

---

**Politechnika Śląska**  
**Wydział Inżynierii Biomedycznej**



**Politechnika  
Śląska**

**PRACA DOKTORSKA**

„Funkcjonalizacja powierzchni stali 316LVM pod kątem  
uwarunkowań i oddziaływania z układem sercowo-naczyniowym”

mgr Aneta Dyner

Promotor:

dr hab. inż. Marcin Basiaga, prof PŚ

Zabrze 2023

---

## PODZIĘKOWANIA

*Składam serdeczne podziękowania:*

*Panu dr hab. inż. Marcinowi Basiadze, Prof. PŚ  
za całą przekazaną mi wiedzę, wsparcie oraz wszelką pomoc, a także za  
zaufanie i dodanie mi wiary we własne siły*

*Panu dr hab. inż. Romanowi Majorowi, Prof. PAN  
oraz Panu dr hab. inż. Łukaszowi Majorowi, Prof. PAN  
za pomoc w realizacji badań*

*Panu Prof. dr hab. inż. Zbigniewowi Paszendzie, Dziekanowi Wydziału  
Inżynierii Biomedycznej Politechniki Śląskiej  
za okazaną życzliwość i cenne wskazówki w trakcie realizacji mojej rozprawy*

*Wszystkim pracownikom Wydziału Inżynierii Biomedycznej Politechniki  
Śląskiej za wszelkie wsparcie, pomoc i życzliwość*

*Mojemu mężowi Marcinowi Dynierowi, za inspirację, wsparcie i cierpliwość*

*Mojemu teściowi Markowi Dynierowi za przekazaną wiedzę podczas mojej  
pracy w firmie CHIRMED, bez której stworzenie tej pracy nie byłoby możliwe*

*Mojej mamie, za to kim jestem i za dobry przykład wytrwałości pomimo  
przeciwności losu*

---

## Spis treści

1.	Wprowadzenie .....	5
2.	Przegląd piśmiennictwa .....	8
2.1.	Problematyka chorób układu sercowo-naczyniowego .....	8
2.2.	Choroby układu sercowo-naczyniowego- etiologia i sposoby leczenia .....	12
2.3.	Charakterystyka implantów stosowanych w układzie krążenia.....	17
2.4.	Problematyka modyfikacji powierzchni implantów sercowo-naczyniowych .....	26
2.5.	Aktualny stan wiedzy dotyczący modyfikacji powierzchni stali nierdzewnej stosowanej na stenty naczyniowe .....	29
3.	Podsumowanie przeglądu piśmiennictwa.....	45
4.	Badania własne .....	47
4.1.	Cel, założenia i teza pracy .....	47
4.2.	Metodyka badań.....	51
4.2.1.	Badania składu chemicznego warstwy powierzchniowej .....	51
4.2.2.	Badania grubości warstw .....	52
4.2.3.	Badania własności elektrochemicznych .....	52
4.2.4.	Badania własności fizycznych.....	54
4.2.5.	Wybór wariantu temperaturowego do dalszych badań.....	55
4.2.6.	Badania podatności powłoki do odkształceń.....	55
4.2.7.	Badania mikrostruktury .....	56
4.2.8.	Badania własności biologicznych.....	56
4.3.	Wyniki badań.....	61
4.3.1.	Badania składu chemicznego warstwy powierzchniowej .....	61
4.3.2.	Badania grubości warstw .....	63
4.3.3.	Badania własności elektrochemicznych .....	64
4.3.4.	Badania własności fizycznych.....	69
4.3.5.	Wybór wariantu temperaturowego do dalszych badań.....	74
4.3.6.	Badania podatności powłoki do odkształceń.....	74
4.3.7.	Badania mikrostruktury .....	76
4.3.8.	Badania własności biologicznych.....	77
5.	Omówienie wyników badań .....	87
6.	Wnioski.....	95
7.	Streszczenie .....	97

---

8. Bibliografia.....	99
----------------------	----

---

# 1. Wprowadzenie

Według doniesień Światowej Organizacji Zdrowia, choroby układu sercowo-naczyniowego są najważniejszą przyczyną zgonów na całym świecie. Szacowana ilość zgonów w 2019 roku wynosi 17,9 mln osób, co stanowi 32% wszystkich zgonów na świecie, w tym 85% było spowodowanych zawałem serca i udarem mózgu. W 2013 roku Światowa Organizacja Zdrowia opracowała „Globalny plan działania na rzecz zapobiegania i kontroli chorób niezakaźnych na lata 2013-2020”, w którym zwróciła szczególną uwagę nie tylko na działania prewencyjne, lecz również na potrzebę rozwoju technologii i wyrobów medycznych do leczenia chorób układu sercowo-naczyniowego.

Choroby układu sercowo naczyniowego obejmują grupę zaburzeń serca i naczyń krwionośnych z których największym zagrożeniem są zawały serca i udary mózgu spowodowane głównie zablokowaniem naczyń krwionośnych. Najczęstszą przyczyną tych zdarzeń jest gromadzenie złogów tłuszczu na wewnętrznych ściankach naczyń krwionośnych. Najczęstszą przyczyną udarów są zakrzepy oraz krwawienia z naczyń krwionośnych w mózgu. Poza wdrożeniem działań związanych ze skuteczną prewencją chorób układu krążenia, istotne jest skuteczne leczenie i zapobieganie powikłaniom po wdrożeniu leczenia.

Skuteczną metodą leczenia chorób układu sercowo naczyniowego są zabiegi angioplastyki przywracające drożność zwężonym naczyniom krwionośnym. Leczenie chorób układu krążenia wymaga często użycia implantów naczyniowych, takich jak protezy naczyń krwionośnych, stenty i stent-grafty.

Wyroby do implantacji przeznaczone do kontaktu z krwią wymagają użycia materiałów o wysokiej biokompatybilności ze względu na kontakt z płynną tkanką łączną. Z tego względu materiały stosowane do implantów do kontaktu z krwią powinny być przede wszystkim atrombogeniczne i hydrofobowe. Istotne jest również zapobieganie typowym reakcjom odrzucenia oraz powikłaniom, do których należy głównie zakrzepica oraz

---

restenoza, czyli ponowne zwężanie naczyń krwionośnych po zabiegach wszczepiania stentów naczyniowych.

Istotną rolę w poprawie biogodności implantów do kontaktu z krwią odgrywają powłoki funkcjonalne. Opracowane do tej pory metody nanoszenia powłok funkcjonalnych do układu sercowo-naczyniowego mają za zadanie zmniejszenie ryzyka występowania typowych powikłań. Na szczególną uwagę zasługują metody ALD (Atomic Layer Deposition), które dają możliwość precyzyjnej kontroli grubości warstwy w skali nanometrycznej oraz jednorodne powlekanie podłoża o skomplikowanych kształtach z wysoką powtarzalnością.

Przedmiotem rozprawy doktorskiej są powłoki z  $\text{TiO}_2$  nanoszone metodą ALD na podłoże ze stali 316LVM z przeznaczeniem na implanty do kontaktu z krwią. Szczególnym przypadkiem takiego implantu są stenty wewnątrznaczyniowe. Trwające nadal intensywne prace dotyczące modyfikacji powierzchni stentów, wskazują na brak satysfakcjonujących rozwiązań w tej dziedzinie. Nadal nierozwiązanym problemem jest późna zakrzepica w stencie. Opracowanie idealnej powierzchni stentu wydaje się zadaniem bardzo trudnym, biorąc pod uwagę fakt, że uszkodzony podczas implantacji naturalny śródbłonek uczestniczy aktywnie w procesie przebudowy ścian naczyń, przez co nie jest wyłącznie pasywną barierą odgradzającą krew od tkanek. Dodatkowo, materiał, z którego wykonany jest stent musi zapewniać odpowiednie podparcie dla ścian naczyń w trakcie leczenia. Pomimo opracowania wielu strategii dotyczących modyfikacji powierzchni stentu, w tym również strategii biomimetycznych, musimy pamiętać, że w odniesieniu do dostępnych obecnie biomateriałów i modyfikacji powierzchniowych, nadal mamy do czynienia z przyrodą nieżywioną, przez co wydaje się niemożliwe naśladowanie naturalnych mechanizmów zachodzących w ludzkim organizmie.

Ocena biologiczna biomateriałów według obowiązujących norm powinna obejmować wiele aspektów oddziaływania biomateriału z ludzkim organizmem. Przed przystąpieniem do badań biologicznych na tkankach, materiał powinien zostać poddany szczegółowej charakterystyce fizykochemicznej, ze względu na konieczność uwzględnienia wszystkich czynników biochemicznych, biomechanicznych i bioelektrycznych zachodzących w ludzkim organizmie. Materiał może zostać ostatecznie zakwalifikowany jako odpowiedni dla wyrobu medycznego po przeprowadzeniu badań biologicznych na komórkach, tkankach, a w razie konieczności badań *in vivo* na zwierzętach oraz badań klinicznych.

---

Niniejsza praca jest w pewnym stopniu zebraniem doświadczeń autorki związanych z oceną zgodności wyrobów medycznych, która stanowi proces oparty na zarządzaniu ryzykiem związanym z zastosowaniem wyrobów medycznych. Istotną rolę w tym procesie odgrywa kompleksowe podejście do bezpieczeństwa wyrobów medycznych oraz ostrożne podejście do innowacji w celu rozważenia korzyści oraz ryzyka wynikającego z zastosowania nowych materiałów oraz technologii w medycynie.

---

## 2. Przegląd piśmiennictwa

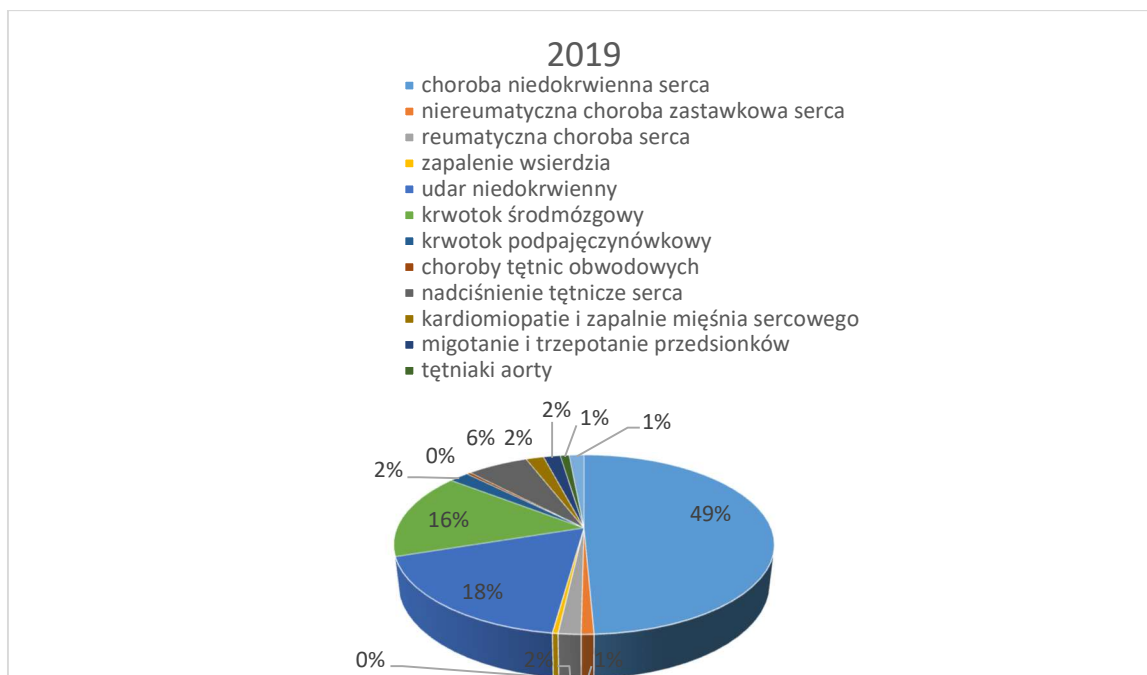
### 2.1. Problematyka chorób układu sercowo-naczyniowego

Choroby układu sercowo-naczyniowego obejmują szeroką grupę schorzeń naczyń krwionośnych oraz schorzeń i wad wrodzonych serca. Do najgroźniejszych zdarzeń związanych z tymi chorobami należą zawały serca i udary niedokrwienne mózgu, spowodowane zazwyczaj zablokowaniem naczyń krwionośnych doprowadzających krew do serca lub mózgu. Najczęstszą przyczyną blokowania naczyń krwionośnych jest skrzeplina powstająca w wyniku pęknięcia blaszki miażdżycowej, jej owrzodzenia, wytworzenia szczeliny lub nadżerki. Jeśli proces ten ma miejsce w naczyniu wieńcowym skutkuje zmniejszeniem przepływu krwi przez mięsień sercowy i/lub dystalną embolizacją, z następczą martwicą mięśnia sercowego. Podłożem tego zjawiska u chorego najczęściej jest zaawansowana choroba wieńcowa [1].

Pomimo licznych programów profilaktycznych oraz postępów w dziedzinie kardiologii interwencyjnej, choroby sercowo-naczyniowe (CVDs; Cardiovascular Diseases) nadal są główną przyczyną śmierci na całym świecie. W 2019 roku z powodu tych chorób zmarło 17,9 mln ludzi, co stanowi 32% wszystkich zgonów na świecie. 85% tych zgonów było spowodowanych zawałem serca i udarem mózgu [1]. Choroba niedokrwienności serca była przyczyną największej liczby utraconych lat na świecie w 2019 roku. Ilość utraconych lat życia wynosiła wtedy 176,6 mln [2].

Jak pokazano na rycinie 1, chorobą przyczyniającą się do największej ilości zgonów spośród wszystkich chorób układu sercowo-naczyniowego jest choroba niedokrwienności serca, stanowiąca aż 49% wszystkich przyczyn zgonów [3]. Ponad 98% przypadków choroby niedokrwiennej serca jest spowodowanych miażdżycą [4].





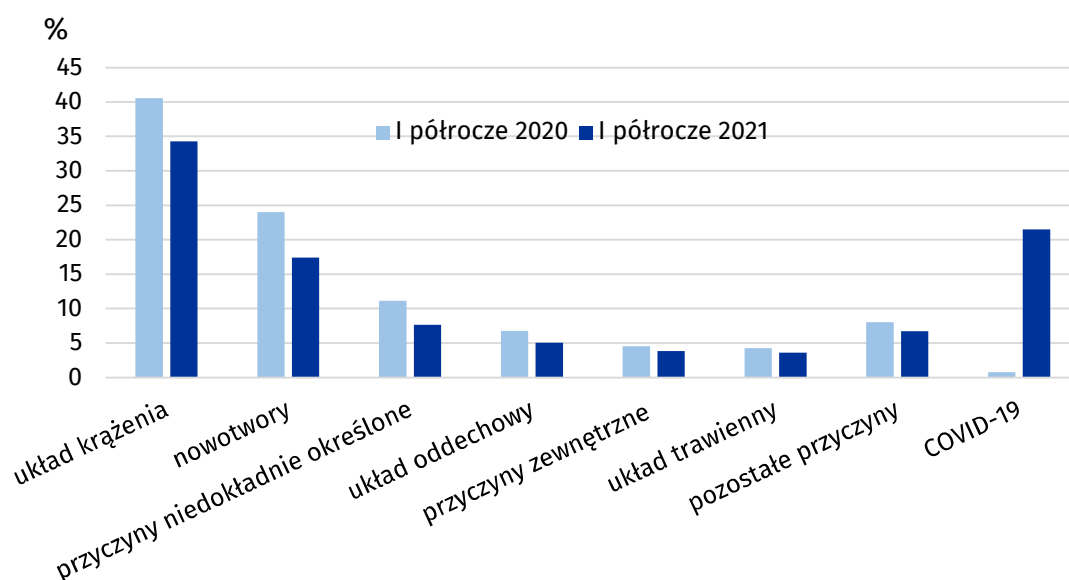
Ryc. 1 Proporcje przyczyn zgonów z powodu chorób układu sercowo-naczyniowego na świecie w 2019 roku [3]

Również w Europie CVDs stanowią najważniejszą przyczynę zgonów, głównie związanych z zawałami serca i udarami mózgu. W 2016 roku zarejestrowano 1,68 mln zgonów z powodu chorób układu sercowo-naczyniowego, co stanowi 37,1% wszystkich zgonów w Europie. Dla porównania, ilość zgonów z powodu nowotworów złośliwych stanowiła w 2016 roku 25,8%. Najwyższy odsetek śmiertelności wśród krajów Europy z powodu CVDs, odnotowuje się w Krajach Nadbałtyckich (50-60%) i w Bułgarii (65,8%). W ostatnich latach zaobserwowano spadek ilości śmierci spowodowanych chorobami układu krążenia w kilku krajach członkowskich, prawdopodobnie poprzez wprowadzenie badań przesiewowych, nowych technik chirurgicznych oraz form leczenia, a także poprzez zmianę stylu życia [5].

Przeżytkowa angioplastyka wieńcowa (PTCA; Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty) była w latach 2014-2019 w Europie jedną z najczęstszych interwencji u pacjentów leczonych z powodu chorób układu krążenia. PTCA jest niechirurgicznym zabiegiem stosowanym w leczeniu zwężenia tętnic wieńcowych. Polega on na przeżytkowym wprowadzeniu cewnika angioplastycznego w miejsce zwężonego naczynia wieńcowego, następnie poprzez inflację balonu następuje poszerzenie zwężenia i w konsekwencji przywrócenie przepływu krwi [5].

W stanach Zjednoczonych jako główną przyczynę śmierci wymienia się chorobę niedokrwienną serca, która w 1990 i 2019 roku spowodowała utratę 8,6 mln lat życia i 550 000 zgonów w 2019 roku [2].

Jak pokazuje niniejszy wykres (ryc. 2), główną przyczyną zgonów w Polsce w I półroczu 2020 oraz 2021 pozostają pomimo pandemii COVID-19 choroby układu krążenia [6].



Ryc. 2 Procentowa liczba zgonów według przyczyn w Polsce [6]

Światowa Organizacja Zdrowia wspiera rządy państw członkowskich w zapobieganiu, zarządzaniu i monitorowaniu chorób układu sercowo-naczyniowego poprzez rozwój globalnych strategii mających na celu zmniejszenie częstotliwości zachorowalności oraz śmiertelności z powodu tych chorób [1].

W 2013 roku Państwa Członkowskie WHO przyjęły „Globalny plan działania na rzecz zapobiegania i kontroli chorób niezakaźnych na lata 2013-2020”. Plan zwraca szczególną uwagę nie tylko na działania prewencyjne, lecz również na potrzebę rozwoju technologii i wyrobów medycznych do leczenia chorób układu sercowo-naczyniowego [1].

Odpowiedzią na apel WHO jest Program Profilaktyki i Leczenia Chorób Układu Sercowo-Naczyniowego POLKARD na lata 2017-2021. Program obejmuje działania prewencyjne, poprawę wyposażenia w sprzęt leczniczy, poprawę efektywności leczenia udarów mózgu, ocenę jakości i skuteczności leczenia chorób układu krążenia [7].

---

W ostatnich latach możemy zaobserwować znaczny postęp w leczeniu kardiologicznym, zwłaszcza w dziedzinie kardiologii interwencyjnej. Na uwagę zasługuje między innymi wprowadzenie stentów uwalniających leki. Obecnie w stabilnej chorobie wieńcowej rewaskularyzacja za pomocą przezskórnych interwencji wieńcowych PCI (Percutaneous Coronary Intervention) (lub pomostowania aortalno-wieńcowego CABG, Coronary Artery Bypass Grafting) stanowi skuteczne leczenie niedokrwienia i jego niekorzystnych manifestacji klinicznych. Ponadto celem tych zabiegów jest zmniejszenie ryzyka dużych zdarzeń sercowo - naczyniowych, włącznie z zawałem serca i zgonem z tych przyczyn. Wcześniejsze metaanalizy nie wykazywały korzyści ze stosowania PCI w stabilnej chorobie wieńcowej w zakresie różnic w przeżyciu i częstości zawałów serca [8] [9]. Bardziej aktualna metaanaliza [10] wykazała zmniejszenie częstości zgonów i zawału serca wśród pacjentów z chorobą wieńcową poddanych rewaskularyzacji w porównaniu z pacjentami leczonymi wyłącznie farmakologicznie, jeśli rewaskularyzację wykonywano za pomocą CABG lub stentów uwalniających lek (DES) nowej generacji, a nie wyłącznie angioplastyki balonowej, niepokrytych stentów metalowych lub DES wczesnej generacji [11].

Technologie wytwarzania stentów ewaluowały stopniowo pod względem mechanizmów uwalniania leków, rodzaju zastosowanych leków oraz materiałów, prowadząc stopniowo do dalszej redukcji powikłań takich jak restenoza oraz późna zakrzepica.

Najczęstszym powikłaniem sercowym po zabiegach przezskórnej angioplastyki wieńcowej jest nagłe zamknięcie naczynia w czasie zabiegu lub wkrótce po nim. Dochodzi do niego zazwyczaj wskutek rozwarstwienia ściany poszerzanej tętnicy, zakrzepicy w stencie lub wystąpienia tzw. zjawiska no flow [12].

Podwójna terapia przeciwplateletowa (DAPT- Dual Antiplatelet Therapy) jest obecnie standardem w leczeniu pacjentów po przezskórnej interwencji wieńcowej z implantacją stentu. Czas trwania podwójnej terapii przeciwplateletowej oraz korzyści z jej zastosowania różnią się w zależności od rodzaju zastosowanego stentu. Wytyczne dotyczące czasu trwania DAPT są również różne dla pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową oraz ostrym zespołem wieńcowym oraz pacjentów po przebytych operacjach kardiologicznych, pacjentów z chorobami towarzyszącymi oraz zaplanowanymi operacjami niekardiologicznymi. Szczególną grupę pacjentów stanowią pacjenci z powikłaniami krwotocznymi, u których należy rozważyć dawkowanie i czas trwania DAPT, w tym również natychmiastowe zaprzestanie DAPT [13].

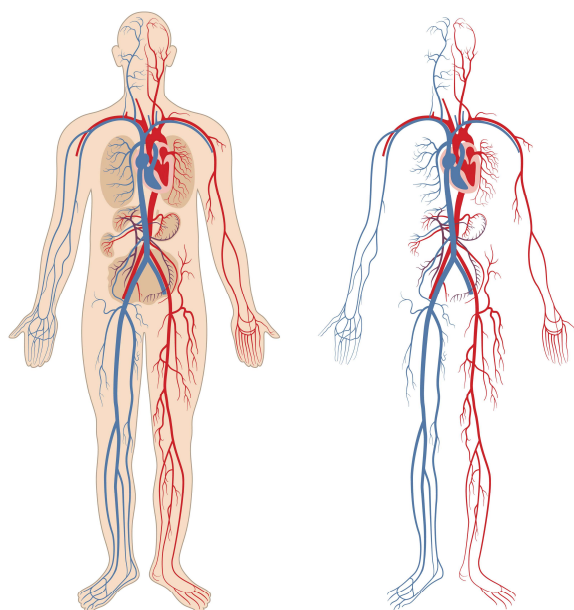
---

Pomimo znacznych postępów w kardiologii interwencyjnej, choroby układu sercowo-naczyniowego nadal zajmują czołowe miejsce w statystyce chorób i zgonów na całym świecie. Istnienie tych problemów wskazuje na konieczność doskonalenia obecnych rozwiązań z zakresu kardiologii interwencyjnej również pod kątem zmniejszenia ryzyka powikłań po zabiegach ze szczególnym uwzględnieniem pacjentów z różnych grup ryzyka.

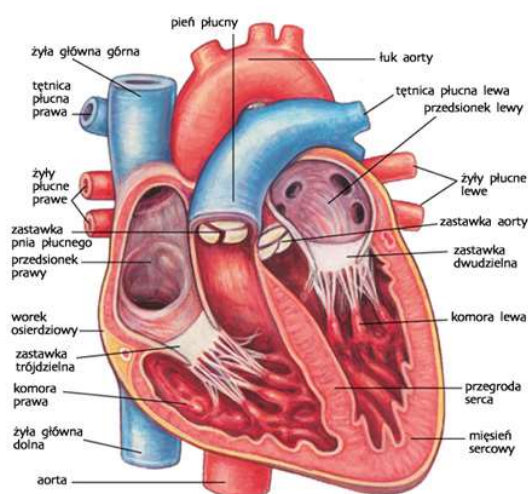
## **2.2. Choroby układu sercowo-naczyniowego- etiologia i sposoby leczenia**

Podstawowym zadaniem układu sercowo- naczyniowego człowieka jest zaopatrywanie organizmu w tlen i substancje odżywcze oraz termoregulacja i transport hormonów i enzymów. Układ sercowo naczyniowy składa się z serca i naczyń krwionośnych (tętnic, żył i naczyń włosowatych). Tętnice to naczynia, w których utlenowana i bogata w składniki krew jest transportowana do narządów i tkanek dzięki pompującej pracy serca. W stanie fizjologicznym tętnice utrzymują wytworzone w sercu ciśnienie krwi na stabilnym poziomie. Tętnice transportują z reguły krew utlenowaną, tylko w tętnicach krążenia płucnego znajduje się krew odtlenowana. Żyły odprowadzają krew z tkanek narządów do serca, a naczynia włosowate rozprawdają krew do tkanek. Układ krążenia składa się z obwodu dużego i małego- tzw. płucnego. W dużym układzie krążenia krew utlenowana wypływa z lewej komory serca do tętnic, a następnie przechodząc przez sieć naczyń włosowatych wraca pozbawiona tlenu do prawego przedsionka serca. W małym układzie krążenia krew ulega natlenowaniu i powraca do lewego przedsionka serca. Praca serca umożliwia utrzymanie stałego gradientu ciśnieniowego [14]. Schemat układu krwionośnego przedstawiono na rycinie 2.

Serce składa się z dwóch przedsionków i dwóch komór. Przedsionek prawy zbiera krew z całego organizmu poza płucami. Z przedsionka prawego przez zastawkę trójdzielną krew przepływa do komory prawej, a stąd przez pień płucny do płuc. Przedsionek lewy zbiera krew z płuc za pomocą czterech żył. Z przedsionka lewego przez zastawkę dwudzielną krew przepływa do komory lewej a stąd do aorty. Aorta zaopatruje cały organizm w krew natlenowaną [10]. Budowę serca przedstawiono na rycinie 3.



Ryc. 2 Układ krwionośny człowieka [15]



Ryc. 3 Budowa serca [16]

Fizjologiczna praca serca zapewnia prawidłowy wyrzut krwi do układu naczyniowego dostosowany do aktualnych potrzeb organizmu, zarówno w spoczynku jak i w czasie obciążenia wysiłkiem. Niewydolność serca to zespół objawów hemodynamicznych i klinicznych wywołanych nieskuteczną pracą serca jako pompy tłoczącej krew. Niewydolność serca może być następstwem różnych chorób układu sercowo-naczyniowego. Choroba ta może wywoływać groźne dla życia zaburzenia rytmu serca prowadzące do nagłego zgonu sercowego w 50% przypadkach [14].

---

Leczenie niewydolności serca obejmuje leczenie prewencyjne i przyczynowe, farmakoterapię, leczenie chirurgiczne, urządzenia wspomagające prace serca, elektroterapię, przeszczep serca oraz rehabilitację [14]. W przypadku ostrej niewydolności serca, przy braku postępów leczenia należy rozważyć metody takie jak mechaniczne wspomaganie krążenia, respiratoterapię lub doraźne leczenie nerkozastępcze. W ostatnich latach opracowano wiele urządzeń do mechanicznego wspomagania serca jak: aparaty do kontra pulsacji wewnątrzortalnej, pompy zewnętrzne, niekiedy uzupełniane zewnętrznymi oksygenatorami (np. ECMO; Extra Corporeal Membrane Oxygenator) oraz implantowalne sztuczne komory – ryc. 4 [17].



Ryc. 4 Proteza serca opracowana przez Fundację Rozwoju Kardiologii w Zabrze [18]

Kolejną grupą schorzeń układu sercowo-naczyniowego są wady zastawkowe serca. Spośród przyczyn wad zastawkowych serca wymienić należy: infekcyjne lub reumatyczne zapalenie wsierdza, gorączkę reumatyczną, zmiany zwyrodnieniowe zastawki, zmiany o charakterze wtórnym wynikające np. z nierównowagi sił zamykających i otwierających działających na zastawkę, przeciążenie ciśnieniowe lub objętościowe [19].

Najczęstsze wady zastawkowe to [17]:

- Niedomykalność aortalna- spowodowana dysfunkcją zastawki aortalnej, w następstwie której krew w rozkurczu cofa się z aorty do lewej komory
- Stenoza mitralna- zmniejszenie pola powierzchni zastawki poniżej  $2,5 \text{ cm}^2$
- Niedomykalność mitralna- nieszczelność lewego ujścia przedsionkowo-komorowego, polegająca na zwrotnym przepływie krwi z lewej komory do lewego przedsionka podczas kurczu lewej komory
- Wypadanie płatków zastawki mitralnej- uwypuklenie się w czasie skurczu komory jednego lub obu płatków zastawki w kierunku lewego przedsionka

- 
- Zwężenie zastawki trójdzielnej (stenoza trójdzielna) - zastawkowa wada serca ograniczająca przepływ krwi przez zastawkę, co powoduje nieprawidłowe napełnianie prawej komory

Leczenie wad zastawkowych obejmuje głównie [17] [20]:

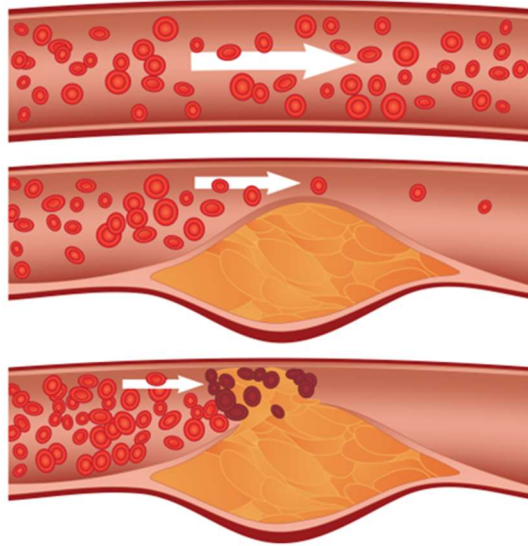
- Leczenie farmakologiczne
- Walwuloplastykę, czyli poszerzanie zastawkowych ujść tętniczych lub żylnych za pomocą różnej konstrukcji cewników z balonem
- Leczenie chirurgiczne polegające głównie na plastyce zastawki lub wymianie na protezę mechaniczną lub biologiczną
- Zabiegi przezskórnej naprawy niedomykalności zastawki mitralnej za pomocą systemów przezskórnych (MitraClip -Abott, Watchman – Boston). Zabieg wykonywany za pomocą specjalnego systemu wprowadzającego złożonego z cewnika oraz systemu wprowadzania implantu
- Zabiegi anuloplastyki mitralnej z wszczepieniem sztucznego pierścienia

Najpoważniejszym problemem społecznym jest choroba niedokrwienna serca stanowiąca najczęstszą przyczynę zachorowalności i zgonów [17]. Najczęstszą przyczyną niedokrwienia mięśnia sercowego jest miażdżycy, która prowadzi do zwężenia lub całkowitego zamknięcia światła tętnic wieńcowych. Niedokrwienie może być spowodowane również wadą aortalną, zwężeniem miejsca odejścia tętnic wieńcowych, zatorami tętnic wieńcowych, ich stanem zapalnym, nieprawidłowym odejściem tętnic wieńcowych od tętnicy płucnej, a także spazmem naczyń wieńcowych [14].

Podstawową zmianą patomorfologiczną w miażdżycy są blaszki miażdżycowe w błonie wewnętrznej tętnic [14]. W początkowej fazie choroby dochodzi do akumulacji lipidów, co może ujawnić się pogrubieniem ściany błony wewnętrznej tętnic. Komórki mięśni gładkich wędrują i proliferują w błonie wewnętrznej, co powoduje gromadzenie lipidów i wytworzenie tzw. nacieków tłuszczowych. Nacieczenia tłuszczowe przekształcają się w blaszki włókniste składające się głównie z tkanki łącznej, mięśni gładkich oraz tłuszczów. Zmiany te mogą być jeszcze niewidoczne w badaniu angiograficznym. Zjawisko to można wytłumaczyć zdolnością tętnicy do remodelingu poprzez uwypuklenie bez zmiany wielkości światła tętnicy. W następnej fazie dochodzi do uwypuklenia blaszek miażdżycowych do wnętrza tętnicy, co powoduje jej stopniowe zwężenie. Zwężenie przekraczające 60% średnicy wewnętrznej tętnicy wieńcowej jest nazywane zwężeniem krytycznym, które prowadzi do niedokrwienia i wystąpienia objawów duszniczo-bolesnej. Blaszką

---

miażdżycowa może podlegać erozji lub może dochodzić do jej pęknięcia. Procesy te inicjują powstawanie skrzepliny, która powiększa się powodując jej zwięzanie lub całkowite zamknięcie. Mechanizm ten może powodować ostre epizody wieńcowe jak dławica niestabilna lub zawał serca [14]. Etapy tworzenia blaszki miażdżycowej zostały przedstawione na rycinie 5.



Ryc. 5 Etapy tworzenia blaszki miażdżycowej z tworzeniem skrzepliny [15]

Przebieg choroby niedokrwiennej zależy w dużej mierze od kształtu blaszki miażdżycowej. Blaszki zawierające dużo kolagenu nazywane są blaszkami włóknistymi stabilnymi. Blaszki z dużą zawartością lipidów, makrofagów i limfocytów typu T są miękkie i łatwiej pękają, często są przyczyną ostrych zespołów wieńcowych. Głównymi czynnikami powstawania miażdżycy są zaburzenia metabolizmu lipidów, dysfunkcja śródbłonna, czynniki zapalne i immunologiczne, pęknięcie blaszki miażdżycowej i palenie papierosów [14].

Leczenie obejmuje [14]:

- Rozpoznanie i leczenie chorób towarzyszących
- Zwalczanie czynników ryzyka choroby niedokrwiennej serca
- Zmianę stylu życia
- Leczenie farmakologiczne
- Rewaskularyzację za pomocą angioplastyki wieńcowej oraz pomostowania aortalno-wieńcowego



---

Pomimo rozwoju nowoczesnych metod diagnozowania i leczenia chorób sercowo-naczyniowych, choroby te są nadal jedną z najczęstszych przyczyn zgonów w Polsce i na całym świecie. Leczenie tych chorób jest zazwyczaj wielopłaszczyznowe i obejmuje zarówno leczenie farmakologiczne, jak i zabiegi małoinwazyjne i chirurgiczne. Często konieczne jest wszczepienie implantów wspomagających pracę serca i układu krążenia.

## **2.3. Charakterystyka implantów stosowanych w układzie krążenia**

Implanty wprowadzane są do organizmu w obręb tkanek w celu zastąpienia, zespolenia, przyjęcia ich funkcji, wywołania procesu regeneracji lub innych procesów mających na celu ratowanie zdrowia, życia lub poprawę jego komfortu [21]. Biomateriały wykorzystywane na implanty muszą spełniać rygorystyczne wymagania norm dotyczących oceny biologicznej wyrobów medycznych. Układ krwionośny to serce i naczynia krwionośne, w którym krew jest w ciągłym ruchu. Z tego powodu materiały wykorzystywane w układzie krążenia powinny być atrombogeniczne i hydrofobowe. Najczęściej stosowanymi implantami w układzie sercowo-naczyniowym są stenty. Stentowanie polega na wprowadzeniu do niedrożnego lub zwężonego odcinka tętnicy metalowych protez wewnątrznaczyniowych, stanowiących element podporowy zapobiegający zapadaniu się światła naczynia po angioplastyce balonowej. Wskazaniem do stentowania są istotne zwężenia naczyń lub rozwarstwienie ściany w czasie zabiegu. Stentowanie zakłada się także po udrożnieniu długich odcinków tętnic oraz w leczeniu restenoz odległych po pierwotnym zabiegu [17].

Stenty zostały po raz pierwszy wprowadzone do kardiologii inwazyjnej w latach 80 XX wieku. Pierwotnie były przeznaczone do leczenia rozwarstwienia tętnicy wieńcowej poddanej plastyce balonowej. Badania wykazały również ich przydatność w zmniejszeniu częstotliwości restenozy, czyli nawrotu zwężenia tętnicy [22]. Obecnie zaleca się stosowanie stentów przy angioplastyce natywnych tętnic wieńcowych oraz żylnych pomostów aortalno-wieńcowych [22].

Stenty dzielimy ze względu na [22]:

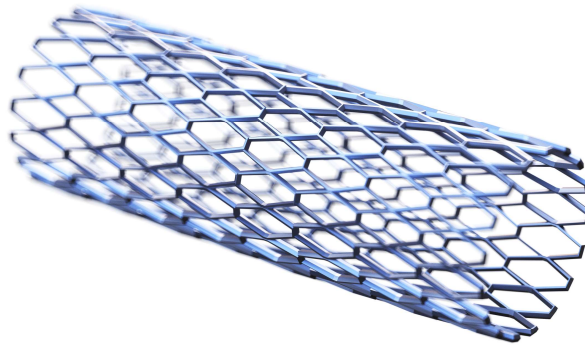
- Materiał, z którego są wykonane- metalowe (BMS) i niemetalowe- przegląd materiałów stosowanych na stenty przedstawiono w tabeli 1

Tabela 1

## Przegląd materiałów stosowanych na stenty [23]

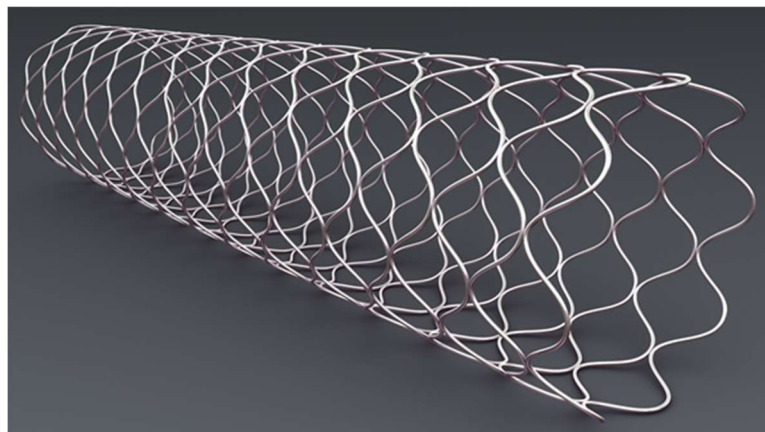
Materiał na stenty	Stenty rozprężane na balonie (BE)	Stal nierdzewna 316L	Większość stentów BE
		Tantal	Medtronic- Wiktor; BSC- Stercker; Cordis- CrossFlex
		Martenzytyczny Nitinol	PAS- Act One; Vascular Therapies/US Surgical: Paragon
		Platyna Iryd	Angiodynamics- Angio Stent
		Polimery	Igaki- Tamai Stent, Tamai Medical, Biodegradable PLLA
		Stop niobu	InFlowDynamics: Lunar StarFlex
	Stenty samorozprężalne (SE)	Superelastyczny stop Nickel-Titanium	Większość stentów SE
		Stop na osnowie kobaltu	BSC- Wallstent; Magic Wallstent
		Pełno-twarda stal nierdzewna	Cook Z-Stent

- Sposób wykonania stentu
  - Zwijane (coil- spirala wykonana z jednego drutu)
  - Wycinane laserowo w cylindrycznym materiale (slotted tube) - ryc. 6



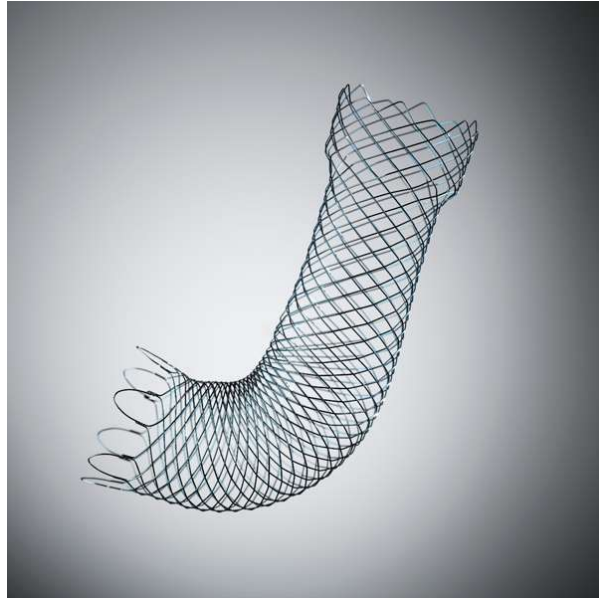
Ryc. 6 Stent typu slotted tube [15]

- Spawane z pojedynczych ogniów w kształcie pierścieni (tzw. modułarne) - ryc. 7



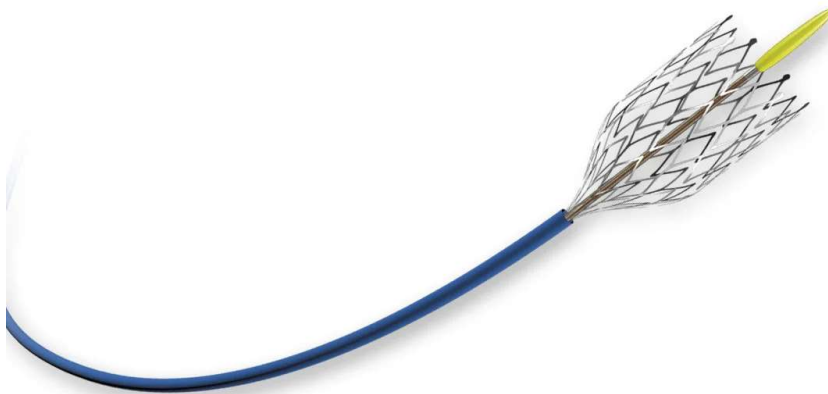
Ryc. 7 Stent pierścieniowy modułarny spawany laserowo [15]

- Stenty siateczkowe (mesh stents) - ryc. 8

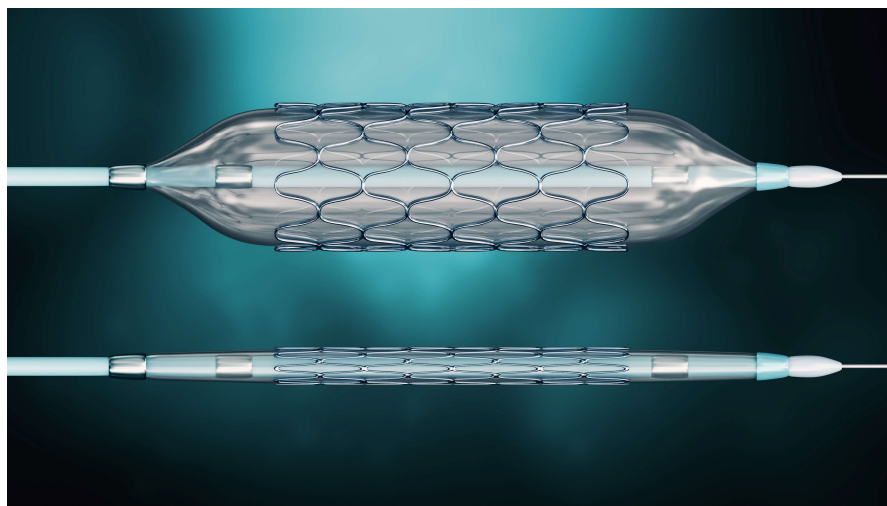


Ryc. 8 Stent siateczkowy firmy Boston Scientific [24]

- Sposób implantacji -rozprężane balonem i samorozprężalne- ryc. 9,10



Ryc. 9 Stent samorozprężalny Mer firmy Balton Sp. z o.o. [25]



Ryc. 10 Stent rozprężany na balonie [15]

- Pokrycia lekami modyfikujące sposób gojenia stentu i hamujące nawrót zwężenia
  - Stenty niepokrywane (klasyczne- BMS- bare metal stent)
  - Stenty pokrywane lekami (DES- drug eluting stents)

Stenty wieńcowe uwalniające leki zostały wprowadzone w celu zmniejszenia restenozy w stencie, która jest związana z proliferacją i migracją komórek mięśni gładkich naczyń. Stenty uwalniające leki pokryte są zazwyczaj polimerem, który uwalnia stopniowo lek hamujący przerost neointymy. Wadą stentów DES drugiej generacji jest zwiększone prawdopodobieństwo późnego wykrzepiania w porównaniu ze stentami BMS [22].

Stenty biodegradowalne ulegają rozpuszczeniu w naczyniu krwionośnym po upływie kilkunastu miesięcy od zabiegu. Po wchłonięciu stentu ściana naczynia się regeneruje [22]. Pierwszym stentem bioresorbowalnym implantowanym u ludzi był stent Igaki-Tamai (Kyoto Medical, Japonia) wykonany z kwasu poli-L-mlekowego (PLLA- Poly-L-lactic acid), którego średni czas degradacji wynosił 18–24 miesięcy. Pierwszym bioabsorbowalnym stentem uwalniającym substancje antymiotyczną był BVS (Bioabsorbable Vascular Solutions) zbudowany z PLLA jako matrycy z poli-D, L-laktydem (PDLLA- Poly (D, L-lactide)) wysyconym ewerolimusem [22].

Materiałem do budowy biodegradowalnych stentów metalowych okazał się magnez, będący naturalnym mikroelementem. Przykładem stentu metalowego wykonanego ze stopu magnezu jest resorbowalny stent magnezowy Magmaris firmy Biotronik (RMS) [26], przedstawiony na rycinie 11.



Ryc. 11 Stent magnezowy Magmaris [26]

Po 12 miesiącach po implantacji badania wykazały prawie całkowitą resorpcję magnezu [26].

Istotnym postępowaniem w rozwoju stentów są stenty DES trzeciej generacji. Stenty te posiadają cienką rozpórkę metalową (zazwyczaj stop kobalt-chrom, platyna-chrom) pokrytą bioabsorbowalnym polimerem [27]. Ewolucja stentów została przedstawiona na schemacie 1.



Schemat 1- Ewolucja stentów [28]

Stenty DES pierwszej generacji wykazały wyższą skuteczność nad stentami metalowymi i stały się stentami z wyboru do rewaskularyzacji [28].

---

W porównaniu ze stentami BMS, stenty uwalniające lek pierwszej generacji znacznie zmniejszyły ryzyko restenozy w ciągu pierwszego roku po implantacji. Jednak ta korzyść została osiągnięta kosztem częstszych późnych zdarzeń niepożądanych, w tym rewaskularyzacji docelowej zmiany (TLR- target lesion revascularization) i bardzo późnej zakrzepicy w stencie (ST- stent thrombosis) w ciągu 5 lat obserwacji [29] [30] [31].

Powikłania stentów pierwszej generacji, takie jak zakrzepica w stencie i późna restenoza, doprowadziły do opracowania stentów DES drugiej generacji, które wykazały przewagę nad DES pierwszej generacji [32].

Chociaż DES trzeciej generacji wprowadzono z bioresorbowalnymi polimerami, nie poprawiły one wyników klinicznych w porównaniu z DES drugiej generacji. W badaniu CENTURY II biodegradowalny stent uwalniający sirolimus trzeciej generacji (Ultimaster) wykazywał wskaźniki zakrzepicy w stencie takie same jak wskaźniki trwałego polimerowego stentu uwalniającego ewerolimus (Xience) 9 miesięcy po założeniu (0,9%). Wskaźniki rewaskularyzacji zmian docelowych były również mniej więcej takie same dla obu stentów (odpowiednio 4,5% vs 4,2%) [33].

Ogólnie rzecz biorąc, wyniki DES drugiej generacji są dobre, z niską częstością zdarzeń, co stanowi wyzwanie dla zdolności do wykazania dalszej poprawy lub wyższości DES trzeciej generacji. Niemniej jednak trwają wysiłki, aby nadal ulepszać obecne stenty za pomocą cieńszych rozpórek i bardziej biokompatybilnego polimeru, polimeru biodegradowalnego lub stentów bez polimerów [28].

Opracowanie nowej generacji stentów uwalniających lek (DES) miało ogromny wpływ na liczbę stentów stosowanych do przezskórnej angioplastyki wieńcowej w leczeniu choroby wieńcowej (CAD; Cardiovascular Artery Disease). Jednak nawet DES drugiej i trzeciej generacji są niewystarczające w porównaniu z pomostowaniem aortalno-wieńcowym (CABG) pod względem konieczności powtórnej rewaskularyzacji [28].

Właściwości fizyczne i chemiczne stentów są różne w zależności od doboru materiału do produkcji stentów. Odporność na korozję, zużycie mechaniczne, zachowanie i cechy przyczepności powierzchni są ważnymi parametrami dla wskaźnika sukcesu stentów. Podczas procesu korozji i zużycia mechanicznego, właściwości mechaniczne i chemiczne materiału stentu osłabiają się z czasem, co prowadzi do powstawania zanieczyszczeń i uwalniania jonów alergennych lub toksycznych, takich jak nikiel (Ni), kobalt (Co), chrom (Cr), Aluminium (Al) lub Wanad (V). Ten proces może spowodować poluzowanie i uszkodzenie stentu. Procesy restenozy w stencie zachodzą w wyniku przylegania cząstek

---

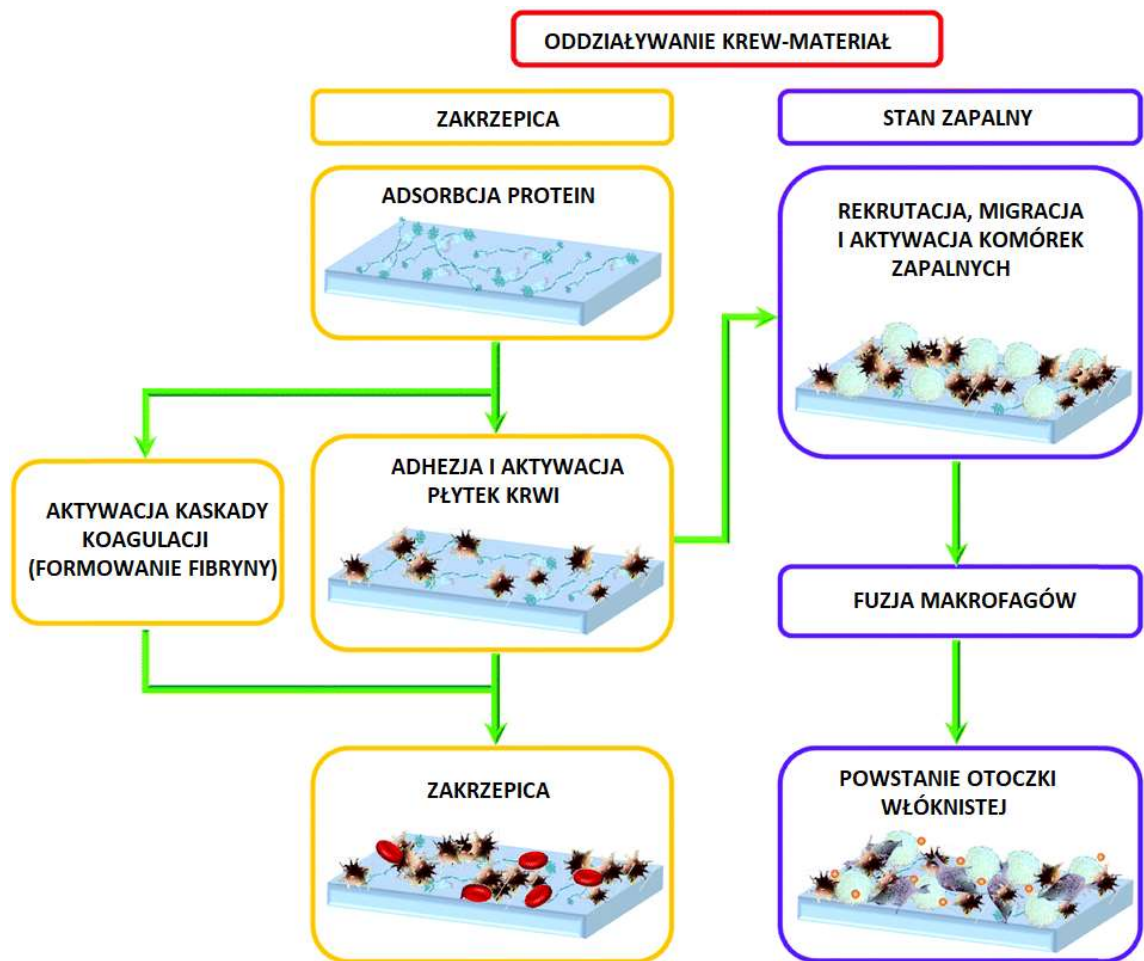
adipocytów, włóknienia lub przylegania komórek mięśni gładkich na powierzchni stentu. Opisane w literaturze problemy restenozy obejmują wszystkie rodzaje konstrukcji stentu wykazujące podobne uszkodzenia [35]. Trwałe stenty naczyniowe mogą z czasem przyczynić się do powikłań z powodu interakcji płynów ustrojowych z materiałem stentu. Niedostateczna lub nadmierna ekspansja, pęknięcie, nieprawidłowe położenie i niejednorodna struktura stentów może prowadzić do uszkodzeń powierzchni naczyń, które zwiększają krzepnięcie i reakcje zapalne powodujące proliferację komórek mięśniowych i tworzenie macierzy zewnątrzkomórkowej w uszkodzonym regionie. Proces ten nazywa się rozrostem neointymy, ponieważ procesy te powodują proliferację komórek i tkanek. Awaria techniczna stentu dotycząca procedury implantacji lub cechy materiału prowadzi do ponownej okluzji w naczyniu w ciągu tygodni lub miesięcy [35].

Proces wgajania implantu zależy głównie od miejsca implantacji oraz struktury i właściwości fizykochemicznych materiału, z którego jest wykonany.

Implanty dziane, gąbczaste i porowate wgajają się przez przerastanie tkanką łączną, niezależnie od tego czy są nieresorbowalne czy resorbowalne. Implanty lite wgajają się przez całkowite lub częściowe otorbienie tkanką łączną. W bezpośrednim sąsiedztwie implantu mogą znajdować się komórki żerne. Ich ilość jest uzależniona od działania drażniącego wszczepu i obecności drobin wszczepionego materiału. Im bardziej implant jest obojętny pod względem fizykochemicznym, tym relacja miejscowa organizmu jest mniejsza, a procesy zapalne mniej nasilone. Faza wysiękowa jest krótka i mało nasilona, przechodzi szybko w fazę proliferacyjną, prowadząc do wytworzenia włóknistej torebki łącznotkankowej [36].

W przypadku implantów kontaktujących się z krwią, istotną rolę odgrywa również adsorpcja protein, która może doprowadzić do aktywacji procesów prowadzących do powstawania zakrzepów oraz inicjacji stanu zapalnego. Schemat oddziaływania krwi z materiałem implantu przedstawia rycina 12.





Ryc. 12 Schemat oddziaływania krwi z materiałem implantu [37]

Zastosowanie stentów zrewolucjonizowało zabiegi angioplastyki naczyń wieńcowych. Technologie produkcji stentów są nadal ulepszone. Podstawową wadą stentów pozostaje nadal brak optymalnej równowagi pomiędzy restenozą w stencie a późną zakrzepicą. Podczas gdy stenty BMS lepiej zapobiegają zakrzepicy, stenty DES zapobiegają restenozie. Dlatego też obecnie trwają nieustanne próby modyfikacji powierzchni implantów poprzez naniesienie powłok hemokompatybilnych poprawiających właściwości fizykochemiczne materiału stentu [28].

---

## 2.4. Problematyka modyfikacji powierzchni implantów sercowo-naczyniowych

Implanty wprowadzone do organizmu ludzkiego traktowane są zawsze jak ciało obce i mogą wywoływać szereg zarówno miejscowych jak i ogólnoustrojowych reakcji organizmu. W zależności od miejsca implantacji oraz tkanki, z którą implant ma kontakt, wymagania dotyczące implantów mogą się różnić, zasadniczo jednak wobec wszystkich implantów wymagana jest wysoka biozgodność oraz możliwość długotrwałego spełniania swoich funkcji, co pozwala na stworzenie warunków w sposób optymalny dostosowanych do naturalnych procesów zachodzących w organizmie [36].

Biomateriały stanowią grupę materiałów o różnym składzie, budowie i właściwościach, których wspólną cechą jest ich akceptowalność przez organizm ludzki. Niektóre z nich łączą się trwale z żywą tkanką lub biorą udział w jej regeneracji [36].

Wyróżniamy następujące grupy biomateriałów: metalowe, ceramiczne, polimerowe, węglowe, kompozytowe [38].

Ze względu na zachowania materiałów wyróżniamy [36]:

- Materiały obojętne- niewywołujące żadnej lub prawie żadnej reakcji organizmu jak np. niektóre metale i ceramika
- Materiały aktywne- wiążące się z otaczającą tkanką i przyczyniające się do jej regeneracji
- Materiały ulegające rozkładowi w organizmie ludzkim- po rozpuszczeniu zostają wchłonięte przez organizm ludzki

Jeszcze inny podział implantów opiera się na czasie ich stosowania [36]:

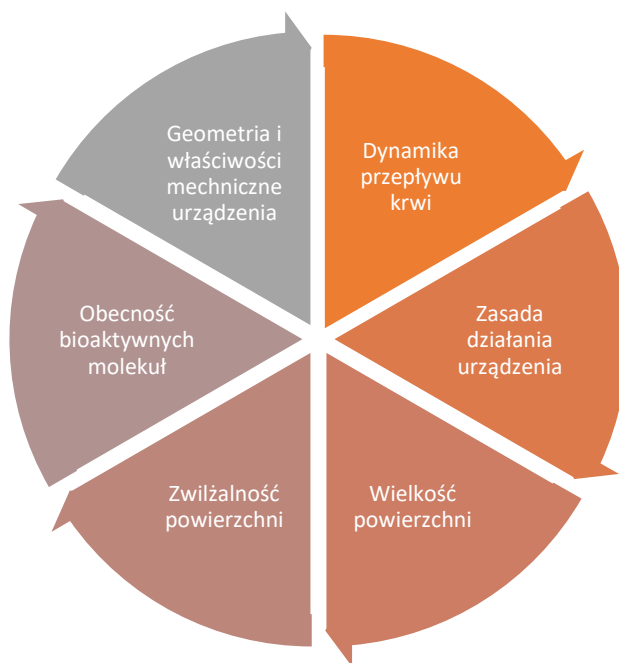
- Krótkotrwałe- przebywające w organizmie do dwóch lat (np. niektóre implanty wykonane ze stali austenitycznych)
- Długotrwałe- czas ich przebywania w środowisku tkankowym może przekroczyć nawet 20 lat

Czas bezpiecznego użytkowania implantów zależy od wielu czynników takich jak [36]:

- Skład chemiczny biomateriałów i ich biozgodność
- Właściwości mechaniczne i trybologiczne
- Właściwości fizyczne

- Odporność korozyjna materiałów
- Powierzchnia biomateriałów

Na biogodność urządzeń w układzie krążenia wpływają również czynniki przedstawione na rycinie 13.



Ryc. 13 Czynniki warunkujące hemokompatybilność urządzeń w układzie sercowo-naczyniowym [35]

Połączenie wszystkich cech biomateriałów w układzie krążenia może okazać się trudne, ponieważ każdy materiał posiada pewne ograniczenia związane z jego specyficznymi właściwościami. Materiały o dobrych właściwościach mechanicznych może cechować niewystarczająca biogodność lub odwrotnie- materiały o wysokiej biogodności mogą mieć właściwości mechaniczne nieodpowiednie do danego zastosowania.

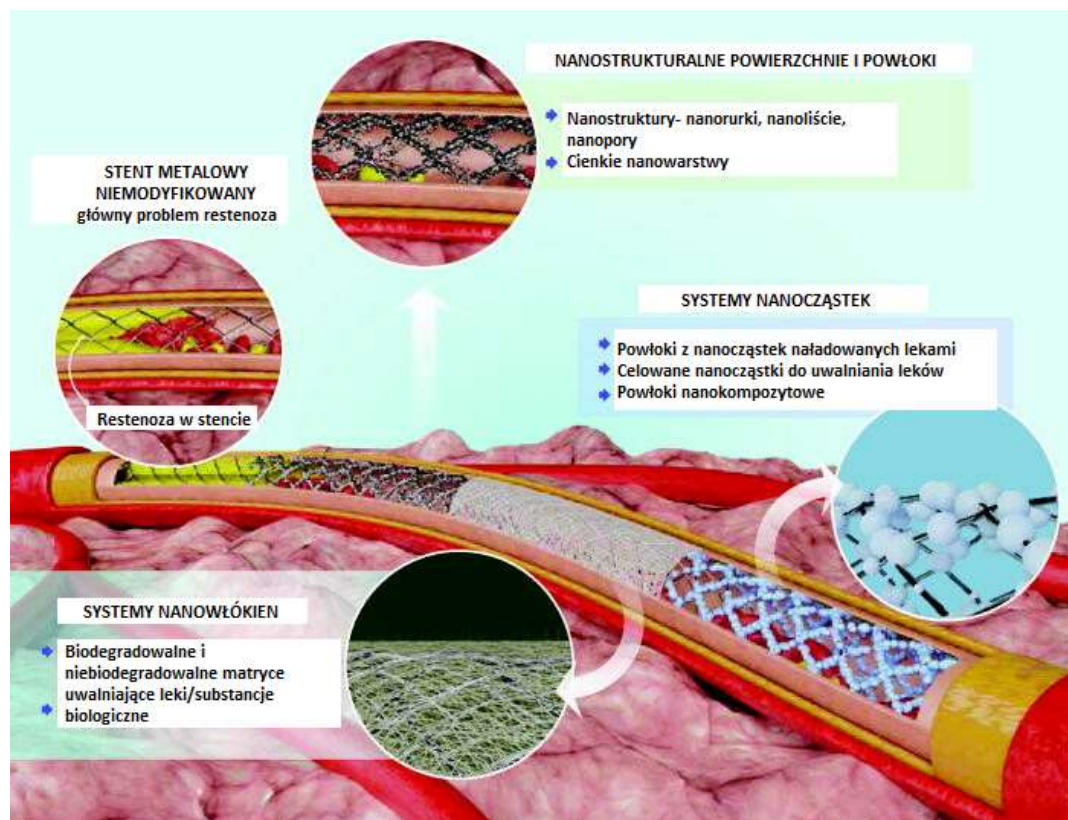
Rozwiązaniem tego problemu są nowoczesne techniki inżynierii powierzchni, ponieważ możliwości poprawy właściwości użytkowych biomateriałów poprzez modyfikacje ich składu chemicznego zostały prawie całkowicie wyczerpane.

Modyfikowane powierzchnie implantów metalicznych powinny być [39]:

- jednorodne
- o odpowiedniej adhezji dającej wysoką odporność na delaminację warstwy
- wytrzymałe i funkcjonalne
- jak najcieńsze, aby nie zmieniały parametrów geometrycznych oraz mechanicznych implantu

- 
- wytrzymałe na sterylizację

W związku z tym strategie modyfikacji powierzchni dotyczących stentów skupiają się wokół nowoczesnych metod zmiany topografii, składu chemicznego powierzchni, chropowatości, zwilżalności oraz stworzenia platform uwalniających leki i substancje biologiczne. Dodatkowo istnieje konieczność zachowania długoterminowego bezpieczeństwa i hemokompatybilności w odniesieniu do zastosowanych materiałów, konstrukcji oraz powierzchni. Obecnie stosowane modyfikacje stentów mają za zadanie zapobieganie korozji i uwalnianiu toksycznych jonów, poprawę biokompatybilności i trwałości oraz interakcji materiału z komórkami. Obecnie dużym zainteresowaniem naukowców cieszy się inżynieria nanopowierzchni z wykorzystaniem materiałów i technologii w nanoskali, co pozwala na otrzymanie korzystnego stosunku powierzchni do objętości, energii powierzchniowej, chropowatości, reaktywności i zwilżalności. W przypadku stentów istotne jest również zachowanie charakterystyki mechanicznej bez istotnych zmian po procesach modyfikacji. Z punktu widzenia inżynierii materiałowej właściwości fizykochemiczne powierzchni biomateriałów (topografia, chropowatość, chemia powierzchni, zwilżalność) mogą znacznie wpływać na odpowiedź komórkową. Podobnie, kształt i rozmiar struktur mogą regulować funkcje komórek poprzez modyfikacje organizacji cytoszkieletu. Nanotopografia może również w sposób krytyczny kontrolować ścieżki sygnalizacyjne na poziomie cząsteczkowym i subkomórkowym, warunkując odpowiedź komórkową i hemokompatybilność stentów, w tym adsorpcję protein, adhezję komórek naczyń krwionośnych oraz proliferację. Ostatnie osiągnięcia dotyczące nano powłok na stenty skupiają się na modyfikacjach bezpolimerowych, powłokach do kontrolowanego uwalniania leków, podejściach opartych na nanotopograficznych stentach bezlekowych oraz powłokach zawierających nanocząstki/nanowłókna uwalniające leki [40]. Różne strategie modyfikacji powierzchni stentów zostały przedstawione na rycinie 14.



Ryc. 14 Różne strategie modyfikacji stentów wewnątrznaczyniowych [40]

## 2.5. Aktualny stan wiedzy dotyczący modyfikacji powierzchni stali nierdzewnej stosowanej na stenty naczyniowe

Dane literaturowe wykazują, że obiecującą strategią stosowaną w walce z restenozą oraz wykrzepianiem krwi jest modyfikacja powierzchni implantu powłokami hemokompatybilnymi. Prowadzone badania mają na celu opracowanie materiału zapobiegającego powstawaniu tym niekorzystnym procesom i jednocześnie bezpiecznego dla ludzkiego organizmu.

Przykładem mogą być badania Navarro [41] dotyczące oceny stentów ze stali 316L z powłoką ze złota (Au) oraz stopu kobalt-chrom Co-Cr z powłokami węglowymi wykonane metodą polaryzacji elektrochemicznej. Stenty ze stali 316L z powłoką Au i C, stenty 316L z niepokrytego metalu i Co-Cr badano za pomocą testów potencjodynamicznych.

---

Stwierdzono, że statystyczny wynik kliniczny stentów koreluje z wzorcami jonów uwalnianych z odpowiadających im substratów metalicznych. We wszystkich przypadkach uwalnianie jonów było konsekwencją procesów korozji wżerowej stali 316L i rozpuszczania się ziaren stopu Co-Cr. Kliniczne niepowodzenia stentów ze stali 316L powlekanych Au i C są związane z ich niezdolnością do hamowania uwalniania jonów z podłoża. Badanie wskazuje, że udoskonalenia materiałów i powierzchni muszą być ukierunkowane na precyzyjne ukształtowanie właściwości fizykochemicznych warstw powierzchniowych w kierunku zahamowania uwalniania toksycznych jonów z powierzchni stentu.

W literaturze wiele miejsca poświęca się procesom modyfikacji powierzchni mającej na celu wytworzenie warstwy pasywnej zapobiegającej korozji i uwalnianiu toksycznych jonów z powierzchni stentów. Proces produkcji stentów naczyniowych ze stopu 316LVM z uwzględnieniem procesów modyfikacji powierzchniowej został szczegółowo opisany w pracy Ravała i in. [42]. Udowodnili oni przydatność procesów obróbki powierzchniowej takiej jak wytrawianie w kwasie, elektropolerowanie, pasywacja w uzyskaniu gładkiej powierzchni stentu typu slotted tube oraz homogenicznej warstwy pasywnej tlenku chromu. Zakres badań ograniczony jedynie do charakterystyki metalograficznej nie potwierdził skuteczności tych procesów w poprawie odporności korozyjnej stentów wykonanych ze stopu 316LVM.

Dalsze badania prowadzone przez Sojitra i in. [43] wykazują poprawę jakości powierzchni oraz odporności na korozję wżerową w badaniach potencjodynamicznych stentów wykonanych z 316LVM po elektropolerowaniu i pasywacji.

Shahryari i in. [44] zbadał w 2010 r. reakcje fibrynogenu, płytek krwi oraz komórek śródbłonna i mięśni gładkich na elektrochemicznie zmodyfikowaną powierzchnię stali nierdzewnej 316L. Badania wykazały znaczną różnicę pomiędzy drugorzędową strukturą fibrynogenu zaabsorbowanego na niezmodyfikowanej powierzchni i powierzchni po procesie potencjodynamicznej cyklicznej pasywacji, która była bliższa strukturze pierwotnej w przypadku powierzchni modyfikowanej. Postulowano, że zjawisko to jest wynikiem mniejszej gęstości płytek krwi zaadsorbowanych na powierzchni. Konkurencyjna interakcja z komórkami śródbłonna oraz komórkami mięśni gładkich z badanymi powierzchniami, wykazała, że gęstość tych komórek jest wyższa na powierzchni modyfikowanej po 2-godzinnej ekspozycji, sugerując szybszą kinetykę początkowej fazy proliferacji. Zaprezentowane wyniki jasno wskazują na wzrost biokompatybilności

---

powierzchni modyfikowanej. Badania nie dają jednak pełnego obrazu hemozgodności powierzchni modyfikowanych skupiając się jedynie na pojedynczych aspektach biokompatybilności. Brak jest również informacji na temat struktury oraz właściwości fizykochemicznych modyfikowanej powierzchni.

W 2020 r. Aliakseyeu i in. [45] przeprowadzili modyfikację powierzchni stentów ze stali 316LVM polegającą na pulsacyjnym polerowaniu elektrolitycznym za pomocą mikrosekundowych pulsów. Wykorzystanie pulsacyjnego prądu pozwoliło uzyskać znaczną poprawę wydajności procesu. Wyniki badań zawierają analizę porównawczą procesu elektropolerowania z wykorzystaniem prądu stałego oraz pulsacyjnego. Wykorzystanie trybu pulsacyjnego pozwoliło na uzyskanie wysokiej jakości powierzchni z wysoką wydajnością, w której intensywność wygładzania mikro chropowatości wzrosła znacznie w porównaniu do tradycyjnej metody. Wysoka jakość powierzchni o chropowatości 0,12-0,14 $\mu\text{m}$  została uzyskana przy niskiej utracie wymiarów (11-14%) z lekkim zaokrągleniem krawędzi. Badania odporności na korozję wżerową wykazały zwiększenie potencjału korozyjnego z 770 do 1370 mV w porównaniu do stanu początkowego. Ze względu na wąski zakres badań, w tym również brak badań biologicznych, nie dają one pełnego obrazu możliwości zastosowania zaproponowanej technologii modyfikacji do produkcji stentów naczyniowych.

W literaturze naukowej brak jest badań potwierdzających wystarczające właściwości barierowe warstw pasywnych powstałych na skutek zabiegów pasywacji chemicznej lub elektrochemicznej w odniesieniu do ich zastosowania na implanty w układzie krążenia. Badania kliniczne potwierdziły uwalnianie toksycznych jonów z implantów wykonanych z metali lub stopów. Również degradacja wszczepionych polimerów powoduje szereg reakcji zapalnych, takich jak restenoza i zwapnienie. Jedną z strategii modyfikacji powierzchni to zastosowanie powłok bioinertnych. Badania wykazują, że pokrycie materiału implantu powłoką, służącą jako bariera, może zmniejszyć częstość powikłań, jeśli interakcja między materiałem a systemem biologicznym jest zmniejszona. Opierając się na tej hipotezie, wiele znaczących badań zostało podjętych przez różne grupy badawcze [46].

Uwagę wielu naukowców przyciągnęły powłoki DLC (Diamond-like Coatings) znane również jako amorficzny węgiel uwodorniony (a-C:H). Jest to klasa materiałów o doskonałych właściwościach mechanicznych, tribologicznych i biologicznych. Dzięki dodaniu innych elementów do DLC wszystkie te właściwości mogą być zmieniane w pewnym zakresie. Badania wykazały, że można wpływać na proporcje różnych białek

---

zaadsorbowanych na powierzchni poprzez dodanie różnych elementów do filmu DLC. Białka te następnie wpływają na przyleganie komórek, proliferację i różnicowanie komórek. Powłoki DLC wykazują dobrą hemokompatybilność, która wyraża się w obniżonym tworzeniu skrzepliny. Po ekspozycji na krew obserwuje się zwiększony stosunek adsorpcji albuminy do adsorpcji fibrynogenu, a także zmniejszoną liczbę płytek krwi na powierzchniach powlekanych. Implanty sercowo-naczyniowe powlekane DLC, takie jak sztuczne zastawki serca i stenty są dostępne w sprzedaży [47].

Pierwszymi komercyjnie dostępnymi stentami z powłoką DLC były stenty BioDiamond wykonane ze stali 316L. Badania wykazały redukcję uwalniania toksycznych jonów do osocza, niską adsorpcję protein, zredukowaną aktywację płytek krwi oraz poprawioną adhezję i wzrost komórek śródbłonka [48]. Zdolność cienkich warstw węglowych do poprawy hemokompatybilności stali nierdzewnej była również prezentowana w dalszych badaniach. Wyniki badań klinicznych były jednak niejednoznaczne. Airoidi i in. [49] porównali stenty pokryte powłoką DLC (Diamond Flex AS, Phytis Medical Devices) z niepokrytymi stentami ze stali nierdzewnej. Badania przeprowadzone na 347 pacjentach nie wykazały znacznej przewagi stentów pokrywanych z niepokrytymi. Podobne wyniki uzyskał Miereles i in. [50] porównując stent Phytis™ pokryty warstwą DLC ze stentami ze stali nierdzewnej (Multi-Link Penta™, Abbott Laboratories, Abbot Park). Badania ponownie potwierdziły brak wyraźnej różnicy w występowaniu restenozy po 6-miesięcznej implantacji.

Metodę RF PACVD do wytworzenia warstwy pasywno-węglowej na stali 316L zaproponował Marciniak [51], uzyskując warstwy o dobrej adhezji oraz odporności korozyjnej w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Wytworzona uszlachetniająca warstwa kompozytowa na powierzchni implantów z odlewniczego stopu kobaltowo-chromowo-molibdenowego odznacza się dobrą adhezją i prawie dwukrotnie większą odpornością na korozję wżerową w odniesieniu do stanu wyjściowego podłoża stopu w środowisku tkanek i płynów ustrojowych. Badania nie dostarczają informacji na temat biokompatybilności wytworzonych warstw.

Istotne znaczenie w procesie osadzania cienkich warstw ma zachowanie pożądanych właściwości podłoża, co pokazują wyniki badań Czerniak i in. [52]. Zbadali oni warstwy diamentowe wytworzone w plazmie wysokiej częstotliwości pod obniżonym ciśnieniem (RF-PCVD) z przeznaczeniem na stenty naczyniowe. Po naniesieniu warstwy zostały przeprowadzone badania właściwości mechanicznych stali 316L. Pozwoliły one sprawdzić,



---

czy zmieniają się właściwości tego materiału i czy może on być po takiej modyfikacji nadal stosowany na stenty. Na podstawie przedstawionych wyników można stwierdzić, że wytworzona warstwa nie spełnia oczekiwań autorów. Zamiast podnosić właściwości mechaniczne powoduje ich osłabienie. Głównym problemem podczas nanoszenia warstwy diamentowej w reaktorze RF PCVD jest wysoka temperatura, która niszczy strukturę cienkich drutów. Podczas procesu nanoszenia warstwy nastąpiło utwardzenie materiału. Spowodowało to obniżenie jego właściwości plastycznych, czego konsekwencją jest spadek wytrzymałość na obciążenia cykliczne. Jest to zjawisko bardzo niekorzystne, ponieważ materiał taki nie nadaje się na stenty.

Metoda zol-żel jest popularną metodą nanoszenia cienkich warstw tlenków zapewniająca dobrą adhezję pomiędzy substratem a powłoką oraz dobre zabezpieczenie przed korozją. Do możliwych wad tego typu metody należą: kontrakcja warstwy podczas jej nanoszenia, pozostałości grup hydroksylowych i/lub węglowych, długi czas przetwarzania, obecność niewielkich porów, możliwa toksyczność spowodowana wykorzystaniem roztworów organicznych [53]. Najczęściej nanoszonymi powłokami tlenkowymi z przeznaczeniem na implanty w układzie krążenia z wykorzystaniem metody zol-żel są:  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Tlenki te osadzone metodą zol-żel na podłoża ze stali nierdzewnej wykazują dobrą ochronę przed korozją [54] [55] [56].

W 2008 r. Grygier [57] dokonał oceny przydatności powłok krzemionkowych nanoszonych metodą zanurzeniową zol-żel z przeznaczeniem na stenty z wykorzystaniem prekursorów tetraethyl ortosilicate oznaczany jako TEOS (Tetraetoksylan) oraz diethoxydimethylsilane oznaczany jako DEMS (Dimetylodietoksylan). Połączone one zostały w różnych stosunkach objętościowych z prekursorem winylowym, vinylotriethoxysilanem oznaczanym jako VTES. Naniesione w ten sposób warstwy wykazały duży stopień niejednorodności oraz działanie cytotoksyczne.

Skuteczność nanoszenia powłok  $\text{SiO}_2$  oraz  $\text{TiO}_2$  metodą zol-żel (dip coating) na stal 316L w celu poprawy odporności korozyjnej wykazali również Lima i in. [58]. Zbadali oni wartości potencjału korozyjnego, rezystancję polaryzacji i szybkość korozji dla próbek pokrytych warstwami  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$  oraz  $\text{SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$ . Badania wykonano w 15% roztworze  $\text{H}_2\text{SO}_4$  w temperaturach 25, 40 i 50°C. Badania wykazały, że wszystkie powłoki chronią metaliczny substrat przed korozją w badanym środowisku.

Przewagę tlenku tytanu nad innymi tlenkami w poprawie adhezji i proliferacji komórek śródbłonna wykazał Chai i in. [59]. Przeprowadzili oni badania powłok  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$ ,

---

SiO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub>, and Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> naniesionych na komercyjnie czysty tytan (cp Ti) oraz stal 316L za pomocą metody zol-żel w celu poprawy endotelializacji. Właściwości fizykochemiczne zmodyfikowanych powierzchni scharakteryzowano za pomocą elipsometrii, mikroskopu sił atomowych oraz metody kropli siedzącej. Wielkość adhezji/prolifracji komórek, morfologię adhezji komórek i ekspresję adhezji białek oceniano na linii komórek ludzkiego śródbłónka naczyń mikrokrążenia płuc. Grubość powłok tlenkowych sięgała 100 nm; znacznie bardziej chropowatą strukturę nanoporowatą stwierdzono w powłokach TiO<sub>2</sub> i Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> niż w przypadku cp-Ti. Powłoka SiO<sub>2</sub> miała najwyższą energię powierzchniową (75,1 mJ/m<sup>2</sup>), w porównaniu do cp-Ti (45,7 mJ/m<sup>2</sup>). Powłoka TiO<sub>2</sub> wykazała znacznie wyższy wskaźnik adhezji komórek śródbłónka. Powłoki TiO<sub>2</sub>, Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> i TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub> wykazywały wyższą proliferację śródbłónka w testach 3-dniowych niż Ti bez powłoki. Powłoki wykazały również dobrą hemokompatybilność. Przeanalizowano aspekty hemokompatybilności, takie jak aktywacja płytek krwi, hemoliza, fibrynoliza, tworzenie fibryny, wytwarzanie trombiny, aktywacja kontaktowa i aktywacja dopełniacza. Testy potwierdziły, że większość powłok tlenkowych nie pogarsza hemokompatybilności. Charakterystyki fizykochemiczne wykazały zróżnicowaną zwilżalność powierzchni i wyraźne różnice topograficzne różnych powłok tlenkowych. Wyniki badań dowodzą, że niektóre powłoki tlenkowe na bazie tytanu mogą znacznie poprawić adhezję i proliferację komórek śródbłónka, szczególnie we wczesnym okresie, co sprzyja szybkiej regeneracji [59].

Wawrzyńska i in [60], zbadali wpływ grubości warstw TiO<sub>2</sub> na trombogenność oraz proliferację komórek śródbłónka. Dwa typy powłok z tlenku tytanu o grubościach 300 nm i 500 nm zostały naniesione na podłoże ze stali nierdzewnej 316L-SLS (spiekanej laserowo) metodą zol-żel wykazując w badaniach in vivo zwiększoną proliferację śródbłónka oraz przedłużony czas rekalcyfikacji osocza w obu próbkach. Odpowiedź komórek mięśni gładkich nie uległa zmianie w porównaniu do próbek niepokrytych. Badania in vitro wykazały mniejszą ilość fibrynogenu na powłokach TiO<sub>2</sub> w porównaniu do próbek niepokrytych. Nie wykonano badań właściwości fizykochemicznych wytworzonych warstw. Badania nie dostarczają informacji na temat właściwości mechanicznych i fizykochemicznych warstw.

Inna grupa badawcza oceniła wpływ grubości warstwy TiO<sub>2</sub> na podłożu ze stali 316L naniesionej metodą zol-żel (dip-coating) na adhezję płytek krwi z użyciem osocza bogato płytkowego. Wraz ze wzrostem grubości warstwy tlenku, liczba przylegających płytek

---

szybko spadała, osiągając minimum około 150 nm. Wskazuje to, że grubość warstwy tlenku tytanu wpływa na adhezję płytek [61].

W 2013 r. Foruzanmehr i in. [62] dokonali oceny hemokompatybilności cienkich warstw  $\text{TiO}_2$  naniesionych metodą zol-żel na elektropolerowaną stal 316L, uzyskując 1-5-krotne nanowarstwy. Morfologia powierzchni i struktura warstw została zbadana za pomocą dyfrakcji promieni X i mikroskopii sił atomowych. Badania dyfraktometryczne wykazały, że pierwotna warstwa wierzchnia jest zbudowana całkowicie z anatazu z rozmiarem krystalitów 12nm. Zbadano aktywację i adhezję płytek krwi oraz czas wykrzepiania. Wyniki wykazały, że stal nierdzewna z nanostrukturalnym  $\text{TiO}_2$  poprawiła hemokompatybilność w odniesieniu do aktywacji płytek krwi i kaskady koagulacji, co obniżyło trombogenność wyrobów kontaktujących się z krwią wykonanych ze stali nierdzewnej. Zwiększenie ilości cienkich warstw wydłużyło czas wykrzepiania. Można wysnuć przypuszczenie, że zwiększenie grubości warstwy powoduje większą adsorpcję protein na powierzchni a w konsekwencji adhezję płytek krwi. Ponadto nadmierne zwiększenie chropowatości może prowadzić do inicjacji adsorpcji protein. Innym ważnym mechanizmem, który może wpływać na adhezję płytek krwi jest ładunek powierzchniowy. Punkt izoelektryczny  $\text{TiO}_2$  wynosi pH 6,2. Kiedy próbki zostają wprowadzone do środowiska krwi o pH 7,4, tlenek tytanu zostaje naładowany ujemnie, dlatego trombocyty z ładunkiem ujemnym nie będą adherowały do powierzchni. Teoria ta powinna wskazywać na takie same wyniki adhezji płytek krwi dla wszystkich pokrywanych próbek. Tymczasem badania wskazują, że wraz ze zwiększeniem grubości warstwy,  $\text{TiO}_2$  stopniowo przyjmuje właściwości półprzewodnika, dlatego istotne jest uzyskanie optymalnej grubości warstwy dla uzyskania gęstości ładunku ujemnego na powierzchni. Badania wykazały najmniejszą adhezję płytek krwi na poczwórnej warstwie  $\text{TiO}_2$ . Badania Foruzanmehra i in. [62] pozwoliły na ustalenie związku ilości, grubości i topografii powierzchni warstw  $\text{TiO}_2$  naniesionych metodą zol-żel z ich właściwościami trombogennymi, co pozwoliło na lepsze zrozumienie zjawisk powierzchniowych na implantach w kontakcie z krwią. Autorzy nie zbadali jednak istotnych właściwości fizykochemicznych oraz biologicznych wytworzonych warstw. Między innymi, nie przeprowadzono badań odporności na korozję oraz właściwości barierowych wytworzonych warstw, co nie pozwala na pełną ocenę przydatności wytworzonych warstw na implanty w układzie krążenia.

Właściwości mechaniczne i fizykochemiczne warstw  $\text{TiO}_2$  nanoszonych na podłoże ze stali 316L metodą zol-żel (dip-coating) zostały zbadane 2007r. przez Krzak-Roś i in. [63].

---

Jako substratów użyto  $\text{Ti}(\text{i-PrO})_4$  (TIPO), propanolu oraz acetyl acetonu (AcAc) jako stabilizatora. Powłoki wygrzewano w temperaturze  $500^\circ\text{C}$  uzyskując strukturę anatazu. Badania wykazały dobrą adhezję warstw do podłoża, ciągłość powierzchni oraz wpływ parametrów podłoża na chropowatość warstw. Ograniczony zakres badań, w tym brak badań odporności korozyjnej oraz oceny biologicznej warstw, nie pozwala na jednoznaczne określenie przydatności powłok na implanty.

W 2013 roku Donesz-Sikorska [64] zbadła warstwy  $\text{SiO}_2$  i  $\text{TiO}_2$  oraz  $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$  nakładane metodą zanurzeniową zol-żel na implanty ze stali 316L. Otrzymane powłoki charakteryzowały się homogenicznością struktury, wysoką adhezją do podłoża oraz stymulującym wpływem na komórki. Dobrą adhezję powłok potwierdzono podczas próby jednoosiowego rozciągania, co może wskazywać na ich swoistą elastyczność. Wyniki testów biologicznych przeprowadzonych w warunkach *in vitro* oraz mikroskopowe obserwacje morfologii, rozmieszczenia oraz adhezji komórek do otrzymanych powłok wskazują na ich stymulujący charakter. Komórki hodowane na powłokach hybrydowych ( $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$ ) charakteryzowały się najbardziej zrównoważonym współczynnikiem proliferacji. Najwyższa aktywność proliferacyjna została zaobserwowana w pierwszym i siódmym dniu hodowli na powłoce  $\text{TiO}_2$ . Badania za pomocą spektroskopii ramanowskiej potwierdziły amorficzną formę krzemionki oraz formę krystaliczną (anataz)  $\text{TiO}_2$ .

W 2016 r. Walke i in. [65] przeprowadzili badania własności fizykochemicznych po procesie sterylizacji warstw  $\text{SiO}_2$  naniesionych na stal nierdzewną 316LVM metodą zol-żel w celu wykazania przydatności tak przygotowanych warstw do specyfiki układu sercowo-naczyniowego. Wcześniejsze badania autorów pozwoliły na optymalizację parametrów nanoszenia warstw. W celu identyfikacji zjawisk zachodzących na granicy faz oraz oceny przydatności zaproponowanej modyfikacji powierzchni z uwzględnieniem procesu sterylizacji (ETO i sterylizacji parowej), wykonano badania potencjodynamiczne, badania impedancji EIS, adhezji, morfologii powierzchni oraz badania biologiczne. Niezależnie od metody sterylizacji, badania wykazały redukcję siły krytycznej powodującej delaminację warstwy. Badania odporności korozyjnej również wykazały nieznaczny jej spadek po procesie sterylizacji w środowisku sztucznej plazmy. Warstwy  $\text{SiO}_2$  po procesie sterylizacji nie wykazały cech cytotoksyczności i negatywnego wpływu na liczebność komórek krwi [65].

Na stenty nanoszono również powłoki z tlenku irydu. Powłoki zostały nałożone bezpośrednio na podłoże stentu przez reaktywne napylenie irydu w atmosferze tlenu. Tlenek

---

irydu działa jako bariera przed jonami metali, jednakże jego zgodność naczyniowa jest przypisywana katalitycznemu działaniu na powierzchnię stentu i sposobowi w jaki zakłóca proces restenozy. Proces ten został jednak potwierdzony tylko w badaniach in-vitro. Brakuje dostatecznych danych klinicznych potwierdzających ten efekt in vivo [66].

Plazmowa immersyjna implantacja jonów (PIII) to technika modyfikacji materiału służąca do obróbki obszarów przypowierzchniowych materiałów poprzez wszczepianie jonów energetycznych z plazmy otaczającej próbkę. Hung i in. [67] zbadali warstwy tlenku tytanu  $TiO_2$  naniesione metodą immersyjnej implantacji jonowej w plazmie tlenowej (tlenowa PIII) na podłoże ze stali 316L. Stan chemiczny powierzchni, strukturę i morfologię warstw badano za pomocą rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronowej, dyfrakcji rentgenowskiej, mikroskopii Ramana, mikroskopii sił atomowych oraz skaningowego mikroskopu elektronowego. Właściwości mechaniczne warstw, takie jak moduł Younga i twardość, zbadano za pomocą testów nanoindentacji. Stwierdzono, że stan chemiczny  $Ti^{4+}$  występuje na powierzchniach poddanych obróbce tlenowej PIII, które składały się z nanokrystalicznego  $TiO_2$  o strukturze rutyłu. Badania czasu krzepnięcia in vitro wykazały, że czas krzepnięcia na powierzchniach wytworzonych za pomocą tlenowej-PIII był dłuższy niż substratu Ti, co wiązało się ze zmniejszoną adsorpcją fibrynogenu [67]. Warstwy Ti-O naniesione na stal 316L za pomocą immersyjnej plazmowej implantacji jonowej i osadzania (PIII&D) zostały zbadane przez Xie i in. [68]. Zbadali oni deformację i zachowanie korozyjne tych warstw z przeznaczeniem na stenty naczyniowe. Testy rozciągania i trzypunktowego zginania wykazały, że na folii Ti-O, która uległa stosunkowo dużemu odkształceniu plastycznemu (wydłużenie od 4% do 16%), nie wystąpiło złuszczenie i rozwarstwianie. Testy korozji elektrochemicznej wykazały, że odkształcona warstwa Ti-O naniesiona metodą PIII&D na stal 316L uległa korozji w symulowanym płynie ustrojowym (SBF) w większym stopniu niż niezdeformowana [68].

Yelkarasi i in. [69] zbadał biokompatybilność oraz stabilność mechaniczną nanoporowatych warstw  $TiO_2$  z przeznaczeniem na produkcję stentów wolnych od leków z niskim ryzykiem restenozy. Warstwa tytanu o grubości  $1\mu m$  została naniesiona na podłoże ze stali 316LVM poprzez rozpylanie magnetronowe, a następnie usunięta za pomocą ultradźwięków do grubości 500nm. Badania XPS wykazały obecność warstwy  $TiO_2$  o grubości 5nm ze śladami fluorowanego tytanu oraz nanostrukturalnej powierzchni. Obróbka plazmą tlenową nanowzorowanych powierzchni wytworzyła dodatkową warstwę tlenku wolnego od fluoru o grubości 5 nm. Tak przygotowane warstwy wierzchnie poddano

---

badaniom w celu oceny morfologii powierzchni, składu chemicznego, próbom zginania, zwilżalności powierzchni, ocenie biologicznej *in vitro* w interakcji z komórkami śródbłonna tętnic wieńcowych oraz komórkami mięśni gładkich oraz testy adhezji płytek krwi. Próbki wykazały obecność nanostruktur o pożądanych wymiarach oraz brak odprysków podczas odkształcenia plastycznego. Badania żywotności komórek wykazały, że nanowzorowane powierzchnie stymulują proliferację komórek śródbłonna, jednocześnie zmniejszając proliferację mięśni gładkich. Obróbka plazmowa dodatkowo przyspieszyła proliferację komórek śródbłonna. Aktywacja płytek krwi nie występowała na powierzchniach nanostrukturalnych poddanych obróbce plazmą tlenową, pozbawionych fluoru [69]. Pomimo uzyskania pozytywnych wyników wybranych aspektów oceny biologicznej, wyniki badań nie są rozstrzygające ze względu na wybiórczy charakter badań. Wybrana metoda obróbki powierzchniowej jest wieloetapowa, co rodzi wątpliwości dotyczące jej powtarzalności. Nie wykonano również kompleksowych badań dotyczących właściwości fizykochemicznych tak naniesionych warstw, w tym właściwości barierowych zapewniających ochronę przed uwalnianiem jonów Ni.

Mikhalovska i in. [70] przeprowadzili badania biokompatybilności *in vitro* i *in vivo* tlenków TiO, ZrO oraz DLC naniesionych metodą rozpylania magnetronowego i porównali z niepokrytymi stentami ze stali nierdzewnej 316L. Badania wykazały jednorodność powłok o grubości 2,2-2,4  $\mu\text{m}$ . Stenty pokryte i niepokryte zostały poddane procesowi sterylizacji w temperaturze 165°C i poddane obciążeniom cyklicznym oraz testom w warunkach symulujących naturalne warunki implantacji. Badania powłok metodą SEM/EXD wykazały niską chropowatość, jednorodność i stałość składu chemicznego naniesionych warstw. Badania cytotoksyczności na ekstraktach wykazały zredukowaną o 40-60% ilość kolonii komórkowych w stosunku do grupy negatywnej. Ocena adsorpcji fibrynogenu wykazała niską ilość zaadsorbowanych protein na TiO, ZrO oraz stali nierdzewnej oraz wyższą ilość zaadsorbowanego fibrynogenu na powłokach DLC. Adhezja płytek krwi była również wyższa na powłokach DLC. Oba stenty powlekane tlenkami wykazały dowody słabszej odpowiedzi zapalnej i pełniejszej śródbłonna w porównaniu ze stentem niepowlekanym oraz powlekanym DLC. Na podstawie uzyskanych danych można zasugerować, że znacznie zwiększyła się neointima wokół stentów pokrytych warstwą DLC [70].

Oceny przyczepności warstwy tlenku tytanu TiO i TiO<sub>2</sub> do powierzchni próbek wytrzymałościowych oraz stentów ze stali 316L naniesionej metodą napyłania

---

magnetronowego zbadał Wang i in. [71]. Wpływ struktury, temperatury osadzania, międzywarstwy Ti i grubości na adhezję warstw tlenku tytanu zbadano za pomocą prób rozciągania. Wyniki wykazały, że struktura warstw Ti-O dramatycznie wpływa na ich przyczepność. Warstwa TiO jest krucha, pozbawiona zdolności do deformacji. Dlatego jej przyczepność była gorsza niż w przypadku TiO<sub>2</sub>. Wyższa temperatura podłoża pomogła poprawić przyczepność warstwy. Przyczepność folii TiO z międzywarstwą Ti była lepsza niż folii bez międzywarstwy. Wprowadzenie międzywarstwy Ti wpłynęło korzystnie na przyczepność folii. Warstwa TiO<sub>2</sub> osadzona na stentach miała dobrą adhezję. Po rozprężeniu stentu, film nie pękał i nie odklejał się [71].

Powłoki na bazie tlenku tytanu (IV) są jednymi z najbardziej obiecujących powłok na stenty naczyniowe. Charakteryzują się dobrą hemokompatybilnością odnoszącą się do ich energii powierzchniowej oraz właściwości półprzewodnikowych [72]. Dodatek azotu do powłok TiO<sub>2</sub> wykazał znaczną poprawę hemokompatybilności ze względu na obecność tlenku azotu na powierzchni. Stenty „TiNOX” wykonane z niezidentyfikowanej stali nierdzewnej zostały pokryte powłoką tlenoazotku tytanu za pomocą reaktywnego fizycznego osadzania z fazy gazowej w próżni. W zależności od ilości stosunku tlenu do azotu możliwe było osadzanie warstw o określonym składzie i oporności. Przeprowadzono badania implantacji in-vivo, ocenę histologiczną oraz badania in-vitro adhezji płytek krwi oraz wiązania fibrynogenu. Badania nie wykazały śladów restenozy w pokrywanych i niepokrywanych fragmentach stentów. Próbkę z powłoką wykazały mniejszą adhezję płytek krwi oraz wiązanie fibrynogenu na stentach z powłokami w porównaniu do stentów niepokrytych. Badania histologiczne wykazały mniejszą grubość neointymy na stentach pokrytych, przy czym efekt ten był bardziej widoczny w przypadku próbki z powłoką ceramiczną o właściwościach półprzewodnikowych niż próbki z powłoką o charakterze metalicznym. Wyniki badań sugerują znaczny wpływ właściwości elektrochemicznych powłok na ich właściwości antyproliferacyjne [73]. W 2006 r. Karajalinen i in. [74] porównali stenty ze stali nierdzewnej pokryte tlenoazotkiem tytanu ze stentami uwalniającymi paclitaxel. Stenty pokryte tlenkiem tytanu wykazały biokompatybilność w badaniach przedklinicznych hamując odkładanie płytek krwi i fibryny oraz zmniejszając wzrost neointymy. W badaniach obserwacyjnych i nierandomizowanych stenty powlekane azotkiem tytanu wykazały bezpieczeństwo i skuteczność. W randomizowanych badaniach pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym, powlekane tlenoazotkiem tytanu stenty wykazały porównywalną skuteczność [74].

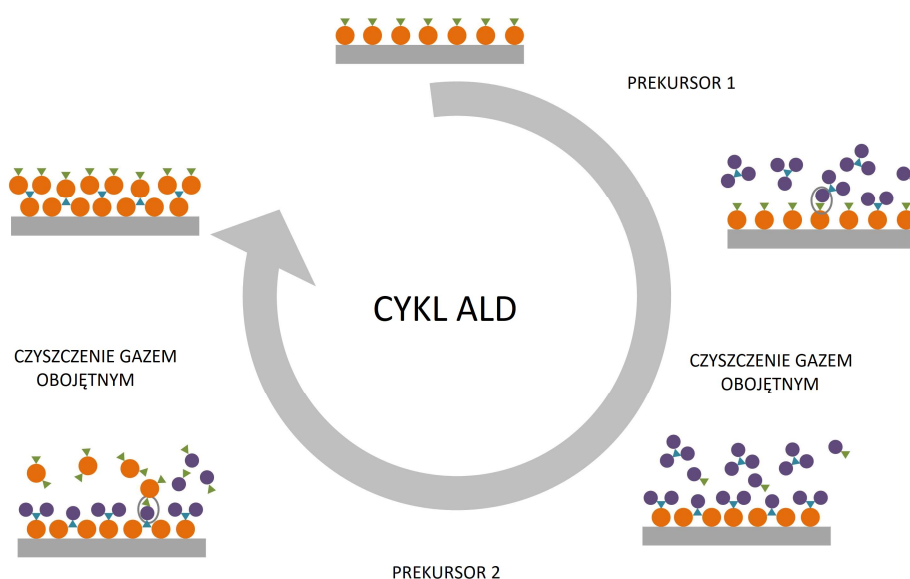
---

Superhydrofobowe warstwy  $\text{TiO}_2$  wytworzone na powierzchni stali 316L zbadał Huang i in. [75]. Wytworzyli oni superhydrofilowe i superhydrofobowe warstwy nanorurek w celu poprawy odporności korozyjnej oraz hemokompatybilności stali 316L. Amorficzne superhydrofilowe nanorurki (TNT) zostały wytworzone poprzez elektrochemiczną anodyzację warstw Ti naniesionych na stal nierdzewną. Następnie przeprowadzono wygrzewanie w celu wytworzenia fazy anatazu (superhydrofilowej) oraz fluorosilanizację w celu zmiany właściwości warstwy na superhydrofobową. Wykonano badania morfologii, struktury i zwilżalności próbek, oraz wpływu zwilżalności powierzchni na odporność korozyjną i adhezję płytek krwi. Wyniki pokazały, że faza krystaliczna (anataz vs. amorficzna) i zwilżalność silnie wpłynęły na odporność na korozję i adhezję płytek. Superhydrofilowe amorficzne nanorurki nie chroniły stali nierdzewnej przed korozją, podczas gdy superhydrofobowe amorficzne nanorurki nieznacznie poprawiły odporność stali nierdzewnej na korozję. Zarówno superhydrofilowe, jak i superhydrofobowe anatazowe nanorurki znacznie poprawiły odporność na korozję stali 316L. Superhydrofilowe amorficzne TNT minimalizowały adhezję i aktywację płytek krwi, podczas gdy superhydrofilowe anatazowe TNT aktywowały tworzenie sieci fibrynowej. Superhydrofobowe TNT (superhydrofobowe amorficzne TNT i superhydrofobowe anatazowe TNT) znacznie zmniejszyły adhezję płytek i poprawiły odporność na korozję niezależnie od fazy krystalicznej [75].

W ostatnim czasie rośnie zainteresowanie zastosowaniem technologii osadzania warstw atomowych (ALD) do zastosowań w inżynierii tkankowej i ulepszaniu powierzchni implantów. Technologia ALD, będąca odmianą metody CVD pozwala na wytwarzanie ultracienkich, jednorodnych i powtarzalnych powłok o szerokim zakresie potencjalnego zastosowania biologicznego dzięki ich cechom biomimetycznym [76]. W typowej reakcji CVD prekursorzy gazowe są wspólnie wprowadzane do komory, aby przejść heterogeniczną reakcję. Gazowe produkty uboczne reakcji są usuwane przez usuwanie strumienia gazu. Ta niejednorodna reakcja często skutkuje niejednorodną grubością lub niekonformalnym wzrostem na większości podłoża. W ALD naprzemienne pulsowanie gazów prekursorowych i reagujących są oddzielone etapami oczyszczania, aby uzyskać samoograniczające się reakcje powierzchniowe. Reakcja ALD kończy się, gdy wszystkie dostępne miejsca na powierzchni reaktywnej są zajęte, niezależnie od temperatury i strumienia prekursorów. Cecha ta jest określana jako samoograniczająca, co umożliwia ALD osadzanie jednolitych warstw o wysokiej konformacji i dokładnie kontrolowanej



grubości na wszystkich rodzajach podłoży. Aby zapewnić samoograniczający się charakter ALD, temperatura osadzania powinna być utrzymywana w określonym zakresie. Istnieje okno temperaturowe, w którym tempo wzrostu (wzrost na cykl-GPC) jest stałe, gdy prekursorzy są całkowicie zaadsorbowane na powierzchni podłoża. To okno temperaturowe i konsekwentne GPC sprawiają, że ALD jest idealnym narzędziem do osadzania filmów o odporności na temperaturę i kontroli grubości, podczas gdy w przypadku CVD na szybkość wzrostu silnie wpływa temperatura. Proces ALD polega na dwóch kolejnych naprzemiennych impulsach gazowych prekursorów, tworzących cienkowarstwowy produkt. Oddzielone sekwencyjne reakcje gaz-powierzchnia nazywane są „reakcjami połówkowymi”. Każda połówkowa reakcja zazwyczaj składa się z dwóch etapów. Na przykład podczas pierwszej reakcji połówkowej zachodzi samoograniczający się proces adsorpcji nasyconej. Oczekuje się, że odsłonięty prekursor, który tworzy nie więcej niż jedną mono warstwę na powierzchni, będzie w pełni reagował z centrami aktywnymi na podłożu. Następnie do komory wdmuchiwany jest obojętny gaz nośny (zwykle N<sub>2</sub> lub Ar) w celu wydmuchania nadmiaru prekursora lub gazowych produktów ubocznych, aby zapewnić samoograniczenie reakcji. Po tym etapie następuje druga analogiczna połówkowa reakcja. Dwie połówkowe reakcje tworzą mono warstwę pożądanego materiału i regenerują miejsca aktywne do następnego cyklu reakcji. Cały proces ALD powtarza się cyklicznie, aby osiągnąć pożądaną grubość powłoki [77]. Schemat procesu ALD został przedstawiony na rycinie 15.



Ryc. 15 Schemat procesu ALD [78]

---

Wcześniej technologia ALD była wykorzystywana do uzyskania jednolitej powłoki  $\text{TiO}_2$  o kontrolowanej grubości, nie przekraczającej 2 nm [79]. Powłoki zostały zdeponowane na materiałach porowatych i obiektach trójwymiarowych, które wykazały ich wysoki potencjał aplikacyjny w funkcjonalizacji implantów przeznaczonych dla stomatologii i ortopedii [80]. Jednak Liu i in. [81] po raz pierwszy zastosował technologię ALD do uzyskania nanopowłok  $\text{TiO}_2$  o właściwościach antybakteryjnych i wysokiej bioaktywności. Ich badanie wykazało szeroki zakres skuteczności przeciwdrobnoustrojowej powłok ALD-  $\text{TiO}_2$  hamując wzrost bakterii Gram-dodatnich (*S. aureus*), Gram-ujemnych (*E. coli*) oraz bakterii opornych na antybiotyki (MRSA). Ponadto wykazano, że powłoki ALD-  $\text{TiO}_2$  mają potencjał selektywnej funkcji promującej osteoblasty, jednocześnie hamując adhezję i proliferację fibroblastów. Ta cecha ma ogromne znaczenie dla implantów ortopedycznych, które są zaprojektowane tak, aby zminimalizować tworzenie tkanki włóknistej, jednocześnie maksymalizując tworzenie funkcjonalnej tkanki kostnej [81]. Ponadto badanie Yanga i in. [82] wskazało dalsze potencjalne biomedyczne zastosowanie powłok  $\text{TiO}_2$ , pokazując, że te nanowarstwy mogą być osadzone na stentach ze stopu Mg-Zn w celu wzmocnienia adhezji i wzrostu komórek śródbłonka tętnicy wieńcowej. Badanie wykazało, że kontrola temperatury powłok ALD-  $\text{TiO}_2$  jest niezbędna w celu uzyskania prawidłowej biologicznej funkcji biomateriału. Yang i in. [82] wykazali, że powłoki osadzone w temperaturze  $150^\circ\text{C}$  mają większy potencjał do promowania proliferacji komórek śródbłonka niż powłoki osadzone w temperaturze  $200^\circ\text{C}$ .

Wykorzystanie metod ALD do nanoszenia powłok  $\text{Al}_2\text{O}_3$  i  $\text{ZrO}_2$  w celu poprawy własności fizykochemicznych stali nierdzewnej opisał w swoich pracach Matero i in. [83]. Badania wykazały niewystarczające właściwości antykorozyjne powłok  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Dobre właściwości antykorozyjne wykazała warstwa łączona  $\text{ZrO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$ . Wyniki pozwoliły wysnuć przypuszczenia, że nie osiągnięto w badaniach optymalnych parametrów nanoszenia warstw  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . W 2011 roku Marin i in. [84], Diaz i in. [85] oraz Potts i in. [86] wyraźnie wykazali, że porowatość resztkowa warstw ALD zmniejsza się ze zwiększeniem grubości warstwy, poprawiając tym samym ochronę podłoża. W większości przypadków [84] [85] [86] nanometryczne warstwy ALD wyraźnie wykazywały podobną ochronę korozyjną, jeśli nie lepszą od konwencjonalnych technik.

Powłoki z tlenku glinu na stentach były również badane przez Jugessura i in. [87] pod kątem ich zdolności do nadawania właściwości przeciwzakrzepowych, a także jako warstwy inertne, zapobiegające uwalnianiu toksycznych jonów. Stenty pokryte  $\text{Al}_2\text{O}_3$

---

o grubości poniżej 30 nm przy użyciu wspomaganego plazmą osadzania warstw atomowych (ALD) wykazywały lepszą atomobogencją bez zmiany swoich właściwości mechanicznych. Opisano również charakterystykę warstw za pomocą różnych technik, takich jak elipsometria, skaningowa mikroskopia elektronowa ze skupioną wiązką jonów. Wyniki pokazują zgodność i jednolitość warstw wierzchnich. Praca pokazuje również wpływ powłoki ALD na skuteczną przyczepność kolejnych powłok organicznych na stencie, które ostatecznie poprawiają właściwości przeciwzakrzepowe powierzchni [87].

Staszuk i in. [88] zbadali strukturę i właściwości powłok ZnO otrzymanych metodą atomowego osadzania warstw (ALD) na podłożu stalowym Cr-Ni-Mo. Uzyskane wyniki wykazały, że liczba cykli ALD miała istotny wpływ na strukturę, morfologię i odporność korozyjną warstw ZnO. Stwierdzono, że po zwiększeniu grubości powłoki ZnO na materiale poprawie uległy się również jej właściwości elektrochemiczne określające odporność korozyjną. Ponadto, na podstawie badań trybologicznych, stwierdzono istotne obniżenie współczynnika tarcia próbek z badanymi powłokami w stosunku do podłoża niepowlekanego [88].

W literaturze opisane zostały również powłoki gradientowe oraz powłoki wielowarstwowe mieszane. W 2017 r. Walke i in. [89] zbadali przydatność powłok gradientowych  $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$  do poprawy hemokompatybilności podłoża ze stali 316LVM. Powłoki zostały naniesione metodą ALD z zastosowaniem prekursorów: dla  $\text{SiO}_2$ :  $\text{C}_6\text{H}_{19}\text{N}_3\text{Si}$  i  $\text{O}_3$ ;  $T = 340^\circ\text{C}$ ,  $L = 600$  cykli; dla  $\text{TiO}_2$ :  $\text{TiCl}_4$  i  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $T = 200^\circ\text{C}$ ,  $L = 50$  cykli. Charakterystyka morfologiczna warstwy  $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$  wykazywała tendencję do dziedziczenia parametrów stereometrycznych utworzonej powierzchni podłoża stalowego przez zabiegi poprzedzające jego aplikację. Wyniki badań odporności na korozję wżerową wykazały, że powłoki  $\text{TiO}_2$  i  $\text{SiO}_2$  zwiększyły odporność korozyjną podłoża. Badania EIS wykazały obecność warstwy podwójnej: wewnętrznej kompaktowej oraz zewnętrznej porowatej. Warstwa pasywna wykonana na podłożu 316 LVM podczas obróbki wstępnej powierzchni (mechaniczna i elektrochemiczna) i osadzania warstwy gradientowej  $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$  za pomocą metody ALD poprawia odporność na korozję. Prawidłowy wybór parametrów nakładania warstwy również zaowocował odpowiednią przyczepnością do podłoża, co skutecznie minimalizuje migrację jonów pierwiastków Fe, Cr, Ni [89]. Badanie nie obejmowało oceny biologicznej (w tym oceny hemokompatybilności) co daje niepełny obraz zastosowania w/w warstw na wyroby kontaktujące się z krwią.

---

Abbas i in. [90] zbadali biokompatybilność, bioaktywność i odporność na korozję stali nierdzewnej 316L z nanopowłoką SiO<sub>2</sub> i Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> oraz wielowarstwą SiO<sub>2</sub>/ Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> naniesioną metodą osadzania warstwy atomowej w temperaturze 250°C. Wyniki pokazują, że odporność na korozję można skutecznie zwiększyć za pomocą cienkich warstw. Wielokrotna warstwa okazała się skuteczniejszą ochroną przed korozją niż pojedyncze warstwy, a tlenek glinu wykazał lepszą odporność na korozję niż tlenek tytanu, natomiast tlenek tytanu wykazał mniejszą toksyczność [90].

Spajic i in. [91] zbadali cienkie warstwy Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> i HfO<sub>2</sub> osadzone w konfiguracjach jedno- i wielowarstwowych metodą ALD na tytanie i stali nierdzewnej do zastosowań biomedycznych. Morfologię, strukturę i skład powlekanych stopów scharakteryzowano za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej z spektroskopią rentgenowską z dyspersją energii oraz rentgenowską spektroskopią fotoelektronów. Ponadto do badania grubości i topografii z właściwościami potencjału powierzchniowego wykorzystano elipsometrię i mikroskopię sił atomowych w połączeniu ze skaningową mikroskopią sił sondy Kelvina. Do oceny delaminacji nałożonych folii zastosowano improwizowaną metodę, polegającą na teście twardości Vickersa. Pokryte próbki, a także odsłonięte podłoża, zostały przetestowane w temperaturze 37 °C w symulowanym płynie ustrojowym, przy użyciu potencjodynamicznej polaryzacji i elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej jako technik oceny podatności na korozję. Stwierdzono dobre właściwości barierowe warstw. Badanie te wykazały, że stopień ochrony korozyjnej zależy głównie od grubości warstwy i rodzaju podłoża, w mniejszym stopniu od konfiguracji warstw [91]. W innych badaniach Spajic i in. [92] badali wpływ przygotowania powierzchni podłoża na właściwości warstw cienkich warstw Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> i HfO<sub>2</sub> nanoszone na cp-Ti metodą osadzania warstw atomowych. Powierzchnie cp-Ti były szlifowane i polerowane. Cienkie warstwy Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> i HfO<sub>2</sub> były jednolite, jednorodne i dopasowane do powierzchni podłoża. W symulowanym roztworze fizjologicznym uzyskano znaczną długotrwałą ochronę przed korozją. Chropowatość podłoża wpływała na właściwości barierowe cienkich warstw tlenku glinu i hafnu [92]. Badanie nie obejmowały oceny biologicznej naniesionych warstw.

Replikacja porowatej struktury powierzchni jest ważnym sposobem wytwarzania nanostruktur i została wykorzystana do funkcjonalizacji powierzchni. Dzięki samoograniczającym się reakcjom, ALD jest w stanie w precyzyjnie kontrolowany sposób wytworzyć jednolite i dopasowane filmy na wszystkich powlekanych powierzchniach. Ta funkcja zapewnia prosty sposób dostrajania właściwości prawie każdej powierzchni.

---

W tym sensie ALD jest potężnym narzędziem do syntezy materiałów nanostrukturalnych lub funkcjonalizowanych materiałów nanostrukturalnych [77].

### **3. Podsumowanie przeglądu piśmiennictwa**

Wieloletnie obserwacje mechanizmów pracy układu krążenia, a także liczne badania prowadzone przez lekarzy przy ścisłej współpracy inżynierów pozwoliły na modelowanie struktur i procesów biologicznych związanych z krążeniem. Dzięki temu uzyskano szerokie możliwości prowadzenia testów pracy całego układu i symulowania sytuacji patologicznych, na podstawie których opracowano szereg implantów oraz metod zabiegowych przywracających stan normalny w organizmie lub maksymalnie do niego zbliżony. Obecnie stosuje się różnorodne metody leczenia dysfunkcji układu sercowo-naczyniowego, m.in. leczenie implantologiczne. Popularną, jeśli chodzi o zastosowanie, grupę wyrobów implantowanych stanowią stenty naczyniowe.

Na przestrzeni ostatnich lat możemy zauważyć znaczny rozwój technologii produkcji stentów. Ich użycie pociąga jednak za sobą dwa zasadnicze problemy związane z wykrzepianiem i restenozą. W celu ograniczenia tych niekorzystnych procesów istnieje konieczność kształtowania własności fizykochemicznych warstwy powierzchniowej implantów [35-38, 50-51, 53, 56, 62-63, 74-75]. Do tej pory nie osiągnięto jednak w tej dziedzinie w pełni zadowalających efektów. Potwierdzeniem tych działań są publikacje w literaturze światowej, które prezentują najczęściej cząstkowe rezultaty badań [35-39, 41, 45, 47, 52, 54-58, 60, 63, 65]. Wciąż nierozwiązanym problemem pozostaje kompleksowość badań pokazujących pełną charakterystykę ich zachowania w warunkach implantacji oraz długotrwałego kontaktu ze środowiskiem tkankowym. W literaturze niewiele miejsca poświęca się również roli procesu obróbki powierzchniowej biomateriału metalowego, co ma zasadniczy wpływ na finalną postać powłoki oraz jej adhezję do metalicznego podłoża. Dodatkowo brak danych dotyczących mikrostruktury wytworzonych powłok, odporności korozyjnej identyfikowanej w odniesieniu do różnych rodzajów korozji zachodzących w organizmie ludzkim, poziomu przenikania jonów metalicznych z podłoża do organizmu czy adhezji powłoki do podłoża nie pozwala w pełni na ocenę przydatności wytwarzanych powłok do zastosowań w układzie sercowo-naczyniowym. Zaprezentowane programy

---

badawcze skupiają się na wybranych aspektach oceny fizykochemicznej lub/i oceny biologicznej, która w przypadku implantów kontaktujących się z krwią powinna obejmować wiele aspektów hemokompatybilności, w tym również specyfikę działania implantu [35-39, 41, 45, 47, 52, 54-58, 60, 63, 65].

Ponadto, jak pokazują dane literaturowe, najczęściej stosowanymi technologiami zapewniającymi nakładanie warstw powierzchniowych są metody zol-żel, PVD, CVD, RFMS [46, 48-59, 62-65]. Niestety największą wadą tych metod, oprócz wysokiej temperatury osadzania, jest nierównomierne pokrywanie ze wszystkich stron złożonych geometrycznie powierzchni (np. zminiaturyzowanych implantów) co jest niezwykle istotne w przypadku takich implantów, jak stenty naczyniowe. Dlatego też zasadne wydaje się zastosowanie metody niskotemperaturowej spełniającej to kryterium.

---

## 4. Badania własne

### 4.1. Cel, założenia i teza pracy

Na podstawie analizy literaturowej oraz wyników badań wstępnych, dotyczących modyfikacji powierzchni biomateriałów stosowanych na implanty w układzie sercowo-naczyniowym, sformułowano cel pracy:

***Ocena wpływu właściwości fizykochemicznych powłok na bazie dwutlenku tytanu na procesy zachodzące na powierzchni implantów wykonanych ze stali nierdzewnej po ich wprowadzeniu do układu krwionośnego.***

Opracowanie warunków wytworzenia powłok na implantach wykonanych ze stali 316LVM i weryfikacja ich przydatności do zastosowań klinicznych znajdują się w obszarze zagadnień inżynierii biomedycznej. Osiągnięcie założonego celu realizowano przez prawidłowe ukształtowanie struktury, własności mechanicznych materiału podłoża oraz morfologii, własności fizykochemicznych powłok adekwatnych do specyfiki układu krwionośnego. Na podstawie przeprowadzonego studium literaturowego można przyjąć następującą tezę badawczą:

***Funkcjonalizacja stali 316LVM powłoką  $TiO_2$  naniesioną metodą osadzania warstw atomowych ALD o właściwościach fizykochemicznych adekwatnych do specyfiki układu sercowo-naczyniowym zapewnia odpowiednią biokompatybilność w odniesieniu do wybranych badań *in vitro* dedykowanych dla implantów kontaktujących się z krwią i tkankami naczyń krwionośnych.***

Weryfikacja przyjętej tezy wymagała zrealizowania odpowiedniego programu badawczego – Ryc. 16, który pozwoli na pełną charakterystykę procesów zachodzących na powierzchni implantów wytworzonych z stali 316LVM po ich wprowadzeniu do układu krwionośnego.

#### 1. BADANIE MATERIAŁU WYJŚCIOWEGO

- *analiza składu chemicznego,*
- *ocena własności mechanicznych*

#### 2. DOBÓR PROCESÓW ORAZ WARUNKÓW OBRÓBKI POWIERZCHNI

- *polerowanie elektrochemiczne, pasywacja chemiczna,*
- *nanoszenie powłoki TiO<sub>2</sub> metodą Atomic Layer Deposition (ALD)*
- *sterylizacja medyczna*

#### 3. WSTĘPNA OCENA POWŁOKI- dla 4 wariantów temperaturowych

- *badania składu chemicznego,*
- *badania grubości*

#### 4. OCENA WŁASNOŚCI ELEKTROCHEMICZNYCH- dla 4 wariantów temperaturowych

- *badanie odporności na korozję wżerową,*
- *badanie odporności na korozję szczelinową,*
- *charakterystyka powłoki z wykorzystaniem elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (EIS)*
- *badanie przenikania jonów metali do roztworu*

#### 5. OCENA WŁASNOŚCI FIZYCZNYCH- dla 4 wariantów temperaturowych

- *badania adhezji powłoki do podłoża,*
- *badania zwilżalności powierzchni,*
- *badania topografii powierzchni*

#### 6. WYBÓR WARIANTU TEMPERATUROWEGO DO DALSZYCH BADAŃ

- *analiza wyników badań*
- *wybór wariantu optymalnego*

#### 7. OCENA WŁASNOŚCI ELEKTROCHEMICZNYCH I MIKROSTRUKTURY- dla wybranego wariantu temperaturowego

- *badania podatności powłoki do odkształceń*
- *badanie mikrostruktury*

#### 8. OCENA WŁASNOŚCI BIOLOGICZNYCH- dla wybranego wariantu temperaturowego

- *badania cytotoksyczności*
- *badania proliferacji komórek*
- *badania własności trombogennych*
- *badania oddziaływania biomateriału na krwinki czerwone*
- *oznaczanie cytokin prozapalnych*

Ryc. 16 Ramowy program badań

Materiał do badań stanowiła stal 316LVM w stanie przesyconym w postaci krążków o średnicy  $d = 14$  mm i grubości  $g = 3$  mm o składzie chemicznym przedstawionym w tabeli 2 i własnościach mechanicznych zamieszczonych w tabeli 3. Skład chemiczny oraz



własności mechaniczne były zgodne z wymaganiami normy PN-EN ISO 5832-1:2020-03 [99].

Tabela 2

Skład chemiczny stali 316LVM

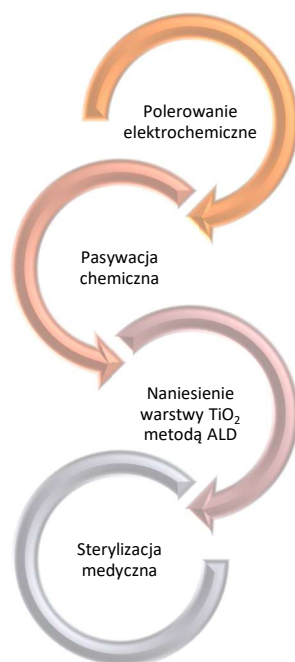
Materiał	Rodzaj analizy	Stężenie masowe pierwiastków, %							
		C	Si	Mn	P	S	Cr	Mo	Ni
Stal 316 LVM	wg ISO 5832-1:2020	0,03 max.	1,0 max.	2,0 max.	0,025 max.	0,01 max.	17,0÷ 19,0	2,25÷ 3,0	13,0÷ 15,0
	wg analizy kontrolnej	0,026	0,43	1,81	0,011	0,004	18,1	2,25	13,85

Tabela 3

Własności mechaniczne stali 316LVM w stanie przesyconym

Materiał	E [MPa]	R <sub>p0,2</sub> [MPa]	R <sub>m</sub> [MPa]	A [%]	HV
Stali 316LVM	182 000	285	669	48	188

Modyfikację powierzchni analizowanego biomateriału realizowano z wykorzystaniem takich zabiegów jak: polerowanie elektrochemiczne, pasywacja, nałożenie powłoki TiO<sub>2</sub> z wykorzystaniem niskotemperaturowej metody Atomic Layer Deposition (ALD), a także sterylizacji medycznej. Dla zapewnienia wymaganych własności fizykochemicznych powierzchni stali 316LVM opracowane zostały warunki jej obróbki powierzchniowej. Zaproponowana obróbka powierzchniowa składała się z kolejnych, następujących po sobie zabiegów – Ryc. 17



Ryc. 17 Ogólny schemat zaproponowanych zabiegów obróbki powierzchniowej

Pierwszym zabiegiem obróbki powierzchniowej było polerowanie elektrochemiczne, które prowadzono w kąpeli na bazie mieszaniny kwasu ortofosforowego i siarkowego (VI). Proces ten prowadzono do momentu uzyskania chropowatości powierzchni  $R_a < 0,16\mu\text{m}$  zalecanej dla implantów. Następnie próbki poddano procesowi pasywacji chemicznej w 40% kwasie  $\text{HNO}_3$ . Są to podstawowe etapy kształtowania własności użytkowych biomateriałów metalowych stosowanych na implanty o zminiaturyzowanych cechach geometrycznych. Następnie na tak przygotowane próbki nanoszono warstwę  $\text{TiO}_2$  z wykorzystaniem metody ALD (Atomic Layer Deposition) o zróżnicowanych parametrach procesu nanoszenia. Zmiennymi parametrami procesu nanoszenia warstw powierzchniowych była: temperatura ( $100^\circ\text{C} - 400^\circ\text{C}$ ) z kolei ilość cykli była stała i wynosiła 500. Wybór ilości cykli podyktowany został wynikami przeprowadzonych badań wstępnych. Jako prekursor zastosowano  $\text{TiCl}_4$  (Titanium (IV) chloride (99, 9999%-Ti)) +  $\text{H}_2\text{O}$ . Na podstawie badań wstępnych dobrano eksperymentalnie istotne warunki technologiczne, które w tej części eksperymentu pozostały stałe – tabela 4. Ostatni etap zaproponowanej obróbki powierzchniowej obejmował sterylizację medyczną, która realizowana była z wykorzystaniem metody parowej w autoklawie BAISIC w temperaturze  $T=135^\circ\text{C}$  i pod ciśnieniem  $p = 2,1$  Bara. Populacja próbek dla każdego przeprowadzonego badania wynosiła po 5 szt. dla każdego analizowanego wariantu. Etapy

badania 1-5 (ryc. 16) realizowano dla wszystkich wariantów temperaturowych, następnie wybrano optymalny wariant temperaturowy do dalszych badań.

Tabela 4

Warunki technologiczne metody ALD dobrane na podstawie badań wstępnych

TiCl <sub>4</sub>	Szybkość przepływu gazu nośnego (N <sub>2</sub> ) [sccm]	200
	Czas wprowadzania prekursora [s]	0,1
	Czas płukania komory [s]	4,0
H <sub>2</sub> O	Szybkość przepływu gazu nośnego (N <sub>2</sub> ) [sccm]	200
	Czas wprowadzania prekursora [s]	0,1
	Czas płukania komory [s]	5,0
Temperatura komory		100÷400
Liczba cykli		500

## 4.2. Metodyka badań

### 4.2.1. Badania składu chemicznego warstwy powierzchniowej

Badanie składu chemicznego warstwy powierzchniowej przeprowadzono metodą spektroskopii elektronów Augera (AES) z wykorzystaniem Scanning Nanoprobe System PHI, modelu 670 firmy Physical Electronics PHI 670. Głębokościowe profilowanie chemiczne zrealizowano przy niskiej energii jonów Ar<sup>+</sup>(500eV). Kąt padania jonów na próbkę wynosił 58,6°, natomiast energia wiązki elektronowej miała wartość 10 keV. W trakcie pomiarów natężenie prądu elektronów odprowadzanych z próbki wynosiło 20 nA, z kolei kąt padania elektronów na badaną powierzchnię przyjął 30°. W celu zwiększenia rozdzielczości głębokościowej pomiary na odkrytej powierzchni prowadzono naprzemiennie

---

z trawieniem. Rozmiar krateru wiązki jonowej wynosił 1000x1000  $\mu\text{m}$ , natomiast powierzchnia, z której uśredniano sygnał pomiarowy AES, to 50x40  $\mu\text{m}$ .

#### **4.2.2. Badania grubości warstw**

Badania grubości naniesionych powłok wykonano z wykorzystaniem reflektometru F10-RT. Urządzenie to wykorzystuje odbicie światła od cienkiej warstwy, a następnie analizuje to światło w pewnym zakresie długości fal.

#### **4.2.3. Badania własności elektrochemicznych**

##### *Badania odporności na korozję wżerową*

Badanie odporności na korozję wżerową przeprowadzono metodą potencjodynamiczną zgodnie z normą ASTM F2129-19a [100] / PN-EN ISO 10993-15:2009 [101]. Stanowisko pomiarowe składało się z potencjostatu VoltaLab PGP201, elektrody odniesienia (nasycona elektroda kalomelowa SCE typu KP-113) / Ag/AgCl 3M KCl, elektrody pomocniczej w postaci drutu platynowego, anody (badana próbka) oraz komputera PC wraz z oprogramowaniem VoltaMaster 4. Badania korozyjne rozpoczynano od wyznaczenia potencjału otwarcia  $E_{\text{OCP}}$  w warunkach bezprądowych, a następnie rejestrowano krzywe polaryzacji od wartości potencjału początkowego  $E_{\text{start}} = E_{\text{OCP}} - 100 \text{ mV}$ . Zmiana potencjału następowała w kierunku anodowym z szybkością 3 mV/s. Po uzyskaniu gęstości prądu anodowego 1 mA/cm<sup>2</sup> zmieniano kierunek polaryzacji. Na podstawie uzyskanych krzywych wyznaczono potencjał korozyjny  $E_{\text{corr}}$ , potencjał przebicia  $E_b$ . Korzystając z metody Sterna, wyznaczono z kolei wartość oporu polaryzacyjnego  $R_p$ . Badanie odporności na korozję wżerową przeprowadzono w temperaturze  $T = 37 \pm 1^\circ\text{C}$  w roztworze sztucznego osocza ( $\text{pH} = 6.8 \pm 0,2$ ) o następującym składzie chemicznym przedstawionym w tabeli 5

Skład chemiczny sztucznego osocza [101]

Składniki	Stężenie składników wodzie destylowanej g/dm <sup>3</sup>
NaCl	6,800
CaCl <sub>2</sub>	0,200
KCl	0,400
MgSO <sub>4</sub>	0,100
Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub>	2,200
NaHPO <sub>4</sub>	0,126
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,026

#### *Badania odporności na korozję szczelinową*

Badania odporności na korozję szczelinową przeprowadzono metodą potencjostatyczną zgodnie z zaleceniami normy ASTM F746-04(2014) [102]. Do zasymulowania szczeliny zastosowano zmodyfikowany kołnierz wykonany z politetrafluoroetyleny (PTFE). Próbki polaryzowano do wartości potencjału +800 mV. Jeżeli po 20 sekundach nie stwierdzono gwałtownego przyrostu gęstości prądu, próbki poddawano dalszej polaryzacji przy tej samej wartości przez 900 sekund. Jeżeli w tym czasie gęstość prądu uległa podwyższeniu, wówczas wartość potencjału  $E_{np} < E_{ks}$  przyjmowano za odpowiadającą potencjałowi krytycznemu korozji szczelinowej.

#### *Badania powłok z wykorzystaniem elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej*

W celu uzyskania informacji o własnościach elektrochemicznych powierzchni analizowanych próbek przeprowadzono również badania z wykorzystaniem elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej EIS. Pomiary wykonano z zastosowaniem systemu pomiarowego Auto Lab PGSTAT 302N wyposażonego w moduł FRA2. Użyty układ pomiarowy umożliwił prowadzenie badań w zakresie częstotliwości  $10^4 \div 10^{-3}$  Hz. Amplituda napięcia sinusoidalnego sygnału pobudzającego wynosiła 10 mV. W badaniach wyznaczono impedancyjne widma układu i dopasowano uzyskane dane pomiarowe do układu zastępczego. Na tej podstawie wyznaczono wartości liczbowe oporności R i pojemności C analizowanych układów. Widma impedancyjne badanego układu przedstawiono w postaci diagramów Nyquista dla różnych wartości

---

częstotliwości oraz w postaci diagramów Bode. Otrzymane spektra EIS interpretowano po dopasowaniu metodą najmniejszych kwadratów do zastępczego układu elektrycznego. Badania zrealizowano w roztworze sztucznego osocza o temperaturze  $T = 37 \pm 1^\circ\text{C}$  i  $\text{pH} = 6,8 \pm 0,2$ .

#### *Badania przenikania jonów metali do roztworu*

Badania przenikania jonów metali do roztworu sztucznego osocza po 28 dniach ekspozycji przeprowadzono z wykorzystaniem metody emisji spektrometrii atomowej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie ICP-AES. W badaniach zastosowano spektrometr emisyjny z plazmą wzbudzoną indukcyjnie JY 2000 firmy Yobin-Yvon. Krzywe wzorcowe opracowano dla materiałów wzorcowych firmy Merck. Dla analizowanego materiału określono stężenie Fe, Cr, Ni, Mo, Ti.

### **4.2.4. Badania własności fizycznych**

#### *Badania adhezji powłok do podłoża*

Badania adhezji powłok  $\text{TiO}_2$  naniesionych na podłoże ze stali 316LVM przeprowadzono metodą zarysowania – scratch test – przy użyciu platformy otwartej wyposażonej w Micro-Combi-Tester firmy CSM zgodnie z normą PN-EN ISO 20502:2016-05 [103]. Test polegał na wykonaniu rysy z wykorzystaniem penetratora – stożka diamentowego Rockwella – przy stopniowym wzroście siły normalnej obciążającej ten penetrator. Siła krytyczna, będąca miarą adhezji, to najmniejsza siła normalna powodująca utratę adhezji powłoki z podłożem. Do oceny wartości siły krytycznej  $L_c$  posłużyła siła tarcia, współczynnika tarcia i sygnał akustyczny oraz obserwacje mikroskopowe wykonane na mikroskopie optycznym, stanowiącym integralną część Platformy. Badania wykonano przy narastającej sile obciążającej od 0,03 do 30 N i przy następujących parametrach pracy: szybkość obciążania 10 N/min, prędkość przesuwu stolika 1 mm/min, długość rysy  $\sim 3$  mm.

#### *Badania zwilżalności powierzchni*

Pomiary kąta zwilżania oraz swobodnej energii powierzchniowej SFE przeprowadzono z wykorzystaniem metody Owensa-Wendta. Pomiary wykonano z użyciem dwóch cieczy: wody destylowanej ( $\theta_w$ ) oraz diiodometanu ( $\theta_d$ ). Pomiary zrealizowano w temperaturze

---

pokojujowej na stanowisku badawczym składającym się z goniometru SURFTENS UNIVERSAL firmy OEG oraz komputera z oprogramowaniem SurfTens 4.5 do analizy zarejestrowanego obrazu kropli. Na powierzchnię każdej z próbek naniesiono po 5 kropli wody destylowanej oraz diiodometanu, każda o pojemności 1,5  $\mu$ l. Pomiar rozpoczynano po 20 sekundach od momentu naniesienia kropli. Czas trwania jednego pomiaru wynosił 60 sekund z częstotliwością próbkowania 1 Hz.

#### *Badania topografii powierzchni*

Badania topografii powierzchni przeprowadzono za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego Supra 35 firmy ZEISS oraz mikroskopu sił atomowych AFM NTegra Spectra firmy NT-MDT. W kontaktowym trybie pracy stosowano sondy krzemowe VIT\_P o częstotliwości rezonansowej 400 kHz. Ponadto ocenę topografii powierzchni przeprowadzono również z wykorzystaniem profilometru optycznego LEICA DCM8.

### **4.2.5. Wybór wariantu temperaturowego do dalszych badań**

Na tym etapie przeanalizowano dotychczasowe wyniki badań i wybrano optymalny wariant temperaturowy do dalszego etapu. Jako decydujące wybrano czynniki, które w największym stopniu wpływały na poprawę właściwości powłoki.

### **4.2.6. Badania podatności powłoki do odkształceń**

W celu określenia podatności do odkształceń powłok  $\text{TiO}_2$  naniesionej na stal 316LVM przeprowadzono próbę zginania na próbkach o średnicy 1,5 mm. Uwzględniając technikę implantacji stentów wieńcowych zastosowano kąty gięcia 20°, 40° oraz 60°. W tym celu wykorzystano specjalnie przygotowane urządzenie, w którym zastosowano promień gięcia 5 mm. Podatność do odkształceń powłoki  $\text{TiO}_2$  oceniano na podstawie wyników badań potencjodynamicznych z odniesieniem do stanu wyjściowego. Badania przeprowadzono zgodnie z zaleceniami normy ASTM F2129 [100]. Stanowisko pomiarowe składało się z potencjostatu VoltaLab PGP201, elektrody odniesienia (nasycona elektroda kalomelowa SCE), elektrody pomocniczej (drut platynowy), anody (badana próbka) oraz komputera PC wraz z oprogramowaniem VoltaMaster 4. Badania korozyjne rozpoczynano od wyznaczenia

---

potencjału otwarcia  $E_{OCP}$  w warunkach bezprądowych w czasie  $t = 2h$ . Krzywe polaryzacji rejestrowano od wartości potencjału początkowego  $E_{init} = E_{OCP} - 100 \text{ mV}$ . Zmiana potencjału następowała w kierunku anodowym z szybkością  $0.167 \text{ mV/s}$ . Po osiągnięci gęstości prądu  $1 \text{ mA/cm}^2$  odwracano kierunek polaryzacji. Na podstawie uzyskanych krzywych wyznaczono potencjał korozyjny  $E_{corr}$ , potencjał przebicia  $E_b$  oraz korzystając z metody Sterna wartość oporu polaryzacyjnego  $R_p$ .

#### **4.2.7. Badania mikrostruktury**

Charakterystykę mikrostruktury warstwy powierzchniowej przeprowadzono z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej TEM. Cienkie folie do analiz TEM wykonano techniką zogniskowanej wiązki jonów galu (technika FIB). Obserwacje przeprowadzono w jasnym polu (TEM BF), czyli przy wykorzystaniu kontrastu dyfrakcyjnego oraz w trybie skaningowo-transmisyjnym (STEM), czyli przy wykorzystaniu kontrastu uzależnionego od liczby atomowej  $Z$ . Jakościową analizę składu chemicznego wykonano za pomocą techniki EDS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy). Badania wykonano na mikroskopie transmisyjnym THEMIS (200 kV) (FEG) firmy ThermoFisher Scientific.

#### **4.2.8. Badania własności biologicznych**

##### *Badania cytotoksyczności*

W ramach badań cytotoksyczności przeprowadzono ocenę żywotności komórek metodą bezpośrednią oraz analizę uwalniania LDH metoda pośrednią.

Badanie żywotności komórek zostało przeprowadzone metodą bezpośrednią zgodnie z normą ISO 10993-5:2009 na fibroblastach (L929 ATCC). W celu zapewnienia wiarygodności statystycznej dla każdej próbki pomiaru dokonano pięciokrotnie. Jako medium wykorzystano suplementowany PromoCell Fibroblast Growth Medium 2 wzbogacony antybiotykami (SIGMA ALDRICH Antibiotic Antimycotic Solution). Żywotność komórek została oceniona po 24-godzinnej inkubacji przy użyciu mikroskopii konfokalnej. W barwieniu przeżyciowym komórek zastosowano FDA (dwoctan fluoresceiny, nazwa handlowa Mitotracker Green) i PI (jodek propidyny). Lipofilowy FDA



---

przenika przez nienaruszoną błonę komórkową w żywym i aktywnym metabolicznie środowisku. FDA jest rozkładany przez esterazy komórkowe na fluoresceinę - substancję lipofobową. Fluoresceina gromadzi się w cytoplazmie żywych komórek i ma charakter substancji fluorescencyjnej. Substancja po oświetleniu niebieskim światłem daje zielony sygnał. Jodek propidyny przenika do komórki tylko w przypadku naruszenia ciągłości błony komórkowej. Po wprowadzeniu do cytoplazmy oznacza on kwasy nukleinowe, a po wzbudzeniu zielonym światłem barwi jądro komórki nekrotycznej na czerwono. Badania prowadzono przy wykorzystaniu skaningowego mikroskopu konfokalnego Carl Zeiss Exciter 5. Analizę obrazu i zliczanie komórek przeprowadzono przy użyciu oprogramowania ZEN 2008 i AxioVision 4 Module AutoMeasure.

Uzupełnieniem badań cytotoksyczności było badanie poziomu dehydrogenazy mleczanowej (LDH), substancji uwalnianej z uszkodzonych komórek, metodą bezpośrednią. Do przeprowadzenia badania wykorzystano komórki ludzkie fibroblasty (L929 ATCC), a jako medium do hodowli wykorzystano Fibroblast Growth Medium 2 (PromoCell) wzbogacony suplementami oraz antybiotykami. W naczynkach umieszczano próbki badanego materiału, a następnie nakładano 1 ml komórek pochodzących z konfluentnej hodowli i inkubowano je w 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> przez 48 h. Po tym czasie z nad próbki pobrano medium i odwirowywano, a następnie z odwirowanego roztworu pobrano nadsącz do analizy poziomu LDH za pomocą Cytotoxicity Assay Kit firmy Roche. Jest to test kolorymetryczny do ilościowego oznaczania śmierci i lizy komórek.

#### *Badanie proliferacji komórek*

Badanie proliferacji zostało wykonane na fibroblastach dermalnych Human Dermal Fibroblasts w wersji ze skóry dorosłej (NHDF-Ad). W badaniu oceniono jakościowo morfologię komórek, adhezję i kierunek procesów wydłużania na podstawie wyglądu cytoszkieletu, oraz ilość i rozmieszczenie jąder komórkowych a także ich zdolność do podziału. Proliferacja komórek została oceniona po 24-godzinnej inkubacji przy użyciu mikroskopii konfokalnej.

Jako medium komórkowe wykorzystano FGTM-2 Growth Media firmy Lonza. Ludzkie fibroblasty skórne firmy Lonza mają gwarancję 15 podwojeń populacji przy zastosowaniu FGTM-2 Growth Media. Hodowlę prowadzono w dedykowanym medium suplementowanym w inkubatorze w 37°C, 99% wilgotności i 5% CO<sub>2</sub>. Komórki zostały utrwalone formaldehydem, błony komórkowe zostały otwarte za pomocą TritonX-100.

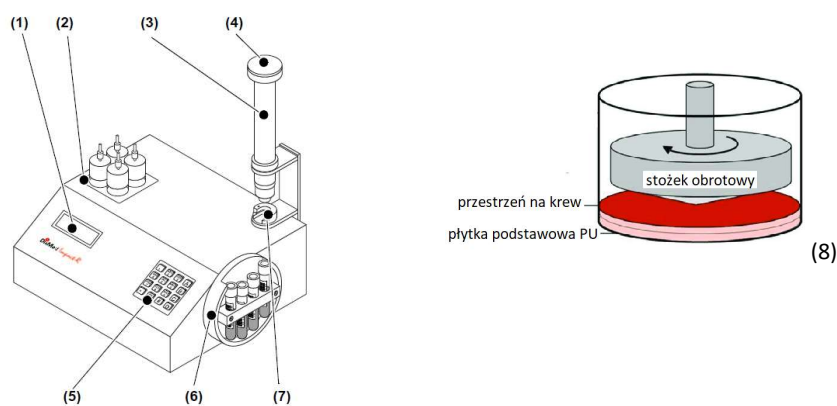
---

Do oceny proliferacji do barwienia jąder komórkowych zastosowano Invitrogen™ DAPI D1306 firmy Thermo Fisher pozwalający na barwienie kontrastowe jądrowe i chromosomowe. DAPI emituje niebieską fluorescencję po związaniu z regionami AT DNA.

Do barwienia F-aktyny (aktyny fibrylarnej) zastosowano barwnik Alexa Fluor 488 firmy Thermo Fisher (drugorzędowe przeciwciało królicze IgG) o zielonej fluorescencji. Aktyna jest elementem cytoszkieletu biorącym udział w podziale komórek, utrzymywaniu i zmianach kształtu oraz w ruchach komórki. Aktyna znakowana fluorescencyjnie jest ważnym narzędziem do badania dynamiki strukturalnej cytoszkieletu w żywych i utrwalonych komórkach.

#### *Badania własności trombogennych*

Celem przeprowadzonego badania była ocena własności trombogennych analizowanych materiałów na podstawie oceny aktywacji i agregacji płytek krwi. Badania trombogenności przeprowadzono na pełnej krwi ludzkiej z zastosowaniem komercyjnie dostępnego testera przepływów aortalnych Impact-R. Stanowisko do badań trombogenności przedstawiono na rycinie 18. Testy prowadzono w warunkach dynamicznych wprowadzając krew w ruch wirowy z określoną prędkością obrotową (780 rpm) nad powierzchnią próbek badanych. Czas ekspozycji krwi do naprężeń ścinających wynosił 2 min. Warunki eksperymentu symulowały zjawiska fizjologicznego przepływu krwi przy ścianie średnich naczyń tętniczych. Zastosowano markery aktywujące selektyny P i miejsce wiązania antygeny fibrynogenu w złożeniu GP IIb -IIIa (PAC-1). W celu analizy ilości agregatów przygotowano kontrole pozytywne i negatywne. Kontrolę negatywną otrzymano z krwi ludzkiej pobranej na cytrynian sodu. Pozytywna kontrola została przygotowana przez zmieszanie krwi z adenozyną di-fosforanem (ADP). Aktywację mierzono jako procent płytek krwi pozostających we krwi po teście ścinania w porównaniu z odsetkiem płytek wykazujących ekspresję P-selektyny i PAC-1 (receptor IIb/IIIa).



Ryc. 18 Stanowisko do badań trombogenności – Impact R [104]: (1) ekran LCD (2) Podkładka studni (silnik 1) (3) Jednostka mikroskopu (4) Moduł kamery USB (5) Klawiatura (6) Mieszanie próbki (silnik 2) (7) Tacka na próbki CMM (8) schemat stożka obrotowego [105]

Ekspresję markerów aktywacji płytek krwi określono za pomocą barwienia pełnej krwi. Porcje krwi 5  $\mu$ L delikatnie zmieszano z monoklonalnymi przeciwciałami skoniugowanymi z fluorochromem: 5  $\mu$ l FITC-PAC-1, 5  $\mu$ l PE-CD62P i 4  $\mu$ l PerCP-CD61 (Becton Dickinson, USA) w soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS) zawierającej 0,2% albuminy surowicy bydlęcej i 2 mM chlorku wapnia (końcowa objętość 35  $\mu$ l). Po 10 minutach barwienia w temperaturze pokojowej, erytrocyty poddano lizie przez dodanie 0,5 ml roztworu do lizy (FLS, Becton Dickinson, USA), a płytki krwi odwirowano (1000 g, 6 min.) i ponownie zawieszono w buforze PBS do dalszej analizy metodą cytometrii przepływowej. Próbki analizowano za pomocą cytometru przepływowego EPICS XL (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA). Ekspresję markerów aktywacji płytek krwi mierzono na obiektach bramkowanych CD61 przy użyciu przeciwciała PAC-1 do zmiany konformacyjnej glikoproteiny IIb/IIIa oraz przy użyciu CD62P dla P-selektyny. Zintegrowaną fluorescencję markera aktywacji obliczono jako sumę mnożenia średniej geometrycznej fluorescencji przez procent obiektów z dodatnim wynikiem markera.

Agregaty płytek analizowano po lizie erytrocytów przez zmieszanie 25  $\mu$ l krwi z 0,4 ml medium roboczego FLS a następnie utrwalenie przez dodanie 3,5 ml 1% paraformaldehydu w PBS. Materiał komórkowy odzyskano przez odwirowanie i barwiono immunologicznie z FITC-CD61. Próbki z CD61 pozostawiono w temperaturze pokojowej przez 30 minut, następnie płukano w PBS i analizowano metodą cytometrii przepływowej. Odsetek agregatów granulocyt-płytki krwi (leukocyty wybarwione markerem płytkowym CD61) obliczono za pomocą bramki rozpraszania przedniego/bocznego granulocytów

---

i dodatkowego monocytu. Bezwzględną liczbę płytek krwi obliczono jako liczba obiektów CD61-dodatnich w odniesieniu do całkowitej liczby granulocytów. Małe i duże agregaty płytek zliczono przy użyciu bramek do rozpraszania do przodu/boku dla obiektów dodatnich pod względem CD61.

#### *Ocena oddziaływania biomateriału na krwinki czerwone*

Celem przeprowadzonych badań *in vitro* była ocena wpływu oddziaływania ekstraktów kontaktowanych z materiałami, na składniki krwi pełnej konserwowanej. Badania przeprowadzono zgodnie z normami PN-EN ISO 10993-4:2018-02 [107] oraz ASTM F 756-00 [108].

Badania przeprowadzono na krwi pełnej ludzkiej (KPK) pozyskanej z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Katowicach. Krew antykoagulowano płynem konserwującym CPDA. Badania obejmowały 3 grupy badane:

- Próba ślepa – KPK wolnostojąca w temperaturze pokojowej, niepoddawana warunkom eksperymentu,
- Kontrola ujemna – KPK bez kontaktu z badanym materiałem, poddawana warunkom eksperymentu (wolnemu mieszanii)
- Grupa badana – materiały kontaktowane z KPK w warunkach eksperymentalnych KPK poddano 3 godzinnemu kontaktowi z badanymi materiałami ekstraktami w temperaturze 37°C, w układzie wolnego mieszanii. Oddziaływanie badanych materiałów na parametry czerwonekrwinkowe określono poprzez ocenę: stopnia hemolizy, wyznaczonego poprzez obliczanie indeksu hemolizy badanych materiałów.

#### *Oznaczenie cytokin prozapalnych*

Badanie to koncentruje się na ilościowej analizie reakcji zapalnej. Cytokiny prozapalne odgrywają kluczową rolę w koordynowaniu komórkowej odpowiedzi immunologicznej i w modulowaniu układu odpornościowego. Cytokiny prozapalne ogólnie regulują wzrost, aktywację komórek, różnicowanie i zasiedlanie komórek odpornościowych do miejsc infekcji w celu kontrolowania i eliminowania patogenów wewnątrzkomórkowych.

Badanie przeprowadzono z wykorzystaniem testów Invitrogen cytokine ELISA kits firmy Thermo Fisher, zawierających receptory najistotniejszych cytokin prozapalnych. Do badań został wykorzystany nadsącz z hodowli fibroblastów L929, które zostały

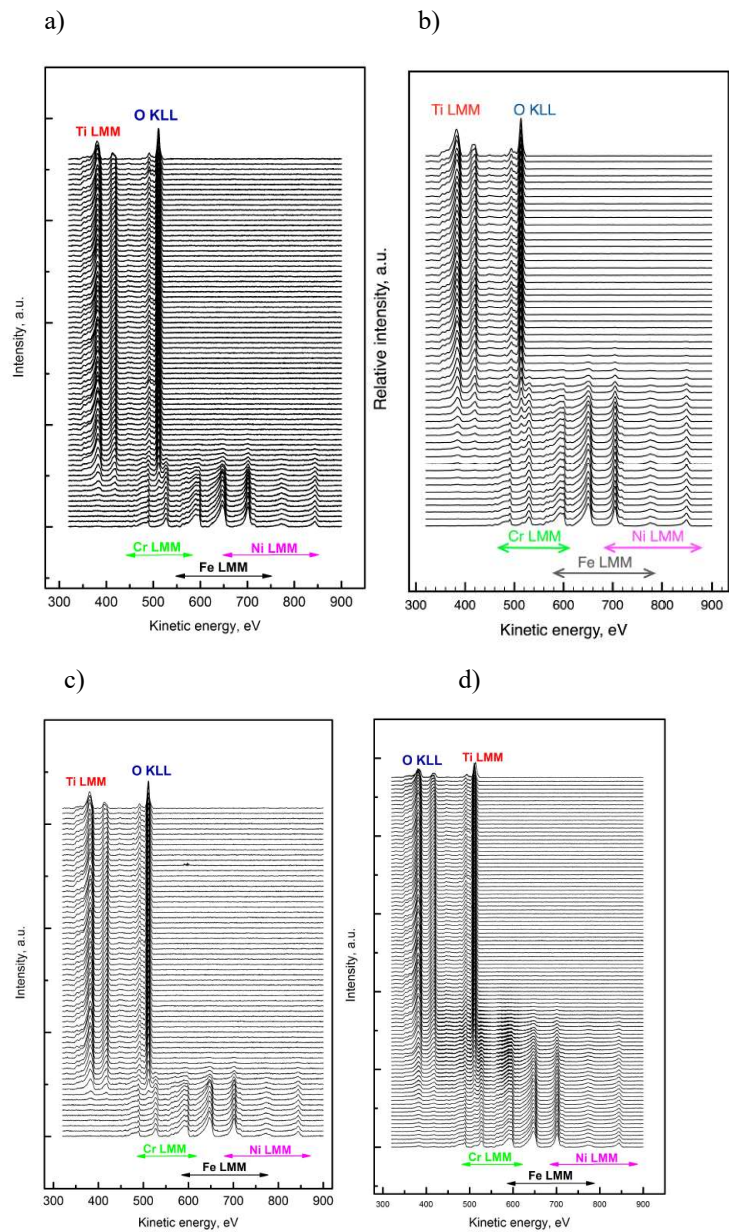
---

wyhodowane do pełnej konfluencji. Pomiarów dokonano metodą kolorymetryczną za pomocą spektrofotometru Elisa firmy Tehrmo Fisher. Podstawą kolorymetrycznych metod oznaczania jest zależność między absorbancją, a stężeniem oznaczanego składnika w badanym roztworze.

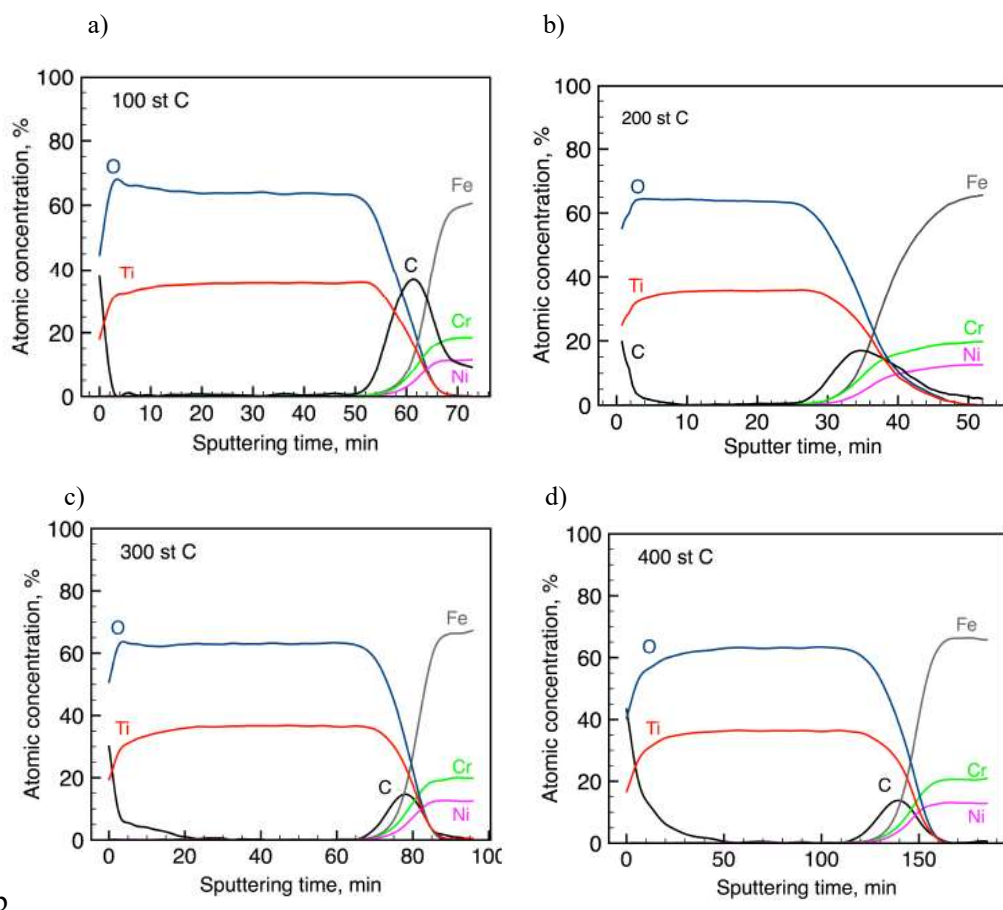
## **4.3. Wyniki badań**

### **4.3.1. Badania składu chemicznego warstwy powierzchniowej**

Wyniki przeprowadzonego składu chemicznego warstwy powierzchniowej przedstawiono na rycinie 19. Rysunki obrazują zmierzone zróżniczkowane spektra AES ¶ w przedziałach energetycznych dla serii widmowych wszystkich pierwiastków tworzących strukturę analizowanych próbek z powłoką TiO<sub>2</sub> naniesioną przy różnych wartościach temperatury procesu (są to serie widmowe O KLL, Ti LMM, Ni LMM, Cr LMM, Fe KLL). Powłoka TiO<sub>2</sub> na podłożu stali 316LVM zawierała tytan i tlen w położeniach charakterystycznych dla wiązania TiO<sub>2</sub>. Powłoka jest wolna od obecności Cr i Ni. Na podstawie przeprowadzonych badań nie stwierdzono istotnych różnic w rozkładzie składu chemicznego powłoki TiO<sub>2</sub> w zależności od temperatury procesu nanoszenia. Między widmami nie zaobserwowano różnic w położeniach i natężeniach pików, co świadczy o chemicznej jednorodności powłoki TiO<sub>2</sub>. Na powierzchni i w obszarze przypowierzchniowym wszystkich analizowanych próbek obecny jest węgiel. Występuje on również w obszarze interfazy TiO<sub>2</sub>/stal 316LVM. Pojawienie się węgla związane jest z obecnością naturalnych zanieczyszczeń na powierzchni próbek.



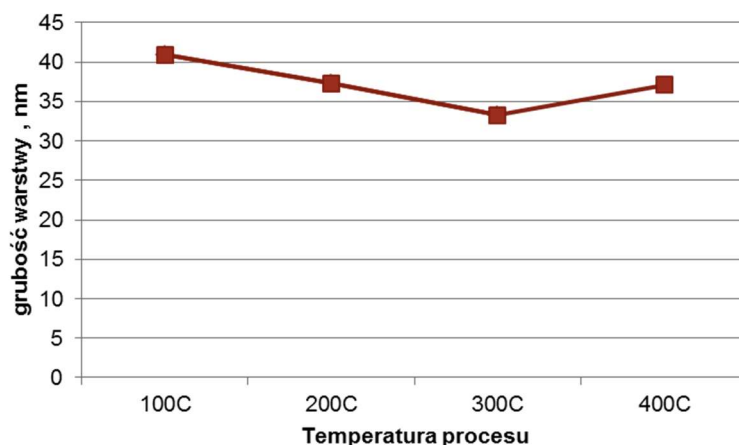
Ryc. 19 Ewolucja linii widmowych tytanu, tlenu, chromu, żelaza i niklu dla powłoki  $\text{TiO}_2$  naniesionej na stal 316LVM metodą ALD przy różnych temperaturach:  
 a) 100°C, b) 200°C, c) 300°C, d) 400°C



Ryc. 20 Profile głębokościowe składu chemicznego powłoki TiO<sub>2</sub> naniesionej na stal 316LVM metodą ALD przy różnych temperaturach:  
a) 100°C, b) 200°C, c) 300°C, d) 400°C

### 4.3.2. Badania grubości warstw

Wyniki uzyskanych pomiarów grubości warstw przedstawiono na rycinie 21. Na podstawie uzyskanych wyników nie stwierdzono istotnego wpływu temperatury nanoszenia na grubość powłoki. Średnia wartość grubości powłoki TiO<sub>2</sub> wynosiła 35nm.



Ryc. 21 Zależność grubości powłoki TiO<sub>2</sub> w funkcji temperatury procesu

### 4.3.3. Badania własności elektrochemicznych

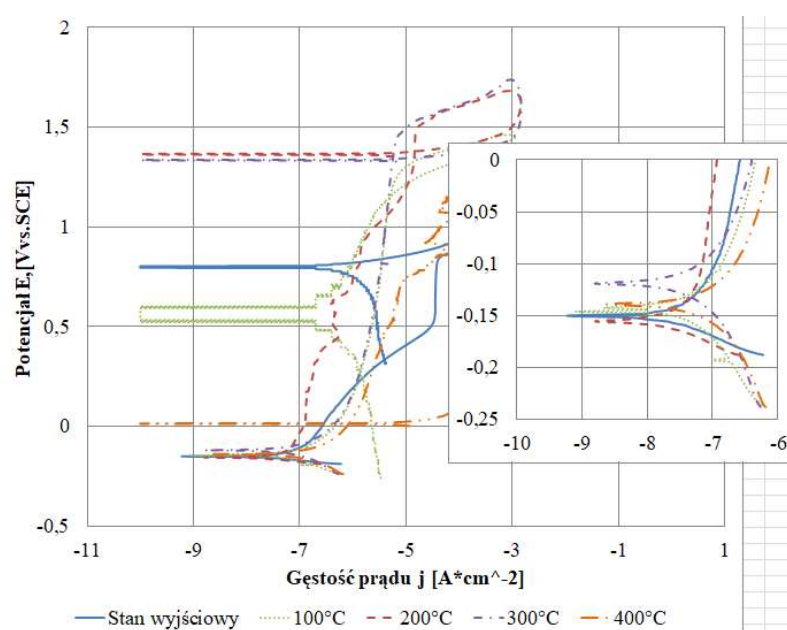
#### *Badania odporności na korozję wżerową*

Wyniki badań potencjodynamicznych odporności na korozję wżerową przedstawiono w tabeli 6 i na rycinie 22. Na podstawie zarejestrowanych krzywych stwierdzono zróżnicowane wartości parametrów charakteryzujących odporność na korozję wżerową w zależności od temperatury nanoszenia. Stwierdzono, że jedynie próbka z powłoką TiO<sub>2</sub> naniesioną w temperaturze 400°C nie poprawiła odporności na korozję wżerową w porównaniu z próbkami niepokrytymi, o czym świadczy mniejsza wartość potencjału przebicia oraz oporu polaryzacyjnego – tab. 6. Najkorzystniejszą odpornością na korozję charakteryzowała się próbka z powłoką TiO<sub>2</sub> naniesioną w temperaturze 200°C.



## Wyniki badań potencjodynamicznych

Temperatura procesu	$E_{corr}$ , mV	SD	$E_b$ , mV	SD	$E_{cp}$ , mV	SD	$E_{tr}$ , mV	SD	$R_p$ , $k\Omega \cdot cm^2$	SD
Stan wyjściowy	-211	±63	+1198	±12	+977	±32	-	-	211	±44
100 °C	-174	±20	+1408	±15	+1143	±66	-	-	252	±57
200 °C	-214	±60	+1584	±48	+1389	±5	-	-	415	±83
300 °C	-138	±3	+1608	±16	+1363	±12	-	-	276	±20
400 °C	-177	±18	+1168	±317	+408	±647	-	-	204	±34

Ryc. 22 Krzywe polaryzacji próbek z powłoką  $TiO_2$  naniesioną na stal 316LVM*Badania odporności na korozję szczelinową*

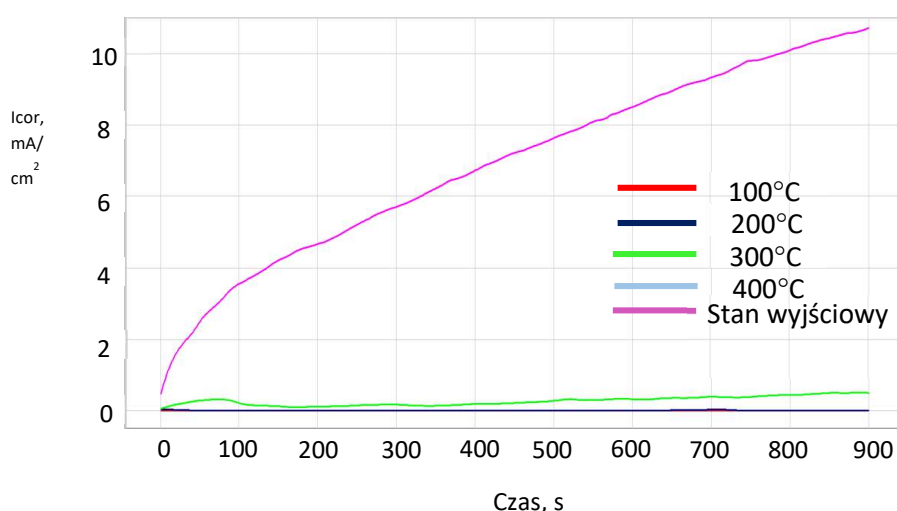
Wyniki badań odporności na korozję szczelinową przedstawiono w tabeli 7 i na rycinie 26. Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzono, że materiał w stanie wyjściowym po procesie polerowania elektrochemicznego i pasywacji nie jest odporny na ten rodzaj korozji. Z kolei uzyskane wyniki dla próbek z naniesioną powłoką  $TiO_2$  potwierdziły

odporność na ten rodzaj korozji niezależnie od zastosowanej temperatury procesu nanoszenia.

Tabela 7

Wyniki badań potencjostatycznych

Lp.	Modyfikacja powierzchni	Odporność na korozję szczelinową	Gęstość prądu po 20 s	Gęstość prądu po 900 s	Gęstość ładunku elektrycznego
			mA/cm <sup>2</sup>	mA/cm <sup>2</sup>	mC/cm <sup>2</sup>
1	Stan wyjściowy	NIE	1,3	10,5	45,2
2	100°C	TAK	0,2	0,01	1,1
3	200°C	TAK	0,08	0,01	0,6
4	300°C	TAK	0,5	0,3	2,1
5	400°C	TAK	0,3	0,09	1,8

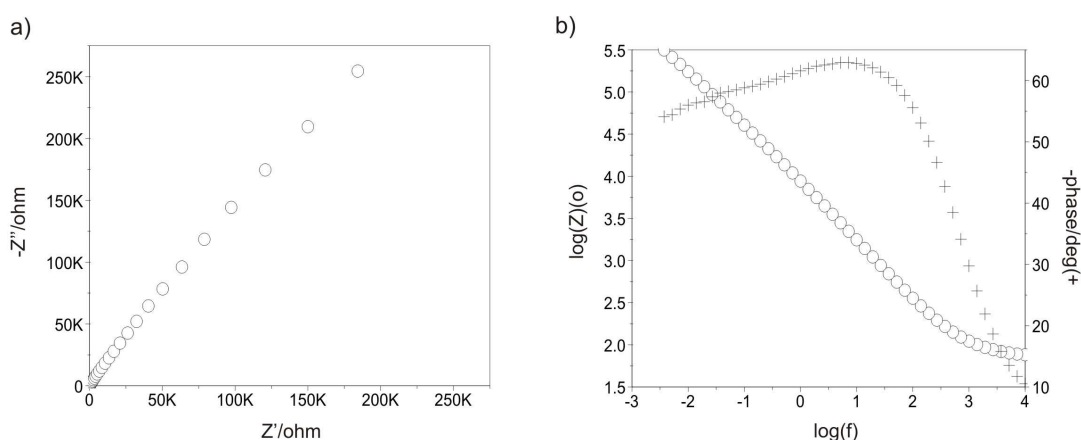


Ryc. 23 Krzywe zmiany gęstości prądu w funkcji czasu dla stali 316LVM zmodyfikowanej powierzchniowo

*Badania powłok z wykorzystaniem elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej*

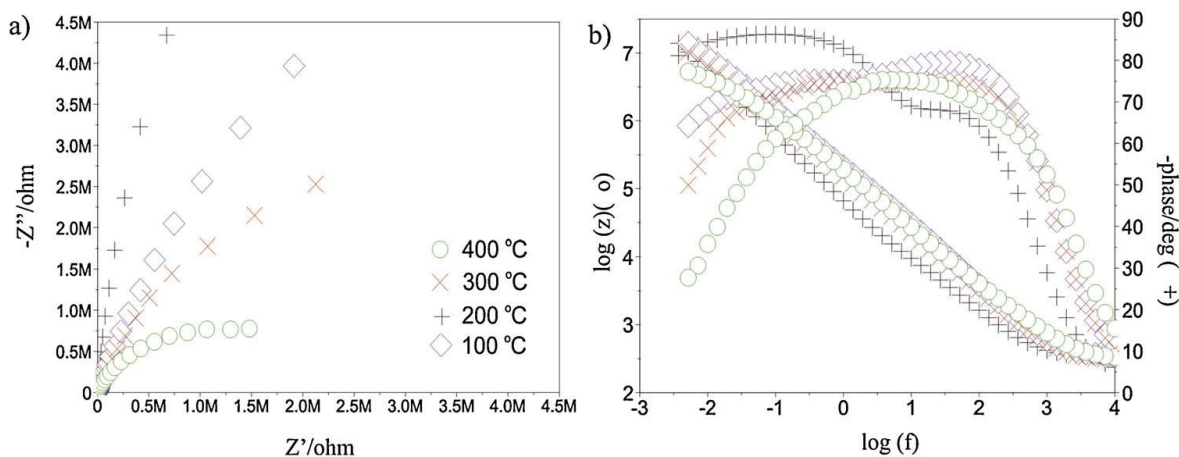
W kolejnym etapie pracy w celu określenia własności elektrochemicznych przeprowadzono badania impedancyjne (EIS). W wyniku zrealizowanych pomiarów częstotliwościowych wyznaczono charakterystyki: amplitudowo-fazową  $Z''(Z')$  oraz amplitudową  $|Z(f)|$  i fazową  $\Theta(f)$  badanego procesu korozyjnego, które przedstawiono na ryc. 24, 25. Wyznaczone widma impedancyjne wskazują na zróżnicowaną kinetykę procesów korozyjnych zachodzących w układzie stal 316LVM- powłoka  $TiO_2$  - sztuczne osocze. Do optymalizacji struktury obwodu odzwierciedlającego proces korozyjny

w badanym układzie zastosowano procedurę optymalizacyjną wykorzystującą metodą Levenberga-Marquardta, która opiera się na numerycznym algorytmie minimalizacji błędu średniokwadratowego. Zaproponowano zastosowanie dwóch elementów stało fazowych w elektrycznym obwodzie zastępczym, co korzystnie wpłynęło na jakość dopasowania krzywych wyznaczonych eksperymentalnie, gdzie  $R_s$  oznacza opór elektrolitu (sztuczne osocze),  $CPE_p$  – pojemność powierzchniowej strefy materiału o dużym stopniu rozwinięcia powierzchni, a  $R_p$  – odzwierciedlający opór elektrolitu w tej strefie materiału, z kolei  $R_{ct}$  i  $CPE_{dl}$  – opór i pojemność warstwy podwójnej – ryc. 26.

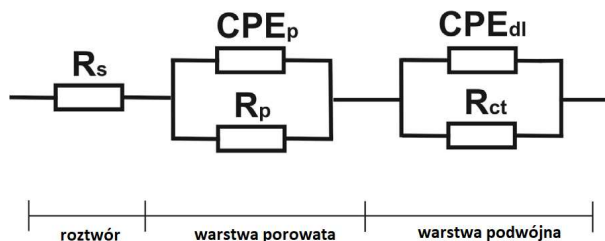


Ryc. 24 Widma impedancyjne wyznaczone dla stali 316LVM:

a) Nyquist diagram, b) Bode diagram



Ryc. 25 Widma impedancyjne wyznaczone dla powłoki  $\text{TiO}_2$  naniesionej na stal 316LVM: a) Nyquist diagram, b) Bode diagram



Ryc. 26 Model elektryczny obwodu zastępczego dla 316LVM -powłoka TiO<sub>2</sub> – sztuczne osocze.

Matematyczny model impedancji powyższego układu przedstawia również równanie (1):

$$Z = R_s + \frac{1}{\frac{1}{R_p} + Y_0(j\omega)^{n_1}} + \frac{1}{\frac{1}{R_{ct}} + Y_0(j\omega)^{n_2}} \quad (1)$$

Na podstawie schematów zastępczych wyznaczono charakterystyczne wielkości opisujące odporność na korozję przy różnych wartościach potencjału utleniania anodowego – tab. 8.

Tabela 8

#### Wyniki badań EIS

Temperatura procesu	R <sub>s</sub> , Ωcm <sup>2</sup>	R <sub>p</sub> , kΩcm <sup>2</sup>	CPE <sub>p</sub>		R <sub>ct</sub> , MΩcm <sup>2</sup>	CPE <sub>dl</sub>		E <sub>OCP</sub> , mV
			Y <sub>0</sub> , Ω <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup> s <sup>-n</sup>	n		Y <sub>0</sub> , Ω <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup> s <sup>-n</sup>	n	
Stan wyjściowy	17	0,2	0,2621E-4	0,87	2,5	0,1887E-4	0,87	-198
100°C	26	55	0,9716E-5	0,97	15,20	0,3749E-5	0,88	-288
200°C	26	15	0,8268E-5	0,81	43,50	0,2002E-4	0,81	-268
300°C	25	65	0,2328E-4	0,98	6,75	0,4322E-5	0,85	-227
400°C	27	26	0,1626E-4	0,98	2,07	0,3923E-4	0,81	-280

### *Badania przenikania jonów metali do roztworu*

Wyniki przeprowadzonych badań przenikania jonów metalicznych do roztworu przedstawiono w tabeli 9. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono wpływ temperatury procesu nanoszenia powłoki TiO<sub>2</sub> na liczbę jonów metalicznych w roztworze fizjologicznym. Najlepszą barierę zabezpieczającą przed przenikaniem jonów metalicznych do roztworu stanowiła powłoka naniesiona w temperaturze 100°C i 200°C. Ponadto stwierdzono, że im większa temperatura procesu nanoszenia tym większe jest przenikanie jonów metalicznych do roztworu.

Tabela 9

Wyniki przenikania jonów metalicznych do roztworu

Temperatura procesu	Stężenie jonów metalicznych, ppm (wartość średnia)									
	Fe	SD	Cr	SD	Ni	SD	Mo	SD	Ti	SD
Stan wyjściowy	0,201	±0,01	0,055	±0,002	0,078	±0,002	0,105	±0,01	-	-
100°C	0,099	±0,002	-	-	-	-	0,099	±0,001	0,105	±0,001
200°C	0,104	±0,01	-	-	-	-	0,105	±0,002	0,112	±0,002
300°C	0,111	±0,01	0,022	±0,001	0,089	±0,001	0,110	±0,001	0,120	±0,001
400°C	0,121	±0,01	0,029	±0,001	0,095	±0,001	0,121	±0,001	0,134	±0,001

### **4.3.4. Badania własności fizycznych**

#### *Badania adhezji powłok do podłoża*

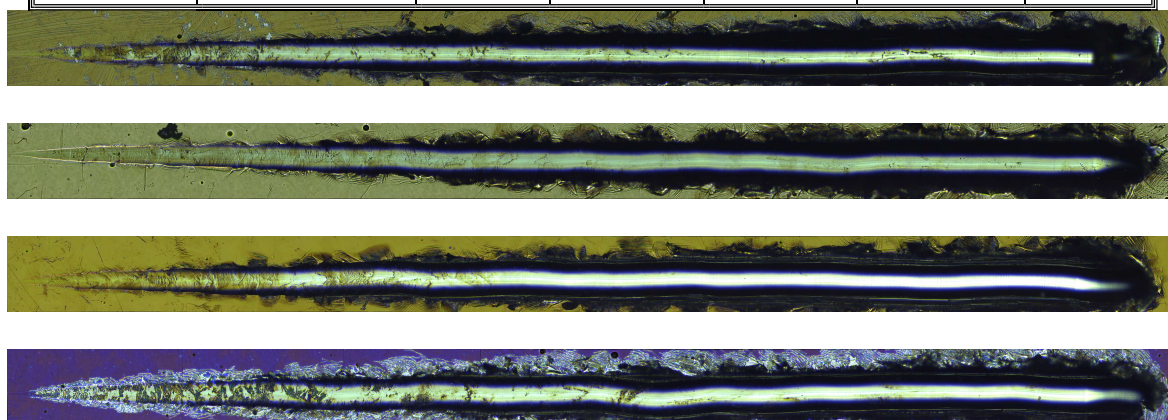
Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono wpływ temperatury procesu nanoszenia warstwy TiO<sub>2</sub> na wartość siły krytycznej Lc będącej miarą adhezji – tab. 10. Najlepszą przyczepnością do podłoża ze stali 316LVM charakteryzowały się próbki z powłoką TiO<sub>2</sub> naniesioną w temperaturach T = 200°C i T = 300°C. Dla tych przypadków wartość siły krytycznej, która spowodowała delaminację powłoki, rozwarstwienia na

zewnątrz i wewnątrz wynosiła odpowiednio  $L_{c2} = 7220$  mN (dla  $T = 200^{\circ}\text{C}$ ) oraz  $L_{c2} = 8020$  mN (dla  $T = 300^{\circ}\text{C}$ ) – ryc. 32.

Tabela 10

Wyniki adhezji warstw  $\text{TiO}_2$  naniesionych na stal 316 LVM

Temperatura procesu, $^{\circ}\text{C}$	Uszkodzenia powłoki	Wartość siły $F_n$ , mN				
		Pomiar 1	Pomiar 2	Pomiar 3	Średnia	SD
100	Odprysk $L_{c1}$	780	1200	1250	1070	$\pm 210$
	Całkowite zerwanie $L_{c2}$	5960	4640	5390	5330	$\pm 540$
200	Odprysk $L_{c1}$	3390	3810	3290	3490	$\pm 225$
	Całkowite zerwanie $L_{c2}$	8160	6610	6890	7220	$\pm 674$
300	Odprysk $L_{c1}$	3350	4220	4010	3860	$\pm 370$
	Całkowite zerwanie $L_{c2}$	8790	7580	7710	8020	$\pm 542$
400	Odprysk $L_{c1}$	280	520	360	380	$\pm 99$
	Całkowite zerwanie $L_{c2}$	1350	4930	3160	3140	$\pm 461$

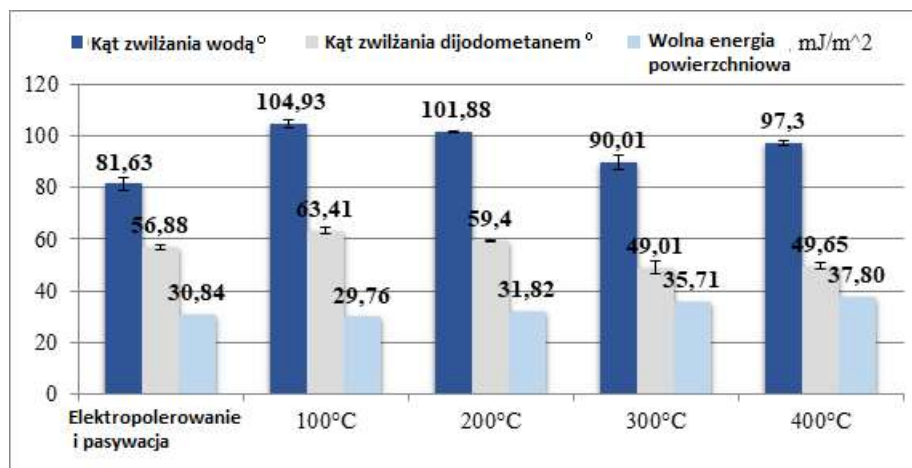


Ryc. 27 Przykładowe zarysowania powłoki  $\text{TiO}_2$  naniesionej na stal 316LVM przy temperaturze procesu:  
a)  $100^{\circ}\text{C}$ , b)  $200^{\circ}\text{C}$ , c)  $300^{\circ}\text{C}$ , d)  $400^{\circ}\text{C}$

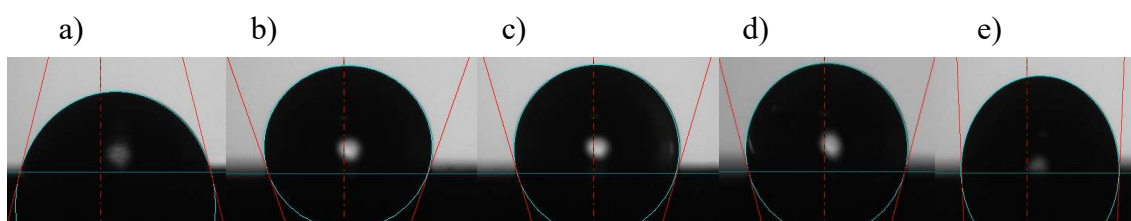
*Badania zwilżalności powierzchni*

Wyniki badania zwilżalności i energii powierzchniowej oraz przykładowe krople naniesione na powierzchnię próbek zmodyfikowanej powierzchniowo stali 316LVM przedstawiono na rycinach 28, 29.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że powłoka  $\text{TiO}_2$  niezależnie od temperatury procesu jej nanoszenia zwiększyła wartość kąta zwilżania  $\theta$ . Próbki w stanie wyjściowym charakteryzowały się powierzchnią hydrofilową ( $\theta_{\text{sr}}=81.63^\circ$ ) z kolei powłoką  $\text{TiO}_2$  miała charakter hydrofobowy. Nie zaobserwowano znaczących różnic w wartościach energii powierzchniowej dla wszystkich analizowanych powierzchni próbek.



Ryc. 28 Wyniki zwilżalności powierzchni zmodyfikowanej powierzchniowo stali 316LVM



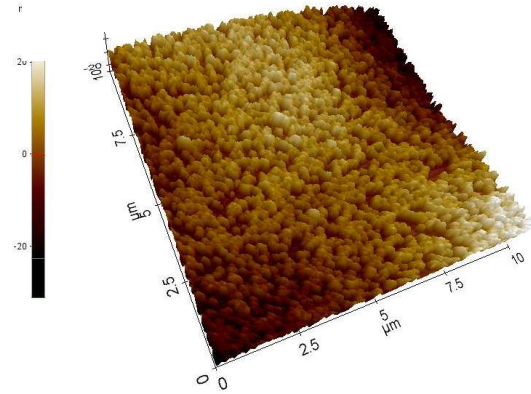
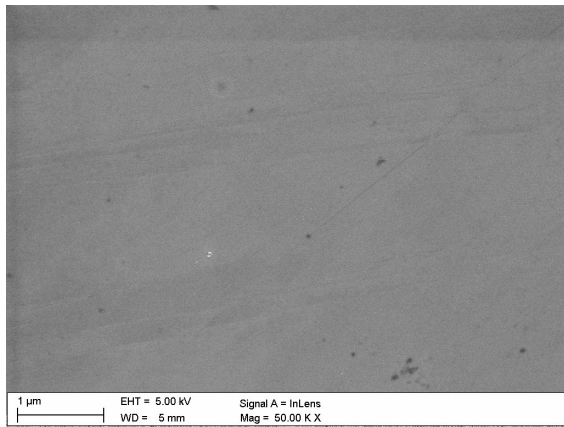
Ryc. 29 Przykładowe krople otrzymane podczas badania dla:

- a) stali 316LVM-stan wyjściowy, b)  $\text{TiO}_2$  przy 100°C, c)  $\text{TiO}_2$  przy 200°C, d)  $\text{TiO}_2$  przy 300°C, e)  $\text{TiO}_2$  przy 400°C

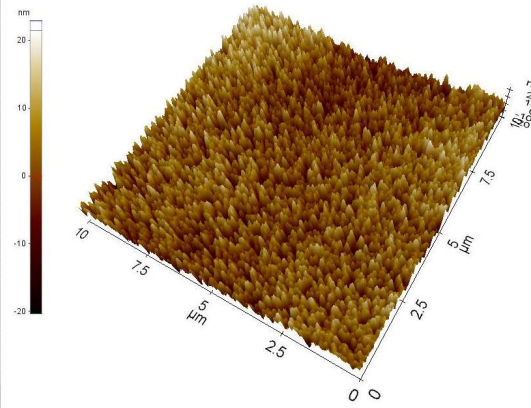
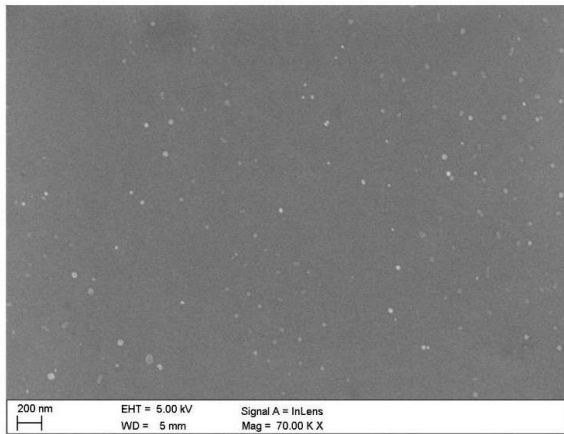
### Badania topografii powierzchni

Wyniki badań topografii powierzchni z wykorzystaniem mikroskopu sił atomowych AFM oraz z wykorzystaniem elektronowego mikroskopu skaningowego SEM nie wykazały różnic w morfologii powierzchni w zależności od zastosowanej temperatury procesu ALD – ryc. 30. We wszystkich przypadkach chropowatość powierzchni nie przekracza wartości zalecanej  $R_a = 160 \text{ nm}$  dla implantów stosowanych w układzie sercowo-naczyniowym- ryc. 31.

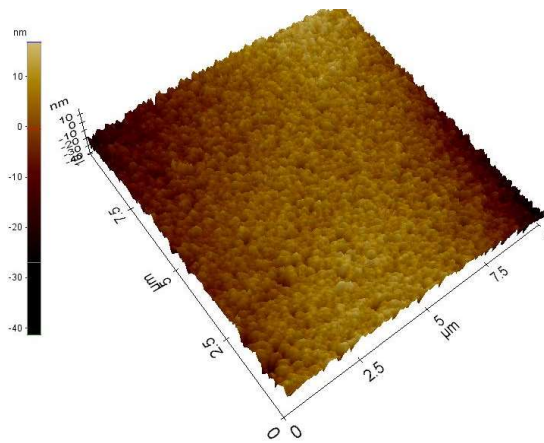
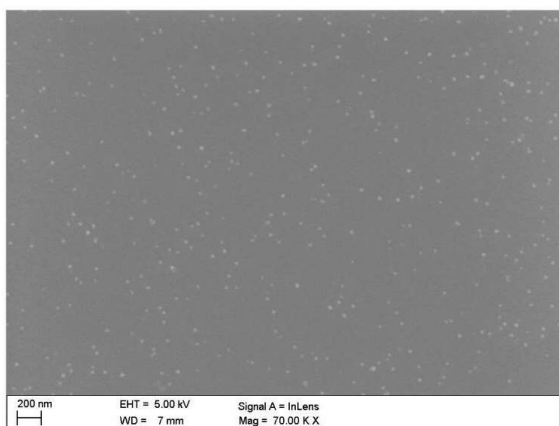
a)



b)

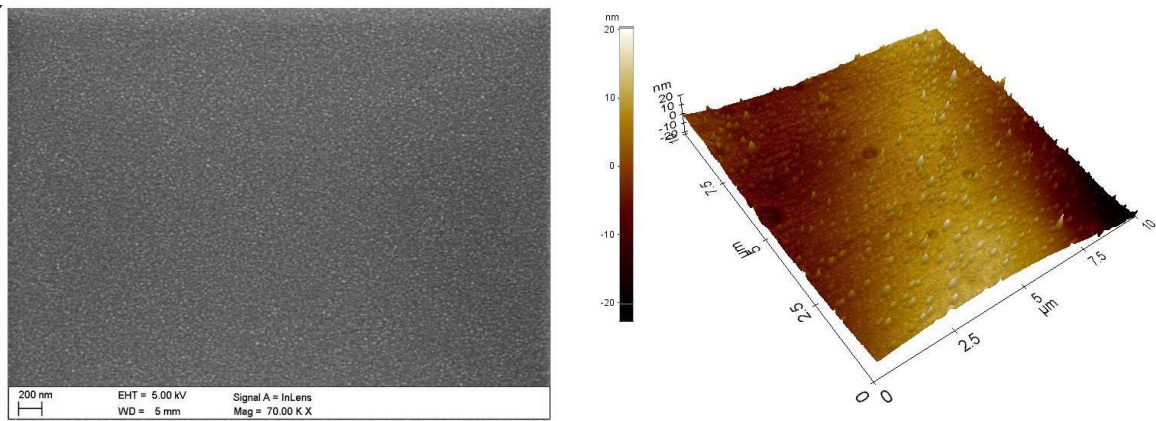


c)

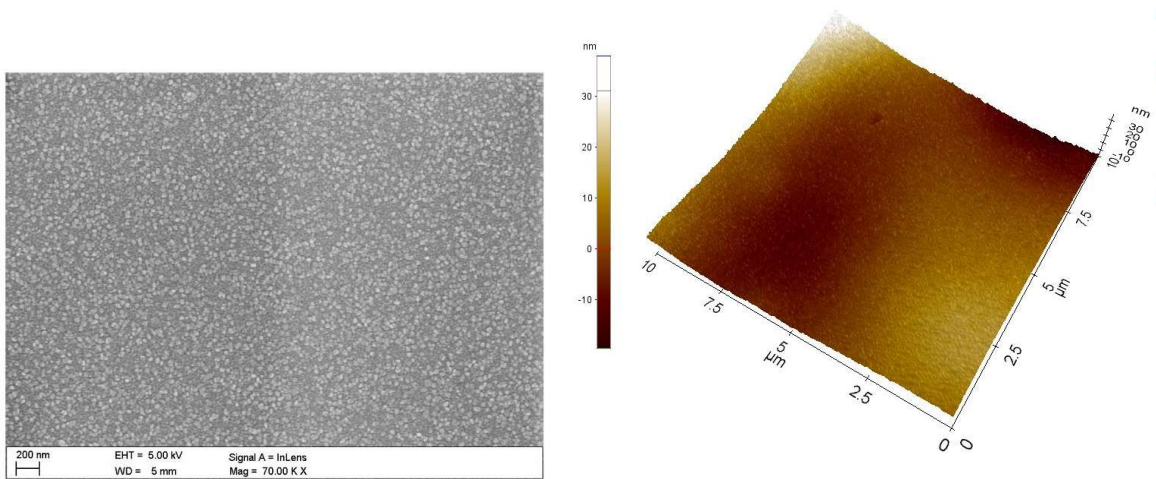




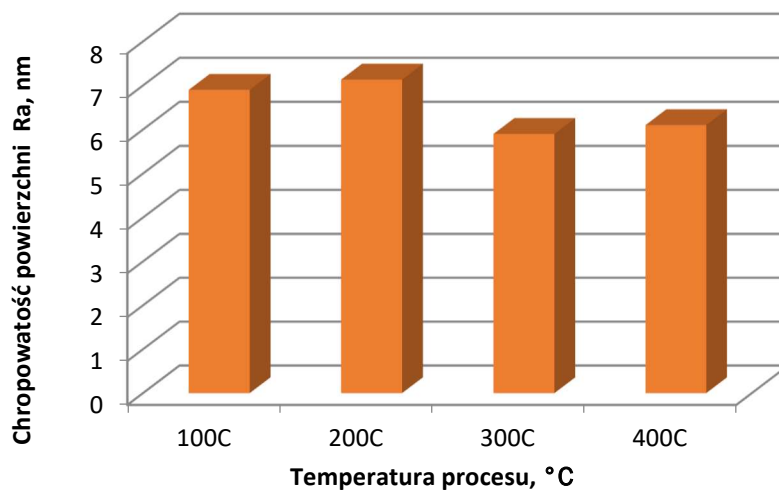
d)



e)



Ryc. 30 Morfologia powierzchni próbek z warstwą  $\text{TiO}_2$  naniesioną metoda ALD w temperaturach, AFM, SEM: a) 316 PLV stan wyjściowy b) 100°C, c) 200°C, d) 300°C, e) 400°C



Ryc. 31 Zależności parametru  $R_a$  w funkcji temperatury procesu ALD

---

### 4.3.5. Wybór wariantu temperaturowego do dalszych badań

Na podstawie analizy dotychczasowych wyników badań, do dalszego etapu badań wytypowano powłokę TiO<sub>2</sub> nanoszoną przy temperaturze 200°C. Jest to powłoka charakteryzująca się najkorzystniejszym zespołem właściwości fizykochemicznych, głównie w odniesieniu do badań elektrochemicznych.

### 4.3.6. Badania podatności powłoki do odkształceń

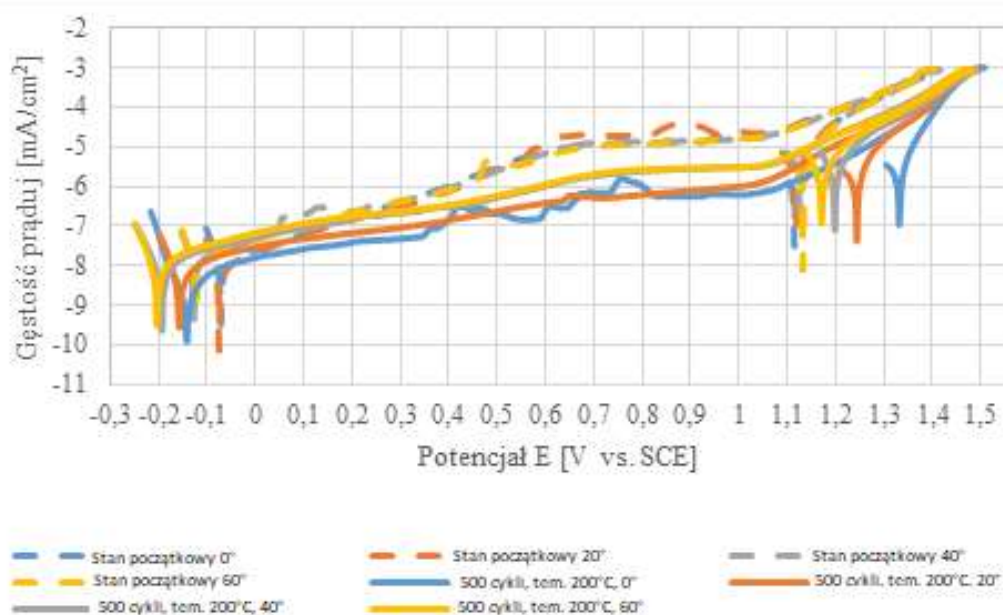
Badania podatności do odkształceń przeprowadzono dla powłoki TiO<sub>2</sub> nanoszonej przy temperaturze 200°C. Uzyskane wyniki potencjodynamiczne oceniające podatność powłoki przedstawiono w tabeli 11 oraz na ryc. 32. Zarejestrowane dla próbek w stanie wyjściowym wartości potencjału korozyjnego  $E_{\text{corr}}$  mieściły się w zakresie od -60 mV dla próbek nie odkształconych do wartości około -120 mV dla próbek odkształconych o kąt 60°. Nie stwierdzono natomiast wyraźnych zmian wartości potencjału przebicia oraz wartości oporu polaryzacyjnego w zależności od stopnia wygięcia próbek – tab. 11. Uzyskane wyniki stanowiły wartości referencyjne dla próbek z naniesioną powłoką TiO<sub>2</sub>. Stwierdzono, że naniesienie powłoki TiO<sub>2</sub> powoduje obniżenie wartości potencjałów korozyjnych w stosunku do stanu wyjściowego i jednocześnie tendencja ta utrzymuje się niezależnie od kąta wygięcia próbek. W przypadku wartości potencjału przebicia  $E_b$  niezależnie od kąta wygięcia naniesienie warstwy tlenkowej w procesie ALD spowodowało jego wzrost w stosunku do stanu wyjściowego o około 100 mV- tab. 11.

Analiza wartości oporu polaryzacyjnego  $R_p$  dla próbek z warstwą tlenkową wykazała wyraźny ich wzrost w stosunku do stanu wyjściowego, świadczący o korzystnym obniżeniu aktywności powierzchni badanego biomateriału w środowisku korozyjnym. Ponadto zauważono stałą tendencję do obniżania jego wartości wraz ze wzrostem kąta wygięcia – ryc. 33. Stwierdzono, że dopiero dla kąta wygięcia 60° osiąga on wartości zbliżone do stanu wyjściowego około  $R_p = 1600 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ .

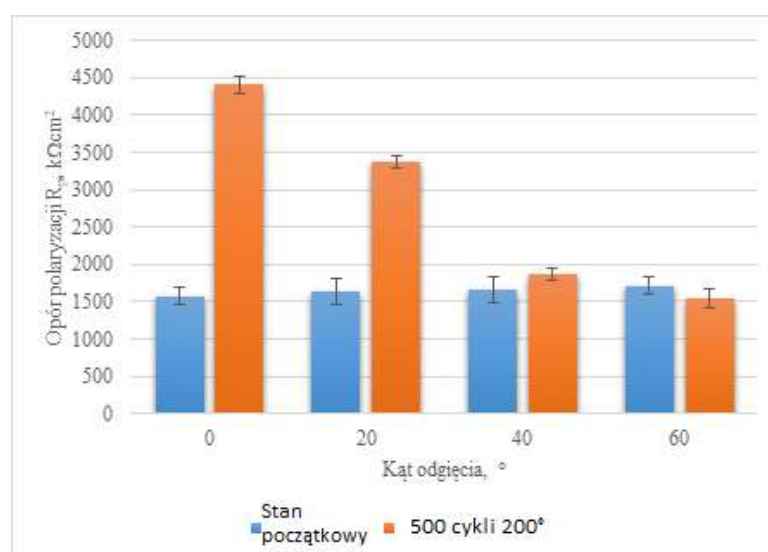
Tabela 11

Wyniki badań potencjodynamicznych zginania próbek w stanie wyjściowym i z powłoką TiO<sub>2</sub>

Powierzchnia	No	Kąt zgięcia, °	E <sub>corr</sub> , mV	E <sub>b</sub> , mV	R <sub>p</sub> , kΩcm <sup>2</sup>
Stan wyjściowy	1	0	-60(16)	+1295(10)	1573(±110)
	2	20	-86(18)	+1290(4)	1641(±169)
	3	40	-121(8)	+1290(3)	1663(±180)
	4	60	-119(1)	+1282(1)	1707(±117)
Powłoka TiO <sub>2</sub>	5	0	-140(6)	+1397(8)	4408(±117)
	6	20	-149(11)	+1390(6)	3371(±84)
	7	40	-182(13)	+1382(11)	1871(±84)
	8	60	-198(5)	+1376(4)	1550(±127)



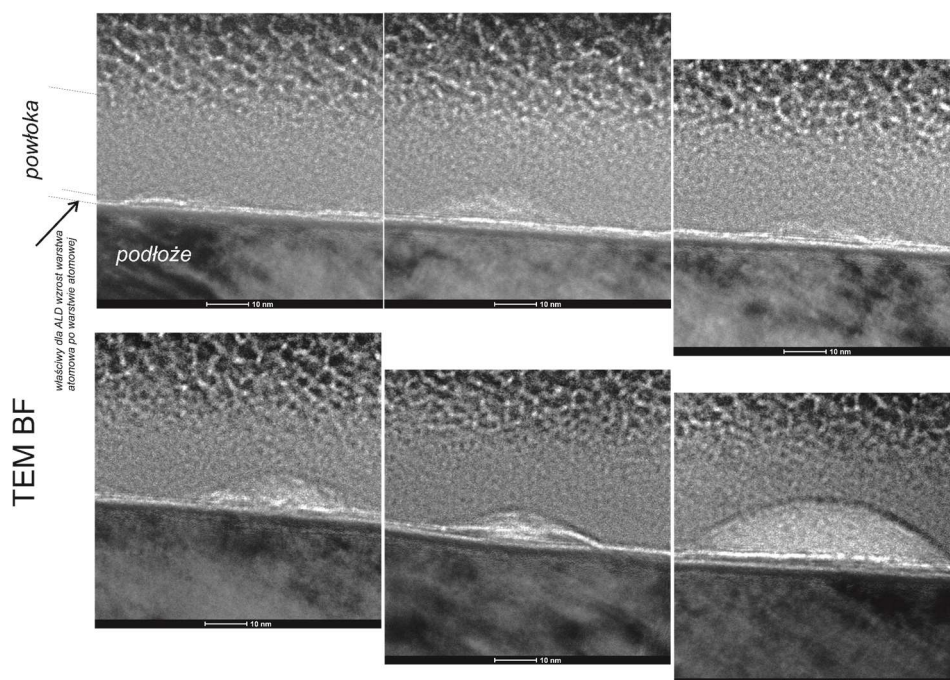
Ryc. 32 Krzywe polaryzacji dla próbek w stanie wyjściowym i z powłoką TiO<sub>2</sub> po różnym ugięciu



Ryc. 33 Porównanie oporu polaryzacyjnego R<sub>p</sub> po zgięciu dla próbek w stanie wyjściowym i po modyfikacji powierzchni z powłoką TiO<sub>2</sub>.

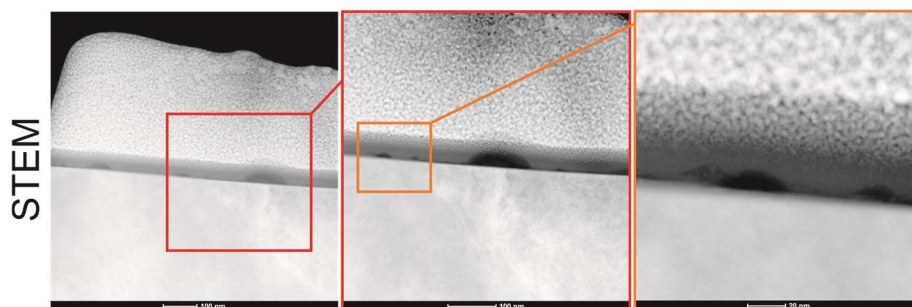
### 4.3.7. Badania mikrostruktury

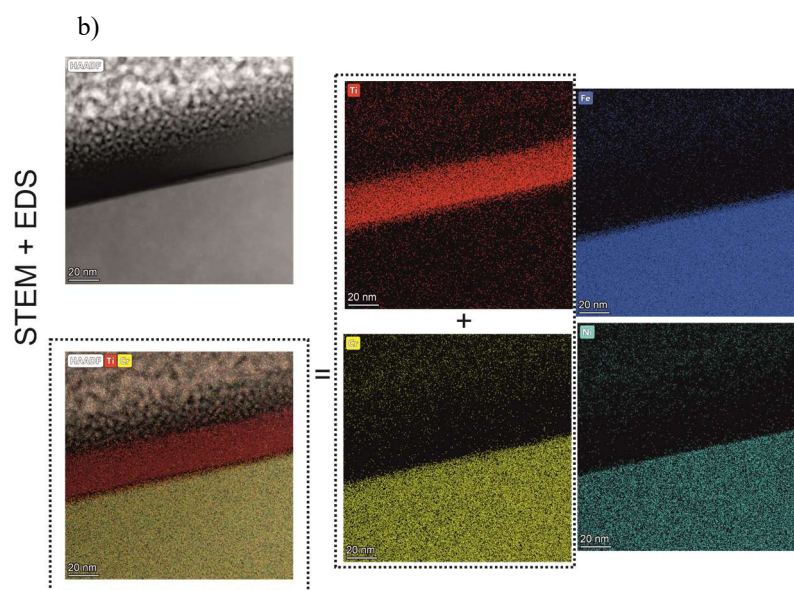
Wyniki przeprowadzonych badań mikrostruktury przedstawiono na rycinie 34-36. Badania z wykorzystaniem kontrastu dyfrakcyjnego wykazały na przekroju poprzecznym prawidłowy dla techniki ALD wzrost warstwy atomowej po warstwie atomowej w odległości około 5 nm od podłoża – ryc. 34. W dalszej odległości struktura była amorficzna (ryc.36). Ponadto zauważono również niepożądane pęcherze, co może świadczyć o słabszej jakości przylegania powłoki do podłoża – ryc. 35. Amorficzny charakter powłoki potwierdzony został również za pomocą skaningowej transmisyjnej mikroskopii elektronowej STEM oraz obrazów wysokorozdzielczych HRTEM – ryc. 35, 36.



Ryc. 34 Analiza mikrostrukturalna na granicy podłoże – powłoka TiO<sub>2</sub>, TEM BF

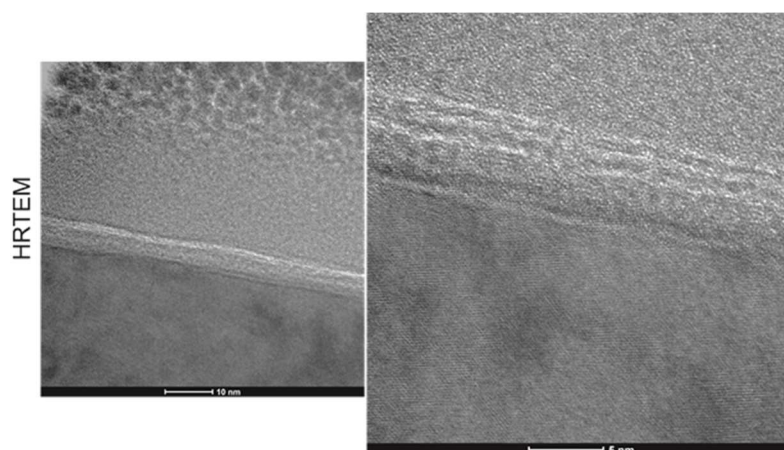
a)





Ryc. 35 Analiza mikrostrukturalna na granicy podłoże – powłoka TiO<sub>2</sub>,

a) STEM, b) STEM+EDS



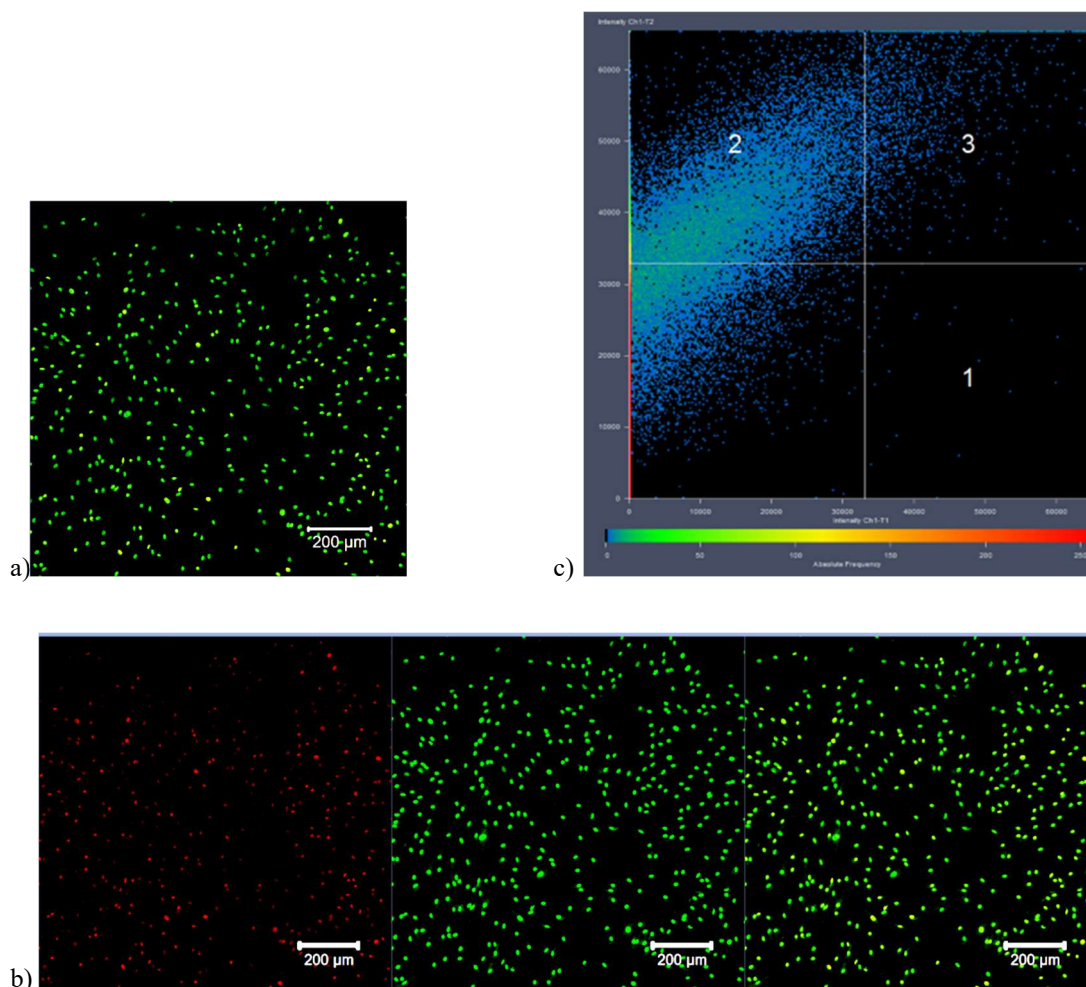
Ryc. 36 Analiza mikrostrukturalna na granicy podłoże – powłoka TiO<sub>2</sub>, HRTEM

### 4.3.8. Badania własności biologicznych

#### *Badania cytotoksyczności*

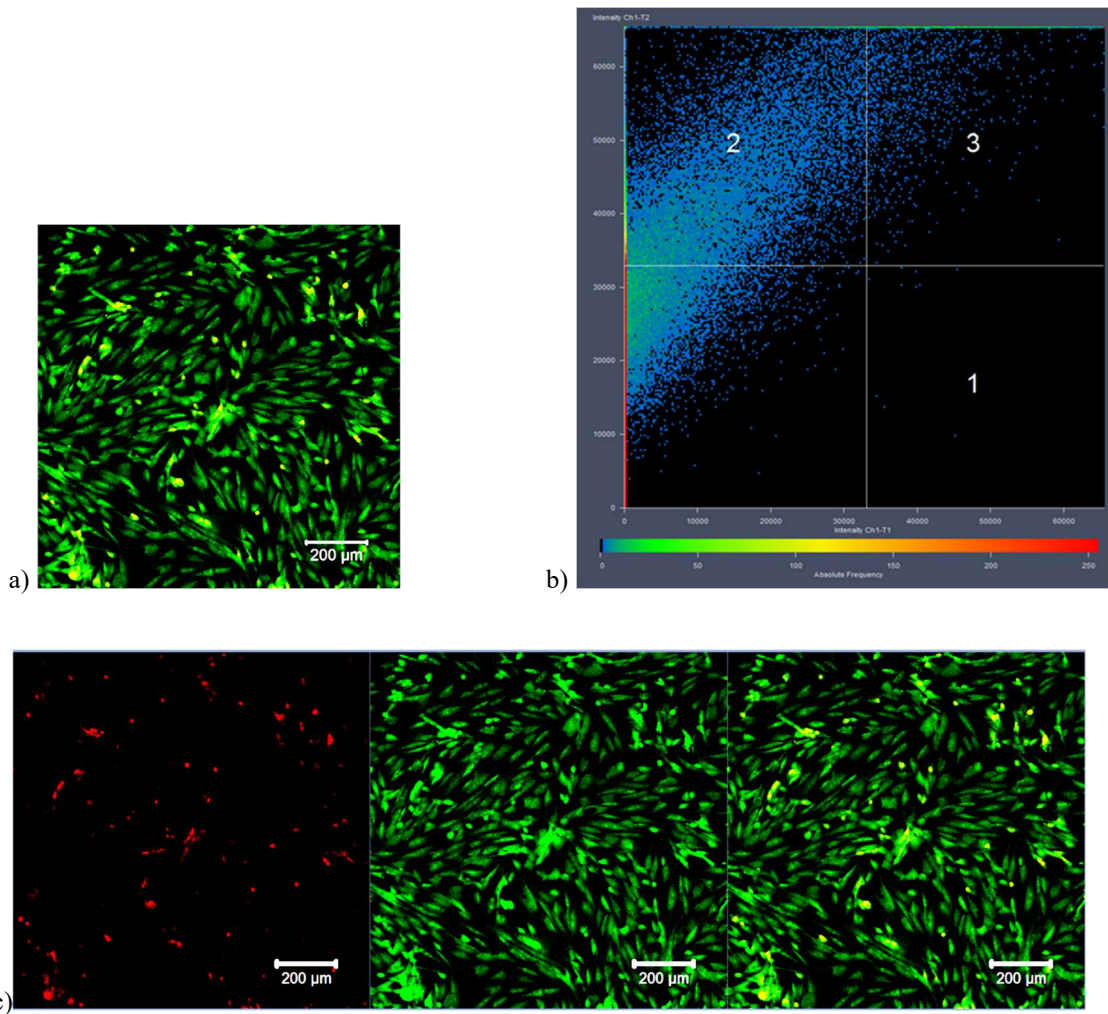
Wyniki przeprowadzonych badań przeżywalności komórek przedstawiono na ryc. 37-39. Analizując zdjęcia z mikroskopii konfokalnej można zauważyć mniejszą ilość komórek o aktywnych mitochondriach oraz większą ilość komórek nekrotycznych na podłożu 316LVM. Z kolei modyfikacja powierzchni poprzez naniesienie powłoki TiO<sub>2</sub> poprawiła właściwości biologiczne. Zaobserwowano spadek cytotoksyczności. Komórki na powierzchni powłoki mają wydłużony kształt oraz stwierdzono zmniejszoną ilość komórek nekrotycznych. Komórki fibroblasty należą do grupy komórek adherentnych. W przypadku

prawidłowego, z punktu widzenia biologii podłoża dochodzi do polaryzacji błony i aktywacji cytoszkieletu aktyny. Komórki wypuszczają tzw. filo- i lamelipodia co jest zjawiskiem korzystnym. Na podstawie badań stwierdzono przeżywalność na poziomie 95% i 100% odpowiednio dla próbek 316LVM oraz 316LVM z TiO<sub>2</sub>. Zgodnie z zapisami normy ISO 10993: Zmniejszenie żywotności komórek o ponad 30% uważa się za efekt cytotoksyczny, co jednak nie zostało zaobserwowane w przypadku analizowanych próbek.



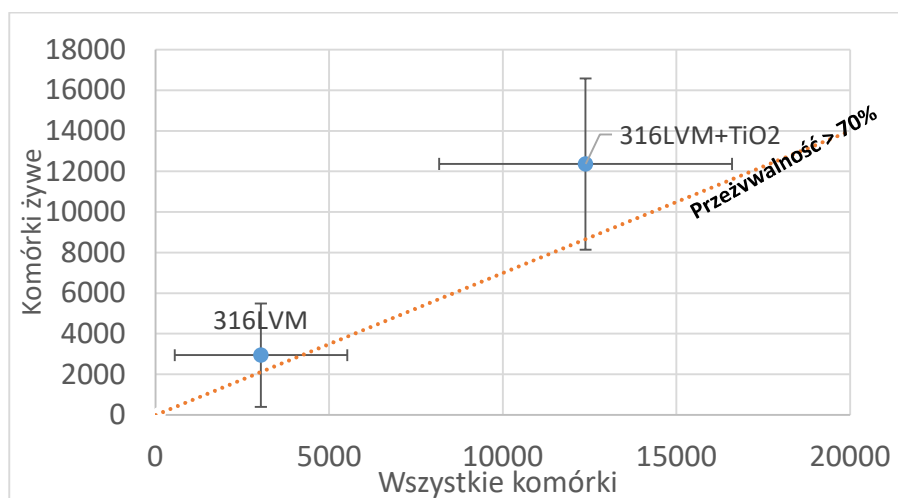
Ryc. 37 Poglądowe zdjęcia badań cytotoksyczności bezpośredniej wykonane za pomocą skaningowego mikroskopu laserowego próbki w stanie wyjściowym 316LVM.

- a) zdjęcie LSM- analiza przeżyciowa komórek na powierzchni, b) rozdzielanie poszczególnych kanałów obserwacji, c) moduł kolokalizacji



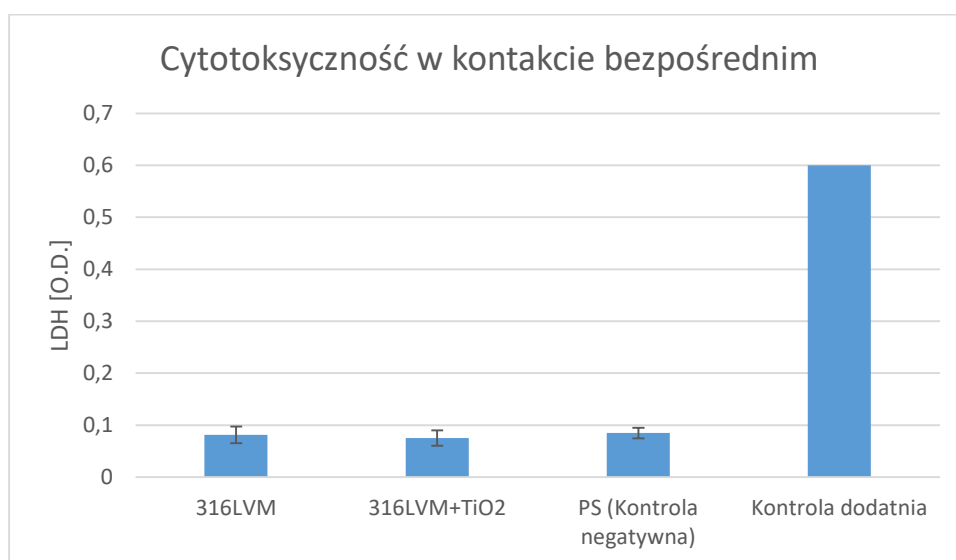
Ryc. 38 Poglądowe zdjęcia badań cytotoksyczności bezpośredniej wykonane za pomocą skaningowego mikroskopu laserowego próbki 316LVM z powłoką  $\text{TiO}_2$ .

a) zdjęcie LSM, b) rozdzielanie poszczególnych kanałów, c) moduł kolokalizacji



Ryc. 39 Liczba pikseli komórek żywych względem wszystkich komórek.

Na rycinie 39 przedstawiono wykres poziomu dehydrogenazy mleczanowej LDH. Im niższa wartość dla badanej próbki tym mniejsza ilość wydzielonego izoenzymu, co oznacza mniejszą cytotoksyczność. Dla badanych materiałów wszystkie wartości znajdują się w tym samym zakresie co wartość LDH dla materiału kontrolnego, który w tym badaniu stanowił PS. Kontrolę pozytywną została przedstawiona jako wartość krytyczna 0,6 co świadczy o 50% prawdopodobieństwie uszkodzenia błon komórkowych.

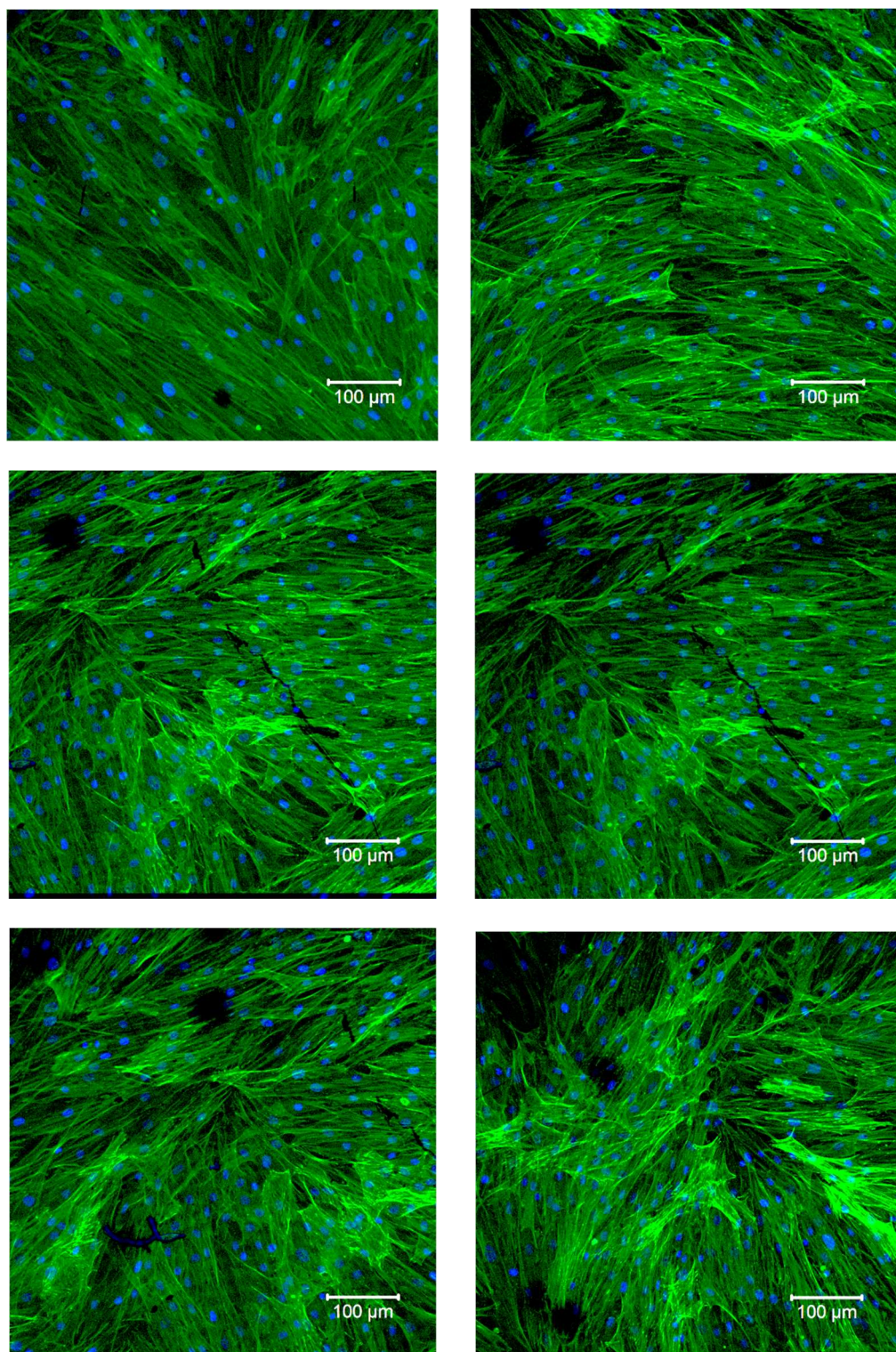


Ryc. 40 Poziom LDH dla badanych próbek w kontakcie bezpośrednim.

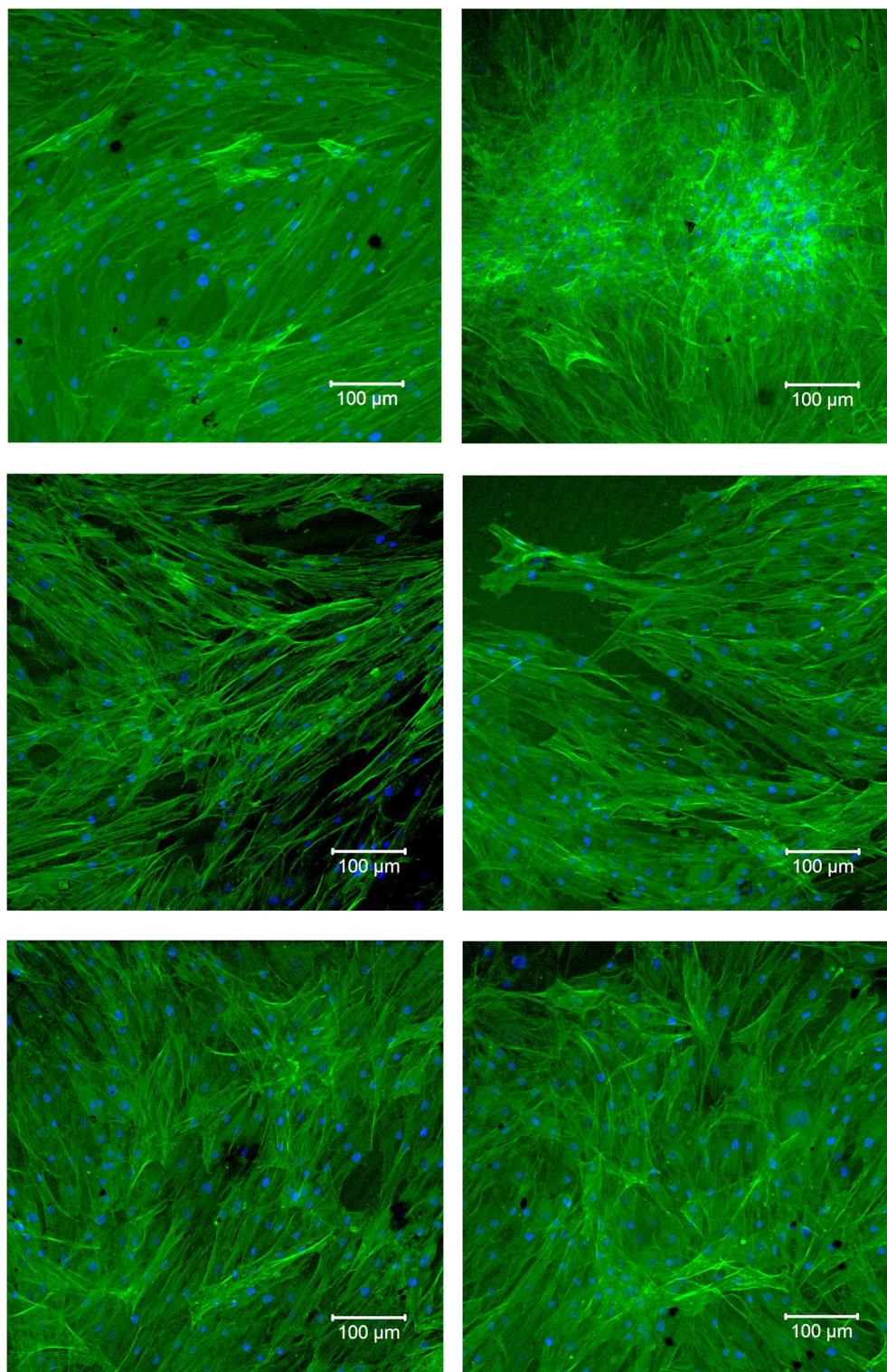
### *Badania proliferacji komórek*

Wyniki przeprowadzonych badań proliferacji komórek przedstawiono na rycinach 40-41. Analizując zdjęcia z mikroskopii konfokalnej, zarówno w przypadku podłoża referencyjnego 316LVM jak i powłoki TiO<sub>2</sub> można zaobserwować typowy prawidłowy wygląd fibroblastów z wrzecionowatym, wydłużonym kształtem, pewną ogniskową adhezją (jasne miejsca) oraz zróżnicowanym kierunkiem wydłużania. W obu przypadkach można zaobserwować liczne okrągłe lub owalne jądra komórkowe, niektóre w fazie podziału (zbliżone do siebie lub częściowo nakładające się niebieskie punkty). W przypadku powłoki można zauważyć większe zróżnicowanie cytoszkieletu oraz zróżnicowaną gęstość i długość filamentów aktynowych. Widoczne są również miejsca o zwiększonym zagęszczeniu jąder komórkowych.





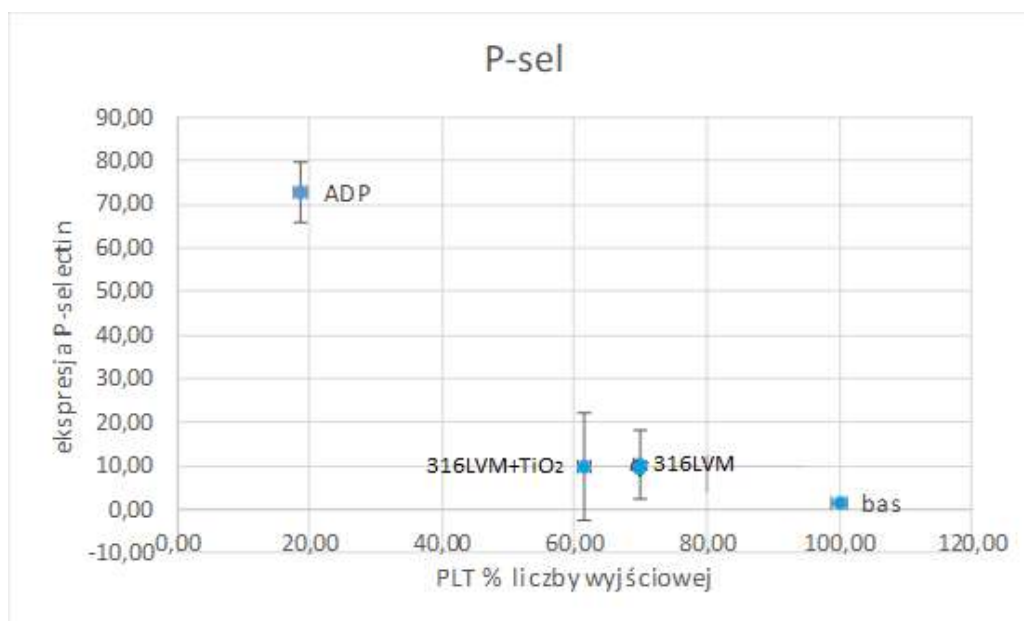
Ryc. 41 Przykładowe zdjęcia badań proliferacji wykonane za pomocą skaningowego mikroskopu laserowego próbki 316LVM



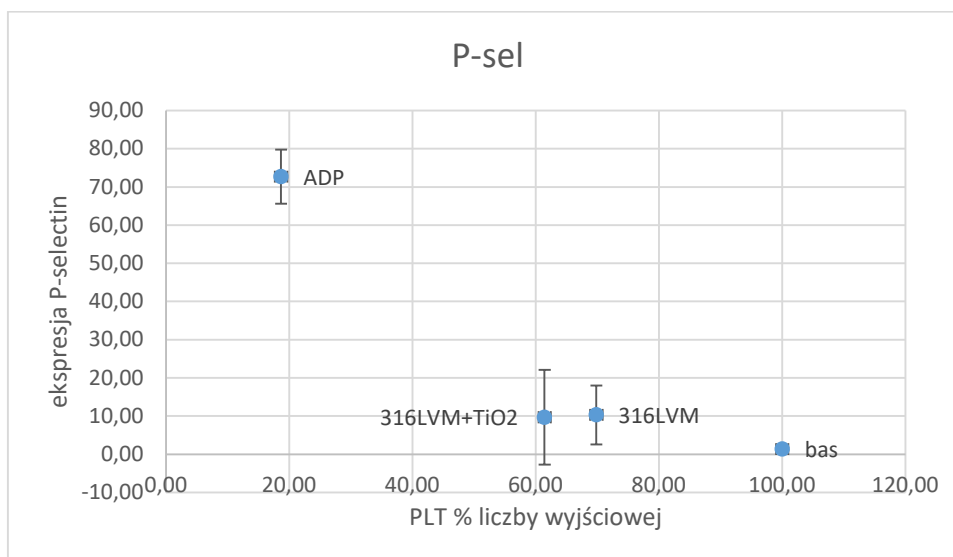
Ryc. 42 Przykładowe zdjęcia badań proliferacji wykonane za pomocą skaningowego mikroskopu laserowego próbki 316LVM z powłoką  $\text{TiO}_2$

## Badania trombogenności

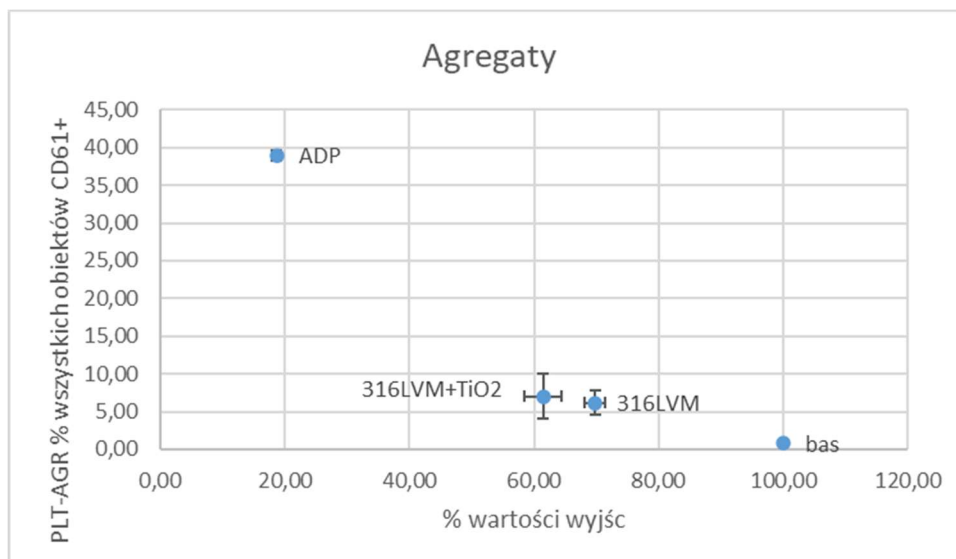
Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono na rycinach 43-45. W przypadku analizy aktywacyjnej selektyny-P (ryc. 43), powłoka  $\text{TiO}_2$  miała niewielki wpływ na procesy aktywacji, bez zużywania płytek krwi, które pozostały we krwi. Z kolei drugi analizowany receptor PAC-1 (ryc.44) został podobnie zaktywowany. Powłoka  $\text{TiO}_2$  nie wpłynęła również znacząco na agregację płytek krwi (Ryc.45)



Ryc. 43 Analiza aktywacji na podstawie receptora P-selektyny



Ryc. 44 Analiza aktywacji na podstawie receptora PAC-1



Ryc. 45 Agregacja płytek wywołana bezpośrednim kontaktem z badanym materiałem w warunkach wysokich sił ścinających.

### *Ocena oddziaływania biomateriału na krwinki czerwone*

Wyniki Indeksu Hemolitycznego (IH) badanych materiałów przedstawiono w tabeli 12. Obliczenia przeprowadzono zgodnie z wytycznymi normy ASTM F 756-00 [108]. Norma ta definiuje trzy przedziały stopnia hemolizy:

- IH 0-2% - stopień hemolizy: niehemolizujący
- IH 2-5% - stopień hemolizy: nieznacznie hemolizujący,
- IH > 5% - stopień hemolizy: hemolizujący

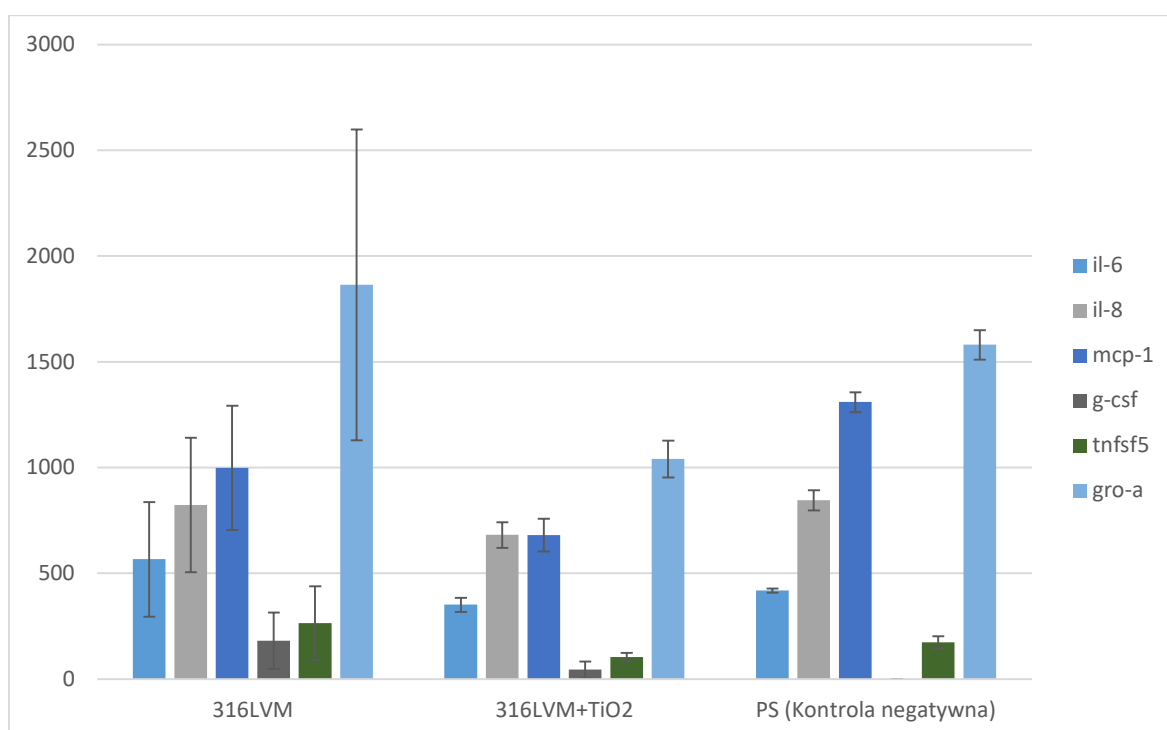
Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono zróżnicowane wartości Indeksu hemolitycznego. Stwierdzono obniżenie się wartości indeksu hemolizy dla próbek z powłoką TiO<sub>2</sub> w porównaniu dla próbek w stanie wyjściowym. Uzyskane wartości IH dla badanych grup kształtowały się poniżej wartości 2%, co oznacza, że badane materiały można zakwalifikować jako niehemolizujące.

## Wyniki badań hemolizy

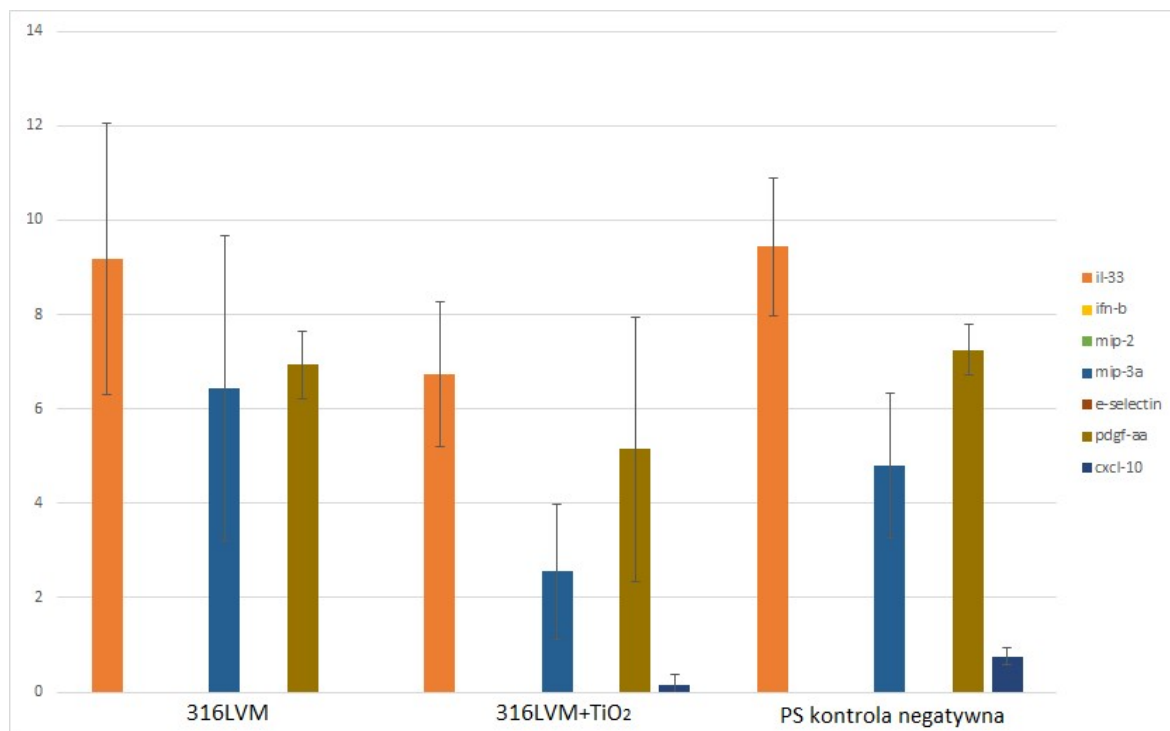
Material	Indeks hemolityczny	Hemoliza
316 LVM	0,20	Niehemolizujący
316 LVM + TiO <sub>2</sub>	0,09	Niehemolizujący

*Oznaczanie cytokin prozapalnych*

Poziomy wszystkich badanych cytokin prozapalnych dla próbki z powłoką TiO<sub>2</sub> były w większości niższe niż w przypadku kontroli negatywnej- ryc. 46 i 47. W przypadku próbki referencyjnej 316LVM zaobserwowano zróżnicowany wpływ materiału na poszczególne poziomy cytokin. Podwyższony poziom cytokin w badaniach in vitro jest predykatorem toksyczności ostrej. Naniesienie powłoki TiO<sub>2</sub> spowodowało zmniejszenie poziomów wszystkich badanych cytokin prozapalnych w porównaniu do materiału wyjściowego, co jest zjawiskiem korzystnym.



Ryc. 46 Wykresy wartości cytokin prozapalnych dla badanych materiałów (U/l)



Ryc. 47 Wykresy wartości cytokin prozapalnych dla badanych materiałów (U/l)

---

## 5. Omówienie wyników badań

Zagadnienie ochrony zdrowia w Europie stanowi obecnie główny problem społeczny z uwagi na dążenie do poprawy jakości życia. Analiza danych statystycznych wskazuje, iż podstawową przyczynę zgonów i schorzeń stanowiły i nadal stanowią choroby układu krwionośnego. Podobnie sytuacja przedstawia się w Polsce, aczkolwiek prezentowane dane statystyczne (wartości wskaźników umieralności i hospitalizacji) są jeszcze bardziej niekorzystne. Jednakże w ostatnich kilkunastu latach obserwuje znaczny spadek umieralności wywołanej schorzeniami układu krwionośnego. Stanowi to efekt postępu zarówno w obszarze diagnostyki, jak i metodach leczenia. Jednym z najważniejszych osiągnięć lat dziewięćdziesiątych ubiegłego stulecia było między innymi wprowadzenie do praktyki klinicznej implantów naczyniowych. Pomimo korzyści wynikających ze stosowania tej postaci wyrobów metalowych obserwuje się również pewne niekorzystne procesy, które ograniczają skuteczność leczenia tego rodzaju schorzeń. Wymienia się przede wszystkim wykrzepianie krwi na ich powierzchni oraz restenozę. Jako podstawowy sposób ograniczenia tych niekorzystnych procesów wskazuje się kształtowanie własności fizykochemicznych warstwy powierzchniowej implantów. Własności te w zasadniczy sposób decydują o reaktywności powierzchni implantu ze środowiskiem układu krwionośnego. Do tej pory nie osiągnięto jednak w tej dziedzinie w pełni zadowalających efektów. Wciąż nierozwiązanym problemem pozostaje kompleksowość badań pokazujących pełną charakterystykę ich zachowania w warunkach implantacji oraz długotrwałego kontaktu ze środowiskiem tkankowym. W literaturze niewiele miejsca poświęca się również roli procesu obróbki powierzchniowej biomateriału metalowego, co ma zasadniczy wpływ na finalną postać powłoki oraz jej adhezję do metalicznego podłoża. Dodatkowo brak danych dotyczących mikrostruktury wytworzonych powłok, odporności korozyjnej identyfikowanej w odniesieniu do różnych rodzajów korozji zachodzących w organizmie ludzkim, poziomu przenikania jonów metalicznych z podłoża do organizmu czy adhezji powłoki do podłoża nie pozwala w pełni na ocenę przydatności wytwarzanych powłok do zastosowań w układzie sercowo-naczyniowym. Wychodząc naprzeciw nierozwiązanym problemom, zaproponowano program badań, który może przyczynić się do rozwiązania wymienionych zagadnień – ryc. 16. Przedstawiony w rozprawie doktorskiej program badawczy obejmuje kompleksowe

---

metody umożliwiające pełną ocenę własności zarówno fizykochemicznych, jak i biologicznych uwzględniających specyfikę układu sercowo-naczyniowego. Celem pracy była ocena wpływu właściwości fizykochemicznych powłok na bazie dwutlenku tytanu na procesy zachodzące na powierzchni implantów wykonanych ze stali nierdzewnej po ich wprowadzeniu do układu krwionośnego.

W pracy jako materiał wyjściowy przyjęto powszechnie stosowaną stal chromowo-niklowo-molibdenową (316LVM), z której wytwarza się największą liczbę zróżnicowanych pod względem konstrukcyjnym implantów w układzie sercowo-naczyniowym. Dla poprawy własności fizykochemicznych stali 316LVM, a tym samym ograniczenia niekorzystnego zjawiska, jakim jest restenoza oraz wykrzepianie, zaproponowano jej modyfikację przez naniesienie powłoki  $\text{TiO}_2$  metodą ALD. Dla zapewnienia wymaganych własności fizykochemicznych powierzchni stali 316LVM opracowane zostały warunki jej obróbki powierzchniowej. Zaproponowana obróbka powierzchniowa składała się z kolejnych, następujących po sobie zabiegów. Pierwszymi zabiegami obróbki powierzchniowej było polerowanie elektrochemiczne i pasywacja. Są to podstawowe etapy kształtowania własności użytkowych biomateriałów metalowych stosowanych na implanty o zminiaturyzowanych cechach geometrycznych. Następnie na tak przygotowane próbki nanoszono warstwę  $\text{TiO}_2$  z wykorzystaniem metody ALD (Atomic Layer Deposition) o zróżnicowanych parametrach procesu nanoszenia - tabela 4. Ostatni etap zaproponowanej obróbki powierzchniowej obejmował sterylizację medyczną.

W pierwszej kolejności, ze względu na możliwość wystąpienia reakcji alergicznych i immunologicznych w układzie implant-tkanka przeprowadzono ocenę składu chemicznego warstwy powierzchniowej z wykorzystaniem spektroskopii elektronów Augera (AES). Powłoka  $\text{TiO}_2$  na podłożu stali 316LVM zawierała tytan i tlen w położeniach charakterystycznych dla wiązania  $\text{TiO}_2$  – ryc. 19 i 20. Powłoka jest wolna od obecności Cr i Ni, co zostało również potwierdzone w badaniach STEM-EDS – ryc. 35b. Na podstawie przeprowadzonych badań nie stwierdzono istotnych różnic w rozkładzie składu chemicznego powłoki  $\text{TiO}_2$  w zależności od temperatury procesu nanoszenia. Między widmami nie zaobserwowano różnic w położeniach i natężeniach pików, co świadczy o chemicznej jednorodności powłoki  $\text{TiO}_2$ .

Kolejnym ważnym kryterium determinującym przydatność zaproponowanej modyfikacji powierzchni jest odporność na korozję wżerową, którą przeprowadzono z wykorzystaniem metody potencjodynamicznej w temperaturze  $T = 37 \pm 1^\circ\text{C}$  w roztworze



---

sztucznego osocza. Na podstawie zarejestrowanych krzywych stwierdzono zróżnicowane wartości parametrów charakteryzujących odporność na korozję wżerową w zależności od temperatury nanoszenia – ryc. 22. Stwierdzono, że jedynie próbka z powłoką TiO<sub>2</sub> naniesiona w temperaturze 400°C nie poprawiła odporności na korozję wżerową w porównaniu z próbkami niepokrytymi, o czym świadczy mniejsza wartość potencjału przebicia oraz oporu polaryzacyjnego – tab. 6. Najkorzystniejszą odpornością na korozję charakteryzowała się próbka z powłoką TiO<sub>2</sub> naniesioną w temperaturze 200°C.

W celu uzyskania dodatkowych informacji o właściwościach elektrochemicznych warstwy powierzchniowej przeprowadzono badania z wykorzystaniem elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (EIS). Wyznaczone widma impedancyjne wskazują na zróżnicowaną kinetykę procesów korozyjnych zachodzących w układzie stal 316LVM-powłoka TiO<sub>2</sub> - sztuczne osocze - ryc. 24, 25. Przeprowadzone badania potwierdziły wyniki uzyskane z wykorzystaniem metody potencjodynamicznej i jednoznacznie wykazały, że temperatura procesu T = 200°C wpływa korzystnie na zwiększenie oporu przeniesienia ładunku, powodując tym samym najkorzystniejsze własności ochronne dla stali 316LVM w kontakcie z roztworem sztucznego osocza – tab. 8. Zostało to również potwierdzone w badaniach przenikania jonów metalicznych do roztworu, które wykazały, że powłoka TiO<sub>2</sub> naniesiona przy temperaturze 200°C zdecydowanie ograniczyła przenikanie szkodliwych jonów tj. Cr<sup>3+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, które w połączeniu z białkami, takimi jak te dostępne w krwi, indukują reakcje immunologiczne i powodują możliwość wystąpienia reakcji alergicznych. Ponadto stwierdzono, że im większa temperatura procesu nanoszenia tym większe jest przenikanie jonów metalicznych do roztworu.

Implanty wykonane ze stali 316LVM niejednokrotnie ulegają degradacji na skutek obecności szczelin. Dlatego też przeprowadzono badania odporności na korozję szczelinową metodą potencjostatyczną. Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzono, że materiał w stanie wyjściowym po procesie polerowania elektrochemicznego i pasywacji nie jest odporny na ten rodzaj korozji. Z kolei uzyskane wyniki dla próbek z naniesioną powłoką TiO<sub>2</sub> potwierdziły odporność na ten rodzaj korozji niezależnie od zastosowanej temperatury procesu nanoszenia – tab. 7 i ryc. 23.

Topografia powierzchni jest istotną właściwością wpływającą na oddziaływanie implantu z otaczającymi tkankami. W mikroskali ważnymi czynnikami będą odchylenia od kształtu, falistość, obecność rys. W nanoskali istotne znaczenie będzie miała chropowatość ze względu na mikrostrukturę oraz organizację atomów (np. struktury siateczkowe).

---

Podczas, gdy osteoblasty i makrofagi preferują powierzchnie chropowate, fibroblasty i komórki epitelialne preferują powierzchnie gładkie. Przeprowadzone badania topografii powierzchni z wykorzystaniem mikroskopu sił atomowych AFM oraz z wykorzystaniem elektronowego mikroskopu skaningowego SEM nie wykazały różnic w topografii powierzchni w zależności od zastosowanej temperatury procesu ALD – ryc. 35. We wszystkich przypadkach chropowatość powierzchni nie przekracza wartości zalecanej  $R_a = 160$  nm dla implantów stosowanych w układzie sercowo-naczyniowym - ryc. 31. Zwilżalność powierzchni, która jest zależna od topografii powierzchni, może dodatkowo wpływać na adsorpcję białek, a tym samym na przyczepianie się komórek do podłoża, a zatem jest jednym z kluczowych czynników badania aktywności komórek na implancie. Wyniki pokazały, że modyfikacja powierzchni poprzez naniesienie powłoki  $TiO_2$  metodą ALD spowodowała zwiększenie się kąta zwilżania, a tym samym wyższą hydrofobowość, co jest zjawiskiem korzystnym w przypadku takich zastosowań, jak np. stenty naczyniowe.

Zjawisko zapobiegania zakrzepom w przypadku hydrofobowych powierzchni stentów przypisuje się odmiennej orientacji monomerów fibryny na powierzchniach hydrofilowych i hydrofobowych, która z kolei wpływa na adhezję płytek krwi oraz komórek śródbłonna. Powierzchnie hydrofilowe będą sprzyjały adhezji płytek krwi, blokując zasiedlanie komórek śródbłonna. Na powierzchniach hydrofobowych będzie zachodził proces odwrotny [110].

Ponadto przeprowadzono również ocenę własności mechanicznych, w ramach której wykonano badania adhezji powłoki do podłoża. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono zróżnicowaną adhezję naniesionej powłoki  $TiO_2$  do podłoża ze stali 316LVM w zależności od temperatury procesu nanoszenia. Najkorzystniejszą adhezją charakteryzowała się powłoka naniesiona w temperaturze  $200^\circ C$  i  $300^\circ C$  – tab. 10 i rys.27. W każdym przypadku zaobserwowano ciągłą plastyczną perforację powłoki.

Po tym etapie badań wybrano najbardziej korzystną pod względem właściwości fizykochemicznych i mechanicznych wersję temperaturową, którą była powłoka naniesiona w temperaturze  $200^\circ C$ . Dalsze badania prowadzono wyłącznie dla tej wersji.

W dalszej kolejności w celu oceny mikrostruktury naniesionej powłoki przeprowadzono badania z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej TEM. Przeprowadzone badania wykazały prawidłowy dla techniki ALD wzrost warstwy atomowej po warstwie atomowej – ryc. 34. Ponadto zauważono pęcherze, których pojawienie się spowodowane było najprawdopodobniej procesem pasywacji chemicznej. Amorficzny

---

charakter powłoki potwierdzony został również za pomocą skaningowej transmisyjnej mikroskopii elektronowej STEM oraz obrazów wysokorozdzielczych HRTEM – ryc. 35,36.

Dla implantów stosowanych w kardiologii zabiegowej proces opracowania warunków wytwarzania powłok powinien być również realizowany z uwzględnieniem odkształceń wynikających z techniki implantacji. Dlatego też w dalszej kolejności przeprowadzono badania podatności powłoki do odkształceń. Badania zrealizowano dla próbek o najkorzystniejszym zespole własności fizykochemicznych wytypowanych ze wcześniejszych badań. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że możliwe jest bezpieczne odkształcenie wytworzonej powłoki do wartości kąta  $40^\circ$  o czym świadczą wartości oporu polaryzacyjnego – tab. 11 i rys.32. Ponadto zauważono stałą tendencję do obniżania jego wartości wraz ze wzrostem kąta wygięcia. Stwierdzono, że dopiero dla kąta wygięcia  $60^\circ$  osiąga on wartości zbliżone do stanu wyjściowego około  $R_p = 1600 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ . Przekroczenie zalecanego kąta może doprowadzić do osłabienia powłoki, a w konsekwencji odsłonięcia warstwy wierzchniej biomateriału metalowego, która jednak w dalszym ciągu będzie zapewniała odpowiednie zabezpieczenie przed działaniem środowiska korozyjnego.

Ocena cytotoksyczności jest podstawowym badaniem dla wszystkich wyrobów medycznych mających kontakt z tkanką i może obejmować różne aspekty odpowiedzi komórkowej w zależności od oczekiwanego rodzaju kontaktu. Cytotoksyczność można określić przez ocenę morfologii komórek, uszkodzenia komórek, wzrostu komórek lub aktywności komórkowej. Dlatego też w końcowym etapie przeprowadzono badania cytotoksyczności metodą bezpośrednią. Uzyskane wyniki badań w odniesieniu do odpowiedzi komórkowej pokazują poprawę biokompatybilności z punktu widzenia żywotności komórek dla próbek z naniesioną powłoką  $\text{TiO}_2$  – rys. 37-39. Zgodnie ze skalą oceny cytotoksyczności wg normy ISO 10993-5 przypisano: stopień cytotoksyczności – 0. Z kolei w przypadku stanu wyjściowego – stal 316LVM zaobserwowano słabsze narastanie komórek oraz większą ilość komórek nekrotycznych. Zgodnie ze skalą oceny cytotoksyczności wg normy ISO 10993-5 przypisano: stopień cytotoksyczności – 1. Zostało to potwierdzone w badaniach określających poziom dehydrogenazy mleczanowej (LDH), substancji uwalnianej z uszkodzonych komórek, metodą bezpośrednią. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, niższą wartość poziomu LDH dla próbek z powłoką  $\text{TiO}_2$  w porównaniu do stanu wyjściowego, co oznacza mniejszą cytotoksyczność – ryc.40.

---

Wyniki przeprowadzonych badań proliferacji komórek wykazały typowy prawidłowy wygląd fibroblastów z wrzecionowatym, wydłużonym kształtem, pewną ogniskową adhezją, o zróżnicowanym kierunku wydłużania się komórek i procesów – rys. 41 i 42. W obu przypadkach można zaobserwować liczne okrągłe lub owalne jądra komórkowe, niektóre w fazie podziału (zbliżone do siebie lub częściowo nakładające się niebieskie punkty). W przypadku powłoki można zauważyć większe zróżnicowanie cytoszkieletu oraz zróżnicowaną gęstość i długość filamentów aktynowych. Widoczne są również miejsca o zwiększonym zagęszczeniu jąder komórkowych.

Adhezja komórek odgrywa ważną rolę w fizjologicznych funkcjach komórkowych (np. wzrostu, różnicowania i ruchliwości komórek) oraz integracji wszczepialnych urządzeń biomedycznych z komórkami i tkankami. Pełne zrozumienie adhezji komórek do materiałów o różnych teksturach i składzie chemicznym ma zasadnicze znaczenie dla promowania integracji implantu z otaczającymi tkankami. Komórki mają zdolność do rozpoznawania korzystnej pod względem chemicznym powierzchni ze względu na obecność transbłonowych receptorów zapewniających adhezję do podłoża oraz komunikację między komórkami.

Ocena odpowiedzi cytokinowej jest ważna dla zrozumienia interakcji biomateriału z ludzkimi tkankami. Cytokiny stanowią szeroką gamę białek regulatorowych o zróżnicowanej strukturze chemicznej. Biorą udział w szeregu procesów takich jak wzrost komórek, aktywacja i regulacja immunologicznej odpowiedzi tkankowej i humoralnej, w procesie zapalnym oraz w procesach naprawczych i zwłóknieniowych. Wyniki prowadzonych badań wskazują, że nie tylko skład chemiczny, lecz również własności fizykochemiczne biomateriałów mogą wpłynąć na działania niepożądane związane z obecnością implantu [112]. Dlatego też w ramach badań własności biologicznych przeprowadzono ocenę poziomu cytokin prozapalnych. Wyniki przeprowadzonych badań poziomu cytokin, wykazały, że powłoka  $TiO_2$  korzystnie wpływa na hamowanie niepożądanych reakcji zapalnych, z kolei podłoże 316LVM wykazało potencjał prozapalny. Należy pamiętać, że proces zapalny oraz proces koagulacji są ściśle ze sobą powiązane - stan zapalny wywołany czynnikiem tkankowym inicjuje wytwarzanie trombiny, a tym samym stanu zakrzepowego [115], stąd materiał o właściwościach przeciwzapalnych może obniżać ryzyko zakrzepów indukowanych przez stan zapalny. Przeprowadzone badania nie wykazały własności trombogennych w odniesieniu do aktywacji i agregacji płytek krwi. Analiza wybranych receptorów komórkowych w zakresie aktywacji krwi po testach Impact-

---

R dla próbek z powłoką TiO<sub>2</sub> kształtowała się na podobnym poziomie aktywacji w stosunku do materiału wyjściowego – stal 316LVM – ryc. 46-47.

W ramach badań własności biologicznych przeprowadzono również ocenę oddziaływania biomateriału na krwinki czerwone. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono zróżnicowane wartości indeksu hemolitycznego. Stwierdzono obniżenie się wartości indeksu hemolizy dla próbek z powłoką TiO<sub>2</sub> w porównaniu do próbek w stanie wyjściowym. Uzyskane wartości IH dla badanych grup kształtowały się poniżej wartości 2%, co oznacza, że badane materiały można zakwalifikować jako niehemolizujące – tab. 12.

Zaproponowany zakres badań umożliwił w sposób kompleksowy ocenę wpływu właściwości fizykochemicznych powłok na bazie dwutlenku tytanu na procesy zachodzące na powierzchni implantów wykonanych ze stali nierdzewnej po ich wprowadzeniu do układu krwionośnego. Uzyskane wyniki stanowią podstawę do opracowania bardziej szczegółowych kryteriów oceny finalnej jakości wyrobów medycznych stosowanych w układzie sercowo-naczyniowym, co zapewni wymaganą hemokompatybilność implantów i przyczyni się do minimalizacji ryzyka powikłań pooperacyjnych. W efekcie przyczyni się do wzrostu skuteczności leczenia, zmniejszenia wskaźnika powikłań oraz poprawy jakości życia pacjentów. Reasumując, przeprowadzone badania potwierdziły słuszność przyjętej tezy. Funkcjonalizacja stali 316LVM powłoką TiO<sub>2</sub> naniesioną metodą osadzania warstw atomowych ALD o właściwościach fizykochemicznych adekwatnych do specyfiki układu sercowo-naczyniowym zapewnia odpowiednią biokompatybilność w odniesieniu do wybranych badań in vitro dedykowanych dla implantów kontaktujących się z krwią i tkankami naczyń krwionośnych.

Uzyskane wyniki wskazują na potrzebę rozszerzenia programu badań w kontekście gotowego wyrobu. W odniesieniu do stentów, konieczna będzie ocena wpływu modyfikacji na proliferację komórek śródbłonna oraz komórek mięśni gładkich. W tym przypadku należy pamiętać, że efektem pożądanym będzie szybkie odtworzenie uszkodzonych komórek śródbłonna, co zapobiegnie powstawaniu zakrzepów oraz nadmiernej proliferacji komórek mięśni gładkich, co mogłoby doprowadzić do ponownego zwężenia światła naczynia. Dodatkowo należy wziąć pod uwagę specyficzne wymagania dla stentów określone między innymi w normie ISO 25539 oraz ASTM F2743-11. Ze względu na różnice w strukturze stentów oraz niedawny rozwój niektórych z tych implantów, nie zawsze są dostępne znormalizowane badania in vitro i wyniki kliniczne. Należy pamiętać, że powłoki stosowane na stenty powinny być odporne na zniszczenie spowodowane technikami implantacyjnymi,

---

cyklicznym obciążeniem, dyslokacją oraz stosowanymi metodami śledzenia. Produkty zużycia powinny być również zbadane pod kątem ich toksyczności.

Przeprowadzone badania *in vitro* bazują na wykorzystaniu komórek wzorcowych, które możemy łatwo obserwować dostępnymi metodami badawczymi. Dostarczają one ważnych informacji w ocenie biologicznej, natomiast w przypadku gotowych wyrobów należy rozważyć konieczność przeprowadzenia dodatkowych badań, w tym badań *in vivo* na zwierzętach oraz badań klinicznych potwierdzających ostatecznie ich bezpieczeństwo.

---

## 6. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych w rozprawie badań można wysnuć następujące wnioski o charakterze poznawczym i aplikacyjnym:

- Temperatura nanoszenia warstw atomowych TiO<sub>2</sub> w zakresie 100-400°C nie wpływa istotnie na skład chemiczny, jednorodność chemiczną powłoki oraz jej grubość
- Najlepszą odporność na korozję wżerową wykazuje powłoka nanoszona w temperaturze 200°C, co zostało potwierdzone w badaniach potencjodynamicznych oraz EIS. Zostało to również potwierdzone w badaniach przenikania jonów metalicznych do roztworu sztucznego osocza, ponieważ powłoka TiO<sub>2</sub> zdecydowanie ograniczyła przenikanie szkodliwych jonów tj. Cr<sup>3+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, stanowiła zatem skuteczną barierę ochronną. Wszystkie powłoki, niezależnie od temperatury nanoszenia, zabezpieczają podłoże przed korozją szczelinową.
- Modyfikacja powierzchni poprzez naniesienie powłoki TiO<sub>2</sub> metodą ALD spowodowała zwiększenie się kąta zwilżania, a tym samym wyższą hydrofobowość, niezależnie od temperatury nanoszenia
- Niezależnie od temperatury, naniesienie powłoki TiO<sub>2</sub> metodą ALD nie wpływa istotnie na chropowatość powierzchni.
- Najkorzystniejszą adhezją charakteryzowała się powłoka naniesiona w temperaturze 200°C i 300°C
- Powłoka naniesiona w temperaturze 200°C może być bezpiecznie odkształcona do wartości kąta 40°. Przekroczenie zalecanego kąta może doprowadzić do osłabienia powłoki, a w konsekwencji odsłonięcia warstwy wierzchniej biomateriału metalowego, powłoka jednak w dalszym ciągu będzie zapewniała odpowiednie zabezpieczenie przed działaniem środowiska korozyjnego.
- Powłoka naniesiona w temperaturze 200°C poprawia biokompatybilność podłoża w odniesieniu do żywotności komórek w warunkach in vitro. Komórki mają również zdolność do proliferacji w warunkach in vitro
- Powłoka naniesiona w temperaturze 200°C nie powoduje trombogenności oraz hemolizy, wykazuje działanie przeciwwzapalne w porównaniu do podłoża, które ma potencjał zapalny, co zostało potwierdzone w odpowiednich badaniach in vitro
- Przedstawiona w rozprawie metodologia umożliwia wybór parametrów nanoszenia powłoki TiO<sub>2</sub> metodą ALD prowadzących do optymalizacji właściwości

---

fizykochemicznych dostosowanych do specyfiki układu krwionośnego, co zostało potwierdzone badaniami biologicznymi in vitro

- Uzyskane wyniki wskazują na potrzebę rozszerzenia programu badań w kontekście gotowego wyrobu. Obiecujące wyniki badań biologicznych dają podstawę do badań nad możliwością zastosowania zaproponowanej modyfikacji powierzchni na stenty naczyniowe. Z punktu widzenia aplikacyjnego, najbardziej obiecujące są wyniki sugerujące przeciwzapalne właściwości powłoki oraz znaczna poprawa odporności korozyjnej dla wariantu temperatury nanoszenia 200°C.



---

## 7. Streszczenie

W rozprawie doktorskiej zaproponowano proces osadzania warstw atomowych (ALD; Atomic Layer Deposition)  $\text{TiO}_2$  do modyfikacji powierzchni stali nierdzewnej 316LVM przeznaczonej na implanty mające kontakt z krwią. Podłoże ze stali nierdzewnej poddano elektropolerowaniu, pasywacji chemicznej, procesowi ALD oraz sterylizacji parowej.

Właściwości mechaniczne i fizykochemiczne cienkich warstw sprawdzono dla próbek przygotowanych w 500 cyklach ALD w temperaturach 100, 200, 300 i 400°C.

Zbadano następujące właściwości cienkich warstw: skład chemiczny, przyczepność powłok, zwilżalność powierzchni, topografię powierzchni, odporność na korozję wżerową i szczelinową, penetrację jonów metali do sztucznej plazmy, grubość warstwy. Najlepszy zestaw właściwości fizykochemicznych i mechanicznych uzyskano dla temperatury osadzania 200°C.

Próbki o najlepszych właściwościach fizykochemicznych poddano badaniom podatności na odkształcenia, badaniom mikrostruktury oraz testom biologicznym, takim jak: test cytotoksyczności w kontakcie bezpośrednim, badania proliferacji komórek, trombogenność w warunkach dynamicznych, badania hemolizy w warunkach dynamicznych, badanie poziomu cytokin prozapalnych.

Zaproponowana modyfikacja powierzchni poprawiła odporność korozyjną podłoża, zmniejszyła penetrację jonów metali do sztucznego osocza, zmieniła zwilżalność powierzchni na hydrofobową (preferowaną dla powierzchni mających kontakt z krwią), w badaniach *in vitro* poprawiła żywotność komórek, nie powodowała trombogenności, hemolizy, stanu zapalnego. Wyniki badań potwierdzają tezę przedstawioną w niniejszej pracy, a tym samym dowodzą pozytywnego wpływu proponowanej modyfikacji powierzchni na jej właściwości biologiczne. Ponieważ pełna biokompatybilność implantów sercowo-naczyniowych zależy od charakterystyki urządzenia, w zależności od zastosowania należy opracować plan dalszych badań.

---

# Summary

In the PhD Thesis, the Atomic Layer Deposition (ALD) process of TiO<sub>2</sub> was proposed for surface modification of 316LVM steel intended for blood contacting implants. The stainless-steel substrate was subjected to electropolishing, chemical passivation, ALD process and steam sterilization.

The mechanical and physicochemical properties of the thin films were checked for specimens prepared in 500 ALD cycles in temperatures 100, 200, 300 and 400°C.

The following properties of the thin films were investigated: chemical composition, coating adhesion, surface wettability, surface topography, pitting and crevice corrosion resistance, penetration of metal ions into the artificial plasma, layer thickness. The best set of physicochemical and mechanical properties were obtained for deposition temperature 200°C.

The samples with the best set of physicochemical properties were subject to deformation susceptibility tests, microstructure examination and biological tests, such as: cytotoxicity assay in direct contact, cell proliferation assay, thrombogenicity in dynamic conditions, hemolysis assay in dynamic conditions, testing the level of pro-inflammatory cytokines.

The proposed surface modification improved the corrosion resistance of the substrate, reduced the penetration of metal ions into the artificial plasma, changed the surface wettability into hydrophobic one (preferable for blood contacting surfaces), in in vitro tests: improved cell viability, did not cause thrombogenicity, hemolysis, inflammatory response. The research results confirm the thesis presented in this work and thus prove the positive influence of the proposed surface modification on its biological properties. As the biocompatibility of cardiovascular implants depends on the device characteristics, further research plan must be developed, depending on the application.

---

## 8. Bibliografia

- [1] Światowa Organizacja Zdrowia, „World Health Organization/Fact sheets/Cardiovascular Diseases (CVDs),” 11 Czerwiec 2021. [Online]. Available: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
- [2] C. W. Tsao, A. W. Aday, Z. I. Almarzooq, A. Alonso i A. Z. Beaton, „Heart Disease and Stroke Statistics—2022 Update: A Report From the American Heart Association,” *Circulation*, tom 145, nr 8, pp. 153-639, 22 Luty 2022.
- [3] A. G. Roth, G. A. Mensah, C. O. Johnson, G. Addolorato i E. Ammirati, „Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990–2019: Update From the GBD 2019 Study,” *Journal of the American College of Cardiology*, tom 76, nr 25, pp. 982-3021, 2020.
- [4] B. Więckowska, Proces leczenia w Polsce- analizy i modele Tom II Kardiologia, Warszawa: Ministerstwo zdrowia, 2015.
- [5] „Oficjalna strona Komisji Europejskiej, Eurostat Statistics Explained, Cardiovascular Diseases Statistics,” 11 Marzec 2022. [Online]. Available: [https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Cardiovascular\\_diseases\\_statistics#Deaths\\_from\\_cardiovascular\\_diseases](https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Cardiovascular_diseases_statistics#Deaths_from_cardiovascular_diseases).
- [6] Departament Badań Demograficznych GUS, Dyrektor Dorota Szałtys, „Umieralność w I półroczu 2021 roku 31.01.2022 r.,” Główny Urząd Statystyczny, Warszawa, 2022.
- [7] M. Zdrowia, *Program Profilaktyki i Leczenia Chorób Układu Sercowo-Naczyniowego POLKARD na lata 2017-2021*, Warszawa: Ministerstwo Zdrowia, 2017.
- [8] T. A. Trikalinos, A. A. Alsheikh-Ali, A. Tatsioni, B. K. Nallamothu i D. M. Kent, „Percutaneous coronary interventions for non-acute coronary artery disease: a quantitative 20-year synopsis and a network meta-analysis.,” *Lancet*, tom 373, pp. 911-918, 2009.
- [9] K. Stergiopoulos i D. L. Brown, „Initial coronary stent implantation with medical therapy vs medical therapy alone for stable coronary artery disease: meta-analysis of randomized controlled trials.,” *Arch Intern Med.*, tom 172, pp. 312-319, 2012.

- 
- [10] S. Windecker, S. Stortecky, G. G. Stefanini, B. R. da Costa i A. W. Rutjes, „Revascularisation versus medical treatment in patients with stable coronary artery disease: network meta-analysis.,” *BMJ*, tom 348, p. g3859, 2014.
- [11] J. Knuuti, W. Wijns, A. Saraste, D. Capodanno i E. Barbato, „Wytyczne ESC dotyczące rozpoznawania i leczenia przewlekłych zespołów wieńcowych (2019),” *Zeszyty edukacyjne. kardiologia polska 1/2020*, 2020.
- [12] M. Lesiak, „Powikłania w leczeniu interwencyjnym choroby wieńcowej,” *Choroba niedokrwienna serca*, tom 11, nr 1, pp. 10-5, 2012.
- [13] M. Valgimig, H. Bueno, R. A. Byrne, J. P. Collet i F. Costa, „Uaktualnione stanowisko ESC dotyczące stosowania podwójnej terapii przeciwplatekowej w chorobie wieńcowej w 2017 roku przygotowane we współpracy z EACTS,” *Kardiologia Polska*, tom 75, nr 12, p. 1217–1299, 2017.
- [14] A. Cieśliński, J. S. Dubiel, L. Giec, W. Kargul, K. Kawecka Jaszcz, J. Kocemba, J. Kuch, T. Mandecki, L. Poloński, M. Sosnowski, A. Szulc, M. Tendera, J. Wodniecki, S. Woś i T. Zębik, *Kardiologia*, Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2005.
- [15] „Adobe Stock, licencja,” [Online].
- [16] M. Żuk, „Serce, przekrój czołowy,” Wydawnictwo Naukowe PWN.
- [17] P. Pruszczyk i T. Hryniewiecki, *Kardiologia z elementami angiologii*, Warszawa: Medical Tribune Polska, 2018.
- [18] Interia.pl, „Sztuczne Serce Made in Poland,” 29 Maj 2013. [Online]. Available: <https://geekweek.interia.pl/raporty/raport-medycyna-przyszlosci/medycyna/news-sztuczne-serce-made-in-poland,nId,973688#napisz-do-nas>. [Data uzyskania dostępu: 15 czerwiec 2022].
- [19] A. Vahanian, F. Praz, M. Milojevic, S. Baldus, J. Bauersachs i D. Capodanno, „Wytyczne ESC/EACTS 2021 dotyczące leczenia wad zastawkowych serca,” *Kardiologia Polska (Polish Heart Journal)*, Tomy %1 z %279, Suppl. 4, nr 4/2021, 2021.
- [20] A. Sukiennik, „Zabieg przezskórnej naprawy niedomykalnej zastawki mitralnej za pomocą systemu MitraClip (Abbott),” *Folia Cardiologica Excerpta*, tom 5, nr 5, pp. 274-282, 2010.
- [21] M. Olszówka i K. Maciąg, *Przegląd nowoczesnych technik i metod leczenia pacjenta*, Lublin: Fundacja na rzecz promocji nauki i rozwoju Tygiel, 2015, pp. 105-120.

- 
- [22] J. Białkowski i i. in., *Kardiologia Interwencyjna*, Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWN, 2009.
- [23] A. F. Beyi, A. E. Ismail, I. Taib i M. N. Ibrahim, „Stent Classifications and Effect of Geometries on Stent Behaviour Using Finite Element Method,” *International Journal of Mechanical Engineering and Robotics Research*, tom 9, nr 3, 2020.
- [24] Boston Scientific Corporation, „Wallflex Duodenal Stents,” Boston Scientific Corporation, 21 04 2022. [Online]. Available: <https://www.bostonscientific.com/en-US/products/stents--gastrointestinal/wallflex-duodenal-stents.html>. [Data uzyskania dostępu: 21 04 2022].
- [25] Balton Sp. z o. o. , „Mer-stent samorozprężalny do tętnic szyjnych,” Balton Sp. z o.o., 21 04 2022. [Online]. Available: <https://balton.pl/pl/produkty/kardiologia-i-radiologia/radiologia/stenty-do-tetnic-szyjnych/mer-stent-samorozprezalny-do-tetnic-szyjnych>. [Data uzyskania dostępu: 21 04 2022].
- [26] Biotronik, „Vascular Intervention // Coronary Resorbable Magnesium Scaffold (RMS),” Biotronik, 22 04 2022. [Online]. Available: <https://www.biotronik.com/en-de/products/coronary/magmaris>. [Data uzyskania dostępu: 22 04 2022].
- [27] S. B. Baptista, „The third generation of drug-eluting stents: Reassuring data while we wait for the next one,” *Revista Portuguesa de Cardiologia*, tom 40, nr 2, pp. 77-80, 2021.
- [28] R. Wkasman, „A new generation of drug-eluting stents: Indications and outcomes of bioresorbable vascular scaffolds,” *Cleveland Clinic Journal of Medicine* , tom 84, nr 12, pp. 20-14, 2017.
- [29] M. C. Morice, P. W. Serruys, C. Bode, G. A. Van Es i H. P. Stoll, „Long-Term Clinical Outcomes With Sirolimus-Eluting Coronary Stents: Five-Year Results of the RAVEL Trial,” *Journal of the American College of Cardiology*, tom 50, nr 14, p. 1299–1304, 2007.
- [30] G. Weisz, M. B. Leon, D. R. Holmes, D. J. Kereiakes i J. J. Popma, „Five-year follow-up after sirolimus-eluting stent implantation results of the SIRIUS (Sirolimus-Eluting Stent in De-Novo Native Coronary Lesions) Trial,” *Journal of American College of Cardiology*, tom 53, nr 17, pp. 1488-1497, 2009.
- [31] G. W. Stone, S. G. Ellis, A. Colombo, E. Grube i J. J. Popma, „Long-Term Safety and Efficacy of Paclitaxel-Eluting Stents: Final 5-Year Analysis From

- 
- the TAXUS Clinical Trial Program,” *JACC: Cardiovascular Interventions*, tom 4, nr 5, pp. 530-542, 2011.
- [32] E. Kedhi, K. S. Joesoef i E. McFadden, „Second-generation everolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents in real-life practice (COMPARE): a randomised trial,” *Lancet*, tom 375, nr 9710, pp. 201-209, 2010.
- [33] S. Shigeru, Valdes-Chavarri, G. Richardt, R. Moreno i A. I. Romo, „A randomized, prospective, intercontinental evaluation of a bioresorbable polymer sirolimus-eluting coronary stent system: the CENTURY II,” *European Heart Journal*, tom 35, nr 30, pp. 2021-2031, 2014.
- [34] D. J. Kereiakes, I. T. Meredith, S. Windecker, R. L. Jobe i S. R. Metha, „Efficacy and Safety of a Novel Bioabsorbable Polymer-Coated, Everolimus-Eluting Coronary Stent,” *Circulation: Cardiovascular Interventions*, tom 8, nr 4, p. e002372, 2015.
- [35] O. B. Istambul i G. Akdogan, „Influences of Stent Design on In-Stent Restenosis and Major Cardiac Outcomes; A Scoping Review and Meta-Analysis,” *Cardiovascular Engineering and Technology*, tom 13, pp. 147-169, 2022.
- [36] B. Świczko-Żurek, *Biomateriały*, Gdańsk: Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, 2009.
- [37] S. Movafaghi, W. Wang, D. L. Bark, L. P. Dasi i K. C. Popat, „Hemocompatibility of super-repellent surfaces: current and future,” *Materials Horizons*, tom 6, pp. 1596-1610, 2019.
- [38] J. Marciniak, *Biomateriały*, Gliwice: Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, 2013.
- [39] I. Przybyszewska-Doroś, W. Okrój i B. Walkowiak, „Modyfikacje powierzchni implantów metalicznych,” *Inżynieria Biomateriałów*, tom R.8, nr 43-44, pp. 52-62, 2005.
- [40] A. M. Cherian, S. V. Nair, V. Maniyal i D. Menon, „Surface engineering at the nanoscale: A way forward to improve coronary stent efficacy,” *APL Bioengineering*, tom 5, nr 2, 2021.
- [41] L. Navarro, G. Duffo, D. Vetcher, V. P. Moles i J. A. Luna, „Coating induced corrosion of coronary stents - A comparative study with clinical consequences,” *Trends Med* 20, 2020.
- [42] A. Raval, A. Choubey, C. Engineer i D. Kothwala, „Development and assessment of 316LVM cardiovascular stents,” *Materials Science & Engineering A*, tom 386, pp. 331-343, 2004.

- 
- [43] P. Sojitra, D. M. Kothwala, C. Engineer i A. Raval, „Electropolishing of 316LVM Stainless Steel Cardiovascular Stents: An Investigation of Material Removal, Surface Roughness and Corrosion Behaviour,” *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, tom 23, nr 3, pp. 115-121, 2010.
- [44] A. Shahryari, F. Azari, H. Vali i S. Omanovic, „The response of fibrinogen, platelets, endothelial and smooth muscle cells to an electrochemically modified SS316LS surface: Towards the enhanced biocompatibility of coronary stents,” *Acta Biomaterialia*, tom 6, nr 2, pp. 695-701, 2010.
- [45] Y. G. Aliakseyeu, A. Y. Korolyov, V. S. Niss i A. S. Budnitzky, „Electrochemical polishing of matrix stents of the 316LVM steel using microsecond pulses,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus Physical-Technical Series*, tom 66, nr 2, pp. 161-168, 2021.
- [46] P. Qi, M. F. Maitz i N. Huang, „Surface modification of cardiovascular materials and implants,” *Surface & Coatings Technology*, tom 233, pp. 80-90, 2013.
- [47] R. Hauert, „A review of modified DLC coatings for biological applications,” *Diamond and related materials*, tom 12, nr 3-7, pp. 583-589, 2003.
- [48] P. Barragan, F. Herbst, A. Kalachev i W. F. Nader, „The BioDiamond and BioDiamond F Stents,” w *Handbook of Coronary Stents, 3rd edition*, London, Martin DUnitz Publisher Ltd., 2000, pp. 29-39.
- [49] F. Airoidi, A. Colombo, D. Tavano, A. Ferrari i F. Sgura, „Comparison of diamond-like carbon-coated stents versus uncoated stainless steel stents in coronary artery disease,” *American Journal of Cardiology*, tom 93, nr 4, pp. 474-477, 2004.
- [50] G. C. X. Miereles, L. M. de Abreu, A. A. da Cruz Forte, M. K. Sumita i J. H. Sumita, „Randomized comparative study of diamond-like carbon coated stainless steel stent versus uncoated stent implantation in patients with coronary artery disease,” *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, tom 88, nr 4, pp. 390-395, 2007.
- [51] J. Marciniak, Z. Paszenda, S. Mitura i P. Niedzielski, „Sposób wytwarzania warstw kompozytowych pasywno-węglowych na powierzchni wyrobów, zwłaszcza implantów z odlewniczego stopu kobaltowo-chromowo-molibdenowego”. Polska Patent 318122, 24 01 1977.
- [52] M. Czerniak, A. Sysa, J. Grabarczyk, A. Pełka, P. Niedzielski i T. Wężyk, „Modyfikacja powierzchni materiału stosowanego na stenty,” *Inżynieria Biomateriałów*, tom 7, nr 35-36, pp. 9-12, 2004.

- 
- [53] E. M. Modan i A. G. Plaiasu, „Advantages and disadvantages of chemical methods in the elaboration of nanomaterials,” *The Annals of "Dunarea de Jos" University of Galati*, tom 1, 2020.
- [54] J. Masalski, J. Gluszek, J. Zabrzski, K. Nitsch i P. Gluszek, „Improvement in corrosion resistance of the 316L stainless steel by means of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> coatings deposited by the sol-gel method,” *Thin Solid Films*, tom 349, nr 1-2, pp. 186-190, 1999.
- [55] I. Stambolowa, S. Yordanov, L. Lakov i S. Vassilev, „Preparation of sol-gel SiO<sub>2</sub> coatings on steel and their corrosion resistance,” w *MATEC Web of Conferences*, 145, 05011, 2018.
- [56] L. Ćurković, H. Otmacić-Curkovic, S. Salopek i M. Majić Renjo, „Enhancement of corrosion protection of AISI 304 stainless steel by nanostructured sol-gel TiO<sub>2</sub> films,” *Corrosion Science*, tom 77, pp. 176-184, 2013.
- [57] D. Grygier, *Wpływ wybranych własności krzemionkowych warstw wierzchnich na możliwości ich zastosowania jako pokrycia na stenty wieńcowe*, Wrocław: Politechnika Wrocławska, 2008.
- [58] P. De Lima, M. Atik, L. A. Avaca i M. A. Aegerter, „Sol-Gel Coatings for Chemical Protection of Stainless Steel,” *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, tom 2, pp. 529-534, 1994.
- [59] F. Chai, A. Ochsenbein, M. Traisnel, R. Bausch i J. Breme, „Improving endothelial cell adhesion and proliferation on titanium by sol-gel derived oxide coating,” *Journal of Biomedical Materials*, tom 92A, nr 2, pp. 754-765, 2009.
- [60] M. Wawrzyńska, M. Kopaczyńska, B. Sobieszkańska, A. Ulatowska-Jarża i I. Hołowacz, *Intracoronary Application of TiO<sub>2</sub>-Coated Cardiovascular Stents*, Imperial College Press, 2016.
- [61] K. Tsuru, S. Takemoto, T. Yamamoto, S. Hayakawa i A. Osaka, „Blood compatibility of metal oxide layers on stainless-steel,” *Materials Research Society Symposium - Proceedings*, tom 734, pp. 327-332, 2003.
- [62] M. Foruzanmehr, M. S. Hosainalipour, S. M. Tehrani i M. Aghaeipour, „Nano-structure TiO<sub>2</sub> film coating on 316L stainless steel via sol-gel technique for blood compatibility improvement,” *Nanomedicine Journal*, tom 1, nr 3, pp. 128-136, 2013.
- [63] J. Krzak-Roś, D. Grygier, A. Banaszczuk i R. Będziński, „Mechanical and physicochemical properties of titanium dioxide thin films,” *Engineering of Biomaterials*, tom R.10, nr 67-68, pp. 35-37, 2007.



- 
- [64] A. Donesz-Sikorska, K. Marycz, A. Smieszek, J. Grzesiak, K. Kaliński i J. Krzak-Roś, „Biologicznie aktywne powłoki otrzymane metodą zol–żel na metalicznych materiałach implantacyjnych,” *Przemysł Chemiczny*, tom 92, nr 6, p. 1110, 2013.
- [65] W. Walke, Z. Paszenda, T. Pustelny, Z. Opilski, S. Drewniak, M. Kościelniak-Ziemniak i M. Basiaga, „Evaluation of physicochemical properties of SiO<sub>2</sub>-coated stainless steel after sterilization,” *Materials Science & Engineering: C*, tom 63, pp. 155-163, 2016.
- [66] B. O'Brien i W. Carroll, „The evolution of cardiovascular stent materials and surfaces in response to clinical drivers: A review,” *Acta Biomaterialia*, tom 5, pp. 945-958, 2009.
- [67] W. C. Hung, F. M. Chang, T. S. Yang i K. L. Ou, „Oxygen-implanted induced formation of oxide layer enhances blood compatibility on titanium for biomedical applications,” *Materials Science and Engineering: C*, tom 68, nr 1, pp. 523-529, 2016.
- [68] D. Xie, G. Wan, M. F. Maitz i H. Sun, „Deformation and corrosion behaviors of Ti–O film deposited 316L stainless steel by plasma immersion ion implantation and deposition,” *Surface and Coatings Technology*, tom 214, pp. 117-123, 2013.
- [69] C. Yelcarasi, N. Recek, K. Kazmanli, J. Kovac, M. Urgan i I. Junkar, „Biocompatibility and Mechanical Stability of Nanopatterned Titanium Films on Stainless Steel Vascular Stents,” *International Journal of Molecular Sciences*, tom 23, pp. 1-19, 2022.
- [70] L. Mikhalowska, N. Horna, N. Lazarenko i P. Haworth, „Inorganic coatings for cardiovascular stents In vitro and in vivo studies,” *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, tom 96B, nr 2, pp. 333-341, 2010.
- [71] Z. Wang, Y. Leng, N. Huang i M. Zhu, „Adhesion Evaluation of Titanium Oxides Films on 316L Stainless Steel,” *Key Engineering Materials*, Tomy %1 z %2 353-358, pp. 2127-2130, 2007.
- [72] N. Huang, P. Yang, Y. X. Leng, J. Y. Chen, H. Sun, J. Wang i G. J. Wang, „Hemocompatibility of titanium oxide films,” *Biomaterials*, tom 24, nr 13, p. 2177–2187, 2003.
- [73] S. Windecker, I. Mayer, G. De Pasquale, W. Maier i O. Dirsch, „Stent coating with titanium-nitride-oxide for reduction of neointimal hyperplasia,” *Circulation*, tom 104, nr 8, pp. 928-933, 2001.

- 
- [74] P. P. Karjalainen, A. P. Annala, A. Vahlberg i T. Airaksinen, „Long-term clinical outcome with titanium-nitride-oxide-coated stents and paclitaxel-eluting stents for coronary revascularization in an unselected population,” *International Journal of Cardiology*, tom 144, nr 4, p. 42–46, 2017.
- [75] Q. Huang, Y. Yang, R. Hu i C. Lin, „Reduced platelet adhesion and improved corrosion resistance of superhydrophobic TiO<sub>2</sub>-nanotube-coated 316L stainless steel,” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, tom 125, pp. 134-141, 2015.
- [76] P. O. Oviroh, R. Akbarzadeh, D. Pan, R. Coetze i T. C. Jen, „New development of atomic layer deposition: Processes, methods and applications,” *Science and Technology of Advanced Materials*, tom 20, p. 465–496, 2019.
- [77] L. Hu, W. Qi i Y. Li, „Coating strategies for atomic layer deposition,” *Nanotechnology Reviews*, tom 6, nr 6, pp. 527-547, 2017.
- [78] Coating Technologies, S.L., „What is atomic layer deposition,” 21 06 2022. [Online]. Available: <https://ctechnano.com/coating-technologies/what-is-atomic-layer-deposition-ald/>. [Data uzyskania dostępu: 21 06 2022].
- [79] A. M. Cherian, S. V. Nair, V. Maniyal i D. Menon, „Surface engineering at the nanoscale: A way forward to improve coronary stent efficiency,” *APL Bioengineering*, tom 5, nr 021508, 2021.
- [80] L. A. Dobrzański, A. D. Dobrzańska-Danikiewicz, M. Szindler i A. Achteлик-Franczak, „Atomic layer deposition of TiO<sub>2</sub> onto porous biomaterials,” *Archives of Material Science & Engineering*, tom 75, nr 1, pp. 5-11, 2015.
- [81] L. Liu, R. Bhatia i T. J. Webster, „Atomic layer deposition of nano-TiO<sub>2</sub> thin films with enhanced biocompatibility,” *International Journal of Nanomedicine*, tom 12, pp. Atomic layer deposition of nano-TiO<sub>2</sub> thin films with enhanced biocompatibility, 2017.
- [82] F. Yang, R. Chang i T. Webster, „Atomic Layer Deposition Coating of TiO<sub>2</sub> Nano-Thin Films on Magnesium-Zinc Alloys to Enhance Cytocompatibility for Bioresorbable Vascular Stents,” *International Journal of Nanomedicine*, tom 14, p. 9955–9970, 2019.
- [83] R. Matero, *Atomic Layer Deposition of Oxide Films – Growth, Characterisation and Reaction Mechanism Studies*, Helsinki: University of Helsinki-Finland, 2004.
- [84] E. Marin, A. Lanzutti, L. Guzman i L. Fedrizzi, „Corrosion protection of AISI 316 stainless steel by ALD alumina/titania nanometric coatings,” *Journal of Coatings Technology and Research*, tom 8, nr 655, 2011.

- 
- [85] B. Diaz, J. Swiatowska, V. Maurice i A. Seyeux, „Electrochemical and time-of-flight secondary ion mass spectrometry analysis of ultra-thin metal oxide (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) coatings deposited by atomic layer deposition on stainless steel,” *Electrochimica Acta*, tom 56, nr 28, pp. 10516-10523, 2011.
- [86] S. E. Potts, L. Schmalz, B. Diaz, V. Maurice, A. Seyeux, P. Marcus, G. Radnóczy i L. Lóth, „Ultra-Thin Aluminium Oxide Films Deposited by Plasma-Enhanced Atomic Layer Deposition for Corrosion Protection,” *Journal of The Electrochemical Society*, tom 158, nr 5, 2011.
- [87] A. S. Jugessur, A. Textor i C. Grierson, „Nanometer scale coating using atomic layer deposition technique to enhance performance of bio-medical devices,” w *Proceedings of the 12th IEEE International Conference on Nano/Molecular Medicine and Engineering*, 2018.
- [88] M. Staszuk, D. Pakuła, Ł. Raimann, M. Król, M. Basiaga i D. Mysłek, „Structure and Properties of ZnO Coatings Obtained by Atomic Layer Deposition (ALD) Method on a Cr-Ni-Mo Steel Substrate Type,” *Materials*, tom 13, nr 19, p. 4223, 2020.
- [89] W. Walke, M. Basiaga, M. Antonowicz i Z. Paszenda, „Sutability of gradient coatings of TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub> in improving haemocompatibility of AISI316LVM base,” *Engineering of Biomaterials*, tom 143, p. 81, 2017.
- [90] M. K. Abbas, S. A. Ajeel i H. M. Wafdullach, „Biocompatibility, Bioactivity and Corrosion Resistance of Stainless Steel 316L Nanocoated with TiO<sub>2</sub> and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> by Atomic Layer Deposition Method,” w *The Sixth Scientific Conference "Renewable Energy and its Applications" 21–22 February 2018, Karbala, Iraq*, Karbala, 2018.
- [91] I. Spajić, E. Rahimi, M. Lekka, R. Offoiach i L. Fedrizzi, „Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and HfO<sub>2</sub> Atomic Layers Deposited in Single and Multilayer Configurations on Titanium and on Stainless Steel for Biomedical Applications,” *Journal of the Electrochemical Society*, tom 168, nr 7, p. 071510, 2021.
- [92] I. Spajić, P. Rodic, G. Sekularac, M. Lekka i L. Fedrizzi, „The effect of surface preparation on the protective properties of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and HfO<sub>2</sub> thin films deposited on cp-titanium by atomic layer deposition,” *Electrochimica Acta*, tom 366, nr 137431, 2021.
- [93] V. Yelamachili i S. Hajouli, *Coronary Artery Stents*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021.
- [94] C. X. Shan, X. Hou i K.-L. Choy, „Corrosion resistance of TiO<sub>2</sub> films grown on stainless steel by atomic layer deposition,” *Surface and Coatings Technology*, tom 202, nr 11, pp. 2399-2402, 2008.

- 
- [95] D. Xie, H. Wang, R. Ganesan, Y. Leng i H. Sun, „Fatigue durability and corrosion resistance of TiO<sub>2</sub> films on CoCrMo alloy under cyclic deformation,” *Surface and Coatings Technology*, tom 275, pp. 252-259, 2015.
- [96] C. C. Kei, Y. S. Yu, J. Racek, D. Vokoun i P. Sittner, „Atomic Layer-Deposited Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Coatings on NiTi Alloy,” *Journal of Materials Engineering and Performance*, tom 23, p. 2641–2649, 2014.
- [97] M. I. Hamil, N. H. Siyah i M. K. Khalaf, „Electrophoretic deposition of Thin film TiO<sub>2</sub> on Ti6AL4V alloy surface for biomedical applications,” *Egyptian Journal of Chemistry*, tom 63, nr 8, pp. 2959-2964, 2020.
- [98] W. Cai i J. H. Siu, „Effect of working pressure on the structure and the electrochemical corrosion behavior of diamond-like carbon (DLC) coatings on the NiTi alloys,” *Surface and Coatings Technology*, tom 201, nr 9-11, pp. 5194-5197, 2007.
- [99] Polski Komitet Organizacyjny, Sektor Zdrowia, Środowiska i Medycyny, *PN-EN ISO 5832-1:2020-03 Implanty dla chirurgii -- Materiały metalowe -- Część 1: Stal nierdzewna do obróbki plastycznej*, Warszawa: Polski Komitet Organizacyjny, 2020.
- [100] ASTM international, *Standard Test Method for Conducting Cyclic Potentiodynamic Polarization Measurements to Determine the Corrosion Susceptibility of Small Implant Devices*, West Conshohocken, PA: ASTM International, 2019.
- [101] Polski Komitet Normalizacyjny, Sektor Zdrowia, Środowiska i Medycyny, *PN-EN ISO 10993-15:2009 Biologiczna ocena wyrobów medycznych -- Część 15: Identyfikacja i oznaczanie ilościowe produktów degradacji metali i stopów*, Warszawa: Polski Komitet Normalizacyjny, 2009.
- [102] ASTM International, *Standard Test Method for Pitting or Crevice Corrosion of Metallic Surgical Implant Materials*, West Conshohocken, PA: ASTM International, 2014.
- [103] Polski Komitet Normalizacyjny, Sektor Chemii, *PN-EN ISO 20502:2016-05 Ceramika wysokiej jakości (ceramika zaawansowana, techniczna ceramika zaawansowana) -- Oznaczanie adhezji powłok ceramicznych w próbie zarysowania*, Warszawa: Polski Komitet Normalizacyjny, 2016.
- [104] DiaMed AG, *Impact-R User Manual*, 2005.
- [105] R. Major, G. Wilczek, J. Więcek, M. Gawlikowski i H. Plutecka, „Hemocompatible Thin Films Assessed under Blood Flow,” *Molecules*, tom 5696, nr 27, pp. 1-25, 2022.

- 
- [106] Polski Komitet Normalizacyjny, Sektor Zdrowia, Środowiska i Medycyny, *PN-EN ISO 10993-5:2009 Biologiczna ocena wyrobów medycznych -- Część 5: Badania cytotoksyczności in vitro*, Warszawa: Polski Komitet Normalizacyjny, 2009.
- [107] Polski Komitet Normalizacyjny, Sektor Zdrowia, Środowiska i Medycyny, *PN-EN ISO 10993-4:2018-02 Biologiczna ocena wyrobów medycznych -- Część 4: Wybór badań dla interakcji z krwią*, Warszawa: Polski Komitet Normalizacyjny, 2018.
- [108] ASTM International, *Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials*, West Conshohocken, PA: ASTM International, 2010.
- [109] L. A. Dobrzański, A. D. Dobrzańska-Danikiewicz, M. Szindler, A. Achtelek-Franczak i W. Pakieła, „Atomic layer deposition of TiO<sub>2</sub> onto porous biomaterials,” *Archives of Material Science and Engineering*, tom 75, nr 1, pp. 5-11, 2015.
- [110] M. Motola, J. Capek, R. Zazpe, J. Bacova i L. Hromadko, „Thin TiO<sub>2</sub> Coatings by ALD Enhance the Cell Growth on TiO<sub>2</sub> Nanotubular and Flat Substrates,” *ACS Appl. Bio Mater.*, tom 3, nr 9, p. 6447–6456, 2020.
- [111] L. Feller, Y. Yadvat, R. A. G. Khammissa, R. Meyerov i I. Schechter, „Cellular Responses Evoked by Different Surface Characteristics of Intraosseous Titanium Implants,” *Biomed Research International*, tom 2015, nr 171945, pp. 1-8, 2015.
- [112] P. Wilczek i R. Major, *Nanostructural materials for implants and cardiovascular biomedical devices*, Kraków: M-Studio, 2011.
- [113] B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis i M. Raff, *Podstawy biologii komórki*, Warszawa: PWN, 1999.
- [114] E. Noam, „Corrosion of Metallic Biomaterials: A Review,” *Materials*, tom 12, nr 3, p. 407, 2019.
- [115] C. A. Labarrere, A. E. Dabiri i G. S. Kassab, „Thrombogenic and Inflammatory Reactions to Biomaterials in Medical Devices,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, tom 8, nr 123, pp. 1-18, 2020.
- [116] E. L. Fosbol, Y. Zhao, D. M. Shahian, F. L. Grover i F. H. Edwards, „Repeat Coronary Revascularization After Coronary Artery; The Society of Thoracic Surgeons' National Experience, 1991-20,” *Circulation*, tom 127, pp. 1656-1663, 2013.
- [117] C. Chew, M. Hendrickson, H. Yang, G. A. Stouffer i J. Rossi, „Abstract 11557: Rates of Early Target Vessel Revascularization and Target Lesion

---

Revascularization Amongst Third Generation Drug-Eluting Stents,”  
*Circulation*, tom 144, nr 1, p. 11557, 2021.