cells during tissue differentiation at implant interfaces,\" *J Biomech*, vol. 30, no. 6, p. 54, 1996.
- [18] D. Lacroix and P. J. Prendergast, "A mechano-regulation model for tissue differentiation during fracture healing: analysis of gap size and loading,\" *J Biomech*, vol. 35, pp. 1163–1171, 2002.
- [19] N. Venkataraman, S. Bansal, P. Bansal, and S. Narayan, "Dynamics of bone graft healing around implants,\" *Journal of the International Clinical Dental Research Organization*, vol. 7, pp. 40–48, 2015.
- [20] S. Parithimarkalaignan and T. V. Padmanabhan, "Osseointegration: An update,\" *Journal of Indian Prosthodontist Society*, vol. 13, no. 1, pp. 2–6, Mar. 2013, doi: 10.1007/s13191-013-0252-z.
- [21] T. Albrektsson, "Hard tissue implant interface,\" *Aust Dent J*, vol. 53, no. SUPPL. 1, Jun. 2008, doi: 10.1111/j.1834-7819.2008.00039. x.

- [22] I. Maciejewska, J. Nowakowska, and Z. Bereznowski, "Osteointegracja wszczepów zębowych – etapy gojenia kości Praca pogładowa," *Protet Stomatol*, vol. LVI, pp. 214–219, 2006.
- [23] K. Anselme, "Osteoblast adhesion on biomaterials," *Biomaterials*, vol. 21, pp. 667–681, 2000.
- [24] U. Meyer, A. Büchter, H. P. Wiesmann, U. Joos, and D. B. Jones, "Basic reactions of osteoblasts on structured material surfaces," *Eur Cell Mater*, vol. 9, pp. 39–49, 2005, doi: 10.22203/eCM.v009a06.
- [25] M. Bigerelle and K. Anselme, "Statistical correlation between cell adhesion and proliferation on biocompatible metallic materials," *J Biomed Mater Res A*, vol. 72, no. 1, pp. 36–46, Jan. 2005, doi: 10.1002/jbm.a.30212.
- [26] K. Anselme *et al.*, "Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses," *J Biomed Mater Res*, vol. 49, no. 2, pp. 155–166, 2000.
- [27] K. Anselme and M. Bigerelle, "Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion," *Acta Biomater*, vol. 1, no. 2, pp. 211–222, 2005, doi: 10.1016/j.actbio.2004.11.009.
- [28] P. Ouyang *et al.*, "Hydromechanical mechanism behind the effect of pore size of porous titanium scaffolds on osteoblast response and bone ingrowth," *Mater Des*, vol. 183, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.matdes.2019.108151.
- [29] M. Laubach, P. Kobbe, and D. W. Hutmacher, "Biodegradable interbody cages for lumbar spine fusion: Current concepts and future directions," *Biomaterials*, vol. 288, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.biomaterials.2022.121699.
- [30] A. Woolf and B. Pfleger, "Burden of major musculoskeletal conditions," *Bulletin of World Health Organization*, vol. 81, no. 9, pp. 646–656, 2003.
- [31] E. Chong, M. H. Pelletier, R. J. Mobbs, and W. R. Walsh, "The design evolution of interbody cages in anterior cervical discectomy and fusion: A systematic review Orthopedics and biomechanics," *BMC Musculoskelet Disord*, vol. 16, no. 1, Apr. 2015, doi: 10.1186/s12891-015-0546-x.
- [32] A. M. T. Chau and R. J. Mobbs, "Bone graft substitutes in anterior cervical discectomy and fusion," *European Spine Journal*, vol. 18, no. 4, pp. 449–464, Apr. 2009, doi: 10.1007/s00586-008-0878-4.
- [33] R. Loch Macdonald *et al.*, "Multilevel anterior cervical corpectomy and fibular allograft fusion for cervical myelopathy," *J Neurosurg*, vol. 86, pp. 990–997, 1997.
- [34] L. Marchi, N. Abdala, L. Oliveira, R. Amaral, E. Coutinho, and L. Pimenta, "Radiographic and clinical evaluation of cage subsidence after stand-alone lateral interbody fusion," *J Neurosurg Spine*, vol. 19, no. 1, pp. 110–118, Jul. 2013, doi: 10.3171/2013.4.SPINE12319.
- [35] M. J. Reisener, M. Pumberger, J. Shue, F. P. Girardi, and A. P. Hughes, "Trends in lumbar spinal fusion—a literature review," *Journal of Spine Surgery*, vol. 6, no. 4, pp. 752–76, 2020, doi: 10.21037/jss-20-492.
- [36] S. N. Neifert *et al.*, "Predicting Trends in Cervical Spinal Surgery in the United States from 2020 to 2040," in *World Neurosurgery*, Elsevier Inc., Sep. 2020, pp. e175–e181. doi: 10.1016/j.wneu.2020.05.055.
- [37] S. R. Sheikh *et al.*, "Can We Justify It Trends in the Utilization of Spinal Fusions and Associated Reimbursement," *Clin Neurosurg*, vol. 86, no. 2, pp. E193–E202, Feb. 2020, doi: 10.1093/neuros/nyz400.
- [38] "<https://scm-movemed.pl/2017/11/16/bole-kregoslupa-chromanie-neurogenne/>."
- [39] "<https://zdroweplecy.net/fakty-o-dyskopatii-2/>".
- [40] "<https://www.mp.pl/pacjent/ortopedia/choroby-urazy/247230,dyskopatia-w-odcinku-szyjnym-kregoslupa>".
- [41] S. Podlewski, A. Kłębczyk, and M. Radek, "Degenerative cervical spine disease: pathogenesis and symptoms Choroba zwyrodnieniowa odcinka szyjnego kręgosłupa-patogeneza i objawy", doi: 10.5114/ms.2020.102326.
- [42] H. Zhang *et al.*, "Biomaterials for Interbody Fusion in Bone Tissue Engineering," *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 10, May 2022, doi: 10.3389/fbioe.2022.900992.
- [43] S. L. De Kunder, K. Rijkers, I. J. M. H. Caelters, R. A. De Bie, P. J. Koehler, and H. Van Santbrink, "Lumbar interbody fusion," *Spine (Phila Pa 1976)*, vol. 43, no. 16, pp. 1161–1168, 2018, doi: 10.1097/BRS.0000000000002534.

- [44] D. E. Couture and C. L. Branch, "Posterior lumbar interbody fusion with bioabsorbable spacers and local autograft in a series of 27 patients," *Neurosurg Focus*, vol. 16, no. 3, pp. 1–6, 2004.
- [45] H. Nogal, E. Wiśniewska, and E. Antos, "Zarys historyczny dynamiki rozwoju transplantologii klinicznej," *Polski Przegląd Nauk o Zdrowiu*, vol. 1, no. 46, pp. 113–118, 2016.
- [46] Joanna Sobiak, "Przeszczepianie narządów i komórek krwiotwórczych - rys historyczny," *Nowiny Lekarskie*, vol. 80, no. 2, pp. 157–161, 2011.
- [47] A. Gupta, N. Kukkar, K. Sharif, B. J. Main, C. E. Albers, and S. F. El-Amin, "Bone graft substitutes for spine fusion: A brief review," *World J Orthop*, vol. 6, no. 6, pp. 449–456, 2015, doi: 10.5312/wjo.v6.i6.449.
- [48] K. Y. Chi, S. H. Cheng, Y. K. Kuo, E. Y. Lin, and Y. N. Kang, "Safety of Lumbar Interbody Fusion Procedures for Degenerative Disc Disease: A Systematic Review with Network Meta-Analysis of Prospective Studies," *Global Spine J*, vol. 11, no. 5, pp. 751–760, Jun. 2021, doi: 10.1177/2192568220938024.
- [49] T. Lan *et al.*, "Comparison Between Posterior Lumbar Interbody Fusion and Transforaminal Lumbar Interbody Fusion for the Treatment of Lumbar Degenerative Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis," *World Neurosurg*, vol. 112, pp. 86–93, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.wneu.2018.01.021.
- [50] C. Delloye, O. Cornu, V. Druetz, and O. Barbier, "Aspect of current management. Bone allografts. What they can offer and what they cannot," *J Bone Joint Surg*, vol. 89B, no. 5, pp. 574–580, 2007, doi: 10.1302/0301-620X.89B5.
- [51] T. Floyd and D. Ohnmeiss, "A meta-analysis of autograft versus allograft in anterior cervical fusion," *European Spine Journal*, vol. 9, pp. 398–403, 2000.
- [52] Y. Xie, D. Chopin, P. Hardouin, and J. Lu, "Clinical, radiological and histological study of the failure of cervical interbody fusions with bone substitutes," *European Spine Journal*, vol. 15, no. 8, pp. 1196–1203, Aug. 2006, doi: 10.1007/s00586-005-0052-1.
- [53] P. J. Rao, M. H. Pelletier, W. R. Walsh, and R. J. Mobbs, "Spine Interbody Implants: Material Selection and Modification, Functionalization and Bioactivation of Surfaces to Improve Osseointegration," *Orthop Surg*, vol. 6, no. 2, pp. 81–89, 2014, doi: 10.1111/os.12098.
- [54] Wojciech Łabędź, "Zastosowanie implantów międzytrzonowych w leczeniu dyskopatii lędźwiowej," <https://www.praktyczna-ortopedia.pl/article/zastosowanie-implantow-miedzytrzonowych-w-leczeniu-dyskopatii-ledzwiowej>.
- [55] "<https://www.xcmedico.com/pl/peek-cage-system-2-product/>."
- [56] R. J. Mobbs, K. Phan, G. Malham, K. Seex, and P. J. Rau, "Lumbar interbody fusion: techniques, indications and comparison of interbody fusion options including PLIF, TLIF, MI-TLIF, OLIF/ATP, LLIF and ALIF," *Journal of Spine Surgery*, vol. 1, no. 1, pp. 2–18, 2015.
- [57] K. Skalski, J. Skoworodko, and M. Gierzyńska-Dolna, "Stabilizatory oraz implanty krążka międzykręgowego kręgosłupa-przegląd konstrukcji," *Obróbka Plastyczna Metali*, vol. XXII, no. 4, 2011.
- [58] R. Zhao, R. Yang, P. R. Cooper, Z. Khurshid, A. Shavandi, and J. Ratnayake, "Bone grafts and substitutes in dentistry: A review of current trends and developments," *Molecules*, vol. 26, no. 10, 2021, doi: 10.3390/molecules26103007.
- [59] R. M. Biltz and E. D. Pellegrino, "The Chemical Anatomy of Bone. A Comparative study of bone composition in sixteen vertebrates," *J Bone Joint Surg*, vol. 51, no. 3, pp. 456–466, 1969.
- [60] P. Ducheyne and Q. Qiu, "Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function," *Biomaterials*, vol. 20, pp. 2287–2303, 1999.
- [61] B. Stevens, Y. Yang, A. Mohandas, B. Stucker, and K. T. Nguyen, "A review of materials, fabrication methods, and strategies used to enhance bone regeneration in engineered bone tissues," *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, vol. 85, no. 2, pp. 573–582, May 2008, doi: 10.1002/jbm.b.30962.
- [62] T. Kokubo, H. M. Kim, and M. Kawashita, "Novel bioactive materials with different mechanical properties," *Biomaterials*, vol. 24, no. 13, pp. 2161–2175, 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00044-9.
- [63] M. M. Stevens, "Biomaterials for bone tissue engineering," *Materialstoday*, vol. 11, no. 5, pp. 18–25, 2009.

- [64] T. Ghassemi, A. Shahroodi, M. H. Ebrahimzadeh, A. Mousavian, J. Movaffagh, and A. Moradi, "Current Concepts in Scaffolding for Bone Tissue Engineering," *Archives of bone and joint surgery*, vol. 6, no. 2, pp. 90–99, 2018, [Online]. Available: <http://abjs.mums.ac.irtheonlineversionofthisarticleabjs.mums.ac.ir>
- [65] J. H. Lee *et al.*, "Comparison of fusion rate and clinical results between CaO-SiO₂-P₂O₅-B₂O₃ bioactive glass ceramics spacer with titanium cages in posterior lumbar interbody fusion," *Spine Journal*, vol. 16, no. 11, pp. 1367–1376, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.spinee.2016.07.531.
- [66] J. Marciniak and S. Błażejewicz, "Biomateriały," in *Inżynieria Biomedyczna, Podstawy i Zastosowania*, vol. IV, Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, 2016.
- [67] M. B. Kabins and J. N. Weinstein, "The History of Vertebral Screw and Pedicle Screw Fixation," *The Iowa Orthopaedic Journal*, vol. 11, pp. 127–136, 1991.
- [68] K. Phan and R. J. Mobbs, "Evolution of Design of Interbody Cages for Anterior Lumbar Interbody Fusion," *Orthop Surg*, vol. 8, no. 3, pp. 270–277, Aug. 2016, doi: 10.1111/os.12259.
- [69] A. Warburton, S. J. Girdler, C. M. Mikhail, A. Ahn, and S. K. Cho, "Biomaterials in spinal implants: A review," *Neurospine*, vol. 17, no. 1, pp. 101–110, Mar. 2020, doi: 10.14245/ns.1938296.148.
- [70] T. Q. Nguyen, J. M. Buckley, C. Ames, and V. Deviren, "The fatigue life of contoured cobalt chrome posterior spinal fusion rods," *Proc Inst Mech Eng H*, vol. 225, no. 2, pp. 194–198, Feb. 2011, doi: 10.1243/09544119JEIM763.
- [71] H. Yoshihara, "Rods in spinal surgery: A review of the literature," *Spine Journal*, vol. 13, no. 10, pp. 1350–1358, 2013, doi: 10.1016/j.spinee.2013.04.022.
- [72] C. Lindsey, V. Deviren, Z. Xu, R.-F. Yeh, and C. M. Puttlitz, "The Effects of Rod Contouring on Spinal Construct Fatigue Strength," *Spine (Phila Pa 1976)*, vol. 31, no. 15, pp. 1680–1687, 2006.
- [73] "<https://lifespine.com/solstice/>".
- [74] H. J. Meisel and N. Agarwal, "Commentary on 'biomaterials in spinal implants: A review,'" *Neurospine*, vol. 17, no. 1, pp. 111–113, Mar. 2020, doi: 10.14245/ns.2040126.063.
- [75] H. Gao *et al.*, "Porous tantalum scaffolds: Fabrication, structure, properties, and orthopedic applications," *Mater Des*, vol. 210, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.matdes.2021.110095.
- [76] M. Hanc, S. K. Fokter, M. Vogrin, A. Molicnik, and G. Recnik, "Porous tantalum in spinal surgery: an overview," *European Journal of Orthopaedic Surgery and Traumatology*, vol. 26, no. 1, pp. 1–7, Jan. 2016, doi: 10.1007/s00590-015-1654-x.
- [77] H. J. Haugen, S. P. Lyngstadaas, F. Rossi, and G. Perale, "Bone grafts: which is the ideal biomaterial?," *J Clin Periodontol*, vol. 46, no. S21, pp. 92–102, Jun. 2019, doi: 10.1111/jcpe.13058.
- [78] S. M. Kurtz and J. N. Devine, "PEEK biomaterials in trauma, orthopedic, and spinal implants," *Biomaterials*, vol. 28, no. 32, pp. 4845–4869, Nov. 2007, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.013.
- [79] R. Olivares-Navarrete, S. L. Hyzy, P. J. Slosar, J. M. Schneider, Z. Schwartz, and B. D. Boyan, "Implant materials generate different peri-implant inflammatory factors: Poly-ether-ether-ketone promotes fibrosis and microtextured titanium promotes osteogenic factors," *Spine (Phila Pa 1976)*, vol. 40, no. 6, pp. 399–404, Mar. 2015, doi: 10.1097/BRS.0000000000000778.
- [80] M. D. Alvin and T. E. Mroz, "The Mobi-C cervical disc for one-level and two-level cervical disc replacement: A review of the literature," *Medical Devices: Evidence and Research*, vol. 7, pp. 397–403, Nov. 2014, doi: 10.2147/MDER.S54497.
- [81] L. Zhang, G. Yang, B. N. Johnson, and X. Jia, "Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair," *Acta Biomater*, vol. 84, pp. 16–33, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.actbio.2018.11.039.
- [82] A. V. Do, B. Khorsand, S. M. Geary, and A. K. Salem, "3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications," *Adv Healthc Mater*, vol. 4, no. 12, pp. 1742–1762, Aug. 2015, doi: 10.1002/adhm.201500168.
- [83] K. S. Munir, Y. Li, and C. Wen, "Metallic scaffolds manufactured by selective laser melting for biomedical applications," in *Metallic Foam Bone: Processing, Modification and Characterization and Properties*, Elsevier Inc., 2017, pp. 1–23. doi: 10.1016/B978-0-08-101289-5.00001-9.

- [84] A. Myakinin *et al.*, “In vitro evaluation of electrochemically bioactivated Ti6Al4V 3D porous scaffolds,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 121, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.msec.2021.111870.
- [85] Z. Chen *et al.*, “Influence of the pore size and porosity of selective laser melted Ti6Al4V ELI porous scaffold on cell proliferation, osteogenesis and bone ingrowth,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 106, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.msec.2019.110289.
- [86] X. Wang *et al.*, “Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: A review,” *Biomaterials*, vol. 83, pp. 127–141, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.012.
- [87] G. Li *et al.*, “In vitro and in vivo study of additive manufactured porous Ti6Al4V scaffolds for repairing bone defects,” *Sci Rep*, vol. 6, Sep. 2016, doi: 10.1038/srep34072.
- [88] P. Hameed *et al.*, “Biomorphic porous Ti6Al4V gyroid scaffolds for bone implant applications fabricated by selective laser melting,” *Progress in Additive Manufacturing*, vol. 6, no. 3, pp. 455–469, Aug. 2021, doi: 10.1007/s40964-021-00210-5.
- [89] B. Zhang *et al.*, “The biomimetic design and 3D printing of customized mechanical properties porous Ti6Al4V scaffold for load-bearing bone reconstruction,” *Mater Des*, vol. 152, pp. 30–39, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.matdes.2018.04.065.
- [90] V. Karageorgiou and D. Kaplan, “Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 27, pp. 5474–5491, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.02.002.
- [91] N. Taniguchi *et al.*, “Effect of pore size on bone ingrowth into porous titanium implants fabricated by additive manufacturing: An in vivo experiment,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 59, pp. 690–701, Feb. 2016, doi: 10.1016/j.msec.2015.10.069.
- [92] A. Fukuda *et al.*, “Osteoinduction of porous Ti implants with a channel structure fabricated by selective laser melting,” *Acta Biomater*, vol. 7, no. 5, pp. 2327–2336, 2011, doi: 10.1016/j.actbio.2011.01.037.
- [93] Q. Ran *et al.*, “Osteogenesis of 3D printed porous Ti6Al4V implants with different pore sizes,” *J Mech Behav Biomed Mater*, vol. 84, pp. 1–11, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.jmbbm.2018.04.010.
- [94] B. Chang *et al.*, “Influence of pore size of porous titanium fabricated by vacuum diffusion bonding of titanium meshes on cell penetration and bone ingrowth,” *Acta Biomater*, vol. 33, pp. 311–321, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.actbio.2016.01.022.
- [95] L. N. Teixeira, G. E. Crippa, L. P. Lefebvre, P. T. De Oliveira, A. L. Rosa, and M. M. Beloti, “The influence of pore size on osteoblast phenotype expression in cultures grown on porous titanium,” *Int J Oral Maxillofac Surg*, vol. 41, no. 9, pp. 1097–1101, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.ijom.2012.02.020.
- [96] G. Budzik, J. (organizacja i zarządzanie) Woźniak, Ł. Przeszłowski, and Oficyna Wydawnicza Politechniki Rzeszowskiej, *Druk 3D jako element przemysłu przyszłości: analiza rynku i tendencje rozwoju*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Rzeszowskiej, 2022.
- [97] R. K. Chen, Y. an Jin, J. Wensman, and A. Shih, “Additive manufacturing of custom orthoses and prostheses-A review,” *Addit Manuf*, vol. 12, pp. 77–89, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.addma.2016.04.002.
- [98] S. Kondor CAPT Gerald Grant Peter Liacouras, M. R. James Schmid, B. Macy Brian Sabart, and C. Macedonia, “Personalized Surgical Instruments LTC Michael Parsons,” 2013, [Online]. Available: <http://www.asme.org/ab>
- [99] S. N. Kurenov, C. Ionita, D. Sammons, and T. L. Demmy, “Three-dimensional printing to facilitate anatomic study, device development, simulation, and planning in thoracic surgery,” *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, vol. 149, no. 4, pp. 973–979.e1, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.jtcvs.2014.12.059.
- [100] D. M. Kalaskar, *3D printing in medicine*, 2nd ed. Woodhead Publishing, 2022. Accessed: Mar. 14, 2024. [Online]. Available: https://books.google.pl/books?hl=pl&lr=&id=qH9dEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=3d+printing+in+medicine&ots=UZ84kw3JZK&sig=ngpz6TCudWm5V_I8-dwRgruPsKM&redir_esc=y#v=onepage&q=3d%20printing%20in%20medicine&f=false
- [101] J. Giannatsis and V. Dedoussis, “Additive fabrication technologies applied to medicine and health care: A review,” *International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, vol. 40, no. 1–2, pp. 116–127, Jan. 2009, doi: 10.1007/s00170-007-1308-1.

- [102] C. Y. Liaw and M. Guvendiren, “Current and emerging applications of 3D printing in medicine,” *Biofabrication*, vol. 9, no. 2, Jun. 2017, doi: 10.1088/1758-5090/aa7279.
- [103] S. Rouf *et al.*, “Additive manufacturing technologies: Industrial and medical applications,” *Sustainable Operations and Computers*, vol. 3, pp. 258–274, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.susoc.2022.05.001.
- [104] B. Vandembroucke and J. P. Kruth, “Selective laser melting of biocompatible metals for rapid manufacturing of medical parts,” *Rapid Prototyp J*, vol. 13, no. 4, pp. 196–203, Aug. 2007, doi: 10.1108/13552540710776142.
- [105] K. Munir, A. Biesiekierski, C. Wen, and Y. Li, “Selective laser melting in biomedical manufacturing,” in *Metallic Biomaterials Processing and Medical Device Manufacturing*, Elsevier, 2020, pp. 235–269. doi: 10.1016/B978-0-08-102965-7.00007-2.
- [106] X. P. Li, J. Van Humbeeck, and J. P. Kruth, “Selective laser melting of weak-textured commercially pure titanium with high strength and ductility: A study from laser power perspective,” *Mater Des*, vol. 116, pp. 352–358, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.matdes.2016.12.019.
- [107] Y. Zhong, L. Liu, S. Wikman, D. Cui, and Z. Shen, “Intragranular cellular segregation network structure strengthening 316L stainless steel prepared by selective laser melting,” *Journal of Nuclear Materials*, vol. 470, pp. 170–178, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.jnucmat.2015.12.034.
- [108] J. P. Kruth, G. Levy, F. Klocke, and T. H. C. Childs, “Consolidation phenomena in laser and powder-bed based layered manufacturing,” *CIRP Ann Manuf Technol*, vol. 56, no. 2, pp. 730–759, 2007, doi: 10.1016/j.cirp.2007.10.004.
- [109] J. Dias Corpa Tardelli, C. Bolfarini, and A. Cândido dos Reis, “Comparative analysis of corrosion resistance between beta titanium and Ti-6Al-4V alloys: A systematic review,” *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, vol. 62, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.jtemb.2020.126618.
- [110] H. Matusiewicz, “Potential release of in vivo trace metals from metallic medical implants in the human body: From ions to nanoparticles - A systematic analytical review,” *Acta Biomater*, vol. 10, no. 6, pp. 2379–2403, 2014, doi: 10.1016/j.actbio.2014.02.027.
- [111] H. Ishizawa and M. Ogino, “Hydrothermal precipitation of hydroxyapatite on anodic titanium oxide films containing Ca and P,” *Journal of Material Science*, vol. 34, pp. 5893–5898, 1999.
- [112] A. Krzakała *et al.*, “Formation of bioactive coatings on a Ti-6Al-7Nb alloy by plasma electrolytic oxidation,” *Electrochim Acta*, vol. 104, pp. 407–424, 2013, doi: 10.1016/j.electacta.2012.07.075.
- [113] M. Meng, J. Wang, H. Huang, X. Liu, J. Zhang, and Z. Li, “3D printing metal implants in orthopedic surgery: Methods, applications and future prospects,” *J Orthop Translat*, vol. 42, pp. 94–112, Sep. 2023, doi: 10.1016/j.jot.2023.08.004.
- [114] J. L. Burnard, W. C. H. Parr, W. J. Choy, W. R. Walsh, and R. J. Mobbs, “3D-printed spine surgery implants: a systematic review of the efficacy and clinical safety profile of patient-specific and off-the-shelf devices,” *European Spine Journal*, vol. 29, no. 6, pp. 1248–1260, Jun. 2020, doi: 10.1007/s00586-019-06236-2.
- [115] Y. Tong, D. J. Kaplan, J. M. Spivak, and J. A. Bendo, “Three-dimensional printing in spine surgery: a review of current applications,” *Spine Journal*, vol. 20, no. 6, pp. 833–846, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.spinee.2019.11.004.
- [116] O. Mishchenko *et al.*, “Craniofacial reconstruction using 3D personalized implants with enhanced surface properties: Technological and clinical aspects,” *Applied Surface Science Advances*, vol. 16, Aug. 2023, doi: 10.1016/j.apsadv.2023.100437.
- [117] A. Arjunan, M. Demetriou, A. Baroutaji, and C. Wang, “Mechanical performance of highly permeable laser melted Ti6Al4V bone scaffolds,” *J Mech Behav Biomed Mater*, vol. 102, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.jmbbm.2019.103517.
- [118] J. Zhang, A. Chaudhari, and H. Wang, “Surface quality and material removal in magnetic abrasive finishing of selective laser melted 316L stainless steel,” *J Manuf Process*, vol. 45, pp. 710–719, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.jmapro.2019.07.044.
- [119] A. P. Golhin, R. Tonello, J. R. Frisvad, S. Grammatikos, and A. Strandlie, “Surface roughness of as-printed polymers: a comprehensive review,” *International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, vol. 127, no. 3–4, pp. 987–1043, Jul. 2023, doi: 10.1007/s00170-023-11566-z.

- [120] A. Orłowska, W. Kajzer, K. Goldsztajn, B. Rynkus, and J. Szewczenko, "Modification of the surface topography and metallographic structure of Ti6Al4V scaffolds using thermal treatment," in *2024 Spring Meeting of European Materials Research Society*, Strasbourg, Francja, 2024.
- [121] M. A. Surmeneva *et al.*, "The influence of chemical etching on porous structure and mechanical properties of the Ti6Al4V Functionally Graded Porous Scaffolds fabricated by EBM," *Mater Chem Phys*, vol. 275, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.matchemphys.2021.125217.
- [122] G. Pyka, G. Kerckhofs, I. Papantoniou, M. Speirs, J. Schrooten, and M. Wevers, "Surface roughness and morphology customization of additive manufactured open porous Ti6Al4V structures," *Materials*, vol. 6, no. 10, pp. 4737–4757, 2013, doi: 10.3390/ma6104737.
- [123] G. Pyka *et al.*, "Surface modification of Ti6Al4V open porous structures produced by additive manufacturing," *Adv Eng Mater*, vol. 14, no. 6, pp. 363–370, Jun. 2012, doi: 10.1002/adem.201100344.
- [124] G. Pyka, G. Kerckhofs, Y. Chin, and C. Ku Leuven, "The use of micro-CT to correlate in-vitro cell behaviour with the surface roughness of Ti6Al4V scaffolds for tissue engineering," in *Proceedings of SkyScan User Meeting*, Leuven, Apr. 2011. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/267385964>
- [125] D. K. Pattanayak *et al.*, "Bioactive Ti metal analogous to human cancellous bone: Fabrication by selective laser melting and chemical treatments," *Acta Biomater*, vol. 7, no. 3, pp. 1398–1406, 2011, doi: 10.1016/j.actbio.2010.09.034.
- [126] A. Orłowska, K. Goldsztajn, W. Kajzer, and J. Szewczenko, "Wpływ parametrów obróbki cieplnej na własności mechaniczne rusztowań kostnych zTi6Al4V wytwarzanych metodą SLM," in *VI Ogólnopolska Konferencja Naukowa Implanty 2024*, Sopot: Politechnika Gdańska, 2024.
- [127] J. E. Biemond, G. Hannink, N. Verdonschot, and P. Buma, "Bone ingrowth potential of electron beam and selective laser melting produced trabecular-like implant surfaces with and without a biomimetic coating," *J Mater Sci Mater Med*, vol. 24, no. 3, pp. 745–753, Mar. 2013, doi: 10.1007/s10856-012-4836-7.
- [128] S. L. Sing, J. An, W. Y. Yeong, and F. E. Wiria, "Laser and electron-beam powder-bed additive manufacturing of metallic implants: A review on processes, materials and designs," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 34, no. 3, pp. 369–385, Mar. 2016, doi: 10.1002/jor.23075.
- [129] S. Ponader *et al.*, "Effects of topographical surface modifications of electron beam melted Ti-6Al-4V titanium on human fetal osteoblasts," *J Biomed Mater Res A*, vol. 84, no. 4, pp. 1111–1119, Mar. 2008, doi: 10.1002/jbm.a.31540.
- [130] K. Anselme, A. Ponche, and M. Bigerelle, "Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 2: Biological aspects," in *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, Dec. 2010, pp. 1487–1507. doi: 10.1243/09544119JEIM901.
- [131] R. Wei, W. Guo, T. Ji, Y. Zhang, and H. Liang, "One-step reconstruction with a 3D-printed, custom-made prosthesis after total en bloc sacrectomy: a technical note," *European Spine Journal*, vol. 26, no. 7, pp. 1902–1909, Jul. 2017, doi: 10.1007/s00586-016-4871-z.
- [132] R. J. Mobbs, M. Coughlan, R. Thompson, C. E. Sutterlin, and K. Phan, "The utility of 3D printing for surgical planning and patient-specific implant design for complex spinal pathologies: Case report," *J Neurosurg Spine*, vol. 26, no. 4, pp. 513–518, Apr. 2017, doi: 10.3171/2016.9.SPINE16371.
- [133] R. Zieliński, A. Kolkowska, J. Sowiński, B. Konieczny, M. Kozakiewicz, and W. Simka, "Workflow for Maxilla/Mandible Individual [Mai®] Implant by Integra Implants—How Individual Implants Are Manufactured," *Biomedicines*, vol. 12, no. 8, Aug. 2024, doi: 10.3390/biomedicines12081773.
- [134] A. N. Aufa, M. Z. Hassan, and Z. Ismail, "Recent advances in Ti-6Al-4V additively manufactured by selective laser melting for biomedical implants: Prospect development," *J Alloys Compd*, vol. 896, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.jallcom.2021.163072.
- [135] A. Orłowska *et al.*, "Functionalization of 3D printed Ti6Al4V high-porous spinal implant surface with use of plasma electrolytic oxidation," *Appl Surf Sci*, vol. 659, Jun. 2024, doi: 10.1016/j.apsusc.2024.159948.
- [136] R. H. U. Khan, A. Yerokhin, X. Li, H. Dong, and A. Matthews, "Surface characterisation of DC plasma electrolytic oxidation treated 6082 aluminium alloy: Effect of current density and

- electrolyte concentration,” *Surf Coat Technol*, vol. 205, no. 6, pp. 1679–1688, Dec. 2010, doi: 10.1016/j.surfcoat.2010.04.052.
- [137] Z. Gorgin Karaji, R. Hedayati, B. Pouran, I. Apachitei, and A. A. Zadpoor, “Effects of plasma electrolytic oxidation process on the mechanical properties of additively manufactured porous biomaterials,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 76, pp. 406–416, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.03.079.
- [138] gov.pl, “Ministerstwo Zdrowia.”
- [139] J. K. Aronson, C. Heneghan, and R. E. Ferner, “Medical Devices: Definition, Classification, and Regulatory Implications,” *Drug Saf*, vol. 43, no. 2, pp. 83–93, Feb. 2020, doi: 10.1007/s40264-019-00878-3.
- [140] A. Horst and F. McDonald, “Uncertain but not unregulated: Medical product regulation in the light of three-dimensional printed medical products,” *3D Print Addit Manuf*, vol. 7, no. 5, pp. 248–257, Oct. 2020, doi: 10.1089/3dp.2020.0076.
- [141] R. J. Morrison *et al.*, “Regulatory Considerations in the Design and Manufacturing of Implantable 3D-Printed Medical Devices,” *Clin Transl Sci*, vol. 8, no. 5, pp. 594–600, Oct. 2015, doi: 10.1111/cts.12315.
- [142] <http://iso.org>, “International Organization for Standardization.”
- [143] B. Świeczko-Żurek, *Biomateriały*. Gdańsk: Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, 2009. [Online]. Available: www.pg.gda.pl/WydawnictwoPG
- [144] D. M. Brunette, P. Tengvall, M. Textor, and P. Thomsen, *Titanium in Medicine*. Springer, 2001. [Online]. Available: <http://www.springer.de/eng>
- [145] M. T. Mohammed, M. T. Mohammed, Z. A. Khan, and A. N. Siddiquee, “Titanium and its Alloys, the Imperative Materials for Biomedical Applications,” in *International Conference on Recent Trends in Engineering & Technology*, Nov. 2012. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/279202072>
- [146] R. P. Kolli and A. Devaraj, “A review of metastable beta titanium alloys,” *Metals (Basel)*, vol. 8, no. 7, Jul. 2018, doi: 10.3390/met8070506.
- [147] M. A. Murzinova, S. V. Zherebtsov, D. N. Klimenko, and S. L. Semiatin, “The Effect of β Stabilizers on the Structure and Energy of α/β Interfaces in Titanium Alloys,” *Metall Mater Trans A Phys Metall Mater Sci*, vol. 52, no. 5, pp. 1689–1698, May 2021, doi: 10.1007/s11661-021-06175-y.
- [148] L. A. Dobrzański, *Podstawy nauki o materiałach i metaloznawstwo*. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne.
- [149] M. Niinomi, “Recent Metallic Materials for Biomedical Applications,” *Metallurgical and Materials Transactions*, vol. 33A, pp. 477–486, 2002.
- [150] A. Orłowska, J. Szewczenko, W. Kajzer, K. Goldsztajn, and M. Basiaga, “Study of the Effect of Anodic Oxidation on the Corrosion Properties of the Ti6Al4V Implant Produced from SLM,” *J Funct Biomater*, vol. 14, no. 4, 2023, doi: 10.3390/jfb14040191.
- [151] I. Wall, N. Donos, K. Carlqvist, F. Jones, and P. Brett, “Modified titanium surfaces promote accelerated osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells in vitro,” *Bone*, vol. 45, no. 1, pp. 17–26, Jul. 2009, doi: 10.1016/j.bone.2009.03.662.
- [152] T. Wierzchoń, E. Czarnowska, and D. Krupa, *Inżynieria powierzchni w wytwarzaniu biomateriałów tytanowych*. Warszawa: Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, 2004.
- [153] T. Burakowski and T. Wierzchoń, *Inżynieria powierzchni metali*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, 1995.
- [154] J. Baszkiewicz, D. Krupa, J. Mizera, J. W. Sobczak, and A. Biliński, “Corrosion resistance of the surface layers formed on titanium by plasma electrolytic oxidation and hydrothermal treatment,” in *Vacuum*, May 2005, pp. 143–147. doi: 10.1016/j.vacuum.2005.01.017.
- [155] L. A. Dobrzański and A. D. Dobrzańska-Danikiewicz, “Struktura i własności powierzchni wybranych nanostrukturalnych i innych materiałów inżynierskich,” in *Obróbka powierzchni materiałów inżynierskich*, 2011, pp. 226–341.
- [156] Z. Biomateriałów, “BIOAKTYWNE POWŁOKI CHITOZANOWE NA IMPLANTACH TYTANOWYCH mgr inż. Milena Supernak-Marczewska Środowiskowe Studium Doktoranckie Katedra Inżynierii Materiałowej i Spajania.”

- [157] H. Xing *et al.*, “Enhanced Biocompatibility and Osteogenic Property of Biodegradable Zn-0.5Li Alloy through Calcium–Phosphorus Coating,” *Coatings*, vol. 14, no. 3, Mar. 2024, doi: 10.3390/coatings14030350.
- [158] J. Jeong, J. H. Kim, J. H. Shim, N. S. Hwang, and C. Y. Heo, “Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration,” *Biomater Res*, vol. 23, no. 1, Jan. 2019, doi: 10.1186/s40824-018-0149-3.
- [159] Z. Ji *et al.*, “Effects of surface morphology and composition of titanium implants on osteogenesis and inflammatory responses: a review,” *Biomedical Materials (Bristol)*, vol. 18, no. 4, Jul. 2023, doi: 10.1088/1748-605X/acd976.
- [160] R. Drevet, J. Fauré, and H. Benhayoune, “Calcium Phosphates and Bioactive Glasses for Bone Implant Applications,” *Coatings*, vol. 13, no. 7, Jul. 2023, doi: 10.3390/coatings13071217.
- [161] W. Han, S. Fang, Q. Zhong, and S. Qi, “Influence of Dental Implant Surface Modifications on Osseointegration and Biofilm Attachment,” *Coatings*, vol. 12, no. 11, Nov. 2022, doi: 10.3390/coatings12111654.
- [162] F. Rupp, L. Scheideier, N. Olshanska, M. De Wild, M. Wieland, and J. Geis-Gerstorfer, “Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces,” *J Biomed Mater Res A*, vol. 76, no. 2, pp. 323–334, Feb. 2006, doi: 10.1002/jbm.a.30518.
- [163] Z. Qu, X. Rausch-Fan, M. Wieland, M. Matejka, and A. Schedle, “The initial attachment and subsequent behavior regulation of osteoblasts by dental implant surface modification,” *J Biomed Mater Res A*, vol. 82, no. 3, pp. 658–668, Sep. 2007, doi: 10.1002/jbm.a.31023.
- [164] J. A. Schmidt and A. F. Van Recum, “Texturing of polymer surfaces at the cellular level,” *Biomaterials 1991*, vol. 12, 1990.
- [165] C. M. Stanford and J. C. Keller, “The concept of osseointegration and bone matrix expression,” *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, vol. 2, no. 1, pp. 83–101, 1991, doi: 10.1177/10454411910020010601.
- [166] B. D. Ratner, “The Nature of Matter and Materials,” in *Biomaterials Science: An Introduction to Materials: 3rd Edition*, Elsevier Inc., 2013, pp. 6–9. doi:10.1016/B978-0-08-087780-8.00002-4.
- [167] P. Rougerie, R. S. dos Santos, M. Farina, and K. Anselme, “Molecular mechanisms of topography sensing by osteoblasts: An update,” *Applied Sciences (Switzerland)*, vol. 11, no. 4, pp. 1–17, Feb. 2021, doi: 10.3390/app11041791.
- [168] I. J. Y. Martin, *et al.*, “Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells P MG63,” *J Biomed Mater Res*, vol. 29, pp. 389–401, 1995.
- [169] C. H. Lohmann *et al.*, “Maturation State Determines the Response of Osteogenic Cells to Surface Roughness and 1,25-Dihydroxyvitamin D3,” *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 15, no. 6, pp. 1169–1180, 2000.
- [170] J. Lincks *et al.*, “Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition,” *Biomaterials*, vol. 19, pp. 2219–2232, 1998.
- [171] M. Cheng *et al.*, “Calcium Plasma Implanted Titanium Surface with Hierarchical Microstructure for Improving the Bone Formation,” *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 7, no. 23, pp. 13053–13061, Jun. 2015, doi: 10.1021/acsami.5b03209.
- [172] R. A. Gittens *et al.*, “The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 13, pp. 3395–3403, May 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.029.
- [173] Y. Li *et al.*, “Effects of a micro/nano rough strontium-loaded surface on osseointegration,” *Int J Nanomedicine*, vol. 10, pp. 4549–4563, Jul. 2015, doi: 10.2147/IJN.S84398.
- [174] D. Barnat-Hunek, *Swobodna energia powierzchniowa jako czynnik kształtujący skuteczność hydrofobizacji w ochronie konstrukcji budowlanych*. Politechnika Lubelska, 2016.
- [175] A. Marmur, “Wetting on hydrophobic rough surfaces: To be heterogeneous or not to be?,” *Langmuir*, vol. 19, no. 20, pp. 8343–8348, Sep. 2003, doi: 10.1021/la0344682.
- [176] T. S. Jang *et al.*, “Multiscale porous titanium surfaces via a two-step etching process for improved mechanical and biological performance,” *Biomedical Materials (Bristol)*, vol. 12, no. 2, Mar. 2017, doi: 10.1088/1748-605X/aa5d74.

- [177] X. Liu, P. K. Chu, and C. Ding, "Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications," *Materials Science and Engineering R: Reports*, vol. 47, no. 3–4, pp. 49–121, Dec. 2004, doi: 10.1016/j.mser.2004.11.001.
- [178] M. V. Diamanti, B. del Curto, and M. Pedferri, "Anodic oxidation of titanium: From technical aspects to biomedical applications," *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics*, vol. 9, no. 1, pp. 55–69, Jan. 2011, doi: 10.5301/JABB.2011.7429.
- [179] J. Szewczenko, W. Walke, K. Nowinska, and J. Marciniak, "Corrosion resistance of Ti-6Al-4V alloy after diverse surface treatments," in *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, May 2010, pp. 360–371. doi: 10.1002/mawe.201000610.
- [180] M. P. Neupane, I. S. Park, T. S. Bae, H. K. Yi, F. Watari, and M. H. Lee, "Synthesis and Morphology of TiO₂ Nanotubes by Anodic Oxidation Using Surfactant Based Fluorinated Electrolyte," *J Electrochem Soc*, vol. 158, no. 8, p. C242, 2011, doi: 10.1149/1.3598164.
- [181] G. Barati Darband, M. Aliofkhaezai, P. Hamghalam, and N. Valizade, "Plasma electrolytic oxidation of magnesium and its alloys: Mechanism, properties and applications," *Journal of Magnesium and Alloys*, vol. 5, no. 1, pp. 74–132, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.jma.2017.02.004.
- [182] C. Micheletti, R. Suriano, K. Grandfield, and S. Turri, "Drug release from polymer-coated TiO₂nanotubes on additively manufactured Ti-6Al-4V bone implants: a feasibility study," *Nano Express*, vol. 2, no. 1, Mar. 2021, doi: 10.1088/2632-959X/abe278.
- [183] K. Gulati, S. Ramakrishnan, M. S. Aw, G. J. Atkins, D. M. Findlay, and D. Losic, "Biocompatible polymer coating of titania nanotube arrays for improved drug elution and osteoblast adhesion," *Acta Biomater*, vol. 8, no. 1, pp. 449–456, 2012, doi: 10.1016/j.actbio.2011.09.004.
- [184] "Biodegradable polymer coatings on T".
- [185] H. Krawiec, U. Lelek-Borkowska, E. Proniewicz, M. Starowicz, and D. Święch, *Podstawy chemii polimerów*. Akademia Górniczo-Hutnicza im. St. Staszica w Krakowie, 2021.
- [186] D. Raafat and H. G. Sahl, "Chitosan and its antimicrobial potential - A critical literature survey," *Microb Biotechnol*, vol. 2, no. 2 SPEC. ISS., pp. 186–201, Mar. 2009, doi: 10.1111/j.1751-7915.2008.00080.x.
- [187] A. K. Azab *et al.*, "Crosslinked chitosan implants as potential degradable devices for brachytherapy: In vitro and in vivo analysis," *Journal of Controlled Release*, vol. 111, no. 3, pp. 281–289, Apr. 2006, doi: 10.1016/j.jconrel.2005.12.014.
- [188] D. H. Li, L. M. Liu, K. L. Tian, J. C. Liu, and X. Q. Fan, "Synthesis, biodegradability and cytotoxicity of water-soluble isobutylchitosan," *Carbohydr Polym*, vol. 67, no. 1, pp. 40–45, Jan. 2007, doi: 10.1016/j.carbpol.2006.04.022.
- [189] L. S. Nair and C. T. Laurencin, "Biodegradable polymers as biomaterials," *Progress in Polymer Science (Oxford)*, vol. 32, no. 8–9, pp. 762–798, Aug. 2007, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017.
- [190] J. A. Jennings *et al.*, "Chitosan coatings to control release and target tissues for therapeutic delivery," *Ther Deliv*, vol. 6, no. 7, pp. 855–871, Jul. 2015, doi: 10.4155/tde.15.31.
- [191] A. Rasool *et al.*, "Chitosan-Based Smart Polymeric Hydrogels and Their Prospective Applications in Biomedicine," *Starch Journal*, p. 2100150, 2021, doi: 10.1002/star.202100150.
- [192] J. D. Bumgardner *et al.*, "The integration of chitosan-coated titanium in bone: An in vivo study in rabbits," *Implant Dent*, vol. 16, no. 1, pp. 66–79, 2007, doi: 10.1097/ID.0b013e3180312011.
- [193] Z. Ansari *et al.*, "In-situ synthesis and characterization of chitosan/hydroxyapatite nanocomposite coatings to improve the bioactive properties of Ti6Al4V substrates," *Materials*, vol. 13, no. 17, Sep. 2020, doi: 10.3390/MA13173772.
- [194] M. A. Matica, F. L. Aachmann, A. Tøndervik, H. Sletta, and V. Ostafe, "Chitosan as a wound dressing starting material: Antimicrobial properties and mode of action," *Int J Mol Sci*, vol. 20, no. 23, Dec. 2019, doi: 10.3390/ijms20235889.
- [195] W. Paul and C. P. Sharma, "Chitosan and Alginate Wound Dressings: A Short Review," *Trends Biomater Artif Organs*, vol. 18, no. 1, pp. 18–23, 2004, [Online]. Available: <http://www.sbaoi.org>
- [196] P. C. Rath, B. P. Singh, L. Besra, and S. Bhattacharjee, "Multiwalled carbon nanotubes reinforced Hydroxyapatite-chitosan composite coating on Ti metal: Corrosion and mechanical properties," in *Journal of the American Ceramic Society*, Sep. 2012, pp. 2725–2731. doi: 10.1111/j.1551-2916.2012.05195.x.

- [197] Y. Zhou, S. Q. Liu, H. Peng, L. Yu, B. He, and Q. Zhao, "In vivo anti-apoptosis activity of novel berberine-loaded chitosan nanoparticles effectively ameliorates osteoarthritis," *Int Immunopharmacol*, vol. 28, no. 1, pp. 34–43, May 2015, doi: 10.1016/j.intimp.2015.05.014.
- [198] Y. Zhang, J. Ma, and W. Zhang, "Berberine for bone regeneration: Therapeutic potential and molecular mechanisms," *J Ethnopharmacol*, vol. 277, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.jep.2021.114249.
- [199] H. Li, T. Miyahara, Y. Tezuka, Q. Le Tran, H. Seto, and S. Kadota, "Effect of Berberine on Bone Mineral Density in SAMP6 as a Senile Osteoporosis Model," *Notes Biol. Pharm. Bull*, vol. 26, no. 1, pp. 110–111, 2003.
- [200] H. S. Yogesh *et al.*, "Anti-osteoporotic activity of aqueous-methanol extract of *Berberis aristata* in ovariectomized rats," *J Ethnopharmacol*, vol. 134, no. 2, pp. 334–338, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.jep.2010.12.013.
- [201] M. Raju, Y. A. Kulkarni, and S. Wairkar, "Therapeutic potential and recent delivery systems of berberine: A wonder molecule," *J Funct Foods*, vol. 61, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.jff.2019.103517.
- [202] L. Ma *et al.*, "Berberine-releasing electrospun scaffold induces osteogenic differentiation of DPSCs and accelerates bone repair," *Sci Rep*, vol. 11, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41598-020-79734-9.
- [203] D. Huang *et al.*, "Antibacterial chitosan coating on nano-hydroxyapatite/polyamide66 porous bone scaffold for drug delivery," *J Biomater Sci Polym Ed*, vol. 22, no. 7, pp. 931–944, Jan. 2011, doi: 10.1163/092050610X496576.
- [204] P. Huang, Y. Zhang, K. Xu, and Y. Han, "Surface modification of titanium implant by microarc oxidation and hydrothermal treatment," *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, vol. 70, no. 2, pp. 187–190, Aug. 2004, doi: 10.1002/jbm.b.30009.
- [205] I. Yadroitsava, A. Du Plessis, and I. Yadroitsev, "Bone regeneration on implants of titanium alloys produced by laser powder bed fusion: A review," 2019, doi: 10.13140/RG.2.2.36780.72328.
- [206] A. Orłowska, W. Kajzer, K. Goldsztajn, and J. Szewczenko, "Evaluation of the performance properties of the author's highly porous implant for the treatment of discopathies manufactured by SLM in Ti6Al4V alloy," in *19th Scientific Conference "Medical and Sport Technologies" & „Young Biomechanists Conference" named of prof. Dagmara Tejszerska*, Wisła, May 2023.
- [207] I. Wolańska and W. Wolański, "Ergonomia pracy przy komputerze w aspekcie obciążeń kręgosłupa," *Zeszyty Naukowe Katedry Mechaniki Stosowanej*, vol. 27, 2005.
- [208] K. Surma, M. Adach, M. Dębowska, P. Turlej, and P. Szymczyk, "Projekt i analiza obliczeniowa krążka międzykręgowego odcinka szyjnego kręgosłupa przeznaczonego do wytwarzania za pomocą technologii przyrostowych," *Aktualne Problemy Biomechaniki*, vol. 17, 2019.
- [209] M. Chrzan, R. Michnik, and K. Nowakowska, "Ocena obciążeń w odcinku SZYJNYM kręgosłupa podczas użytkowania gogli do wirtualnej rzeczywistości," *Aktualne Problemy Biomechaniki*, vol. 13, pp. 5–12, 2017.
- [210] "Osprey® Ti-6Al-4V-ELI (Grade 23)," <https://www.metalpowder.sandvik/en/products/metal-powder-alloys/titanium/osprey-ti-6al-4v-eli-grade-23/?html-to-pdf=true>.
- [211] D. Yamamoto *et al.*, "Surface hydrophilicity and osteoconductivity of anodized Ti in aqueous solutions with various solute ions," *Mater Trans*, vol. 53, no. 11, pp. 1956–1961, 2012, doi: 10.2320/matertrans.M2012082.
- [212] A. Krzakała *et al.*, "Characterisation of bioactive films on Ti-6Al-4V alloy," *Electrochim Acta*, vol. 104, pp. 425–438, 2013, doi: 10.1016/j.electacta.2012.12.081.
- [213] M. Basiaga, J. Szewczenko, W. Walke, Z. Paszenda, M. Antonowicz, and A. Hyla, "Characteristics of Surface Layers of Ti6Al4V Implants," in *Innovations in Biomedical Engineering*, vol. 526, M. Gzik, E. Tkacz, Z. Paszenda, and E. Piętka, Eds., Springer, 2016, pp. 3–10. [Online]. Available: <http://www.springer.com/series/11156>
- [214] A. Krzakała *et al.*, "Formation of bioactive coatings on a Ti-6Al-7Nb alloy by plasma electrolytic oxidation," *Electrochim Acta*, vol. 104, pp. 407–424, 2013, doi: 10.1016/j.electacta.2012.07.075.
- [215] J. Szewczenko, M. Basiaga, M. Grygiel-Pradelok, and M. Kaczmarek, "Characteristics of Surface Layers of Ti6Al4V Implants," in *Innovations in Biomedical Engineering*, vol. 526, 2016, pp. 76–84. [Online]. Available: <http://www.springer.com/series/11156>

- [216] J. Szewczenko, *Kształtowanie własności fizycznych i chemicznych warstwy wierzchniej implantów ze stopów tytanu dla traumatologii i ortopedii*. Gliwice: Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, 2014.
- [217] A. Orłowska, J. Jaworska, W. Kajzer, K. Goldsztajn, and J. Szewczenko, “Development of a method of applying a layer of chitosan+berberine on a peo-modified spianl implant made of Ti6Al4V, produced by SLM method,” in *Book of Abstract*, Ryto: 32nd Annual Conference Biomaterials in Medicine and Veterinary Medicine, Oct. 2023, p. 35.
- [218] N. Fairley *et al.*, “Systematic and collaborative approach to problem solving using X-ray photoelectron spectroscopy,” *Applied Surface Science Advances*, vol. 5, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.apsadv.2021.100112.
- [219] H. Rietveld, “A profile refinement method for nuclear and magnetic structures,” *J Appl Crystallogr*, vol. 21, pp. 65–71, 1969.
- [220] H. M. Rietveld, “Line profiles of neutron powder-diffraction peaks for structure refinemen,” *Acta Crystallography*, vol. 22, pp. 151–152, 1967.
- [221] B. H. Toby, “R factors in Rietveld analysis: How good is good enough?,” *Powder Diffr*, vol. 21, no. 1, pp. 67–70, Mar. 2006, doi: 10.1154/1.2179804.
- [222] M. Karolus and E. Łagiewka, “Crystallite size and lattice strain in nanocrystalline Ni-Mo alloys studied by Rietveld refinement,” in *Journal of Alloys and Compounds*, Mar. 2004, pp. 235–238. doi: 10.1016/j.jallcom.2003.08.044.
- [223] A. Van Tonder, A. M. Joubert, and A. D. Cromarty, “Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays,” *BMC Res Notes*, vol. 8, no. 1, Dec. 2015, doi: 10.1186/s13104-015-1000-8.
- [224] Y. P. Keepers, P. E. Pizao, G. J. Peters, J. van Ark-Otte, B. Winograd, and H. M. Pinedo, “Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing,” *Eur J Cancer Clin Oncol*, vol. 27, no. 7, pp. 897–900, 1991.
- [225] M. Papadimitriou, E. Hatzidaki, and I. Papisotiriou, “Linearity Comparison of Three Colorimetric Cytotoxicity Assays,” *J Cancer Ther*, vol. 10, no. 07, pp. 580–590, 2019, doi: 10.4236/jct.2019.107047.
- [226] E. Tsuruga, H. Takita, H. Itoh, ō Yuichi Wakisaka, and Y. Kuboki, “Pore Size of Porous Hydroxyapatite as the Cell-Substratum Controls BMP-Induced Osteogenesis,” *J. Biochem*, vol. 121, pp. 317–324, 1997.
- [227] J. Karlsson, A. Snis, H. Engqvist, and J. Lausmaa, “Characterization and comparison of materials produced by Electron Beam Melting (EBM) of two different Ti-6Al-4V powder fractions,” *J Mater Process Technol*, vol. 213, no. 12, pp. 2109–2118, 2013, doi: 10.1016/j.jmatprotec.2013.06.010.
- [228] M. Elahinia, N. Shayesteh Moghaddam, M. Taheri Andani, A. Amerinatanzi, B. A. Bimber, and R. F. Hamilton, “Fabrication of NiTi through additive manufacturing: A review,” *Prog Mater Sci*, vol. 83, pp. 630–663, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.pmatsci.2016.08.001.
- [229] J. Gustavsson, M. P. Ginebra, J. Planell, and E. Engel, “Osteoblast-like cellular response to dynamic changes in the ionic extracellular environment produced by calcium-deficient hydroxyapatite,” in *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Oct. 2012, pp. 2509–2520. doi: 10.1007/s10856-012-4705-4.
- [230] C. Eriksson, H. Nygren, and K. Ohlson, “Implantation of hydrophilic and hydrophobic titanium discs in rat tibia: Cellular reactions on the surfaces during the first 3 weeks in bone,” *Biomaterials*, vol. 25, no. 19, pp. 4759–4766, Aug. 2004, doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.12.006.
- [231] R. A. Gittens *et al.*, “A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects,” *Acta Biomater*, vol. 10, no. 7, pp. 2907–2918, 2014, doi: 10.1016/j.actbio.2014.03.032.
- [232] R. Ghaffarzadegan, S. Khoee, and S. Rezazadeh, “Fabrication, characterization and optimization of berberine-loaded PLA nanoparticles using coaxial electrospray for sustained drug release,” *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 28, no. 1, pp. 237–252, Jun. 2020, doi: 10.1007/s40199-020-00335-y.

- [233] J. Zhou, Y. Dai, J. Fu, C. Yan, D. G. Yu, and T. Yi, "Dual-Step Controlled Release of Berberine Hydrochloride from the Trans-Scale Hybrids of Nanofibers and Microparticles," *Biomolecules*, vol. 13, no. 6, Jun. 2023, doi: 10.3390/biom13061011.
- [234] X. Yin *et al.*, "Study on the release behaviors of berberine hydrochloride based on sandwich nanostructure and shape memory effect," *Materials Science and Engineering C*, vol. 109, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.msec.2019.110541.