

---

KATEDRA BIOMATERIAŁÓW I INŻYNIERII WYROBÓW MEDYCZNYCH  
WYDZIAŁ INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ



**Politechnika  
Śląska**

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Struktura i własności fizykochemiczne warstw  
powierzchniowych stopu NiTi stosowanego na implanty  
w układzie krwionośnym**

**mgr inż. Anna TARATUTA**

**PROMOTOR**

**dr hab. inż. Marcin Basiaga, prof. PŚ**

**PROMOTOR POMOCNICZY**

**dr inż. Magdalena Antonowicz**

ZABRZE 2023

*Składam serdeczne podziękowania dla wszystkich osób,  
które wspierały mnie podczas pisania tej pracy.*

*Szczególne podziękowania kieruję w stronę promotorów,  
dr. hab. inż. Marcina Basiagi, prof. PŚ oraz dr inż. Magdaleny Antonowicz.*

## SPIS TREŚCI

---

I. WPROWADZENIE .....	5
II. PRZEGLĄD LITERATURY .....	7
1. Embriogeneza układu sercowo-naczyniowego.....	7
2. Budowa i funkcjonowanie zdrowego serca .....	9
3. Wady wrodzone serca .....	11
3.1. Etiologia i epidemiologia wrodzonych wad serca.....	11
3.2. Ubytek w przegrodzie międzykomorowej (VSD) .....	13
3.3. Ubytek w przegrodzie międzyprzedsionkowej (ASD).....	15
3.4. Tetralogia Fallota (TOF) .....	17
3.5. Metody leczenia .....	18
3.6. Implanty dedykowane do zamykania ubytków w okolicy serca .....	21
4. Problematyka stosowania implantów ze stopu NiTi.....	25
5. Modyfikacje powierzchni stopu NiTi do zastosowań w układzie krwionośnym ...	30
6. Podsumowanie przeglądu literatury .....	40
III. BADANIA WŁASNE.....	42
1. Cel, założenia i teza pracy .....	42
2. Materiał do badań .....	44
3. Modyfikacja powierzchni .....	44
4. Metodyka badań.....	46
4.1. Charakterystyka powłoki.....	46
4.2. Badania własności fizycznych.....	48
4.3. Badania własności elektrochemicznych .....	49
4.4. Badania własności biologicznych .....	52
4.5. Widzialność fluoroskopowa .....	56

5. Wyniki badań .....	57
5.1. Charakterystyka powłoki.....	57
5.2. Badania własności fizycznych.....	61
5.3. Badania własności elektrochemicznych .....	66
5.4. Badania własności biologicznych .....	69
5.5. Widzialność fluoroskopowa .....	78
6. Omówienie wyników .....	80
7. Wnioski.....	87
IV. BIBLIOGRAFIA .....	88
Streszczenie .....	105
Abstract .....	106

# I. WPROWADZENIE

---

Kluczowym etapem w rozwoju prawidłowego funkcjonowania serca człowieka jest jego życie płodowe. Podczas formowania się zarodka komórki macierzyste różnicują się, rozpoczynając rozwój wszystkich najważniejszych struktur tworzących dojrzały organizm. Rozwój serca i prymitywnych naczyń krwionośnych przypada na około trzeci tydzień życia zarodka. Podczas tego wieloetapowego i skomplikowanego procesu pierwotna cewa sercowa ulega zapętleniu, budując czterojamowe serce. Jest to jeden z najistotniejszych okresów podczas rozwoju serca, ponieważ warunkuje jego prawidłowe położenie w obrębie klatki piersiowej, a także ułożenie poszczególnych jego struktur względem siebie. Jednak możliwe nieprawidłowości występujące podczas kolejnych faz tworzenia się serca prowadzą do pojawienia się wad wrodzonych.

Wady wrodzone obejmują zaburzenia rozwoju organizmu, będące przyczyną powstania anomalii w budowie różnych części ciała. Przyczyny ich wystąpienia nie są dotychczas w pełni poznane. Wada serca jest najczęściej występującą wadą wrodzoną u dzieci. Dzieli się na wiele podjednostek chorobowych, obejmujących różne rodzaje defektów w jego anatomii. Statystycznie najczęściej występują: ubytek w przegrodzie międzykomorowej, międzyprzedsionkowej i Tetralogia Fallota. Wspólnym objawem tych wad jest występowanie otworów, zlokalizowanych w różnych miejscach pompującego krew organu. Bezpośrednim skutkiem ich wystąpienia są zaburzenia prawidłowego przepływu krwi w sercu. W przypadku dużej liczby lub nasilenia objawów, mogą doprowadzić nawet do śmierci noworodka.

Nie każda wada serca wymaga podjęcia leczenia. Część z nich ulega samoistnemu zamknięciu w pierwszych latach życia dziecka, z innymi można funkcjonować bez poważniejszych konsekwencji, a czasem stosuje się farmakoterapię w celu łagodzenia dokuczliwych objawów. W przypadku dużych lub skomplikowanych defektów podejmuje się operację na otwartym sercu. Wady izolowane o średnicy do ok. 40 mm natomiast mogą być zamykane implantami z wykorzystaniem technik małoinwazyjnych. Stosowane implanty do uszczelniania ubytków w sercu to okludery. Zbudowane są najczęściej z nitinolowej siatki, uformowanej w kształt dwóch dysków, pomiędzy którymi rozpięta jest polimerowa tkanina. Ich umieszczenie po obu stronach ubytku uszczelnia go, zapobiegając nieprawidłowemu przepływowi krwi.

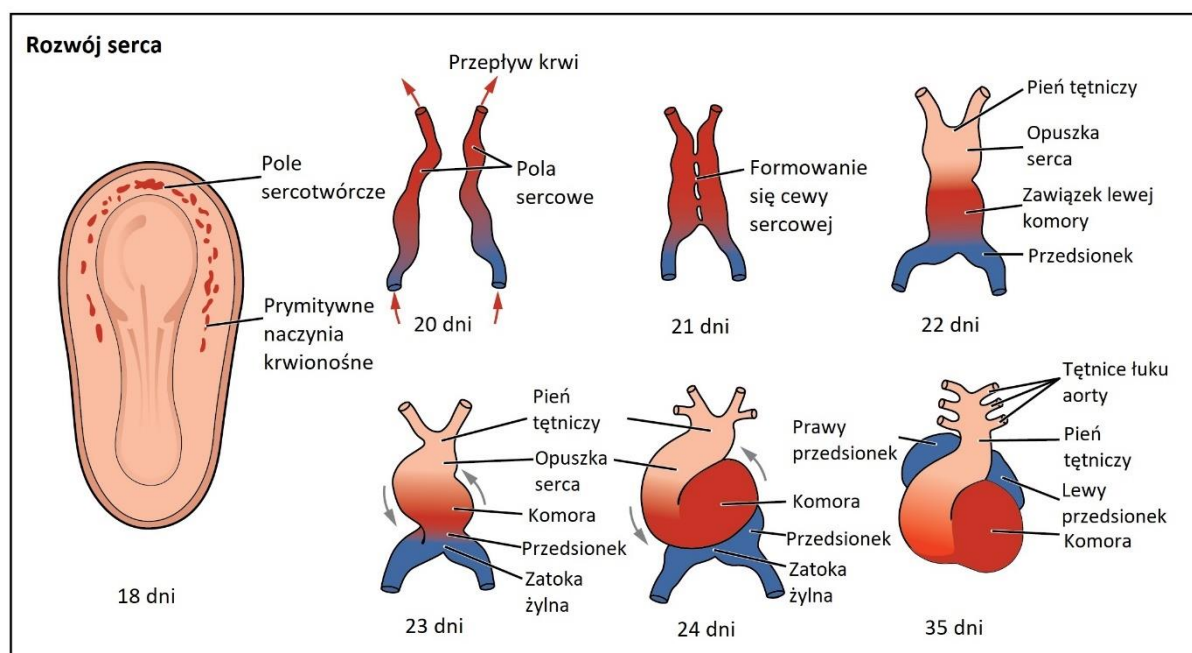
Idealnym materiałem na implanty wprowadzane do organizmu technikami małoinwazyjnymi wydaje się być nitinol, dzięki swojej biokompatybilności i wykazywaniu zjawiska pseudosprężystości. Mimo tego, materiał ten niesie ze sobą ryzyko wystąpienia alergii, zakrzepów czy problemów występujących podczas przerastania tkanką. Aby je rozwiązać, coraz częściej proponowane są różne metody modyfikacji powierzchni. Umożliwiają one ograniczenie wystąpienia efektów niepożądanych, jednocześnie pozwalając na zachowanie efektu związanego z pamięcią kształtu. Podjęto wiele prób modyfikacji powierzchni stopu NiTi, także przez nanoszenie różnego rodzaju powłok, natomiast nie zaproponowano dotychczas rozwiązania, które skutecznie ograniczyłoby uwalnianie niklu, a także zintensyfikowało procesy proliferacji komórek wpływające na przerastanie implantu tkanką. Obiecujące w tym zakresie są powłoki na bazie tantalu, który w ostatnich latach zainteresował naukowców ze względu na dobrą biokompatybilność.

W pracy doktorskiej skupiono się na opracowaniu warunków modyfikacji powierzchni biomateriału do zastosowania na okludery, która ograniczy przenikanie jonów niklu do organizmu, jednocześnie nie pozbawiając wyrobu efektu pseudosprężystości ani nie pogarszając pozostałych właściwości takich jak odporność na korozję czy biologiczna odpowiedź komórek. Na podstawie przeprowadzonych badań dokonano oceny analizowanej powłoki do zastosowania w układzie sercowo-naczyniowym. Uzyskane wyniki mogą być podstawą do dalszych badań na wyrobach medycznych w warunkach *in vivo*.

## II. PRZEGLĄD LITERATURY

### 1. Embriogeneza układu sercowo-naczyniowego

Pierwszym funkcjonalnym organem formującym się już na etapie życia płodowego u kręgowców, w tym ludzi, jest serce [1]. Zaczyna rozwijać się w połowie trzeciego tygodnia ciąży, w pobliżu głowy zarodka, w regionie zwanym obszarem kardiogenym. Komórki, z których zostanie uformowane różnicują się w obszarze pola sercotwórczego, a następnie dzielą się na dwa pola sercowe o rurowym kształcie (Rys. 1). Początkowo pola sercowe wypełniają beleczki mięśniowe, pomiędzy którymi przepływa krew, a oddychanie i odżywianie wewnątrzkomórkowe zachodzi na drodze dyfuzji [2]. Pierwsze pole sercowe bierze udział w tworzeniu przedsionków, kanału przedsionkowo-komorowego i lewej komory, a drugie jest protoplastą prawej komory serca, pierwotnej zatoki żyłnej, układu przewodzącego, tylnej ściany przedsionków, żył płucnych oraz żył i tętnic wieńcowych [3].

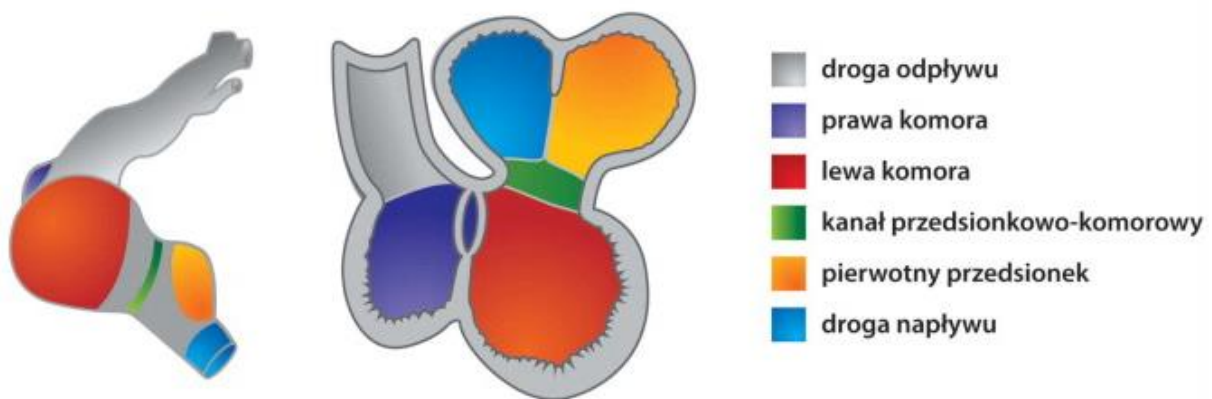


Rys. 1. Etapy rozwoju embrionalnego serca [4]

W dalszym rozwoju zarodka pola sercowe zbliżają się i łączą ze sobą, tworząc cewę sercową. To bardzo prymitywna struktura, rozbudowywana w miarę migrowania kolejnych grup komórek w jej kierunku [5]. Szybko tworzy pięć odrębnych regionów: pień tętniczy, opuszkę serca, pierwotną komorę, pierwotny przedsionek i zatokę żylną.

W cewie serca można wyróżnić wspólny przedsionek, który kończy się otworem pierwotnym, zamykającym się dopiero podczas uformowania się zastawek przedsionkowo-komorowych [6]. Od 21 dnia ciąży rozpoczyna się wczesna współpraca układu nerwowego z mięśniowym, przejawiająca się skurczami cewy sercowej, a kilka dni później cewa zaczyna pompować krew [7]. Zewnętrzna ściana serca zbudowana jest ze zwartego i luźnego (tzw. gąbczastego) miokardium. Ułatwia to odżywianie serca przez krew omywającą wsierdzie, kiedy nie ma jeszcze naczyń wieńcowych [8], [9].

W okolicy czwartego tygodnia ciąży dotychczas prosta cewa sercowa zaczyna ulegać zapętlaniu (Rys. 2). Mechanizm sterujący tym procesem jest bardzo prosty – część brzuszna wzrasta szybciej w porównaniu do grzbietowej. Jest to krytyczny etap formowania się serca, decydujący o prawidłowym położeniu struktur nie tylko względem siebie, ale także w obrębie klatki piersiowej [10]. Następnie zaczynają uwidaczniać się regiony serca: pierwotny przedsionek prawy i lewy, komora lewa oraz opuszka serca. Po zakończeniu zapętlania serce nabiera 4-jamowego wyglądu, choć nadal jest pojedynczą cewą z przewężeniem pomiędzy lewą komorą i lewym przedsionkiem, zwanym kanałem przedsionkowo-komorowym [11].



Rys. 2. Pierwotna cewa sercowa i jej podział na obszary podczas zapętlania [12]

W 33 dniu ciąży z górnej części przedsionka wzrasta przegroda, uczestnicząca w zarastaniu otworu pierwotnego. Kilka dni później, w czasie zarastania, w przegrodzie powstaje nowy otwór, zwany otworem wtórnym. Równocześnie od strony prawego przedsionka rośnie druga przegroda, która nie zarasta całkowicie, pozostawiając w środkowej części otwór, zwany otworem owalnym. Otwór wtórny pozwala na swobodny przepływ utlenowanej krwi z łożyska przez prawy przedsionek do przedsionka lewego, z częściowym ominięciem prawej części serca, a po porodzie zamyka się samoczynnie, uszczelniając przegrodę międzyprzedsionkową [12].



Podział przedsionków i komór przez przegrodę międzyprzedsionkową, przegrodę międzykomorową i przegrodę przedsionkowo-komorową kończy się pod koniec piątego tygodnia. Zastawki przedsionkowo-komorowe tworzą się między piątym a ósmym, a zastawki półksiężycowate między piątym a dziewiątym tygodniem ciąży. Końcowym etapem formowania serca jest przekształcenie się pięciu regionów pierwotnej cewy sercowej w rozpoznawalne struktury [4].

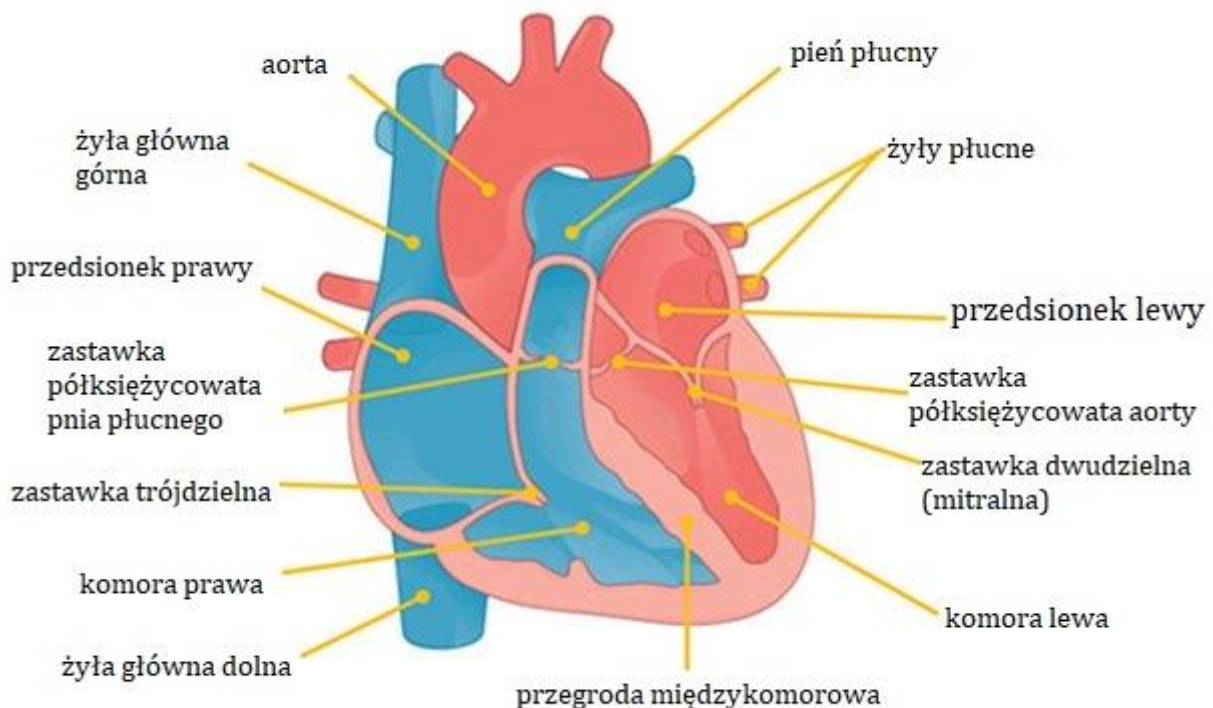
Tuż po porodzie, po pierwszych kilku wdechach noworodka, dochodzi do zwiększenia ciśnienia parcjalnego tlenu, co stymuluje zamknięcie przewodu tętniczego. Od tego momentu krew z prawej komory płynie wyłącznie do płuc, prowadząc do wytworzenia się równoległych układów: krążenia płucnego i systemowego. W tym czasie powinno również nastąpić zamknięcie otworu owalnego w przegrodzie międzyprzedsionkowej. Zamknięciu także ulega przewód żylny, przekierowując krew z żyły wrotnej do wątroby [13].

## **2. Budowa i funkcjonowanie zdrowego serca**

Serce dorosłego człowieka (Rys. 3) położone jest w śródpiersiu, przyśrodkowo, pomiędzy płucami w jamie osierdza. Od innych struktur oddziela je twarda błona, zwaną osierdziem lub workiem osierdziowym. Typowe serce jest wielkości pięści, ma ok. 12 cm długości, 8 cm szerokości i 6 cm grubości. Biorąc pod uwagę różnicę wielkości pomiędzy większością przedstawicieli płci, masa kobiecego serca wynosi około 250-300 gramów, a męskiego około 300-350 gramów [14].

Serce składa się z czterech komór: po lewej i prawej stronie znajduje się po jednym przedsionku i jednej komorze. Przedsionki i komory serca rozdzielają przegrody. Pomiędzy dwoma przedsionkami znajduje się przegroda międzyprzedsionkowa. W zdrowym, dorosłym sercu, przegroda międzyprzedsionkowa ma owalne zagłębienie, będące pozostałością po otworze owalnym [15]. Przegroda między przedsionkami i komorami nazywana jest przegrodą przedsionkowo-komorową. Charakteryzuje się obecnością czterech otworów, które umożliwiają przepływ krwi z przedsionków do komór oraz z komór do pnia płucnego i aorty. W każdym z tych otworów między przedsionkami i komorami znajduje się zastawka, czyli wyspecjalizowana struktura, zapewniająca jednokierunkowy przepływ krwi. Zastawki pomiędzy przedsionkami i komorami to zastawki przedsionkowo-komorowe. Zastawki

w otworach prowadzących do pnia płucnego i aorty, ze względu na kształt tworzących je płatków, to zastawki półksiężycowate. Prawidłowo uformowana zastawka aortalna składa się z trzech płatków: lewego, prawego i tylnego, pozbawionego tętnic wieńcowych. W fazie rozkurczowej napełniają się krwią i dociskają do siebie, zapobiegając odpływowi wstecznemu krwi do lewej komory [16]. Prawa komora serca pompuje odtlenowaną krew do pnia płucnego, który rozwidla się na lewą oraz prawą tętnicę płucną. Te z kolei rozgałęziają się wielokrotnie, zanim dotrą do naczyń płucnych, gdzie następuje wymiana gazowa. Tętnice pnia płucnego i ich rozgałęzienia są jedynymi tętnicami w organizmie, które przenoszą względnie odtlenowaną krew. Wysoko natlenowana krew powracająca z naczyń włosowatych w płucach przechodzi przez żyły płucne. Płynie do lewego przedsionka, lewej komory serca, aorty i dalej do wielu gałęzi obwodu systemowego. Ostatecznie naczynia te doprowadzają ją do naczyń włosowatych, gdzie dochodzi do wymiany z płynem tkankowym i komórkami organizmu. Tlen i składniki odżywcze opuszczają systemowe naczynia włosowate, aby wziąć udział w procesach metabolicznych komórek, a produkty odpadowe wraz z dwutlenkiem węgla dostają się do krwi [17].



Rys. 3. Anatomia ludzkiego serca [18]

Każda z komór serca wyrzuca podczas jednego skurczu około 70 ml krwi. Odpowiada to 5,25 litra płynu na minutę i około 14 000 litrów dziennie. W ciągu jednego roku to 10 milionów litrów krwi przepływającej przez prawie 100 000 km naczyń. Przyjmując średnie tempo skurczów na poziomie 75 skurczów na minutę, ludzkie serce kurczy się około 108 000 razy w ciągu jednego dnia, ponad 39 milionów razy w ciągu jednego roku i prawie 3 miliardy razy w ciągu 75-letniego życia [19].

### **3. Wady wrodzone serca**

Serce człowieka jest niezwykle złożonym organem, a jego embriogeneza rozpoczynająca się na bardzo wczesnym etapie formowania zarodka naraża je na ryzyko wystąpienia różnych nieprawidłowości. Podczas łączenia się pól sercowych w cewę sercową i jej zapętlania powstają otwory umożliwiające swobodny przepływ krwi. W zdrowym sercu, po porodzie, otwory te ulegają zamknięciu samoistnie. Niestety nie u każdego zarodka proces ten przebiega bez zakłóceń, a pojawiające się błędy mogą skutkować wystąpieniem wad wrodzonych.

#### **3.1. Etiologia i epidemiologia wrodzonych wad serca**

Wady wrodzone serca (*Congenital Heart Disease, CHD*) obejmują nieprawidłowości w budowie serca powstające u płodu znajdującego się w macicy [20]. Ze wszystkich wad wrodzonych, to CHD występują najczęściej [21], stanowiąc ok. 1% żywych urodzeń [22]. Na świecie co roku rodzi się ok. 1,35 mln niemowląt z różnymi rodzajami wad serca [23]. Jedną czwartą z nich określa się jako krytyczne wrodzone wady serca (*Critical Congenital Heart Disease, CCHD*), ze względu na dużą ilość lub nasilenie występujących objawów [24]. Jeżeli nie zostaną szybko wykryte, mogą prowadzić do problemów zdrowotnych, a nawet śmierci [26].

CHD wciąż pozostają jedną z głównych przyczyn zgonów u niemowląt [25]. Prawie połowa z nich jeszcze do niedawna miała miejsce w okresie niemowlęcym, ale dzięki znacznym postępom w zakresie diagnostyki prenatalnej, neonatologii i opieki długoterminowej, znacznie się zmniejszyła. Obecnie ponad 75% dzieci z CHD, które przeżyją pierwszy rok życia, w tym dzieci ze złożonymi wadami rozwojowymi, dożyje dorosłości [26]. Rodzaje chorób zaliczających się do CHD wraz z częstością ich występowania przedstawiono w Tab. 1.

Tab. 1. Częstość występowania wrodzonych wad serca wg [27]–[29]

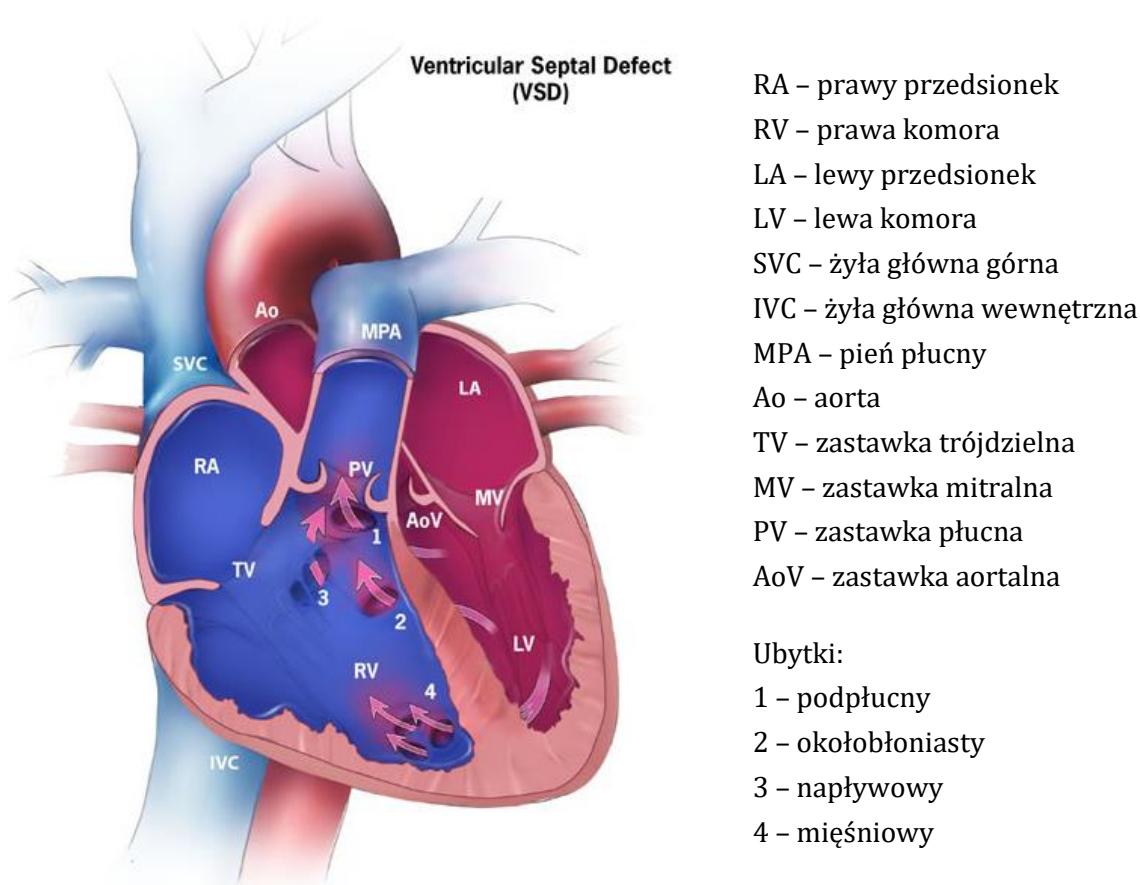
Rodzaj zmiany	Szacowany odsetek CHD [%]
Ubytek w przegrodzie międzykomorowej ( <i>Ventricular Septal Defect, VSD</i> )	20-40
Ubytek w przegrodzie międzyprzedsionkowej ( <i>Atrial Septal Defect, ASD</i> )	6-10
Tetralogia Fallota ( <i>Tetralogy of Fallot, TOF</i> )	5-10
Zwężenie cieśni aorty ( <i>Coarctation of the Aorta, CoA</i> )	4-10
Przerwały przewód tętniczy ( <i>Patent Ductus Arteriosus, PDA</i> )	10
Transpozycja wielkich naczyń ( <i>Transposition of the Great Vessels, TGV</i> )	5
Krytyczna stenoza aortalna ( <i>Critical Aortic Stenosis, AS</i> )	5
Zespół hipoplastycznego lewego serca ( <i>Hypoplastic left heart syndrome, HLHS</i> )	1-2
Atrezja zastawki trójdzielnej ( <i>Tricuspid Atresia, TA</i> )	1
Zwężenie zastawki tętnicy płucnej ( <i>Pulmonary Valve Stenosis, PVS</i> )	1
Anomalia Ebsteina ( <i>Ebstein Anomaly, EA</i> )	1
Przerwanie łuku aorty ( <i>Interrupted Aortic Arch, IAA</i> )	1

Większość nieprawidłowości serca jest wieloczynnikowa, a ich przyczyny nie są dotychczas znane. Można natomiast wyróżnić czynniki ryzyka, do których zaliczają się: teratogeny środowiskowe (dioksyny, polichlorowane bifenylole, pestycydy) [30], spożywanie przez kobietę w ciąży alkoholu lub leków m. in. przeciwpadaczkowych [31] czy antyretrowirusowych [32] oraz infekcje, takie jak grypa i różyczka [33]. Pojawiają się też doniesienia o negatywnym wpływie otyłości u matki na rozwój serca płodu [34], mogącej prowadzić do cukrzycy [35] czy hipercholesterolemii [36]. Do grupy najczęściej występujących CHD zalicza się: ubytek w przegrodzie międzykomorowej (VSD), ubytek w przegrodzie międzyprzedsionkowej (ASD) i tetralogię Fallota (TOF).

### 3.2. Ubytek w przegrodzie międzykomorowej (VSD)

Ubytki w przegrodzie międzykomorowej stanowią 20-40% wszystkich wrodzonych wad serca występujących u niemowląt. Statystyki dotyczące stosunku ilości VSD do innych wad wrodzonych różnią się pomiędzy publikacjami i zależą od tego, czy autorzy wliczają urodzenia martwe (wada serca mogła być przyczyną zgonu). Często diagnozowane złożone anomalie serca wynikają ze współwystępowania VSD z innymi defektami [37].

Ze względu na miejsce występowania, VSD można podzielić na: występujące częściej ubytki okołobłoniaste, ubytki mięśniowe, napływowe i podpłucne (Rys. 4).



Rys. 4. Schemat serca z zaznaczonymi miejscami występowania ubytków (1-4) w VSD [38]

VSD jest również diagnozowany u około 0,2% pacjentów po zawale serca. Ubytek w przegrodzie międzykomorowej, pod wieloma względami, można uznać za jedną z prostszych form CHD. Można rozróżnić podział ubytków ze względu na ich wielkość [39]:

- niewielkie (o powierzchni poniżej 0,5 cm<sup>2</sup>) stanowiące większość przypadków, niepowodujące zaburzeń hemodynamiki, zazwyczaj ulegają samoistnemu zamknięciu w ciągu kilku miesięcy [40].
- średnie (o powierzchni 0,5 – 1,0 cm<sup>2</sup>) objawiające się podwyższonym ciśnieniem w pniu płucnym, co prowadzi do występowania duszności wysiłkowej.
- duże (powyżej 1,0 cm<sup>2</sup>), najpoważniejsze w skutkach, powodujące znaczny przeciek lewo-prawy, a w konsekwencji podwyższone ciśnienie płucne i przeciążenie objętościowe lewej komory. W obrazie klinicznym obserwuje się wtedy zastoinową niewydolność krążenia [28].

Ubytki te mogą występować samodzielnie, być powikłane dodatkowymi zmianami wewnątrzsercowymi, a mogą też być częścią bardziej złożonych kombinacji, takich jak tetralogia Fallota, podwójne ujście prawej komory, transpozycja lub serce jednokomorowe [41].

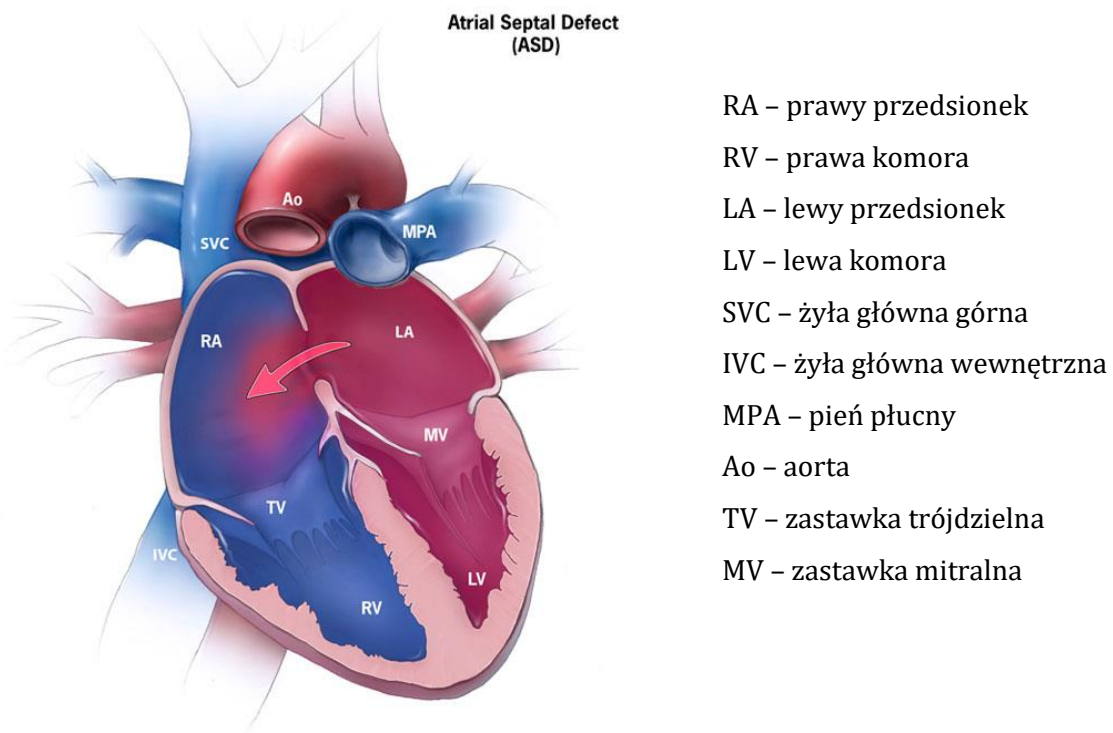
W większości zanotowanych przypadków VSD nie obserwuje się u noworodków żadnych objawów; dopiero duże ubytki przegrody skutkują dusznością, kłopotami z karmieniem, zaburzeniami rozwoju, wzrostu i przyrostu masy ciała, nawracającymi infekcjami dróg oddechowych, niewydolnością krążenia. Widoczną oznaką tej ostatniej jest sinica, pojawiająca się podczas płaczu lub infekcji. Bez podjęcia odpowiedniego leczenia następuje wzrost oporu naczyń płucnych i odwrócenie przecieku krwi przez ubytek przegrody, tzw. zespół Eisenmengera.

W przypadku łagodnych VSD u 30-50% dzieci dochodzi do samoistnego zamknięcia ubytku w ciągu pierwszego roku życia. Jedno z polskich badań podsumowuje ośmioletnie wyniki echokardiografii wykonanej u 3691 dzieci w wieku średnio 5,8 miesiąca. Najczęściej wykrywaną wadą był VSD izolowany (czyli występujący samodzielnie, bez wykrycia innych defektów), który wykryto u 132 dzieci w średnim wieku 4,2 tygodnia, co stanowiło 19,6% wszystkich wrodzonych anomalii serca. Samoistne zamknięcie małego ubytku, występującego w większości w części mięśniowej, zaobserwowano u 48 dzieci. U 33 dzieci ubytki wymagały zabiegu operacyjnego [42]. Mehta i in. [43] stwierdzili u 34% dzieci z izolowanym VSD spontaniczne zamknięcie się VSD w ciągu roku, a u 67% w ciągu 5 lat. Interwencji chirurgicznej wymagało 25% ubytków okołobłoniastych i 4% mięśniowych. Spontaniczne zamykanie się ubytków mięśniowych występowało dwa razy częściej niż ubytków typu okołobłoniastego. Przebieg kliniczny mięśniowych VSD jest łagodniejszy

niż VSD typu okołobłoniastego, chociaż 17% mięśniowych VSD pozostało niezamkniętych w ciągu 5 letniej obserwacji.

### 3.3. Ubytek w przegrodzie międzyprzedsionkowej (ASD)

Inną wadą wrodzoną serca jest ubytek w przegrodzie międzyprzedsionkowej, z częstością występowania ok. 5-10% [44]. Obejmuje zarówno wady dotyczące przegrody, jak i inne, które umożliwiają przepływ krwi pomiędzy przedsionkami. W przypadku braku powikłań w wieku niemowlęcym, objawy ASD pojawiają się dopiero u osób dorosłych, pomiędzy 30 a 40 roku życia, a częstotliwość występowania nietolerancji wysiłku, tachyarytmii przedsionkowych, dysfunkcji prawej komory i nadciśnienia płucnego wzrasta wraz z wiekiem i oczekiwaną długością życia [45]. Zmniejszenie wydolności wysiłkowej związane jest z wyrównaniem się ciśnień w przedsionkach i większą podatnością na przeciek utlenowanej krwi z lewej strony na prawą [46]. Nieleczona wada może skutkować zastoinową niewydolnością krążenia, powiększeniem i przerostem prawego przedsionka, a także zaburzeniami rytmu (migotanie przedsionków). Mechanikę przepływu krwi w ASD w przedstawiono na Rys. 5.



Rys. 5. Schemat serca z zaznaczonym miejscem występowania ASD [38]

Wyróżnia się cztery rodzaje ubytków w przegrodzie międzyprzedsionkowej [47]:

- ubytek typu otworu pierwotnego (*ostium primum, ASDI*),
- ubytek typu otworu wtórnego (*ostium secundum, ASDII*),
- ubytek typu zatoki żyłnej (*sinus venosus, ASD-SV*),
- ubytek typu zatoki wieńcowej (*coronary sinus atrial septal defect, ASD-cs*).

Małe ubytki w przegrodzie międzyprzedsionkowej, o wielkości poniżej 5 mm, zwykle zamykają się samoistnie w pierwszym roku życia [48]. Duże ubytki, większe niż 1 cm, mogą wymagać interwencji przezskórnej lub chirurgicznej, aby zapobiec dalszym powikłaniom, takim jak: częste infekcje układu oddechowego, trudności w oddychaniu, duszności i zmęczenie, szmery w sercu, obrzęki kończyn dolnych, udar mózgu, dysrytmia i nadciśnienie płucne [49]. Ryzyko rozwoju choroby naczyń płucnych, potencjalnie śmiertelnego powikłania, jest wyższe u kobiet i osób starszych z nieleczonym schorzeniem. Chirurgiczne zamknięcie wady jest bezpieczne i skuteczne, a jeśli zostanie wykonane przed 25 r. ż., nie wpływa na obniżenie oczekiwanej długości życia. Co więcej, nie określono dolnej ani górnej granicy wieku dla zamknięcia ubytku, a wielu klinicystów decyduje się skierować dzieci bez objawów na zabieg w wieku 3-5 lat. Zamknięcie ubytku jest bezpieczne i skuteczne w łagodzeniu objawów, nawet u pacjentów w podeszłym wieku, oczywiście z wyjątkiem wystąpienia przeciwwskazań [45].

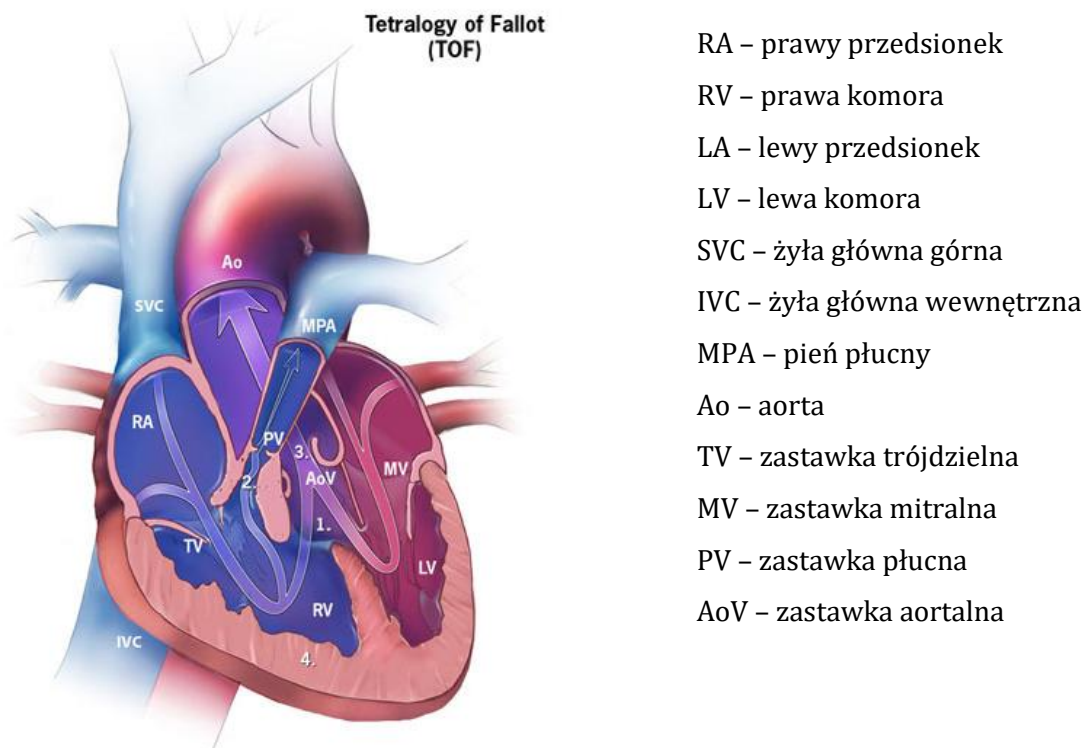
Szczególnym przypadkiem ASD jest przetrwały otwór owalny PFO (*Patent Foramen Ovale*), występujący nawet u 20-30% populacji. Jest pozostałością po otworze łączącym w życiu płodowym prawy i lewy przedsionek serca i ulega zamknięciu u większości niemowląt w ciągu pierwszego roku życia. Jednak u części zdrowych osób nie zamyka się całkowicie i w jego miejscu pozostaje nieczynny PFO. Wiąże się to z ryzykiem wystąpienia zwiększonego ciśnienia w prawym przedsionku, co może doprowadzić do otwarcia kanału i wystąpienia przecieku prawolewego [50].

ASD występują też razem z innymi wrodzonymi wadami serca, takimi jak VSD. Pacjenci z atrezią (zarośnięciem) zastawki trójdzielnej, transpozycją wielkich naczyń, zespołem hipoplastycznego lewego serca oraz całkowitym anomalnym powrotem żył płucnych potrzebują naprzemiennego przepływu krwi jaki zapewnia ASD, aby przetrwać pierwotną zmianę chorobową do czasu podjęcia leczenia interwencyjnego [51].



### 3.4. Tetralogia Fallota (TOF)

Kolejną wadą wrodzoną serca jest tetralogia Fallota, która w Stanach Zjednoczonych występuje częściej (1 na 2518 urodzeń) niż ASD (1 na 2122), wg statystyk z lat 2004-2006 [52]. Schemat serca z zaznaczonymi nieprawidłowościami przedstawiono na Rys. 6.



Rys. 6. Schemat serca z zaznaczonymi nieprawidłowymi przepływami krwi w TOF [38]

TOF diagnozowane jest na podstawie wystąpienia wszystkich czterech wymienionych anomalii [53]:

- otwór w ścianie pomiędzy dwoma dolnymi komorami serca – ten stan nazywany jest również ubytkiem w przegrodzie międzykomorowej,
- zwężenie zastawki płucnej i głównej tętnicy płucnej,
- powiększenie zastawki aortalnej, która wydaje się otwierać z obu komór, a nie tylko z lewej, jak w zdrowym sercu; zastawka aortalna znajduje się bezpośrednio na szczycie ubytku w przegrodzie międzykomorowej,
- ściana mięśniowa dolnej części prawej komory serca jest grubsza niż normalnie, występuje tzw. przerost komór.

Wada uznawana jest za krytyczną, ponieważ niemowlę ze zdiagnozowaną TOF może

wymagać operacji lub innych zabiegów niedługo po urodzeniu. Tetralogia Fallota może spowodować zmniejszenie ilości tlenu we krwi, objawiając się niebieskawym kolorem skóry zwanym sinicą – ponieważ krew nie przenosi wystarczającej ilości tlenu. Niemowlęta z TOF lub innymi wadami powodującymi sinicę mogą mieć poważne problemy zdrowotne, w tym: wyższe ryzyko zapalenia wsierdza, arytmii, zawroty głowy, omdlenia lub drgawki, opóźniony wzrost i rozwój. Podczas operacji leczenia TOF, lekarze poszerzają lub wymieniają zastawkę płucną i powiększają przejście do tętnicy płucnej. Umieszczają również łąkę na ubytku przegrody międzykomorowej, aby zamknąć otwór między dwiema dolnymi komorami serca. Działania te mają na celu poprawę przepływu krwi do płuc i reszty ciała [38].

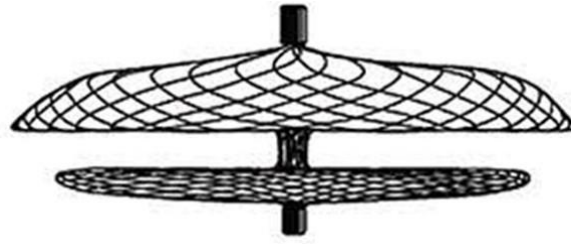
### **3.5. Metody leczenia**

Leczenie wrodzonych wad serca zależy od wieku pacjenta, ilości lub nasilenia objawów, wielkości defektu, a także obecności innych czynników. W przebiegu większości z nich (m. in. w VSD, ASD, TOF) pojawiają się ubytki, przez które krew w sercu przepływa w sposób nieprawidłowy, upośledzając jego funkcjonowanie. Część z nich zamyka się samoistnie w pierwszych latach życia dziecka, a przy występowaniu dokuczliwych objawów można zastosować farmakoterapię. Jednak leki mają za zadanie jedynie łagodzić symptomy choroby, takie jak nieregularne bicie serca czy wahania ciśnienia, ale nie ma takich, które mogłyby naprawić istniejący ubytek.

Uszczelnienie otworu może być wykonane podczas operacji na otwartym sercu (co jest zalecane w przypadku dużych anomalii) lub z wykorzystaniem technik małoinwazyjnych. Niektóre dotknięte chorobą niemowlęta i dzieci mogą wymagać jednej lub kilku interwencji przeprowadzanych w celu rekonstrukcji serca. Operację na otwartym sercu przeprowadza się w krążeniu pozaustrojowym, zwykle u dzieci w wieku przedszkolnym. Ubytki zszywane są nieresorbowalnym szwem ciągłym, a jeżeli jest ich kilka i mają większe rozmiary, do zamknięcia wykorzystuje się łąkę z osierdza dziecka lub z tworzywa sztucznego [45].

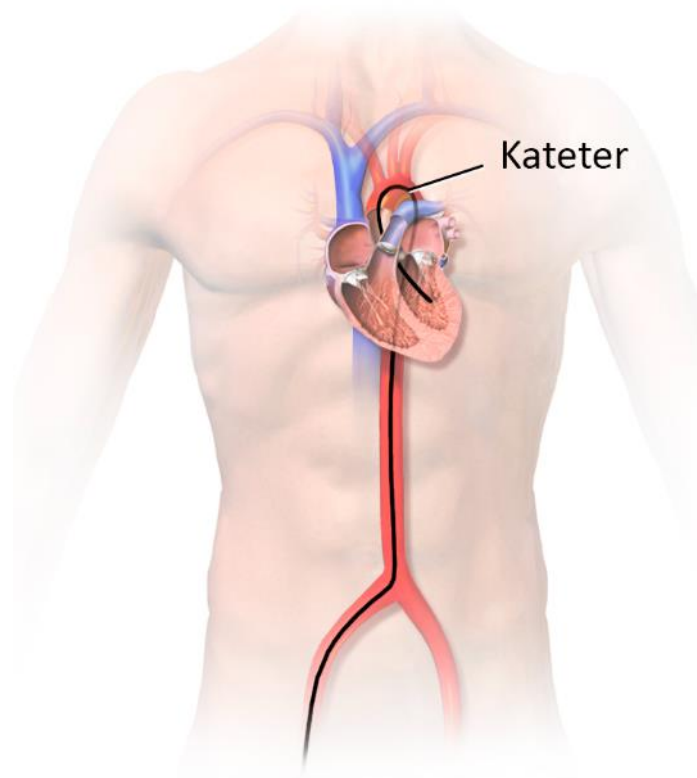
Ubytki, których morfologia umożliwia uszczelnienie ich przy pomocy implantu, do średnicy nawet 40 mm, można leczyć za pomocą przezskórnie wprowadzanych okluderów. Okluder to samorozprężające się urządzenie o konstrukcji składającej się z dwóch dysków wykonanych z cienkiego drutu nitinolowego z wszytą w nie łąką z tkaniny poliestrowej (Rys. 7). Urządzenie jest w pełni kompatybilne ze współczesnym obrazowaniem rezonansu magnetycznego, ale może powodować artefakty. Okludery na

rynku dostępne są w różnych rozmiarach, odpowiadającym średnicom ubytków w sercu, a także kształtach, dopasowanych do uszczelniania różnego rodzaju defektów [54].



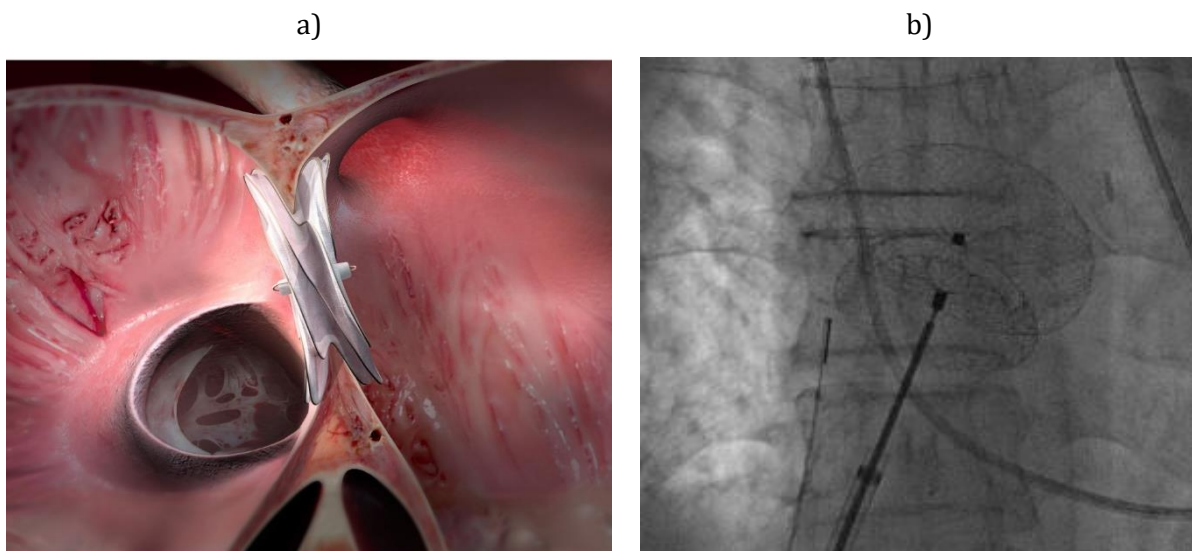
Rys. 7. Konstrukcja okludera na przykładzie urządzenia Amplatzer PFO Occluder [55]

Zabieg małoinwazyjny polega na nakłuciu żyły lub tętnicy przy znieczuleniu miejscowym i wprowadzeniu cewnika, zwanego kateterem, przesuwanego w świetle naczynia do właściwego miejsca w sercu (Rys. 8). Najczęściej w celu przeprowadzenia cewnikowania serca nakłuwa się naczynia udowe, rzadziej korzysta się z dojścia przez kończynę górną. W przypadku cewnikowania lewych struktur serca nakłuwa się naczynia tętnicze, natomiast prawych – naczynia żyłne [56].



Rys. 8. Schemat przemieszczania się kateteru przez żyłę udową [56]

Leczenie przeznaczeniowe jest skuteczną i bezpieczną metodą zamykania ubytków. Dzięki rozwojowi technik małoinwazyjnych możliwe jest przeprowadzanie ich w coraz bardziej skomplikowanych przypadkach. Na przykład, wprowadzenie nowych rodzajów zatyczek Amplatza pozwoliło na wykorzystanie techniki przeznaczeniowej do zamykania mięśniowych, jak i okołobłoniastych ubytków przegrody międzykomorowej i międzyprzedsionkowej [57]. Mimo że zabiegi te obecnie wykonuje się głównie u dzieci w wieku przedszkolnym, zalecane są również u osób dorosłych, u których występuje znaczne nasilenie lub zwiększona ilość objawów. Podczas procedury wszczepiania implantu, na końcu kateteru znajduje się złożony okluder, który po dotarciu do właściwego miejsca, uwalnia się z systemu wprowadzającego (Rys. 9). Ruchy kateteru w naczyniach i jamach serca są kontrolowane na ekranie monitora, ponieważ okresowo przez ciało badanego przepuszcza się wiązkę promieni rentgenowskich [47].



Rys. 9. Widok okludera po umieszczeniu w sercu pacjenta: a) wizualizacja komputerowa [57] oraz b) zdjęcie fluoroskopowe [58]

Wskaźnik powodzenia zabiegów przezskórnych jest porównywalny z tym dla zabiegów chirurgicznych. Powikłania są rzadkie, a ryzyko można zmniejszyć za pomocą odpowiedniego doboru rozmiaru urządzenia. Zaletami zabiegu małoinwazyjnego są: brak torakotomii (otwarcia klatki piersiowej), brak blizny operacyjnej i krótki czas pobytu w szpitalu. Nie jest wymagana transfuzja krwi, więc można uniknąć powikłań z nią związanych [58]. Według przeprowadzonej analizy na grupie 718 dzieci, przezskórne zamykanie ASD ma o 7% wyższy wskaźnik reinterwencji, ale śmiertelność nie jest większa niż w przypadku konwencjonalnej operacji chirurgicznej [59]. Dziecko kwalifikowane do zamknięcia ubytku metodą kardiologii

interwencyjnej powinno mieć powyżej 10 kilogramów masy ciała. Najczęściej ubytek zamyka się zapinką Amplatza, chociaż dostępne są również zapinki innych firm i wciąż pojawiają się nowe. Każda z nich różni się nieco między sobą budową i techniką implantacji. Zapinka jest dobrze widoczna w badaniu echokardiografii przezprzełykowej, której zastosowanie jako drugiej metody obrazującej – oprócz metody angiograficznej – jest niezbędne podczas zabiegu. Dwa oddalone od siebie ubytki międzyprzedsionkowe teoretycznie można zamknąć dwiema zapinkami, ale w przypadku pacjentów z niską masą ciała zaleca się kierować ich na operację kardiologiczną. Zamykanie ubytków w przedniej części przegrody międzyprzedsionkowej wiąże się z niebezpieczeństwem uszkodzenia węzła przedsionkowo-komorowego. Pooperacyjne zaburzenia przewodzenia należą jednak do rzadkości, a śmiertelność okołoperacyjna jest znikoma [47]. Według wytycznych ESC (*European Society of Cardiology*) z 2020 roku, dotyczących leczenia osób dorosłych z wrodzonymi wadami serca, zaleca się zamknięcie ubytku przezskórnie (metodą małoinwazyjną), co jest możliwe u ok. 80% pacjentów wymagających zabiegu [60].

Nie zawsze wada serca może być w pełni naprawiona, ale podjęte działania mogą usprawnić zarówno jego pracę, jak i przepływ krwi. Jednak nawet udana operacja sprawia, że dla osób z CHD ryzyko zachorowalności na arytmie, kardiomiopatię czy infekcje mięśnia sercowego jest większe [61]. W przypadku najpoważniejszych wad serca konieczne jest zastosowanie transplantacji. Decyzja o kwalifikacji do przeszczepu podejmowana jest przez wielodyscyplinarny zespół złożony ze specjalistów zajmujących się kardiologią transplantacyjną, kardiologią, intensywną terapią kardiologiczną, pielęgniarstwem i psychologią transplantacyjną [62]. Wady wrodzone serca stanowią najczęstsze kryterium diagnostyczne kwalifikujące do tego rodzaju operacji. Na podstawie raportu obejmującego przeszczepy w latach 2009-2016 zauważono, że w przypadku osób z CHD ryzyko odrzucenia przeszczepu jest nawet dwukrotnie większe niż w przypadku innych chorób [63].

### **3.6. Implanty dedykowane do zamykania ubytków w okolicy serca**

Najczęściej stosowanym systemem do zamykania ubytków w przegrodzie międzyprzedsionkowej, zarówno w Polsce, jak i na świecie, jest produkt firmy Abbot,

Amplazer PFO Occluder (Rys. 10). Składa się z dwóch dysków połączonych przewężeniem, zbudowanych z samorozprężalnego, nitinolowego drutu uformowanego w siateczkę, stanowiącą rusztowanie dla łąt poliestrowych. W proksymalnej i dystalnej części implantu umieszczono dobrze widoczne w promieniowaniu Roentgena markery, ułatwiające prawidłowe umieszczenie urządzenia. Potwierdzeniem skuteczności implantu w zapobieganiu nawrotom udaru było badanie [64], w którym 980 pacjentów w przedziale 18–60 lat podzielono na grupę do interwencyjnego zamknięcia PFO (499) lub leczenia farmakologicznego (481). Podczas obserwacji (przez 4,2 – 8 lat) w grupie leczonej inwazyjnie ponowny udar mózgu wystąpił u 18, a w grupie leczonej farmakologicznie u 28 osób. Oznacza to 45-procentową redukcję ryzyka udaru w okresie obserwacji. Dla samego udaru kryptogennego, któremu może zapobiec zabieg zamknięcia PFO, można przypisać 72-procentową redukcję w okresie obserwacji. Kolejnym urządzeniem do leczenia PFO jest System PFO Nit-Occlud (Rys. 11). Zbudowany jest z pojedynczego drutu ze stopu NiTi i uszczelniony materiałem wykonanym z polietylenotereftalanu (PTE). Wklęsły kształt jednego z dysków powinien ułatwić przyleganie do ściany przedsionka, a jego budowa pokrywanie się śródbłonkiem. Badania na pacjentach potwierdziły skuteczność systemu porównywalną z zapinką firmy Abbot [65]. U jednego ze 151 badanych stwierdzono zakrzepicę występującą na urządzeniu, a u 19% po 6 tygodniach wystąpił przeciek resztkowy, który po 6 miesiącach od zabiegu występował już tylko u 1,1% pacjentów [66].



Rys. 10. Amplazer™ PFO Occluder [67]



Rys. 11. Nit-Occlud® PFO firmy PFM Medical [68]

Nieco inne rozwiązanie zaproponowała firma Occlutech (Rys. 12). Urządzenie składa się z dwóch dysków plecionych z cienkiego nitinolowego drutu (40-200  $\mu\text{m}$ ). Całość pokryta jest azotkiem tytanu, który, oprócz złotego koloru, zapewnia dodatkową odporność na korozję. Cienkie łąty uszczelniające wykonano z politereftalenu etylenu

(PET). Podobną powłokę zastosowano w urządzeniu Cera Flex (Rys. 13). Nie zaobserwowano dotychczas istotnych różnic w porównaniu do zapinki Amplatzer, a przeprowadzone badania potwierdziły bezpieczeństwo i skuteczność obu urządzeń [65], [69], [70].



Rys. 12. Occlutech Flex II PFO Occluder [71]



Rys. 13. CeraFlex™ PFO Occluder [72]

W Stanach Zjednoczonych najczęściej używanym systemem do zamykania ASD jest Amplatzer Septal Occluder firmy Abbot (Rys. 14) [46], a także okluder septalny Gore Cardioform Septal Occluder (Rys. 15). Konstrukcja tych implantów oparta jest o dwa dyski z nitinolowej siateczki połączone zwężeniem, z poliestrowym (Abbot) lub politetrafluoroetylenowym wypełnieniem (Gore) [46].



Rys. 14. Amplatzer™ Septal Occluder firmy  
Abbot [67]



Rys. 15. GORE® CARDIOFORM Septal  
Occluder [73]

Wykorzystanie pseudosprężystego stopu NiTi pozwala na przezskórne wszczępienie złożonych implantów i rozłożenie ich dysków dopiero w miejscu ze zmianą chorobową, szczelnie zamykając ubytek. Przezskórne zamknięcie ubytków może być bezpiecznie wykonane z niskim ryzykiem powikłań około- i pooperacyjnych u dzieci poniżej 3 roku życia. W trakcie zabiegu i rocznej obserwacji grupy 149 dzieci nie doszło do zgonu ani embolizacji implantu, natomiast tylko w jednym z badanych przypadków

wystąpiły poważne powikłania po zabiegu. U wszystkich pacjentów doszło do normalizacji średnicy prawej komory, a u większości dzieci obserwowano przyspieszenie rozwoju fizycznego i ustąpienie towarzyszących zaburzeń chorobowych [74]. W największej dotychczas opisanej grupie pediatrycznej porównano wyniki 4606 zabiegów przezskórnych i 3159 zabiegów chirurgicznych zamknięcia ASD w 35 szpitalach dziecięcych. Wykazano, że przezcewnikowe zamknięcie ASD było równie korzystne jak zabieg chirurgiczny, a dodatkowo skracało okres hospitalizacji. Efekty utrzymywały się do 18 lat po zabiegu. U żadnego z pacjentów nie zaobserwowano nadżerki serca, co potwierdza, że powikłanie to jest zjawiskiem wyjątkowym. U dzieci o masie ciała poniżej 15 kg oraz tych z dużymi ubytkami występowało jednak większe ryzyko powikłań [75].

W przypadku innej CHD, przetrwałego przewodu tętniczego, zaleca się stosowanie zmodyfikowanego kształtu okludera (Rys. 16), którego trzon jest o 2 mm większy na końcu płucnym niż na końcu aortalnym w porównaniu do standardowego okludera Amplatzer. Ta cecha zapewnia dodatkową stabilność pozycji urządzenia i może zmniejszyć ryzyko embolizacji aorty, szczególnie w przypadkach, gdy musi zostać z jakiegoś powodu usunięte. Charakteryzuje się też niższym profilem, dzięki czemu nawet największy rozmiar implantu można wszczepić za pomocą systemu wprowadzającego o średnicy 6Fr (French, jednostka miary służąca do pomiaru wielkości cewnika, 1Fr = 1/3mm) [76].



*Rys. 16. Zdjęcie konstrukcji okludera Occlutech® PDA [76]*

Każda konstrukcja siatki okludera wypełniona jest tkaniną, zwykle poliestrową, która zamocowana jest luźno na nitinolowym stelażu w celu zapewnienia szczelności układu. Jednak w większości okluderów materiał ten nie izoluje rusztowania od kontaktu z ludzką tkanką, dlatego w pracy skupiono się przede wszystkim na tym najbardziej newralgicznym elemencie budowy implantu.

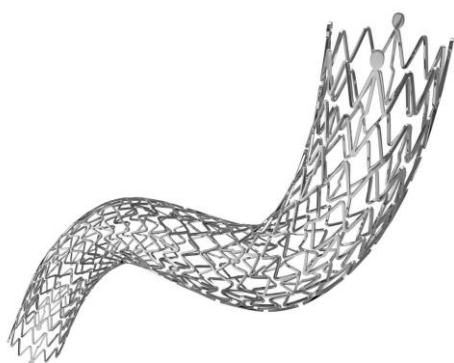


## 4. Problematyka stosowania implantów ze stopu NiTi

Stop niklu i tytanu jest jednym z materiałów wykorzystywanych do produkcji implantów, zwłaszcza tych o niewielkich rozmiarach ze względu na bardzo dobrą biokompatybilność i odporność na zmęczenie [77]. Głównym efektem wykorzystywanym w implantach ze stopu NiTi jest efekt pseudosprężystości, wynikający z niedyfuzyjnej transformacji między martenzytem a austenitem kontrolowanej przez przyłożone naprężenie. Efekt ten, razem z dobrą odpornością na zginanie, umożliwia zastosowanie technik małoinwazyjnych do umieszczenia implantu we właściwym miejscu w ciele pacjenta [78]. Do systemów stosowanych w układzie sercowo-naczyniowym należą, oprócz omówionych wcześniej okluderów, stenty (Rys. 17), stentgrafty (Rys. 18), urządzenia do trombektomii (usuwania zakrzepów, Rys. 19) czy filtry do wyłapywania skrzepów krwi (Rys. 20).

Nitinol uważany jest za najlepszy materiał pod względem hemokompatybilności z krwią. Dodatkowo, we wszystkich wymienionych implantach wykorzystuje się jeden z efektów pamięci kształtu, pseudosprężystość, dzięki której materiał zapamiętuje nadany mu wcześniej kształt. Wprowadzenie implantu do organizmu z wykorzystaniem technik małoinwazyjnych wymaga ściśnięcia urządzenia, a po umieszczeniu w prawidłowym miejscu, powrotu do zadanego kształtu. Stop NiTi jako jedyny jest w tym celu stosowany na tak szeroką skalę, choć pojawia się coraz więcej doniesień o próbach wykonania implantów biodegradowalnych, polimerowych, o zbliżonych do niego właściwościach, pozbawionych wad materiału metalowego [79].

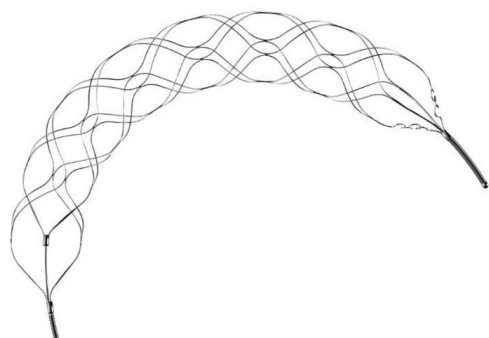
Mimo niewątpliwych korzyści płynących ze stosowania implantów, każde wprowadzenie ciała obcego do organizmu, a zwłaszcza do układu krwionośnego, obarczone jest ryzykiem. Do możliwych powikłań należą reakcje alergiczne, blok przedsionkowo-komorowy oraz występujące najczęściej, powikłania zakrzepowozatorowe. Można powiedzieć, że implant jest hemokompatybilny, jeśli nie powoduje uszkodzenia krwinek, adhezji białek oraz nie przyczynia się do agregacji płytek krwi (trombocytów), co może prowadzić do powstawania zakrzepów [80].



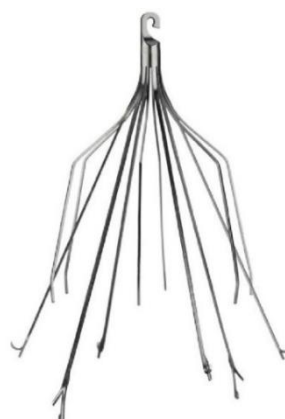
Rys. 17. Stent firmy InSitu Technologies [81]



Rys. 18. Stentgraft firmy CryoLife [82]



Rys. 19. Urządzenie do trombektomii firmy  
Neurosafe [83]



Rys. 20. Filtr do wylapywania skrzepów krwi  
Denali firmy Bard [84]

Biokompatybilność stopów NiTi porównywalna jest z biokompatybilnością czystego tytanu, ale zastosowanie tego materiału do długotrwałego implantowania budzi wątpliwości ze względu na wysoką zawartość niklu i ryzyko uwalniania jego jonów w wyniku korozji w środowisku organizmu. Dane dotyczące stężenia jonów Ni, mogące powodować alergie, nie są jednoznaczne. Nikiel i jego jony nie powodują śmiertelnych zatruc, ale stosunkowo łatwo sprzyjają powstawaniu alergii, dermatoz i zapaleniu skóry. Ponadto mogą wykazywać działanie nowotworowe, teratogenne i mutagenne [85]. Cytotoksyczność niklu zależy od jego stężenia w materiale. Nikiel jest toksyczny dla ludzkich osteoblastów w stężeniach powyżej 50 ppb. Natomiast ostra toksyczność obserwowana jest przy stężeniach przekraczających 200 ppb. Bezpośredni wpływ na liczbę uwolnionych jonów Ni jest wprost proporcjonalny do czasu ekspozycji

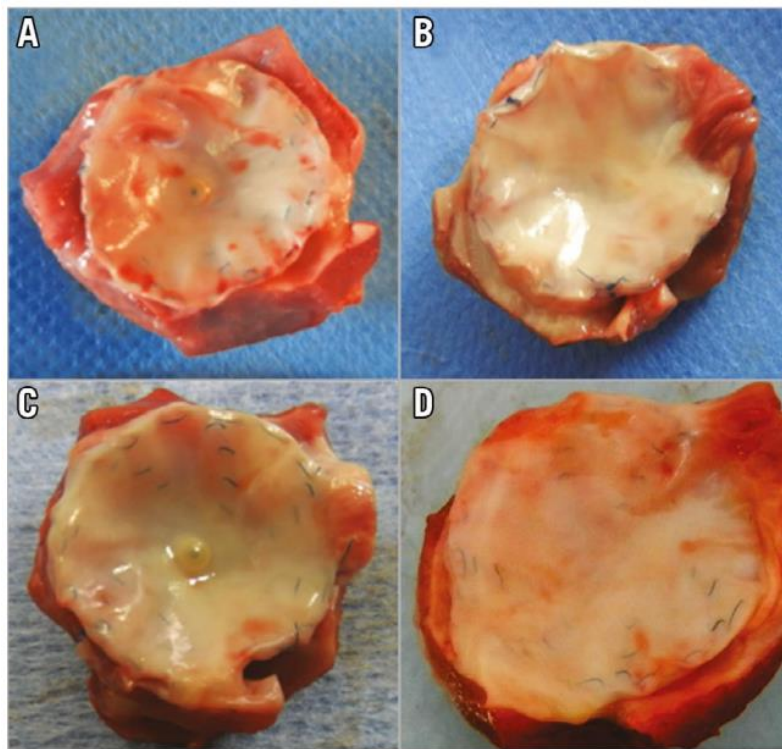
i odwrotnie proporcjonalny do wartości pH roztworu. Jony niklu jako produkt korozji implantu gromadzą się w śledzionie, a następnie w płucach i nerkach. Zwiększone stężenie niklu obserwuje się również w tkankach w pobliżu implantu [86]. Dlatego odporność korozyjna implantów NiTi ma tak duże znaczenie, gdyż bezpośrednio wpływa na hemokompatybilność.

Wystąpieniu zakrzepów zapobiega się obecnie poprzez podawanie pacjentowi leków przeciwzakrzepowych, które mogą jednak wywoływać działania niepożądane. Nawet w przypadku najbardziej zaawansowanych urządzeń wspomagających pracę komór serca, wykorzystujących najnowsze technologie, odsetek niepowodzeń z powodu zakrzepicy sięga 6% [87]. Po wprowadzeniu implantu do układu krwionośnego, dochodzi do szybkiej adsorpcji białek na jego powierzchni, inicjując tworzenie się skrzeplin, ponieważ warstwa białkowa stymuluje kolejne reakcje [88]. Jednym z pierwszych białek osocza, które osadzają się na sztucznych powierzchniach jest fibrynogen, pośredniczący w adhezji płytek krwi [89]. Z kolei płytki krwi przylegające do sztucznych powierzchni ulegają aktywacji i uwalniają substancje, które poprawiają ich adhezję, aktywację i agregację. Prowadzi to do powstawania zakrzepów płytkowych, a liczba krążących w układzie krwionośnym płytek krwi może się zmniejszać przy długotrwałej ekspozycji materiałów trombogennych na krew [90]. Nagromadzenie się zakrzepów na powierzchni implantu jest niekorzystne i zaburza proces gojenia. Jest to jednak rzadkie powikłanie, bo częstość występowania embolizacji okludera użyciu nowoczesnych urządzeń wynosi zaledwie 0,5% [91]. Przykład usuniętego z ciała pacjenta implantu po 7 dniach od wszczęcia przedstawiono na Rys. 21.



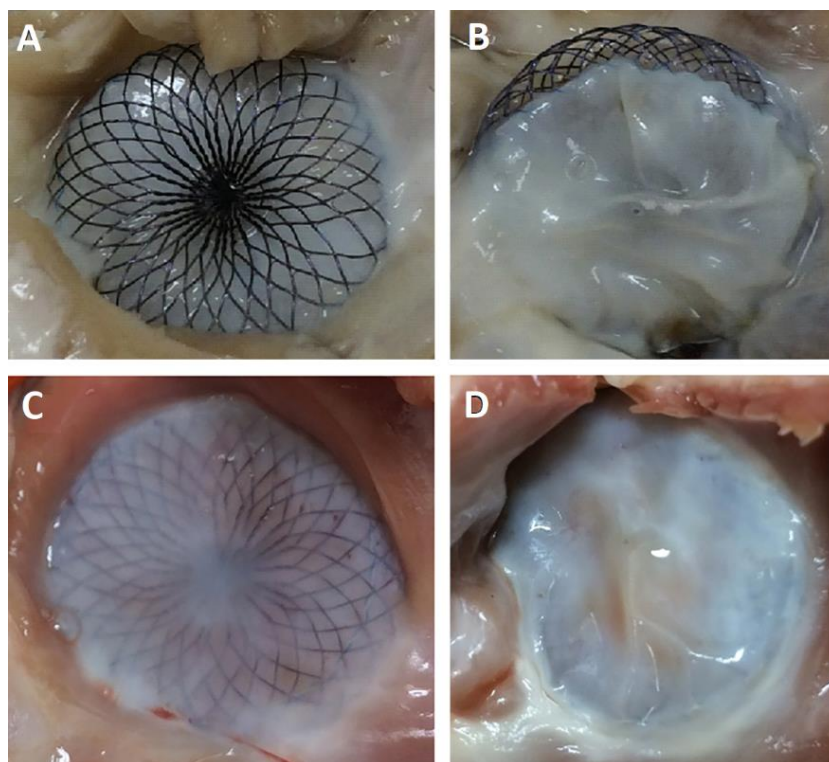
Rys. 21. Eksplantowany okluder do zamykania ubytku w przegrodzie międzyprzedsionkowej (ASD), w którym widoczne jest nieprawidłowe tworzenie się tkanki i skrzepliny [91]

Po wszczepieniu okludera złożony proces gojenia prowadzi do pokrycia go tkanką nabłonkową w ciągu kilku miesięcy (Rys. 22). Nieprawidłowości podczas procesu endotelizacji zwiększają ryzyko powikłań takich jak zakrzepica lub zapalenie wsierdza. Do badania procesu gojenia wykorzystuje się zarówno modele zwierzęce, jak i okludery eksplantowane z ciał pacjentów. Początkowo obserwuje się intensywną reakcję zapalną obejmującą fibrynę, komórki zapalne, czynniki angiogenne, macierz pozakomórkową i skrzepliny. Następnie tworzy się ziarnina, która z czasem ulega zwłóknieniu. Czas trwania tego procesu jest bardzo zmienny, od 28 do 90 dni w modelach zwierzęcych i od 6 do ponad 18 miesięcy u ludzi [53], [92].



*Rys. 22. Makroskopowe zdjęcia usuniętych okluderów z modelu świńskiego pokazujące postępujący przerost okluderów tkanką włóknistą w zależności od czasu implantacji [93]: po 3 miesiącach (A), po 5 miesiącach (B), po 8 miesiącach (C) i po 15 miesiącach (D)*

Pokrycie okludera tkanką po stronie lewego przedsionka zwykle jest całkowite lub prawie całkowite, podczas gdy pokrycie go po stronie prawego przedsionka bywa zmienne (Rys. 23). Endotelizacja implantu w tym miejscu może być utrudniona ze względu na jego wypukły z tej strony kształt, wystający do jamy prawego przedsionka. Badania kliniczne potwierdzają, że najważniejszym czynnikiem decydującym o skutecznym pokryciu tkanek jest całkowite rozwinięcie się konstrukcji okludera [94].



*Rys. 23. Okludery zaimplantowane w serce owcy, oba usunięte po 3 miesiącach.*

*Okluder pokryty jednostronnie: A – strona prawa, B – strona lewa*

*Okluder z pełnym pokryciem tkanką: C – strona prawa, D – strona lewa [94]*

Nitinol, w porównaniu do innych materiałów metalowych stosowanych na implanty, charakteryzuje się niską widzialnością fluoroskopową, tj. nie jest dobrze widoczny w promieniach Roentgena. Nie jest to korzystne, ponieważ zabiegi chirurgii małoinwazyjnej przeprowadzane są z wykorzystaniem promieniowania rentgenowskiego. Aby poprawić widzialność fluoroskopową, wykorzystuje się platynowe znaczniki na początku i końcu implantu, pomagające lekarzowi prawidłowo umiejscowić urządzenie [95].

Biokompatybilność materiału poprawiana jest dzięki zachodzącemu na powierzchni materiału zjawisku samopasywacji, które powoduje powstanie cienkiej warstwy tlenku tytanu ( $TiO_2$ ). Warstwa pasywna ogranicza przenikanie jonów niklu do tkanek i zwiększa odporność na korozję w środowisku płynów ustrojowych człowieka. Literatura naukowa potwierdza, że biokompatybilność materiału poprawia się poprzez zastosowanie dodatkowej pasywacji i pogrubienie zewnętrznej warstwy  $TiO_2$  [96], co można osiągnąć różnymi metodami, takimi jak anodowanie, implantacja jonów czy nanoszenie różnych powłok [97].

Aby ograniczyć przenikanie jonów niklu, ryzyko powstawania zakrzepów, tworzenia się stanu zapalnego, poprawić widzialność fluoroskopową czy zintensyfikować proliferację komórek nabłonka, stosuje się różnego rodzaju modyfikacje powierzchni stopu NiTi. Najpoważniejszym z występujących powikłań jest powstawanie zakrzepów, które w obecnej chwili minimalizuje się przez stosowanie odpowiednich leków. Dlatego też istnieje duża potrzeba opracowania takiej modyfikacji materiału, który wykluczy lub ograniczy konieczność stosowania środków farmakologicznych, oddziałujących na cały organizm.

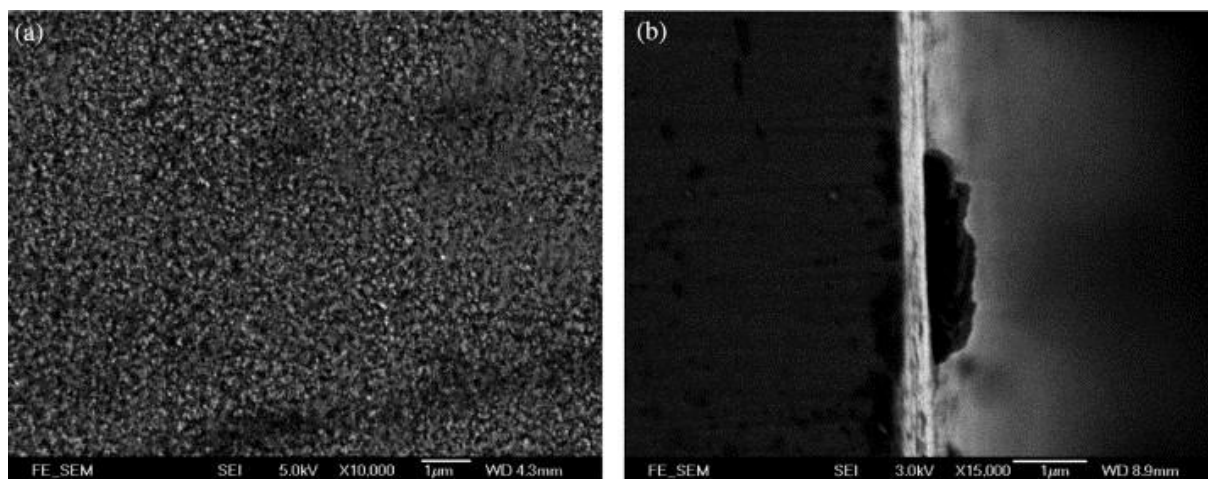
## **5. Modyfikacje powierzchni stopu NiTi do zastosowań w układzie krwionośnym**

W literaturze znajdują się opisy różnych metod pasywacji powierzchni nitinolu, dlatego autorka pracy w ramach badań wstępnych [98] przeprowadziła ocenę wpływu wybranych metod pasywacji stopu NiTi na jego właściwości. Ze względu na niewielkie rozmiary tego rodzaju implantów, jako obróbkę wstępną zastosowano polerowanie elektrochemiczne w 3,5-molowym roztworze  $H_2SO_4$ . Następnie porównano cztery metody pasywacji: we wrzącej wodzie, we wrzącym  $H_2O_2$ , w autoklawie oraz w powietrzu, w temperaturze  $T = 450\text{ }^\circ\text{C}$ . Do oceny powierzchni zastosowano badania odporności na korozję wżerową, elektrochemiczną spektroskopię impedancyjną (EIS) oraz pomiary zwilżalności. Wyniki badań odporności korozyjnej w środowisku sztucznego osocza wskazują na brak istotnych różnic pomiędzy różnymi rodzajami pasywacji w porównaniu z polerowaniem elektrochemicznym. Jedynie pasywacja w perhydrolu zmieniła powierzchnię hydrofilową w hydrofobową. Można stwierdzić, że już podczas procesu polerowania elektrochemicznego spontanicznie wytwarza się warstwa pasywna o bardzo dobrej biokompatybilności, a stosowanie pozostałych zaproponowanych metod pasywacji nie poprawia, ale też nie pogarsza badanych właściwości.

Często stosowaną procedurą modyfikacji powierzchni stopów NiTi (a także stopów tytanu przeznaczonych na implanty) jest anodowanie, w którym jednym z podstawowych celów jest wytworzenie stosunkowo grubej warstwy tlenku i modyfikacja topografii powierzchni stopu. Niestety, proces ten sprzyja uwalnianiu jonów Ni przez pory utworzone na powierzchni. Dlatego też zaleca się zastosowanie po

anodowaniu warstwy zatrzymującej uwalnianie jonów Ni. W trakcie anodowania stopu NiTi w elektrolicie zawierającym  $\text{HNO}_3$  i/lub  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , tworzy się hydrofilowa powierzchnia, która skutecznie zwiększa wydajność proliferacji komórek i ich aktywność na powierzchni nitinolu. Jednakże nikiel jako składnik powierzchni oraz uwalnianie jego jonów z wnętrza stopu hamuje przyłączanie i proliferację komórek, co z kolei osłabia pozytywny efekt anodowania. W konsekwencji prowadzi to do pogorszenia odpowiedzi komórek. Krytyczny problem uwalniania jonów Ni może być zniwelowany poprzez znaczące zmiany w procesie anodowania w celu zminimalizowania wielkości powstających porów. Anodowanie zagęszcza również powierzchnię warstwą tlenku, która poprawia odporność na korozję [99].

Oprócz zwiększania grubości warstwy pasywnej różnymi metodami, innym sposobem na poprawę odporności na korozję stopu NiTi jest naniesienie powłoki dwutlenku tytanu ( $\text{TiO}_2$ ). Na przykład, warstwa  $\text{TiO}_2$  wytworzona za pomocą przetapiania łukiem próżniowym (*Vacuum Arc Remelting, VAR*) poprawia odporność na korozję, zwiększa kąt zwilżania, adhezję osteoblastów i zmniejsza cytotoksyczność nitinolu [100]. Stosując niskotemperaturową metodę osadzania powłoki tlenkowej na polerowanym mechanicznie stopie NiTi, można zwiększyć odporność stopu na korozję. Po obróbce hydrotermicznej w temperaturze  $T = 140\text{ }^\circ\text{C}$  przez czas  $t = 10\text{ h}$ , skaningowa mikroskopia elektronowa wykazuje obecność jednolitej warstwy  $\text{TiO}_2$  o grubości około 200 nm (Rys. 24). Średnia chropowatość powierzchni z powłoką wynosiła 7,3 nm i była tego samego rzędu co chropowatość powierzchni polerowanej (10,3 nm). Charakterystyka korozyjna w roztworze Hanka w temperaturze  $37\text{ }^\circ\text{C}$  przy użyciu elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (EIS) i techniki polaryzacji potencjodynamicznej wykazała, że próbki pokryte powłokami miały znacznie wyższą odpornością korozyjną niż próbki przygotowane metodą polerowania mechanicznego i trawienia chemicznego w roztworze kwasów  $\text{HF}:\text{HNO}_3$  w proporcji 1:10. Stwierdzono, że materiał podłoża nie powinien stać się częścią warstwy poddanej obróbce, aby zminimalizować zawartość Ni w powierzchni, a temperatura obróbki powinna być niska, najlepiej nieprzekraczająca  $T = 300\text{-}400\text{ }^\circ\text{C}$ , aby nie zaburzać właściwości termomechanicznych implantów NiTi. Proces nie powinien być też procesem liniowym, aby zapewnić równomiernie zmodyfikowaną warstwę wierzchnią dla implantów o złożonej geometrii [101].



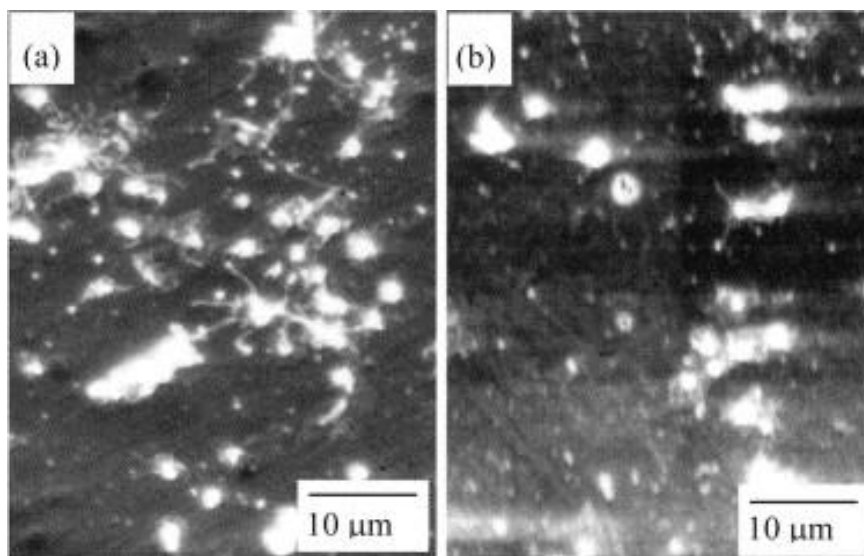
Rys. 24. Zdjęcia SEM próbki NiTi pokrytej tlenkiem tytanu: (a) powierzchnia  
(b) przekrój poprzeczny [101]

Kolejnym sposobem naniesienia tlenku tytanu jest plazmowo wspomagane osadzanie warstw atomowych. W celu oceny właściwości powłoki  $\text{TiO}_2$  na powierzchni podłoża Ni50Ti50, zbadano odporność na korozję, uwalnianie jonów niklu i biokompatybilność *in vitro*. Wyniki pokazują, że powłoka  $\text{TiO}_2$  jest jednolita i wykazuje strukturę amorficzną. Uzyskano powłokę  $\text{TiO}_2$  o odpowiedniej przyczepności do podłoża i wykazano, że charakteryzuje się większą zwilżalnością niż podłoże Ni50Ti50. Może też skutecznie hamować uwalnianie jonów niklu. Po zanurzeniu w symulowanym płynie ustrojowym na 30 dni, ilość uwolnionych jonów niklu zmniejsza się z 60 ppb dla podłoża do 20 ppb dla podłoża z powłoką  $\text{TiO}_2$  nałożoną podczas 200 cykli. Biokompatybilność *in vitro* wykazała, że analizowana powłoka  $\text{TiO}_2$  może zwiększyć przyczepność komórek, poprawić ich proliferację i zmniejszyć cytotoksyczność. Po 5 dniach hodowli, powłoka poprawiła aż 2,7 razy proliferację komórek i zmniejszyła cytotoksyczność z 48% dla podłoża do 37% dla podłoża z naniesioną powłoką. Wyniki te wskazują, że powłoka  $\text{TiO}_2$  osadzona techniką PE-ALD (*Plasma-Enhanced Atomic Layer Deposition*) może skutecznie poprawić biokompatybilność NiTi SMAs (*Smart Materials*) [100].

Stosunkowo łatwą metodą, którą można wykorzystać do poprawy własności stopu NiTi, jest metoda zol-żel. Proces formowania, morfologię powierzchni i strukturę powłok badano za pomocą dyfrakcji rentgenowskiej i mikroskopii sił atomowych. Wyniki wykazały, że cząstki  $\text{TiO}_2$  w były osadzone w powłoce o grubości 205 nm. Elektrochemiczny pomiar korozji wskazał, że cienka warstwa  $\text{TiO}_2$ , jako warstwa ochronna, była skuteczna w poprawie odporności na korozję stopu NiTi. Dodatkowo, w warunkach *in vitro* oceniono hemokompatybilność modyfikacji powierzchni i stopu



NiTi poprzez pomiar dynamicznego czasu krzepnięcia i testy adhezji płytek krwi (Rys. 25). Wyniki wykazały, że stop NiTi pokryty warstwą  $\text{TiO}_2$  charakteryzował się lepszą kompatybilnością z krwią [102].



Rys. 25. Mikrofotografie SEM płytek krwi przylegających do (a) podłoża ze stopu NiTi i (b) warstwy  $\text{TiO}_2$  po 1 h inkubacji w osoczu bogatopłytkowym [102]

Dwuetaповy proces anodowania wraz z naniesieniem powłoki zawierającej chitozan i heparynę może sprzyjać biokompatybilności w stosunku do składników morfotycznych krwi powierzchni nitinolu, co może być korzystne dla stentów wieńcowych. Podczas badań elektrochemicznych powłoka chitozanowo-heparynowa skutecznie powstrzymuje uwalnianie jonów Ni ze stopu i poprawia jego hemokompatybilność. Potwierdzono również pozytywny wpływ zastosowanej powłoki na proliferację komórek śródbłonna żyły pępowinowej [103].

Oprócz polimerów biostabilnych, obecne badania dotyczące implantów koncentrują się na polimerach biodegradowalnych. Ponieważ ulegają one degradacji po spełnieniu swojej funkcji, ich zastosowanie może przyczynić się do zmniejszenia liczby zdarzeń niepożądanych, takich jak restenoza, późna zakrzepica czy reakcje nadwrażliwości. Przegląd [104] dotyczył parametrów funkcji tkanek i komórek krwi, które powinny być brane pod uwagę przy ocenie biokompatybilności polimerów w celu zwiększenia ich fizjologicznych właściwości. Właściwości podłoża, na którym umieszczane są komórki naczyniowe, mogą mieć duży wpływ na morfologię, różnicowanie, ruchliwość i losy komórek. Przyszłe zadania dla rozwoju biomateriałów przeznaczonych do zastosowań medycznych to nie tylko dostosowanie konstrukcji

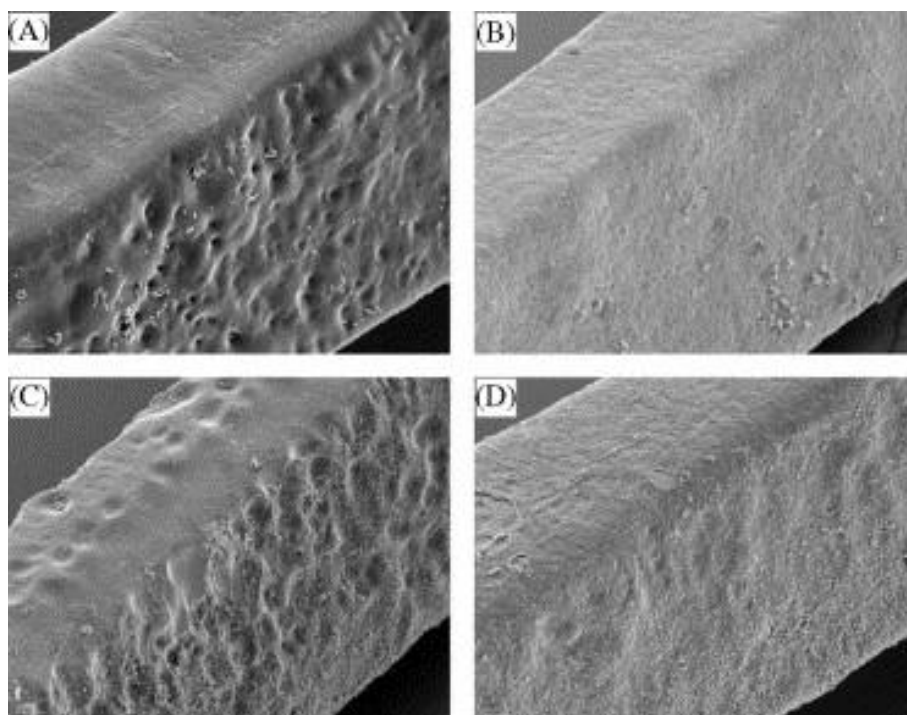
stentów i biomateriałów do potrzeb fizjologicznych, ale także doskonalenie i rozwijanie metod *in vitro* dla ich adekwatnej oceny.

Cienka powłoka poliuretanowa (o grubości do 25  $\mu\text{m}$ ) może zapobiec uszkodzeniom komórek śródbłonna podczas rozszerzania się stentu nawet o 225%. Powłoka poprawia odporność na korozję i obniża chropowatość powierzchni. Dodatkowo, zastosowany materiał umożliwia wprowadzenie do powłoki leków w celu przyspieszenia procesu gojenia. W przypadku sterylizacji takich kompozytów skuteczną okazuje się plazma helowa [105]. Modyfikacja ta jednak nie zapobiega szkodliwej migracji jonów niklu do organizmu [103].

W celu wytworzenia bioaktywnych powłok dla stentów wewnątrznaczyniowych można zastosować proces samoorganizacji warstwa po warstwie dwóch polisacharydów, hialuronanu (HA) i chitozanu (CH). Warstwa podkładowa z polietylenoiminy (PEI) zaadsorbowana na powierzchni metalu jest wymagana, aby zainicjować sekwencyjną adsorpcję słabych polielektrolitów. Pokryte wielowarstwowo próbki NiTi wykazywały zwiększone właściwości przeciwwzkrzepowe w porównaniu do niemodyfikowanych próbek NiTi, co wykazano poprzez zmniejszenie adhezji płytek krwi w teście *in vitro* (zmniejszenie o 38%;  $p = 0,036$ ). Badanie *ex vivo* na modelu świńskim wykazało, że powłoka nie zapobiegała osadzeniu się neutrofilii. Wielowarstwy z domieszką donoru tlenu azotu dodatkowo zmniejszają nawet o 40% adhezję płytek krwi w porównaniu do standardowych wielowarstw. Gdy druty NiTi pokryte wielowarstwą zawierającą fluorescencyjnie znakowany HA zostały umieszczone w bliskim kontakcie ze ścianą naczynia, polisacharyd przemieścił się na próbki aorty wieprzowej. Zwiększona odporność na tworzenie się zakrzepów samoorganizującej się wielowarstwy wraz z właściwościami przeciwzapalnymi i gojenia się ran hialuronianu i chitozanu powinny zmniejszyć hiperplazję neointymy związaną z implantacją nitinolowego stentu [106].

Na implanty wykonane z NiTi stosowane są również powłoki polimerowe uwalniające substancje antyproliferacyjne i przeciwzapalne [107], wykazujące zmniejszenie restenozy. Jednak stosowane są tylko w wybranych przypadkach ze względu na wysokie koszty. Sposób działania takich powłok opiera się na antyproliferacyjnych lub przeciwzapalnych właściwościach uwalnianych substancji. Powłoki polimerowe służące jako nośnik, powinny charakteryzować się stabilnością i biokompatybilnością, aby zapewnić korzystne działanie leku. Zastosowany jako

matryca powłoki poliuretan wykazuje lepsze wyniki w zakresie aktywacji procesu krzepnięcia i zapalenia w porównaniu z innymi badanymi materiałami. Jednak zwiększona całkowita powierzchnia membrany polimerowej wykazuje znaczną aktywację granulocytów. Aby zbadać tę cechę w porównaniu z innymi materiałami do przeszczepów jak np. politetrafluoroetylen (PTFE) konieczne wydaje się bezpośrednie porównanie ich właściwości fizykochemicznych. Polerowanie mechaniczne i pasywacja nie poprawiają właściwości powierzchni stentów, natomiast polerowanie elektrochemiczne, i piaskowanie zmniejszyły aktywację. Najniższy potencjał trombogenny stwierdzono w grupie stentów pokrytych poliuretanem. Ilość osadzonych komórek identyfikowana skaningową mikroskopią elektronową dobrze koreluje ze stopniem aktywacji płytek krwi i aktywacji procesu krzepnięcia, reprezentowanym przez spadek liczby płytek krwi po 120 minutach ekspozycji na krew (Rys. 26) [107].



*Rys. 26. Pojedyncza adhezja komórek krwi na powłoce poliuretanowej (A) i powierzchni piaskowanej (B), gęste osadzanie fibryny i płytek krwi na powierzchni elektropolerowanej (C) i pasywowanej (D) [107]*

Wykorzystanie stentów ze stopu NiTi związane jest z dwoma głównymi problemami [108]: restenozą oraz opóźnieniem reendotelizacji, które wpływają na bezpieczeństwo kliniczne i zmniejszają efekty zabiegu. Osadzenie warstwy  $\text{Al}_2\text{O}_3$  o grubości 10 nm na powierzchni nitinolu oraz zmodyfikowanie sekwencyjne heparyną i środkiem sprzęgającym 3-aminopropylotrietoksyilanem (APS) poprawia

hemokompatybilność materiału, co zostało potwierdzone przez pomiar kąta zwilżania, zbadanie adsorpcji białek oraz adhezji płytek krwi. Wyniki testów hemolizy, proliferacji komórek i cytotoksyczności wykazały, że nałożenia heparyny na stop NiTi zachowało pierwotne pozytywne właściwości materiału. Ze względu na skomplikowany i niewielki kształt implantów stosowanych w układzie krwionośnym, korzystną technologią do modyfikacji i funkcjonalizacji powierzchni jest metoda osadzania warstw atomowych ALD (*Atomic Layer Deposition*). Ma duży potencjał w produkcji wyrobów medycznych, szczególnie w zakresie modyfikacji i funkcjonalizacji powierzchni. Daje możliwość precyzyjnej kontroli grubości warstwy w skali nanometrycznej oraz jednorodne powlekanie podłoży, nawet o skomplikowanych kształtach, z wysoką powtarzalnością, w stosunkowo niskiej temperaturze [108].

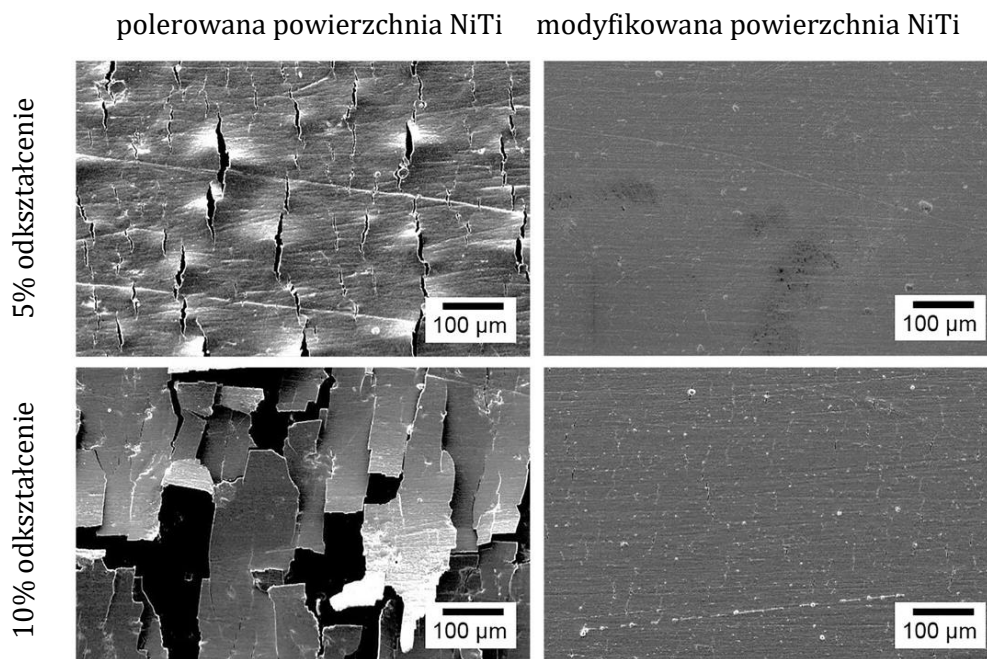
W wymaganiach stawianych implantom, oprócz biokompatybilności, szczególnie podkreśla się konieczność ograniczenia kolonizacji bakteryjnej, mogącej wywoływać infekcje. Dobrą biokompatybilność, możliwość funkcjonalizacji powierzchni i obiecującą aktywność przeciwdrobnoustrojową wykazuje tlenek grafenu (GO). Po zsyntetyzowaniu tlenku grafenu funkcjonalizowanego żelatyną (GOGel) do wytworzenia powłok powierzchniowych na podłożach nitinolowych, badano funkcje mysich komórek osteoblastycznych (MC3T3-E1), w tym przyłączanie się komórek, proliferację i różnicowanie. Funkcje komórek MC3T3-E1 były znacząco zwiększone zarówno na nitinolu pokrytym GO (GO@NiTi) jak i na nitinolu pokrytym GOGel (GOGel@NiTi) w porównaniu z nitinolem bez powłoki. Powierzchnia funkcjonalizowana żelatyną wykazywała najlepsze wyniki w zakresie adhezji, proliferacji i różnicowania komórek. Dodatkowo, zbadano właściwości przeciwdrobnoustrojowe powłok opartych na GO w stosunku do *Escherichia coli* za pomocą zliczania jednostek tworzących kolonie, barwienia fluorescencyjnego live/dead oraz skaningowego mikroskopu elektronowego. Stwierdzono, że powłoka hamowała wzrost *E. coli*. Obrazy SEM ujawniły, że błona komórkowa bakterii straciła integralność, a obrazy fluorescencyjne potwierdziły niski stosunek live/dead *E. coli* po inkubacji na podłożach. Stwierdzono, że powłoki oparte na tlenku grafenu osadzonym na NiTi łączą w sobie aktywność przeciwdrobnoustrojową i ulepszoną biokompatybilność, a zatem prezentują niezwykle potencjał w zastosowaniach na implanty [109].

Poprawę hemokompatybilności implantu można osiągnąć również poprzez pasywne pokrywanie węglikiem krzemu, który dzięki swoim właściwościom

półprzewodzącym zmniejsza intensywność tworzenia się skrzeplin. Samorozprężalne stenty z powłoką z węgliku krzemu i bez niej poddano badaniom weryfikującym jej wpływ na własności trombogene. Oceniano liczbę trombocytów,  $\beta$ -tromboglobulinę (TG), kompleks trombina-antytrombina (TAT) III oraz elastazę polimorficzną. Uwalnianie niklu oznaczano ilościowo w dniach 1, 3 i 223 przy użyciu spektrometrii absorpcji atomowej w piecu grafitowym. Aby uwidocznic tworzenie się skrzeplin na powierzchni, przeprowadzono skaningową mikroskopię elektronową. Badania wykazały przewagę stentów powlekanych w zakresie  $\beta$ -TG oraz tworzenia kompleksu TAT III. SEM ujawniła prawie nieobecne tworzenie się skrzeplin na powłoce. Uwalnianie niklu było zredukowane o ponad 90% we wszystkich punktach czasowych. W warunkach *in vitro* powłoka z węgliku krzemu zastosowana na samorozprężalnych stentach obwodowych wykazała przewagę w zakresie trombogenności. Pasywna bariera spowodowała ograniczone uwalnianie niklu z samego stopu. Cechy te wydają się obiecujące dla zastosowania w naczyniach obwodowych [110].

Pomimo wyżej opisanych propozycji modyfikacji powierzchni stopu NiTi, naukowcy nie przeprowadzali dotychczas badań pod względem adhezji powłoki do podłoża i jej odporności na odkształcenie. Nie zaproponowano dotychczas powłoki, która poprawiłaby odpowiedź biologiczną komórek, hamowała powstawanie zakrzepów, ograniczała przenikanie jonów niklu do organizmu i jednocześnie poprawiłaby widzialność fluoroskopową. Spełnieniem wszystkich wymienionych funkcji może być powłoka na bazie tantalu.

Tantal i związki na bazie tantalu znalazły zastosowanie w wielu dziedzinach, takich jak implanty biomedyczne i narzędzia chirurgiczne, ze względu na doskonałą odporność na korozję i wysoką plastyczność [111]. Tantal jako pierwiastek jest również bardzo dobrze widoczny w promieniowaniu rentgenowskim, w przeciwieństwie do stopu NiTi, dlatego zastosowanie biokompatybilnej powłoki na bazie tantalu może poprawić widoczność fluoroskopową implantów. Co więcej, badania odkształcalności takich powłok sugerują, że przygotowanie powierzchni może mieć kluczowy wpływ na odporność na podatność na odkształcenie (Rys. 27), co jest niezwykle istotne w przypadku stopów NiTi [112].



Rys. 27. Obrazy SEM odkształconych warstw tantalowych [112]

Co więcej, powłoki z pięciotlenku tantalu ( $Ta_2O_5$ ) odparowywane wiązką elektronów charakteryzują się dobrą cytokompatybilnością [113]. Po 5-dniowym pobycie na podłożu pokrytym  $Ta_2O_5$  wzrasta gęstość komórek fibroblastów [114]. Wprowadzenie  $Ta_2O_5$  metodą osadzania elektroforetycznego (*Electrophoretic Deposition, EPD*) w strukturę powłoki z naturalnego hydroksyapatytu (nHA) na podłożu NiTi poprawiło jego biokompatybilność. Obecność  $Ta_2O_5$  zmniejszyła wymywanie jonów NiTi poprzez zmniejszenie porowatości struktury hydroksyapatytu [115]. Potwierdzono potencjał tlenku tantalu w zakresie poprawy odporności na korozję i odpowiedzi komórkowych (np. adhezji, proliferacji i różnicowania) podłoży tytanowych w celu poprawy ich cytokompatybilności i odporności na korozję. Warstwy tlenku tantalu osadzone są na podłożach tytanowych przy użyciu techniki osadzania wspomaganego polimerami (*Polymer Assisted Deposition, PAD*). Przeprowadzone badania potwierdziły utworzenie się warstw tlenku tantalu na powierzchniach podłoży Ti. Powłoka poprawiła odporność na korozję, a także poprawiła proliferację, mineralizację i ekspresję genów osteogenicznych. Nie uwzględniono jednak badań własności fizykochemicznych [116].

Chociaż w nielicznych pracach badano potencjalne zastosowanie powłok na bazie tantalu na implanty ze stopu NiTi, nie zostały one jeszcze dokładnie zbadane [117]–[119]. Większość dotychczasowych prac koncentrowała się na wytwarzaniu powłok  $Ta_2O_5$  na stopie NiTi przy użyciu różnych metod w celu poprawy odporności na korozję

[120], [121]. Powłoka tlenku tantalu i jej warstwa pasywna skutecznie chronią podłoże przed korozją wżerową. Poprawa odporności korozyjnej wiąże się ze zmniejszeniem penetracji jonów niklu do roztworu symulującego płyny ustrojowe. Większość badań przedstawia wyniki dotyczące jedynie zagadnień materiałowych lub jedynie biologicznych i nie rozwijają kwestii przydatności wytworzonych powłok, takich jak podatność powłoki do odkształceń, adhezji do powierzchni podłoża czy odporności na ścieranie. Rzadko też omawiają zagadnienia dotyczące wpływu przygotowania powierzchni na właściwości powłoki.

Nie przeprowadzono dotychczas badań, które weryfikowałyby w jaki sposób przygotowanie powierzchni wpływa na właściwości materiału pokrytego  $Ta_2O_5$ . Przedstawia się głównie ich zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu ze względu na dobre właściwości optyczne [122]. Dlatego, w ramach prac wstępnych, skupiono się na wpływie przygotowania powierzchni oraz opracowaniu warunków nanoszenia powłoki  $Ta_2O_5$  [123].

## 6. Podsumowanie przeglądu literatury

Formowanie się serca podczas embriogenezy jest bardzo złożonym procesem, w którym czynniki genetyczne i epigenetyczne sterują rozwojem kolejnych struktur, a pojawiające się błędy mogą prowadzić do powstania ubytków w tkance tworzącej ten organ. Wśród wad wrodzonych serca najczęściej występują: ubytek w przegrodzie międzyprzedsionkowej (VSD), ubytek w przegrodzie międzykomorowej (ASD) oraz tetralogia Fallota (TOF). Skutki nieleczonych wad obniżają jakość życia pacjenta, a często nasilają się dopiero w życiu dorosłym. Leczenie obejmuje farmakologiczne łagodzenie objawów, a w poważniejszych przypadkach konieczne jest zastosowanie interwencji kardiochirurgicznej. Jednym ze sposobów zamykania ubytków jest wszczepienie okludera, który uszczelni przeciek krwi przez otwór w sercu. Dzięki wykorzystaniu efektu pseudosprężystości stopów NiTi możliwe jest wykonanie zabiegu z wykorzystaniem technik małoinwazyjnych, pozwalających na zaimplementowanie okludera w złożonej postaci i rozłożenie do pożądanego kształtu dopiero w miejscu występowania przecieku.

Zastosowanie stopu NiTi do wytwarzania okluderów, pomimo jego dobrej biokompatybilności, nie jest całkowicie pozbawione ryzyka. Do możliwych powikłań należą reakcje alergiczne wywołane przez przenikanie jonów niklu do organizmu, zjawisko nadmiernego przerastania implantu śródbłonkiem oraz ryzyko wytworzenia się zakrzepów w kontakcie implantu ze składnikami morfotycznymi krwi.

O skuteczności zastosowania okluderów Amplatzera wykonanych ze stopów NiTi decydują właściwości fizykochemiczne powierzchni implantu [124]. Dlatego w obecnie prowadzonych badaniach największą uwagę skupia się na opracowaniu sposobu wytwarzania powłok na powierzchni metalu znacznie ograniczających proces krzepnięcia krwi i zapewniających ich dobrą biotolerancję w środowisku sercowo-naczyniowym. Dodatkowo, metoda nanoszenia powłoki nie powinna być prowadzona w zbyt wysokiej temperaturze, aby nie pozbawić wyrobu efektu pseudosprężystości.

Dotychczas przeprowadzono wiele analiz wpływu modyfikacji powierzchni na właściwości stopu NiTi do zastosowań w układzie krwionośnym. Brakuje jednak kompleksowego podejścia, łączącego z jednej strony badania własności fizykochemicznych, a z drugiej biologicznych. Większość prac opisujących metodykę modyfikacji powierzchni stopu NiTi skupia się albo na analizie własności



fizykochemicznych albo na własnościach biologicznych. Często nie jest rozpatrywany wpływ techniki implantacyjnej na właściwości powłoki, co jest istotne dla implantów ze stopu NiTi ze względu na efekt pseudosprężystości, dlatego badania podatności do odkształceń są kluczowe. Rzadko bada się również adhezję powłoki do podłoża, mimo że to jeden z bardziej istotnych parametrów. Nawet gdy prowadzi się badania uwalniania jonów niklu do podłoża, nie uwzględnia się odporności na korozję po odkształceniu. W części przytoczonych publikacji autorzy skupiają się na poprawie odporności na korozję, podczas gdy problemem jest przede wszystkim uwalnianie do organizmu jonów niklu. Z kolei badania biologiczne powinny być prowadzone zarówno w kierunku oceny cytotoksyczności, jak i proliferacji różnych linii komórkowych.

W celu ograniczania ilości uwalnianych jonów niklu, poprawy odpowiedzi biologicznej komórek i ograniczeniu ryzyka powstawania zakrzepów, stosuje się różne modyfikacje powierzchni stopów NiTi. Dotychczas zaproponowano następujące warstwy wierzchnie: ceramiczne (TiO<sub>2</sub>, TiN, itp.), metalowe (Pa, Zn, Zr, itp.), polimerowe (polilaktyd PLA, poliamidy PA, PTFE itp.), polisacharydowe (chitozan, heparyna) czy węglowe (GO). Do ich wytworzenia najczęściej stosowane są: metoda zol-żel, osadzanie elektrochemiczne, metody natryskiwania plazmowego, CVD, PVD, natryskiwanie termiczne lub plazmowe, napyłanie jonowe lub magnetronowe, anodowanie, osadzanie jarzeniowe oraz metody laserowe [125]. 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 okluderów. Dlatego też skutecznym rozwiązaniem może być zastosowanie metody niskotemperaturowej ALD, spełniającej to kryterium.

### III. BADANIA WŁASNE

---

#### 1. Cel, założenia i teza pracy

Najnowsze publikacje naukowe w obszarze biomateriałów skupiają się na modyfikacjach powierzchni, realizowanych między innymi poprzez nanoszenie cienkich warstw różnymi metodami. Takie podejście pozwala na poprawę części właściwości materiału, nie zmieniając znacznie jego podstawowej funkcji. Implanty stosowane w chirurgii małoinwazyjnej, wykonane ze stopu NiTi, charakteryzują się przede wszystkim efektem pseudosprężystości, a zaproponowana powłoka powinna poprawić własności stopu, nie wpływając znacząco na zmianę kształtu. Na podstawie przeanalizowanych danych literaturowych dotyczących modyfikacji powierzchni stopu NiTi oraz wyników badań wstępnych, których część autorka opublikowała w [98], [123], sformułowano cel pracy:

*Opracowanie warunków wytwarzania wielofunkcyjnej powłoki na bazie tantalu na powierzchni stopu NiTi o własnościach fizykochemicznych adekwatnych do specyfiki układu sercowo-naczyniowego.*

Do dyscypliny inżynieria biomedyczna należą, między innymi, zagadnienia związane z opracowywaniem warunków wytwarzania powłok na biomateriałach i weryfikacja ich przydatności do zastosowań klinicznych. Aby osiągnąć założony cel, zrealizowano szereg działań, od prawidłowego ukształtowania struktury, własności mechanicznych materiału podłoża do morfologii, własności fizykochemicznych powłok mogących mieć zastosowanie w układzie krwionośnym. Na podstawie przeglądu literatury przyjęto następującą tezę badawczą:

*Możliwe jest wytworzenie wielofunkcyjnej powłoki na bazie tantalu metodą osadzania warstw atomowych na podłożu ze stopu NiTi o własnościach fizykochemicznych adekwatnych do specyfiki układu sercowo-naczyniowego, zapewniających ograniczenie uwalnianie jonów Ni oraz tworzenia się zakrzepów.*

W celu weryfikacji postawionej tezy zrealizowano plan badawczy, którego schemat blokowy przedstawiono na Rys. 28. Zawarty w nim szereg badań *in vitro* pozwolił na opisanie procesów zachodzących na powierzchni implantów wytworzonych ze stopu NiTi pokrytego powłoką na bazie tantalum, przeznaczonych do stosowania w układzie krwionośnym.



Rys. 28. Schemat zrealizowanego planu badawczego

## 2. Materiał do badań

Do przeprowadzenia badań wykorzystano trzy postacie próbek stopu NiTi (55,6% Ni): drut o długości 90 mm i grubości 0,178 mm firmy Fort Wayne Metals oraz arkusze blachy w stanie pseudosprężystym firmy Wolften, Sp. z o. o, z których laserowo wycięto paski o wymiarach 90 x 5 mm i grubości 0,3 mm oraz krążki o średnicy 14 mm i grubości 0,8 mm. Skład chemiczny oraz własności mechaniczne analizowanych materiałów spełniały wymagania normy ASTM F2063-18 [126]. Temperatura końcowa austenitu Af wynosiła  $T = 34\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ .

## 3. Modyfikacja powierzchni

W celu przygotowania powierzchni stopu NiTi do nałożenia powłoki, próbki poddano procesowi polerowania elektrochemicznego w roztworze metanolu i  $\text{H}_2\text{SO}_4$  [127] w firmie Balton sp. z o. o. (dokładny skład chemiczny roztworu zastrzeżony przez firmę), zajmującej się produkcją wyrobów medycznych, w tym stentów ze stopu NiTi. Ze względu na rodzaj zastosowanego roztworu, podczas polerowania elektrochemicznego nastąpiła pasywacja powierzchni stopu. Następnie wszystkie próbki były czyszczone przez  $t = 10$  min w kąpeli ultradźwiękowej, w temperaturze  $T = 20\text{ °C}$  w 96% roztworze alkoholu etylowego.

W kolejnym etapie nałożono cienką warstwę  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  metodą Atomic Layer Deposition (ALD), stosując wybrane prekursorzy: podgrzewany *Tantalum Ethoxide*  $\text{Ta}(\text{OC}_2\text{H}_5)_5$  oraz wodę ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Większość technik nakładania powłok wymaga zastosowania podwyższonej temperatury, która w przypadku stopu NiTi może spowodować przekształcenie fazy macierzystej B2 w fazy równowagowe, takie jak  $\text{Ni}_3\text{Ti}$  i  $\text{Ti}_2\text{Ni}$ , lub nierównoważne, nie biorące udziału w zjawiskach pamięci kształtu. Ich obecność wpływa niekorzystnie na odzyskiwanie kształtu i zjawisko pseudosprężystości w stopie. Dlatego w przypadku stopów NiTi należy zwrócić szczególną uwagę na stosowanie niskotemperaturowych metod modyfikacji powierzchni. ALD charakteryzuje się dużą szybkością i powtarzalnością procesu, homogenicznością powłoki, a także umożliwia modyfikację powierzchni obiektów o złożonych kształtach i zróżnicowanej morfologii. Metoda ta opiera się na cyklicznym powtarzaniu pulsów i przedmuchów prekursorów tak, aby każda kolejna warstwa była jednoatomowej grubości [128].

Oznacza to, że w danej chwili w komorze roboczej znajduje się tylko jeden prekursor, który jest źródłem przynajmniej jednego ze składników osadzanego materiału. ALD jest jedyną metodą technologiczną, która pozwala na równomierne pokrycie ze wszystkich stron skomplikowanych geometrycznie powierzchni [129].

Proces prowadzono w temperaturze  $T = 300^{\circ}\text{C}$  [130], a czasy trwania poszczególnych cykli pulsów i płukania przedstawiono w Tab. 2. Jako gaz nośny i płuczący stosowano wysokiej czystości azot 5.0 ( $\text{N}_2$ ) dostarczony przez firmę SIAD Poland Sp. z o.o. Szybkość przepływu gazu nośnego dla prekursora i wody wynosiła  $200 \text{ cm}^3/\text{min}$ . Populację próbek podzielono na dwie grupy: wariant bez powłoki oraz z powłoką naniesioną podczas 400 cykli. Wybór ilości cykli oraz parametrów procesu wynika z przeprowadzonych badań wstępnych.

Tab. 2. Parametry procesu ALD

		Czas [s]
Tantalum Ethoxide $\text{Ta}(\text{OC}_2\text{H}_5)_5$ 250°C	Płukanie	0,1
	Puls	2
$\text{H}_2\text{O}$	Płukanie	0,1
	Puls	3

Przygotowanie powierzchni za pomocą polerowania elektrochemicznego miało na celu wytworzenie międzywarstwy pomiędzy stopem NiTi a powłoką  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  – Rys. 29. Ostatnim etapem przygotowania próbek była sterylizacja w autoklawie BAISIC w temperaturze  $T = 135^{\circ}\text{C}$  i pod ciśnieniem  $p = 2,1 \text{ bar}$  w celu usunięcia drobnoustrojów z powierzchni próbek do dalszych badań.

*bakterie i składniki morfotyczne krwi*



Rys. 29. Schemat ułożenia warstw na podłożu NiTi

W celu ujednoczenia przedstawienia wyników badań dla próbek wykonane zgodnie z powyżej opisaną metodyką zastosowano następujące oznaczenia:

- NiTi – próbki wykonane ze stopu NiTi,
- NiTi + Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> – próbki z nałożoną powłoką Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> na stop NiTi.

## **4. Metodyka badań**

### **4.1. Charakterystyka powłoki**

#### **4.1.1. Badania składu chemicznego**

Skład chemiczny powłoki potwierdzono wykorzystując rentgenowską spektroskopię fotoelektronów (XPS), w ultrawysokiej próżni (ciśnienie podstawowe 8,5 do 10,9 Pa) z wykorzystaniem półsferycznego analizatora energii elektronów PREVAC EA15 wyposażonego w detektor 2D-MCP. Do wzbudzenia próbki wykorzystano monochromatyczne źródło promieniowania rentgenowskiego (dwanodowe źródło PREVAC XR-40B, monochromator RMC50; linia wzbudzenia Al-K $\alpha$  o energii 1486.60 eV). Dla widm przeglądowych energia przejścia kolekcji (PE) została ustawiona na 200 eV (krok skanowania 0.8 eV) oraz na 100 eV dla poszczególnych regionów energetycznych (krok skanowania 0.06 eV). Dla uzyskania najwyższej rozdzielczości energetycznej wszystkie pomiary były wykonywane przy normalnym kącie startu i wyborze zakrzywionej szczeliny wyjściowej analizatora (0.8x25 mm). Skala energii wiązania analizatora była kalibrowana Au 4f rejonu 7/2 (84.0 eV) próbki pokrytej złotem umieszczonej na tym samym etapie próbkowania [131]. Widma dopasowywano za pomocą oprogramowania CASA XPS® (wersja 2.3.25) z wykorzystaniem wbudowanych algorytmów. Jeśli nie zostały one określone, składowe dopasowywano za pomocą iloczynu funkcji Gaussa (30%) i Lorenza (70%). Do odejmowania tła zastosowano funkcję Shirley'a.

#### **4.1.2. Badania struktury chemicznej i krystalograficznej**

W celu zidentyfikowania charakterystycznych związków chemicznych występujących na powierzchni próbki przeprowadzono badania z wykorzystaniem spektroskopii Ramana. Spektroskopia ramanowska umożliwia pomiar aktywnych

fononów Ramana (w materiałach krystalicznych) oraz aktywnych oscylacyjnych trybów Ramana (w cząsteczkach). Dzięki temu możliwe jest uzyskanie unikalnego spektralnego odcisku palca różnych krystalicznych materiałów polimorficznych oraz informacji spektralnej od cząsteczek znajdujących się w miejscu pomiaru. Próbkę badano przy użyciu spektrometru Ramana inVia Reflex firmy Renishaw, wyposażonego w laser wzbudzający o długości fali 514,5 nm (światło zielone). Widma rejestrowano w szerokim zakresie przesunięcia ramanowskiego od 50 do 3100  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **4.1.3. Badania mikrostruktury**

Charakterystykę mikrostruktury warstwy powierzchniowej przeprowadzono z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej TEM. Cienkie folie do analiz 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.

#### **4.1.4. Pomiary grubości powłoki**

Ze względu na nanometryczny rząd wielkości powłoki, do pomiaru jej grubości zastosowano elipsometrię spektralną. Technika ta polega na pomiarze zmiany stanu polaryzacji światła po odbiciu od powierzchni badanej próbki w celu precyzyjnego i bezinwazyjnego określenia parametrów optycznych materiału w szerokim zakresie spektralnym. Metoda charakteryzuje się wysoką czułością, gdyż nawet pojedyncza powierzchniowa warstwa atomów w sposób mierzalny zmienia stan polaryzacji światła odbitego. Pomiary wykonano za pomocą spektroskopowego elipsometru matrycowego Muellera RC2-DI Woollam Co. Zakres spektralny elipsometru wynosi od 190 nm do 1700 nm. Próbkę mierzono dla kątów padania od 50 do 70 stopni z krokiem co 5 stopni. Analizę elipsometryczną przeprowadzono w dwóch etapach – najpierw scharakteryzowano polerowane mechanicznie podłoże NiTi i uzyskano jego odpowiedź optyczną. Następnie dokonano pomiarów próbki z warstwą  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  i dopasowano

parametry warstwy. Zmierzone w funkcji długości fali kąty elipsometryczne,  $\Psi$  i  $\Delta$ , zostały następnie dopasowane do przygotowanego modelu układu i na tej podstawie wyznaczono grubość powłoki.

## **4.2. Badania własności fizycznych**

### **4.2.1. Badania adhezji powłoki do podłoża**

Przyczepność powłoki Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> do podłoża zbadano metodą testu zarysowania z wykorzystaniem platformy otwartej wyposażonej w Micro-Combi-Tester firmy CSM zgodnie z zaleceniami normy PN-EN ISO 20502:2016-05 [132]. Za pomocą diamentowego stożka Rockwella wykonano rysę o długości  $l = 3$  mm, stopniowo zwiększając obciążenie wgłębnika z szybkością ładowania  $v_s = 10$  N/min i prędkością stołu  $v_t = 10$  mm/min, przy wzrastającej sile obciążającej  $F_c$  w zakresie 0,03-30 N. Jako siłę krytyczną wyznaczono minimalną siłę normalną powodującą utratę przyczepności badanej powłoki do podłoża. Do oceny siły krytycznej  $L_c$  wykorzystano zmiany emisji akustycznej, siły tarcia i współczynnika tarcia oraz obserwacje mikroskopowe.

### **4.2.2. Badania tribologiczne**

Podczas badań tribologicznych wyznaczono współczynnik tarcia oraz zbadano makroskopowo nieciągłości śladu wytarcia. Badania przeprowadzono metodą ball-on-disc w celu wyznaczenia współczynnika tarcia. Wykonano je przy użyciu tribometru TRB firmy Anton Paar przykładając obciążenie 1 N. Jako przeciwpróbkę zastosowano kulkę stalową o średnicy 6 mm, a stół z badanym materiałem obracał się z prędkością  $v = 0,5$  cm/s. Pomiar prowadzono zadając długość przebytej przez kulkę drogi tarcia  $s = 17$  m. Podczas każdego pomiaru wyznaczono współczynnik tarcia, jego średnią wartość oraz dokonano oceny topografii śladu wytarcia wykorzystując mikroskop 3D LEICA DCM8 z oprogramowaniem LeicaMap przy powiększeniu 20x. Wykonano również mapy topografii powierzchni przed i po nałożeniu powłoki. Pojedynczy pomiar obejmował powierzchnię o wymiarach 840 x 630  $\mu$ m.



### **4.2.3. Badania zwilżalności i swobodnej energii powierzchniowej**

Zwilżalność powierzchni zbadano mierząc kąty zwilżania metodą siedzącej kropli, natomiast swobodną energię powierzchniową (SEP) wyznaczono metodą Owensa-Wendta. Pomiary kątów zwilżania wykonano przy użyciu wody destylowanej ( $\theta_w$ ) i diiodometanu ( $\theta_d$ ) w temperaturze pokojowej  $T = 23 \pm 1$  °C na stanowisku badawczym składającym się z goniometru SURFTENS UNIVERSAL firmy OEG GmbH oraz komputera z oprogramowaniem Surftens 4.5. Na powierzchnię każdej próbki наносono po pięć kropli o objętości  $V = 1$  mm<sup>3</sup> wody destylowanej i diiodometanu. Pomiar kątów zwilżania rozpoczynano 15 s po ich osadzeniu na próbce. Czas trwania jednego pomiaru wynosił 60 s przy częstotliwości próbkowania 1 Hz. Na podstawie przeprowadzonych badań wyznaczono średnie wartości kąta zwilżania  $\theta_{sr}$  oraz swobodnej energii powierzchniowej  $\gamma_s$ . Przyjęte do obliczeń wartości swobodnej energii powierzchniowych (SEP) oraz ich składowe: polarną i dyspersyjną wynosiły odpowiednio: dla wody destylowanej:  $\gamma_{sp} = 51.0$  mJ/m<sup>2</sup> i  $\gamma_{sd} = 21.8$  mJ/m<sup>2</sup> oraz dla diiodometanu:  $\gamma_{sp} = 6.7$  mJ/m<sup>2</sup> i  $\gamma_{sd} = 44.1$  mJ/m<sup>2</sup>.

### **4.2.4. Badania topografii powierzchni**

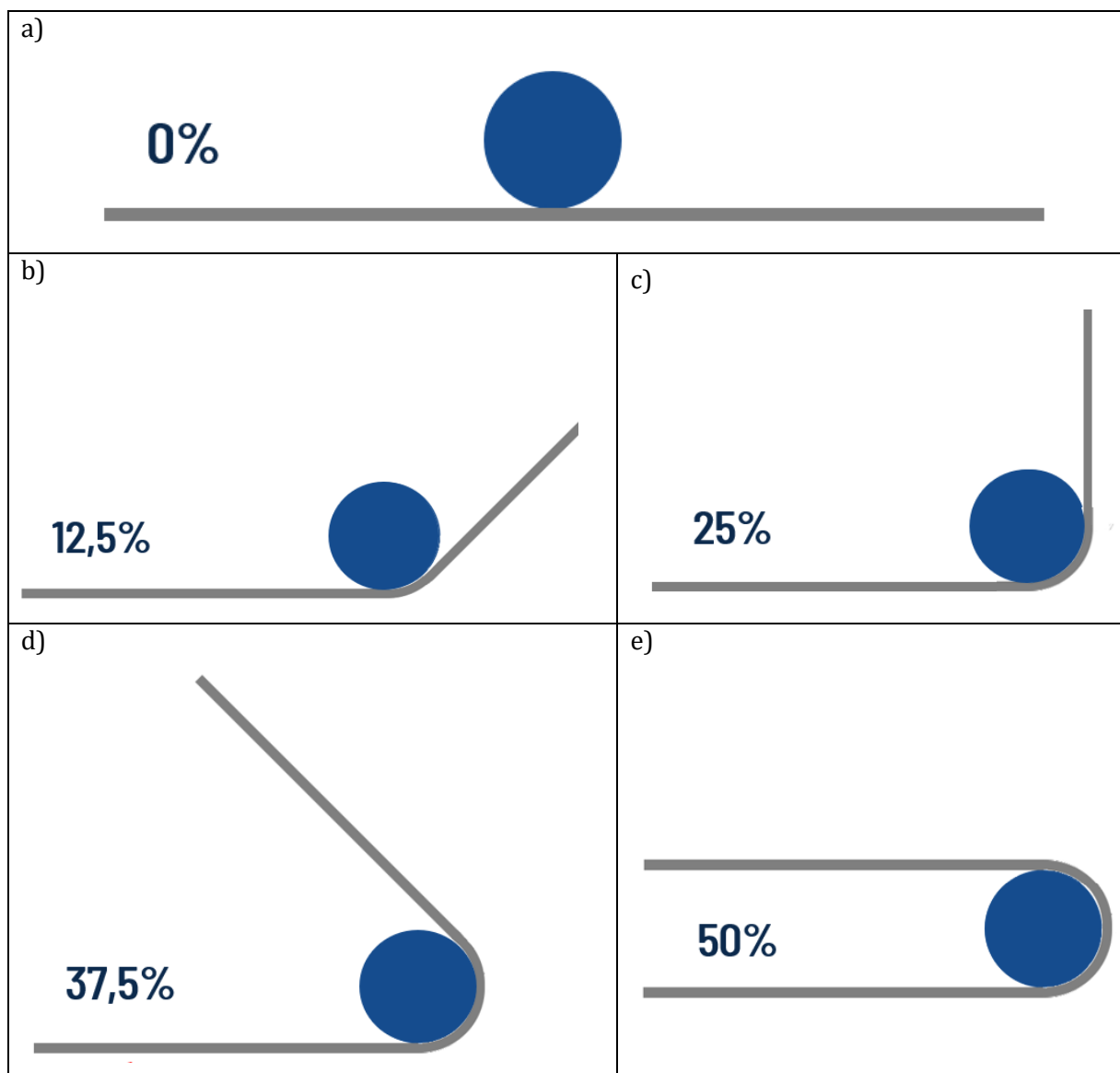
Badania topografii powierzchni przeprowadzono za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego Supra 35 firmy ZEISS oraz mikroskopu sił atomowych AFM NTegra Spectra firmy NT-MDT. W kontaktowym trybie pracy stosowano sondy krzemowe VIT\_P o częstotliwości rezonansowej 400 kHz. Na podstawie uzyskanych map powierzchni wyznaczono średnie wartości parametru Ra wg normy ISO 25178 [133].

## **4.3. Badania własności elektrochemicznych**

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

Ze względu na konstrukcję i sposób umieszczania okluderów w ciele pacjenta (z wykorzystaniem technik małoinwazyjnych), materiał implantu jest narażony na duże odkształcenia. Nałożona powłoka odkształci się wraz z podłożem, co może mieć wpływ na jej odporność na korozję. Dlatego zbadano wpływ podatności powłoki do odkształceń na odporność na korozję metodą potencjodynamiczną, rejestrując krzywe polaryzacji anodowej. Pomiary przeprowadzono dla drutu o grubości 0,178 mm, z powłoką i bez,

zginanych w pięciu wariantach na pręcie o średnicy 10 mm. Odkształcenie przeprowadzono w zakresie: 0% (Rys. 30a), 12,5% (Rys. 30b), 25% (Rys. 30c), 37,5% (Rys. 30d) oraz 50% (Rys. 30e).



Rys. 30. Zestawienie pięciu wariantów zginania drutów do badań korozyjnych

Badania wykonano metodą potencjodynamiczną, zgodnie z zaleceniami normy PN-EN ISO 10993-15 [134]. Wykorzystano potencjostat Autolab PGSTAT302N z oprogramowaniem Nova 2.1, elektrodę odniesienia, którą stanowiła nasycona elektroda kalomelowa SCE typu KP-113/Ag/AgCl 3M KCl, elektrodę pomocniczą w postaci drutu platynowego oraz anody, którą była badana próbka. Badania każdego wariantu rozpoczęto od wyznaczenia potencjału otwartego obwodu  $E_{OCP}$  w czasie  $t = 120$  min. Krzywe oporu polaryzacyjnego rejestrowano od wartości potencjału początkowego  $E_{init} = E_{OCP} - 100$  mV przy szybkości skanowania  $v = 0,3$  mV/s. Po

uzyskaniu gęstości prądu anodowego  $i_{kor} = 1 \text{ mA/cm}^2$  lub wartości potencjału  $E = 4V$ , zmieniano kierunek polaryzacji. Z uzyskanych krzywych wyznaczano potencjał korozyjny  $E_{kor}$  i opór polaryzacyjny  $R_p$ . Do wyznaczenia oporu polaryzacyjnego zastosowano metodę Sterna. Badania odporności na korozję wżerową przeprowadzono w roztworze PBS (*Phosphate Buffered Saline*) o składzie: 0,14 M NaCl, 0,0027 M KCl, 0,010 M  $PO_4^{3-}$  i  $pH = 7 \pm 0,2$ , w temperaturze  $T = 37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **4.3.1. Badania odporności na korozję szczelinową**

Kształt okluderów sprawia, że istnieje ryzyko pojawienia się korozji w szczelinach elementów implantu. Badania odporności na korozję szczelinową przeprowadzono metodą potencjostatyczną zgodnie z zaleceniami normy ASTM F746-04 (2021) [135], w roztworze PBS. Do zasymulowania szczeliny zastosowano zmodyfikowany kołnierz wykonany z politetrafluoroetyleny (PTFE). Próbki polaryzowano do wartości potencjału  $E = 800 \text{ mV}$ . 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 [136].

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

Każdy materiał wprowadzony do organizmu jest narażony na degradację, a jej produkty mogą przenikać do organów i tkanek. Szczególnie niebezpieczne są jony niklu, ponieważ mogą powodować alergie, dlatego wykonano badania przenikania jonów metali do roztworu. Próbki o powierzchni  $s = 0,5 \text{ cm}^2$  zanurzone na  $t = 28$  dni w objętości  $V = 100 \text{ cm}^3$  roztworu PBS. Po tym czasie ekspozycji przeprowadzono analizę wykorzystując metodę emisji spektrometrii atomowej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie ICP-AES. W badaniach wykorzystano spektrometr emisyjny plazmą wzbudzoną indukcyjnie JY 2000 firmy Yobin-Yvon. Krzywe wzorcowe opracowano dla materiałów wzorcowych firmy Merck. Dla analizowanego materiału określono stężenie jonów Ni, Ti i Ta.

## **4.4. Badania własności biologicznych**

### **4.4.1. Badania adhezji bakterii**

Badania adhezji bakterii przeprowadzono z wykorzystaniem referencyjnego *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Przed badaniem inokulat bakterii inkubowano przez  $t = 18$  h w temperaturze  $T = 37$  °C w  $V = 15$  cm<sup>3</sup> Tryptic Soy Broth (TSB). Następnie badane próbki umieszczano w płytkach 24-dołkowych. Na badane powierzchnie dodawano  $V = 1$  mL zawiesiny bakteryjnej ( $\sim 1 \cdot 10^8$  CFU·cm<sup>-3</sup>), a próbki inkubowano w  $T = 37$  °C przez  $t = 4$  h z wytrząsaniem przy 80 rpm. Próbki przemywano roztworem buforu fosforanowego (PBS, VWR, Polska). W celu usunięcia zaadsorbowanych bakterii próbki umieszczano w nowych płytkach 24-dołkowych i intensywnie traktowano  $V = 1$  mL 0,25% trypsyny. Następnie po  $V = 100$  µL bakterii i roztworu trypsyny pobierano i mieszano z 0,9% NaCl w stężeniach 1:1000, 1:10 000 i 1:100 000 lub większych. Objętość  $V = 100$  µL przygotowanych roztworów rozprowadzono na płytkach agarowych. Płytki agarowe inkubowano w temperaturze  $T = 37$ °C przez  $t = 18$  h. Ilość kolonii bakterii określono przez zliczenie ich na tak przygotowanych płytkach agarowych.

### **4.4.2. Badania cytotoksyczności**

W ramach badań cytotoksyczności przeprowadzono ocenę żywotności komórek metodą bezpośrednią oraz analizę uwalniania LDH (dehydrogenazy mleczanowej), substancji uwalnianej z uszkodzonych komórek, również metodą bezpośrednią. Badanie żywotności komórek zostało przeprowadzone zgodnie z zaleceniami normy ISO 10993-5:2009 [137] 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 (dwoetan 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 – 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 LDH metodą bezpośrednią. Do przeprowadzenia badania wykorzystano 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  $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  przez  $t = 48\text{ h}$ . Po tym czasie z próbek pobrano medium i odwirowywano, a następnie z odwirowanego roztworu pobrano nadsącz do analizy poziomu LDH za pomocą Cytotoxicity Assay Kit firmy Roche.

#### **4.4.3. Badania 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  $T = 37^{\circ}\text{C}$ , 99% wilgotności i 5%  $\text{CO}_2$ . 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.

#### **4.4.4. Badania własności trombogennych**

Celem przeprowadzonych badań 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. 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 difosforanem adenozyliny (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). Ekspresję markerów aktywacji płytek krwi określono za pomocą barwienia pełnej krwi. Porcje krwi  $V = 5 \mu\text{L}$  delikatnie zmieszano z monoklonalnymi przeciwciałami skoniugowanymi z fluorochromem:  $5 \mu\text{L}$  FITC-PAC-1,  $V = 5 \mu\text{L}$  PE-CD62P i  $V = 4 \mu\text{L}$  PerCP-CD61 (Becton Dickinson, USA) w soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS) zawierającej 0,2% albuminy surowicy bydlęcej i 2 mM chlorku wapnia (końcowa objętość  $35 \mu\text{L}$ ). Po 10 minutach barwienia w temperaturze pokojowej, erytrocyty poddano lizie przez dodanie  $V = 0,5 \text{ ml}$  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. Próbkę 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  $V = 25 \mu\text{l}$  krwi z  $V = 0,4 \text{ cm}^3$  medium roboczego FLS a następnie utrwalenie przez dodanie  $V = 3,5 \text{ ml}$  1% paraformaldehydu w PBS. Materiał komórkowy odzyskano przez odwirowanie i barwiono immunologicznie z FITC-CD61. Próbki z CD61 pozostawiono w temperaturze pokojowej przez  $t = 30$  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 (8) 60 i dodatkowego monocytu. Bezwzględna 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.

#### **4.4.5. Ocena oddziaływania na krwinki czerwone**

Celem przeprowadzonych badań *in vitro* była ocena wpływu oddziaływania ekstraktów kontaktowanych z materiałami, na składniki krwi pełnej konserwowanej (KPK). Badania przeprowadzono zgodnie z normami PN-EN ISO 10993-4:2018-02 [138] oraz ASTM F 756-00 [139]. Badania przeprowadzono na krwi pełnej ludzkiej 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  $T = 37^\circ\text{C}$ , w układzie wolnego mieszania. Oddziaływanie badanych materiałów na parametry czerwonych krwinek określono poprzez ocenę stopnia hemolizy, wyznaczonego poprzez obliczanie indeksu hemolizy badanych materiałów.

#### **4.4.6. Oznaczanie cytokin prozapalnych**

Badanie to koncentruje się na ilościowej analizie reakcji zapalnej. 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.

#### **4.5. Widzialność fluoroskopowa**

W celu weryfikacji widzialności fluoroskopowej analizowanych próbek wykonano zdjęcia aparatem rentgenograficznym PXR casp system przy następujących parametrach: moc 120keV, czas naświetlania 0,5 s. Wszystkie użyte próbki miały postać krążków o grubości 0,8 mm. Uzyskane zdjęcia poddano analizie kontrastu w stosunku do tła na podstawie odcieni szarości poszczególnych pikseli.



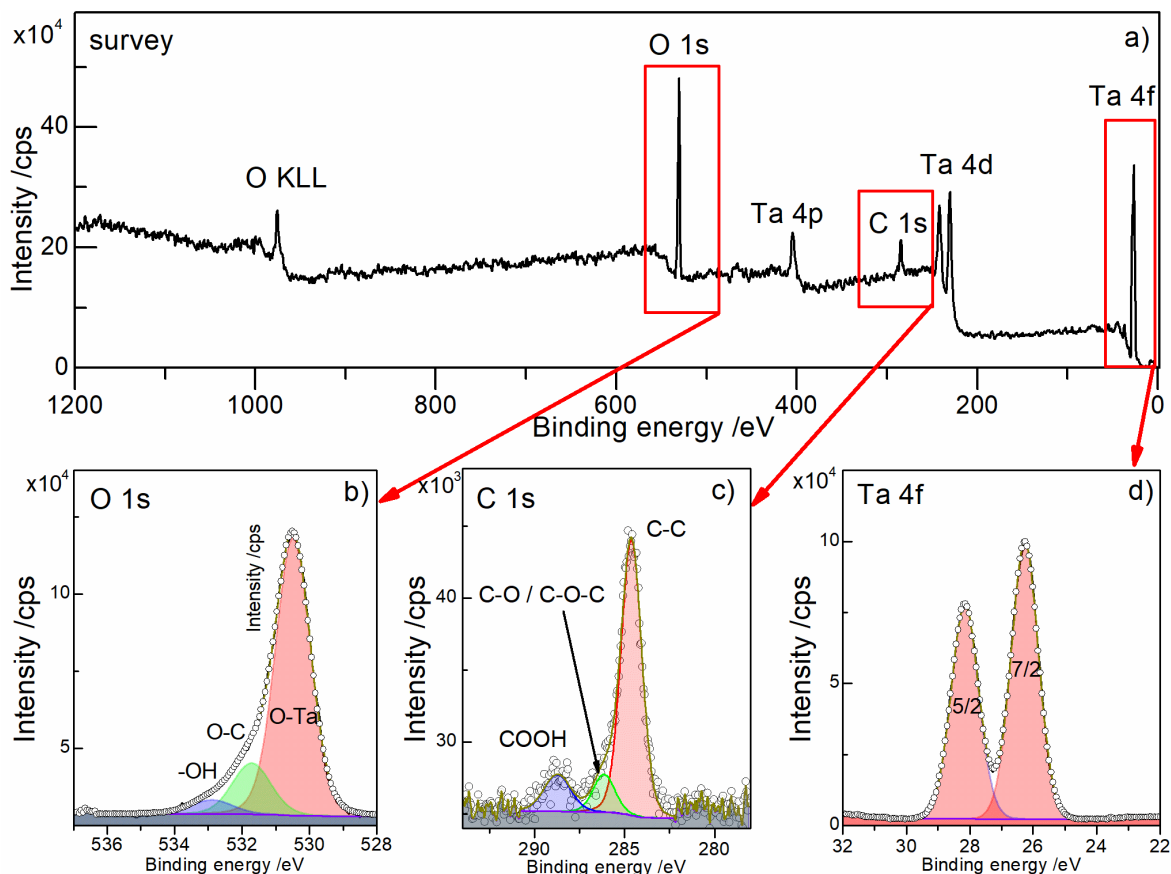
## 5. Wyniki badań

### 5.1. Charakterystyka powłoki

#### 5.1.1. Badania składu chemicznego

Widma przeprowadzonego składu chemicznego warstwy powierzchniowej przedstawiono na Rys. 31a. Wszystkie oczekiwane poziomy energetyczne związane z tantalem i tlenem są dobrze widoczne. Umiarkowane zanieczyszczenie węglem, reprezentowane przez linię C 1s, jest również oczekiwane, ponieważ próbka była transportowana w warunkach otoczenia do zestawu XPS, powodując naturalną absorpcję przypadkowego węgla. Na podstawie uzyskanych wyników ogólny skład powierzchni (w odniesieniu do współczynników względnej czułości uniwersalnej funkcji transmisji) wynosił 21,9% Ta, 50,5% O i 27,6% C. Po wykluczeniu węgla, skład powierzchni wynosił **30,2% Ta i 69,8% O**.

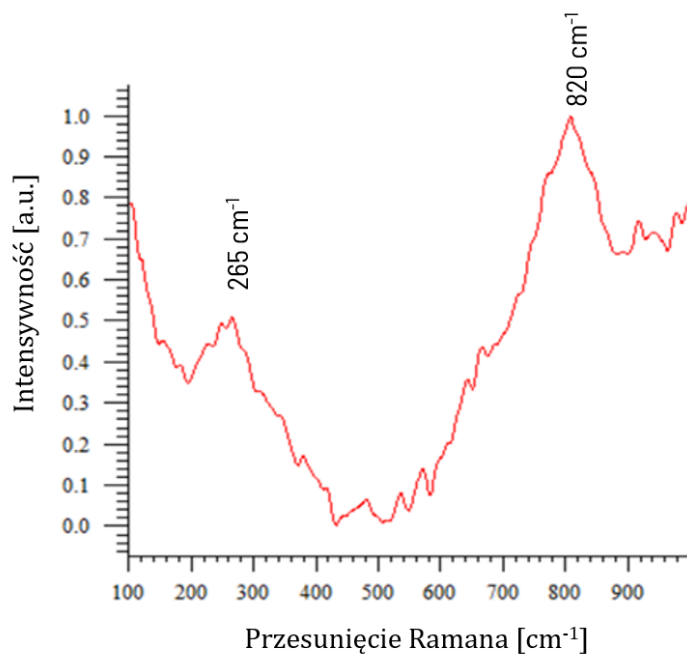
W celu szczegółowej analizy zarejestrowano dwa główne regiony energetyczne związane z warstwą tlenku tantalu. Pierwszy, O 1s, pokazany na Rys. 31b, przedstawia skład trzech komponentów, z których pierwszy (przy  $\sim 530,2$  eV) należy przypisać do sieciowego tlenku tantalu, a pozostałe do węglowej i resztkowej grupy -OH [140]. Obszar zaznaczony na Rys. 31c przedstawia region C 1s jako potwierdzenie składu powierzchniowego węgla przygodnego ujawnionego przez trzy składowe, tj. C-C, C-O / C-O-C i resztkowy COOH odpowiednio przy 284,6 eV,  $\sim 286,2$  eV i 288,7 eV [141]. Analiza przeprowadzona na obszarze Ta 4f ujawniła jeden składnik z rozszczepieniem spin-orbita 7/2 - 5/2 (Rys. 31d). Położenie głównego składnika 7/2 (26,26 eV), wysoka symetryczność i niska szerokość połówkowa ( $< 1$  eV) wskazują, że warstwa składa się z wysoce stechiometrycznego tlenku  $Ta_2O_5$ . Stwierdzenie to jest również poparte obliczeniami składu, które wskazują, że stosunek Ta/O wynosi  $\sim 0,434$  (w odniesieniu do teoretycznego 0,4 oczekiwanego dla  $Ta_2O_5$ ) [142]. W zakresie detekcji nie wykryto znaczącego udziału form podtlenkowych. Należy tutaj zaznaczyć, że do obliczeń stechiometrycznych wykorzystano tylko składnik O-Ta jako reprezentujący tlen związany z tantalem. Z tego względu z analizy wykluczono związki węgla.



Rys. 31 Widma przeglądowe (a), z zaznaczonymi głównymi poziomami energetycznymi rdzenia i wyróżnionymi obszarami energetycznymi zainteresowania po rozkładzie: O 1s (b), C 1s (c) i Ta 4f (d).

### 5.1.2. Badania struktury chemicznej i krystalograficznej

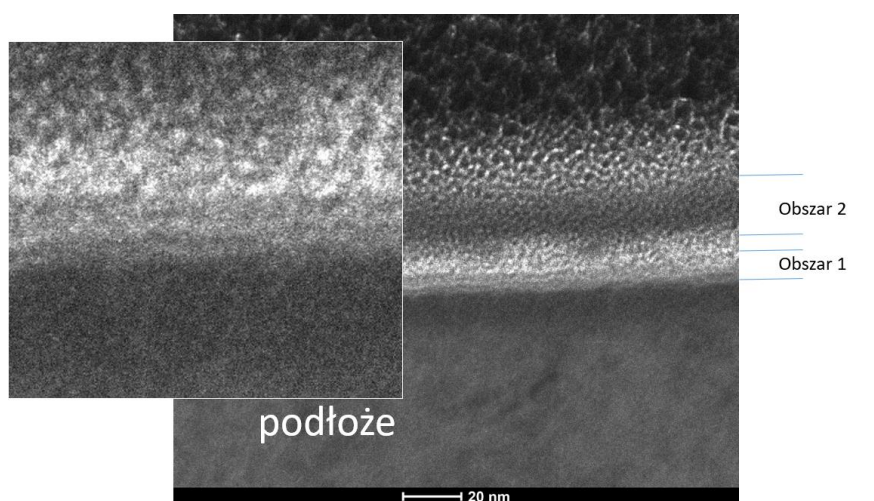
Wszystkie zarejestrowane widma Ramana nie wykazywały większych różnic, wskazując na charakterystyczne pasma potwierdzające obecność  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ . Przykładowe widmo Ramana przygotowanej próbki pokazano na Rys. 32. Dla osadzonej warstwy zarejestrowano pasma pomiędzy  $450$  a  $100\text{ cm}^{-1}$  odpowiadające drganiom zginającym O-Ta-O, a także pasma w zakresie  $900 - 450\text{ cm}^{-1}$  mogące być związane ze sprzężonym rozciąganiem wiązań Ta-O. Drgania rozciągające Ta-O-Ta zarejestrowano między  $900$  a  $700\text{ cm}^{-1}$ , a drgania zginające Ta-O-Ta zarejestrowano przy  $265$  i  $820\text{ cm}^{-1}$ .



Rys. 32. Przykładowe widmo Ramana dla powłoki  $Ta_2O_5$

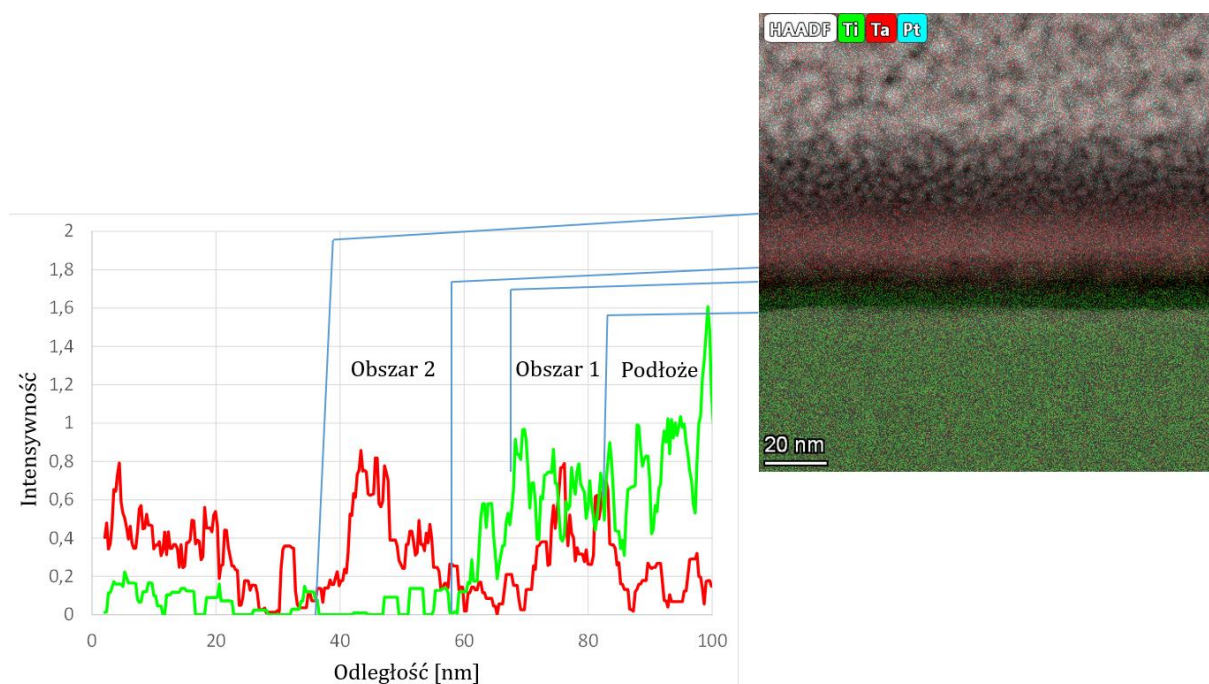
### 5.1.3. Badania mikrostruktury

Obraz uzyskany na przekroju poprzecznym przy wykorzystaniu kontrastu dyfrakcyjnego, czyli obraz w jasnym polu obserwacji (TEM BF) przedstawiono na Rys. 33. Wyróżniono dwa obszary w powłoce. Bezpośrednio pierwszy od podłoża (Obszar 1) charakteryzował się ułożeniem warstw atomowych charakterystycznych dla nakładania techniką ALD. Następnie zaobserwowano obszar przejściowy i Obszar 2, gdzie nie wyróżniono już ułożenia warstw atomowych.



Rys. 33. Zdjęcie TEM BF przekroju próbki z powłoką

Wyniki wykonanej jakościowej analizy składu chemicznego EDS przedstawiono za pomocą map rozkładu intensywności wybranych pierwiastków oraz w postaci wykresu przedstawionego na Rys. 34.



Rys. 34. Rozkład intensywności wybranych pierwiastków w przekroju próbki

Obszar 1, czyli część, która charakteryzowała się warstwowym ułożeniem struktur atomowych zawiera zarówno tytan jak i tantal. Obszar 2, czyli część o strukturze jednolitej zawierał w głównej mierze tantal.

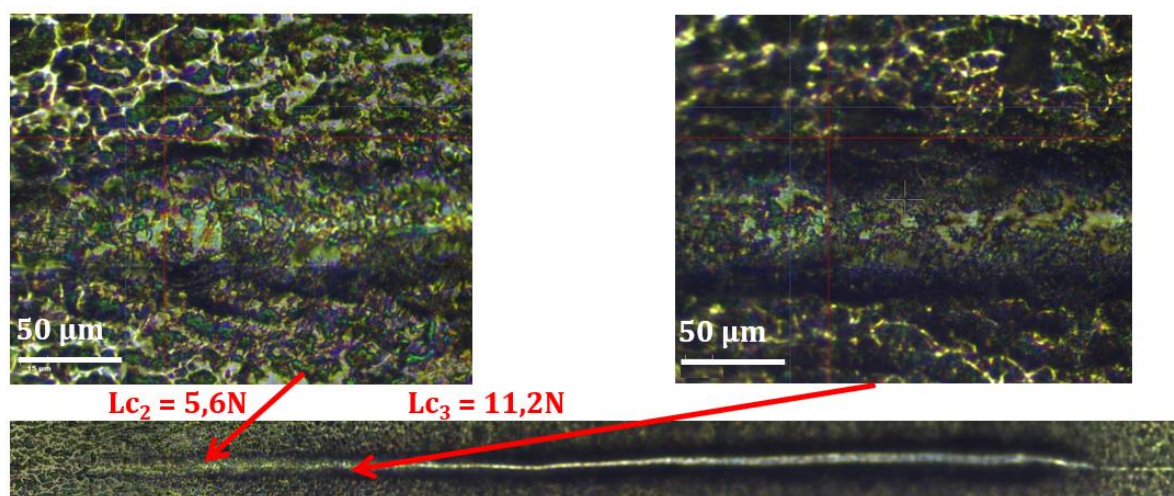
#### 5.1.4. Pomiary grubości powłoki

Ze względu na to, że nitinol samoczynnie pasyduje (w powietrzu pokrywa się cienką warstwą  $\text{TiO}_2$  o regularnej grubości), na polerowanej powierzchni próbki zamodelowano jej tabelaryczną odpowiedź optyczną, a chropowatość powierzchni zamodelowano za pomocą przybliżenia efektywnego ośrodka Brudgemanna (B-EMA). Grubość warstwy  $\text{TiO}_2$  i EMA wynosiła odpowiednio 5,3 nm i 7,3 nm. Następnie osadzona warstwa  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  i jej chropowatość powierzchni została zamodelowana za pomocą EMA (*Effective Medium Approximation*). Porównano zmierzone kąty elipsometryczne i odpowiedź pseudo-dielektryczną z modelem z pierwszej części tego badania. Warstwa  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  została zamodelowana przy użyciu parametryzacji Tauc-Lorentza. Grubości warstw  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  wyniosły odpowiednio 2,7 nm i 13,8 nm.

## 5.2. Badania własności fizycznych

### 5.2.1. Badania adhezji powłoki do podłoża

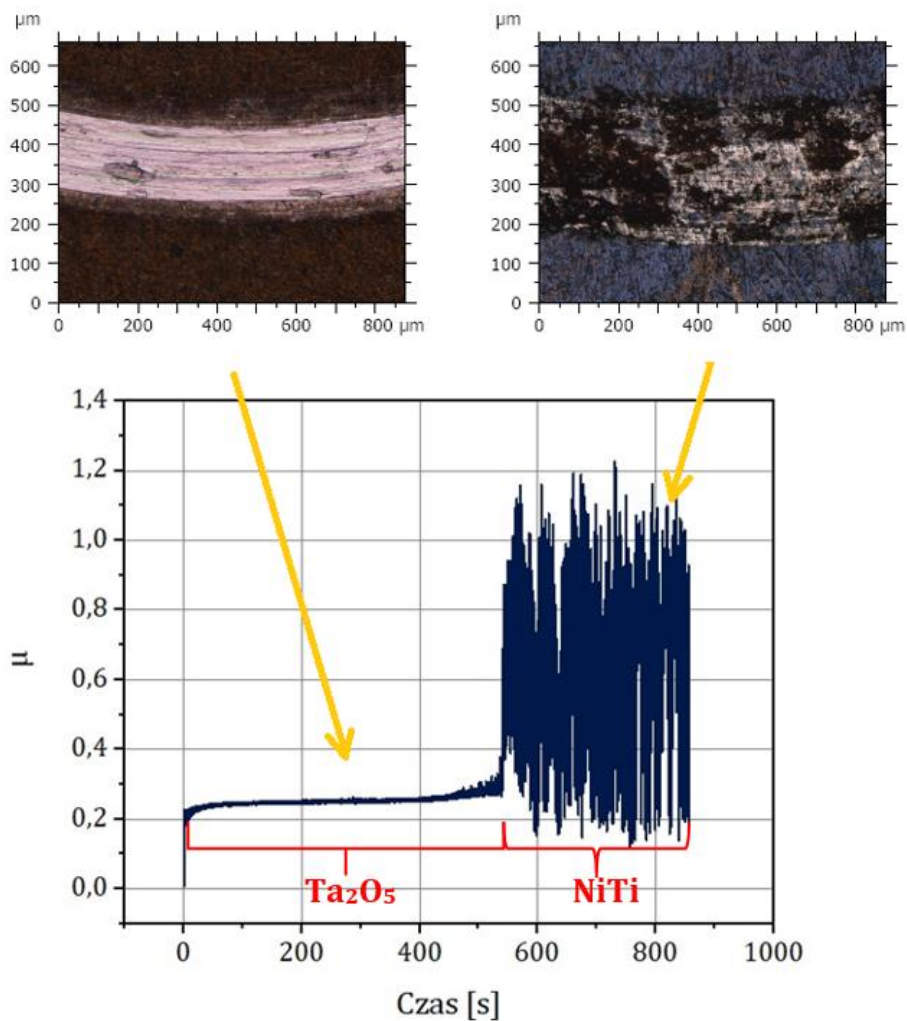
Analizowana powłoka charakteryzowała się bardzo dobrą przyczepnością do podłoża. W przykładowym pomiarze przedstawionym na Rys. 35, odprysk powłoki zaobserwowano dopiero przy wartości  $L_{c2} = 5,6 \pm 0,3$  N, a całkowite przerwanie jej ciągłości przy wartości  $L_{c3} = 11,2 \pm 0,4$  N. Na podstawie oceny makroskopowej rysy stwierdzono nieciągłą perforację powłoki.



Rys. 35. Przykładowe zarysowanie powłoki  $Ta_2O_5$

### 5.2.2. Badania tribologiczne

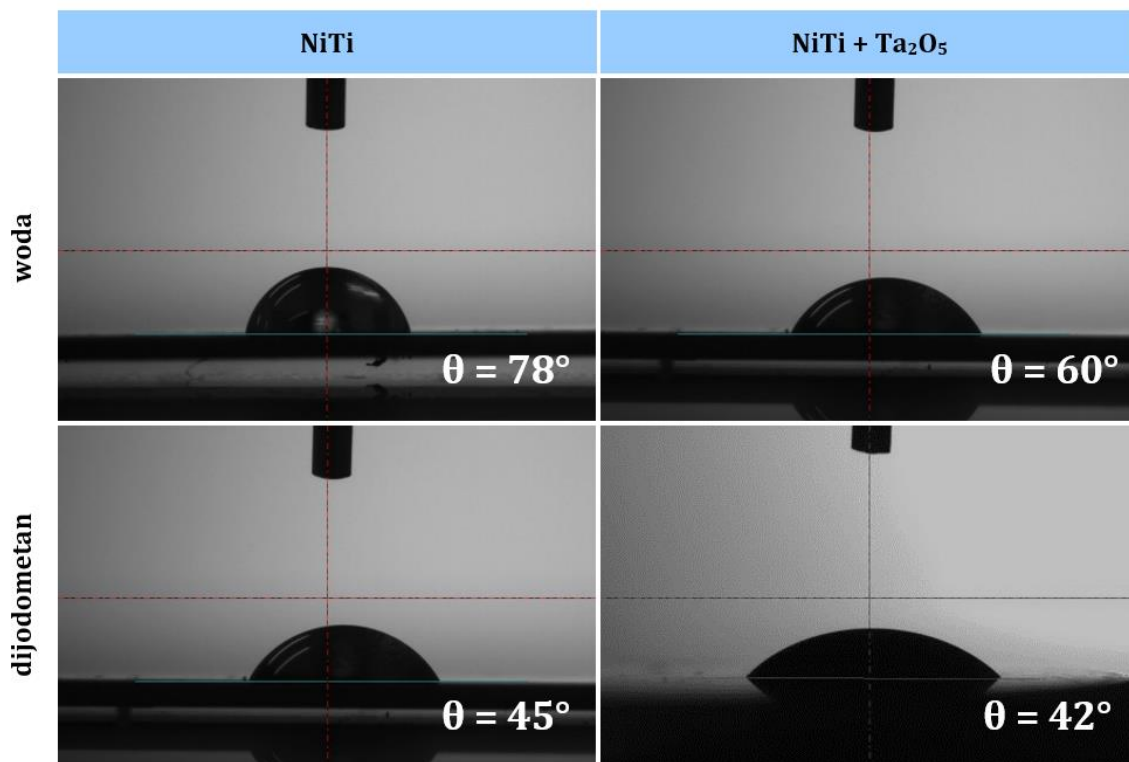
Wyniki pomiarów wartości współczynnika tarcia przedstawiono na Rys. 36, wraz ze zdjęciami makroskopowymi powierzchni. Na podstawie uzyskanych wartości stwierdzono zwiększenie wartości współczynnika tarcia względem stalowej przeciwpróbki dla wariantu NiTi+ $Ta_2O_5$  w porównaniu do wariantu bez powłoki NiTi. Średnie wartości wynosiły odpowiednio dla NiTi:  $\mu = 0,64 \pm 0,08$ , a z kolei dla NiTi +  $Ta_2O_5$ :  $\mu = 0,24 \pm 0,06$ .



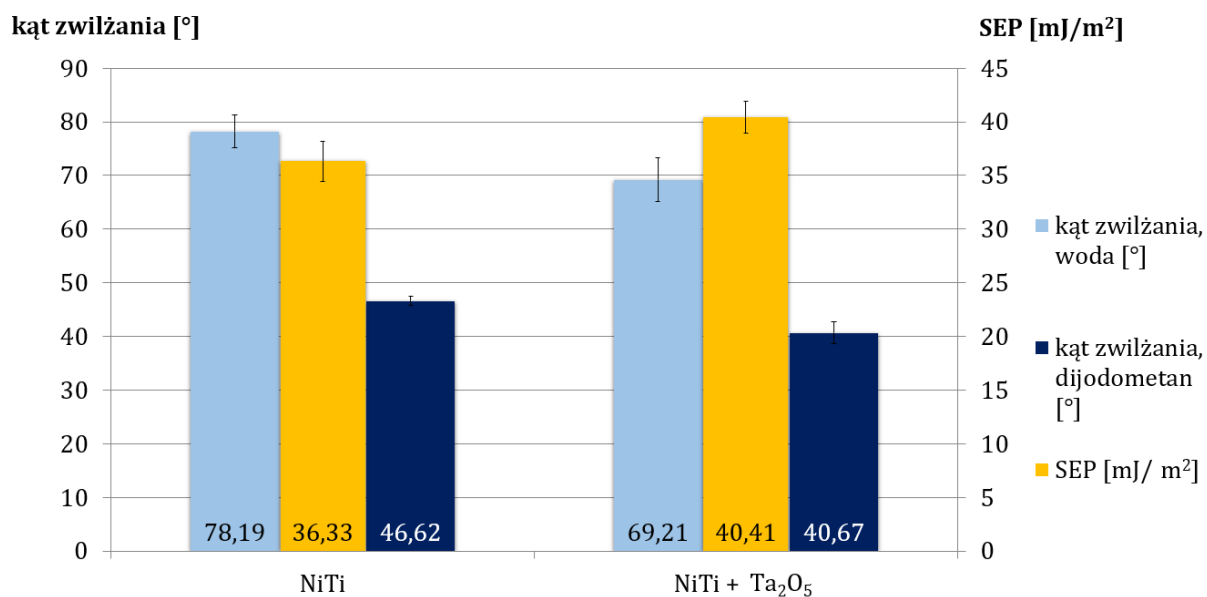
Rys. 36. Przedstawienie wyników pomiaru współczynnika tarcia dla podłoża NiTi i powłoki  $Ta_2O_5$

### 5.2.3. Badania zwilżalności i energii powierzchniowej

Wyniki pomiarów zwilżalności i energii powierzchniowej oraz przykładowe krople naniesione na powierzchnię próbek bez i z powłoką przedstawiono na Rys. 37 i Rys. 38. Powierzchnia próbek ze stopu NiTi, zarówno przed jak i po naniesieniu powłoki wykazuje charakter hydrofilowy. Powłoka  $Ta_2O_5$  wpłynęła na zmniejszenie się wartości kąta zwilżania zarówno wody, jak i diiodometanu oraz na zwiększenie energii powierzchniowej.



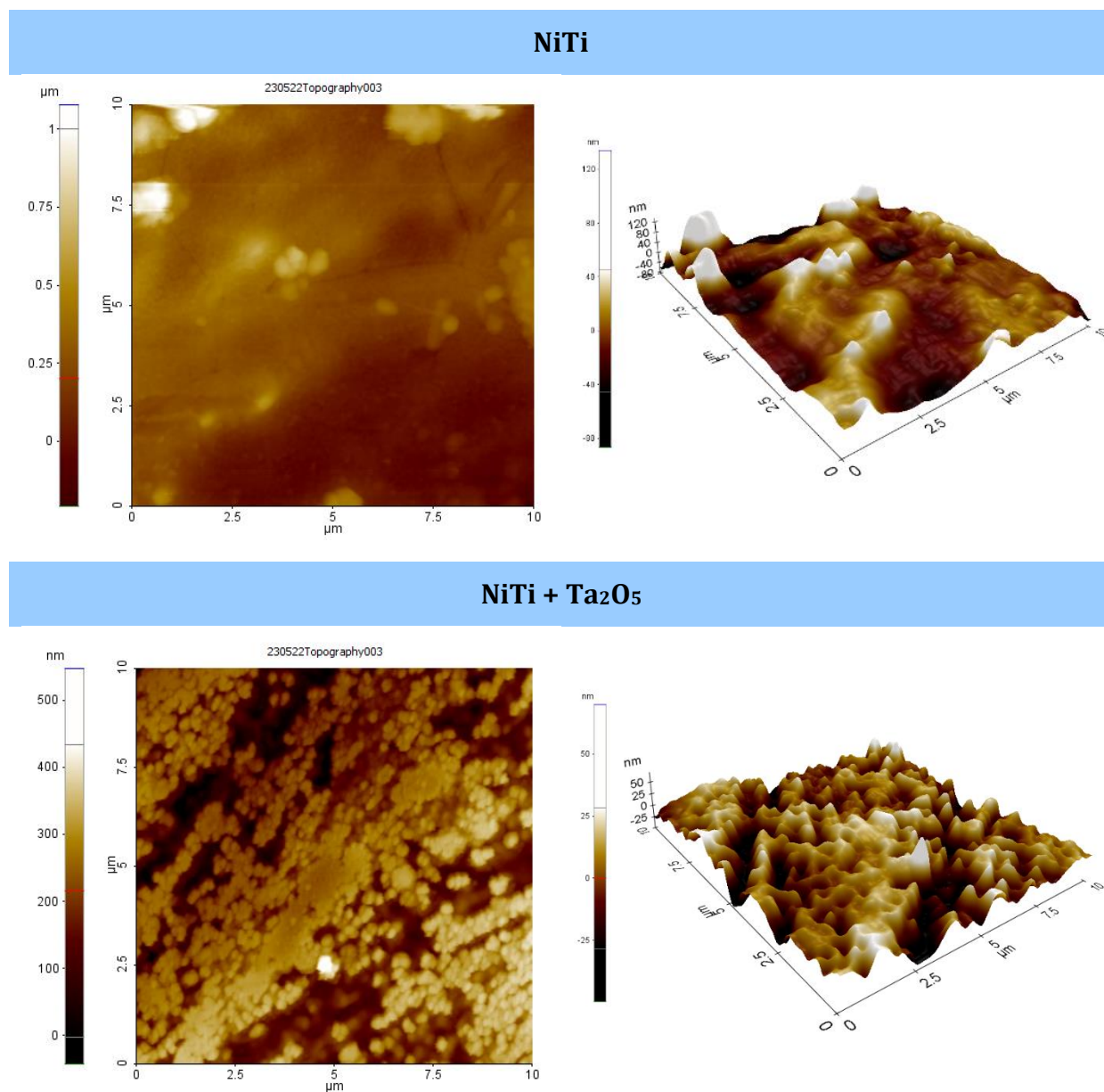
Rys. 37. Przykładowe zdjęcia kształtów kropli podczas pomiarów z wykorzystaniem wody i diiodometanu



Rys. 38. Zestawienie wyników pomiarów kątów zwilżania dla wody i diiodometanu oraz wyznaczonej energii powierzchniowej

## 5.2.4. Badania topografii powierzchni

Wyniki badań topografii powierzchni z wykorzystaniem mikroskopu sił atomowych AFM oraz z wykorzystaniem elektronowego mikroskopu skaningowego SEM nie wykazały znaczących różnic w morfologii powierzchni pomiędzy podłożem a podłożem z powłoką (Rys. 39 i Tab. 3). Zdjęcia SEM przedstawiono na Rys. 40.

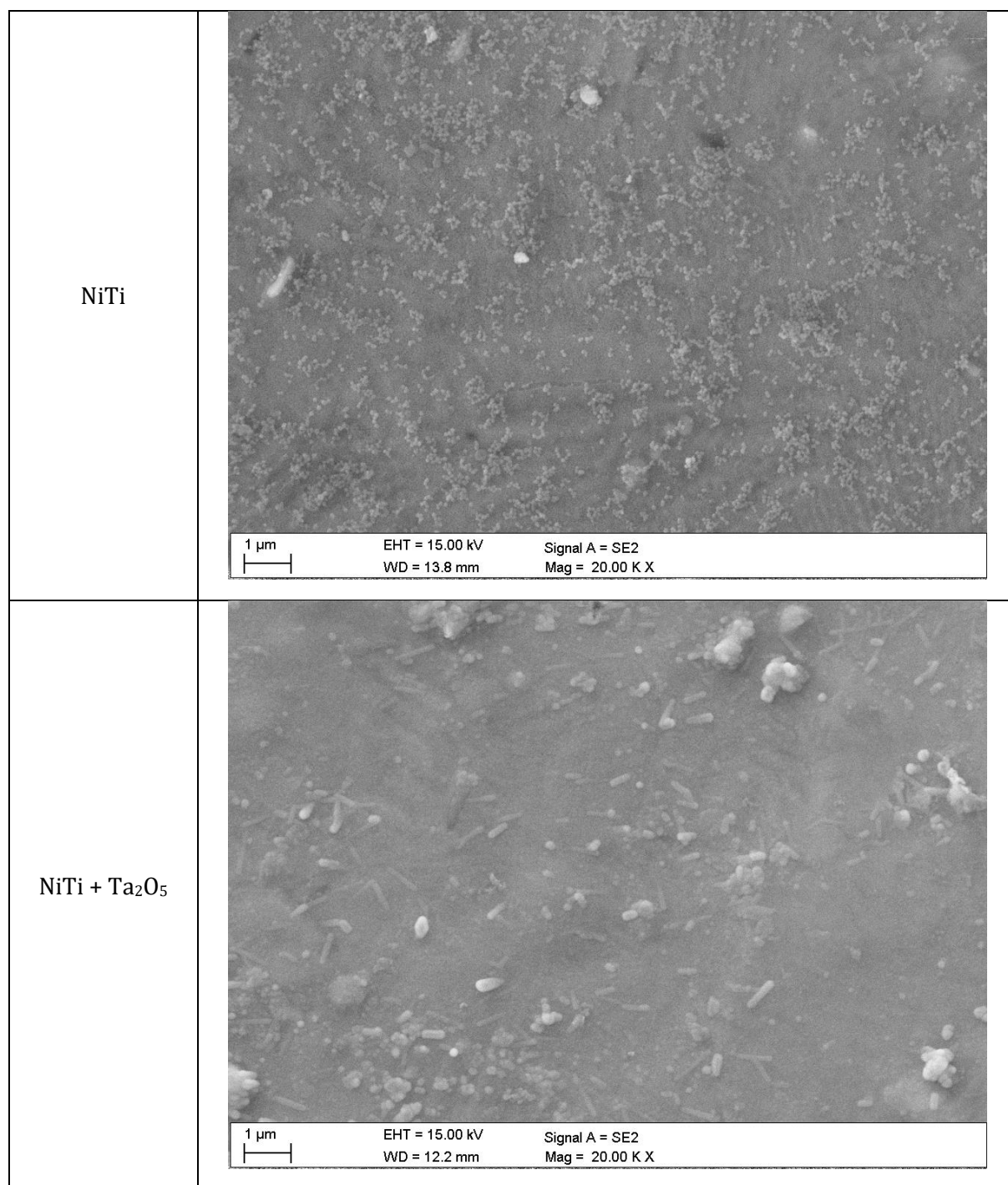


Rys. 39. Przykładowa morfologia powierzchni 2D i 3D badanych próbek



Tab. 3. Wyniki średniej chropowatości badanych próbek

Próbka	Ra [nm]
NiTi	149,75 ± 41,57
NiTi + Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	84,80 ± 16,70



Rys. 40. Porównanie zdjęć SEM powierzchni przy powiększeniu 20000x

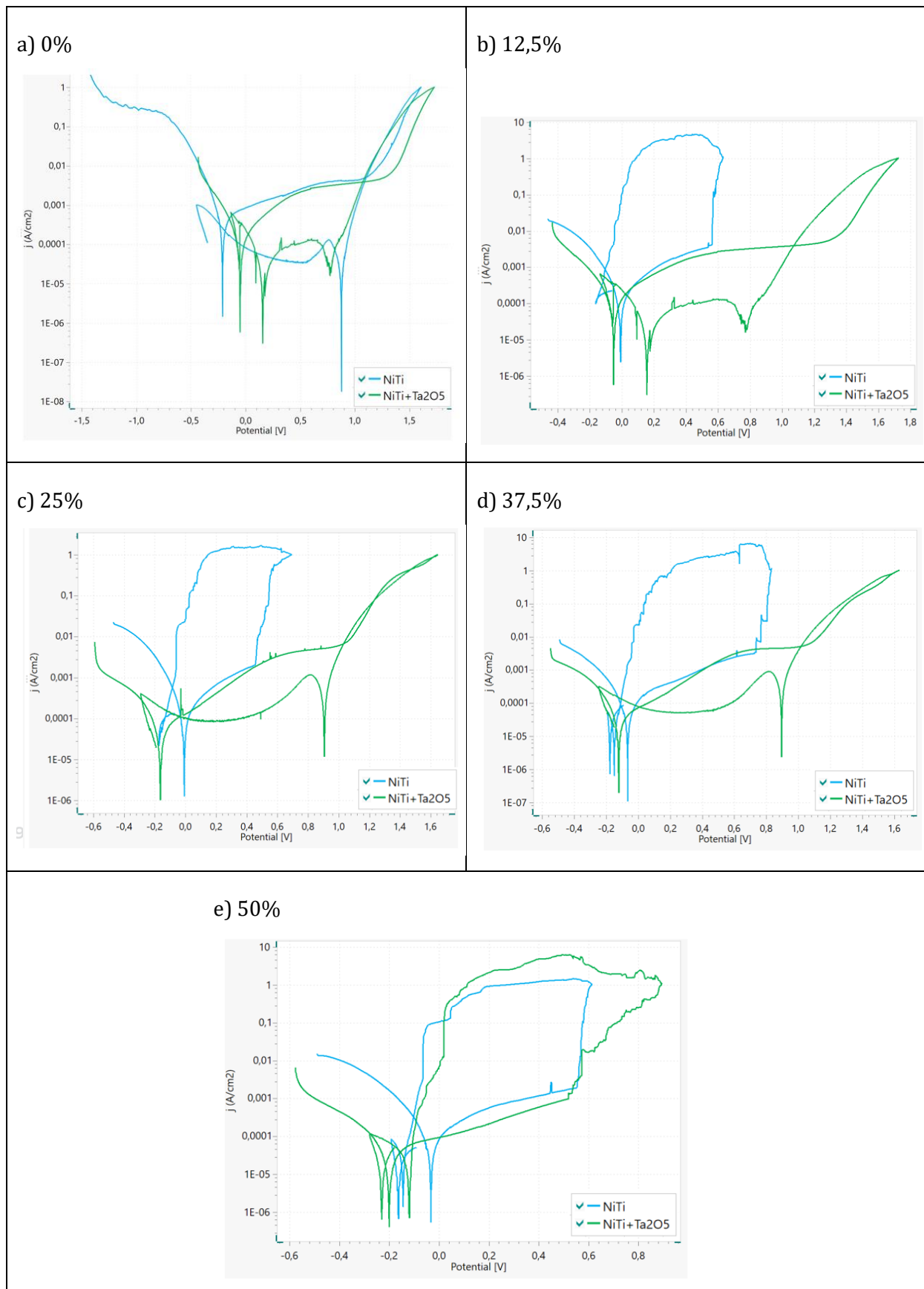
## 5.3. Badania własności elektrochemicznych

### 5.3.1. Badania podatności powłoki do odkształceń

Niemal dwukrotnie wyższe wartości oporu polaryzacyjnego wskazują, że powłoka Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> poprawiła odporność na korozję badanego stopu NiTi, co świadczy o korzystnym obniżeniu aktywności powierzchni badanego biomateriału w środowisku korozyjnym. Ponadto wraz ze wzrostem odkształcenia zaobserwowano wzrost wartości oporu polaryzacyjnego, korzystnie wpływając na odkształcenie zmodyfikowanego stopu NiTi. Wyniki badań potencjodynamicznych oceniające podatność powłoki do odkształceń przedstawiono w Tab. 4. Krzywe polaryzacji anodowej, na których wyznaczono pętle histerezy dla przykładowych próbek przedstawiono na Rys. 41.

Tab. 4. Zestawienie wyników odporności na korozję wżerową

Próbka	Odkształcenie [%]	E <sub>kor</sub> [mV]	j <sub>kor</sub> [nA/cm <sup>2</sup> ]	R <sub>p</sub> [kΩ]
NiTi	0	-458 ± 61	269,0 ± 68,0	573 ± 102
NiTi + Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0	-125 ± 33	76,6 ± 11,7	2 012 ± 301
NiTi	12,5	-6 ± 16	125,0 ± 47,0	1 231 ± 190
NiTi + Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	12,5	-138 ± 45	39,7 ± 8,6	3 877 ± 365
NiTi	25	-6 ± 22	109,0 ± 40,0	1 416 ± 105
NiTi + Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	25	-162 ± 30	38,1 ± 8,2	4 046 ± 280
NiTi	37,5	-64 ± 28	52,2 ± 10,1	2 956 ± 206
NiTi + Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	37,5	-120 ± 29	28,7 ± 8,5	5 372 ± 307
NiTi	50	-32 ± 12	60,8 ± 9,9	2 535 ± 180
NiTi + Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	50	-200 ± 53	27,7 ± 8,3	5 560 ± 354



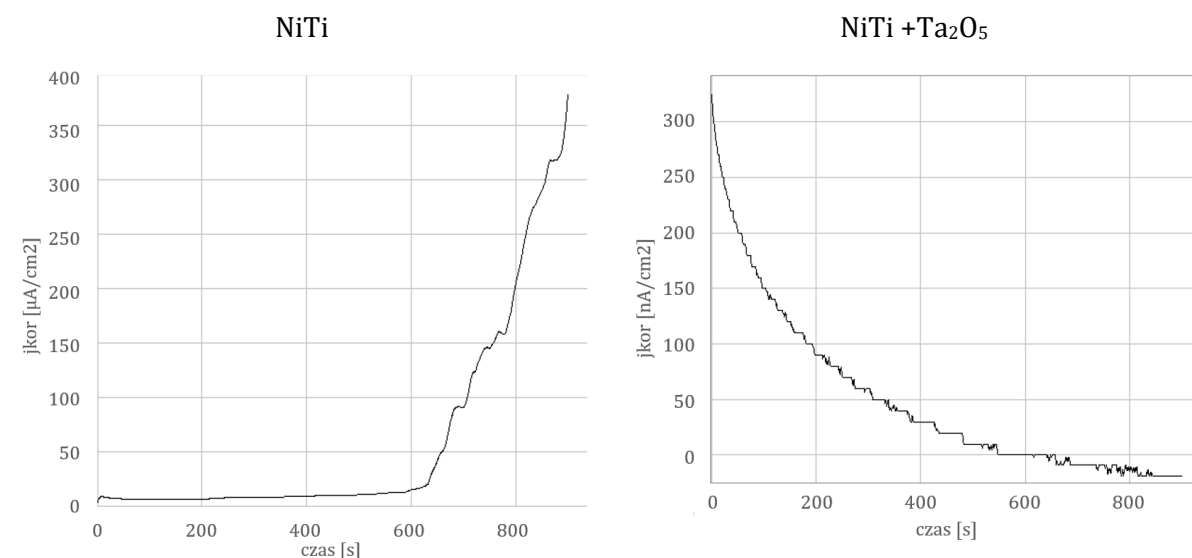
Rys. 41. Wyniki badań polaryzacji anodowej podczas zginania próbek w różnym stopniu odkształcenia

### 5.3.2. Badania odporności na korozję szczelinową

Wyniki badań odporności na korozję szczelinową przedstawiono w Tab. 5 i na Rys. 42. Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzono, że materiał w stanie wyjściowym po procesie polerowania elektrochemicznego NiTi nie jest odporny na ten rodzaj korozji. Z kolei uzyskane wyniki dla próbek z naniesioną powłoką Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> potwierdziły odporność na ten rodzaj korozji.

Tab. 5. Zestawienie wyników odporności na korozję szczelinową

Próbka	Odporność na korozję szczelinową	Gęstość prądu po 20 s [μA/cm <sup>2</sup> ]	Gęstość prądu po 900 s [μA/cm <sup>2</sup> ]	Gęstość ładunku elektrycznego [mC/cm <sup>2</sup> ]
NiTi	Nie	7,270	377,28	53,614
NiTi+Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Tak	0,253	0	0,042



Rys. 42. Krzywe zmiany gęstości prądu w funkcji czasu

### 5.3.3. Badania przenikania jonów metali do roztworu

Wyniki przeprowadzonych badań przenikania jonów metalicznych do roztworu przedstawiono w Tab. 7. Wyniki potwierdziły, że zastosowana powłoka ograniczyła przenikanie jonów niklu, a także tytanu do roztworu. Pojawiły się natomiast jony

tantalu, uwolnione z powłoki, w ilości dwukrotnie mniejszej od ilości jonów tytanu o aż 14-krotnie mniejszej niż ilość jonów niklu.

Tab. 6. Wyniki badania przenikania jonów niklu do roztworu PBS

	Ni [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]	Ti [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]	Ta [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]
NiTi	180,1 $\pm$ 0,2	31,7 $\pm$ 0,2	0
NiTi + Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	140,0 $\pm$ 0,2	22,0 $\pm$ 0,2	10,8 $\pm$ 0,2

## 5.4. Badania własności biologicznych

### 5.4.1. Badania adhezji bakterii

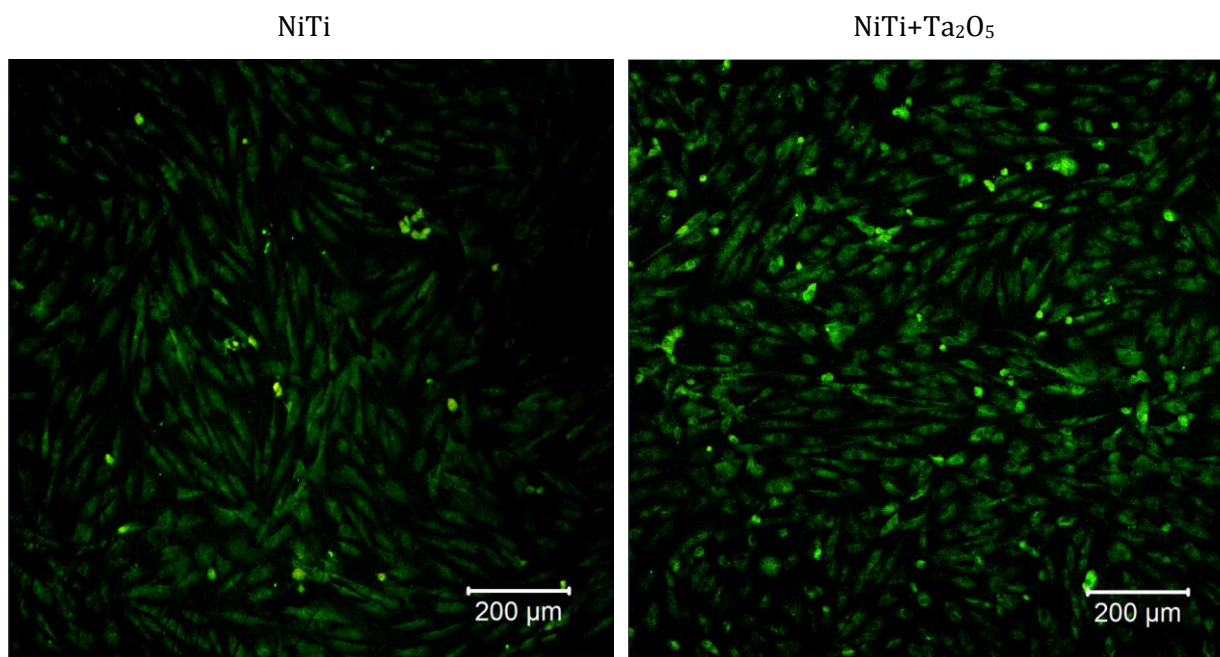
Kolonie bakterii zostały zliczone, a wyniki przedstawiono w Tab. 7. Na podstawie wyników można stwierdzić, że całkowita liczba kolonii bakteryjnych zadherowanych do podłoża zmniejszyła się po nałożeniu powłoki Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Kontrolna liczba bakterii wynosiła  $3,09 \cdot 10^7$  CFU (*Colony-Forming Unit* – jednostka tworząca kolonię).

Tab. 7. Średnia liczba bakterii *S. Aureus* zadherowanych do podłoża

Próbka	Średnia liczba kolonii [CFU]
NiTi	$2,40 \cdot 10^4 \pm 8,00 \cdot 10^3$
NiTi + Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	$1,65 \cdot 10^4 \pm 7,50 \cdot 10^3$
kontrola	$3,09 \cdot 10^7 \pm 4,44 \cdot 10^6$

### 5.4.2. Badania cytotoksyczności

Ocenie cytotoksyczności zostały poddane próbki dwóch różnych modyfikacji powierzchniowych. Na Rys. 43 przedstawiono zestawienie zdjęć ze skaningowego mikroskopu konfokalnego Carl Zeiss Exciter 5.



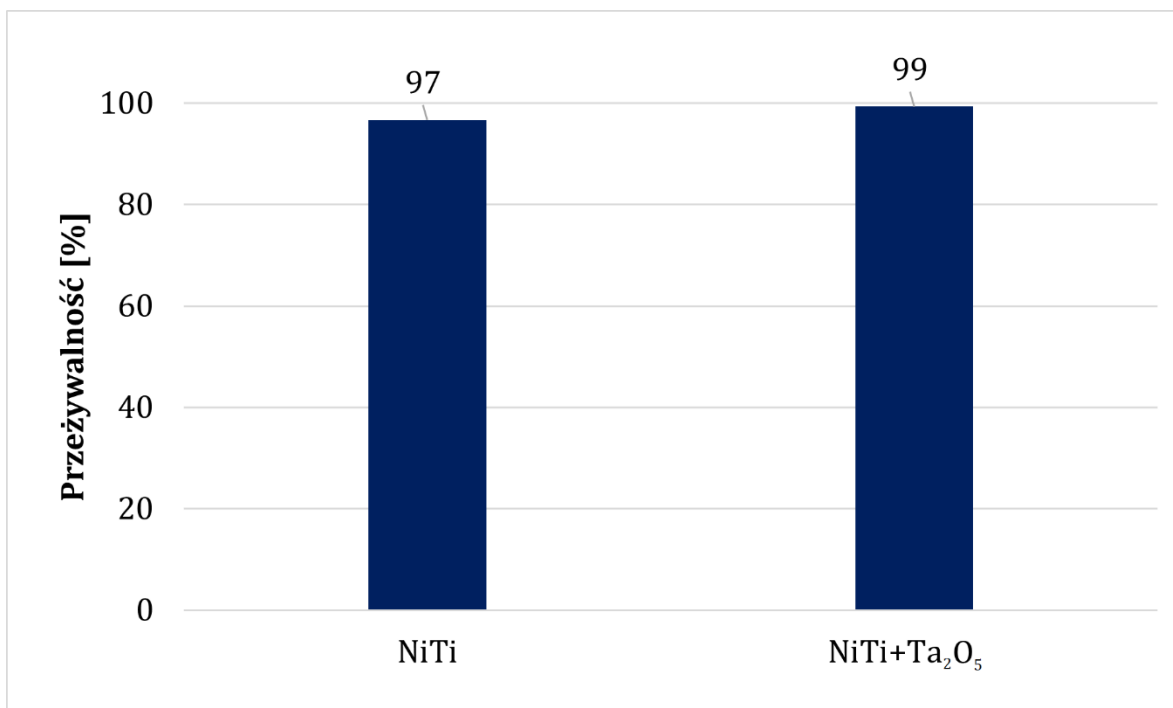
Rys. 43. Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego, kolorem zielonym oznaczono komórki żywe, kolorem czerwonym oznaczono komórki martwe

Analizując zdjęcia z mikroskopii konfokalnej można zauważyć nieznacznie mniejszą ilość komórek o aktywnych mitochondriach oraz nieznacznie większą ilość komórek nekrotycznych na podłożu NiTi. Zgodnie z zapisem normy ISO 10933-5 [137] stopień toksyczności można określić jako 0, brak działania cytotoksycznego (Tab. 8) zarówno dla materiału referencyjnego, jak i z powłoką.

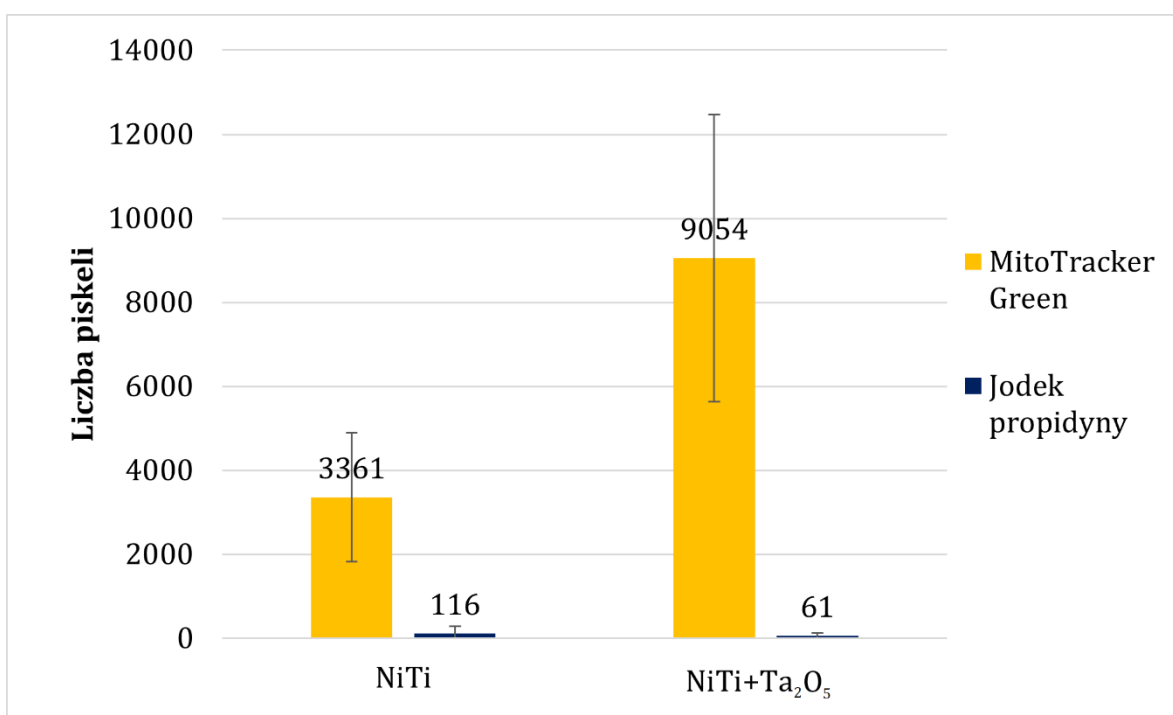
Tab. 8. Stopień cytotoksyczności zgodnie z normą ISO 10933-5 [137]

Stopień	Toksyczność	Opis zmian w hodowlach
0	Brak	pojedyncze, wewnątrz cytoplazmatyczne ziarnistości, nie stwierdza się lizy komórek, brak zahamowania wzrostu komórek
1	Słaba	nie więcej niż 20% komórek zaokrąglonych, obkurczonych, odklejających się od podłoża, bez zagęszczeń cytoplazmy, pojedyncze komórki rozerwane
2	Umiarkowana	nie więcej niż 50% komórek zaokrąglonych, bez ziarnistości, rozległa liza komórek i puste przestrzenie między komórkami
3	Średnia	nie więcej niż 70% komórek zaokrąglonych, komórki uległy lizie
4	Silna	prawie całkowicie lub całkowicie zniszczona hodowla komórkowa

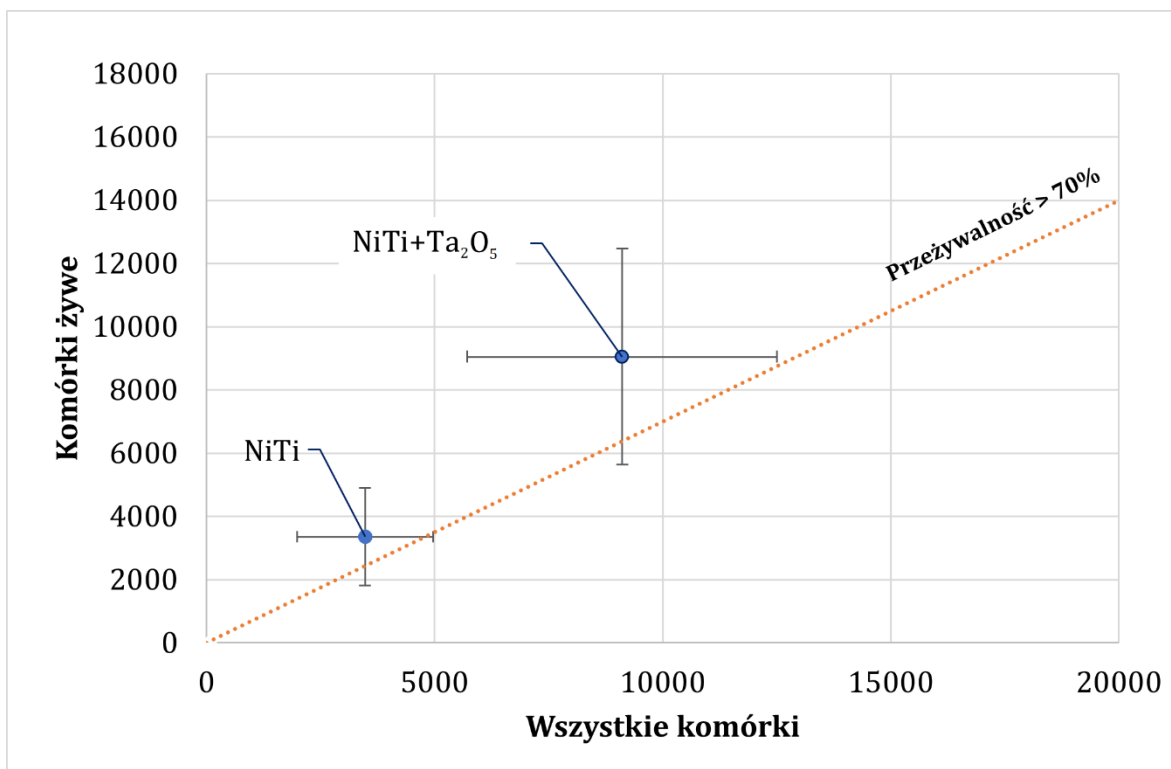
Na Rys. 44, Rys. 45 i Rys. 46 przedstawiono wyniki uzyskane z mikroskopu konfokalnego przy użyciu funkcji kolokalizacji. Przeżywalność określona jest zgodnie z normą i oznacza ona stosunek żywych komórek do wszystkich komórek na próbce. Zgodnie z normą, jeśli wartość żywych komórek przekracza 70% wskazuje na brak działania cytotoksycznego.



Rys. 44. Przeżywalność komórek na badanych materiałach

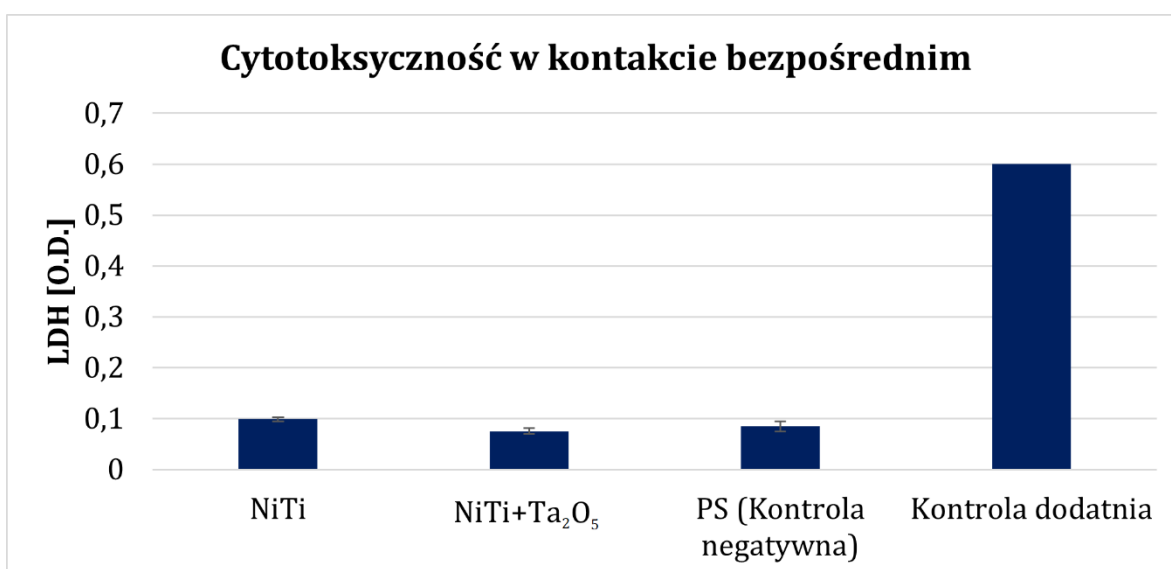


Rys. 45. Liczba pikseli odpowiadająca komórkom żywym i martwym



Rys. 46. Liczba pikseli komórek żywych względem wszystkich komórek

Na Rys. 47 przedstawiono wykres poziomu dehydrogenazy mleczanowej LDH. Im niższa wartość dla badanej próbki tym mniejsza ilość wydzielonego izoenzymu, co oznacza mniejszą cytotoksycznosc. Mniejszą wartość zaobserwowano w przypadku powłoki Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> w porównaniu do materiału referencyjnego.

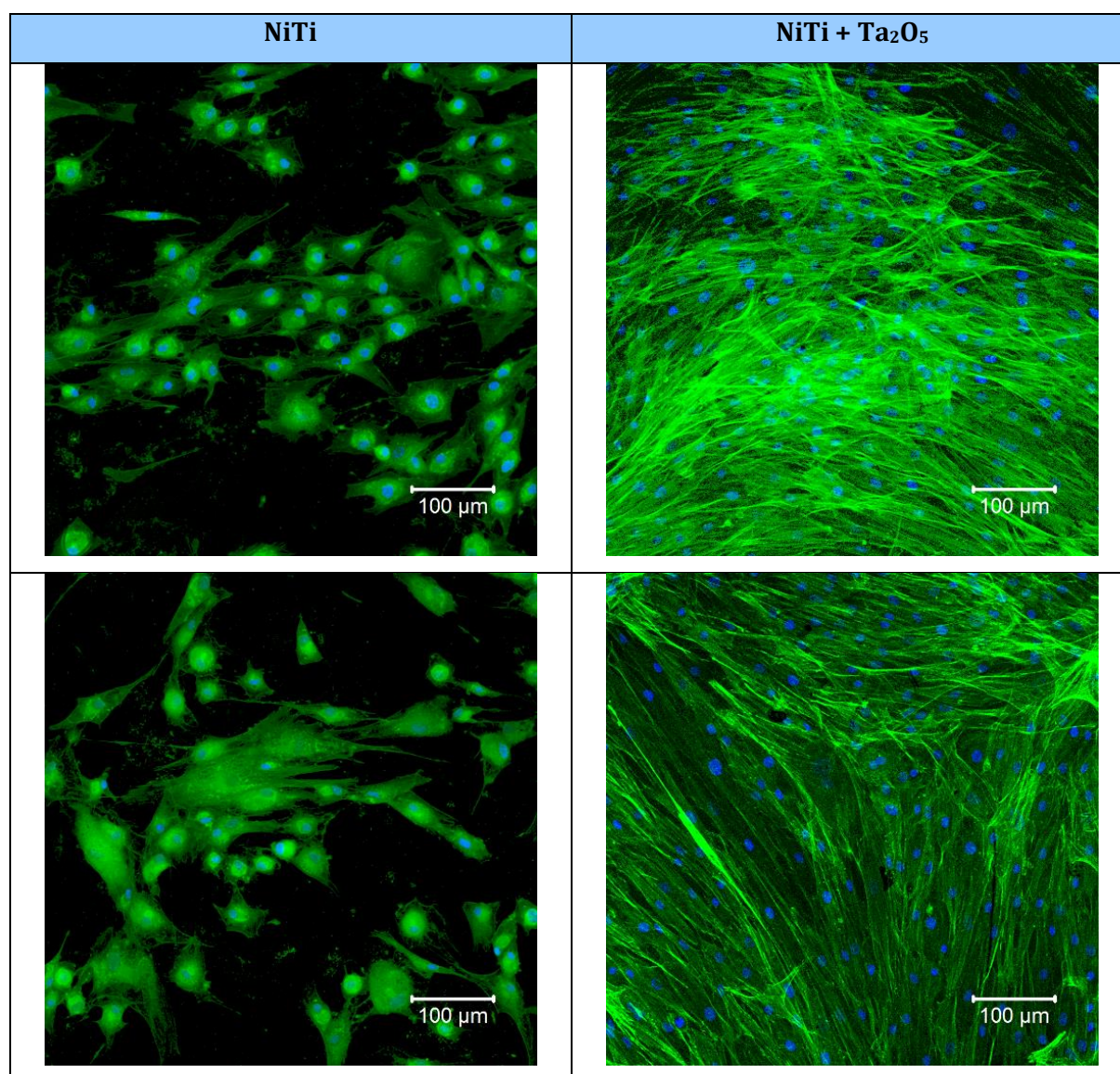


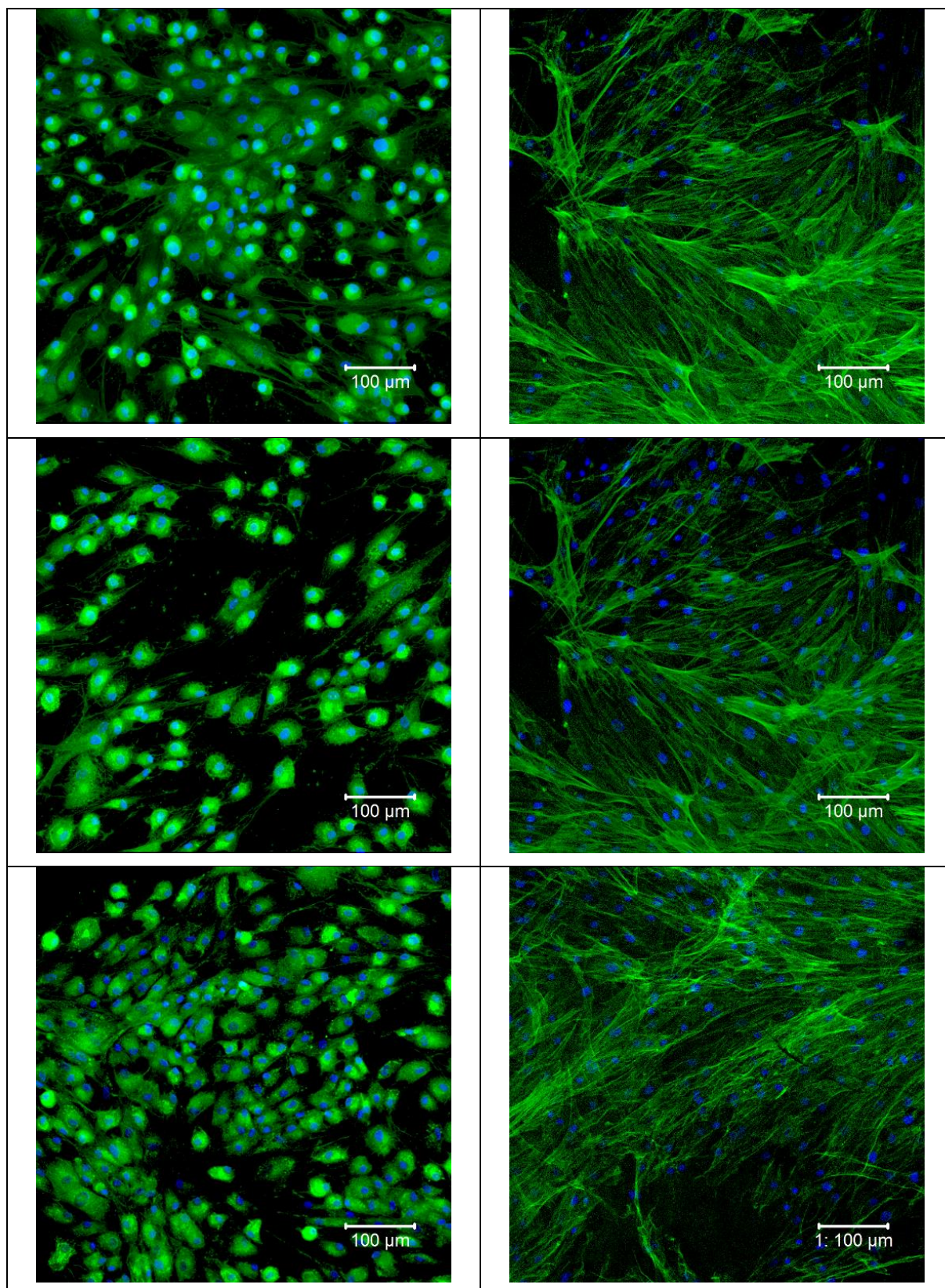
Rys. 47. Poziom LDH dla badanych próbek w kontakcie bezposrednim



### 5.4.3. Badania proliferacji komórek

Wyniki przeprowadzonych badań proliferacji komórek przedstawiono na Rys. 48. Analizując zdjęcia z mikroskopii konfokalnej, zarówno w przypadku podłoża referencyjnego w postaci stopu NiTi, jak i stopu z powłoką Ta<sub>2</sub>O<sub>5</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.

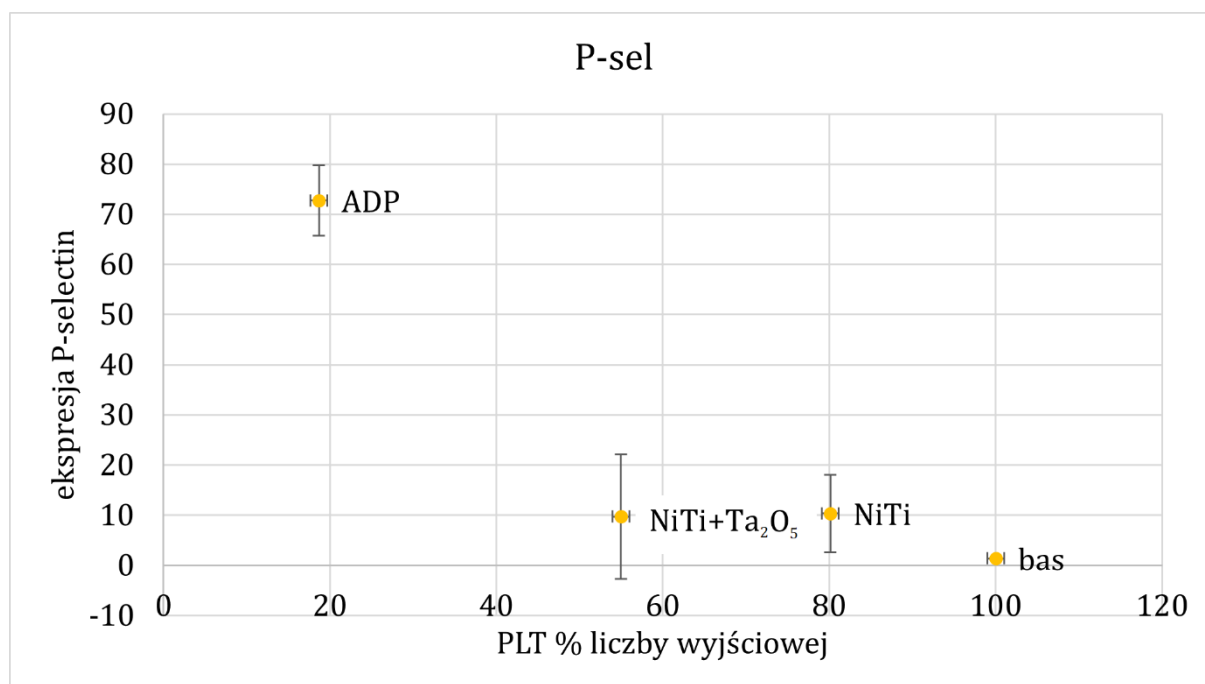




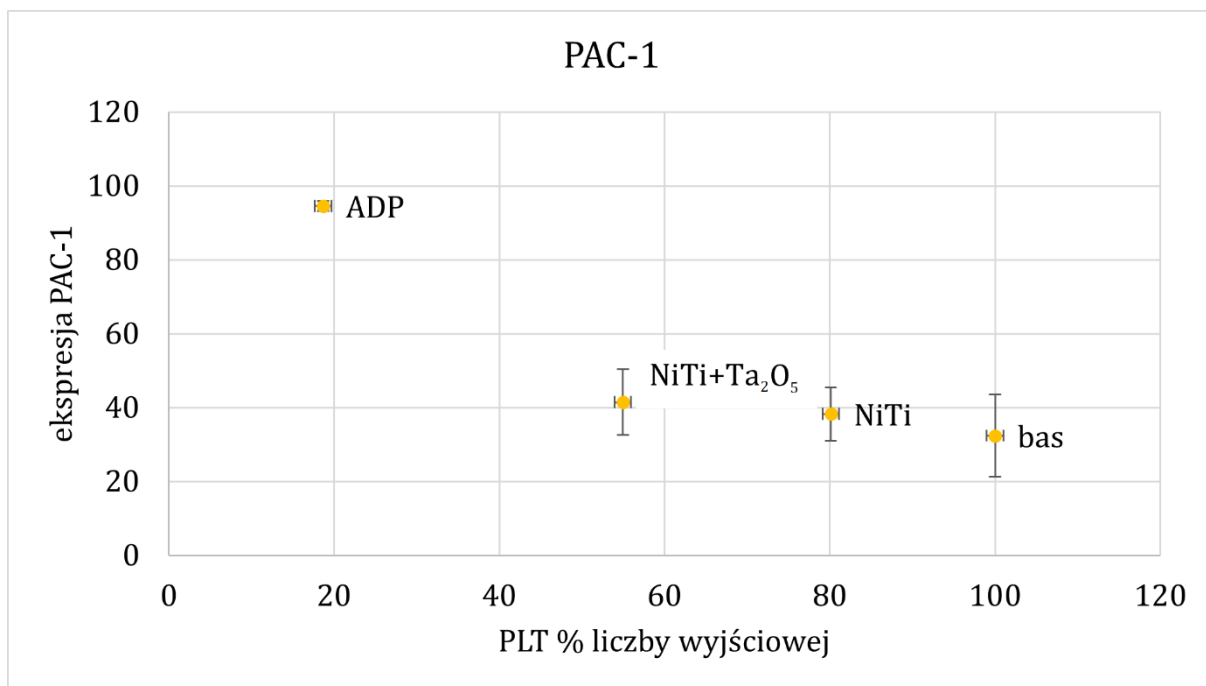
*Rys. 48. Przykładowe zdjęcia badań proliferacji wykonane za pomocą skaningowego mikroskopu laserowego*

#### 5.4.4. Badania własności trombogennych

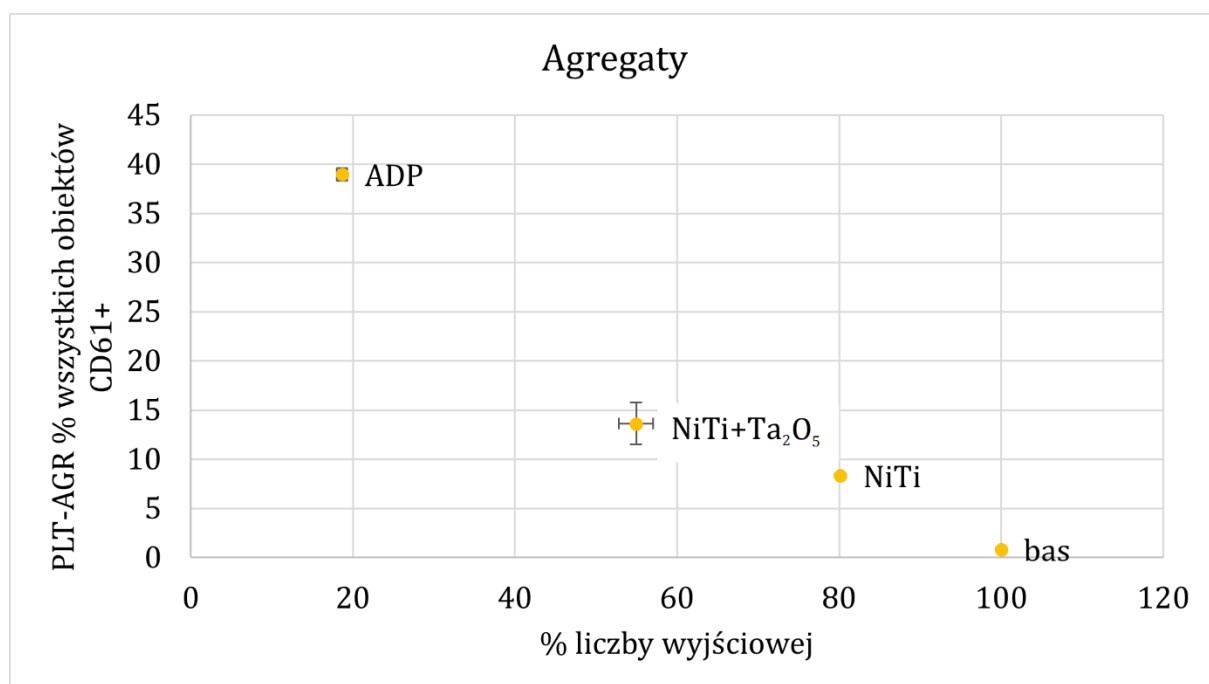
Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono na poniższych wykresach. W przypadku analizy aktywacyjnej selektyny-P (Rys. 49), powłoka Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> miała niewielki wpływ na procesy aktywacji, bez zużywania płytek krwi, które w niej pozostały. Z kolei drugi analizowany receptor PAC-1 (Rys. 50) został zaktywowany nieco silniej. Powłoka poprawiła również agregację płytek krwi w porównaniu do podłoża (Rys. 51). ADP to kontrola pozytywna, bas to kontrola negatywna.



Rys. 49. Analiza aktywacji na podstawie receptora P-selektyny



Rys. 50. Analiza aktywacji na podstawie receptora PAC-1



Rys. 51. Agregacja płytek wywołana bezpośrednim kontaktem z badanym materiałem w warunkach wysokich sił ścinających

#### 5.4.5. Ocena oddziaływania na krwinki czerwone

Wyniki Indeksu Hemolitycznego (IH) badanych materiałów przedstawiono w Tab. 9. Obliczenia przeprowadzono zgodnie z wytycznymi normy ASTM F756-00 [143]. 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

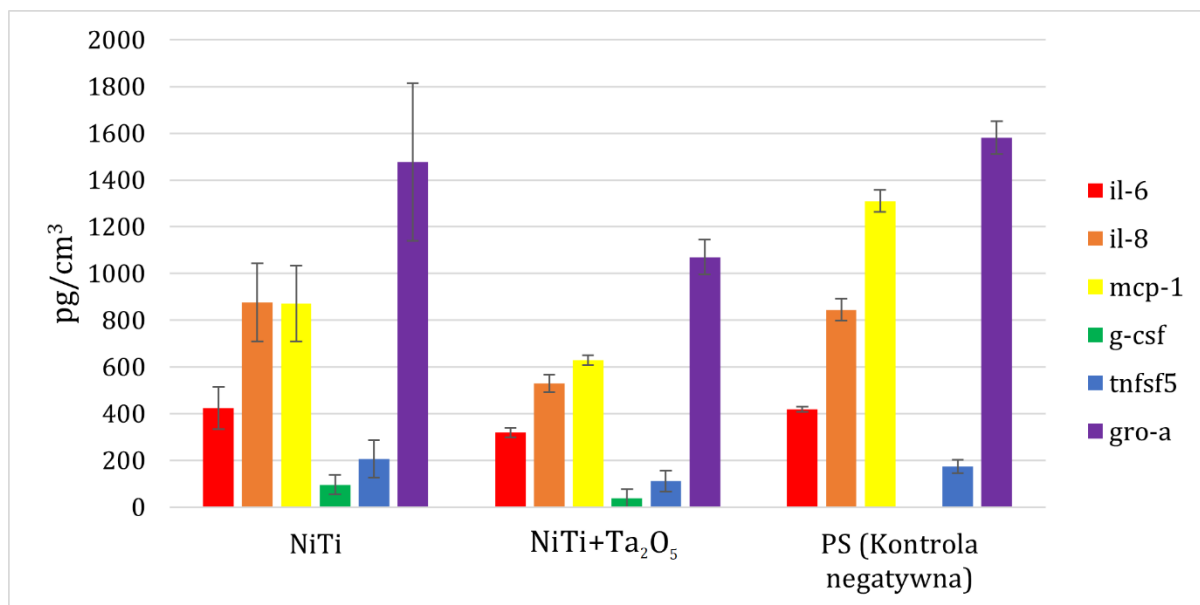
Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono zróżnicowane wartości Indeksu hemolitycznego. Stwierdzono obniżenie się wartości indeksu hemolizy dla próbek z powłoką Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> w porównaniu dla próbek w stanie wyjściowym. Uzyskane wartości IH dla badanych grup kształtowały się poniżej wartości 2%, co oznacza, że badane materiały można zakwalifikować jako niehemolizujące.

Tab. 9. Wyniki oceny oddziaływania materiału i powłoki na krwinki czerwone

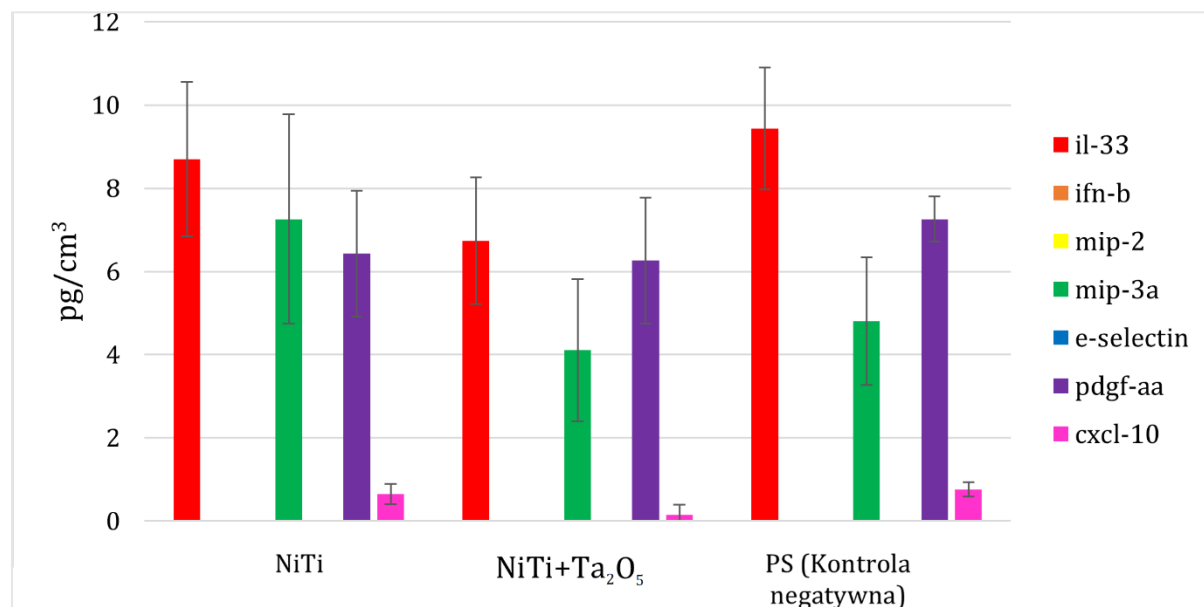
Material	Indeks hemolityczny	Hemoliza
NiTi	0,18	Niehemolizujący
NiTi + Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,12	Niehemolizujący

#### 5.4.6. Oznaczanie cytokin prozapalnych

Poziomy wszystkich badanych cytokin prozapalnych dla próbki z powłoką Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> były niższe niż w przypadku kontroli negatywnej oraz materiału bez powłoki (Rys. 52). W przypadku próbki referencyjnej NiTi zaobserwowano zróżnicowany wpływ materiału na poszczególne poziomy cytokin. Podwyższony poziom cytokin w badaniach *in vitro* jest predykatorem toksyczności ostrej. Naniesienie powłoki Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> spowodowało zmniejszenie poziomów wszystkich badanych cytokin prozapalnych w porównaniu do materiału wyjściowego, co jest zjawiskiem korzystnym.



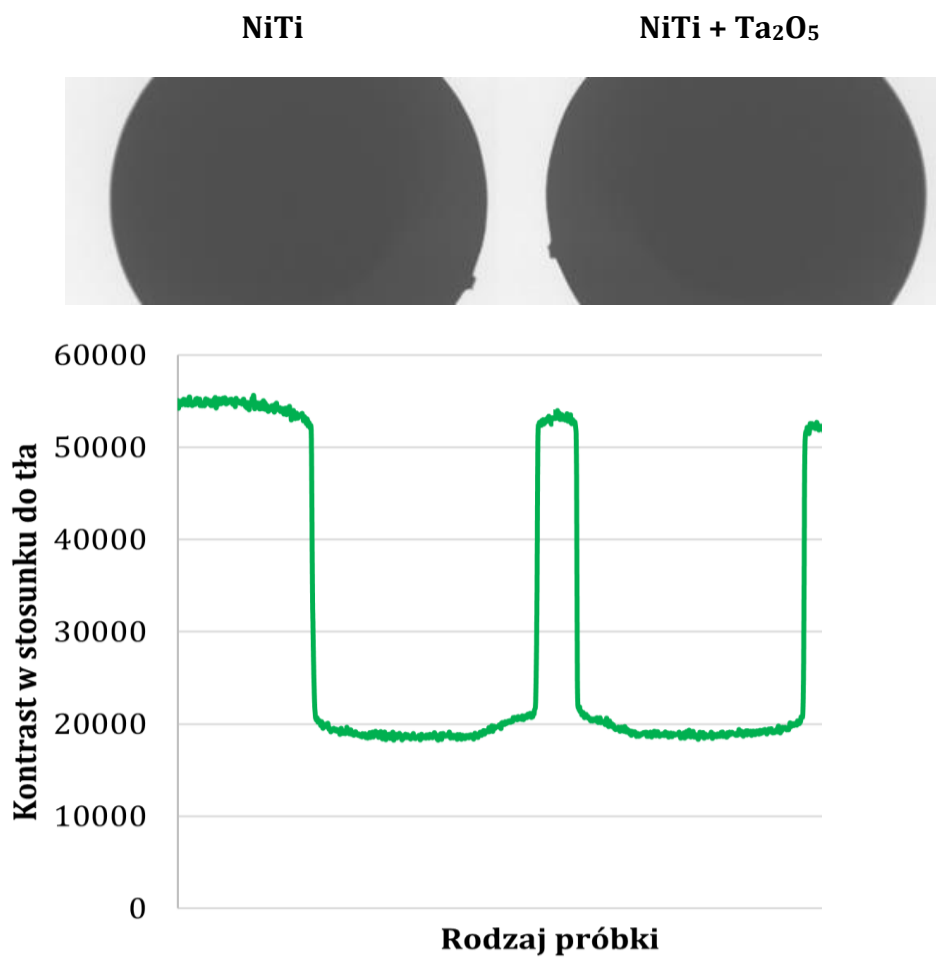
Rys. 52. Wykresy wartości cytokin prozapalnych dla badanych materiałów



Rys. 53. Wykresy wartości cytokin prozapalnych dla badanych materiałów

## 5.5. Widzialność fluoroskopowa

Wyniki widzialności fluoroskopowej przedstawiono jako zdjęcia z tomografu oraz wykres pokazujący kontrast próbki w stosunku do tła. Nie zarejestrowano widocznych różnic w kontraście w stosunku do tła po nałożeniu powłoki Rys. 54.



Rys. 54. Zdjęcia fluoroskopowe wybranych próbek wraz z wykresem kontrastu w stosunku do tła

## 6. Omówienie wyników

Najnowsze metody leczenia ubytków serca obejmują wszczepianie okludera podczas zabiegu małoinwazyjnego, nawet już u dzieci w wieku przedszkolnym. Urządzenia te zbudowane są z nitinolowej siateczki uformowanej najczęściej w kształt dwóch dysków, pomiędzy którymi umieszcza się materiał pełniący funkcję uszczelniającą. Dzięki swoim właściwościom pseudosprężystym, stop NiTi jest idealny do tego typu zastosowań, ponieważ odzyskuje wcześniej zaprogramowany kształt od razu po uwolnieniu implantu z systemu wprowadzającego. Mimo dobrej biokompatybilności, której zasługą jest cienka warstwa pasywna samoistnie tworząca się na powierzchni stopu, materiał ten nie jest pozbawiony wad. Część z nich wynika z właściwości samego materiału, a część z postaci konstrukcyjnej implantu. Potencjalnymi powikłaniami stosowania okluderów są: możliwość powstawania zakrzepów, niedostateczne lub nadmierne przerastanie tkanką, czy wywoływanie alergii przez uwalnianie jonów niklu do organizmu. Dodatkowo, nitinol jest słabo widzialny w świetle fluoroskopii, co może utrudniać prawidłowy przebieg zabiegów wykonywanych technikami małoinwazyjnymi. Dlatego, aby poprawić właściwości materiału, stosuje się różnego rodzaju modyfikacje powierzchni, takie jak na przykład nakładanie powłok. Wysoki potencjał do zastosowań biomedycznych wykazują powłoki na bazie tantalu. Potwierdzono ich potencjał w zakresie poprawy odporności na korozję i odpowiedzi komórkowych. Dotychczasowe badania potwierdzają ich cytokompatybilność oraz poprawę proliferacji, mineralizacji i ekspresji genów osteogenicznych.

Znanych jest wiele metod modyfikacji powierzchni stopów do zastosowań medycznych. W przypadku stopów NiTi najczęściej stosowane są: metoda zol-żel, osadzanie elektroforetyczne (EPD) lub elektrochemiczne, metody napyłania plazmowego, CVD, PVD, ALD, natryskiwanie termiczne lub plazmowe, rozpylanie jonowe lub magnetronowe, anodyzacja, osadzanie jarzeniowe, metody laserowe. Metody modyfikacji powierzchni powinny również cechować się prostotą, powtarzalnością i szybkością przeprowadzania procesu. Istotne są również aspekty ekonomiczne związane z zakupem i użytkowaniem, bardzo często kosztownej, aparatury. Większość z wymienionych technik wymaga również stosowania podwyższonej temperatury, co w przypadku stopu NiTi, może spowodować rozkład fazy macierzystej B2 na fazy



równowagowe, takie jak Ni<sub>3</sub>Ti i Ti<sub>2</sub>Ni lub nierównowagowe, nie biorące udziału w zjawiskach pamięci kształtu. Ich obecność może wpłynąć niekorzystnie na zjawisko pseudosprężystości w stopie. Dlatego w przypadku stopów NiTi na szczególną uwagę zasługują niskotemperaturowe metody modyfikacji powierzchni.

Do tej pory nie osiągnięto jednak w tej dziedzinie w pełni zadowalających efektów, co potwierdza niezbyt duża liczba publikacji wyczerpujących zagadnienie w literaturze światowej. Nie ma opracowań syntetyzujących kompleksowo zagadnienia fizykochemiczne oraz biologiczne dotyczące implantów w odniesieniu do specyfiki układu krwionośnego. Brakuje danych dotyczących struktury warstw powierzchniowych, adhezji do metalowego podłoża, poziomu stężenia jonów niklu przenikających z powierzchni do organizmu ludzkiego czy podatności powłoki do odkształceń, co uniemożliwia wielostronną ocenę wyników uzyskanych przez poszczególnych autorów. Wciąż nierozwiązanym problemem pozostaje kompletny zestaw badań biologicznych pokazujących pełną charakterystykę warstw powierzchniowych w warunkach długotrwałego kontaktu ze środowiskiem tkankowym. Wychodząc naprzeciw nierozwiązanym problemom, zaproponowano program badań, który może przyczynić się do rozwiązania wymienionych zagadnień (Rys. 28). Przedstawiony program badawczy obejmuje szereg badań umożliwiających syntetyczną ocenę własności zarówno fizykochemicznych, jak i biologicznych, dla materiału mogącego mieć zastosowanie w układzie sercowo-naczyniowym. Celem pracy było opracowanie warunków wytwarzania wielofunkcyjnej powłoki na bazie tantalu na powierzchni stopu NiTi o własnościach fizykochemicznych adekwatnych do specyfiki układu sercowo-naczyniowego.

W pracy jako materiał wyjściowy wykorzystano stop niklu i tytanu w trzech różnych postaciach, odpowiednich do wybranych metod badawczych. Ze względu na niewielkie rozmiary implantów do okluzji serca i w celu zapewnienia powtarzalności rezultatów, powierzchnię przygotowano stosując polerowanie elektrochemiczne. Dla poprawy własności fizykochemicznych nitinolu, a tym samym ograniczenia wykrzepiania i uwalniania jonów niklu, zaproponowano jej modyfikację przez naniesienie powłoki Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> metodą ALD. Ostatni etap przygotowania powierzchni obejmował sterylizację parową.

Pierwszym etapem przeprowadzonych badań było scharakteryzowanie naniesionej powłoki. Aby potwierdzić jej prawidłowy skład chemiczny, zastosowano

pomiary z wykorzystaniem XPS. Na podstawie uzyskanych wyników ogólny skład powierzchni (po wykluczeniu węgla) zgadzał się z założonym i wynosił 30,2% Ta i 69,8% O. Nie zarejestrowano ani pierwiastków Ni, ani Ti, co świadczy o całkowitym pokryciu stopu wybraną powłoką (Rys. 31). Dla osadzonej warstwy podczas analizy widm ramanowskich zarejestrowano drgania zginające i rozciągające wiązań O-Ta-O i Ta-O-Ta (Rys. 32). Analiza mikrostruktury przekroju próbki ujawniła występujące dwa obszary w powłoce. W pierwszym, od strony podłoża, zidentyfikowano pierwiastki tytanu oraz tantalu, a dodatkowo charakteryzował się on warstwowym ułożeniem struktur atomowych. Drugi obszar zawierał przede wszystkim tantal, a struktura została zidentyfikowana jako jednolita (Rys. 34). Taki układ dobrze obrazuje efekt zastosowanej metody nakładania powłoki, ponieważ z założenia proces ALD ma nabudowywać kolejne warstwy o grubościach jednoatomowych. Co więcej, brak obecności niklu w analizowanych obszarach dodatkowo potwierdza skuteczność zastosowania polerowania elektrochemicznego jako metodę pasywacji powierzchni – tworząc skuteczną warstwę pasywną. Ze względu na niewielką grubość analizowanej powłoki, do pomiaru jej grubości wykorzystano elipsometrię. Po porównaniu zmierzonych kątów elipsometrycznych i odpowiedzi pseudo-dielektrycznych z założonym modelem, określono grubość warstwy pasywnej na poziomie 2,7 nm, a powłoki Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> na poziomie 13,8 nm.

Przyczepność powłoki do podłoża jest kolejną istotną kwestią z punktu widzenia oceny potencjalnego zastosowania. Badania przeprowadzono metodą scratch-test. Odprysk powłoki zaobserwowano dopiero przy sile  $L_{c2} = 5,6$  N, a całkowite przerwanie jej ciągłości przy sile  $L_{c3} = 11,2$  N. Na podstawie oceny makroskopowej rysy stwierdzono nieciągłą perforację powłoki (Rys. 35). Tak wysokie wartości podanych parametrów świadczą o bardzo dobrej adhezji powłoki do podłoża [144]–[146]. Jest to zasługą wybranej metody naniesienia powłoki, ponieważ podczas procesu ALD kolejne cienkie warstwy przylegają równolegle do siebie na całej geometrii powierzchni, znacznie ograniczając możliwość powstawania lokalnych nieciągłości. W ramach oceny własności fizycznych wykazano również, że powłoka Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> poprawiła współczynnik tarcia powłoki w stosunku do materiału podłoża (Rys. 36).

Ważną funkcję w przypadku badań biologicznych, w tym adhezji bakterii do podłoża, cytotoksyczności, trombogenności, hemolizy pełnią własności fizyczne powierzchni, spośród których najistotniejsze są zwilżalność, topografia (morfologia)

powierzchni oraz swobodna energia powierzchniowa. Na podstawie uzyskanych wyników zwilżalności i energii powierzchniowej można stwierdzić, że powierzchnia próbek ze stopu NiTi, zarówno przed jak i po naniesieniu powłoki ma charakter hydrofilowy (Rys. 37, Rys. 38). Powłoka Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> wpłynęła na zmniejszenie się wartości kąta zwilżania zarówno wody, jak i diiodometanu oraz na zwiększenie energii powierzchniowej. Może to z jednej strony wpływać korzystnie na endotelizację, ale z drugiej zwiększać zdolność do tworzenia zakrzepów [147], [148]. Wyniki badań topografii powierzchni z wykorzystaniem zarówno mikroskopu sił atomowych AFM oraz elektronowego mikroskopu skaningowego SEM wykazały, że naniesienie powłoki spowodowało zmniejszenie parametru Ra (Tab. 3). Na zdjęciach AFM (Rys. 39) można zauważyć, że powłoka wykazywała podobną skondensowaną i zwartą mikrostrukturę, nawet jeśli chropowatość powierzchni była inna. Mimo że zazwyczaj proces ALD dobrze odwzorowuje powierzchnię, może obniżyć chropowatość ze względu na skłonność do wypełniania niewielkich ubytków i defektów [149]. We wszystkich przypadkach chropowatość powierzchni nie przekracza wartości zalecanej Ra = 160 nm dla implantów stosowanych w układzie sercowo-naczyniowym [150], [151].

Istotnym kryterium determinującym przydatność zaproponowanej modyfikacji powierzchni jest podatność powłoki do odkształceń, ze względu na technikę implantacyjną. Zmiana kształtu może mieć wpływ na odporność korozyjną, dlatego przeprowadzono badania potencjodynamiczne dla próbek o różnym stopniu odkształcenia. Niemal dwukrotnie wyższe wartości oporu polaryzacyjnego wskazują, że powłoka Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> poprawiła odporność na korozję badanego stopu NiTi, co świadczy o korzystnym obniżeniu aktywności powierzchni badanego biomateriału w środowisku korozyjnym. Ponadto, wraz ze wzrostem odkształcenia (0%-50%) zaobserwowano wzrost wartości oporu polaryzacyjnego, wykazując tym samym bezpieczne odkształcenie zmodyfikowanego stopu NiTi – Tab. 4 i Rys. 41. Zmierzone wartości parametrów korozji podłoża NiTi przed odkształceniem odpowiadały wynikom uzyskanym przez innych autorów [130], [152].

Kształt okluderów wiąże się ze zwiększonym ryzykiem pojawienia się korozji w szczelinach elementów implantu. Dlatego w dalszej kolejności przeprowadzono badania odporności na korozję szczelinową metodą potencjostatyczną. Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzono, że materiał w stanie wyjściowym po procesie polerowania elektrochemicznego NiTi nie jest odporny na ten rodzaj korozji. Z kolei

uzyskane wyniki dla próbek z naniesioną powłoką Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> potwierdziły odporność na korozję szczelinową (Tab. 5, Rys. 42).

Umieszczenie implantu wykonanego ze stopu NiTi w organizmie niezmiennie wiąże się z ryzykiem wystąpienia odczynów alergicznych wywołanych uwalnianiem jonów niklu. Dlatego wykonano analizę spektrometryczną próbek zanurzonych przez 28 dni w roztworze PBS. Wyniki wykazały, że zastosowana powłoka ograniczyła przenikanie zarówno jonów niklu, jak i tytanu do badanego roztworu (Tab. 6). Z powłoki uwolniły się również jony tantalu, które są jednak nieszkodliwe dla organizmu człowieka [153], a dodatkowo w ilości wielokrotnie mniejszej.

Badania biologiczne rozpoczęto od oceny adhezji bakterii *S. Aureus* do podłoża. Niebezpieczeństwo choroby wywołanej przez *S. aureus* jest potęgowane przez powszechne występowanie na całym świecie wielu szczepów opornych na antybiotyki, takich jak *S. aureus* oporny na metycylinę i wankomycynę (odpowiednio MRSA i VRSA), co jest zjawiskiem bezpośrednio przypisywanym długotrwałemu stosowaniu antybiotyków. Po przedostaniu się do krwiobiegu może wywołać miejscowe zakażenie, takie jak infekcyjne zapalenie wsierdza lub uogólnione zakażenie, takie jak posocznica [154], [155]. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że całkowita liczba kolonii bakteryjnych zadherowanych do podłoża nieznacznie zmniejszyła się po nałożeniu powłoki Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (Tab. 7). Największy wpływ na ograniczenie adhezji bakterii ma obniżenie chropowatości powierzchni [156]. W dalszej kolejności przeprowadzono badania cytotoksyczności. Analizując zdjęcia z mikroskopii konfokalnej można zauważyć nieznacznie mniejszą ilość komórek o aktywnych mitochondriach oraz nieznacznie większą ilość komórek nekrotycznych na podłożu NiTi (Rys. 43). Stopień toksyczności określono jako 0, brak działania cytotoksycznego zarówno dla materiału referencyjnego, jak i z powłoką. Zgodnie z zapisami normy ISO 10993 [137] dotyczącej biologicznej oceny wyrobów medycznych, zmniejszenie żywotności komórek o ponad 30% uważa się za efekt cytotoksyczny. Na podstawie przeprowadzonych badań cytotoksyczności widoczna jest przeżywalność komórkowa na poziomie 97-99% dla wszystkich próbek, zarówno bez, jak i z powłoką (Rys. 44). Przeżywalność określona jako stosunek żywych komórek do wszystkich komórek na próbce przekracza 70%, co wskazuje na brak działania cytotoksycznego (Rys. 45, Rys. 46). Dla badanych materiałów wszystkie wartości LDH znajdują się w tym samym zakresie co wartości LDH dla materiału

kontrolnego. Ani nitinol, ani powłoka  $Ta_2O_5$ , naniesiona w opisanych warunkach, nie wykazują działania cytotoksycznego (Rys. 47).

Okludery po umieszczeniu w organizmie powinny zostać obrośnięte tkanką, a materiał z jakiego są wykonane nie powinien zakłócać tego procesu. Wyniki przeprowadzonych badań proliferacji komórek wykazały typowy prawidłowy wygląd fibroblastów z wrzecionowatym, wydłużonym kształtem (Rys. 48). W przypadku powłoki można zauważyć większe zróżnicowanie cytoszkieletu oraz zróżnicowaną gęstość i długość filamentów aktynowych. Widoczne są również miejsca o zwiększonym zagęszczeniu jąder komórkowych, co potwierdza korzystny wpływ powłoki na badane właściwości. Porównywalny efekt osiągnięto między innymi dla powłoki TiN [147].

Dużym zagrożeniem w przypadku implantów stosowanych w układzie krwionośnym jest ryzyko powstawania zakrzepów, mogących prowadzić nawet do śmierci pacjenta. Przeprowadzone badania nie wykazały własności trombogennych w odniesieniu do aktywacji i agregacji płytek krwi (Rys. 49, Rys. 50, Rys. 51). Dodatkowo, na podstawie przeprowadzonych badań, stwierdzono również zróżnicowane wartości Indeksu hemolitycznego. Zaobserwowano również obniżenie się wartości indeksu hemolizy dla próbek z powłoką  $Ta_2O_5$  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 (Tab. 9). Cytokiny prozapalne odgrywają kluczową rolę w koordynowaniu komórkowej odpowiedzi immunologicznej i w modulowaniu układu odpornościowego. Poziomy wszystkich badanych cytokin prozapalnych dla próbki z powłoką  $Ta_2O_5$  były niższe niż w przypadku kontroli negatywnej oraz materiału bez powłoki, co jest zjawiskiem korzystnym, gdyż regulują one wzrost, aktywację komórek, różnicowanie i zasiedlanie komórek odpornościowych do miejsc infekcji w celu kontrolowania i eliminowania patogenów wewnątrzkomórkowych (Rys. 52 i Rys. 53). Adhezja i aktywacja płytek krwi na powierzchni biomateriałów, które zostały powiązane z powstawaniem trombogenności, są najważniejszymi cechami określającymi hemokompatybilność [157]. Porównując uzyskane wyniki z publikacjami, kompozytowa nanowarstwa  $TiO_2/Ta_2O_5$  utworzona na stopie NiTi z pamięcią kształtu poprzez implantację Ta również osłabiła adhezję i aktywację płytek krwi, a szybkość hemolizy zmniejszyła się o co najmniej 46% ze względu na zmniejszoną energię powierzchniową i lepszą odporność na korozję. Nie zbadano jednak wpływu powłoki na indeks

hemolityczny ani nie przeprowadzono oznaczenia ilości cytokin prozapalnych. Obniżenie energii powierzchniowej poprawiło hemokompatybilność materiału [158], co potwierdzają wyniki uzyskane dla wariantu z nałożoną powłoką Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Ze względu na to, że okludery są umieszczane w ciele pacjenta z wykorzystaniem technik małoinwazyjnych, przeprowadzono badania widzialności fluoroskopowej z wykorzystaniem aparatu rentgenograficznego. Na podstawie obserwacji nie stwierdzono zmiany wartości współczynnika pochłaniania pomiędzy próbkami z powłoką NiTi+Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, jak i bez powłoki NiTi (Rys. 54). Świadczy to najprawdopodobniej o niewystarczającej grubości wytworzonej powłoki, ponieważ poprawę widzialności fluoroskopowej zaobserwowano dla powłok na bazie tantalu o grubości 200 μm [159].

Reasumując, przeprowadzone badania potwierdziły słuszność przyjętej tezy. Możliwe jest wytworzenie wielofunkcyjnej powłoki na bazie tantalu metodą osadzania warstw atomowych na podłożu ze stopu NiTi o własnościach fizykochemicznych adekwatnych do specyfiki układu sercowo-naczyniowego, zapewniających ograniczenie uwalniania jonów Ni oraz tworzenia się zakrzepów. Na podstawie wyników przeprowadzonych badań można stwierdzić, że analizowana powłoka Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, naniesiona na stop NiTi w opisanych warunkach, stanowi obiecujący kierunek do poprawy własności implantów stosowanych w układzie krwionośnym. Uzyskano zadowalające rezultaty w zakresie poprawy odporności na korozję czy ograniczenia uwalniania jonów niklu do środowiska symulującego płyny fizjologiczne. Wyniki badań biologicznych wskazują na przydatność powłoki tlenku tantalu w zakresie ograniczania adhezji bakterii, cytotoksyczności czy poprawy proliferacji komórek. Zarówno materiał podłoża, jak i powłoka, mają porównywalny charakter niehemolizujący, a powłoka nieco obniżyła ilość oddziaływujących z nią cytokin prozapalnych w porównaniu do podłoża i analizy kontrolnej. Niestety powłoka jest zbyt cienka, żeby mogła znacząco wpłynąć na poprawę widzialności fluoroskopowej. Uzyskane wyniki z przeprowadzonych badań wskazują na potrzebę rozwiązania następujących zagadnień:

- wytworzenie powłoki o większej grubości przy jednoczesnym zachowaniu podatności do odkształceń w celu poprawy widzialności fluoroskopowej,
- wytworzenie powłoki na implantach oraz ich ocenę w warunkach klinicznych,
- przeprowadzenie badań ilościowych dotyczących proliferacji komórek.

## 7. Wnioski

1. Zaproponowane warunki procesu nanoszenia z wykorzystaniem metody ALD pozwoliły na uzyskanie powłoki Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> o bardzo dobrej adhezji do podłoża, co przełożyło się na jej podatność do odkształceń. Wraz ze wzrostem odkształcenia (aż do 50%) zaobserwowano wzrost wartości oporu polaryzacyjnego podczas badań potencjodynamicznych.
2. Wytworzona powłoka Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> stanowiła skuteczną barierę przed oddziaływaniem środowiska zewnętrznego, czego dowodem jest ograniczenie ilości jonów Ni przenikających do roztworu PBS. Właściwości barierowe zostały również potwierdzone w badaniach potencjostatycznych i potencjodynamicznych – nastąpiła poprawa odporności na korozję wżerową i szczelinową.
3. Powłoka Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> poprawiła zwilżalność powierzchni w stosunku do podłoża, a jej charakter pozostał hydrofilowy. Przełożyło się to na korzystniejsze wyniki badań proliferacji, gdzie powłoka zintensyfikowała różnicowanie i wzrost komórek.
4. Wytworzona powłoka Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, w porównaniu do podłoża, ograniczyła adhezję bakterii, miała niewielki wpływ na procesy aktywacji płytek krwi oraz wykazuje działanie niehemolizujące i przeciwzapalne, co zostało potwierdzone podczas badań biologicznych.
5. Na zmodyfikowanej powierzchni znajdują się jedynie pierwiastki tantalum i tlenu, bez niklu i tytanu z podłoża, dlatego wytworzona powłoka Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> charakteryzuje się dobrą biokompatybilnością i nie wywołuje działania cytotoksycznego.

Podsumowując, potwierdzono tezę pracy, możliwe jest wytworzenie wielofunkcyjnej powłoki na bazie tantalum metodą osadzania warstw atomowych na podłożu ze stopu NiTi o własnościach fizykochemicznych adekwatnych do specyfiki układu sercowo-naczyniowego, zapewniających ograniczenie uwalnianie jonów Ni oraz tworzenia się zakrzepów.

## IV. BIBLIOGRAFIA

---

- [1] H. Kidokoro, S. Yonei-Tamura, K. Tamura, G. C. Schoenwolf, and Y. Saijoh, "The heart tube forms and elongates through dynamic cell rearrangement coordinated with foregut extension," *Development (Cambridge)*, vol. 145, no. 7, Apr. 2018, doi: 10.1242/DEV.152488/VIDEO-7.
- [2] M. Kanani *et al.*, "Development of the atrioventricular valves: clinicomorphological correlations," *Annals of Thoracic Surgery*, vol. 79, no. 5, pp. 1797–1804, Jan. 2005, doi: 10.1016/J.ATHORACSUR.2004.06.122.
- [3] H. Lie-Venema *et al.*, "Origin, fate, and function of epicardium-derived cells (EPDCs) in normal and abnormal cardiac development," *hindawi.com*, vol. 7, pp. 1777–1798, 2007, doi: 10.1100/tsw.2007.294.
- [4] "19.5 Development of the Heart - Anatomy and Physiology | OpenStax." <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/19-5-development-of-the-heart> (dostęp z dnia 02.02.2023).
- [5] A. Koleśnik and C. S. Niszczota, "Embriogeneza i anatomia wad lewej części serca," *Pediatr Pol*, vol. 87, no. 6, pp. 589–603, Nov. 2012, doi: 10.1016/j.pepo.2012.09.010.
- [6] J. Yanni, M. Boyett, R. Anderson, H. D.-H. Rhythm, and undefined 2009, "The extent of the specialized atrioventricular ring tissues," *Elsevier*, dostęp z dnia 29.01.2023. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1547527109000794>
- [7] D. Kornas-Biela, "Okres prenatalny," 2011, dostęp z dnia 02.02.2023. <https://repozytorium.kul.pl/handle/20.500.12153/3931>
- [8] D. Sedmera, T. Pexieder, M. Vuillemin, R. P. Thompson, and R. H. Anderson, "Developmental Patterning of the Myocardium," *Anat Rec*, vol. 258, pp. 319–337, 2000, doi: 10.1002/(SICI)1097-0185(20000401)258:4.
- [9] D. Sedmera and T. McQuinn, "Embryogenesis of the Heart Muscle," *Heart Fail Clin*, vol. 4, no. 3, pp. 235–245, Jul. 2008, doi: 10.1016/J.HFC.2008.02.007.
- [10] A. Wenink, A. G. G.-C. in the Young, and undefined 2005, "Pathogenesis of congenital cardiac malformations and mechanisms of cardiac remodelling," *cambridge.org*, dostęp z dnia 29.01.2023. <https://www.cambridge.org/core/journals/cardiology-in-the->



- young/article/pathogenesis-of-congenital-cardiac-malformations-and-mechanisms-of-cardiac-remodelling/208ADBBC33A52F74AF18017DE00B17A6
- [11] A. Ratajska, A. Kołodzińska, B. M. Cizek, and A. Wasiutyński, "Współzależności między wadami wrodzonymi serca a jego rozwojem w świetle współczesnych badań naukowych," *Kardiologia Polska*, vol. 68, no. (supl. 5), 2010, dostęp z dnia 02.02.2023. [www.kardiologiapolska.pl](http://www.kardiologiapolska.pl)
- [12] C. Sebastian Niszczota and A. Koleśnik, "Rozwój i morfologia kliniczna prawidłowego serca płodu i dziecka. Sekwencyjna analiza segmentalna serca z wadą wrodzoną," *Pediatr Pol*, vol. 87, no. 1, pp. 78–90, Jan. 2012, doi: 10.1016/S0031-3939(12)70598-X.
- [13] J. A. Epstein, "Cardiac Development and Implications for Heart Disease," *New England Journal of Medicine*, vol. 363, no. 17, pp. 1638–1647, Oct. 2010, doi: 10.1056/NEJMRA1003941/SUPPL\_FILE/NEJMRA1003941\_DISCLOSURES.PDF.
- [14] S. M, G. M, K. A, and H. J, "Basic axes of human heart in correlation with heart mass and right ventricular wall thickness," *Folia Morphol (Warsz)*, vol. 65, no. 4, pp. 385–389, 2006, dostęp z dnia 06.02.2023. [https://journals.viamedica.pl/fovia\\_morphologica/article/view/16073](https://journals.viamedica.pl/fovia_morphologica/article/view/16073)
- [15] N. Al-Sakini, "Anatomy of the heart," *Medicine*, vol. 50, no. 6, pp. 317–321, Jun. 2022, doi: 10.1016/J.MPMED.2022.03.014.
- [16] R. Anderson, E. Baker, A. Redington, and M. Rigby, "Paediatric cardiology," 2009, dostęp z dnia 29.01.2023. [https://books.google.com/books?hl=pl&lr=&id=i9ZegL14S-4C&oi=fnd&pg=PP1&dq=Anderson+RH,+Baker+EJ,+Penny+DJ,+Redington+AN,+Rigby+ML,+Wernovsky+G.+Paediatric+cardiology.+Philadelphia:+Churchill+Livingstone%3B+2010&ots=FoEo9a30vZ&sig=zJSmU-WYM6kxAU6F5\\_Fq7QQX2Ak](https://books.google.com/books?hl=pl&lr=&id=i9ZegL14S-4C&oi=fnd&pg=PP1&dq=Anderson+RH,+Baker+EJ,+Penny+DJ,+Redington+AN,+Rigby+ML,+Wernovsky+G.+Paediatric+cardiology.+Philadelphia:+Churchill+Livingstone%3B+2010&ots=FoEo9a30vZ&sig=zJSmU-WYM6kxAU6F5_Fq7QQX2Ak)
- [17] G. D. Buckberg, N. C. Nanda, C. Nguyen, and M. J. Kocica, "What Is the Heart? Anatomy, Function, Pathophysiology, and Misconceptions," *Journal of Cardiovascular Development and Disease 2018, Vol. 5, Page 33*, vol. 5, no. 2, p. 33, Jun. 2018, doi: 10.3390/JCDD5020033.
- [18] "Budowa i praca serca - Powtórka z biologii." <https://powtorkazbiologii.pl/budowa-i-praca-serca/> (dostęp z dnia 25.01.2023).

- [19] "19.1 Heart Anatomy - Anatomy and Physiology | OpenStax." <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/19-1-heart-anatomy> (dostęp z dnia 06.02.2023).
- [20] R. R. Sun, M. Liu, L. Lu, Y. Zheng, and P. Zhang, "Congenital Heart Disease: Causes, Diagnosis, Symptoms, and Treatments," *Cell Biochem Biophys*, vol. 72, no. 3, pp. 857–860, Jul. 2015, doi: 10.1007/S12013-015-0551-6/METRICS.
- [21] S. Stefanovic, P. Barnett, K. van Duijvenboden, D. Weber, M. Gessler, and V. M. Christoffels, "GATA-dependent regulatory switches establish atrioventricular canal specificity during heart development," *Nature Communications* 2014 5:1, vol. 5, no. 1, pp. 1–11, Apr. 2014, doi: 10.1038/ncomms4680.
- [22] M. D. Reller, M. J. Strickland, T. Riehle-Colarusso, W. T. Mahle, and A. Correa, "Prevalence of Congenital Heart Defects in Metropolitan Atlanta, 1998-2005," *J Pediatr*, vol. 153, no. 6, pp. 807–813, Dec. 2008, doi: 10.1016/j.jpeds.2008.05.059.
- [23] A. C. Fahed, B. D. Gelb, J. G. Seidman, and C. E. Seidman, "Genetics of congenital heart disease: The glass half empty," *Circ Res*, vol. 112, no. 4, pp. 707–720, Feb. 2013, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.300853/FORMAT/EPUB.
- [24] L. Botto, A. Correa, J. E.- Pediatrics, and undefined 2001, "Racial and temporal variations in the prevalence of heart defects," *publications.aap.org*, dostęp z dnia 14.01.2023. <https://publications.aap.org/pediatrics/article-abstract/107/3/e32/66016>
- [25] T. L. Sander, D. B. Klinkner, A. Tomita-Mitchell, and M. E. Mitchell, "Molecular and cellular basis of congenital heart disease," *Pediatr Clin North Am*, vol. 53, no. 5, pp. 989–1009, 2006, doi: 10.1016/J.PCL.2006.08.010.
- [26] M. E. Pierpont *et al.*, "Genetic basis for congenital heart defects: Current knowledge - A scientific statement from the American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young," *Circulation*, vol. 115, no. 23, pp. 3015–3038, Jun. 2007, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.183056.
- [27] K. Dolbec and N. W. Mick, "Congenital Heart Disease," *Emerg Med Clin North Am*, vol. 29, no. 4, pp. 811–827, Nov. 2011, doi: 10.1016/J.EMC.2011.08.005.
- [28] W. Dakkak and T. I. Oliver, "Ventricular Septal Defect," *Case Studies in Pediatric Anesthesia*, pp. 282–285, May 2022, doi: 10.1017/9781108668736.063.

- [29] C. T. Mai *et al.*, “National population-based estimates for major birth defects, 2010–2014,” *Birth Defects Res*, vol. 111, no. 18, pp. 1420–1435, Nov. 2019, doi: 10.1002/BDR2.1589.
- [30] P. G. Kopf and M. K. Walker, “Overview of developmental heart defects by dioxins, PCBs, and pesticides,” *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, vol. 27, no. 4, pp. 276–285, Oct. 2009, doi: 10.1080/10590500903310195.
- [31] H. Zhu, S. Kartiko, R. F.-C. genetics, and undefined 2009, “Importance of gene–environment interactions in the etiology of selected birth defects,” *Wiley Online Library*, vol. 75, no. 5, pp. 409–423, 2009, doi: 10.1111/j.1399-0004.2009.01174.x.
- [32] D. H. Watts *et al.*, “Birth defects among a cohort of infants born to HIV-infected women on antiretroviral medication,” *J Perinat Med*, vol. 39, no. 2, pp. 163–170, Mar. 2011, doi: 10.1515/JPM.2010.139/HTML.
- [33] P. Dewan and P. Gupta, “Burden of congenital rubella syndrome (CRS) in India: A systematic review,” *Indian Pediatr*, vol. 49, no. 5, pp. 377–399, May 2012, doi: 10.1007/S13312-012-0087-4.
- [34] N. Madsen, S. Schwartz, ... M. L.-C. heart, and undefined 2013, “Prepregnancy body mass index and congenital heart defects among offspring: a population-based study,” *Wiley Online Library*, vol. 8, no. 2, pp. 131–141, Mar. 2012, doi: 10.1111/j.1747-0803.2012.00714.x.
- [35] C. Wren, G. Birrell, G. H.- Heart, and undefined 2003, “Cardiovascular malformations in infants of diabetic mothers,” *heart.bmj.com*, dostęp z dnia 14.01.2023. <https://heart.bmj.com/content/89/10/1217.short>
- [36] H. Smedts, E. van Uitert, O. V.- Nutrition, undefined Metabolism, and undefined 2012, “A derangement of the maternal lipid profile is associated with an elevated risk of congenital heart disease in the offspring,” *Elsevier*, dostęp z dnia 14.01.2023. [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939475310001900?casa\\_token=yaw98XKajJMAAAAA:HzpuX-gzo5xeo50v8KrxY072sUag5fh\\_gqV57lipb9o63da02Y-yxdqvaE0f8-vRPP90UwfyDg](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939475310001900?casa_token=yaw98XKajJMAAAAA:HzpuX-gzo5xeo50v8KrxY072sUag5fh_gqV57lipb9o63da02Y-yxdqvaE0f8-vRPP90UwfyDg)
- [37] M. S. Minette and D. J. Sahn, “Ventricular Septal Defects,” *Circulation*, vol. 114, no. 20, pp. 2190–2197, Nov. 2006, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.618124.

- [38] “Centers for Disease Control and Prevention, National Center on Birth Defects and Developmental Disabilities.” <https://www.cdc.gov/ncbddd/heartdefects/ventricularseptaldefect.html> (dostęp z dnia 13.01.2023).
- [39] J. P. Jacobs, R. P. Burke, J. A. Quintessenza, and C. Mavroudis, “Congenital Heart Surgery Nomenclature and Database Project: ventricular septal defect,” *Ann Thorac Surg*, vol. 69, no. 4 Suppl, 2000, doi: 10.1016/S0003-4975(99)01270-9.
- [40] D. J. Penny and G. W. Vick, “Ventricular septal defect,” *The Lancet*, vol. 377, no. 9771, pp. 1103–1112, Mar. 2011, doi: 10.1016/S0140-6736(10)61339-6.
- [41] D. E. Spicer, H. H. Hsu, J. Co-Vu, R. H. Anderson, and F. J. Fricker, “Ventricular septal defect,” *Orphanet J Rare Dis*, vol. 9, no. 1, p. 144, Dec. 2014, doi: 10.1186/S13023-014-0144-2/FIGURES/18.
- [42] F. Cardiol *et al.*, “Częstość występowania ubytków przegrody międzykomorowej oraz ich samoistnego zamykania się u dzieci,” *Folia Cardiol*, vol. 10, no. 6, pp. 785–790, 2003, dostęp z dnia 15.01.2023. [https://journals.viamedica.pl/fovia\\_cardiologica/article/view/24418](https://journals.viamedica.pl/fovia_cardiologica/article/view/24418)
- [43] A. Mehta, S. Goenka, ... B. C.-... M. J. of, and undefined 2000, “Natural history of isolated ventricular septal defect in the first five years of life,” *europemc.org*, dostęp z dnia 15.01.2023. <https://europemc.org/article/med/10754804>
- [44] Oliver. Leach, G. I. (Gijsbert I. van Boxel, and R. Parker, “General medicine,” p. 457, 2013, dostęp z dnia 14.01.2023. [https://books.google.com/books/about/General\\_Medicine.html?hl=pl&id=dK\\_MlAEACAAJ](https://books.google.com/books/about/General_Medicine.html?hl=pl&id=dK_MlAEACAAJ)
- [45] T. Geva, J. D. Martins, and R. M. Wald, “Atrial septal defects,” *The Lancet*, vol. 383, no. 9932, pp. 1921–1932, May 2014, doi: 10.1016/S0140-6736(13)62145-5.
- [46] E. A. Bradley and A. N. Zaidi, “Atrial Septal Defect,” *Cardiol Clin*, vol. 38, no. 3, pp. 317–324, Aug. 2020, doi: 10.1016/J.CCL.2020.04.001.
- [47] “Ubytek przegrody międzyprzedsionkowej.” <https://www.sercedziecka.org.pl/wady-serca/ubytek-przegrody-miedzyprzedsionkowej-33/> (dostęp z dnia 08.01.2023).
- [48] E. Garne, “Atrial and ventricular septal defects - epidemiology and spontaneous closure,” *J Matern Fetal Neonatal Med*, vol. 19, no. 5, pp. 271–276, May 2006, doi: 10.1080/14767050500433817.

- [49] M. Behjati-Ardakani, M. Golshan, S. Akhavan-Karbasi, S. M. Hosseini, M. A. Behjati-Ardakani, and M. Sarebanhassanabad, "The Clinical Course of Patients With Atrial Septal Defects," *Iran J Pediatr*, vol. 26, no. 4, p. 4649, Aug. 2016, doi: 10.5812/IJP.4649.
- [50] S. Iwańczyk, A. Araszkievicz, M. Grygier, and K. Kardiologii, "Przetrwwały otwór owalny, a kryptogeny udar mózgu i migrenowe bóle głowy—czy najnowsze wyniki badania RESPECT otworzą nam drzwi do szerszego stosowania," *journals.viamedica.pl*, p. 23, dostęp z dnia 04.06.2023. [https://journals.viamedica.pl/kardiologia\\_inwazyjna/article/view/48418](https://journals.viamedica.pl/kardiologia_inwazyjna/article/view/48418)
- [51] A. J. Torres, "Hemodynamic assessment of atrial septal defects," *J Thorac Dis*, vol. 10, no. Suppl 24, p. S2882, Sep. 2018, doi: 10.21037/JTD.2018.02.17.
- [52] S. E. Parker *et al.*, "Updated national birth prevalence estimates for selected birth defects in the United States, 2004–2006," *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, vol. 88, no. 12, pp. 1008–1016, Dec. 2010, doi: 10.1002/BDRA.20735.
- [53] N. Dahan *et al.*, "Dynamic Autologous Reendothelialization of Small-Caliber Arterial Extracellular Matrix: A Preclinical Large Animal Study," *Tissue Eng Part A*, vol. 23, no. 1–2, pp. 69–79, Jan. 2017, doi: 10.1089/TEN.TEA.2016.0126.
- [54] R. F. Padera and F. J. Schoen, "Cardiovascular Medical Devices: Heart Valves, Pacemakers and Defibrillators, Mechanical Circulatory Support, and Other Intracardiac Devices," *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, pp. 999–1032, Jan. 2020, doi: 10.1016/B978-0-12-816137-1.00067-2.
- [55] "Amplatzer Talisman PFO Occluder | PFO Closure Device." <https://www.cardiovascular.abbott/us/en/hcp/products/structural-heart/structural-interventions/amplatzer-talisman.html> (dostęp z dnia 27.06.2023).
- [56] "hjertekateterisering – Store medisinske leksikon." <https://sml.sn.no/hjertekateterisering> (dostęp z dnia 25.06.2023).
- [57] N. Y. N. D. Kouakou, J. Song, J. Huh, and I. S. Kang, "The experience of transcatheter closure of postoperative ventricular septal defect after total correction," *J Cardiothorac Surg*, vol. 14, no. 1, Jun. 2019, doi: 10.1186/S13019-019-0933-8.
- [58] M. C. Yang and J. R. Wu, "Recent review of transcatheter closure of atrial septal defect," *Kaohsiung J Med Sci*, vol. 34, no. 7, pp. 363–369, Jul. 2018, doi: 10.1016/J.KJMS.2018.05.001.

- [59] M. A. Kotowycz *et al.*, “Long-Term Outcomes After Surgical Versus Transcatheter Closure of Atrial Septal Defects in Adults,” *JACC Cardiovasc Interv*, vol. 6, no. 5, pp. 497–503, May 2013, doi: 10.1016/J.JCIN.2012.12.126.
- [60] H. Baumgartner *et al.*, “2020 ESC Guidelines for the management of adult congenital heart disease The Task Force for the management of adult congenital heart disease of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Adult Congenital Heart Disease (ISACHD),” *Eur Heart J*, vol. 42, no. 6, pp. 563–645, Feb. 2021, doi: 10.1093/EURHEARTJ/EHAA554.
- [61] med Tomasz Zapolski, K. Klinka Kardiologii, T. Zapolski, A. Haratym-Zwolak, and A. Wysokiński, “Współczesne zasady diagnostyki zapalenia mięśnia sercowego i kardiomiopatii pozapalnej,” *Folia Cardiol*, vol. 10, no. 4, pp. 259–267, Aug. 2015, doi: 10.5603/FC.2015.0047.
- [62] “Critical Care of Children with Heart Disease,” *Critical Care of Children with Heart Disease*, 2020, doi: 10.1007/978-3-030-21870-6.
- [63] L. H. Lund *et al.*, “The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-fourth Adult Heart Transplantation Report-2017; Focus Theme: Allograft ischemic time,” *J Heart Lung Transplant*, vol. 36, no. 10, pp. 1037–1046, Oct. 2017, doi: 10.1016/J.HEALUN.2017.07.019.
- [64] J. L. Saver *et al.*, “Long-Term Outcomes of Patent Foramen Ovale Closure or Medical Therapy after Stroke,” *New England Journal of Medicine*, vol. 377, no. 11, pp. 1022–1032, Sep. 2017, doi: 10.1056/NEJMOA1610057/SUPPL\_FILE/NEJMOA1610057\_DISCLOSURES.PDF.
- [65] M. Grygier, A. A.-K. Inwazyjna, and undefined 2017, “Przegląd systemów do zamykania przetrwałego otworu owalnego najczęściej używanych w Polsce,” *journals.viamedica.pl*.
- [66] A. Araszkievicz, S. Sławek, O. Trojnarska, M. Lesiak, and M. Grygier, “Interventional closure of patent foramen ovale with Nit-occlud® device in prevention of recurrent neurologic events—Long-term results,” *Catheterization and Cardiovascular Interventions*, vol. 92, no. 1, pp. 159–164, Jul. 2018, doi: 10.1002/CCD.27386.

- [67] “Amplatzer Septal Occluders for ASD Closure | Abbott.” <https://www.cardiovascular.abbott/us/en/hcp/products/structural-heart/structural-interventions/amplatzer-septal.html> (dostęp z dnia 22.02.2022).
- [68] “Nit-Occlud® PFO: Productcatalogue | pfm medical ag.” [https://www.pfmmedical.com/productcatalogue/occluder/nit\\_occludr\\_pfo/index.html#downloads](https://www.pfmmedical.com/productcatalogue/occluder/nit_occludr_pfo/index.html#downloads) (dostęp z dnia 22.02.2022).
- [69] D. Hildick-Smith *et al.*, “Occlutech percutaneous patent foramen ovale closure: Safety and efficacy registry (OPPOSE),” *Int J Cardiol*, vol. 245, pp. 99–104, Oct. 2017, doi: 10.1016/J.IJCARD.2017.07.058.
- [70] D. Trabattoni *et al.*, “AMPLATZER versus Figulla occluder for transcatheter patent foramen ovale closure,” *EuroIntervention*, vol. 12, no. 17, pp. 2092–2099, Apr. 2017, doi: 10.4244/EIJ-D-15-00499.
- [71] “PFO Occluder - Occlutech - Perfecting Performance.” <https://occlutech.com/pfo/> (dostęp z dnia 22.02.2022).
- [72] “CeraFlex™ PFO Occluder.” [http://www.lifetechmed.com/en/product/p1/ceraflex™\\_occluders/360.aspx](http://www.lifetechmed.com/en/product/p1/ceraflex™_occluders/360.aspx) (dostęp z dnia 22.02.2022).
- [73] “GORE® CARDIOFORM Septal Occluder | Gore Medical Europe.” <https://www.goremedical.com/eu/products/cardioform/septal-occluder> (dostęp z dnia 22.02.2022).
- [74] M. T. Knop *et al.*, “Transcatheter closure of atrial septal defects type 2 in children under three years of age,” *Kardiologia Polska (Polish Heart Journal)*, vol. 76, no. 8, pp. 1257–1262, Aug. 2018, doi: 10.5603/KP.A2018.0113.
- [75] Z. Jalal *et al.*, “Long-Term Outcomes After Percutaneous Closure of Ostium Secundum Atrial Septal Defect in the Young: A Nationwide Cohort Study,” *JACC Cardiovasc Interv*, vol. 11, no. 8, pp. 795–804, Apr. 2018, doi: 10.1016/J.JCIN.2018.01.262.
- [76] M. A. E. Abdelbasit, M. Alwi, G. Kandavello, M. Che Mood, H. Samion, and Z. M. Hijazi, “The new Occlutech® PDA occluder: Initial human experience,” *Catheterization and Cardiovascular Interventions*, vol. 86, no. 1, pp. 94–99, Jul. 2015, doi: 10.1002/CCD.25878.
- [77] S. O. Omid, Z. Goudarzi, L. M. Kangarshahi, A. Mokhtarzade, and F. Bahrami, “Self-expanding stents based on shape memory alloys and shape memory polymers,”

- Journal of Composites and Compounds*, vol. 2, no. 3, pp. 92–98, May 2020, doi: 10.29252/jcc.2.2.5.
- [78] S. Chandra Chavalla and D. Juhre, “Virtual simulation of deformation behavior of NiTi stents used in minimally invasive surgery,” *Proceedings of the 7th GACM Colloquium on Computational Mechanics for Young Scientists from Academia and Industry*, 2017.
- [79] D. Coronel-Meneses, C. Sánchez-Trasviña, I. Ratera, and K. Mayolo-Deloisa, “Strategies for surface coatings of implantable cardiac medical devices,” *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 11, no. May, p. 1173260, May 2023, doi: 10.3389/FBIOE.2023.1173260.
- [80] N. S. Murthy, V. B. Damodaran, S. H. Lee, A. S. Hwang, and H.-J. Sung, “Characterization of thin films for biomedical applications,” *Thin Film Coatings for Biomaterials and Biomedical Applications*, pp. 81–115, Jan. 2016, doi: 10.1016/B978-1-78242-453-6.00005-5.
- [81] “Peripheral stent - XOLO™ - InSitu Technologies - nitinol / self-expanding.” <https://www.medicaexpo.com/prod/insitu-technologies/product-90155-573459.html> (dostęp z dnia 29.05.2023).
- [82] “CryoLife receives CE mark for E-nya thoracic stent graft - Vascular News.” <https://vascularnews.com/cryolife-receives-ce-mark-for-e-nya-thoracic-stent-graft/> (dostęp z dnia 29.05.2023).
- [83] “Urządzenie do usuwania skrzepów z trombektomii.” <https://pl.neurosafemed.com/ischemic-cerebral-stroke-products/clot-retrieval-thrombectomy-device.html> (dostęp z dnia 29.05.2023).
- [84] A. Owen and N. Abeysinghe, “Angel® Catheter as a Preventative Measure for Pulmonary Embolism in a Major Burn Patient,” *J Intensive Care Soc*, vol. 15, no. 1\_suppl2, p. 14, Jan. 2014, doi: 10.1177/17511437140151S309.
- [85] S. K. Patel, B. Behera, B. Swain, R. Roshan, D. Sahoo, and A. Behera, “A review on NiTi alloys for biomedical applications and their biocompatibility,” *Mater Today Proc*, vol. 33, pp. 5548–5551, 2020, doi: 10.1016/j.matpr.2020.03.538.
- [86] H. H. Huang *et al.*, “Ion release from NiTi orthodontic wires in artificial saliva with various acidities,” *Biomaterials*, vol. 24, no. 20, pp. 3585–3592, Sep. 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00188-1.



- [87] D. Bluestein, S. Einav, M. S.-J. of biomechanics, and undefined 2013, "Device thrombogenicity emulation: a novel methodology for optimizing the thromboresistance of cardiovascular devices," *Elsevier*, dostęp z dnia: 16.01.2023. [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021929012006859?casa\\_token=mKwFrMIU8E8AAAAA:mwwDvmrkIE\\_z0LXqRwWwYlSlwG5te8Bwzj7XT9XRuWvRoCI9xL0CiH9gbeNjLq6EcjtqluIT-g](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021929012006859?casa_token=mKwFrMIU8E8AAAAA:mwwDvmrkIE_z0LXqRwWwYlSlwG5te8Bwzj7XT9XRuWvRoCI9xL0CiH9gbeNjLq6EcjtqluIT-g)
- [88] C. J. Wilson, R. E. Clegg, D. I. Leavesley, and M. J. Pearcy, "Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: A review," *Tissue Eng*, vol. 11, no. 1–2, pp. 1–18, Jan. 2005, doi: 10.1089/TEN.2005.11.1.
- [89] J. Zdolsek, J. W. Eaton, and L. Tang, "Histamine release and fibrinogen adsorption mediate acute inflammatory responses to biomaterial implants in humans," *J Transl Med*, vol. 5, no. 1, pp. 1–6, Jul. 2007, doi: 10.1186/1479-5876-5-31/FIGURES/2.
- [90] I. H. Jaffer, J. C. Fredenburgh, J. Hirsh, and J. I. Weitz, "Medical device-induced thrombosis: what causes it and how can we prevent it?," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 13, no. S1, pp. S72–S81, Jun. 2015, doi: 10.1111/JTH.12961.
- [91] D. A. Crawford, S. G. Naidu, A. A. Shah, V. J. Davila, and W. M. Stone, "Endovascular Retrieval of an Embolized Atrial Septal Occluder Device From the Abdominal Aorta," *Vasc Endovascular Surg*, vol. 52, no. 8, pp. 669–673, Nov. 2018, doi: 10.1177/1538574418790393/SUPPL\_FILE/APPENDIX\_A\_UPDATE\_(2).PDF.
- [92] R. Foth *et al.*, "Immunohistochemical characterization of neotissues and tissue reactions to septal defect-occlusion devices," *Circ Cardiovasc Interv*, vol. 2, no. 2, pp. 90–96, Apr. 2009, doi: 10.1161/CIRCINTERVENTIONS.108.810507.
- [93] M. Sigler, B. Söderberg, B. Schmitt, A. Mellmann, and J. Bernhard, "Carag bioresorbable septal occluder (CBSO): histopathology of experimental implants," *EuroIntervention*, vol. 13, no. 14, pp. 1655–1661, Feb. 2018, doi: 10.4244/EIJ-D-17-00006.
- [94] E. Perdreau *et al.*, "Assessment of Nit-Occlud atrial septal defect occluder device healing process using micro-computed tomography imaging," *PLoS One*, vol. 18, no. 4, p. e0284471, Apr. 2023, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0284471.
- [95] A. R. Pelton, J. DiCello, and S. Miyazaki, "Optimisation of processing and properties of medical grade Nitinol wire," <http://dx.doi.org/10.3109/13645700009063057>, vol. 9, no. 2, pp. 107–118, 2009, doi: 10.3109/13645700009063057.

- [96] L. Ponsonnet, D. Tréheux, M. Lissac, N. Jaffrezic, and B. Grosogeat, "Review of in vitro studies on the biocompatibility of NiTi alloys," *International Journal of Applied Electromagnetics and Mechanics*, vol. 23, no. 3–4, pp. 147–151, Sep. 2006, doi: 10.3233/jae-2006-733.
- [97] J. Witkowska, A. Sowińska, E. Czarnowska, T. Płociński, T. Borowski, and T. Wierzchoń, "NiTi shape-memory alloy oxidized in low-temperature plasma with carbon coating: Characteristic and a potential for cardiovascular applications," *Appl Surf Sci*, vol. 421, pp. 89–96, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.apsusc.2017.01.145.
- [98] A. Taratuta, Z. Paszenda, M. Basiaga, M. Antonowicz, W. Walke, and D. Nakonieczny, "Evaluation of the physicochemical properties of passive layers produced on NiTi alloys for use in the cardiovascular system," *Lecture Notes in Networks and Systems*, vol. 409, pp. 217–224, 2023, doi: 10.1007/978-3-030-99112-8\_22.
- [99] K. Yamasaki, M. Hirano, S. komai, H. Taniho, and N. Ohtsu, "Cell responses on Ni-free anodized layer of NiTi alloy with various surface morphologies," *Appl Surf Sci*, vol. 531, p. 147351, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.apsusc.2020.147351.
- [100] A. Abbas *et al.*, "Atomic layer deposited TiO<sub>2</sub> films on an equiatomic NiTi shape memory alloy for biomedical applications," *J Alloys Compd*, vol. 886, p. 161282, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.jallcom.2021.161282.
- [101] F. T. Cheng, P. Shi, and H. C. Man, "A preliminary study of TiO<sub>2</sub> deposition on NiTi by a hydrothermal method," *Surf Coat Technol*, vol. 187, no. 1, pp. 26–32, Oct. 2004, doi: 10.1016/J.SURFCOAT.2004.01.023.
- [102] J. X. Liu, D. Z. Yang, F. Shi, and Y. J. Cai, "Sol–gel deposited TiO<sub>2</sub> film on NiTi surgical alloy for biocompatibility improvement," *Thin Solid Films*, vol. 429, no. 1–2, pp. 225–230, Apr. 2003, doi: 10.1016/S0040-6090(03)00146-9.
- [103] F. Mohammadi, N. Golafshan, M. Kharaziha, and A. Ashrafi, "Chitosan-heparin nanoparticle coating on anodized NiTi for improvement of blood compatibility and biocompatibility," *Int J Biol Macromol*, vol. 127, pp. 159–168, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.026.
- [104] A. Strohbach and R. Busch, "Polymers for Cardiovascular Stent Coatings," *International Journal of Polymer Science*, vol. 2015. Hindawi Limited, 2015. doi: 10.1155/2015/782653.

- [105] S. Trigwell, S. De, R. Sharma, M. K. Mazumder, and J. L. Mehta, "Structural evaluation of radially expandable cardiovascular stents encased in a polyurethane film," *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, vol. 76B, no. 2, pp. 241–250, 2006, doi: 10.1002/jbm.b.30359.
- [106] B. Thierry, F. M. Winnik, Y. Merhi, J. Silver, and M. Tabrizian, "Bioactive Coatings of Endovascular Stents Based on Polyelectrolyte Multilayers," *Biomacromolecules*, vol. 4, no. 6, pp. 1564–1571, Nov. 2003, doi: 10.1021/BM0341834.
- [107] G. Tepe *et al.*, "Reduced thrombogenicity of nitinol stents - In vitro evaluation of different surface modifications and coatings," *Biomaterials*, vol. 27, no. 4, pp. 643–650, Feb. 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.06.004.
- [108] F. Wang, Y. Zhang, X. Chen, B. Leng, X. Guo, and T. Zhang, "ALD mediated heparin grafting on nitinol for self-expanded carotid stents," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 143, pp. 390–398, Jul. 2016, doi: 10.1016/J.COLSURFB.2016.03.063.
- [109] C. Zhao, S. Pandit, Y. Fu, I. Mijakovic, A. Jesorka, and J. Liu, "Graphene oxide based coatings on nitinol for biomedical implant applications: Effectively promote mammalian cell growth but kill bacteria," *RSC Adv*, vol. 6, no. 44, pp. 38124–38134, 2016, doi: 10.1039/C6RA06026A.
- [110] J. M. Schmehl, C. Harder, H. P. Wendel, C. D. Claussen, and G. Tepe, "Silicon carbide coating of nitinol stents to increase antithrombogenic properties and reduce nickel release," *Cardiovascular Revascularization Medicine*, vol. 9, no. 4, pp. 255–262, Oct. 2008, doi: 10.1016/J.CARREV.2008.03.004.
- [111] H. A. Ching, D. Choudhury, M. J. Nine, and N. A. A. Osman, "Effects of surface coating on reducing friction and wear of orthopaedic implants," *Sci Technol Adv Mater*, vol. 15, no. 1, p. 14402, Feb. 2014, doi: 10.1088/1468-6996/15/1/014402.
- [112] C. Park, S. Kim, H.-E. Kim, and T.-S. Jang, "Mechanically stable tantalum coating on a nano-roughened NiTi stent for enhanced radiopacity and biocompatibility," *Surf Coat Technol*, vol. 305, pp. 139–145, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.surfcoat.2016.08.014.
- [113] N. Donkov, A. Zykova, V. Safonov, R. Rogowska, J. Smolik, and V. Luk'yanchenko, "Tantalum pentoxide ceramic coatings deposition on Ti4Al6V substrates for biomedical applications," 2011, dostęp z dnia: 23.12.2022. <http://dspace.nbu.gov.ua/xmlui/handle/123456789/90948>

- [114] N. Donkov, E. Mateev, A. Zykova, V. Safonov, and V. Luk'Yanchenko, "Biocompatibility of dielectric Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> coatings in in vitro tests," *J Phys Conf Ser*, vol. 223, no. 1, 2010, doi: 10.1088/1742-6596/223/1/012030.
- [115] N. Horandghadim, J. Khalil-Allafi, and M. Urgen, "Effect of Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> content on the osseointegration and cytotoxicity behaviors in hydroxyapatite-Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> coatings applied by EPD on superelastic NiTi alloys," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 102, pp. 683–695, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.05.005.
- [116] G. Xu, X. Shen, Y. Hu, P. Ma, and K. Cai, "Fabrication of tantalum oxide layers onto titanium substrates for improved corrosion resistance and cytocompatibility," *Surf Coat Technol*, vol. 272, pp. 58–65, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.surfcoat.2015.04.024.
- [117] D. Glocker, "Tantalum-coated stents," *Advanced Materials and Processes*, vol. 166, pp. 58–59, Dec. 2008.
- [118] K. Kukli, M. Ritala, and M. Leskelä, "Atomic Layer Deposition and Chemical Vapor Deposition of Tantalum Oxide by Successive and Simultaneous Pulsing of Tantalum Ethoxide and Tantalum Chloride," *Chemistry of Materials*, vol. 12, no. 7, pp. 1914–1920, Jun. 2000, doi: 10.1021/cm001017j.
- [119] Y. Zhou, M. Li, Y. Cheng, Y. F. Zheng, T. F. Xi, and S. C. Wei, "Tantalum coated NiTi alloy by PIIID for biomedical application," *Surf Coat Technol*, vol. 228, pp. S2–S6, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.surfcoat.2012.11.002.
- [120] Y. Li, S. Wei, X. Cheng, T. Zhang, and G. Cheng, "Corrosion behavior and surface characterization of tantalum implanted TiNi alloy," *Surf Coat Technol*, vol. 202, no. 13, pp. 3017–3022, Mar. 2008, doi: 10.1016/j.surfcoat.2007.11.003.
- [121] Y. Cheng, W. Cai, H. T. Li, and L. C. Zhao, "Corrosion property of TiNi shape memory alloys coated with tantalum," *J Mater Sci Lett*, vol. 22, no. 23, pp. 1681–1683, Dec. 2003, doi: 10.1023/b:jmsl.0000004648.40757.56.
- [122] K. H. Min, R. Sinclair, I. S. Park, S. T. Kim, and U. I. Chung, "Crystallization behaviour of ALD-Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> thin films: The application of in-situ TEM," *Philosophical Magazine*, vol. 85, no. 18, pp. 2049–2063, Jun. 2005, doi: 10.1080/14786430500036546.
- [123] A. Taratuta *et al.*, "Influence of passive layer fabrication method on physicochemical and antimicrobial properties of the Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> layer on NiTi alloy," *Vacuum*, p. 112187, May 2023, doi: 10.1016/j.vacuum.2023.112187.

- [124] M. Ulmi *et al.*, "Propensity-Score Matched Comparison of the Cera PFO Occluder With the Amplatzer PFO Occluder for Percutaneous Closure of Patent Foramen Ovale Without Echocardiographic Guidance," *J Invasive Cardiol*, vol. 29, Jan. 2017.
- [125] J. Lełątko and T. Goryczka, *Modyfikacja powierzchni stopów NiTi wykazujących pamięć kształtu*. Uniwersytet Śląski, 2013.
- [126] "ASTM International - ASTM F2063-18 - Standard Specification for Wrought Nickel-Titanium Shape Memory Alloys for Medical Devices and Surgical Implants," *International Standard*. 2018.
- [127] N. Isabel *et al.*, "Surface Characterization of NiTi Superelastic and Shape Memory Alloys After Electrolytic Polishing," *Materials Research*, vol. 20, pp. 572–579, 2017, doi: 10.1590/1980-5373-MR-2016-0933.
- [128] R. W. Johnson, A. Hultqvist, and S. F. Bent, "A brief review of atomic layer deposition: from fundamentals to applications," *Materials Today*, vol. 17, no. 5, pp. 236–246, Jun. 2014, doi: 10.1016/j.mattod.2014.04.026.
- [129] H. C. Lin, Y. L. Chang, Y. Y. Han, K. C. Yang, and M. C. Chen, "Atomic Layer Deposited Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Films on NiTi Shape Memory Alloys for Biomedical Applications," *Procedia Manuf*, vol. 37, pp. 431–437, Jan. 2019, doi: 10.1016/J.PROMFG.2019.12.070.
- [130] Y. Cheng, W. Cai, H. T. Li, Y. F. Zheng, and L. C. Zhao, "Surface characteristics and corrosion resistance properties of TiNi shape memory alloy coated with Ta," *Surf Coat Technol*, vol. 186, no. 3, pp. 346–352, Sep. 2004, doi: 10.1016/J.SURFCOAT.2004.01.012.
- [131] I. Lindau, P. Pianetta, K. Y. Yu, and W. E. Spicer, "Photoemission of gold in the energy range 30-300 eV using synchrotron radiation," *Phys Rev B*, vol. 13, no. 2, pp. 492–495, Jan. 1976, doi: 10.1103/physrevb.13.492.
- [132] "PN EN ISO 20502 : 2016 Ceramika wysokiej jakości (ceramika zaawansowana, techniczna ceramika zaawansowana) -- Oznaczanie adhezji powłok ceramicznych w próbie zarysowania."
- [133] "PN-EN ISO 25178-2:2022-06 Specyfikacje geometrii wyrobów (GPS) - Struktura geometryczna powierzchni: Przestrzenna -- Część 2: Terminy, definicje i parametry struktury geometrycznej powierzchni."
- [134] "PN-EN ISO 10993-15:2009 Biologiczna ocena wyrobów medycznych -- Część 15: Identyfikacja i oznaczanie ilościowe produktów degradacji metali i stopów."

- [135] "F746 Standard Test Method for Pitting or Crevice Corrosion of Metallic Surgical Implant Materials." <https://www.astm.org/f0746-04r21.html> (dostęp z dnia 26.01.2023).
- [136] "ASTM International - ASTM F746-04(2021) - Standard Test Method for Pitting or Crevice Corrosion of Metallic Surgical Implant Materials | GlobalSpec."
- [137] "PN-EN ISO 10993-5:2009 Biologiczna ocena wyrobów medycznych -- Część 5: Badania cytotoksyczności in vitro."
- [138] "PN-EN ISO 10993-4:2018-02 Biologiczna ocena wyrobów medycznych -- Część 4: Wybór badań dla interakcji z krwią."
- [139] "F756 Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials." <https://www.astm.org/f0756-00.html> (dostęp z dnia 29.05.2023).
- [140] A. v. Naumkin, A. Kraut-Vass, S. W. Gaarenstroom, and C. J. Powell, "NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database, NIST Standard Reference Database Number 20, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899 (2000).," <https://srdata.nist.gov/xps/> (dostęp z dnia 23.12.2022).
- [141] H. Hantsche, "High resolution XPS of organic polymers, the scienta ESCA300 database. By G. Beamson and D. Briggs, Wiley, Chichester 1992, 295 pp., hardcover, £ 65.00, ISBN 0-471-93592-1," *Advanced Materials*, vol. 5, no. 10, pp. 778–778, Oct. 1993, doi: 10.1002/ADMA.19930051035.
- [142] "Tantalum | XPS Periodic Table | Thermo Fisher Scientific - PL." <https://www.thermofisher.com/pl/en/home/materials-science/learning-center/periodic-table/transition-metal/tantalum.html> (dostęp z dnia 21.03.2023).
- [143] "ASTM F756-00 - Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials."
- [144] O. M. E. Ylivaara *et al.*, "Aluminum oxide from trimethylaluminum and water by atomic layer deposition: The temperature dependence of residual stress, elastic modulus, hardness and adhesion," *Thin Solid Films*, vol. 552, pp. 124–135, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2013.11.112>.
- [145] I. Avila, K. Pantchev, J. Holopainen, M. Ritala, and J. Tuukkanen, "Adhesion and mechanical properties of nanocrystalline hydroxyapatite coating obtained by conversion of atomic layer-deposited calcium carbonate on titanium substrate," *J*

- Mater Sci Mater Med*, vol. 29, no. 8, p. 111, 2018, doi: 10.1007/s10856-018-6121-x.
- [146] P. Boryło *et al.*, "The influence of atomic layer deposition process temperature on ZnO thin film structure," *Appl Surf Sci*, vol. 474, pp. 177–186, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.03.169>.
- [147] S. Jin, Y. Zhang, Q. Wang, D. Zhang, and S. Zhang, "Influence of TiN coating on the biocompatibility of medical NiTi alloy," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 101, pp. 343–349, Jan. 2013, doi: 10.1016/J.COLSURFB.2012.06.029.
- [148] C. Y. Zheng, F. L. Nie, Y. F. Zheng, Y. Cheng, S. C. Wei, and R. Z. Valiev, "Enhanced in vitro biocompatibility of ultrafine-grained biomedical NiTi alloy with microporous surface," *Appl Surf Sci*, vol. 257, no. 21, pp. 9086–9093, 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2011.05.105>.
- [149] F. Xu, L. Luo, L. Xiong, and Y. Liu, "Microstructure and corrosion behavior of ALD Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> film on AZ31 magnesium alloy with different surface roughness," *Journal of Magnesium and Alloys*, vol. 8, no. 2, pp. 480–492, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jma.2019.06.003>.
- [150] Z. Paszenda, "Kształtowanie własności fizykochemicznych stentów wieńcowych ze stali Cr-Ni-Mo do zastosowań w kardiologii zabiegowej," *Zeszyty Naukowe. Mechanika / Politechnika Śląska*, vol. z. 150, pp. 1–134, 2005.
- [151] J. Marciniak, *Biomateriały*. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, 2002.
- [152] F. Stergioudi, C. A. Vogiatzis, E. Pavlidou, S. Skolianos, and N. Michailidis, "Corrosion resistance of porous NiTi biomedical alloy in simulated body fluids," *Smart Mater Struct*, vol. 25, no. 9, p. 95024, Aug. 2016, doi: 10.1088/0964-1726/25/9/095024.
- [153] Y. Chen *et al.*, "Drug-Loaded Mesoporous Tantalum Oxide Nanoparticles for Enhanced Synergetic Chemoradiotherapy with Reduced Systemic Toxicity," *Small*, vol. 13, no. 8, p. 1602869, 2017, doi: <https://doi.org/10.1002/smll.201602869>.
- [154] C. D. Garcarena, T. M. McHale, R. L. Watkin, and S. W. Kerrigan, "Coordinated Molecular Cross-Talk between Staphylococcus aureus, Endothelial Cells and Platelets in Bloodstream Infection," *Pathogens*, vol. 4, no. 4, pp. 869–882, 2015, doi: 10.3390/pathogens4040869.
- [155] M. Saadatian-Elahi, R. Teyssou, and P. Vanhems, "Staphylococcus aureus, the major pathogen in orthopaedic and cardiac surgical site infections: A literature

- review," *International Journal of Surgery*, vol. 6, no. 3, pp. 238–245, 2008, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2007.05.001>.
- [156] S. R. Jang, I. W. Suh, and L. Heng, "Nanoscale Polishing Technique of Biomedical Grade NiTi Wire by Advanced MAF Process: Relationship between Surface Roughness and Bacterial Adhesion," *J Funct Biomater*, vol. 14, no. 4, 2023, doi: [10.3390/jfb14040177](https://doi.org/10.3390/jfb14040177).
- [157] R. K. Roy *et al.*, "Hemocompatibility of surface-modified, silicon-incorporated, diamond-like carbon films," *Acta Biomater*, vol. 5, no. 1, pp. 249–256, 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.07.031>.
- [158] T. Zhao, Y. Li, Y. Gao, Y. Xiang, H. Chen, and T. Zhang, "Hemocompatibility investigation of the NiTi alloy implanted with tantalum," *J Mater Sci Mater Med*, vol. 22, no. 10, p. 2311, 2011, doi: [10.1007/s10856-011-4406-4](https://doi.org/10.1007/s10856-011-4406-4).
- [159] J.-S. Park, K. H. Yim, S. Jeong, D. H. Lee, and D. G. Kim, "A Novel High-Visibility Radiopaque Tantalum Marker for Biliary Self-Expandable Metal Stents," *Gut Liver*, vol. 13, no. 3, pp. 366–372, May 2019, doi: [10.5009/gnl18330](https://doi.org/10.5009/gnl18330).



# Struktura i własności fizykochemiczne warstw powierzchniowych stopu NiTi stosowanego na implanty w układzie krwionośnym

## Streszczenie

W rozprawie doktorskiej podjęto tematykę modyfikacji powierzchni stopu NiTi do zastosowań w układzie krwionośnym na przykładzie okluderów, implantów służących do zamykania ubytków serca. Stosowanie tego stopu, mimo jego dobrej biokompatybilności i występującym efekcie pseudosprężystości, związane jest z ryzykiem wystąpienia alergii, zakrzepów czy problemów występujących podczas przerastania tkanką. W celu ograniczenia tych negatywnych skutków, zaproponowano modyfikację powierzchni polegającą na nałożeniu powłoki tlenku tantalum metodą ALD na podłoże poddane procesowi polerowania elektrochemicznego.

Skład chemiczny uzyskanej powłoki wynosił 30,2% Ta i 69,8% O. Analiza mikrostruktury przekroju próbki ujawniła dwa obszary w powłoce: od strony podłoża zidentyfikowano warstwowe ułożenie struktur składających się z tytanu oraz tantalum. Drugi obszar zawierał jednolitą strukturę zawierającą przede wszystkim tantal. Pomiary grubości powłoki zrealizowano z wykorzystaniem elipsometrii, grubość warstwy pasywnej wynosiła 2,7 nm, a powłoki Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 13,8 nm. Wytworzona powłoka charakteryzowała się także bardzo dobrą adhezją do podłoża, a także poprawiła współczynnik tarcia nitinolu. Mimo zmniejszenia chropowatości powierzchni, powłoka miała wpływ na obniżenie się wartości kąta zwilżania, zwiększając jej hydrofilowość. Co więcej, powłoka skutecznie ograniczyła przenikanie jonów niklu do roztworu PBS oraz poprawiła odporność na korozję szczelinową i wżerową, nawet po odkształceniu.

W celu uzupełnienia badań fizykochemicznych, wykonano badania biologiczne, obejmujące adhezję bakterii do podłoża, cytotoksyczność, proliferację komórek, trombogenność, hemolizę oraz badania poziomu cytokin prozapalnych. Wyniki wymienionych badań wykazały korzystny wpływ powłoki na własności badanego materiału – ograniczyła adhezję bakterii, cytotoksyczność, trombogenność i poziom cytokin, a zintensyfikowała proliferację komórek. Dla podłoża oraz podłoża z powłoką potwierdzono własności niehemolizujące.

## **Structure and physicochemical properties of surface layers of NiTi alloys used for implants in the cardiovascular system**

### **Abstract**

The dissertation is concerned with the surface modification of NiTi alloy for applications in the blood system using occluders dedicated to closing heart defects. The use of this alloy, despite its good biocompatibility and the pseudo-elasticity effect, is associated with the risk of allergies, blood clots or problems occurring during tissue overgrowth. To reduce these negative effects, a surface modification was proposed to modify the surface by applying a tantalum oxide coating by the ALD method to a substrate treated by electrochemical polishing.

The chemical composition of the resulting coating was 30.2% Ta and 69.8% O. Microstructure analysis of the sample cross-section revealed two areas in the coating: on the substrate side, a layered arrangement of structures consisting of titanium and tantalum was identified. The other region contained an uniform structure containing mainly tantalum. The thickness measurements of the coating were made using ellipsometry; the thickness of the passive layer was 2.7 nm and the Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> coating was 13.8 nm. The formed coating also showed great adhesion to the substrate and improved the friction coefficient of nitinol. Moreover, the coating effectively reduced the penetration of nickel ions into the PBS solution and improved resistance to crevice and pitting corrosion, even after deformation.

To complement physicochemical studies, biological tests were performed, including bacterial adhesion to the substrate, cytotoxicity, cell proliferation, thrombogenicity, hemolysis, and pro-inflammatory cytokine levels studies. The results of the mentioned studies showed a beneficial effect of the coating on the properties of the test material; bacterial adhesion, cytotoxicity, thrombogenicity, and cytokine levels were reduced, while proliferation was promoted. Nonhemolyzing properties were confirmed for the substrate and the coated substrate.