

KATEDRA BIOMATERIAŁÓW I INŻYNIERII WYROBÓW MEDYCZNYCH
WYDZIAŁ INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ



**Politechnika
Śląska**

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Ocena własności fizycznych i chemicznych
biodegradowalnych powłok polimerowych zawierających
hydroksyapatyt i substancję aktywną**

mgr inż. Karolina GOLDSZTAJN

PROMOTOR

dr hab. inż. Janusz Szewczenko, prof. PŚ

PROMOTOR POMOCNICZY

dr inż. Wojciech Kajzer

ZABRZE 2024

*Pracę tę dedykuję moim rodzicom i bratu,
za nieustanną wiarę i wsparcie na każdym etapie życia.*

*Pragnę szczególnie serdecznie podziękować mojemu promotorowi,
dr hab. inż. Januszowi Szewczenko, prof. PŚ,
oraz promotorowi pomocniczemu,
dr inż. Wojciechowi Kajzer.
Za nieocenione wsparcie, wyrozumiałość i cierpliwość.*

Spis treści

I. WPROWADZENIE	5
I. PRZEGLĄD LITERATURY	7
1. Hydroksyapatyt	7
2. Złamanie i gojenie tkanki kostnej	10
3. Metody leczenia złamań	12
4. Zakażenia okołowszczepowe	16
5. Modyfikacje powierzchni stopów tytanu	17
6. Powłoki polimerowe	21
7. Metody nakładania powłok polimerowych	25
Podsumowanie przeglądu literatury	29
II. BADANIA WŁASNE	32
1. Cel i teza pracy	32
2. Materiał do badań	34
2.1. Modyfikacja powierzchni	35
2.2. Ekspozycja na roztwór PBS	37
3. Metodyka badań	37
3.1. Badania składu chemicznego warstwy wierzchniej	37
3.2. Badania morfologii powierzchni	38
3.3. Badania zwilżalności powierzchni	39
3.4. Badania adhezji powłoki do podłoża	39
3.5. Badania składu fazowego	40
3.6. Badania elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej	40
3.7. Badania odporności na korozję wżerową	41
3.8. Badania przenikalności jonów	42
3.9. Badania zmiany masy molekularnej polimeru	42
3.10. Badania cytotoksyczności	43
3.11. Badania cytokin prozapalnych	43
4. Wyniki badań	44
4.1. Skład chemiczny warstwy wierzchniej	44
4.2. Morfologia powierzchni	48
4.3. Zwilżalność powierzchni	54
4.4. Adhezja powłoki do podłoża	55
4.5. Skład fazowy	56
4.6. Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna	59

4.7.	Odporność na korozję wżerową	61
4.8.	Przenikanie jonów	63
4.9.	Zmiana masy molekularnej polimeru	65
4.10.	Cytotoksyczność	66
4.11.	Cytokiny prozapalne	70
5.	Omówienie wyników	72
6.	Wnioski	80
8.	BIBLIOGRAFIA.....	81
	Streszczenie.....	96
	Abstract.....	97

I. WPROWADZENIE

Kości w organizmie człowieka pełnią funkcję podpory dla całego ciała, umożliwiają poruszanie się, a także ochraniają najważniejsze organy ludzkiego ciała, takie jak mózg, rdzeń kręgowy oraz serce. Niestety duża ilość wypadków komunikacyjnych, wzrost popularności sportów ekstremalnych, a także wzrost populacji starszych osób, w dużej mierze cierpiących na osteoporozę, wpływa na mnogość złamań kości. Złamania mogą być leczone w sposób zachowawczy z zastosowaniem gipsu lub ortezy. Jednakże metoda ta sprawdza się jedynie w przypadku prostych złamań. Natomiast leczenie skomplikowanych złamań wieloodłamowych lub złamań osteoporotycznych wymaga leczenia chirurgicznego. Podczas zabiegu niezbędne jest zapewnienie odpowiedniego ustawienia i stabilizacji odłamów kostnych przez dobór odpowiedniej konstrukcji i materiału implantu. Niestety leczenie operacyjne niesie ze sobą ryzyko zakażenia okołowszczepowego, które postępując prowadzi do zaburzeń zrostu kostnego

Obecnie coraz powszechniejszym sposobem leczenia złamań staje się stabilizacja z wykorzystaniem implantów metalowych, w szczególności ze stopów tytanu. Ze względu na degradację w środowisku tkankowym, a co za tym idzie, uwalnianie produktów degradacji z powierzchni implantów do środowiska tkankowego, niezbędne jest zapewnienie odpowiedniej biokompatybilności poprzez zastosowanie modyfikacji powierzchni. Jedną z takich metod jest wytwarzanie warstw tlenkowych na powierzchni materiałów, na przykład metodami elektrochemicznymi, co jak udowodniono w wielu dotychczasowych badaniach, pozwala na ograniczenie uwalniania jonów pierwiastków stopowych.

Obiecującym wydaje się również zastosowanie implantów z biomateriałów polimerowych. Jednakże problemem tutaj okazuje się zapewnienie odpowiednich właściwości mechanicznych implantu przez cały okres trwania leczenia. Analiza literatury pokazuje, że rozwiązaniem tego problemu może być wykorzystanie powłok polimerowych na podłożu metalowym. W ten sposób metalowe podłoże zapewnia odpowiednią stabilizację przez cały okres rekonwalescencji, a polimerowa powłoka pełni funkcję barierową, ograniczając przenikanie produktów degradacji metalowego implantu. Ponadto zastosowanie powłoki polimerowej wiąże się także z innymi zaletami. Biodegradowalne powłoki polimerowe mogą bowiem stanowić system

lokalnego dostarczania leków oraz substancji mineralnych, stymulując wzrost kostny oraz ograniczając konieczność ogólnoustrojowego przyjmowania leków.

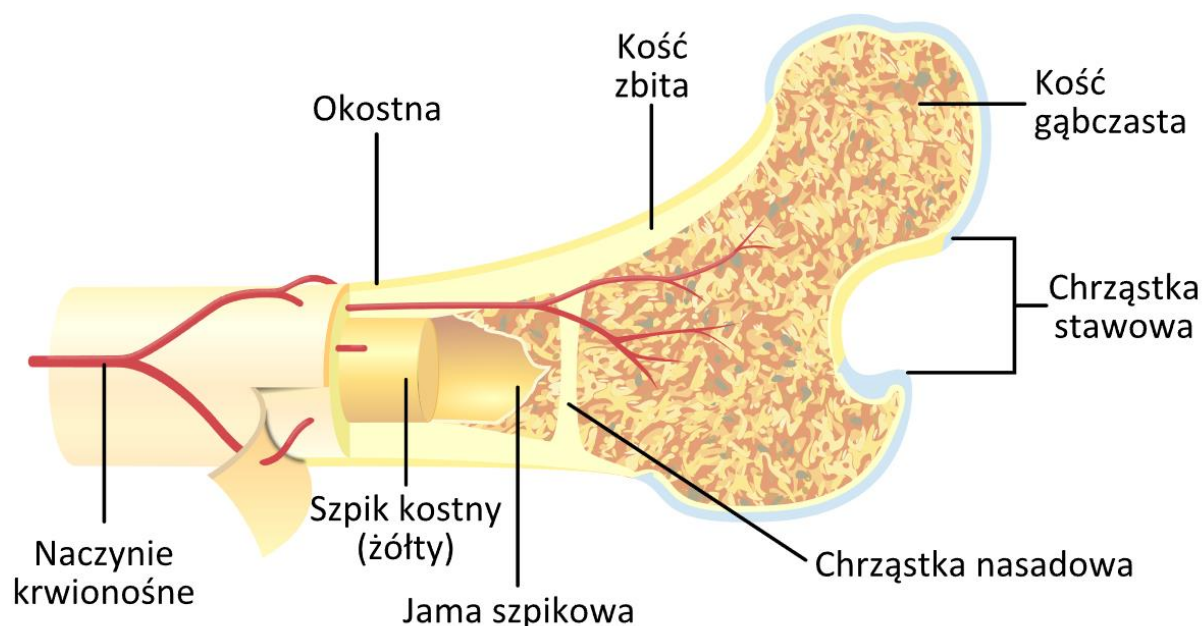
W pracy podjęto tematykę modyfikacji powierzchni utlenianego anodowo stopu Ti6Al7Nb poprzez naniesienie powłoki biodegradowalnego poli(laktyd-koglikolidu), która ma pełnić funkcję bariery dla produktów degradacji stopu oraz stanowić matrycę do uwalniania substancji aktywnych. Kanapkowa powłoka, w wewnętrznej części zawierała hydroksyapatyt, natomiast w zewnętrznej lek. Zastosowanie powłoki polimerowej pozwala po pierwsze na poprawę odporności korozyjnej stopu oraz zmniejszenie ilości jonów przenikających do środowiska tkankowego. Ponadto uwalniana, w pierwszych etapie degradacji, substancja aktywna ma za zadanie ograniczać ryzyko infekcji i konieczności ogólnoustrojowej farmakoterapii. Następnie wspierając proces regeneracji tkanki kostnej poprzez dostarczanie hydroksyapatytu. Z tego powodu celem pracy była ocena własności powłoki polimerowej, która zawiera substancję aktywną oraz hydroksyapatyt. Aby to osiągnąć, przeprowadzono badania własności fizycznych, chemicznych, w tym elektrochemicznych oraz badania cytotoxyczności i oznaczenie cytokin prozapalnych. Uzyskane wyniki pozwoliły scharakteryzować uzyskaną powłokę oraz jej przydatność do zastosowań na implanty w ortopedii i traumatologii.

I. PRZEGLĄD LITERATURY

1. Hydroksyapatyt

Kości są doskonale przystosowane do przenoszenia obciążeń, wspierania ciała oraz zapewniania dźwigni do ruchu [1]. Jest to wysoce unaczyniona, zmineralizowana tkanka łączna, składająca się z komórek i macierzy międzykomórkowej, zbudowana częściowo z materiałów organicznych – głównie włókien kolagenowych oraz soli nieorganicznych bogatych w wapń i fosfor [2]. Pod względem budowy (Rysunek 1) nie należy ona do tkanek jednorodnych, można więc wyróżnić następujące typy tkanki kostnej [3]:

- tkanka kostna grubowłóknista,
- tkanka kostna drobnowłóknista,
- tkanka kostna gąbczasta,
- tkanka kostna blaszkowata (tkanka kostna zbita).

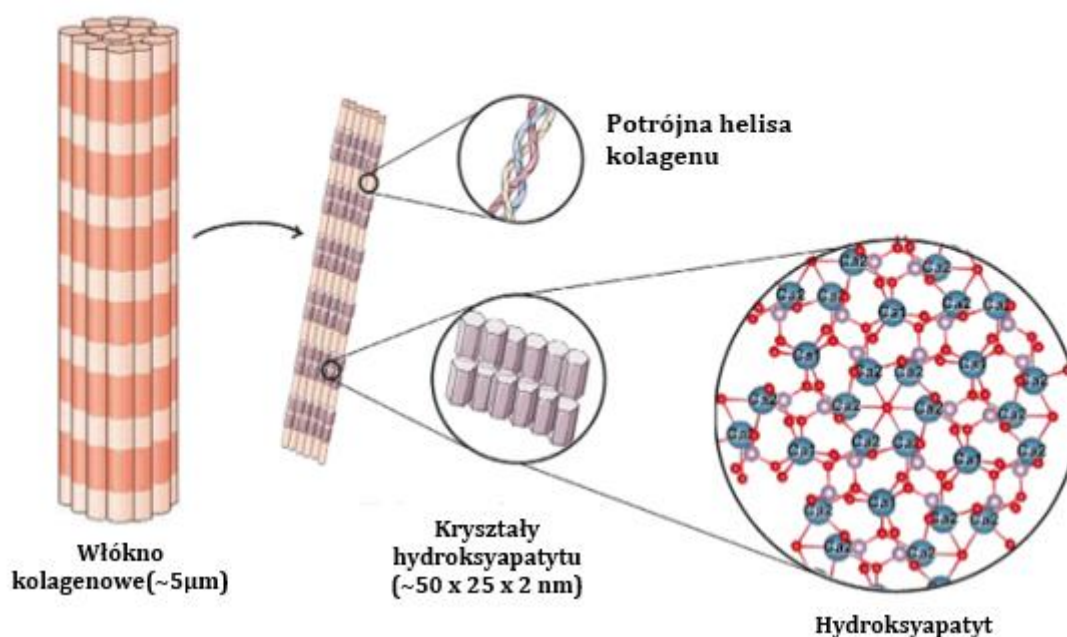


Rysunek 1. Schemat budowy kości [4]

Macierz kostna jest pozakomórkowym zmineralizowanym materiałem kości i podobnie jak ogólne tkanki łączne składa się z substancji, w której osadzone są liczne włókna kolagenowe, zwykle uporządkowane w kości w macierzach pararelnych [5]. W dojrzałej kości macierz jest umiarkowanie uwodniona, 10-20% jej masy stanowi woda. W suchej masie 60-70% stanowią nieorganiczne sole mineralne (głównie

mikrokrystaliczne wodorotlenki wapnia i fosforu, hydroksyapatyt), 30-40% to kolagen, a pozostała część to niekolagenowe białka i węglowodany [1], [5]. Proporcje tych składników różnią się w zależności od wieku, lokalizacji i stanu metabolicznego [6].

Matryca kolagenowa w naturalnej tkance kostnej zapewnia elastyczność kości i służy jako matryca do osadzania i wzrostu kryształów apatyty [7]. Biologiczne apatyty to nanokryształy przypominające płytki, o grubości kilku nanometrów i długości kilkudziesięciu nanometrów (Rysunek 2). Kryształy te są osadzone równoległe z włóknami kolagenowymi. Struktura ta w wyniku samoorganizacji kolagenu przyjmuje formę potrójnej helisy [8]. W budowie kryształów apatyty wyróżnić można trzy główne strefy: centralną, powierzchniową oraz uwodnioną. To właśnie ta ostatnia odpowiedzialna jest za wymianę jonów pomiędzy hydroksyapatytem i macierzą tkanki kostnej [7]. Reakcje hydroksyapatytu z włóknami kolagenowymi z niekolagenowymi białkami macierzy odpowiadają za twardość i sztywność kości [9]. Między innymi budowie, blaszkowatej strukturze oraz zmineralizowanej substancji międzykomórkowej, kości zawdzięczają swoją wytrzymałość mechaniczną [3].

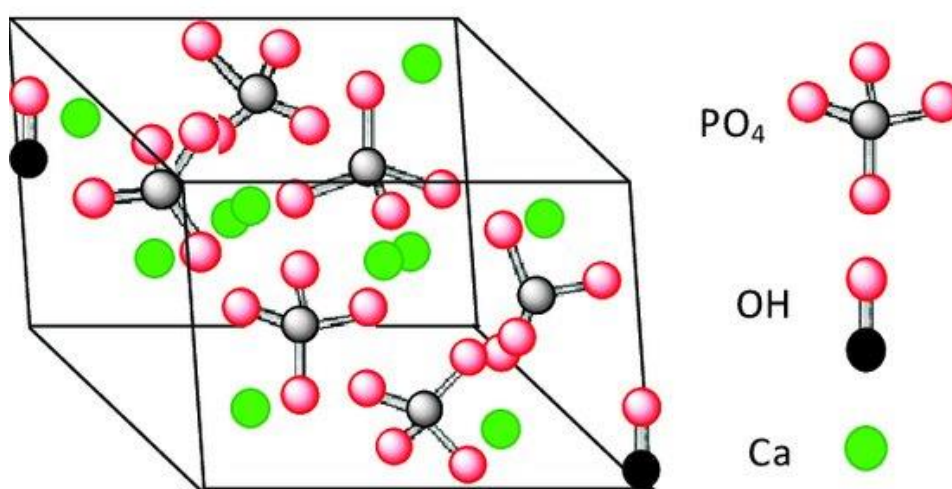


Rysunek 2. Hierarchiczna struktura kolagenu i hydroksyapatytu w tkance kostnej [7]

Hydroksyapatyt (HAp) ma wzór chemiczny $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ i masę molową równą 502,31 g/mol [10]. W jego stechiometrycznej postaci stosunek wapnia do fosforu (Ca/P) wynosi 1,67 [11]. W niestechiometrycznych odmianach tego materiału stosunek

ten może się zmieniać w zależności od zawartości wapnia: w przypadku nadmiaru wapnia stosunek Ca/P rośnie, natomiast przy jego niedoborze spada. Wynika to z możliwości podstawienia jonów w sieci krystalicznej HAp innymi jonami, co jest możliwe dzięki zdolności HAp do wymiany kationów i anionów [12],[13].

Podstawowa jednostka strukturalna hydroksyapatytu składa się z atomów wapnia (Ca), fosforu (P), tlenu (O) oraz wodoru (H). Fosfor występuje w grupach fosforanowych, natomiast wodór i tlen tworzą grupy hydroksylowe. Grupy fosforanowe mają kształt tetraedru, w którym jon fosforu znajduje się w centrum czworościanu, a cztery atomy tlenu są rozmieszczone na jego wierzchołkach [12].



Rysunek 3. Struktura krystalograficzna hydroksyapatytu [14]

Hydroksyapatyt (HAp) zaliczany jest do grupy fosforanów wapnia. Fosforany wapnia to sole składające się z kationów wapnia i anionów fosforanowych, wyróżniamy orto- (PO_4^{3-}), meta- (PO_3^-), piro- ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) oraz polifosforany ($(\text{PO}_3)_n^{n-}$) [15]. Ze względu na ich istotne zastosowania medyczne, największą uwagę zwraca się na ortofosforany, które są solami kwasu ortofosforowego (V). Czyste ortofosforany wapnia mają postać białych kryształów, jednak dzięki możliwości wbudowania innych jonów, takich jak żelazo, mangan czy pierwiastki ziem rzadkich, mogą występować w różnych kolorach [16].

Poza naturalnym hydroksyapatytem występującym w organizmie, wyróżnić można również HAp mineralny oraz syntetyczny. Biologicznie utworzone ortofosforany wapnia, zwane również apatytem biologicznym (bioapatytem), stanowią podstawowy składnik kości i zębów u kręgowców [17]. Bioapatyt różni się od stechiometrycznego

hydroksyapatytu (HAp) swoją strukturą i właściwościami. Charakteryzuje się niskim stopniem krystaliczności oraz brakiem idealnej stechiometrii (stosunek molowy Ca/P hydroksyapatytu naturalnie występującego w kościach wynosi powyżej 1,67), co wynika z licznych podstawień w sieci krystalicznej, gdzie jony typowe dla HAp (takie jak wapń i fosfor) są zastępowane innymi jonami, takimi jak węglan (CO_3^{2-}), sól (Na^+), magnez (Mg^{2+}), potas (K^+), chlorek (Cl^-) i fluorek (F^-). Te różnice sprawiają, że struktura apatytu jest mniej stabilna, co z kolei zwiększa jego rozpuszczalność w porównaniu do syntetycznego, stechiometrycznego HAp. Dzięki swoim właściwościom, bioapatyt pełni w organizmie funkcję rezerwuaru składników mineralnych. Dodatkowo, jest obecny także w formacjach patologicznych, takich jak kamienie nerkowe czy zmiany miażdżycowe [12], [13], [17].

Hydroksyapatyt charakteryzuje się wysoką bioaktywnością, właściwościami osteoindukcyjnymi [17], co oznacza, że wspomaga wzrost tkanki kostnej poprzez aktywowanie procesu różnicowania się komórek macierzystych w osteoblasty (komórki budujące kości). Ponadto, posiada właściwości osteokondukcyjne [18], czyli zapewnia warunki sprzyjające rozrostowi komórek kostnych i wiązaniu się tkanki z powierzchnią implantu nim pokrytego. HAp jest również biodegradowalny oraz nietoksyczny. Jednakże, czysty hydroksyapatyt cechuje się znaczną kruchością i niską wytrzymałością mechaniczną. Ogranicza to jego zastosowanie w medycynie regeneracyjnej, szczególnie w przypadku implantów kostnych, które muszą przenosić duże obciążenia [19].

2. Złamanie i gojenie tkanki kostnej

Złamanie jest przerwaniem ciągłości kości, do którego dochodzi wskutek działania sił większych od wytrzymałości tkanki kostnej. Wystąpienie takich sił w układzie kostnym wynika najczęściej z urazów wysokoenergetycznych (np. upadku lub wypadku komunikacyjnego), cyklicznych obciążeń zmęczeniowych, a także osteoporozy lub innych chorób układu kostnego [20]. W zależności od kierunku działających sił, a także miejsca złamania (trzonu, nasady lub przynasady kości), dochodzi do przemieszczenia się odłamów kostnych lub ich zgniecenia. Ogólnie złamania podzielić można na [3]:

- otwarte lub zamknięte,
- wyrównane lub z przemieszczeniem,
- proste lub skomplikowane.

Niezależnie od rodzaju złamania, poza uszkodzeniem tkanki kostnej, równolegle następuje uszkodzenie naczyń śródszpikowych, które prowadzi do przerwania krążenia śródkostnego, a co za tym idzie zatrzymaniem odżywiania kości oraz zatrzymaniem mikrokrążenia w miejscu urazu. Ponadto dochodzi do przerwania nerwów wnikaających do jamy szpikowej i uszkodzenia otaczających tkanek [21]. W ich następstwie rozpoczyna się szereg procesów ogólnoustrojowych, a także lokalnych, które możemy podzielić na trzy główne etapy (Rysunek 4):

I. Faza zapalna i proliferacyjna

W wyniku uszkodzeń naczyń krwionośnych w miejscu złamania zaobserwować można obrzęk oraz krwiak pourazowy, który prowadzi do ograniczonego dostępu tlenu i obniżonego pH [20]. Wydzielające się czynniki wzrostowe, powodują wzrost oraz proliferację fibroblastów i komórek pluripotencjalnych tkanki łącznej, co w ciągu kilku dni prowadzi do powstania tkanki ziarninowej. Z kolei mobilizacja różnicowania się komórek mezenchymalnych do osteoblastów prowadzi do przerostu chrząstki, a w konsekwencji tworzenia miękkiej kostniny i odnawiania pierwszych naczyń krwionośnych [22]. Na tym etapie formuje się podstawa strukturalna zregenerowanej tkanki kostnej, którą stanowią włókna kolagenu z odłożonymi na nich kryształami hydroksyapatytu [8].

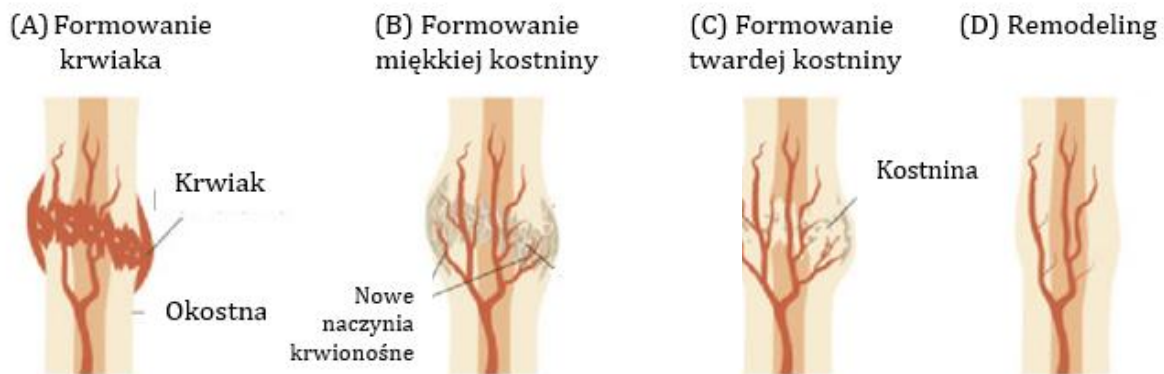
II. Faza formowania się kostniny

Rozpoczyna się tworzenie kostniny włóknisto-chrzęstnej oraz włóknisto-kostnej, które jest efektem proliferacji i różnicowania komórek okostnej, śródkostnej oraz szpiku kostnego. Obecne w niej chondroblasty wytwarzają czynniki wzrostu, odpowiedzialne za syntezę kolagenu typu II, charakterystycznego dla chrząstki [22]. W dalszej fazie, za sprawą tworzących się osteoblastów, dochodzi do syntezy kolagenu typu I (typowego dla kości), następuje mineralizacja chrząstki, która zastąpiona zostaje twardą kostniną [23].

III. Faza przebudowy i modelowania

W końcowym etapie regeneracji tkanki kostnej dochodzi do przebudowy jej struktury. Prowadzi ona do wzmocnienia oraz przywrócenia właściwych cech mechanicznych uformowanej kostninie poprzez proces usuwania martwej tkanki kostnej i przebudowy nowo powstałej kości. W zależności

od warunków fizjologicznych remodeling może trwać od kilku miesięcy do nawet kilku lat [3].



Rysunek 4. Etapy leczenia złamania kości [22]

3. Metody leczenia złamań

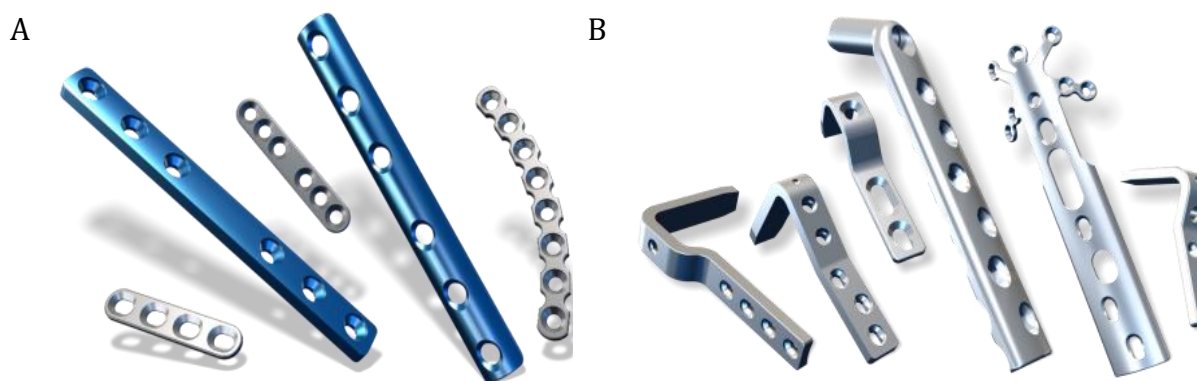
Prawidłowe gojenie w przypadku przerwania ciągłości kości jest procesem złożonym, który przebiega przy odpowiednim unieruchomieniu odłamów w początkowej fazie regeneracji, jednocześnie z zapewnieniem odkształcenia w zakresie sprężystym w osi długiej kości podczas dalszych etapów gojenia [24]. Niewłaściwa przebudowa i resorpcja kości, wynikająca z nieodpowiedniej stabilizacji, odgrywa istotną rolę w występowaniu wielu stanów klinicznych, do których zaliczyć można m.in. upośledzone gojenie złamań [25]. Aby temu zapobiec należy odpowiednio dobrać metodę leczenia uzależnioną od rodzaju i miejsca złamania. Wyróżniamy [26]:

- leczenie zachowawcze – polega na ustabilizowaniu miejsca urazu za pomocą gipsu lub ortezy, stosowane w przypadku złamań prostych,
- leczenie operacyjne – odłamy kostne stabilizowane za pomocą implantów, m.in. drutów lub płytek kostnych, sprawdzające się w przypadku złamań skomplikowanych, otwartych i przemieszczonych.

Do lat 60. XX w. panowało przekonanie, że najlepszym sposobem leczenia operacyjnego złamań jest stabilizacja bezwzględna, która zapewniała pełne unieruchomienie, a ich podstawą było anatomiczne ustawienie odłamów. Jednakże obecnie, dzięki lepszemu poznaniu zagadnień biomechanicznych i biofizycznych zrostu kostnego za najkorzystniejsze rozwiązania uznaje się te wykorzystujące stabilizację względną, pozwalającą na pewien zakres elastyczności odłamów kostnych [27].

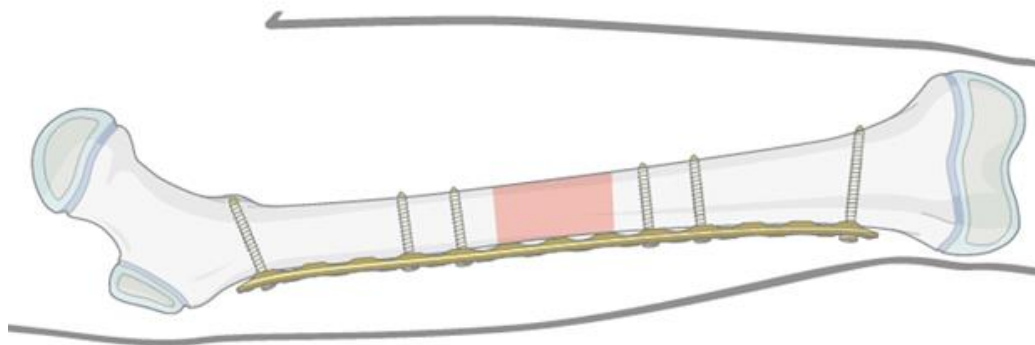
Płytki kostne są najczęściej stosowanymi implantami w operacyjnym leczeniu złamań. Do ich zalet, zaliczyć można wystarczającą stabilność, rozumianą jako odporność

na rozciąganie, ściskanie, skręcanie i zginanie [26]. Typowe procedury chirurgiczne dla płytek obejmują konieczność stabilizacji wkrętami dociśniętej bezpośrednio do powierzchni kości metalowej płytki. Technologia takiego mocowania wymaga pełnego, anatomicznego unieruchomienia odłamów kostnych oraz niewielkiej traumatyzacji tkanek miękkich. Rozwiązaniem, który umożliwia kompresję odłamów kostnych, są dynamiczne płytki kompresyjne DCP (ang. *Dynamic Comperssion Plate*). Wadą ich stosowania jest duże obciążenie i usztywnienie kości, co prowadziło do nierównomiernego rozkładu naprężeń, a co za tym idzie degradacji tkanki kostnej, na którą wpływ ma również niedostateczne ukrwienie pod powierzchnią płytki [27]. Aby uniknąć tego problemu, zmniejszono powierzchnię styku kości z płytką, poprzez zmianę jej kształtu. W ten sposób opracowano dynamiczne płytki kompresyjne z ograniczonym kontaktem LC-DCP (ang. *Limited Contact Dynamic Comperssion Plate*), które poprawiają ukrwienie kości pod płytką oraz zapewniają bardziej równomierny rozkład naprężeń względem płytki DCP [28]. Konwencjonalne płytki, które stabilizację opierają na siłach tarcia działających na płytkę podczas mocowania wkrętami i docisku w złamaniach przynasadowych i stawowych, mają ograniczoną odporność na stosowane obciążenia w porównaniu z mocowaniem blokującym [27]. Płytki blokowane LC-DCP są zalecane do stosowania w sytuacjach anatomicznych ograniczeń wprowadzania wkrętów kostnych, kości osteoporotycznych lub potrzeby podparcia odłamów pod stałym kątem. W tym rodzaju zespolenia, przenoszenie obciążeń pomiędzy płytką, a wkrętami nie zależy od siły tarcia między powierzchnią płytki a powierzchnią kości. Obecnie większość płytek kostnych ma rozbudowaną część okołostawową i otwory blokujące, a chirurg może zdecydować o rodzaju śruby, np. blokującej lub nieblokującej, w zależności od miejsca i rodzaju złamania [26], [27], [28].



Rysunek 5. A) Płytki kostne proste, B) płytki kostne kątowe [29]

Mocowanie złamań za pomocą płytek kostnych ma na celu zapewnienie niezbędnej stabilności mechanicznej na końcach złamania, a wszelkie mikroruchy powinny być unikane. Obecnie wiadomo jednak, że mikroruchy na końcach złamania mogą przyspieszyć gojenie się złamania, jednocześnie zmniejszając ryzyko opóźnionego zrostu lub jego całkowitego braku. Na tej podstawie opracowano nowe podejście do stabilizacji odłamów podczas leczenia operacyjnego [27]. Gojenie złamań poprzez sztywne unieruchomienie osiąga się poprzez pierwotny zrrost kostny, podczas gdy stabilizacja bez kompresji opiera się na aktywacji wtórnego zrrostu kostnego. W takich warunkach złamanie goi się szybciej, a wyleczona tkanka kostna ma lepsze właściwości mechaniczne. Na bazie tej koncepcji powstała nowa metoda leczenia złamań, minimalnie inwazyjna przezskórna osteosynteza płytkowa (MIPPO) (ang. *Minimally Invasive Percutaneous Plate Osteosynthesis*). Takie rozwiązanie promuje przyspieszenie gojenia, nie wpływa negatywnie na ukrwienie kości. Ponadto dzięki zastosowaniu małoinwazyjnej metody ograniczone zostaje uszkodzenie tkanek miękkich [30].



Rysunek 6. Schemat małoinwazyjnej przezskórnej osteosyntezy płytkowej MIPPO [31]

Gwoździe śródszpikowe są implantami najczęściej stosowanymi w przypadku zespołów kości długich. Umieszczane są w kanale szpikowym, przez co w ograniczony sposób wpływają na tkanki miękkie wokół złamania [32]. Z tego powodu gwoździe śródszpikowe mogą być skuteczniejszą metodą leczenia u pacjentów z przewlekłymi chorobami współistniejącymi, ponieważ te grupy pacjentów są bardziej narażone na powikłania pooperacyjne. Umożliwiają stabilne unieruchomienie złamań trzonu kości z wczesną mobilizacją stawów i obciążaniem kończyn, przyczyniając się do przyspieszenia rekonwalescencji. W przypadku złamań wymagających większej

stabilizacji, możliwe jest wprowadzenie śrub blokujących, prostopadle do kości [33]. Stosowane gwoździe śródszpikowe mają przekroje o różnych kształtach, które mogą być otwarte lub zamknięte. Wraz z długością gwoźdźca, determinuje to jego sztywność. W przypadku gwoździ blokowanych, w przenoszeniu obciążeń w znacznym stopniu uczestniczą też wkręty kostne. W połączeniu z działaniem środowiska korozyjnego, w tym miejscu może dochodzić do zniszczenia zespolenia poprzez złamanie lub odkształcenie plastyczne [34], [35].



Rysunek 7. Gwoździe śródszpikowe [36]

Ze względu na wymagania wytrzymałościowe stawiane implantom wykorzystywanym do zespolenia i stabilizacji odłamów kostnych, wykonywane są one głównie z biomateriałów metalowych. Ze względu na konieczność przenoszenia obciążeń w obrębie tkanki kostnej i materiału, biomateriał metalowy powinien charakteryzować się własnościami mechanicznymi zbliżonymi do własności mechanicznych kości [35]. Czas przebywania w organizmie oraz zachodzące w nim procesy metaboliczne, bakteriologiczne oraz odpornościowe warunkują konieczność dobrej odporności korozyjnej implantów w środowisku płynów ustrojowych. Ponadto przy wyborze materiału na stabilizator kostny należy zwrócić także szczególną uwagę na właściwości osteokonduktywne powierzchni, gdyż implanty przeznaczone do czasowego przebywania w organizmie nie powinny indukować nadmiernego narastania powierzchni tkanką kostną. Sytuacja taka doprowadzić może do traumatyzacji tkanki podczas usuwania implantu [34], [37].

Stali zaczęto używać do produkcji płytek kostnych już w latach 30. XX wieku [27]. Spośród nich, stale austenityczne, szczególnie typ 316L, najczęściej znajdują

zastosowanie jako materiał na implanty ze względu na najlepszą odporność korozyjną, wytrzymałość zmęczeniową, plastyczność, obrabialność i właściwości paramagnetyczne w porównaniu do innych gatunków stali (Tabela 1). Implanty wykonane ze stali 316L zapewniają wystarczające mocowanie fragmentów złamania. Jednak jej moduł Younga znacznie przewyższa moduł Younga kości korowej. Ponadto stal nie wykazuje wystarczającej odporności korozyjnej w środowisku płynów ustrojowych ze względu na obecność jonów chlorkowych i białek [35].

W porównaniu ze stalą, stopy tytanu charakteryzują się niższym modułem sprężystości, wyższą wytrzymałością, biokompatybilnością oraz wyższą odpornością na korozję wżerową w organizmie. To przyczyniło się do ich szerokiego zastosowania jako materiały do stabilizacji kostnej.

Tabela 1. Porównanie wartości modułu Younga wybranych materiałów metalowych z kością korową [35]

Materiał	316L	Ti6Al4V	Ti6Al7Nb	Kość korowa
Moduł Younga [GPa]	193	112	110	10-30

Ze względu na wysoką biokompatybilność oraz wartości modułu Younga zbliżone do modułu Younga tkanki kostnej, podejmowane były badania polimerów jako materiałów na implanty ortopedyczne. Jednakże ich głównym ograniczeniem są niskie własności mechaniczne, które mogą być niewystarczające do zapewnienia odpowiedniej stabilizacji odłamów kostnych, w szczególności kości długich. Mimo to, znalazły zastosowanie w chirurgii szczękowo-twarzowej [38].

4. Zakażenia okołowszczepowe

Istotnym problemem związanym z operacyjnym leczeniem złamań są zakażenia okołowszczepowe [39]. Inicjują je drobnoustroje, które kolonizują powierzchnię implantu tworząc na niej biofilm [40]. W jego wyniku dochodzi do powstania stanu zapalnego, początkującego proces resorpcji tkanki kostnej w okolicy zastosowanego stabilizatora. Prowadzi to do zaburzenia prawidłowej stabilizacji odłamów, a w konsekwencji nieprawidłowego lub całkowitego braku zrostu oraz zakażeń systemowych. W dużej mierze rozwój infekcji zależy od właściwości materiałowych implantu oraz stanu chorego [39]. Spośród właściwości powierzchni implantów mających wpływ na adhezję bakterii wymienić można zwilżalność powierzchni, skład chemiczny

oraz chropowatość. Wykazano, że rozwojowi biofilmu na stabilizatorach sprzyja wysokie rozwinięcie powierzchni oraz jej hydrofobowy charakter [41]

Leczenie zakażeń okołowszczepowych obejmuje ogólnoustrojową lub miejscową antybiotykoterapię, oczyszczenie powierzchni implantu i otaczających go tkanek z biofilmu bakteryjnego oraz usunięcie stabilizatora. Wybór odpowiedniego postępowania uzależniony jest ściśle od stopnia zaawansowania zakażenia oraz stabilności zespolenia [42]. Procedury te nie zawsze są skuteczne. Wynika to z faktu, że tworzące biofilm bakterie posiadają bardzo wysoką odporność na środki bakteriobójcze, a ponadto zmienione zapalnie tkanki ograniczają penetrację leku w miejsce wszczepu [43].

Z tego powodu po przeprowadzonym zabiegu implantacji, zalecane jest wdrożenie profilaktycznej, ogólnoustrojowej farmakoterapii, która według niektórych badań obniża ryzyko zakażenia do 5% [44]. Skuteczność profilaktyki zakażeń okołowszczepowych w dużej mierze zależy od szybkości jej wdrożenia, miejsca złamania oraz wielkości rany [39]. Obserwuje się bowiem drastyczny wzrost ryzyka infekcji po operacji w przypadku, gdy podczas złamania doszło do poważnego uszkodzenia tkanek miękkich (nawet 10-50%) [44].

5. Modyfikacje powierzchni stopów tytanu

Niska wartość modułu Younga stopów tytanu, zbliżona najbardziej spośród wszystkich materiałów metalowych do modułu sprężystości kości, wysoka odporność korozyjna w środowisku tkankowym, biokompatybilność, duża wytrzymałość względna R_m/ρ , decydują o ich szczególnej użyteczności w zastosowaniach na implanty do zespołów kostnych [45].

Stopy tytanu można sklasyfikować jako jednofazowe α , dwufazowe $\alpha+\beta$ oraz jednofazowe β , co opiera się na ich strukturze w stanie stabilnym [35]. Stopy dwufazowe $\alpha+\beta$ oraz jednofazowe β powstają poprzez podgrzanie materiału do temperatury, w której istnieje odpowiednia faza. Jednakże, z uwagi na niestabilność fazy β w temperaturze ciała człowieka, niezbędne jest dodanie pierwiastków stabilizujących tę fazę, takich jak wanad, molibden, niob, żelazo czy chrom. W medycynie najczęściej stosuje się stopy dwufazowe, do których należą m.in. Ti6Al4V i Ti6Al7Nb [46].

Stopy tytanu charakteryzują się zdolnością do samopasywacji, co przekłada się na ich wyjątkową odporność na korozję. Proces ten prowadzi do spontanicznego tworzenia

cienkiej, kilku nanometrowej warstwy pasywnej, zbudowanej z tlenków. Zewnętrzna część tej warstwy składa się z amorficznego dwutlenku tytanu (TiO_2), natomiast wewnętrzna zawiera niestechiometryczne tlenki TiO_{2-x} [34], [45], [47]. Warstwa pasywna wykazuje zdolność do odbudowy po uszkodzeniach mechanicznych lub w wyniku oddziaływania agresywnego środowiska. Oprócz tlenków tytanu, zawiera ona niewielkie ilości tlenków glinu i wanadu lub niobu, w zależności od składu stopu. Ich obecność może jednak prowadzić do niekorzystnych reakcji w organizmie, takich jak cytotoksyczność wywołana przez wanad czy osteomalacja spowodowana działaniem glinu [48]. Z tego powodu, bezwanadowy stop Ti6Al7Nb zyskuje przewagę nad Ti6Al4V .

Opisane powyżej skutki obecności jonów glinu w warstwie pasywnej są jednym z powodów dynamicznego rozwoju dziedziny modyfikacji powierzchni stopów, której celem jest poprawa biogodności oraz właściwości fizykochemicznych. Technologie stosowane w obróbce powierzchniowej można ogólnie podzielić na metody mechaniczne, chemiczne i fizyczne [49]. W zależności od wybranej metody możliwe jest uzyskanie różnych efektów, takich jak: zwiększenie odporności na ścieranie, podniesienie odporności na korozję, poprawa mechanicznego kontaktu między implantem a tkanką kostną, poprawa przewodnictwa elektrycznego i magnetycznego, zwiększenie biokompatybilności oraz bioaktywności, a także skrócenie czasu gojenia po wszczepieniu implantu [50].

Poza istotną poprawą biogodności, z punktu widzenia przydatności na implanty do osteosyntezy istotne jest również zapewnienie pożądanego sposobu oddziaływania powierzchni materiału na tkankę kostną. Na którą wpływ będzie miała zwilżalność i rozwinięcie powierzchni, a także skład chemiczny warstwy wierzchniej [37]. Niezależnie od tego, każda modyfikowana warstwa wierzchnia powinna charakteryzować się [51], [52]:

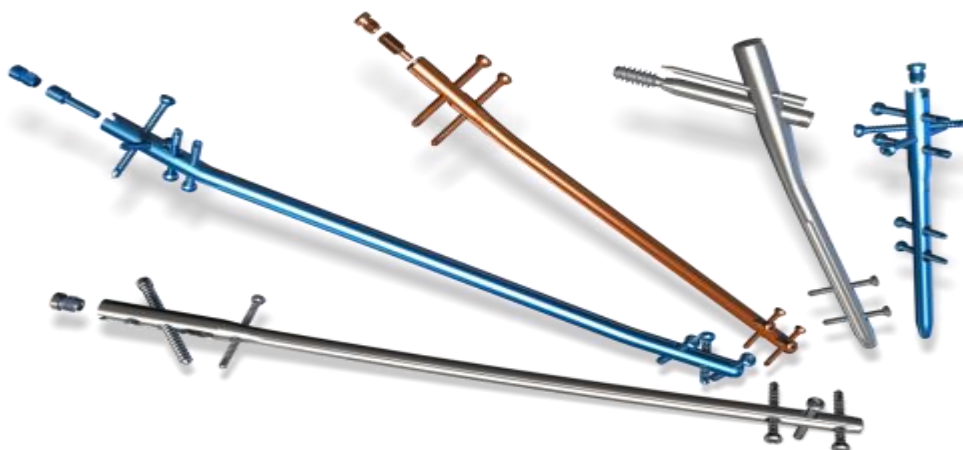
- odpowiednią wytrzymałością,
- odpowiednią funkcjonalnością,
- możliwością sterylizacji,
- niewielką grubością, aby nie wpływać na kształt i parametry mechaniczne implantu,
- odpowiednią adhezją,
- jednorodnością.

Zastosowanie obróbki mechanicznej, takiej jak szlifowanie, polerowanie czy też piaskowanie (obróbka strumieniowo-ścierna), pozwala na otrzymanie powierzchni o pożądanej topografii, która to determinować będzie oddziaływanie implantu z tkanką kostną [53]. Przykładowo, aby umożliwić przyrastanie tkanki kostnej należy zapewnić wysoką chropowatość powierzchni. Jedną z najpopularniejszych metod wykorzystywanych w inżynierii biomedycznej jest piaskowanie cząsteczkami węgliku krzemu, tlenkiem glinu, dwufazowymi fosforanami wapnia, a także cząsteczkami hydroksyapatytu z fosforanami wapnia [54]. Prowadzi to do wzrostu chropowatości oraz umocnienia warstwy wierzchniej, a także zmiany jej składu chemicznego. Otrzymane w ten sposób powierzchnie charakteryzują się dobrymi właściwościami osteoindukcyjnymi [50]. Powierzchnie o niższych wartościach chropowatości powierzchni $>1\mu\text{m}$, uzyskane na drodze polerowania elektrolitycznego lub mechanicznego, sprzyjają natomiast wzrostowi właściwości osteokonduktywnych [37], [55].

Opisany rodzaj modyfikacji stanowi najczęściej obróbkę wstępną, po których następują kolejne etapy przygotowania powierzchni. Obecnie najczęstszą końcową modyfikacją stanowi proces utleniania anodowego. Uzyskanie warstwy pasywnej TiO_2 o kontrolowanych własnościach możliwe jest poprzez sterowanie parametrami procesu, do których zalicza się: skład chemiczny elektrolitu, pH elektrolitu, temperaturę, napięcie prądu, gęstość prądu, warunki hydrodynamiczne oraz czas trwania procesu [56]. Skład chemiczny wykorzystywanej kąpeli decydować będzie w dużej mierze o składzie powstającej warstwy pasywnej, co pozwala na poprawę bioaktywności, bądź przeciwnie, w zależności od dobranych składników. Po utlenianiu anodowym w kąpielach na bazie kwasu H_3PO_4 , w warstwie pasywnej obecne są fosforany, co prowadzi do otrzymania powierzchni bardziej bioaktywnej w porównaniu do powierzchni uzyskanych w innych kąpielach [57].

Po procesie utleniania anodowego zachodzi poprawa odporności na korozję wżerową, która jest proporcjonalna do zastosowanego napięcia. Jednakże obniżeniu ulega wytrzymałość zmęczeniowa [56], [58]. Wartość użytego podczas procesu napięcia wpływa na grubość warstwy, a także jej morfologię. Ponadto grubość warstwy pasywnej, od której zależy otrzymany efekt kolorystyczny (Rysunek 8), rośnie szybciej w elektrolitach o odczynie kwasowym niż zasadowym [59]. Zastosowanie napięcia mniejszego od 40 V prowadzi do uzyskania warstwy nanorurek, która korzystna jest dla

dobrego przylegania cząsteczek hydroksyapatytu do podłoża. W ten sposób powstaje znacznie silniej związana i stabilniejsza warstwa [60]. W czasie prowadzenia procesu utleniania plazmowego możliwe jest wykorzystywanie prądu o napięciu wyższym niż 150 V [61], natomiast w przypadku utleniania iskrowego stosowane jest pulsacyjne napięcie w zakresie 200 – 500 V [62]. W wyniku obu tych procesów otrzymuje się warstwy porowate o zróżnicowanej, w zależności od warunków procesów, wielkości porów [63]. W celu otrzymania jednorodnej warstewki, dziedziczącej topografię podłoża, należy przeprowadzić natomiast proces przy średnich wartościach napięcia. Przy takich wartościach otrzymana warstwa pasywna dziedziczy topografię powierzchni, nie prowadząc do jej dużego rozwinięcia jak w przypadku wcześniejszych procesów, co wpływa korzystnie na własności osteokonduktywne stopu tytanu [34].



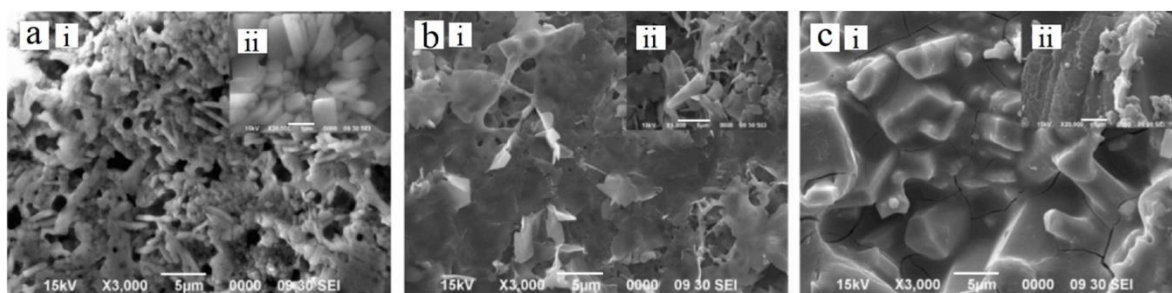
Rysunek 8. Gwoździe śródszkieletowe blokowane o różnej grubości warstwy pasywnej po utlenianiu anodowym [64]

Zastosowanie powłoki DLC (*ang. Diamond Like Carbon*), nanoszonej metodą CVD lub PVD, poprawia odporność na ścieranie, zużycie oraz wzrost twardości powierzchni stopu tytanu [65], [66]. Podobnie wzrost własności tribologicznych osiągnąć można poprzez azotowanie i węgloazotowanie powierzchni w procesach jarzeniowych, co zapewnia również poprawę odporności korozyjnej oraz wzrost twardości [34].

Poprawę własności stopów tytanu uzyskać można również przez nakładanie powłok metodą ALD (*Atomic Layer Deposition*), która pozwala na uzyskanie cienkich nanometrycznych powłok, dziedziczących topografię powierzchni [67]. Zastosowanie powłoki ZrO_2 poprawia odporność korozyjną stopu $Ti6Al7Nb$, obniżając jego zwilżalność [68]. Podobny wpływ obserwuje się w przypadku powłoki TiO_2 [69], [70].

Ponadto, niezależnie od ilości zastosowanych cykli nakładania, powłoka nie powoduje zmiany chropowatości powierzchni [69]. Dodatkowo stosowanie powłok ZrO₂ oraz TiO₂, sprawia, że implant posiada właściwości antybakteryjne i przeciwdrobnoustrojowe [71], [72], [73], co może pozwolić ograniczyć ryzyko infekcji po implantacji.

Często wykorzystywaną metodą modyfikacji powierzchni stopów tytanu jest nakładanie powłok hydroksyapatytowych. Takie połączenie prowadzi do poprawy biokompatybilności oraz odporności korozyjnej stopów tytanu, jednocześnie niwelując problem niewystarczających własności mechanicznych HAp w zastosowaniach na implanty kostne [74], [75]. Powłoka HAp, nałożona na powierzchnię stopów tytanu, stanowi barierę dla przenikających do środowiska tkankowego jonów pierwiastków stopowych. Badania biologiczne wykazały korzystny wpływ powłok na przebieg procesu regeneracji tkanki kostnej [76].



Rysunek 9. Powłoka HAp na podłożu ze stopu tytanu metoda zol-żel [77]

6. Powłoki polimerowe

Materiały polimerowe są grupą materiałów najczęściej wykorzystywanych w medycynie. Szerokie spektrum przeznaczenia materiałów polimerowych wynika z możliwości dostosowywania ich własności poprzez zmianę masy cząsteczkowej, składu chemicznego, uporządkowania struktury czy typu przyłączonych grup funkcyjnych [78]. Ponadto na właściwości polimerów wpływają również metody ich syntezy oraz przetwarzania. Materiały polimerowe powstają na drodze polimeryzacji, czyli reakcji chemicznej, w której monomery łączą się w cząsteczki o budowie łańcuchowej (polimery). Ze względu na przebieg procesu oraz rodzaj monomeru, polimeryzację można zaklasyfikować jako addycyjną lub kondensacyjną [79], [80]. Zarówno wśród polimerów naturalnych, jak i syntetycznych, wyróżnić można materiały niedegradowalne, bioresorbowalne oraz biodegradowalne [81]. Polimery biodegradowalne to takie, które w wyniku działania czynników biologicznych (mikroorganizmów, komórek

lub enzymów) ulegają degradacji na drodze hydrolizy, degradacji enzymatycznej, fotodegradacji lub oksydodegradacji [82]. Skutkiem zachodzących procesów jest rozpad cząsteczki polimeru na nieszkodliwe dla organizmu monomery. Z kolei produktami degradacji polimerów bioresorbowalnych są cząsteczki naturalnie występujące w organizmie. Degradacja hydrolityczna to złożony proces, którego pierwszy etap stanowi pobranie wody, po którym następuje rozerwanie wiązań estrowych z autokatalizą lub bez oraz dyfuzja i uwalnianie rozpuszczonych merów [79].

Jednym z kluczowych powodów wykorzystywania powłok polimerowych jest poprawa biokompatybilności materiałów podłoża [83]. Zastosowanie hybrydowej powłoki PCL/TiO₂ na podłożu tytanowym, nie tylko poprawiła jego biogodność, ale także bioaktywność oraz działanie przeciwdrobnoustrojowe (*S. aureus*), co może być przydatne w zapobieganiu potencjalnym zakażeniom [84]. Powłoka ze zmieszanego kwasu garbnikowego (TA) i glikolu polietylenowego (PEG), osadzona metodą zanurzeniową na stop Ti, zminimalizowała adhezję bakterii, zapobiegła tworzeniu się biofilmu i zmniejszyła przyleganie płytek krwi [85].

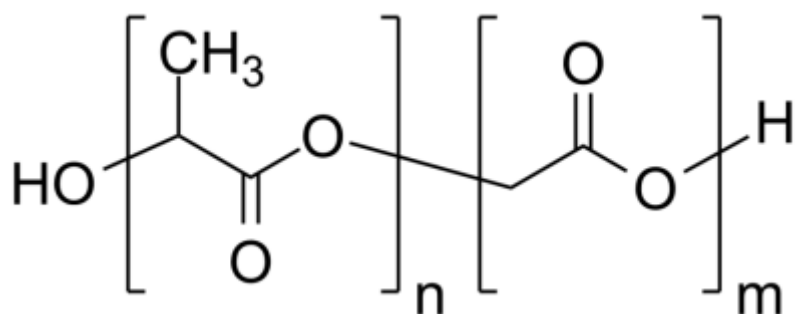
Poprawę odporności korozyjnej stentów ze stopów magnezu, uzyskano poprzez zastosowanie, zarówno powłoki PLGA, jak i PLA. Ponadto powłoka PLA wykazuje biogodność [86]. Odporność korozyjną poprawia też polimer pseudopeptydowy naniesiony na stent ze stali 316L [87].

Powłoki z biodegradowalnych powłok polimerowych, poza poprawą właściwości implantu, mogą stanowić także matrycę do uwalniania substancji leczniczych. W tym kontekście, jednym z najważniejszych zagadnień projektowania właściwości powłok polimerowych jest degradacja, czyli częściowy rozkład polimeru na produkty o dużych, lecz mniejszych od wyjściowego polimeru, masach cząsteczkowych. Czynniki inicjującymi degradację mogą być oddziaływania fizyczne (naprężenia, ciepło, promieniowanie wysokoenergetyczne) jak i chemiczne (tlen, agresywne media) [88]. Szybkość degradacji uzależniona jest od [89]:

- zwilżalności polimeru – związki hydrofilowe degradować będą szybciej niż hydrofobowe,
- stopnia uporządkowania – struktury krystaliczne degradują wolniej od struktur amorficznych. Wpływ na uporządkowanie struktury mają parametry procesu polimeryzacji oraz stosowane w nich katalizatory,

- masy cząsteczkowej – wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej polimeru wzrasta szybkość degradacji,
- stopnia rozwinięcia powierzchni w odniesieniu do objętości materiału – im mniejszy tym degradacja polimeru przebiega wolniej,
- obecności dodatków niskocząsteczkowych, która przyspiesza szybkość degradacji poprzez tworzenie dróg dyfuzji wody do wnętrza polimeru w miejscu wymytych dodatków.

Wśród materiałów polimerowych szerokie zastosowanie w medycynie posiada poli(laktyd-ko-glikolid) (PLGA) ze względu na jego biokompatybilność i biodegradowalność [90]. PLGA jest liniowym kopolimerem, który może być wytwarzany w różnych proporcjach między składowymi monomerami kwasu mlekowego i glikolowego (Rysunek 10) [91]. PLGA o niskiej masie cząsteczkowej można uzyskać przez kopolimeryzację kwasu mlekowego i glikolowego z otwarciem pierścienia. PLGA o wyższej masie cząsteczkowej może być syntetyzowany przy użyciu tego samego procesu z wykorzystaniem katalizatorów [92]. W procesie polimeryzacji kolejne jednostki monomeryczne kwasu glikolowego i mlekowego są łączone ze sobą wiązaniami estrowymi, w wyniku czego powstaje amorficzny poliester PLGA [93].



Rysunek 10. Wzór poli(laktyd-ko-glikolidu) (PLGA) [94]

W porównaniu z polimerami kwasu mlekowego, poli(kwasem mlekowym) i poli(kwasem glikolowym), PLGA pozwala na większą kontrolę szybkości degradacji. Ponadto może być zastosowany w formie skafoldów, powłok, włókien lub sfer [95], [96], [97].

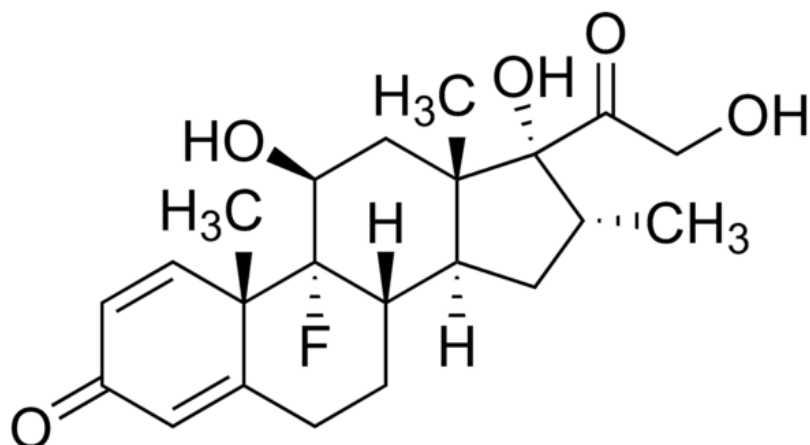
Wytrzymałość oraz szybkość degradacji PLGA zależą w dużej mierze od jego masy cząsteczkowej oraz długości łańcucha. Zwiększając jego masę molekularną można spowolnić degradację od kilku tygodni do nawet kilku miesięcy [98], [99]. Skład

kopolimeru (a dokładniej stosunek kwasu mlekowego i glikolowego) jest również ważnym czynnikiem wpływającym na degradację PLGA [93]. Kwas mlekowy jest bardziej hydrofobowy niż kwas glikolowy, co sprawia, że kopolimery PLGA bogate w laktyd są mniej hydrofilowe, absorbują mniej wody, a w związku z tym wolniej ulegają degradacji [100], [101].

Oprócz masy cząsteczkowej i składu kopolimeru, PLGA może podlegać kilku modyfikacjom końcowym (takim jak estrowe zamknięcie wolnej grupy końcowej kwasu karboksylowego), które znacząco wpływają na jego końcowe właściwości fizykochemiczne [102]. PLGA zakończony estrem może degradować wolniej nawet o kilka tygodni w porównaniu z bardziej hydrofilowym PLGA zakończonym kwasem, który ma podobną masę cząsteczkową i skład kopolimeru [93]. Ponadto PLGA może być funkcjonalizowany poprzez wprowadzanie grup hydroksylowych, aminowych i karboksylowych, które będą decydować o jego zwilżalności, a w konsekwencji kinetyce degradacji [103]. Szerokie spektrum możliwości kontrolowania kinetyki degradacji PLGA decyduje o jego wysokiej przydatności jako systemu doprowadzającego leki, zapewniając możliwość dopasowania ich uwalniania do zastosowania.

Istnieje wiele doniesień o skuteczności stosowania powłoki PLGA jako matrycy dostarczającej substancje aktywne [104]. Zanurzenie elektrod implantu ślimakowego w roztworze PLGA, zawierającym lek - deksametazon, pozwala na uwalnianie go w sposób ciągły, tym samym niwelując ryzyko infekcji wewnątrzślimakowej [105]. Powłoka PLGA pozwala także na uwalnianie w sposób kontrolowany streptokin [106]. Stosowanie powłoki PLGA zawierającej indometacynę, jako substancję aktywną, na implancie tytanowym, zapewniło trwałe, kontrolowane uwalnianie leku, jednocześnie poprawiając biokompatybilność stopu [104].

Wspomniany wcześniej deksametazon (DEX) (Rysunek 10) jest syntetycznym glikokortykosteroidem, fluorowaną pochodną prednizonu o długotrwałym i silnym działaniu przeciwzapalnym, przeciwalergicznym i immunosupresyjnym [107]. Ponadto DEX jest nie tylko immunomodulatorem i środkiem przeciwzapalnym, ale także lekiem osteogennym stosowanym w eksperymentalnych hodowli komórkowej w celu indukcji proliferacji i dojrzewania ludzkich komórek macierzystych szpiku kostnego [108], [109] oraz zwiększenia mineralizacji macierzy zewnątrzkomórkowej osteoblastów [110], [111]. Z tego powodu jego wykorzystanie w implantach do stabilizacji zrostu kostnego wydaje się obiecujące.

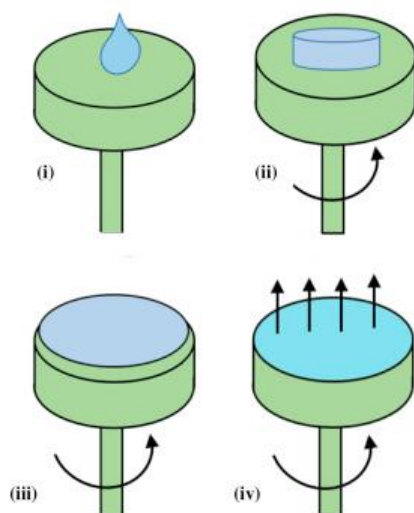


Rysunek 10. Wzór deksametazonu [112]

7. Metody nakładania powłok polimerowych

Istnieje wiele metod nanoszenia powłok polimerowych, których parametry mogą decydować o końcowych właściwościach uzyskanej powłoki. Wśród najpopularniejszych wymienić można: spin coating, metodę zanurzeniową (dip coating), zol-żel, polimeryzację plazmową oraz natryskiwanie (np. ultradźwiękowe).

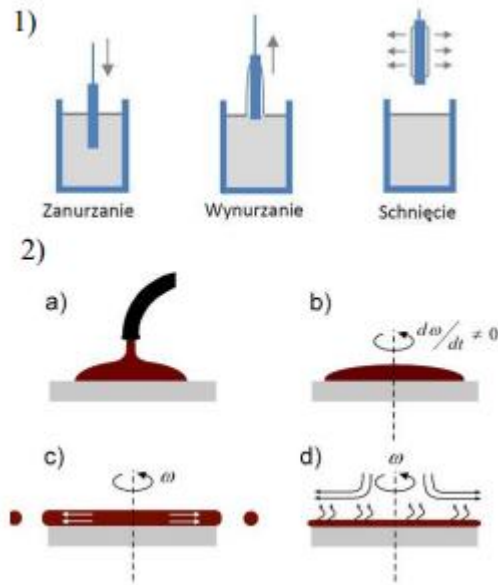
Metoda spin coatingu stosowana jest do wytwarzania cienkich warstw materiałów organicznych na płaskich powierzchniach [113]. Przebiega ona w czterech etapach: osadzanie, przyspieszanie, wirowanie i odparowanie (Rysunek 11). W pierwszym etapie materiał jest osadzany na stole obrotowym, który następnie jest przyspieszany do zadanej prędkości obrotowej, w której wiruje przez określony czas. Roztwór naniesiony na stół obrotowy jest rozprowadzany za pomocą siły odśrodkowej. Wysoka prędkość wirowania powoduje przerzedzenie warstwy. Po tym etapie następuje suszenie nałożonej warstwy [114]. Wysoko lotne składniki są usuwane z podłoża przez parowanie lub suszenie, a nisko lotne składniki roztworu pozostają na powierzchni podłoża [115]. Grubość osadzonej warstwy jest kontrolowana przez lepkość roztworu powlekającego i prędkość obrotową [116]. Do głównych wad tej metody zaliczyć można ograniczenie wielkości наносzonego elementu oraz duże straty materiałowe (ok. 95-98%) [117].



Rysunek 11. Schemat procesu spin coatingu [115]

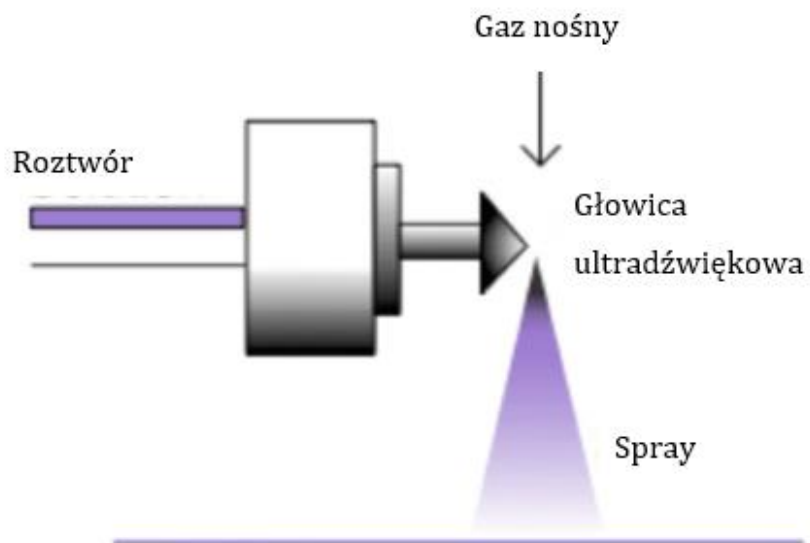
Polimeryzacja plazmowa to proces, w którym reakcja polimeryzacji jest inicjowana przez plazmę, która jest zwykle wykorzystywana do selektywnego osadzania molekuł lub rodników funkcjonalnych [118]. Proces ten składa się z dwóch etapów: wspomaganego plazmą chemicznego osadzania z fazy gazowej i polimeryzacji podczas osadzania, która obejmuje aktywację poprzez interakcję między cząsteczkami fazy gazowej i plazmy, a następnie osadzanie na podłożu [119]. Polimeryzacja plazmowa jest procesem wykorzystywanym do otrzymywania cienkich powłok polimerowych o wysokich masach cząsteczkowych bezpośrednio na powierzchni podłoża [120].

Metoda zol-żel, znajduje szerokie zastosowanie w osadzaniu cienkich powłok, umożliwiając dobrą kontrolę ich składu chemicznego. Zolem nazywa się zawiesinę koloidalną cząsteczek stałych w cieczy, natomiast żel jest efektem jego koagulacji, w wyniku której powstaje struktura sieci przestrzennej, uniemożliwiająca swobodne przemieszczanie cieczy [50]. Cały proces podzielić można na następujące etapy: hydroliza i polikondensacja, żelowanie, starzenie, suszenie, zagęszczenie i krystalizacja. Wśród technik nanoszenia powłok metodą zol-żel wyróżnić można pokrywanie natryskowe, przez zanurzenie, wirowe oraz przez nanoszenie kropli (Rysunek 12). Natomiast na parametry otrzymanej powłoki znaczący wpływ ma to w jakich warunkach przebiega żelowanie materiału [121]. Głównym atutem powłok nanoszonych metodą zol-żel jest osiągnięcie dobrych własności adhezyjnych otrzymanej powłoki do podłoża.



Rysunek 12. Nanoszenie powłok: 1) przez zanurzenie [122], 2) metodą wirową [123]

Natryskiwanie powłok realizować można różnymi metodami. Jedną z nich jest natryskiwanie ultradźwiękowe (Rysunek 13). Do nanoszenia wykorzystywany jest polimer w stanie ciekłym, który może stanowić roztwór, zół lub zawiesina [124]. Ciecz doprowadzona do dyszy jest najpierw rozbijana przez ultradźwięki na mgiełkę drobnych kropeł, a następnie w tej postaci rozpylana jest równomiernie na nanoszoną powierzchnię. Właściwości otrzymanej powłoki mogą być w ścisły sposób kontrolowane przez parametry procesu, do których zalicza się między innymi częstotliwość i moc ultradźwięków, prędkość przepływu roztworu, prędkość przesuwu głowicy, odległość między dyszą, a nanoszoną powierzchnią [125]. Zdecydowaną przewagą tej metody nad innymi jest duża wydajność i niewielkie straty materiałowe. Ponadto pozwala ona na otrzymywanie powłok o grubościach kontrolowanych nie tylko parametrami procesu, a ilością natryśniętych warstw, możliwe jest także wytworzenie powłok o strukturze kanapkowej [126].



Rysunek 13. Schemat natryskiwania ultradźwiękowego [127]

Podsumowanie przeglądu literatury

Analiza literatury wykazuje, że z powodu odpowiednich właściwości mechanicznych, a także dobrej odporności korozyjnej w środowisku tkankowym człowieka, stopy tytanu są jednymi z częściej stosowanych biomateriałów na implanty do osteosyntezy. Przez wiele lat uważano je za materiały biokompatybilne. Jednakże zgodnie z najnowszą wiedzą, produkty ich degradacji, którymi są jony pierwiastków stopowych, powodować mogą niepożądane reakcje okołowszczepowe oraz alergiczne. Ze względu na neurotoksyczność wanadu, coraz większą popularność zyskuje stop Ti6Al7Nb. Niemniej jego pierwiastki stopowe, w szczególności glin, również nie są obojętne dla organizmu człowieka. Z tego powodu obecnie głównym kierunkiem badań są metody modyfikacji ich powierzchni, których zadaniem jest ograniczenie tego niekorzystnego zjawiska. W tym celu najczęściej stosuje się utlenianie anodowe, które pozwala na otrzymanie warstwy wierzchniej, którą stanowią głównie tlenki tytanu. Właściwości warstwy pasywnej, w szczególności grubość, topografia i zwilżalność powierzchni oraz jej skład chemiczny zależą od parametrów procesu. Do parametrów tych zalicza się wartość napięcia, gęstość prądu, temperaturę, czas trwania procesu oraz oczywiście właściwości stosowanej kąpielii (skład chemiczny, temperatura, pH) jak również warunki hydrodynamiczne.

Problemy ze stosowaniem stopów tytanu na stabilizatory kostne mogłyby zostać rozwiązane poprzez zastąpienie ich biomateriałami o wyższej biokompatybilności, do których należy grupa materiałów polimerowych. Prowadzone są prace, których celem jest opracowanie systemów stabilizacji z polimerów biodegradowalnych. Ich niewątpliwą zaletą może stanowić brak konieczności reoperacji, który wynika z całkowitej degradacji materiału w środowisku tkankowym. Istnieje jednak duże ryzyko, że takie polimerowe systemy nie byłyby w stanie zapewnić odpowiedniej stabilizacji odłamów kostnych przez cały okres trwania leczenia, ze względu na spadek własności mechanicznych następujący wraz z niedostatecznie kontrolowaną degradacją polimeru. W następstwie braku stabilności złamania, może dochodzić do obluzowań, które skutkują nieprawidłowym lub całkowitym brakiem zrostu. W takim przypadku konieczne są kolejne zabiegi, aby oczyścić miejsce złamania z resztek implantu oraz na nowo ustabilizować odłamy kostne z wykorzystaniem metalowego systemu stabilizacji.

Słusznym zatem wydaje się połączenie tych dwóch materiałów, poprzez zastosowanie materiału polimerowego jako powłoki na implant ze stopu tytanu. W ten sposób metalowy rdzeń zapewni odpowiednią stabilizację złamania przez wymagany czas. Z kolei powłoka polimerowa spełniać będzie funkcję bariery, ograniczając przenikanie jonów pierwiastków stopowych do środowiska tkankowego.

Dotychczas prowadzone prace wskazują, że poli(laktyd-ko-glikolidu) PLGA jest materiałem o wysokiej biokompatybilności, znajdującym szerokie zastosowanie w medycynie. Analiza danych literaturowych wskazuje, że jako powłoka na stopach tytanu poprawia ich odporność korozyjną oraz biokompatybilność, skutecznie obniżając ilość jonów przenikających do środowiska tkankowego.

Jednym z najpoważniejszych problemów operacyjnego leczenia złamania, niezależnie od stosowanego systemu stabilizacji odłamów kostnych, jest ryzyko zakażenia okołowszczepowego, które występuje w przypadku 7-12% złamań otwartych. Inicjowane są one między innymi przez drobnoustroje kolonizujące powierzchnię implantu, tworząc na nim biofilm. Powstanie stanu zapalnego prowadzi do resorpcji tkanki kostnej, co w konsekwencji może spowodować obłuzowanie implantu i utratę stabilizacji miejsca złamania. Ponadto zakażenie przyczynia się do nieprawidłowego zrostu lub jego braku oraz zakażenia systemowego. Prowadzi to do wydłużenia czasu hospitalizacji oraz pogorszenia jakości życia pacjenta. Leczenie obejmuje najczęściej ogólnoustrojową antybiotykoterapię, która ze względu na utrudnioną penetrację leku do tkanek zmienionych zapalnie wykazuje obniżoną skuteczność. Większe powodzenie leczenia uzyskać można poprzez dostarczenie antybiotyku bezpośrednio w miejsce zakażenia. Profilaktyczna antybiotykoterapia zalecana przy operacyjnym leczeniu złamania, wprawdzie obniża ryzyko wystąpienia zakażenia do 5%, jednak nie likwiduje go całkowicie, jednocześnie działając ogólnoustrojowo.

Problem zakażeń okołowszczepowych można ograniczyć stosując do osteosyntezy implanty z powłoką polimerową, zawierającą substancję aktywną o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, będzie ona zapobiegać zakażeniu przez miejscowe dostarczenie leku, unikając konieczności ogólnoustrojowej antybiotykoterapii. Dodatkowo umieszczony w powłoce hydroksyapatyt, dzięki swoim właściwościom osteokonduktywnym, może stymulować zrost kostny. Szczególnie istotne wydaje się to w przypadku na przykład złamań kości osteoporotycznych lub wielopoziomowych. Ze względu na przebieg procesu leczenia zrostu kostnego, HAp powinien dostarczony być

przede wszystkim w drugim etapie, w fazie formowania się kostniny. Taki efekt można osiągnąć przez stworzenie powłoki o strukturze kanapkowej, która w zewnętrznej warstwie zawierać będzie lek, a w wewnętrznej hydroksyapatyt.

Powłoka polimerowa na powierzchni implantów stosowanych do stabilizacji odłamów kostnych powinna charakteryzować się ciągłością, dobrą adhezją do podłoża, jednorodnością właściwości fizycznych i chemicznych oraz nie powinna inicjować reakcji cytotoksycznych. Powinna ograniczać uwalnianie jonów pierwiastków stopowych do środowiska tkankowego oraz degradować w sposób kontrolowany, zapewniając ciągłe, stałe uwalnianie substancji. Ponadto istotne jest by wykazywała właściwości osteokonduktywne, na które wpływają między innymi zwilżalność oraz chropowatość powierzchni.

W literaturze opisywane są powłoki polimerowe, uwalniające leki, do zastosowań na implanty do osteosyntezy. Natomiast nadal brak jest danych dotyczących powłok, które zawierają równocześnie substancje aktywne oraz hydroksyapatyt. Ponadto w aspekcie opisywanych powłok niewiele jest również prac reprezentujących kompleksowe podejście, które obejmuje jednocześnie zarówno badania właściwości fizykochemicznych, jak i badania właściwości biologicznych.

II. BADANIA WŁASNE

1. Cel i teza pracy

Stopy tytanu znajdują szerokie zastosowanie jako implanty w ortopedii i traumatologii. Pomimo wieloletniego przekonania o ich pełnej biogodności, obecny stan wiedzy wskazuje, że uwalniające się z ich powierzchni, w wyniku degradacji, jony pierwiastków stopowych mogą powodować niepożądane reakcje okołowszczepowe oraz ogólne. Z tego powodu obecnie jednym z głównych kierunków badań w dziedzinie inżynierii biomateriałów jest modyfikowanie powierzchni implantów, w celu poprawy ich biokompatybilności. Obok biogodności wykorzystywanych na implanty materiałów, istotnym problemem związanym z operacyjną stabilizacją złamań jest ryzyko zakażenia okołowszczepowego, które w znaczny sposób wpływa na sukces leczenia. Analiza danych literaturowych wskazuje, że zastosowanie powłoki polimerowej na powierzchni stopu tytanu, ogranicza uwalniania jonów z powierzchni oraz poprawia ich biokompatybilność i odporność korozyjną. Implanty pokryte biodegradowalnym polimerem mogą ponadto stanowić nośnik do uwalniania substancji aktywnej, dostarczając antybiotyków bezpośrednio w miejsce złamania. Wciąż jednak niewiele jest danych opisujących wykorzystanie w takich powłokach hydroksyapatytu, a także kompleksowej oceny ich właściwości fizycznych i chemicznych, które mają wpływ na osteokonduktywność implantu. Właściwości osteokonduktywne implantów są szczególnie istotne w przypadku stosowania czasowej stabilizacji.

Na podstawie analizy literatury oraz wyników badań własnych, dotyczących modyfikowania powierzchni stopów tytanu przez nakładanie powłok polimerowych, sformułowano cel pracy.

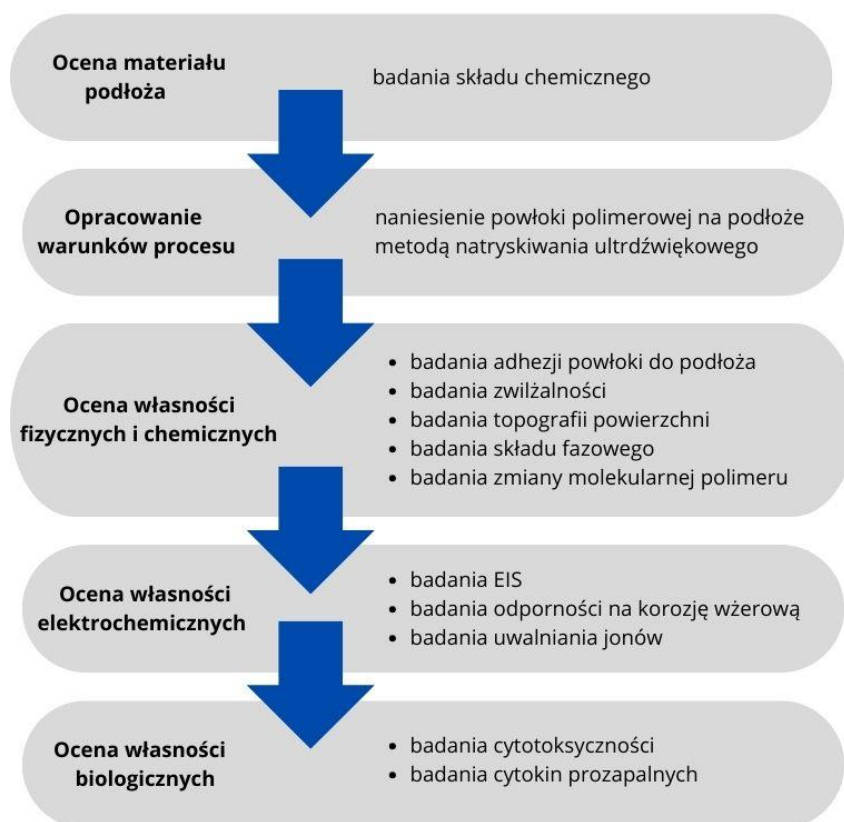
Celem pracy jest ocena właściwości fizycznych i chemicznych biodegradowalnych powłok polimerowych, zawierających hydroksyapatyt oraz substancję aktywną, naniesionych na powierzchnie stopu Ti6Al7Nb wykorzystywanego na implanty do osteosyntezy.

Opracowanie procesu wytwarzania powłok na biomateriałach i weryfikacja ich przydatności do zastosowań klinicznych należą do zagadnień inżynierii biomedycznej.

Aby zrealizować przedstawiony cel opracowano metodologię wytworzenia oraz oceny własności fizycznych, chemicznych oraz biogodności naniesionej na stop tytanu powłoki. Na podstawie analizy literaturowej sformułowano następującą tezę pracy:

Poprawa biokompatybilności implantów ze stopu Ti6Al7Nb oraz wspomaganie procesu regeneracji tkanki kostnej jest możliwe przez zastosowanie biodegradowalnych powłok polimerowych, zawierających hydroksyapatyt i substancję aktywną.

W celu weryfikacji postawionej tezy opracowano plan badawczy przedstawiony na schemacie blokowym (Rysunek 14). Do badań wykorzystano stop Ti6Al7Nb, na powierzchnię którego naniesiono powłokę z PLGA o strukturze kanapkowej, która zawiera hydroksyapatyt i substancję aktywną (deksametazon). Stop Ti6Al7Nb wybrano jako materiał powszechnie wykorzystywany w ortopedii i traumatologii. Na materiał powłoki wytypowano dobrze scharakteryzowany w literaturze polimer PLGA. HAp wybrano z powodu jego właściwości osteokonduktywnych oraz bioaktywnych. Natomiast wybór deksametazonu uwarunkowany był jego przeciwzapalnym działaniem.



Rysunek 14. Schemat programu badań

2. Materiał do badań

Do badań wykorzystano próbki ze stopu tytanu Ti6Al7Nb w postaci krążków o średnicy 25 mm i grubości 1 mm, których skład chemiczny został przedstawiony w Tabeli 2. Skład chemiczny oraz własności wytrzymałościowe zastosowanego stopu spełniały zalecenia normy ISO 5832-11 [128].

Tabela 2. Skład chemiczny stopu Ti6Al7Nb

	Stężenie pierwiastków [%]							
	Al	Nb	C	Fe	N	O	Ta	Ti
Analiza wytopu	6,18	6,97	0,006	0,14	0,005	0,17	<0,001	reszta

Próbki Ti6Al7Nb przygotowano, stosując wstępną obróbkę powierzchniową, na którą składało się kolejno szlifowanie, piaskowanie oraz utlenianie anodowe (Tabela 3). Po każdym etapie modyfikacji krążki czyszczone ultradźwiękowo w 96% roztworze alkoholu etylowego, przez $t = 10$ min, w temperaturze pokojowej.

Tabela 3. Warunki wstępnej obróbki powierzchniowej

Obróbka powierzchniowa	Warunki procesu
Szlifowanie	papiery ściernie SiC o ziarnistości: 180, 300, 500, 800, siła nacisku 5N, t = 3 min na każdej gradacji papieru
Piaskowanie	kulki szklane SiO ₂ o średnicy 70 – 120 μm, t = 2 min
Utlenianie anodowe	elektrolit Titan Color (POLIGRAT GmbH) na bazie kwasu fosforowego i siarkowego, pH = 0,5 ÷ 0,6, napięcie 97 V, temperatura pokojowa, t = 2 min

2.1. Modyfikacja powierzchni

W kolejnym etapie powierzchnię stopu tytanu po wstępnej obróbce powierzchniowej poddano modyfikacji poprzez naniesienie powłoki polimerowej. Powłokę osadzano metodą natryskiwania ultradźwiękowego z wykorzystaniem urządzenia ExactaCoat (SonoTek) wyposażonego w głowicę Impact. Metoda ta umożliwia generowanie ultradźwięków o określonej częstotliwości, które rozbijają roztwór polimeru, tworząc aerozol rozpylany na modyfikowaną powierzchnię.

Do wytworzenia powłoki zastosowano poli(laktyd-ko-glikolid) PLGA o udziale komonomerów 85:15, zsyntezowany na drodze polimeryzacji z otwarciem pierścienia glikolidu (Purac) i D,L-laktydu (Purac) w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych Polskiej Akademii Nauk w Zabrze. D,L-laktyd wstępnie oczyszczono przez rekrytalizację z bezwodnego octanu etylu, a następnie wysuszono w piecu próżniowym w temperaturze pokojowej. Polimeryzację prowadzono początkowo w temperaturze $T = 130^{\circ}\text{C}$ przez 24 godziny, a następnie w temperaturze $T = 120^{\circ}\text{C}$ przez 48 godzin w atmosferze argonu, używając acetyloacetonianu cyrkonu (IV) (Sigma Aldrich) jako nietoksycznego inicjatora reakcji. Masę molową (M_n) otrzymanego polimeru oznaczono metodą chromatografii żelowej GPC (chromatograf Physics SP 8800, detektor: Shodex SE 61), która wynosi $M_n = 74$ kDa.

W kolejnym etapie, w celu uzyskania powłoki o strukturze kanapkowej, przygotowano trzy różne roztwory:

I. 1% roztwór PLGA w chlorku metylenu (Sigma Aldrich),

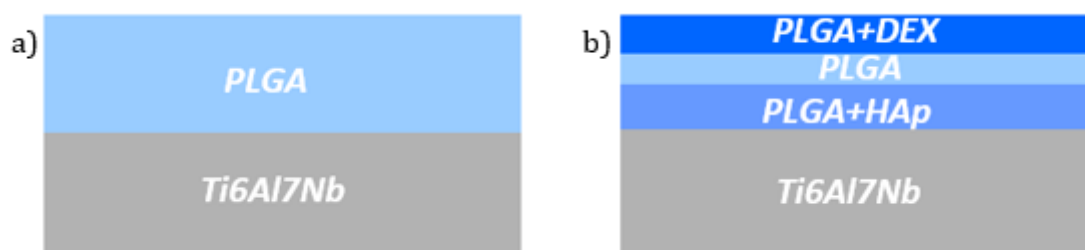
- II. 1% roztwór PLGA w chlorku metylenu, zawierający hydroksyapatyt (Sigma Aldrich) w ilości 20% wagowych polimeru,
- III. 1% roztwór PLGA w chlorku metylenu, zawierający deksametazon (Merck) w ilości 20% wagowych polimeru.

Parametry nanoszenia (Tabela 3.), zawartość HAp, oraz ilość tworzących powłokę warstw (ilość warstw odpowiada liczbie pojedynczych natryśnięć), zostały opracowane na podstawie przeprowadzonych wcześniej przez autorkę badań wstępnych [129], [130]. Powłoki nanoszono jedynie na jedną stronę próbek.

Do badań wykorzystano trzy rodzaje próbek:

- próbki utleniane anodowo - Ti6Al7Nb
- próbki utleniane anodowo z naniesionymi 15 warstwami poli(laktyd-ko-glikolidu) – PLGA (Rysunek 15a),
- próbki utleniane anodowo z naniesionymi: 15 warstwami poli(laktyd-ko-glikolidu) zawierającymi HAp, 2 warstwami poli(laktyd-ko-glikolidu) oraz 5 warstwami poli(laktyd-ko-glikolidu) zawierającymi deksametazon - HAp+DEX (Rysunek 15b).

Zastosowanie warstwy przejściowej w postaci PLGA, wynika z delaminacji powłoki, która zaobserwowana została podczas bezpośredniego nakładania warstwy zawierającej deksametazon na powłokę z hydroksyapatytem.



Rysunek 15. Schemat warstw naniesionych na powierzchnię stopu Ti6Al7Nb, a) PLGA, b) HAp+DEX

Tabela 4. Parametry procesu nanoszenia powłok na powierzchnię stopu Ti6Al7Nb

Parametry nanoszenia	
Częstotliwość ultradźwięków	60 kHz
Moc ultradźwięków	1,5 W
Prędkość przepływu roztworu	1 cm ³ /min
Prędkość przesuwu głowicy	5 mm/s

Ciśnienie kurtyny powietrza	2 Pa
-----------------------------	------

Po zakończonym procesie nanoszenia próbki pozostawiono do wysuszenia na 48 godzin w temperaturze otoczenia. Ostatnim etapem przygotowania próbek była sterylizacja radiacyjna przeprowadzona z energią 10 MeV i dawką 25 kGy.

2.2. Ekspozycja na roztwór PBS

W celu określenia wpływu warunków symulujących środowisko płynów ustrojowych na analizowane próbki poddano je ekspozycji na działanie roztworu PBS (producent) (ang. *Phosphate Buffered Saline*) o pH = 7,4 (Tabela 5) w temperaturze $T = 37 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Każdą próbkę moczo w $0,1 \text{ dm}^3$ roztworu przez okres trzech, sześciu i dziewięciu tygodni. W celu ekspozycji na roztwór jedynie powierzchni próbek z naniesionymi powłokami zastosowano specjalne uchwyty.

Tabela 5. Skład roztworu PBS

Składnik	Stężenie [mol/dm^3]
NaCl	0,14
KCl	0,0027
Jony fosforanowe (PO_4^{3-})	0,01

3. Metodyka badań

3.1. Badania składu chemicznego warstwy wierzchniej

W celu określenia wpływu warunków modyfikacji powierzchni stopu Ti6Al7Nb przeprowadzono badania składu warstwy wierzchniej. W wyniku utleniania anodowego na powierzchni stopów tytanu dochodzi do wytworzenia warstwy pasywnej, której skład chemiczny zależy od rodzaju pierwiastków stopowych. Ponadto warstwa wierzchnia może zawierać pierwiastki wchodzące w skład stosowanych ścierniw oraz kąpieli. Do określenia składu chemicznego warstwy pasywnej badanego stopu wykorzystano rentgenowską spektrometrię fotoelektronów (XPS, *X-ray photoelectron spectroscopy*). Badania XPS przeprowadzono przy użyciu spektrometru Prevac wyposażonego

w monochromatyzowane źródło promieniowania rentgenowskiego Al K α o energii wzbudzenia 1486,6 eV i dwuwiązkowy neutralizator ładunku. Do kalibracji skali energii wiązania analizatora (BE) wybrano główny składnik C 1s i przypisano go do BE = 284,6 eV [131], [132]. Trawienie próbki wiązką jonów Ar⁺ ze stałą szybkością rozpylania pozwoliło uzyskać chemiczny profil głębokości.

Dane XPS zostały skwantyfikowane przy użyciu oprogramowania CASA XPS. Dopasowanie piku przeprowadzono głównie przy użyciu krzywej iloczynu Gaussa (70%) i Lorentza (30%) (GL) po odjęciu tła typu Shirley'a. W przypadku składników metalicznych wpływ asymetrii został uwzględniony w postaci funkcji LA, w której skorygowano rozrzut ogona Lorentza po jednej stronie składnika [133]. Niepewność określonej pozycji składnika XPS oszacowano na 0,07 eV.

3.2. Badania morfologii powierzchni

Badania morfologii powierzchni przeprowadzono z wykorzystaniem:

- *mikroskopii świetlnej*

Do badań użyto mikroskopu cyfrowego Leica DVM6. Zdjęcia powierzchni wykonano przy powiększeniach 40x dla próbek w stanie wyjściowym oraz po ekspozycji na działanie roztworu PBS.

- *skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM)*

Powierzchnię próbek analizowano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM, *ang. scanning electron microscope*) Quanta 250 FEG (Thermo Fisher Scientific), pracującego w warunkach niskiej próżni (80 Pa) i napięciu przyspieszającym 10 kV z elektronów wtórnych zbieranych przez detektor dużego pola. Obserwacje przeprowadzono dla próbek w stanie wyjściowy i po ekspozycji.

- *profilometrii optycznej*

Badania przeprowadzono za pomocą profilometru optycznego Leica DCM8 metodą różnicowania konfokalnego. Zastosowano zielone światło i powiększenie 20x. Analizowany obszar wynosił 880 μm x 660 μm w każdym pomiarze. Uzyskane wyniki zostały przeanalizowane przy użyciu oprogramowania Leica Map Premium. Wyznaczono parametry Ra i Sa zgodnie z zaleceniami normy ISO 25178 [151]. Badania wykonano dla próbek w stanie wyjściowym oraz po moczeniu w roztworze PBS.

3.3. Badania zwilżalności powierzchni

Badania zwilżalności powierzchni przeprowadzono metodą siedzącej kropli. Pomiary kąta zwilżania (θ) przeprowadzono za pomocą tensjometru optycznego Attension Theta Flex (Biolin Scientific) i analizowano za pomocą oprogramowania OneAttension. Testy przeprowadzono przy użyciu wody destylowanej o wielkości kropli $1,5 \text{ mm}^3$. Pomiar rozpoczął się 15 s po osadzeniu kropli i trwał 60 s z częstotliwością próbkowania 1 Hz. Analizę kąta zwilżania przeprowadzono dla próbek w stanie wyjściowym oraz po ekspozycji na działanie roztworu PBS.

3.4. Badania adhezji powłoki do podłoża

Badania przyczepności powłok polimerowych do podłoża przeprowadzono metodą scratch test, przy użyciu otwartej platformy CSM, wyposażoną w MicroCombi Tester (Anton Paar). Do testów wykorzystano diamentowy stożek Rockwella. Siła obciążenia wzrastała od 0,03 do 30 N. Prędkość obciążenia była stała i wynosiła 10 N/min, prędkość przesuwu stołu 1 mm/min, a długość zarysowania 3 mm. Ze względu na trudności w oszacowaniu siły krytycznej (F_n), powodującej całkowite uszkodzenie powłoki, za pomocą obserwacji mikroskopowych, zaproponowano porównanie uzyskanej siły tarcia w funkcji długości zarysowania dla próbek niepowlekanych i powlekanych. Pierwszy punkt przecięcia krzywych potraktowano jako moment przerwania ciągłości powłoki [134].

Ponadto w celu jakościowego określenia adhezji powłoki polimerowej do metalowego podłoża oraz jej jednorodności zastosowano skaningową mikroskopię akustyczną (SAM, *ang. scanning acoustic microscopy*). Badania przeprowadzono przy użyciu mikroskopu skaningowego KSI Evo II. Testy wykonano z użyciem głowicy szafirowej o częstotliwości 75 MHz w trybie skanowania powierzchni C-scan i tomografii akustycznej w trybie X-scan, natomiast medium sprzęgające stanowiła woda demineralizowana o pH 7,4. Badania zostały przeprowadzone w temperaturze pokojowej. Skany wykonano dla zewnętrznej powierzchni powłoki, w jej wnętrzu i na granicy faz metalowe podłożo-polimer. Ocenie adhezji powłoki do podłoża zarówno metodą scratch testu, jak i SAM, poddano próbki w stanie wyjściowym oraz po moczeniu w roztworze PBS.

3.5. Badania składu fazowego

Badania składu fazowego przeprowadzono metodą dyfrakcji rentgenowskiej (XRD, ang. *X-ray diffraction*) przeprowadzono przy użyciu dyfraktometru D8 Advance (Bruker, Karlsruhe, Niemcy) z katodą Cu-K α ($\lambda=1,54 \text{ \AA}$) pracującego przy napięciu 40 kV i prądzie 40 mA. Szybkość skanowania wynosiła $0,60^\circ/\text{min}$ z krokiem skanowania $0,02^\circ$ w zakresie od 5° do $90^\circ 2\theta$. Identyfikację dopasowanych faz przeprowadzono za pomocą programu DIFFRAC.EVA z wykorzystaniem Otwartej Bazy Danych Krystalograficznych (COD) i bazy danych Międzynarodowego Centrum Danych Dyfrakcyjnych (ICDD PDF#2), natomiast dokładne parametry sieci i współrzędne atomowe dopasowanej fazy obliczono za pomocą dopasowania Rietvelda w programie TOPAS 6, w oparciu o teorię Williamsona-Halla [135], [136]. W opisie profili linii dyfrakcyjnych przy dopasowaniu Rietvelda wykorzystano funkcję pseudo-Voigta. Parametry R_{wp} (ang. *weighted-pattern factor*), R_{exp} (ang. *expected R factor*) i GOF (ang. *goodness-of-fit*) zostały użyte jako numeryczne kryteria jakości dopasowania krzywej modelowanej do eksperymentalnych danych dyfrakcyjnych [137]. Kształty pików, parametry sieci krystalicznej, rozmiar krystalitów i odkształcenie sieci krystalicznej były dopasowywane jednocześnie [135], [136], [138]. Po uzyskaniu wstępnego dopasowania, do analizy włączono pozycje atomowe i ostatecznie izotropowe współczynniki temperaturowe, w celu uzyskania dokładnego dopasowania krzywej modelowej do krzywej eksperymentalnej.

Ze względu na specyficzny rodzaj badanej powłoki, opartej na fizycznej mieszaninie bioresorbowalnego polimeru i hydroksyapatytu, oraz głębokość penetracji promieniowania rentgenowskiego, która jest większa niż grubość powłoki, zastosowano własną metodologię. Próbkę wyjściową przebadano pięciokrotnie i obliczono zawartość wagową wszystkich faz krystalicznych metodą Rietvelda. Pozwala to określić średni udział wagowy cząstek HAp w próbce początkowej i śledzić jej zmiany podczas degradacji powłoki.

3.6. Badania elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej

Pomiary elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (EIS, ang. *Electrochemical impedance spectroscopy*) przeprowadzono przy użyciu potencjostatu-galwanostatu PARSTAT 4000A z analizatorem odpowiedzi

częstotliwościowej (Ametek). Oprogramowanie VersaStudio 2.62.2 zostało wykorzystane do sterowania konfiguracją testową. Do badań wykorzystano układ trójelektrodowy, składający się z elektrody odniesienia, której funkcję spełniania nasycona elektroda kalomelowa (SCE ang. *Saturated Calomel Electrode*) z kapilarą Ługina, przeciwelektrody w formie platynowanej płytki tytanowej o powierzchnia czynnej ok. 9,5 cm² oraz elektrody roboczej, którą stanowiła próbka. Pomiary prowadzono w roztworze PBS (Tabela 5) w temperaturze 37⁰C. Powierzchnia próbki wystawionej na działanie elektrolitu wynosiła 0,283 cm². W pierwszym etapie badania mierzono potencjał obwodu otwartego (E_{OCP}) przez 1 godzinę. Następnie, po ustabilizowaniu się potencjału, przeprowadzono EIS przy E_{OCP} z sygnałem sinusoidalnym o amplitudzie 10 mV RMS, zakresie częstotliwości (f) 100 000-0,01 Hz i 5 punktach na dekadę. Badaniom poddano próbki w stanie wyjściowym oraz po 3, 6 i 9 tygodniach przebywania w roztworze. Dla każdego badanego wariantu wykonano 4 równoległe pomiary.

3.7. Badania odporności na korozję wżerową

Badania odporności korozyjnej przeprowadzono metodą potencjodynamiczną z wykorzystaniem potencjostatu AUTOLAB PGSTAT302N z oprogramowaniem Nova 2.1. Do badań wykorzystano trójelektrodowy układ, składający się z elektrody odniesienia, której funkcję spełniania elektroda chlorosrebrowa (Ag|AgCl w 3M KCl) z kapilarą Ługina, przeciwelektrody w postaci drutu platynowego oraz elektrody roboczej, którą była próbka. Pomiary prowadzono w roztworze PBS (Tabela 5) w temperaturze 37⁰C. Powierzchnia próbki wystawionej na działanie elektrolitu wynosiła 4,9 cm². W pierwszym etapie badania mierzono potencjał obwodu otwartego (E_{OCP}) przez 1 godzinę. Po ustabilizowaniu się potencjału rozpoczęto rejestrację krzywych potencjodynamicznych, przebiegającą trójetapowo:

I Rejestracja krzywej od potencjału E_{start} = E_{OCP} - 200 mV do potencjału E_{stop} = E_{OCP} + 200 mV, z szybkością skanowania 0,1 mV/s. Na podstawie zarejestrowanej krzywej metodą Sterna wyznaczono potencjał korozyjny E_{kor},

II Rejestracja krzywej od potencjału E_{start} = E_{OCP} - 100 mV do potencjału E_{stop} = E_{OCP} + 100 mV, z szybkością skanowania 0,1 mV/s. Na podstawie zarejestrowanej krzywej metodą Tafela wyznaczono opór polaryzacyjny R_p,

III Rejestracja krzywej potencjodynamicznej od potencjału $E_{\text{start}} = E_{\text{OCP}} - 100 \text{ mV}$ do osiągnięcia wartości potencjału $E = 2\text{V}$ lub gęstości prądu $j = 1 \text{ mA/cm}^2$, po którym następowała zmiana kierunku polaryzacji. Szybkość skanowania wynosiła $0,3 \text{ mV/s}$.

Po I i II etapie, by powrócić do stanu równowagi, przez 15 min ustalano potencjał otwarcia E_{OCP} .

3.8. Badania przenikalności jonów

Analizę ilości jonów metali, które przeniknęły do roztworu z powierzchni badanych próbek przeprowadzono metodą emisyjnej spektrometrii atomowej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP-AES, *ang. Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy*). W badaniach wykorzystano spektrometr emisyjny JY 2000 firmy Jobin-Yvon. Wyznaczono stężenie jonów Ti, Al i Nb. Ponadto w celu określenia kinetyki uwalniania HAp, analizowano ilość jonów Ca oraz P. Krzywe wzorcowe opracowano dla materiałów wzorcowych firmy Merck. Badaniom poddano roztwory po przetrzymywaniu w nich próbek przez okres 3, 6 i 9 tygodni.

Otrzymane wyniki przedstawiono jako gęstość jonów uwalnianych z jednostki powierzchni stosując następujące przeliczenie:

$$d = \left(\frac{\text{ppm} \times V}{s} \right) \times 1000 \quad (1)$$

gdzie:

d – gęstość jonów uwalnianych z powierzchni [$\mu\text{g/cm}^2$],

ppp – ilość jonów w roztworze,

V – objętość roztworu,

s – pole powierzchni próbki.

3.9. Badania zmiany masy molekularnej polimeru

W celu zdeterminowania degradacji badanych powłok polimerowych, przeprowadzono analizę zmiany masy molowej (M_n) metodą chromatografii żelowej (GPC, *ang. Gel Permeation Chromatography*) z wykorzystaniem chromatografu Physics SP 8800, wyposażonego w detektor: Shodex SE 61. Na podstawie otrzymanych wyników wyznaczono procentowy ubytek masy (WL%), zgodnie z następującym równaniem:

$$WL(\%) = \frac{W_0 - W_{\text{dry}}}{W_0} \times 100\% \quad (2)$$

gdzie:

W_0 - masa początkowa,

W_{dry} - masa końcowa materiałów suszonych pod próżnią, aż do osiągnięcia stałej masy.

3.10. Badania cytotoksyczności

Badanie cytotoksyczności zostało przeprowadzone metodą bezpośrednią zgodnie z normą ISO 10993-5:2009 [152] na fibroblastach ludzkich dermalnych NHDF (PromoCell C-12302). Jako medium wykorzystano suplementowany PromoCell Fibroblast Growth Medium 2 wzbogacony antybiotykami (Sigma Aldrich Antibiotic Antymycotic Solution). W celu zapewnienia wiarygodności statystycznej z każdego rodzaju próbki wykorzystano 3 sztuki. Jako materiał odniesienia wykorzystano polistyren (PS). Znad próbek przed wybarwieniem pobrane zostało medium hodowlane w celu oceny poziomu dehydrogenazy mleczanowej (LDH, ang. *lactate dehydrogenase*). LDH jest cytoplazmatycznym enzymem uwalnianym po rozerwaniu błony komórki nekrotycznej lub apoptycznej, dlatego jego aktywność mierzy się w celu wykrycia cytotoksycznego działania materiałów lub czynników środowiskowych.

Żywotność komórek została oceniona po 48-godzinnej inkubacji przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej. W barwieniu komórek zastosowano FDA (tetraoctan fluoresceiny) i PI (jodek propidyny). Lipofilowy FDA przenika przez nienaruszoną błonę komórkową w żywym i aktywnym metabolicznie środowisku. Dioktan jest rozkładany przez esterazy komórkowe na fluoresceinę - substancję lipofobową. Fluoresceina gromadzi się w cytoplazmie żywych komórek i ma charakter substancji fluorescencyjnej. Substancja po oświetleniu niebieskim światłem daje zielony sygnał. Jodek propidyny jednak przenika wewnątrz 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.

3.11. Badania cytokin prozapalnych

Badanie ilościowej reakcji zapalnej przeprowadzono z wykorzystaniem testów Invitrogen Cytokine ELISA kits (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 (Thermo Fisher). Podstawą kolorymetrycznych metod oznaczania jest zależność między absorbancją, a stężeniem oznaczanego składnika w badanym roztworze.

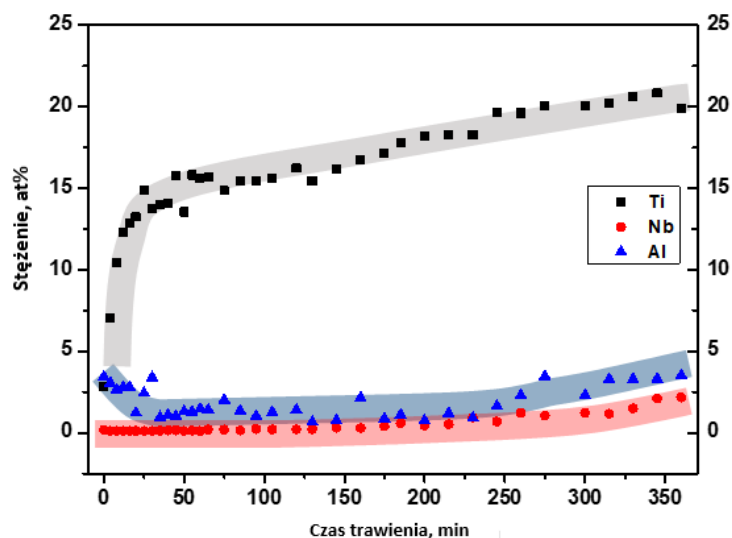
4. Wyniki badań

4.1. Skład chemiczny warstwy wierzchniej

Szczegółowa analiza widm zarejestrowanych podczas badań warstwy wierzchniej, metodą XPS, wytworzonej w wyniku utleniania anodowego stopu Ti6Al7Nb umożliwiła określenie jej składu chemicznego.

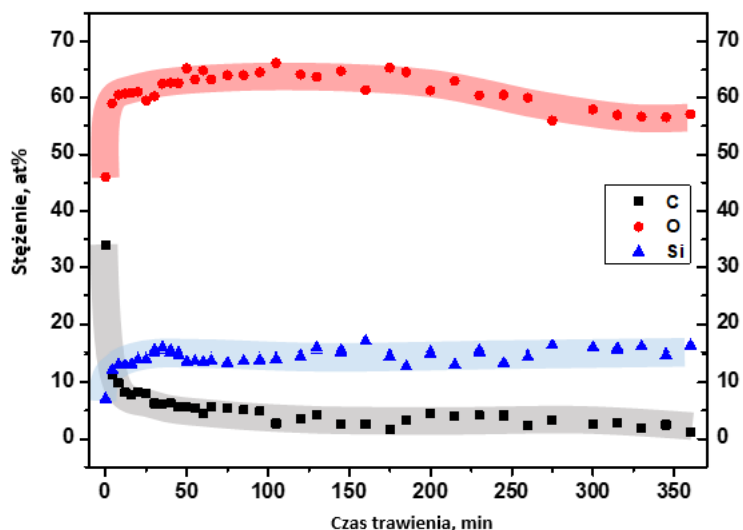
Analiza profilu Ti wykazała, że główny metaliczny składnik stopu nie jest dominujący na powierzchni próbki (czas trawienia 0 min) (Rysunek 16). Tytan osiągnął tam stężenie około 3%, podobnie do stężenia powierzchniowego glinu. Jednak wraz z głębokością warstwy, udział Ti wzrastał wykładniczo, osiągając stabilną wartość około 15% dla czasu trawienia jonami Ar⁺ w zakresie 25-130 min. Dalszy wzrost głębokości wykazał stopniowe zwiększenie zawartości tytanu do stężenia około 20%. Podczas silnego wzrostu zawartości Ti, stężenie glinu zmniejszyło się. Po 25 minutach trawienia stężenie Al oscylowało wokół 1-2%. Następnie ponownie wzrosło do około 3,5% na głębokości odpowiadającej wytrawianiu 260-360 min. Wykazano, że stężenie niobu było niewielkie w porównaniu z innymi głównymi składnikami stopu. Pozostało ono na stałym poziomie 0,2% od powierzchni do głębokości warstwy uzyskanej po 160 min

trawienia. Przy dłuższym trawieniu zawartość Nb zaczęła stopniowo wzrastać, osiągając ok. 2% przy maksymalnym czasie trawienia.



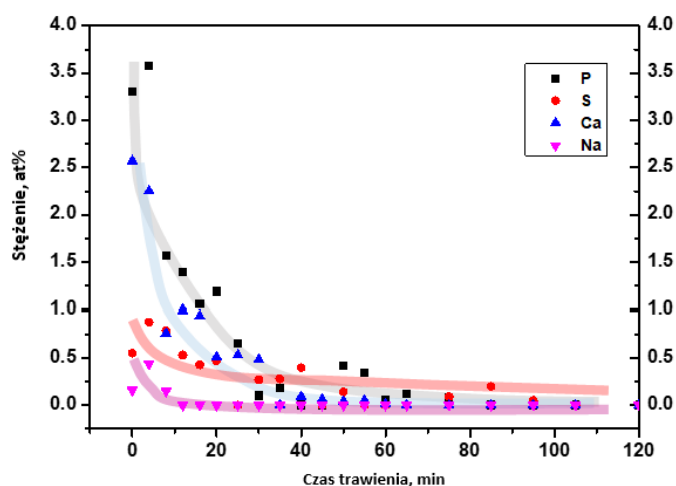
Rysunek 16. Stężenie tytanu, glinu i niobu w warstwie wierzchniej w funkcji czasu trawienia Ar⁺

Głównym składnikiem warstwy okazał się tlen, osiągając stężenie około 60-65% dla głębokości odpowiadającej przedziałowi 4-260 min trawienia jonami Ar⁺ (Rysunek 17). Wartość ta zmniejszyła się nieznacznie o kilka procent w ciągu kolejnych 100 minut oddziaływania jonów. Jedynie powierzchnia charakteryzowała się niższą zawartością tlenu (około 45%) spowodowaną prawdopodobnie obecnością nadmiaru węgla, która wynosiła prawie 34%. Wartość ta drastycznie spadła po zaledwie kilku minutach trawienia jonowego (do ok. 10%), a następnie systematycznie spadała do 2% przy maksymalnym czasie trawienia. Krzem, podobnie jak tlen, wykazywał niższe stężenie na powierzchni (około 7%) niż w głębszych obszarach warstwy wierzchniej. Pozostaje ono na stałym poziomie około 15% dla całego zakresu czasu trawienia.



Rysunek 17. Stężenie węgla, tlenu i krzemu w warstwie wierzchniej w funkcji czasu trawienia Ar^+

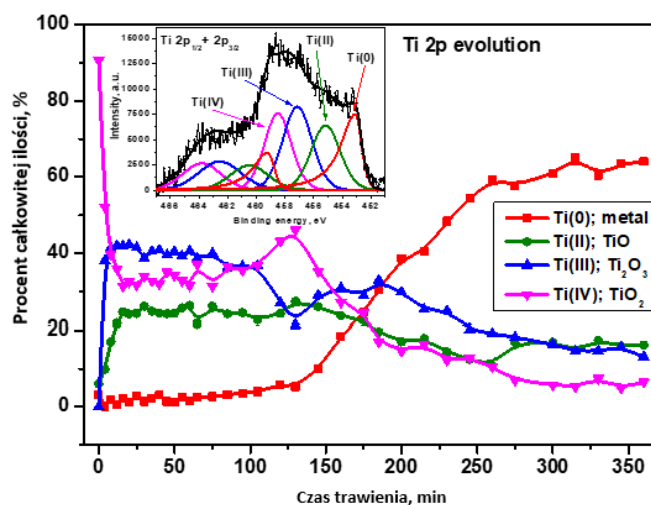
Fosfor i wapń wykazywały najwyższe stężenie na powierzchni, odpowiednio około 3,5% i 2,5% (Rysunek 18). Udział tych pierwiastków stopniowo zanikał do głębokości odpowiadającej 30 minutom trawienia. Profil siarki zachowywał się podobnie. Osiągnął maksymalną wartość około 1% na powierzchni i stopniowo zanikał po 35 minutach trawienia. Sód był szczątkowy w stężeniu około 0,4% na powierzchni i zniknął po 12 minutach trawienia.



Rysunek 18. Stężenie fosforu, siarki, wapnia i sodu w warstwie wierzchniej w funkcji czasu trawienia Ar^+

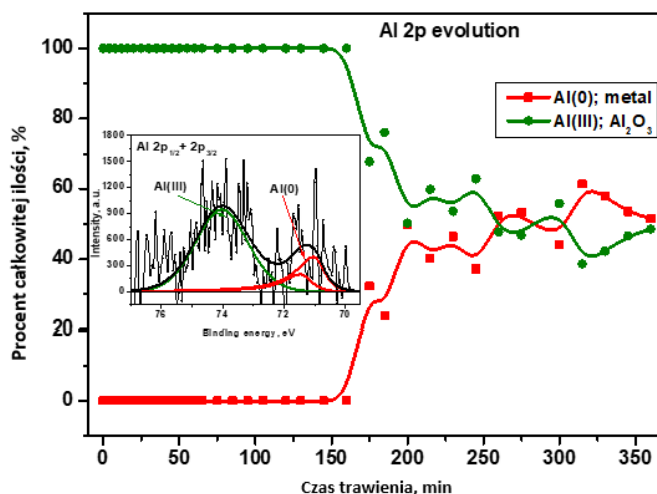
Rozkład piku Ti 2p (Rysunek 19) ujawnił istnienie składników w postaci metalicznej oraz na drugim, trzecim i czwartym stopniu utlenienia, w tym rozszczepienie spin-orbita ($2p_{3/2}$ i $2p_{1/2}$) równe 6,1 eV [139]. Asymetryczny składnik Ti $2p_{3/2}$ w pozycji przy 453,1 eV został przypisany do Ti(0) w postaci metalicznej. Z kolei

symetryczne składowe Ti 2p_{3/2} przy energii wiązania 455,2 eV, 457,1 eV i 458,5 eV przypisano odpowiednio Ti(II) w postaci TiO, Ti(III) - Ti₂O₃ oraz Ti(IV) jako TiO₂ [133].



Rysunek 19. Składniki sygnału Ti 2p w funkcji czasu trawienia Ar+. Wstawka: widmo XPS reprezentatywne dla Ti 2p z dopasowaniem piku dla powierzchni Ti6Al7Nb po 175 min trawienia

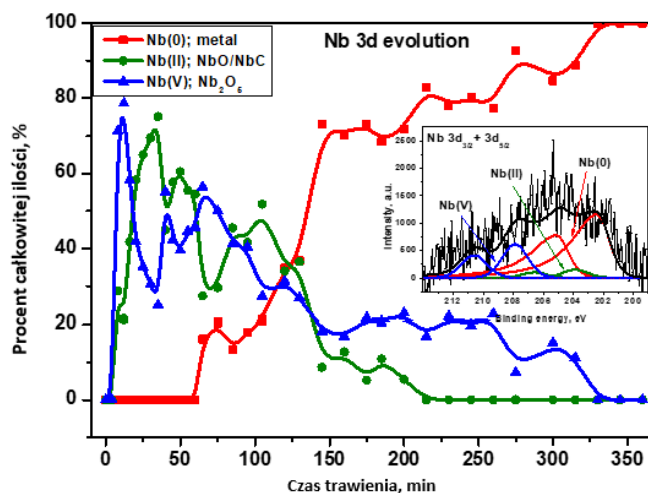
Rozkład piku glinu ujawnił istnienie jego składników w postaci metalicznej (z rozszczepieniem spin-orbita równym 0,42 eV [139]) oraz na trzecim stopniu utlenienia. Asymetryczna składowa Al 2p_{3/2} zlokalizowana przy 71,0 eV została przypisana do Al(0) w postaci metalu, natomiast symetryczną, przy 74,0 eV, przypisano Al(III) jako Al₂O₃ [140].



Rysunek 20. Składniki sygnału Al 2p w funkcji czasu trawienia Ar+. Wstawka: widmo XPS reprezentatywne dla Al 2p z dopasowaniem piku dla powierzchni Ti6Al7Nb po 175 min trawienia

Rozkład piku Nb 3d wykazał istnienie składników niobu w postaci metalicznej oraz na drugim i piątym stopniu utlenienia z rozszczepieniem spin-orbita (3d_{5/2} i 3d_{3/2}) równym 2,7 eV [139]. Asymetryczny składnik Nb 3d_{5/2} zlokalizowany przy 202,4 eV

został przypisany do Nb(0) w postaci metalicznej. Symetryczne składowe Nb 3d_{5/2} przy 203,8 eV i 207,9 eV przypisano kolejno Nb(II) w postaci NbO i/lub NbC, Nb(V) jako Nb₂O₅ [141].

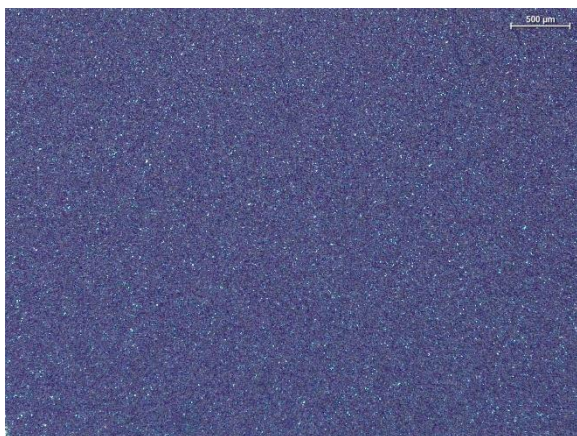


Rysunek 21. Składniki sygnału Nb 3d w funkcji czasu trawienia Ar⁺. Wstawka: widmo XPS reprezentatywne dla Nb 3d z dopasowaniem piku dla powierzchni Ti6Al7Nb po 175 min trawienia

4.2. Morfologia powierzchni

Ti6Al7Nb w stanie wyjściowym charakteryzowało się jednorodną, typową dla piaskowania, topografią powierzchni i efektem kolorystycznym, wynikającym z zastosowania utleniania anodowego (Rysunek 22a)). Zarówno w przypadku powłoki PLGA, jak i HAp+DEX, zaobserwowano zmatowienie powierzchni w stosunku do utlenianego anodowo stopu Ti6Al7Nb. Obie otrzymane powłoki były ciągłe, jednorodne oraz transparentne (Rysunek 22b,c)).

a)



b)



c)

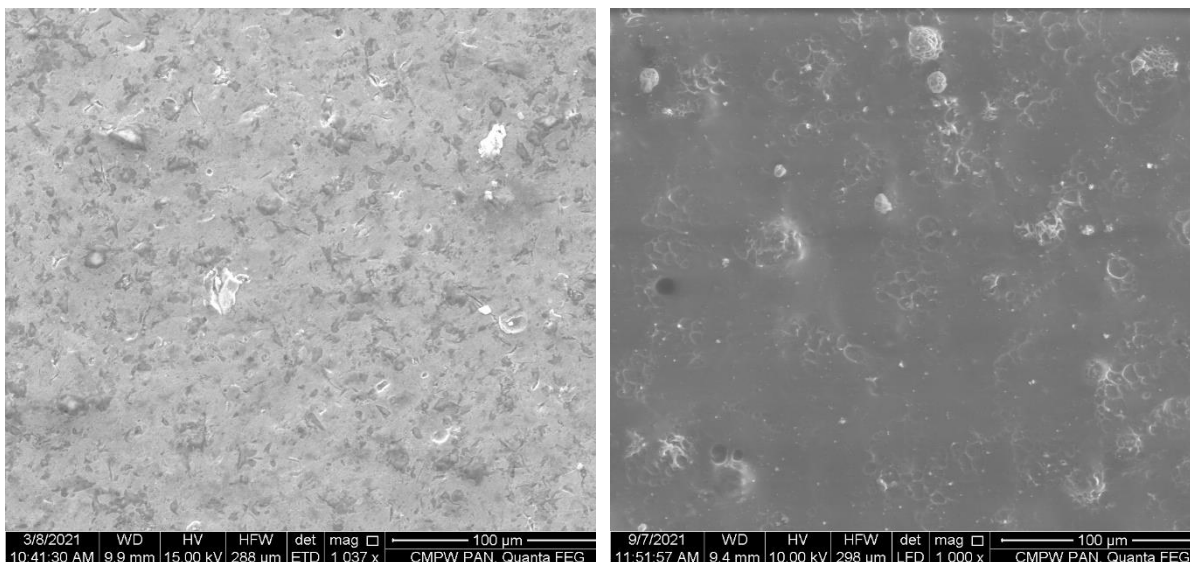


Rysunek 22. Powierzchnia próbek w stanie wyjściowym: a) Ti6Al7Nb, b) PLGA, c) HAp+DEX, mikroskop świetlny

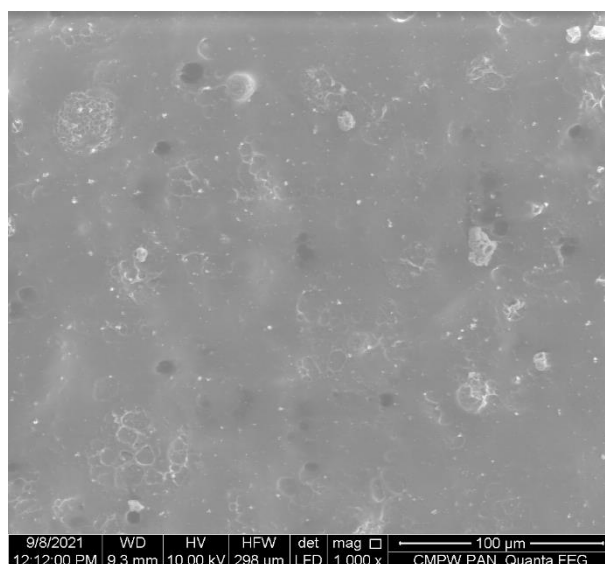
Obserwacje z wykorzystaniem SEM potwierdziły jednorodną morfologię powierzchni Ti6Al7Nb (Rysunek 23a)). Na powierzchni PLGA i HAp+DEX (Rysunek 23b)c)) zaobserwowano kuliste struktury 3D oraz pojedyncze powierzchniowo otwarte obszary. Pomimo tego obie powłoki charakteryzują się ciągłością.

a)

b)

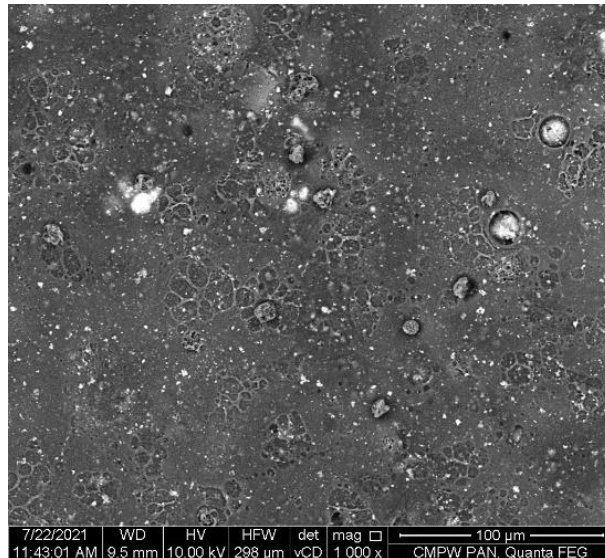


c)



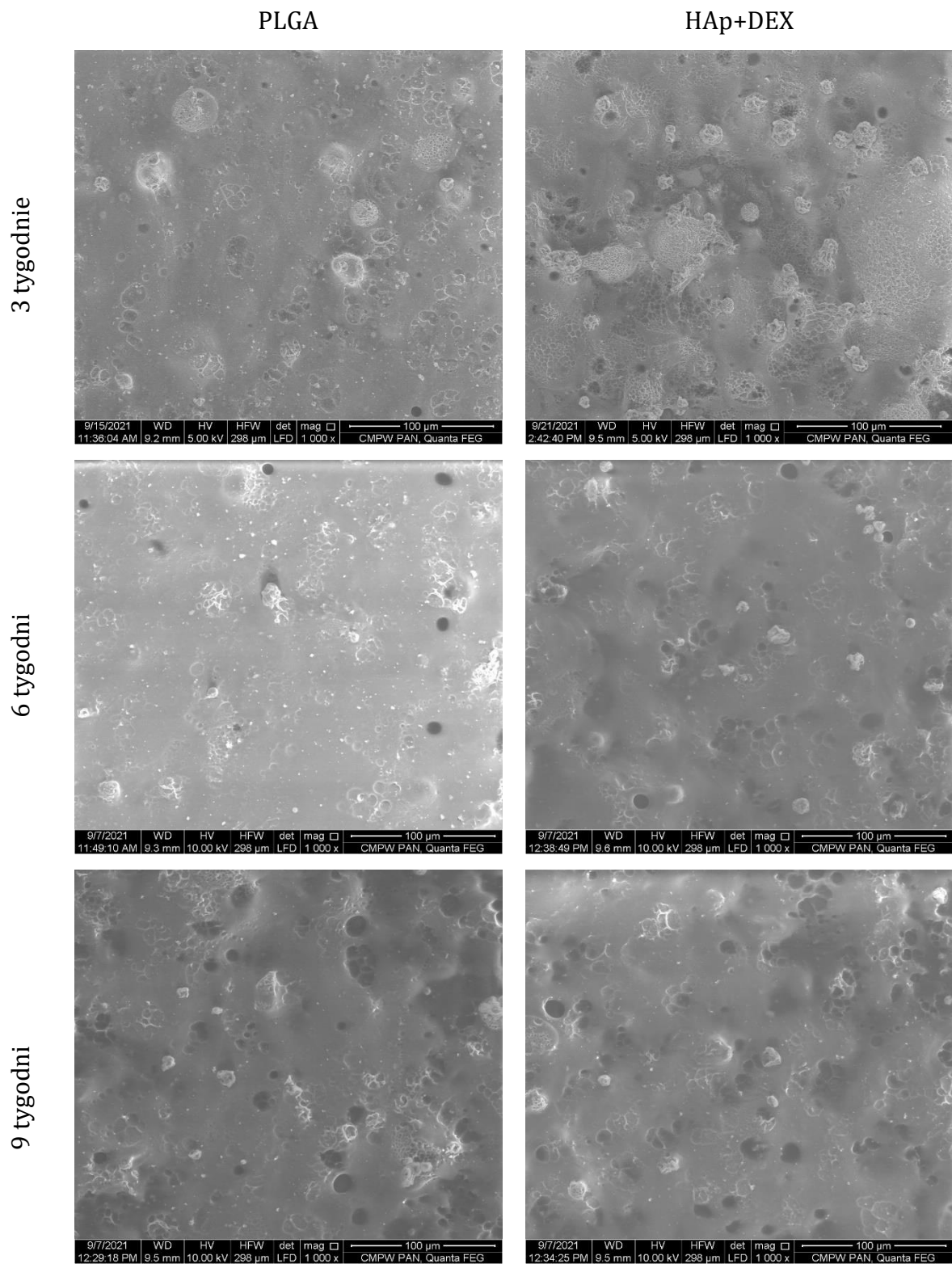
Rysunek 23. Powierzchnia próbek w stanie wyjściowym: a) Ti6Al7Nb, b) PLGA, c) HAp+DEX, SEM

Powłoka HAp+DEX, obrazowana z wykorzystaniem detektora vCD (Rysunek 24), charakteryzuje się równomiernie rozproszonymi na całej powierzchni jasnymi obszarami. Podczas jakościowej analizy EDS zidentyfikowano je jako hydroksyapatyt (największe ilości pierwiastków Ca i P).



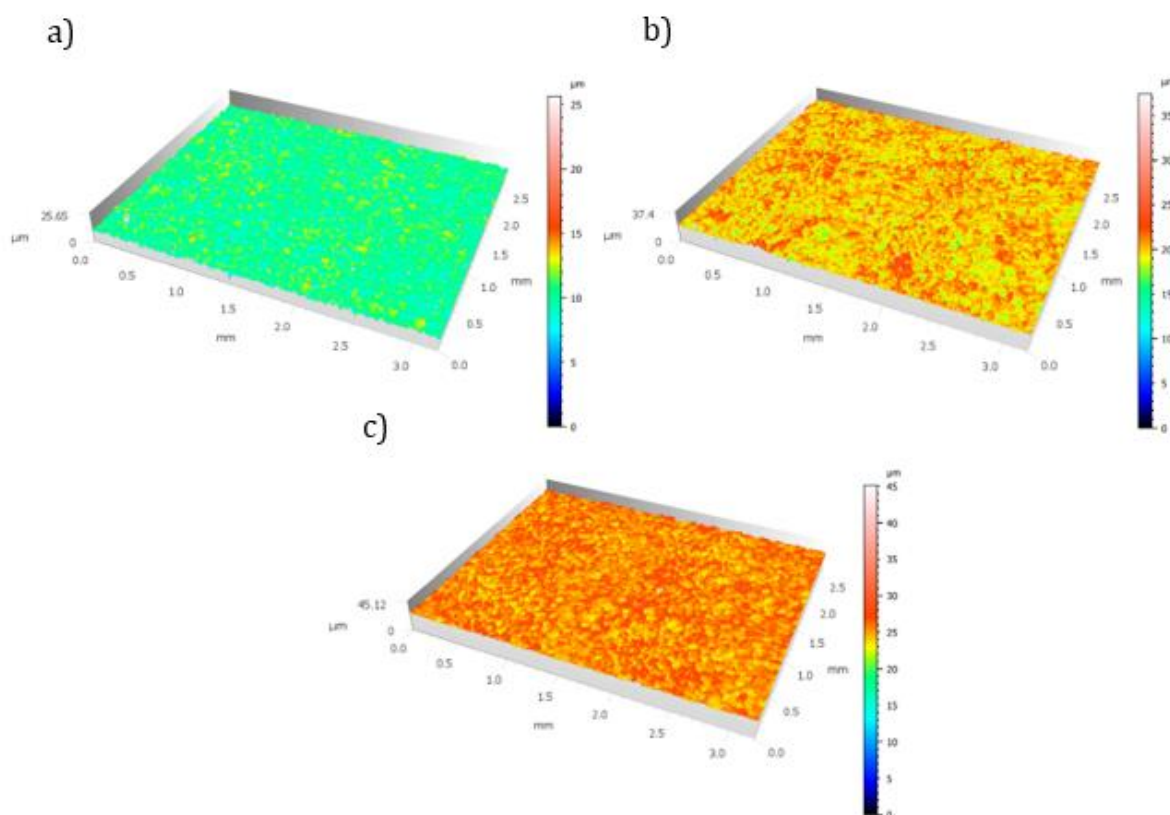
Rysunek 24. Powierzchnia HAp+DEX, SEM, detektor vCD

Ekspozycja na działanie roztworu PBS wywołała zmiany na powierzchni PLGA oraz HAp+DEX (Rysunek 25). Po 3 tygodniach moczenia uwidoczniły się kuliste struktury, których ilość zmniejsza się po szóstym i dziewiątym tygodniu. Po 6 tygodniu ekspozycji bardziej widoczne są otwarte obszary powierzchniowe, a ich ilość wzrasta wraz z czasem ekspozycji. Nie zaobserwowano znaczących różnic pomiędzy powierzchniami PLGA oraz HAp+DEX w czasie moczenia. Ponadto w trakcie obserwacji SEM nie odnotowano przerwania ciągłości powłoki po żadnym etapie moczenia.



Rysunek 25. Powierzchnia PLGA i HAp+DEX po ekspozycji na roztwór PBS, SEM

W stanie wyjściowym Ti6Al7Nb charakteryzuje się najniższymi parametrami Ra oraz Sa (odpowiednio Tabela 6 -Tabela 7) spośród analizowanych próbek. Powłoka PLGA wpływa na niewielki wzrost tych parametrów. Z kolei HAp+DEX znacząco je podnosi (Ra = 0,89 μm , Sa = 1,17 μm). Nie zaobserwowano jednoznacznego wpływu ekspozycji na działanie roztworu PBS na parametry Ra i Sa powierzchni Ti6Al7Nb. W przypadku PLGA oraz HAp+DEX moczenie wpływa na wzrost opisywanych parametrów, który postępuje wraz ze wzrostem czasu ekspozycji. Przy czym w każdym punkcie czasowym, większe parametry Ra i Sa odnotowano dla HAp+DEX. Przykładowe obrazy topografii powierzchni przedstawiono na Rysunek 26.



Rysunek 26. Topografia powierzchni próbek w stanie wyjściowym: a) Ti6Al7Nb, b) PLGA, c) HAp+DEX

Tabela 6. Średnie wartości parametru chropowatości Ra

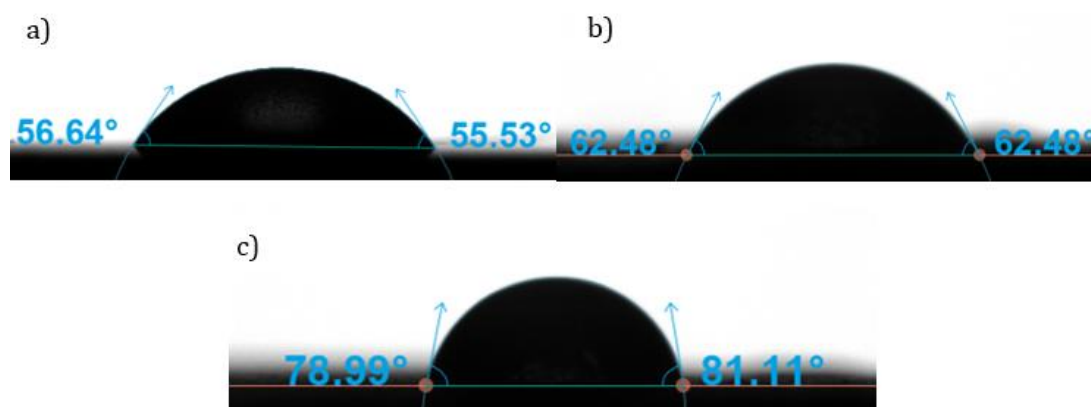
Czas moczenia	Ra [μm]		
	Ti6Al7Nb	PLGA	HAp+DEX
Stan wyjściowy	0,34 \pm 0,11	0,45 \pm 0,02	0,89 \pm 0,59
3 tygodnie	0,38 \pm 0,05	0,47 \pm 0,06	1,2 \pm 0,34
6 tygodni	0,36 \pm 0,06	0,62 \pm 0,05	1,57 \pm 0,48
9 tygodni	0,4 \pm 0,04	0,68 \pm 0,02	2,07 \pm 0,29

Tabela 7. Średnie wartości parametru chropowatości Sa

Czas moczenia	Sa [μm]		
	Ti6Al7Nb	PLGA	HAp+DEX
Stan wyjściowy	0,39 \pm 0,08	0,52 \pm 0,03	1,17 \pm 0,48
3 tygodnie	0,44 \pm 0,04	0,59 \pm 0,02	1,34 \pm 0,44
6 tygodni	0,42 \pm 0,05	0,74 \pm 0,03	1,8 \pm 0,52
9 tygodni	0,43 \pm 0,09	0,8 \pm 0,05	2,25 \pm 0,49

4.3. Zwilżalność powierzchni

Wszystkie próbki charakteryzują się powierzchnią hydrofilową (Tabela 8). Najniższą wartość kąta zwilżania zaobserwowano dla Ti6Al7Nb, natomiast nałożenie powłoki powoduje spadek właściwości hydrofilowych powierzchni. Największą wartość kąta zwilżania ma powierzchnia HAp+DEX. Ekspozycja na działanie roztworu PBS powoduje zmniejszenie kąta zwilżania wszystkich powierzchni, które postępuje wraz ze wzrostem czasu moczenia. Po 9-tygodniowej ekspozycji najbardziej hydrofilowa jest powierzchnia PLGA. Przykładowe zdjęcia kroplel na powierzchni próbek w stanie wyjściowym przedstawiono na Rysunek 27.



Rysunek 27. Przykładowe kroplel na powierzchni próbek: a) Ti6Al7Nb, b) PLGA, c) HAp+DEX

Tabela 8. Średnie wartości kąta zwilżania wodą

Czas moczenia	Θ [°]		
	Ti6Al7Nb	PLGA	HAp+DEX
Stan wyjściowy	54 \pm 2	63 \pm 3	80 \pm 5
3 tygodnie	49 \pm 4	48 \pm 5	59 \pm 2
6 tygodni	43 \pm 1	42 \pm 3	53 \pm 5
9 tygodni	42 \pm 1	37 \pm 3	49 \pm 3

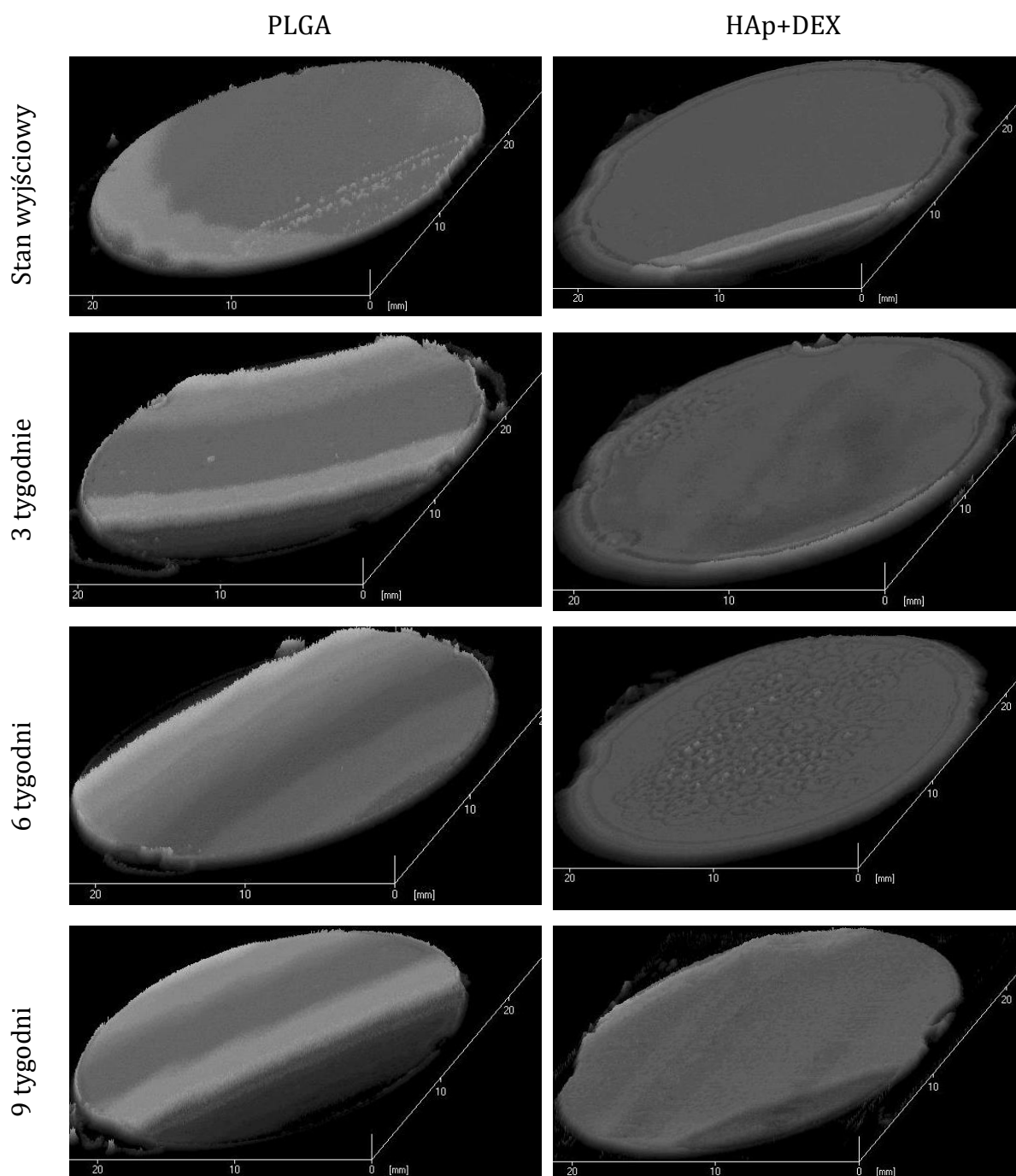
4.4. Adhezja powłoki do podłoża

Porównując wartość siły krytycznej F_n , która powoduje całkowite uszkodzenie powłoki, dla powłok PLGA i HAp+DEX, większą adhezją zaobserwowano dla próbek HAp+DEX. Dotyczy to powłok zarówno w stanie wyjściowym, jak i po ekspozycji na roztwór PBS (Tabela 9). Po 3 tygodniach moczenia dla obu wariantów odnotowano wzrost wartości siły F_n , a następnie od 6 tygodnia jej zmniejszenie, które postępowało do 9 tygodnia.

Tabela 9. Wartości siły krytycznej F_n , powodującej całkowite uszkodzenie powłoki

Czas moczenia	F_n [N]	
	PLGA	HAp+DEX
Stan wyjściowy	1,9	2,4
3 tygodnie	2,2	2,6
6 tygodni	1,7	2
9 tygodni	1,3	1,9

Obserwacje powierzchni PLGA oraz HAp+DEX w stanie wyjściowym, prowadzone z wykorzystaniem SAM (Rysunek 28), nie ujawniły żadnych miejscowych defektów powłoki ani jej delaminacji. Długotrwała ekspozycja na roztwór PBS, również nie spowodowała uszkodzenia powłok ani ich deleminacji. Zaobserwowano jedynie zmiany gęstości powłok, objawiające się różnymi odcieniami szarości na uzyskanych obrazach. Zmiany te narastały wraz ze wzrostem czasu ekspozycji.



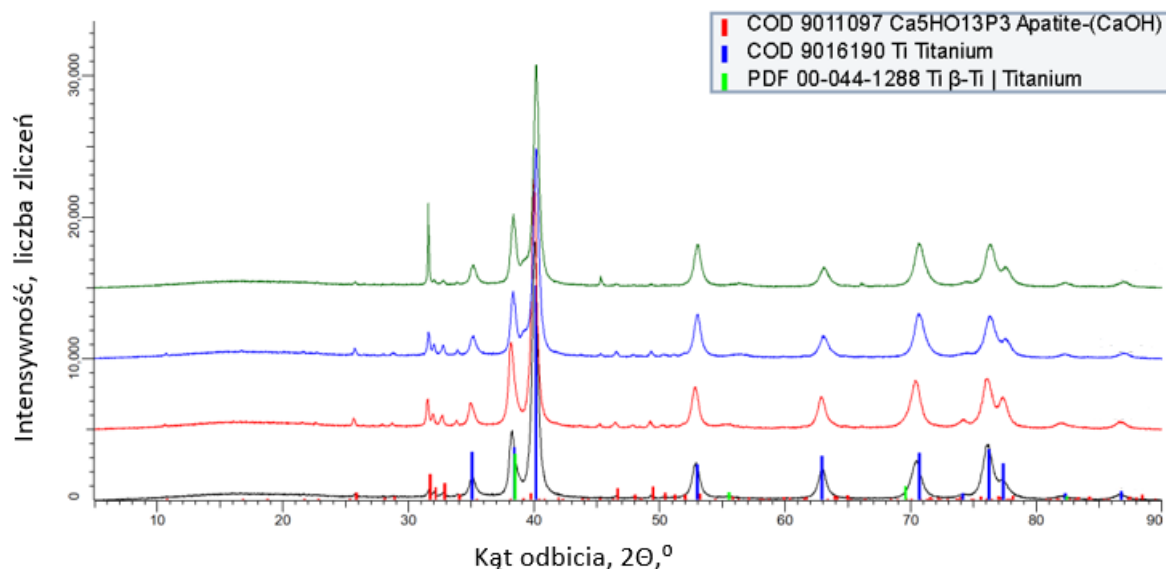
Rysunek 28. Obrazy akustyczne PLGA i HAp+DEX, SAM

4.5. Skład fazowy

Analiza dyfraktogramów analizowanych próbek umożliwiła określenie ich składu fazowego.

Podczas badań XRD powłoki PLGA nie zaobserwowano pików charakterystycznych dla polimeru, a zidentyfikowano jedynie fazy należące do podłoża. Wszystkie piki wykryte podczas badań próbek HAp+DEX należą do faz α -Ti, β -Ti oraz hydroksyapatytu ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (Rysunek 29). Nie zaobserwowano pików

charakterystycznych dla produktów korozji stopów tytanu po ekspozycji na roztwór PBS, niezależnie od czasu jej trwania, natomiast po 9 tygodniach moczenia widocznie zwiększa się intensywność pików odpowiadających fazie HAp. W pracy nie zaprezentowano dyfraktogramów dla PLGA, gdyż widoczne były na nich jedynie fazy α - i β -Ti.



Rysunek 29. Dyfraktogramy próbek HAp+DEX po różnych czasach ekspozycji. Kolor czarny – stan wyjściowy, czerwony – 3 tygodnie, niebieski – 6 tygodni, zielony – 9 tygodni. Skany przesunięto wzdłuż osi Y dla lepszego porównania

Wyznaczone parametry sieci krystalicznej zarówno α -, jak i β -tytanu, niezależnie od badanego czasu moczenia, są stabilne z niewielkimi zmianami (Tabela 10). Odkształcenie sieci HAp zmniejsza się wraz z czasem ekspozycji na działanie roztworu, czemu towarzyszą również niewielkie zmiany parametrów sieci. Po 9 tygodniach moczenia wykryto uprzywilejowaną orientację hydroksyapatytu wzdłuż płaszczyzny (3-11), co odpowiada najsilniejszemu pikowi HAp na dyfraktogramie (Rysunek 29). Zaobserwowano zmniejszanie udziału masy HAp od 6 tygodnia ekspozycji.

Tabela 10.

Wybrane parametry strukturalne faz krystalicznych wyznaczone metodą dopasowania Rietvela.
Wartości w nawiasach oznaczają współczynnik zmienności, a nie odchylenie standardowe

Czas moczenia	Faza (grupa przestrzenna)	Parametry sieci, ICDD, Å	Parametry sieci, obliczone, Å	Wielkość kryształitu, nm	Odształcenie sieci, %	Udział masowy, %
Stan wyjściowy	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂ (P6 ₃ /m)	a = b = 9,424; c = 6,879	a = b = 9,464; c = 6,913	200 (30)	1,17 (16)	8 (6)
	α-Ti (P6 ₃ /mmc)	a = b = 2,95; c = 4,68	a = b = 2,955; c = 4,70	27 (9)	0,89 (3)	81,3 (11)
	β-Ti (Im-3m)	a = 3,30	a = 2,98	5 (14)	0	10,7 (11)
3 tygodnie	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂ (P6 ₃ /m)	a = b = 9,424; c = 6,879	a = b = 9,458; c = 6,905	180 (80)	0,79 (7)	8 (6)
	α-Ti (P6 ₃ /mmc)	a = b = 2,95; c = 4,68	a = b = 2,951; c = 4,699	27 (8)	0,88 (3)	81,5 (9)
	β-Ti (Im-3m)	a = 3,30	a = 2,98	3 (10)	0	10,5 (8)
6 tygodni	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂ (P6 ₃ /m)	a = b = 9,424; c = 6,879	a = b = 9,448; c = 6,895	180 (80)	0,66 (8)	7,7 (6)
	α-Ti (P6 ₃ /mmc)	a = b = 2,95; c = 4,68	a = b = 2,944; c = 4,684	27 (10)	0,88 (3)	81,8 (8)
	β-Ti (Im-3m)	a = 3,30	a = 2,98	3 (5)	0	10,5 (7)
9 tygodni	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂ (P6 ₃ /m)	a = b = 9,424; c = 6,879	a = b = 9,470; c = 6,895	180 (50)	0,18 (6)	7,1 (6)
	α-Ti (P6 ₃ /mmc)	a = b = 2,95; c = 4,68	a = b = 2,946; c = 4,687	27 (9)	0,87 (3)	82,4 (9)
	β-Ti (Im-3m)	a = 3,30	a = 2,98	3 (6)	0	10,5 (7)

4.6. Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna

Najwyższy potencjał E_{OCP} w stanie wyjściowym zarejestrowano dla Ti6Al7Nb, natomiast nałożone powłoki powodują jego obniżenie (Tabela 11). Nie zaobserwowano jednak jednoznacznych zależności między rodzajem powłoki i czasem moczenia na wartość E_{OCP} . Określenie zmian w czasie oraz ich źródeł jest dodatkowo utrudnione przez wysokie odchylenia standardowe, otrzymane dla wszystkich próbek, poza Ti6Al7Nb w stanie wyjściowym.

Tabela 11. Wartość potencjału otwarcia po 1h stabilizacji

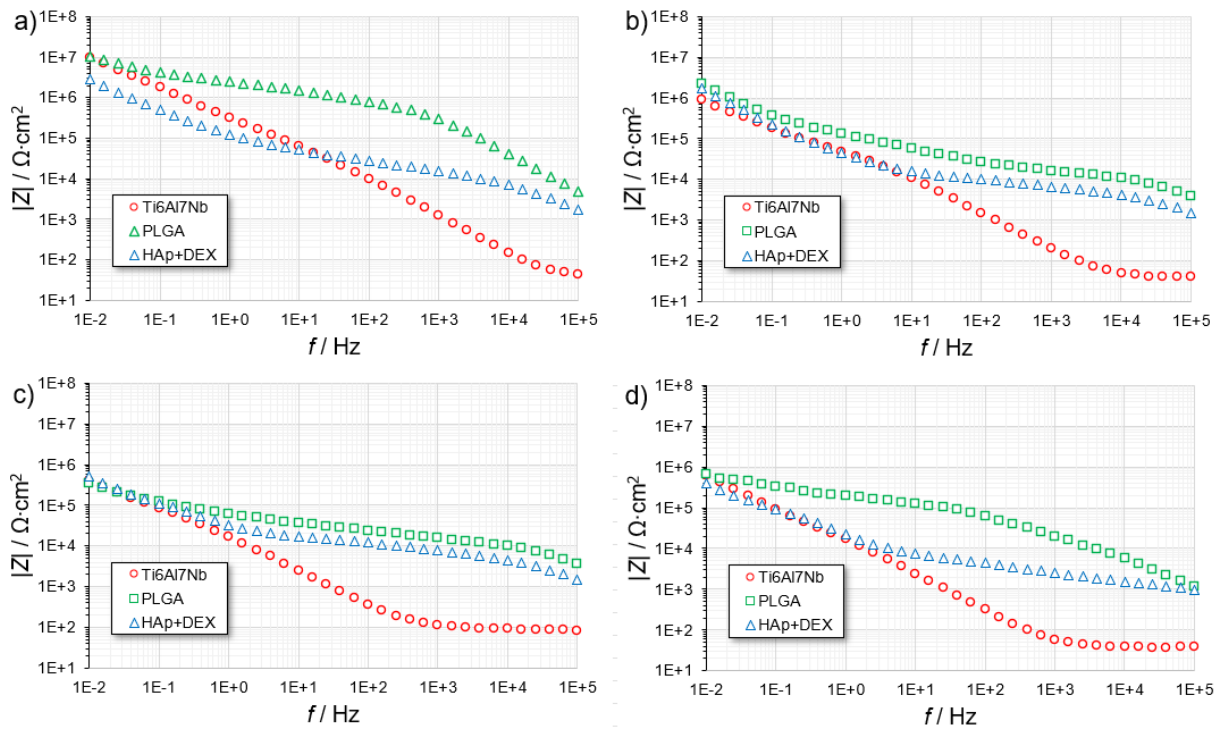
Czas moczenia	E_{OCP} [mV]		
	Ti6Al7Nb	PLGA	HAp+DEX
Stan wyjściowy	-5 ±17	-49 ±52	-50 ±92
3 tygodnie	95 ±140	-41 ±53	-17 ±156
6 tygodni	5 ±121	78 ±168	67 ±151
9 tygodni	4 ±100	101 ±99	-87 ±107

W przypadku analizowanych próbek niemożliwe było znalezienie odpowiedniego obwodu zastępczego. Uzyskane parametry dopasowania były albo rozbieżne do nieskończoności, albo obarczone błędami względnymi przekraczającymi 100%, co oznaczało, że ich wartości można było zmniejszyć blisko zera lub zwiększyć kolektory bez utraty jakości dopasowania. Takie wyniki nie posiadają fizycznego uzasadnienia, dlatego postanowiono przeanalizować uzyskane widma (Rysunek 30) bez procedury dopasowania obwodu.

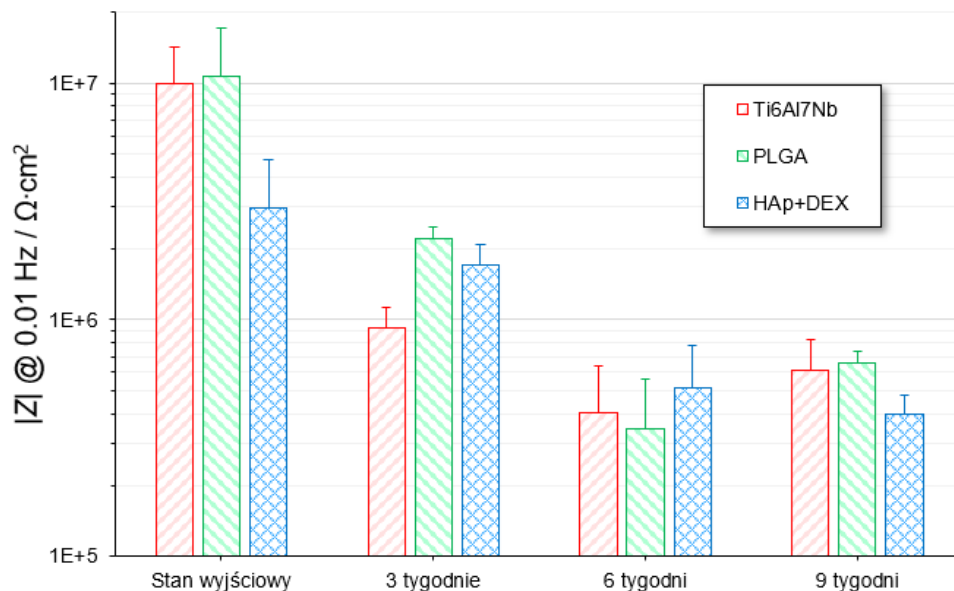
Ti6Al7Nb oraz PLGA w stanie wyjściowym charakteryzują się podobnym modułem impedancji w obszarze niskich częstotliwości (Rysunek 30a)), natomiast w przypadku HAp+DEX jest on mniejszy. Jednakże, wartość $|Z|$ przy $f = 0,01$ Hz wszystkich próbek przekracza $10 \text{ M}\Omega\text{cm}^2$ (Rysunek 31). W obszarze średnich i wysokich częstotliwości widma, wartość modułu impedancji PLGA jest znacznie wyższa niż Ti6Al7Nb, podobnie jak wartość modułu HAp+DEX.

Zaobserwowano, że wraz z czasem spada wartość $|Z|$ wszystkich próbek. Po 3 tygodniach moczenia najniższą wartość przy $f = 0,01\text{Hz}$ wykazuje Ti6Al7Nb (Rysunek 30b)). Jednakże po 6 i 9 tygodniach ekspozycji na PBS niskoczęstotliwościowe

moduły impedancji wszystkich trzech wariantów są do siebie zbliżone. Przy czym, w każdym punkcie czasowym, odnotowano analogiczną jak w przypadku stanu wyjściowego zależność w obszarach średniej i wysokiej częstotliwości.



Rysunek 30. Wykresy Bodego obrazujące widma impedancji a) stan wyjściowy, b) 3 tygodnie ekspozycji, c) 6 tygodni ekspozycji, d) 9 tygodni ekspozycji



Rysunek 31. Wartość modułu impedancji niskiej częstotliwości $f=0,01$ Hz

4.7. Odporność na korozję wżerową

Wstępna analiza wyników badań potencjostatycznych i potencjodynamicznych próbek bez powłok oraz z powłokami polimerowymi, zarówno w stanie wyjściowym jak i po przetrzymywaniu w roztworze PBS wykazała ich dobrą odporność na korozję wżerową. Brak rozwoju korozji wżerowej został potwierdzony obserwacjami mikroskopowymi.

W przebiegu krzywych potencjodynamicznych próbek Ti6Al7Nb oraz pokrytych powłokami polimerowymi (PLGA, HAp+DEX) nie zaobserwowano potencjału przebicia. Dotyczy to próbek w stanie wyjściowym jak i eksponowanych na roztwór PBS (Rysunek 32). Ponadto dla wszystkich próbek zarejestrowane krzywe powrotne charakteryzują się mniejszą wartością gęstości prądu niż krzywe pierwotne.

Szczegółowa analiza parametrów korozyjnych wyznaczonych na podstawie badań wskazuje na ich zróżnicowanie oraz zmienność zależną od rodzaju próbki oraz czasu ekspozycji na roztwór.

Największymi wartościami potencjału korozyjnego E_{kor} charakteryzowały próbki bez powłoki w stanie wyjściowym Ti6Al7Nb (Tabela 12), natomiast najmniejsze HAp+DEX. Ekspozycja na działanie roztworu PBS spowodowała wzrost E_{kor} dla Ti6Al7Nb, postępujący wraz z czasem trwania moczenia. W przypadku PLGA oraz HAp+DEX, przetrzymywanych 3 tygodnie w roztworze zaobserwowano spadek potencjału korozyjnego, którego wartość w kolejnych okresach utrzymywała się na zbliżonym poziomie.

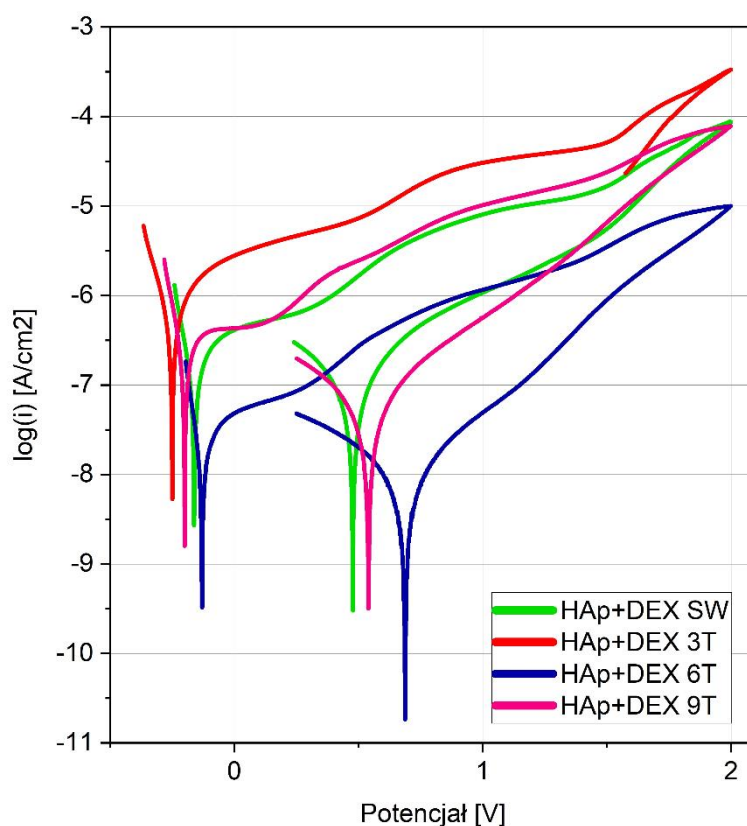
Najniższą wartość oporu polaryzacyjnego R_p (Tabela 13) zarejestrowano dla Ti6Al7Nb, z kolei próbki PLGA oraz HAp+DEX charakteryzują się wyższą, zbliżoną do siebie wartością. Ekspozycja na roztwór PBS wpływa na obniżenie wartości oporu polaryzacyjnego wraz ze wzrostem czasu moczenia we wszystkich analizowanych przypadkach. Ogólnie można stwierdzić, że próbki z powłoką PLGA wykazują wyższe wartości R_p niż próbki z powłoką HAp+DEX.

Tabela 12. Średnie wartości potencjału korozyjnego E_{kor}

Czas moczenia	E_{kor} [mV]		
	Ti6Al7Nb	PLGA	HAp+DEX
Stan wyjściowy	-31 ±19	-75 ±42	-133 ±33
3 tygodnie	-20 ±34	-220 ±53	-214 ±48
6 tygodni	15 ±29	-174 ±24	-188 ±35
9 tygodni	35 ±27	-182 ±37	-213 ±26

Tabela 13. Średnie wartości oporu polaryzacyjnego R_p

Czas moczenia	R_p [$M\Omega cm^2$]		
	Ti6Al7Nb	PLGA	HAp+DEX
Stan wyjściowy	0,93 ±0,21	3,66 ±0,72	3,68 ±0,81
3 tygodnie	0,52 ±0,14	1,02 ±0,56	0,63 ±0,49
6 tygodni	0,07 ±0,05	0,67 ±0,38	0,85 ±0,41
9 tygodni	0,15 ±0,12	0,61 ±0,41	0,25 ±0,19

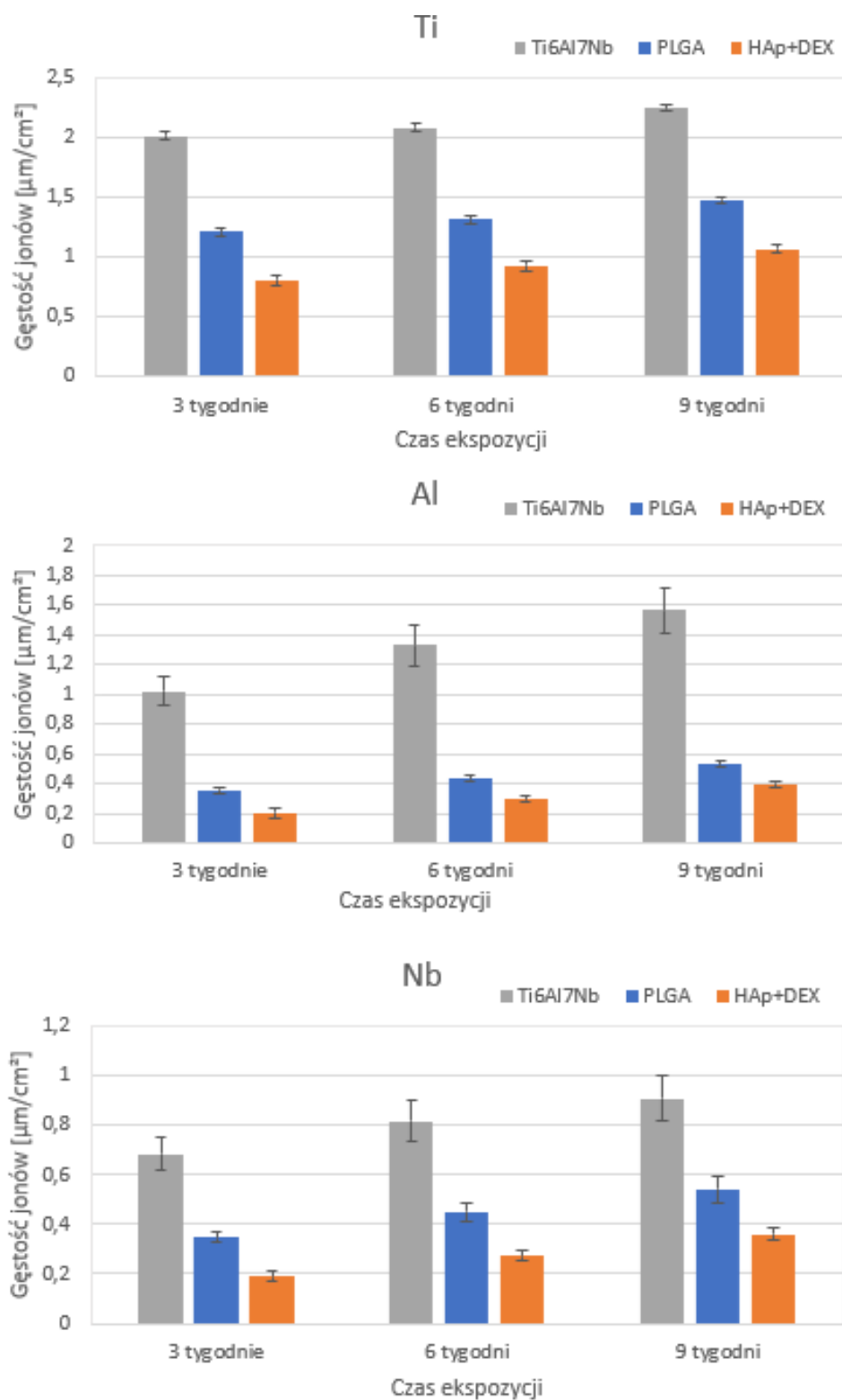


Rysunek 32. Krzywe potencjodynamiczne zarejestrowane dla HAp+DEX po różnym czasie moczenia. SW – stan wyjściowy, 3T – 3 tygodnie, 6T – 6 tygodni, 9T – 9 tygodni

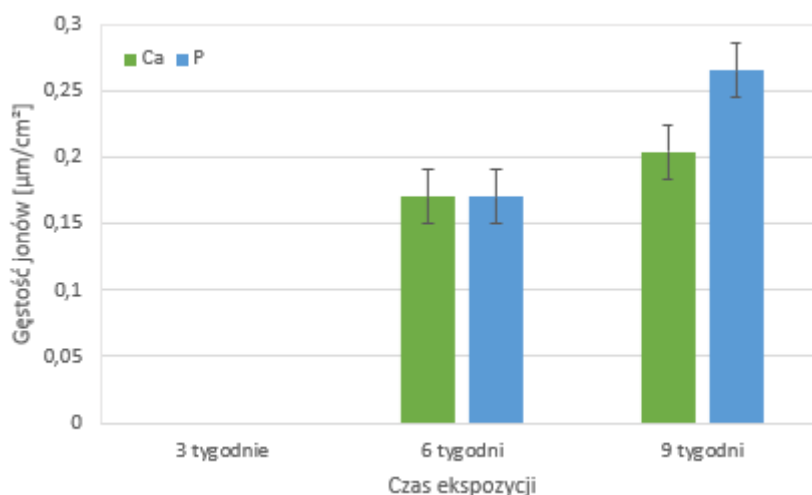
4.8. Przenikanie jonów

Największą gęstością masy jonów przenikających do roztworu charakteryzowały się próbki stopu Ti6Al7Nb (Rysunek 33). Naniesione na powierzchnie powłoki PLGA oraz HAp+DEX znacznie obniżyły gęstość masy jonów metali obecnych w roztworze we wszystkich rozpatrywanych przypadkach. Gęstość masy jonów tytanu, glinu oraz niobu obecnych w roztworze wzrasta wraz z czasem ekspozycji zarówno dla próbek Ti6Al7Nb, jak i próbek z naniesionymi powłokami polimerowymi. Największą gęstość masy jonów obserwowano po dziewięcioletniej ekspozycji. Najniższe gęstości masy jonów tytanu, glinu i niobu w roztworze, w każdym punkcie czasowym, odnotowano dla HAp+DEX.

Jony wapnia i fosforu (Rysunek 34) pojawiły się w roztworze, w równej ilości, po sześciotygodniowym moczeniu próbek HAp+DEX. Ich ilość wzrosła wraz z czasem moczenia. Po 9 tygodniu w roztworze zaobserwowano wyższe stężenie jonów P. Zarówno w przypadku próbek Ti6Al7Nb, jak i PLGA, nie odnotowano obecności omawianych jonów.



Rysunek 33. Gęstość jonów tytanu, glinu i niobu uwolniona z powierzchni



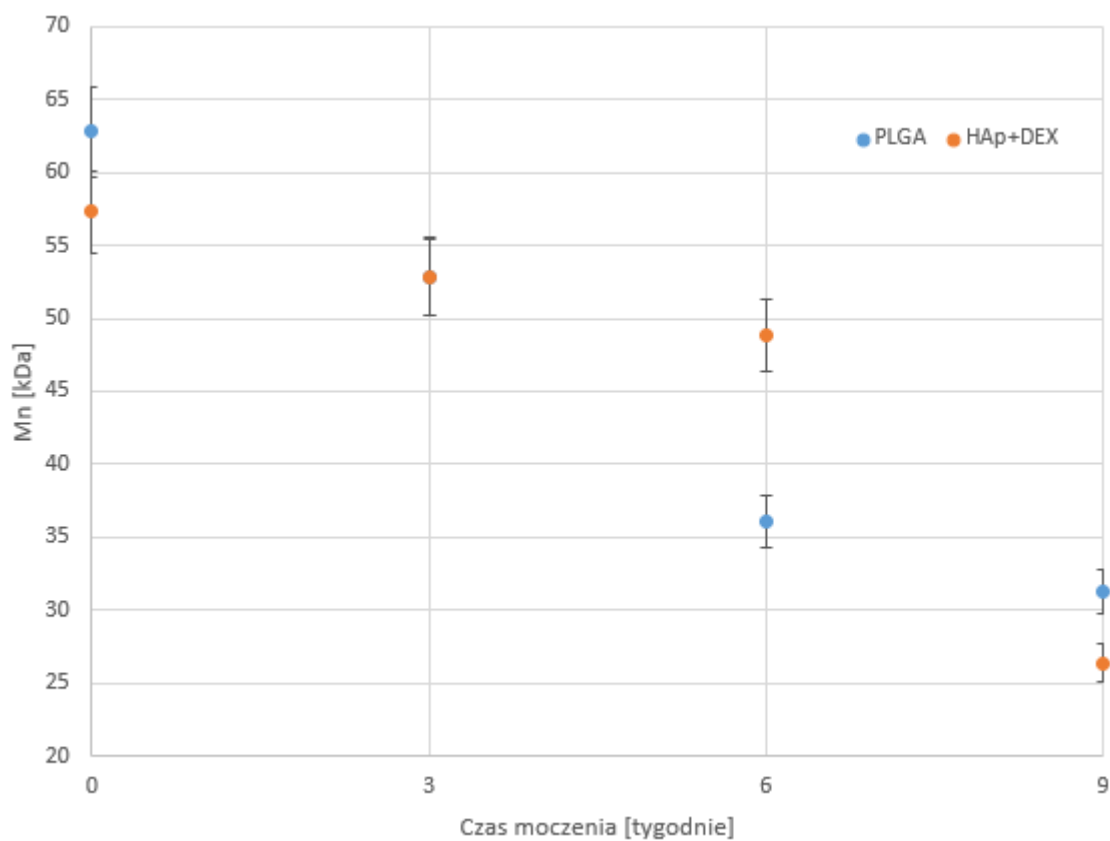
Rysunek 34. Gęstość jonów wapnia i fosforu uwolniona z powierzchni HAp+DEX

4.9. Zmiana masy molekularnej polimeru

Polimer w powłoce HAp+DEX wykazuje w stanie wyjściowym niższą masę molekularną M_n (57 kDa) niż w przypadku powłoki PLGA (63 kDa). Po pierwszych trzech tygodniach moczenia osiągają one tę samą masę $M_n = 53$ kDa, przy czym ubytek masy zachodzi szybciej w przypadku PLGA (Rysunek 35). Po sześciotygodniowej ekspozycji, znacząco zmniejsza się masa molekularna próbki PLGA, natomiast w przypadku HAp+DEX obserwowany jest jedynie nieznaczny spadek. Dopiero po 9 tygodniach moczenia następuje szybszy ubytek masy polimeru w HAp+DEX, końcowo osiągając niższą masę M_n (26 kDa) niż PLGA (31 kDa). Jednakże, procentowo większy ubytek masy polimeru nastąpił w przypadku próbki PLGA.

Tabela 14. Procentowy ubytek masy powłoki

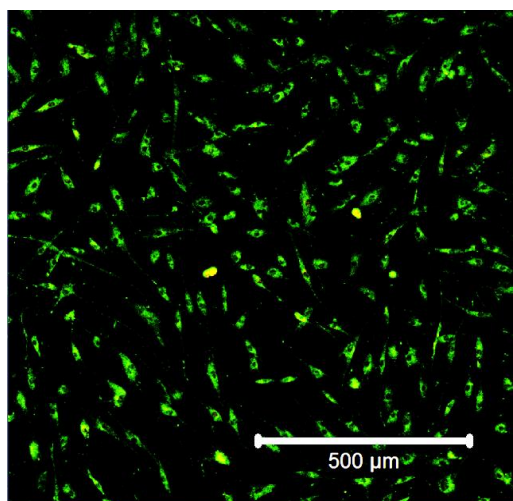
Czas moczenia	WL [%]	
	PLGA	HAp+DEX
3 tygodnie	18,25	16,19
6 tygodni	39,45	20,28
9 tygodni	52,93	45,47



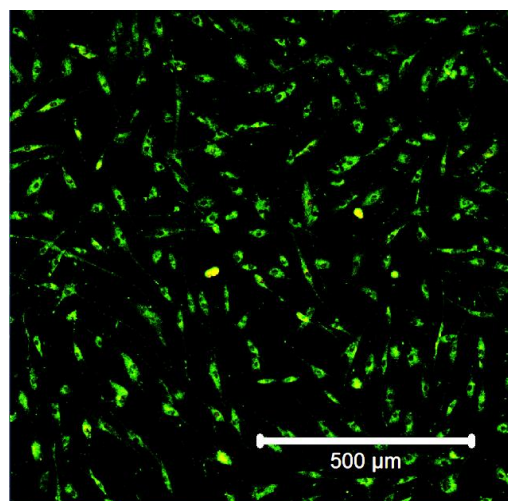
Rysunek 35. Zmiana masy molekularnej polimeru w czasie ekspozycji na działanie roztworu PBS

4.10. Cytotoksyczność

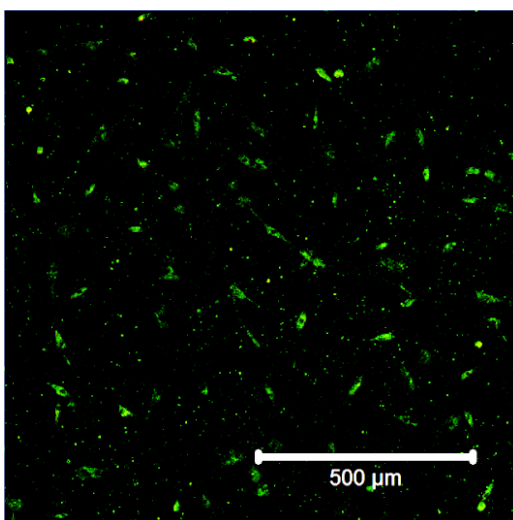
Analizując zdjęcia z mikroskopii konfokalnej można zauważyć prawidłowy wrzecionowaty kształt komórek dla Ti6Al7Nb oraz PLGA (Rysunek 36). Natomiast na powierzchni próbek HAp+DEX zaobserwowano również komórki o kształcie kulistym.



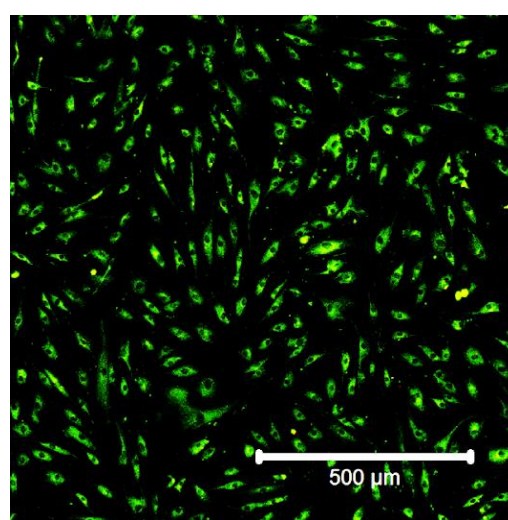
Ti6Al7Nb



PLGA



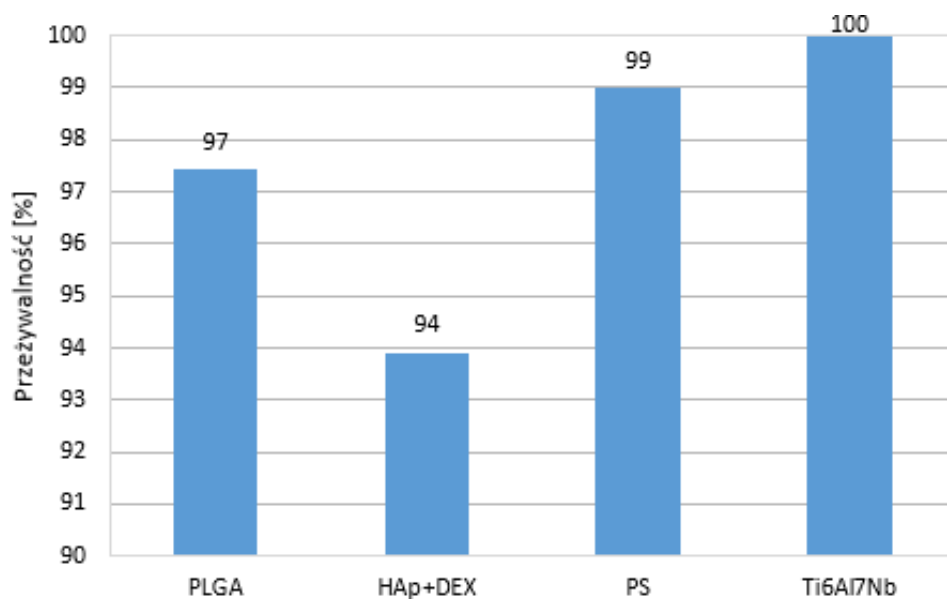
HAp+DEX



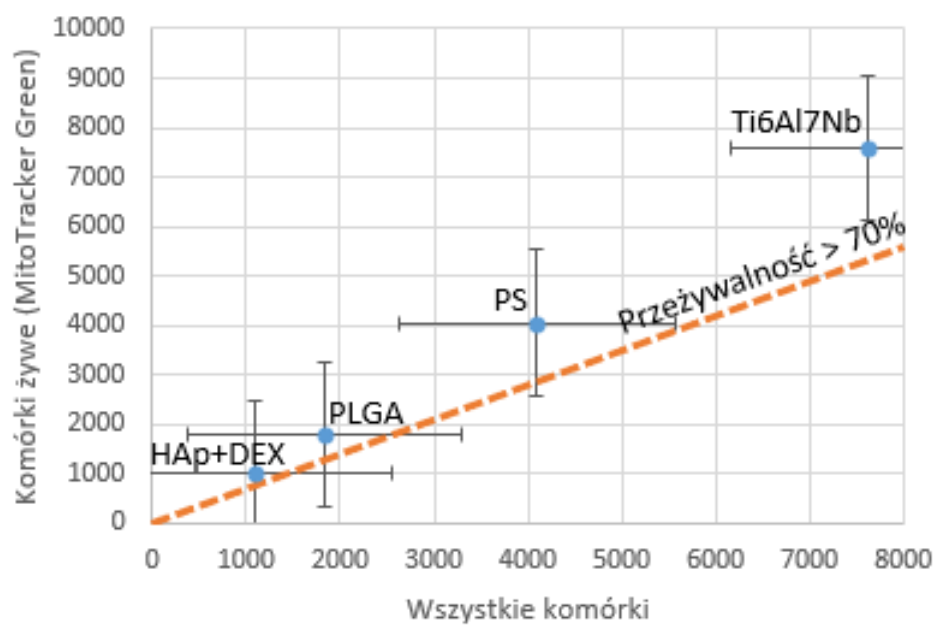
PS – kontrola negatywna

Rysunek 36. Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego, kolor zielony – komórki żywe, kolor czerwony – komórki martwe

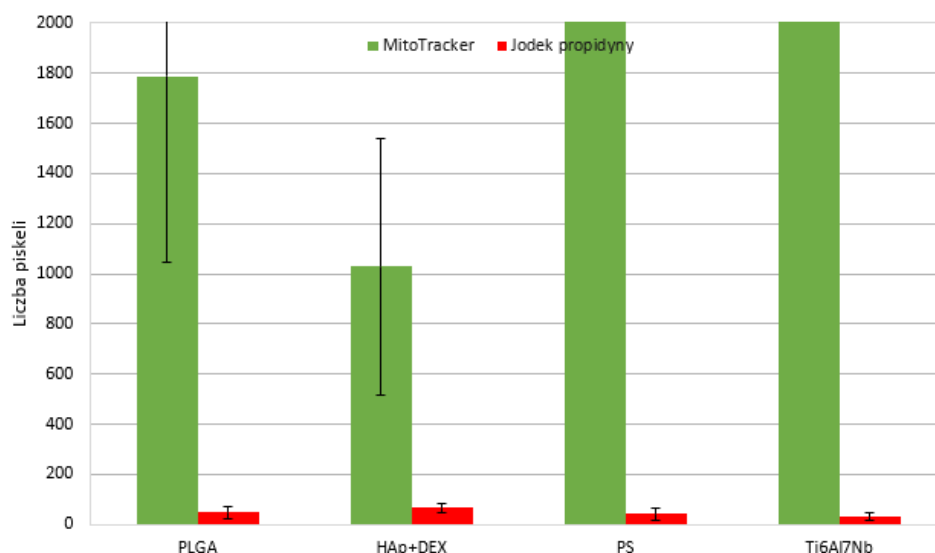
Analiza przeżywalności komórek (Rysunek 37, Rysunek 38) oraz ilości komórek żywych względem martwych (Rysunek 39) wskazuje na przeżywalność komórek na poziomie 94 – 100% we wszystkich analizowanych przypadkach, co zgodnie z normą [152] (przeżywalność > 70%) świadczy o braku działania cytotoksycznego.



Rysunek 37. Przeżywalność komórek

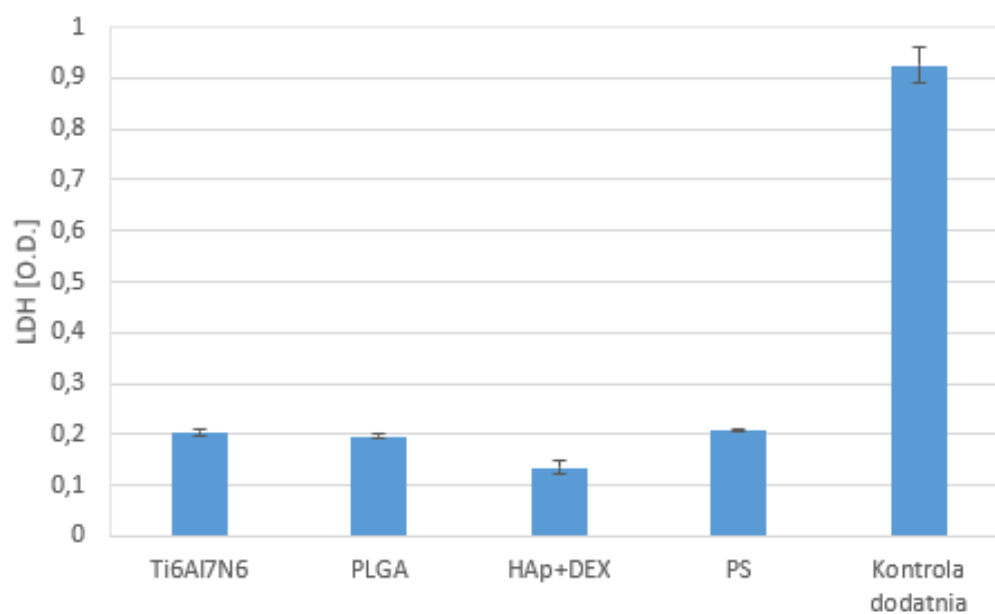


Rysunek 38. Liczba komórek żywych względem wszystkich komórek



Rysunek 39. Liczba pikseli odpowiadająca komórkom żywym i martwym

Dehydrogenaza mleczanowa LDH jest enzymem uwalnianym po rozerwaniu błony komórki. Jego aktywność mierzy się, aby określić cytotoksyczny efekt materiałów lub czynników. Im wyższa wartość LDH, tym wyższa cytotoksyczność. Najwyższy poziom LDH (Rysunek 40) odnotowano dla próbek Ti6Al7Nb, natomiast najniższy dla HAp+DEX.



Rysunek 40. Poziom LDH w kontakcie bezpośrednim (PS – kontrola negatywna)

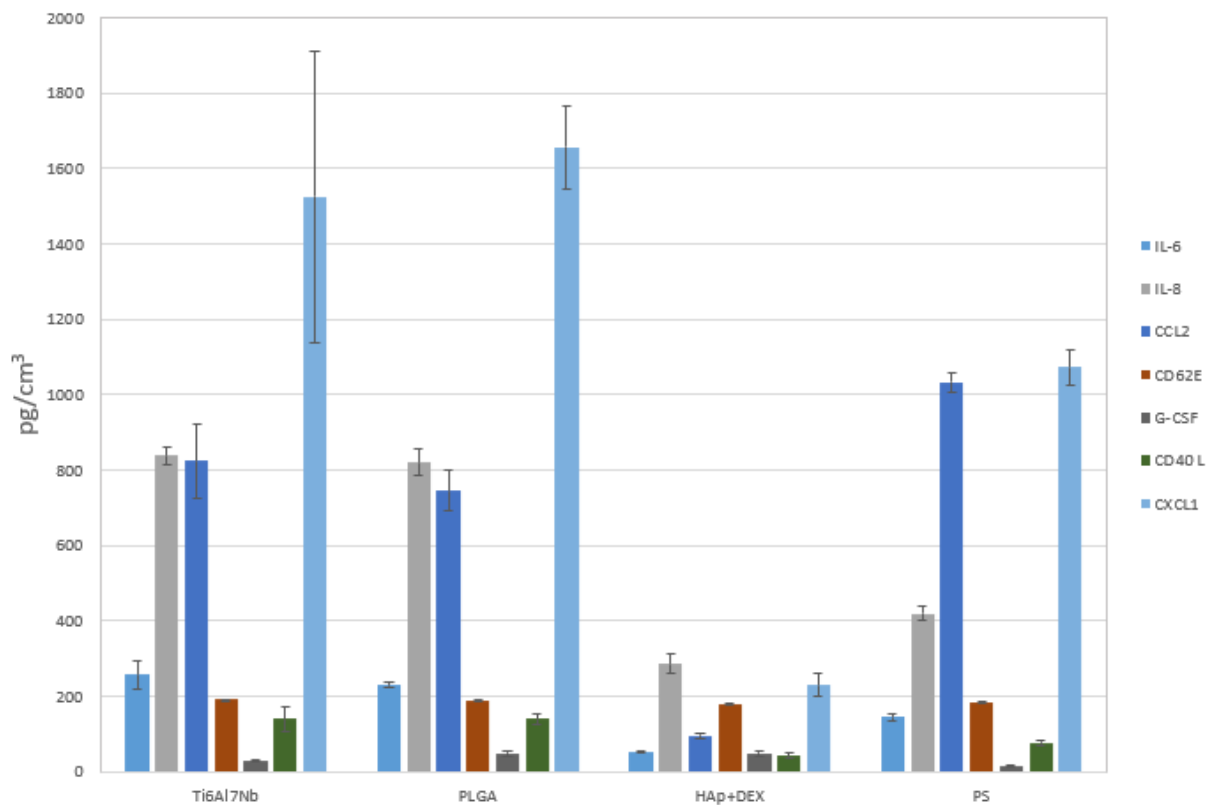
4.11. Cytokiny prozapalne

Cytokiny prozapalne to kluczowe mediatory reakcji zapalnych, które są wytwarzane przez różne komórki układu odpornościowego, które odpowiadają za inicjację i modulację odpowiedzi immunologicznej w organizmie, przede wszystkim podczas infekcji, uszkodzeń tkankowych lub stanów chorobowych takich jak choroby autoimmunologiczne czy nowotwory. Podwyższony poziom cytokin w badaniach *in vitro* jest predykatorem toksyczności ostrej.

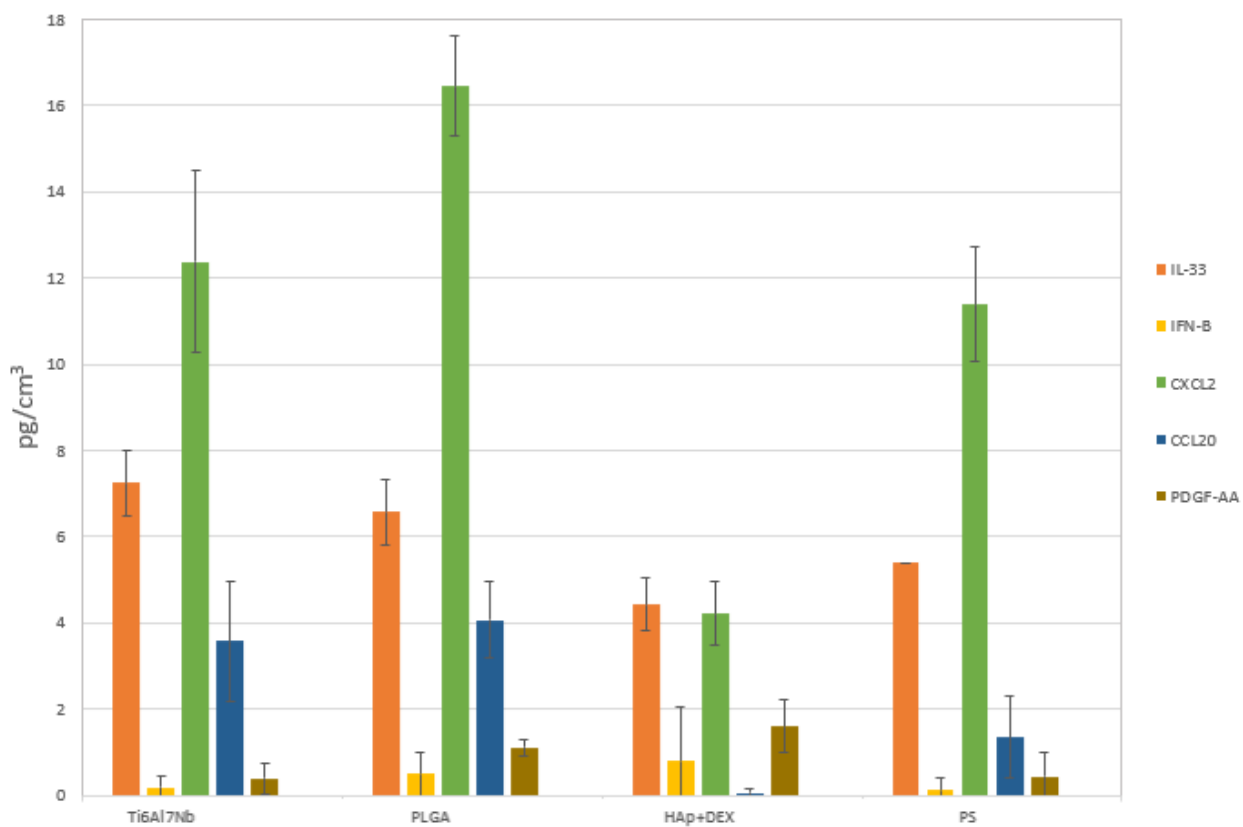
Dla próbki utlenianej anodowo Ti6Al7Nb zaobserwowano nieznacznie wyższe poziomy cytokin IL-6, CD62E, G-CSF, CD40 L, CXCL2, IFN- β , IL-33 oraz PDGF-AA w odniesieniu do kontroli negatywnej (Rysunek 41, Rysunek 42). Z kolei poziom cytokin IL-8, CXCL1 oraz CCL20 są wyraźnie podwyższone. W przypadku utlenianego anodowo stopu odnotowano niższą wartość CCL2 w odniesieniu do kontroli negatywnej.

Analizując poziom cytokin próbek po utlenianiu anodowym oraz powłoki PLGA można stwierdzić, iż naniesienie powłoki PLGA spowodowało niewielkie obniżenie poziomu cytokin IL-6, IL-8, CCL2, IL-33 oraz wzrost poziomu G-CSF, IFN- β , CXCL1, CXCL2 CCL20. Poziomy cytokin CD62E oraz CD40 L nie uległy zmianie.

Zastosowanie powłoki, zawierającej deksametazon, wpłynęło w wyraźny sposób na obniżenie poziomu IL-6, IL-8, CCL2, CD62E, CD40L, CXCL1, IL-33, CXCL2, CCL20 w odniesieniu do utlenianego anodowo stopu oraz powłoki PLGA. Natomiast w przypadku cytokin IFN- β oraz PDGF-AA zaobserwowano wzrost stężenia. Poziom G-CSF jest taki sam jak przy powłoce bez substancji aktywnej, ale nieznacznie wyższy niż w przypadku Ti6Al7Nb. Stężenie CD62E dla każdego rodzaju próbki jest takie samo.



Rysunek 41. Wartości cytokin prozapalnych



Rysunek 42. Wartości cytokin prozapalnych

5. Omówienie wyników

Problematyka operacyjnego leczenia złamań kości z wykorzystaniem implantów obejmuje trzy główne aspekty. Po pierwsze, ryzyko wystąpienia zakażenia okołowszczepowego, w wyniku którego może dojść do utraty stabilizacji miejsca złamania oraz zaburzeń zrostu kostnego. Po drugie, dobór implantu, który z jednej strony zapewni odpowiednie ułożenie oraz stabilizację odłamów kostnych poprzez swoją konstrukcję oraz właściwości mechaniczne materiału. Po trzecie materiał ten musi cechować odporność korozyjna w środowisku tkankowym, biokompatybilność oraz w przypadku systemów stabilizacji do czasowej implantacji, właściwości osteokonduktywne, aby w jak najmniejszym stopniu traumatyzować tkanki podczas usuwania implantu po zakończonej rekonwalescencji. Obecnie do zastosowań w ortopedii i traumatologii najczęściej wybierane są stopy tytanu, które jednak wymagają zastosowania dodatkowej modyfikacji powierzchni, w celu poprawy odporności korozyjnej oraz biokompatybilności przez ograniczenie uwalniania jonów z powierzchni implantu do środowiska tkankowego. Jedną z takich metod jest utlenianie anodowe, w wyniku którego na powierzchni wytwarzana jest warstwa o składzie chemicznym ściśle uzależnionym od zastosowanych warunków procesu oraz składu i pH stosowanego do utleniania elektrolitu.

W pracy jako biomateriał metalowy wybrano stop $Ti6Al7Nb$, którego powierzchnię utleniano anodowo. Stop ten jest coraz powszechniej wykorzystywany do produkcji stabilizatorów kostnych, natomiast utlenianie anodowe jest najczęściej stosowaną metodą modyfikacji ich powierzchni. Wyniki badań wskazują, że warstwa wierzchnia składa się z tlenków tytanu, aluminium i niobu (Rysunek 16). Wśród tlenków tytanu powierzchniowo dominuje TiO_2 (Rysunek 19). Sytuacja ta zmienia się w ciągu pierwszych minut trawienia, gdy ilość TiO_2 spadła do około 35% całkowitej zawartości tytanu, wzrasta natomiast udział Ti_2O_3 i TiO . Wraz z dalszym wzrostem głębokości, zwiększa się udział tytanu w postaci metalicznej. Na głębokości odpowiadającej 360 min trawienia najmniejsza jest zawartość tlenku TiO_2 . Od powierzchni warstwy do głębokości odpowiadającej 150 min trawienia, glin występuje tylko w postaci Al_2O_3 (Rysunek 20). Następnie jego zawartość gwałtownie spada osiągając poziom ok. 50% całkowitej zawartości Al, a pozostałe 50% stanowi glin w postaci metalicznej. Przy powierzchni warstwy pasywnej nie występują tlenki niobu. Niob w postaci Nb_2O_5 oraz NbO/NbC

pojawia się dopiero na głębokości, odpowiadającej ok. 10 min trawienia jonami Ar^+ (Rysunek 21). Wraz ze wzrostem głębokości wzrasta udział Nb w postaci metalicznej, maleje natomiast udział tlenków niobu, aż do głębokości, odpowiadającej ok. 315 min trawienia, gdzie jedyną składową niobu stanowi jego postać metaliczna. Ponadto w skład warstwy wierzchniej wchodzi fosfor, siarka, wapń oraz sód, których obecność pochodzi z roztworu wykorzystywanego do utleniania anodowego, a także krzem, który stanowi pozostałość po procesie piaskowania (Rysunek 17 Rysunek 18). Na powierzchni warstwy obecnie są głównie tlenki TiO_2 , co zapewnia skuteczną ochronę przed korozją wżerową. Co więcej, obecność fosforu i wapnia w warstwie może promować bioaktywację powierzchni i poprawiać osteokonduktywność.

Modyfikacja stopów tytanu biodegradowalnymi powłokami polimerowymi pozwala na dwutorowe działanie, jednocześnie pełnić funkcję bariery dla produktów degradacji uwalnianych z powierzchni oraz stanowić matrycę dla uwalniania substancji aktywnych, których zadaniem jest zmniejszenie ryzyka infekcji po implantacji oraz wspomaganie procesów regeneracji tkanki kostnej. Powłoka polimerowa do zastosowań w ortopedii i traumatologii powinna charakteryzować się ciągłością oraz dobrą adhezją do podłoża, co będzie miało bezpośredni wpływ na jej trwałość podczas implantacji.

Jako matrycę do uwalniania substancji aktywnych wybrano biodegradowalny polimer poli(laktyd-ko-glikolidu), w którym umieszczono hydroksyapatyt i deksametazon. Bezpośrednio na powierzchnię stopu nałożono powłokę, zawierającą HAp, stanowiący główny mineralny składnik kości, wybrany z powodu jego właściwości osteokonduktywnych oraz bioaktywnych. Degradacja tej części powłoki przez uwalnianie cząsteczek hydroksyapatytu ma za zadanie wspomagać proces regeneracji tkanki kostnej. Natomiast DEX, obecny w zewnętrznych warstwach nałożonej powłoki, charakteryzuje się przeciwzapalnym działaniem. Jego uwalnianie powoduje ograniczenie ryzyka infekcji oraz stanu zapalnego po implantacji. Między zewnętrzną i wewnętrzną częścią powłoki nałożono warstwę przejściową (PLGA bez substancji), której zastosowanie podyktowane było, pojawiającą się w wyniku interakcji obu składników powłoki delaminacją. W pracy kompleksowej ocenie poddano próbki utleniane anodowo (próbki referencyjne), utleniane anodowo z powłoką polimerową (PLGA) oraz utleniane anodowo z warstwową powłoką składającą się z PLGA zawierającą HAp, czystego PLGA i PLGA zawierającego DEX - (HAp+DEX).

Obserwacje powierzchni powłok PLGA oraz HAp+DEX potwierdzają ich ciągłość, jednorodność oraz transparentność (Rysunek 22Rysunek 23). Ponadto obecny w powłoce hydroksyapatyt jest równomiernie rozproszony (Rysunek 24). Widoczne na powierzchni kuliste struktury są charakterystyczne dla zastosowanej metody natryskiwania ultradźwiękowego i wynikają najprawdopodobniej z częściowego odparowania rozpuszczalnika przed dotarciem kropli roztworu na nanoszoną powierzchnię. Żadna z powłok nie posiada defektów ani miejscowych delaminacji (Rysunek 28). Wyniki badań wskazują, że dodatek hydroksyapatytu oraz deksametazonu wpływa na poprawę adhezji powłoki PLGA do utlenianego anodowo podłoża Ti6Al7Nb (Tabela 9). Zarówno powłoka PLGA, jak i HAp+DEX, nie wykazywała przerwania ciągłości po moczeniu (Rysunek 25). Ponadto obserwacje z wykorzystaniem mikroskopu akustycznego potwierdzają brak delaminacji powłoki po moczeniu (Rysunek 28). Przeprowadzone obserwacje z wykorzystaniem SEM i SAM pozwalają stwierdzić, że dodatek HAp i DEX nie wpływa w widoczny sposób na zmiany powierzchni podczas ekspozycji na roztwór PBS. Natomiast wyniki badań scratch-test wskazują, że wraz z czasem moczenia spada adhezja powłok do podłoża. Obserwowane w obrazie zarejestrowanym za pomocą mikroskopu akustycznego zmiany gęstości powłok polimerowych wynikać mogą z absorpcji wody i pęcznienia powłoki.

Implanty do czasowej stabilizacji powinny wykazywać także właściwości osteokonduktywne, które w dużej mierze zależą od chropowatości oraz zwilżalności powierzchni. Wykazano [55], że najlepsze właściwości osteokonduktywne posiadają materiały o R_a w zakresie 0,1-0,3 μm . Ponadto czym wyższa chropowatość, tym lepsza może być osteointegracja między kością a implantem [55], [142]. Otrzymane powłoki charakteryzują się wyższymi parametrami chropowatości niż sugerowane dla zapewnienia właściwości osteokonduktywnych (Tabela 6Tabela 7). Ponadto dodatek hydroksyapatytu i leku znacząco podnosi chropowatości powierzchni. Wzrost chropowatości wraz z czasem moczenia, tożsamy jest ze zmianami morfologii powierzchni, co potwierdzono podczas obserwacji mikroskopowych (Rysunek 25). Największe odchylenia standardowe parametrów R_a i S_a mogą świadczyć o największym zróżnicowaniu powierzchni, wynikającym z obecności cząsteczek hydroksapatytu o wielkości ok. 180 nm oraz procesu degradacji powłoki.

Implant po wszczepieniu ma pierwszy kontakt z płynami ustrojowymi, składającymi się w głównej mierze z wody. Z tego powodu zwilżalność powierzchni

będzie miała znaczący wpływ na zachodzące na niej procesy. Dla zapewnienia właściwości osteokonduktywnych powierzchnia implantu powinna mieć charakter hydrofilowy [143], [144], [145]. Wyniki badań wskazują, że wszystkich powierzchnie mają właściwości hydrofilowe, przy czym zawartość hydroksyapatytu i leku wpływa na obniżenie zwilżalności powierzchni (Tabela 8). Czas ekspozycji na roztwór PBS wpływa na systematyczne zmniejszanie kąta zwilżania, a więc wraz z czasem wzrasta hydrofilowość powierzchni. Poza wpływem na właściwości osteokonduktywne, zwilżalność decyduje także o adhezji białek oraz bakterii do powierzchni implantu. W środowisku wodnym większą adhezję bakterii obserwuje się w przypadku powierzchni hydrofobowych [146]. Otrzymane wyniki sugerują, że powłoki PLGA oraz HAp+DEX mogą ograniczać rozwój biofilmu na powierzchni, w ten sposób zmniejszając również ryzyko infekcji, a ich hydrofilowa powierzchnia promuje właściwości osteokonduktywne materiału.

Stosowane na implanty w ortopedii i traumatologii powłoki polimerowe powinny zapewniać poprawę odporności korozyjnej oraz poprawiać biokompatybilność stopu tytanu przez ograniczanie przenikania jego produktów degradacji do środowiska tkankowego. Podczas analizy wyników badań elektrochemicznych, należy zwrócić uwagę, że wartości E_{ocp} mają stosunkowo duże odchylenie standardowe (około 50-150 mV) (Tabela 11). Ponieważ polimer pod wpływem elektrolitu ulega degradacji, co zostało potwierdzone zmianą masy molekularnej (Tabela 14), zrozumiałe jest, że proces ten zakłóca zachodzące procesy elektrochemiczne, ponieważ lokalnie zakwasza obszar w pobliżu elektrody. Chociaż oczekuje się, że działanie buforujące PBS powinno zminimalizować ten efekt, jednakże jest on również dość bogaty w agresywne jony chlorkowe, które mogą komplikować przebieg procesu korozyjnego. Korozja powodowana przez jony chlorkowe jest zawsze do pewnego stopnia nieprzewidywalna ze względu na jej lokalny, złożony i częściowo stochastyczny charakter [147], dlatego można oczekiwać, że niektóre obszary próbki będą korodować w większym stopniu, a inne w mniejszym.

Korozja jest procesem zachodzącym w długich skalach czasowych, z tego powodu impedancja mierzona w niskoczęstotliwościowej części widma jest najbardziej przydatna do określenia ogólnej odporności na korozję badanych próbek. Warto zauważyć, że próbki utlenianego anodowo tytanu bez powłoki oraz z powłoką PLGA charakteryzują się początkowo bardzo podobnym modułem impedancji przy częstotliwości

$f=0,01$ Hz (Rysunek 31). Anodowanie tytanu tworzy bardzo cienką i wytrzymałą powłokę tlenkową, która jest odporna na atak chlorków [148], co wyjaśnia, dlaczego wartości $|Z|$ przekraczają $10 \text{ M}\Omega\text{cm}^2$. Powłoka PLGA na anodyzowanej powierzchni stopu tytanu tylko nieznacznie zwiększa moduł impedancji w obszarze niskich częstotliwości. Sugeruje to, że najbardziej znaczący wkład w odporność korozyjną próbek ma warstwa tlenku wytworzona w procesie utleniania anodowego [149], [150]. Niemniej jednak w zakresie średnich i wysokich częstotliwości, wartości modułu $|Z|$ powłok jest znacznie wyższa w porównaniu do utlenianego stopu (Rysunek 30), co razem z wynikami badań potencjodynamicznych wskazuje na wpływ powłoki polimerowej na poprawę odporności korozyjnej badanej próbki. Próbki z powłoką PLGA charakteryzują się mniejszą wartością potencjału korozyjnego oraz większymi wartościami oporu polaryzacyjnego w porównaniu do utlenianego stopu Ti6Al7Nb bez powłoki (Tabela 12 Tabela 13). Dodatek HAp i DEX spowodował spadek zmierzonej impedancji przy częstotliwości $f=0,01$ Hz (Rysunek 31). Spowodowane może to być powstałymi przez obecność cząstek HAp, defektami mikrostrukturalnymi albo zwiększoną rzeczywistą powierzchnią powstałego układu elektrochemicznego [149]. Jednocześnie, podobnie jak w przypadku powłoki PLGA, zaobserwowano wzrost modułu impedancji w zakresie średnich i wysokich częstotliwości. Wyniki badań potencjodynamicznych wskazują, że powłoka zawierająca HAp i DEX, charakteryzowała się niższymi wartościami potencjału E_{kor} oraz R_p niż powłoka PLGA bez dodatku substancji, ale wykazywała lepszą odporność korozyjną niż stop Ti6Al7Nb.

Ekspozycja na roztwór PBS prowadzi do postępującego wraz z czasem obniżenia impedancji, a tym samym zmniejszenia odporności na korozję. Po 9 tygodniach moczenia (Rysunek 30d)), wartości $|Z|$ mierzone przy $0,01$ Hz wynoszą ok. $500 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$, co jest typowe dla materiałów na bazie tytanu [149]. Pogorszenie odporności korozyjnej, wraz z czasem trwania moczenia potwierdzają także uzyskane wartości oporu polaryzacyjnego (Tabela 13). Otrzymane wyniki sugerują, że powłoki polimerowe pozytywnie wpływają na odporność korozyjną stopu tytanu, a także mogą spowolnić zachodzące procesy korozyjne warstwy wierzchniej.

Ponadto zastosowanie powłoki PLGA na podłożu utlenianego anodowo stopu Ti6Al7Nb znacznie obniżyło gęstość masy jonów Ti, Al oraz Nb przenikających do roztworu PBS (Rysunek 33). Dodatek HAp i DEX jeszcze bardziej ogranicza przenikanie jonów z powierzchni stopu tytanu. Świadczy to o spełnianiu przez obie

warianty powłok (PLGA i HAp+DEX) funkcji ochronnej w postaci bariery dla produktów degradacji metalowego podłoża. Każdy umieszczony w organizmie implant narażony jest na degradację prowadzącą do uwalniania jonów pierwiastków stopowych do środowiska tkankowego, co może skutkować wystąpieniem działań niepożądanych. Zastosowanie powłoki jako bariery dla uwalnianych jonów prowadzi zatem do poprawy biokompatybilności stosowanych implantów. Warto zauważyć, że wraz ze wzrostem czasu wzrasta ilość jonów w roztworze. Może to wskazywać na postępujący podczas trwania ekspozycji proces degradacji powłoki, który znajduje potwierdzenie w ubytku masy molekularnej polimeru powłoki. Jednakże podczas badań XRD nie zostały wykryte piki charakterystyczne dla produktów degradacji stopu tytanu, co może świadczyć o szczelności zastosowanej powłoki przez okres moczenia (Rysunek 29).

Powłoka, która stanowi matrycę do uwalniania substancji aktywnych, musi zapewniać kontrolowaną degradację polimeru, a co z tym związane kinetykę uwalnianych substancji. Obserwowane różnice w ubytku masy molekularnej polimeru w powłoce PLGA oraz HAp+DEX, wskazują, że hydroksyapatyt oraz lek wpływa na kinetykę degradacji polimeru, spowalniając ją w początkowej fazie (Rysunek 35). Wyniki badań XRD wskazują, że dodatek HAp oraz DEX nie wpływa na amorficzność polimeru. W czasie degradacji nie zachodzi jego krystalizacja, a rozpuszczanie. Biorąc pod uwagę parametry strukturalne HAp, należy zauważyć, że odkształcenie sieci zmniejsza się wraz z niewielkimi zmianami parametrów sieci. Może to sugerować interakcję między zastosowanym roztworem a cząstkami HAp, powodując relaksację struktury krystalicznej, najprawdopodobniej z powodu obecności jonów PO_4^{3-} w roztworze. W oparciu o otrzymane wyniki stwierdzono, że uwalnianie hydroksyapatytu do roztworu następuje po 6 tygodniach degradacji, a po 9 tygodniach degradacji jest ono coraz silniejsze.

Koreluje to z wynikami przenikania jonów, w których obecność jonów wapnia i fosforu odnotowano po 6 tygodniach. Świadczy to o tym, że w pierwszych etapach degradowe część powłoki zawierająca substancję aktywną, a następnie zastosowana warstwa przejściowa. Niestety z powodu zbyt małej grubości powłoki, zawierającej DEX, pomimo podjętych prób określenia kinetyki uwalniania leku, nie udało się to. Otrzymywane podczas badań wyniki były obarczone zbyt dużymi błędami. Jednakże wyniki badań przedstawione w pracy pozwalają sądzić, że następująca w pierwszych etapach degradacja powłoki prowadzi do uwolnienia substancji aktywnej. Zapewnienie

takiej degradacji powłoki polimerowej i co za tym idzie stopniowego uwalniania zawartych w powłoce substancji, pozwala na obniżenie ryzyka infekcji i stanu zapalnego w pierwszym etapie degradacji powłoki. A następnie, uwalniany HAp może wspomagać proces regeneracji tkanki kostnej w fazie formowania kostniny.

Wszystkie materiały stosowane na implanty muszą wykazywać brak działania cytotoksycznego. Wyniki badań przeżywalności komórek, świadczą o tym, że wszystkie analizowane próbki wykazują brak cytotoksyczności (przeżywalność 94 – 100%) (Rysunek 36 Rysunek 39). Ponadto wyniki aktywności dehydrogenazy mleczanowej LDH wskazują, że dodatek hydroksyapatytu i deksametazonu obniża cytotoksyczność powłoki PLGA (Rysunek 40).

Cytokiny prozapalne są związkami odpowiedzialnymi za inicjację i modulację odpowiedzi immunologicznej w organizmie podczas infekcji, uszkodzeń tkankowych lub stanów chorobowych. Podwyższone poziomy cytokin w badaniach *in vitro* wskazują toksyczność ostrą. Otrzymane w pracy wyniki dowodzą, że obniżenie stężenia cytokin zachodzi poprzez zastosowanie deksametazonu w powłoce (Rysunek 41 Rysunek 42). Poziom cytokin utlenianego anodowo stopu Ti6Al7Nb bez powłoki oraz z powłoką PLGA, jest znacznie wyższy niż w przypadku powłoki HAp+DEX. Pozwala to sądzić, że zawarta w powłoce substancja aktywna działa w sposób przeciwzapalny oraz może ograniczać infekcje.

Reasumując, otrzymana w pracy powłoka polimerowa, zawierająca hydroksyapatyt oraz deksametazon charakteryzuje się ciągłością, jednorodnością oraz stosunkowo dobrą adhezją. Powłoka wykazuje chropowatość, która zgodnie z danymi literaturowymi może promować integrację z kością, jednak jej hydrofilowa powierzchnia poprawia właściwości osteokonduktywne, jednocześnie ograniczając również adhezję bakterii i powstawanie biofilmu, odpowiedzialnego za inicjację infekcji. Wyniki badań elektrochemicznych sugerują dobrą odporność korozyjną próbek z naniesioną powłoką, która ponadto spełnia funkcję barierową, w znaczny sposób ograniczając przenikanie jonów z powierzchni stopu do środowiska. Wskazuje to na poprawę biokompatybilności względem utlenianego stopu Ti6Al7Nb. Wyniki zmian masy molekularnej polimeru, udowadniają, że dodatek HAp oraz DEX wpływa na kinetykę degradacji powłoki, nieznacznie ją spowalniając. Uwalnianie substancji zachodzi w sposób stopniowy i stały, czego potwierdzeniem są wyniki przenikania jonów Ca i P oraz badania XRD. Co istotne z punktu widzenia zastosowania na implanty, nałożona

powłoka nie powoduje efektu cytotoksycznego. Ponadto zmniejszenie aktywności cytokin prozapalnych świadczy o jej przydatności w zapobieganiu infekcji i stanów zapalnych.

Analiza danych literaturowych oraz wyniki zrealizowanych badań wskazują na potrzebę precyzyjnego określenia kinetyki uwalniania deksametazonu oraz określenie przydatności nałożonej powłoki na implantach w warunkach klinicznych.

6. Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników badań sformułowano następujące wnioski i spostrzeżenia:

1. Biodegradowalna powłoka polimerowa, zawierająca hydroksyapatyt i deksametazon, jest transparentna, ciągła i jednorodna. Dodatek HAp i DEX poprawia adhezję powłoki do metalowego podłoża.
2. Polimerowa powłoka HAp+DEX charakteryzuje się właściwościami hydrofilowymi. Dodatek HAp i DEX wpływa na wzrost chropowatość powierzchni.
3. Biodegradowalna powłoka polimerowa HAp+DEX charakteryzuje się dobrą odpornością korozyjną. Stanowi barierę dla jonów pierwiastków stopowych Ti6Al7Nb uwalnianych do środowiska, w znaczący sposób ograniczając ich ilość.
4. Dodatek hydroksyapatytu oraz deksametazonu wpływa na spowolnienie degradacji powłoki polimerowej. Kanapkowa struktura powłoki umożliwia stopniowe uwalnianie zawartych w powłoce substancji. Uwalnianie HAp obserwuje się od 6 tygodnia i jest ono ciągłe.
5. Powłoka HAp+DEX nie wykazuje działania cytotoksycznego. Zawarty w powłoce deksametazon ogranicza aktywność cytokin prozapalnych.

BIBLIOGRAFIA

- [1] F. Horan, "Gray's Anatomy: the anatomical basis of clinical practice," *J Bone Joint Surg Br*, vol. 91-B, no. 7, 2009, doi: 10.1302/0301-620x.91b7.22719.
- [2] R. Florencio-Silva, G. R. D. S. Sasso, E. Sasso-Cerri, M. J. Simões, and P. S. Cerri, "Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells," *Biomed Res Int*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/421746.
- [3] Niedźwiedzki Tadeusz and Kuryszko Jan, *Biologia kości*. Warszawa: PWN, 2007.
- [4] "Bone cross-section-pl - File:Bone cross-section.svg - Wikimedia Commons." Accessed: Sep. 30, 2024. [Online]. Available: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bone_cross-section.svg#/media/File:Bone_cross-section-pl.svg
- [5] A. E. Goodship and R. K. W. Smith, "Skeletal physiology: responses to exercise and training," *Equine Exercise Physiology: The Science of Exercise in the Athletic Horse*, pp. 81–105, Jan. 2008, doi: 10.1016/B978-070202857-1.50006-8.
- [6] F. J. A. De Paula, D. M. Black, and C. J. Rosen, "Osteoporosis and Bone Biology," *Williams Textbook of Endocrinology*, pp. 1323–1364, Jan. 2016, doi: 10.1016/B978-0-323-29738-7.00029-0.
- [7] A. Ressler, A. Žužić, I. Ivanišević, N. Kamboj, and H. Ivanković, "Ionic substituted hydroxyapatite for bone regeneration applications: A review," *Open Ceramics*, vol. 6, Jun. 2021, doi: 10.1016/J.OCERAM.2021.100122.
- [8] M. Tzaphlidou, "Bone Architecture: Collagen Structure and Calcium/Phosphorus Maps," *J Biol Phys*, vol. 34, no. 1–2, p. 39, Apr. 2008, doi: 10.1007/S10867-008-9115-Y.
- [9] P. H. Schlesinger *et al.*, "Landmark Review: Cellular and extracellular matrix of bone, with principles of synthesis and dependency of mineral deposition on cell membrane transport," *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 318, no. 1, p. C111, Jan. 2020, doi: 10.1152/AJPCELL.00120.2019.
- [10] M. Gao *et al.*, "Capacitive deionization toward fluoride elimination: Selective advantage, state of the art, and future perspectives," *Desalination*, vol. 577, p. 117392, May 2024, doi: 10.1016/J.DESAL.2024.117392.

- [11] T. U. Habibah, D. V. Amlani, and M. Brizuela, "Hydroxyapatite Dental Material," *StatPearls*, Sep. 2022, Accessed: Sep. 30, 2024. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513314/>
- [12] J. Latocha, "Procesy otrzymywania nanocząsteczek hydroksyapatytu o różnej morfologii do zastosowań biomedycznych", [Rozprawa doktorska, Uniwersytet Warszawski], Warszawa, 2023.
- [13] K. Lin and J. Chang, "Structure and properties of hydroxyapatite for biomedical applications," *Hydroxyapatite (Hap) for Biomedical Applications*, pp. 3–19, Jan. 2015, doi: 10.1016/B978-1-78242-033-0.00001-8.
- [14] S. Rujitanapanich, P. Kumpapan, and P. Wanjanoi, "Synthesis of hydroxyapatite from oyster shell via precipitation," *Energy Procedia*, vol. 56, no. C, pp. 112–117, 2014, doi: 10.1016/J.EGYPRO.2014.07.138.
- [15] M. Khoroushi, A. A. Khademi, M. E. Dastgurdi, and M. Abdolrahimi, "Nanobiomaterials in endodontics," *Nanobiomaterials in Dentistry: Applications of Nanobiomaterials*, vol. 11, pp. 389–424, Jan. 2016, doi: 10.1016/B978-0-323-42867-5.00014-X.
- [16] S. Pokhrel, "Hydroxyapatite: Preparation, Properties and Its Biomedical Applications," *Advances in Chemical Engineering and Science*, vol. 08, no. 04, 2018, doi: 10.4236/aces.2018.84016.
- [17] R. Z. LeGeros, "Calcium phosphate-based osteoinductive materials," *Chem Rev*, vol. 108, no. 11, pp. 4742–4753, Nov. 2008, doi: 10.1021/CR800427G/ASSET/CR800427G.FP.PNG_V03.
- [18] C. Szpalski, M. McRae, G. F. Rogers, J. D. Bumgardner, and S. M. Warren, "Biomaterials and Their Application in Craniomaxillofacial Surgery," *Comprehensive Biomaterials*, vol. 6, pp. 325–341, Jan. 2011, doi: 10.1016/B978-0-08-055294-1.00219-1.
- [19] S. Pokhrel, "Hydroxyapatite: Preparation, Properties and Its Biomedical Applications," *Advances in Chemical Engineering and Science*, vol. 08, no. 04, 2018, doi: 10.4236/aces.2018.84016.
- [20] N. L. Fazzalari, "Bone Fracture and bone fracture repair," *Osteoporosis International*, vol. 22, no. 6, pp. 2003–2006, Jun. 2011, doi: 10.1007/S00198-011-1611-4/METRICS.

- [21] K. Arvidson *et al.*, “Bone regeneration and stem cells,” *J Cell Mol Med*, vol. 15, no. 4, pp. 718–746, Apr. 2011, doi: 10.1111/J.1582-4934.2010.01224.X.
- [22] B. Beamer, C. Hettrich, and J. Lane, “Vascular endothelial growth factor: An essential component of angiogenesis and fracture healing,” *HSS Journal*, vol. 6, no. 1, pp. 85–94, Feb. 2010, doi: 10.1007/S11420-009-9129-4.
- [23] D. Yuan and A. El-Hashash, “Cutting edge research on stem cell applications in joint, cartilage, and bone repair and regeneration,” *Joint and Bone: From Bench to Bedside*, pp. 1–21, Jan. 2023, doi: 10.1016/B978-0-323-91938-8.00007-X.
- [24] R. Dimitriou, E. Jones, D. McGonagle, and P. V. Giannoudis, “Bone regeneration: Current concepts and future directions,” *BMC Med*, vol. 9, no. 1, pp. 1–10, May 2011, doi: 10.1186/1741-7015-9-66/FIGURES/1.
- [25] J. R. Sheen, A. Mabrouk, and V. V. Garla, “Fracture Healing Overview,” *StatPearls*, Apr. 2023, Accessed: Sep. 30, 2024. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551678/>
- [26] T. J. Pater, S. I. Grindel, G. J. Schmeling, and M. Wang, “Stability of unicortical locked fixation versus bicortical non-locked fixation for forearm fractures,” *Bone Research 2014 2:1*, vol. 2, no. 1, pp. 1–5, Jul. 2014, doi: 10.1038/boneres.2014.14.
- [27] J. Li *et al.*, “Materials evolution of bone plates for internal fixation of bone fractures: A review,” *J Mater Sci Technol*, vol. 36, pp. 190–208, Jan. 2020, doi: 10.1016/J.JMST.2019.07.024.
- [28] R. K. Gupta, R. K. Rohilla, K. Sangwan, V. Singh, and S. Walia, “Locking plate fixation in distal metaphyseal tibial fractures: Series of 79 patients,” *Int Orthop*, vol. 34, no. 8, pp. 1285–1290, Dec. 2010, doi: 10.1007/S00264-009-0880-4/TABLES/3.
- [29] “Płytki kostne proste - Medgal.” Accessed: Sep. 30, 2024. [Online]. Available: <https://medgal.com.pl/product?id=22>
- [30] C. Krettek, P. Schandelmaier, T. Miclau, and H. Tscherne, “Minimally invasive percutaneous plate osteosynthesis (MIPPO) using the DCS in proximal and distal femoral fractures,” *Injury*, vol. 28, no. SUPPL.1, pp. A20–A30, Jan. 1997, doi: 10.1016/S0020-1383(97)90112-1.
- [31] “MIPO for Complete oblique or spiral, simple.” Accessed: Sep. 30, 2024. [Online]. Available: <https://surgeryreference.aofoundation.org/orthopedic-trauma/pediatric-trauma/femoral-shaft/32-d-51/mipo#general-considerations>

- [32] D. K. Wukich, A. Joseph, M. Ryan, C. Ramirez, and J. J. Irrgang, "Outcomes of ankle fractures in patients with uncomplicated versus complicated diabetes," *Foot Ankle Int*, vol. 32, no. 2, pp. 120–130, Feb. 2011, doi: 10.3113/FAI.2011.0120.
- [33] V. Filardi, "The healing stages of an intramedullary implanted tibia: A stress strain comparative analysis of the calcification process," *J Orthop*, vol. 12, pp. S51–S61, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.jor.2015.01.016.
- [34] J. Szewczenko, *Kształowanie własności fizycznych i chemicznych warstwy wierzchniej implantów ze stopu tytanu dla traumatologii i ortopedii*. Gliwice, 2014.
- [35] J. Marciniak, "Biomateriały." 2002.
- [36] "GWÓŹDŹ ŚRÓDSZPIKOWY - MEDGAL VET." Accessed: Sep. 30, 2024. [Online]. Available: <https://medgalvet.com.pl/produkt/gwozdz-srodszpikowy/>
- [37] P. Kazimierczak and A. Przekora, "Osteoconductive and Osteoinductive Surface Modifications of Biomaterials for Bone Regeneration: A Concise Review," *Coatings 2020, Vol. 10, Page 971*, vol. 10, no. 10, p. 971, Oct. 2020, doi: 10.3390/COATINGS10100971.
- [38] S. Ramakrishna, J. Mayer, E. Wintermantel, and K. W. Leong, "Biomedical applications of polymer-composite materials: a review," *Compos Sci Technol*, vol. 61, no. 9, pp. 1189–1224, Jul. 2001, doi: 10.1016/S0266-3538(00)00241-4.
- [39] R. Pokrowiecki, S. Tyski, and M. Zaleska, "Problematyka zakażeń okołowszczepowych," *Postepy Mikrobiologii*, vol. 53, no. 2, 2014.
- [40] M. Kazemzadeh-Narbat, B. F. L. Lai, C. Ding, J. N. Kizhakkedathu, R. E. W. Hancock, and R. Wang, "Multilayered coating on titanium for controlled release of antimicrobial peptides for the prevention of implant-associated infections," *Biomaterials*, vol. 34, no. 24, pp. 5969–5977, Aug. 2013, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2013.04.036.
- [41] K. V. Holmberg, M. Abdolhosseini, Y. Li, X. Chen, S. U. Gorr, and C. Aparicio, "Bio-inspired stable antimicrobial peptide coatings for dental applications," *Acta Biomater*, vol. 9, no. 9, pp. 8224–8231, 2013, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2013.06.017.
- [42] M. Diefenbeck, T. Mückley, and G. O. Hofmann, "Prophylaxis and treatment of implant-related infections by local application of antibiotics," *Injury*, vol. 37 Suppl 2, no. 2 SUPPL., May 2006, doi: 10.1016/J.INJURY.2006.04.015.

- [43] R. M. Donlan, "Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage," *Trends Microbiol*, vol. 17, no. 2, pp. 66–72, Feb. 2009, doi: 10.1016/J.TIM.2008.11.002.
- [44] T. R. Bowen and J. C. Widmaier, "Host classification predicts infection after open fracture," *Clin Orthop Relat Res*, vol. 433, no. 433, pp. 205–211, 2005, doi: 10.1097/01.BLO.0000150345.51508.74.
- [45] M. Geetha, A. K. Singh, R. Asokamani, and A. K. Gogia, "Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review," *Prog Mater Sci*, vol. 54, no. 3, pp. 397–425, May 2009, doi: 10.1016/J.PMATSCI.2008.06.004.
- [46] J. J. Noël, N. Ebrahimi, and D. W. Shoesmith, "Corrosion of Titanium and Titanium Alloys," *Encyclopedia of Interfacial Chemistry: Surface Science and Electrochemistry*, pp. 192–200, Jan. 2018, doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.13834-X.
- [47] F. Di Franco, A. Zaffora, M. Santamaria, and F. Di Quarto, "Anodization and anodic oxides," in *Encyclopedia of Interfacial Chemistry: Surface Science and Electrochemistry*, 2018. doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.11704-4.
- [48] M. Abdel-Hady Gepreel and M. Niinomi, "Biocompatibility of Ti-alloys for long-term implantation," *J Mech Behav Biomed Mater*, vol. 20, pp. 407–415, Apr. 2013, doi: 10.1016/J.JMBBM.2012.11.014.
- [49] S. Izman *et al.*, "Surface Modification Techniques for Biomedical Grade of Titanium Alloys: Oxidation, Carburization and Ion Implantation Processes," *Titanium Alloys - Towards Achieving Enhanced Properties for Diversified Applications*, Mar. 2012, doi: 10.5772/36318.
- [50] S. Sobieszczyk, "Surface modifications of ti and its alloys," *Advances in Materials Sciences*, vol. 10, no. 1, 2010, doi: 10.2478/v10077-010-0003-3.
- [51] I. Przybyszewska-Doroż, W. Okrój, and B. Walkowiak, "Modyfikacje powierzchni implantów metalicznych," *Inżynieria Biomateriałów*, vol. R. 8, nr 43–44, 2005.
- [52] K. Gao, Y. Zhang, J. Yi, F. Dong, and P. Chen, "Overview of Surface Modification Techniques for Titanium Alloys in Modern Material Science: A Comprehensive Analysis," *Coatings 2024, Vol. 14, Page 148*, vol. 14, no. 1, p. 148, Jan. 2024, doi: 10.3390/COATINGS14010148.
- [53] J. C. Balza *et al.*, "Sandblasting as a surface modification technique on titanium alloys for biomedical applications: Abrasive particle behavior," *IOP Conf Ser Mater Sci Eng*, vol. 45, no. 1, 2013, doi: 10.1088/1757-899X/45/1/012004.

- [54] E. Goyenvalle, E. Aguado, R. Cognet, X. Bourges, and G. Daculsi, "Calcium phosphate ceramic blasting on titanium surface improve bone ingrowth," *Key Eng Mater*, vol. 361-363 II, pp. 1351–1354, 2008, doi: 10.4028/WWW.SCIENTIFIC.NET/KEM.361-363.1351.
- [55] D. Yamamoto, I. Kawai, K. Kuroda, R. Ichino, M. Okido, and A. Seki, "Osteoconductivity of Anodized Titanium with Controlled Micron-Level Surface Roughness," *Mater Trans*, vol. 52, no. 8, pp. 1650–1654, Aug. 2011, doi: 10.2320/MATERTRANS.M2011049.
- [56] M. V. Diamanti, B. del Curto, and M. Pedefferri, "Anodic oxidation of titanium: From technical aspects to biomedical applications," *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics*, vol. 9, no. 1, 2011, doi: 10.5301/JABB.2011.7429.
- [57] U. S *et al.*, "Anodic Oxidation of Titanium in Sulphuric Acid and Phosphoric Acid Electrolytes," *Journal of Materials Science and Nanotechnology*, vol. 1, no. 1, 2014, doi: 10.15744/2348-9812.1.s106.
- [58] M. V. Diamanti, B. del Curto, and M. Pedefferri, "Anodic oxidation of titanium: From technical aspects to biomedical applications," *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics*, vol. 9, no. 1, 2011, doi: 10.5301/JABB.2011.7429.
- [59] M. V. Diamanti, B. Del Curto, V. Masconale, C. Passaro, and M. P. Pedefferri, "Anodic coloring of titanium and its alloy for jewels production," *Color Res Appl*, vol. 37, no. 5, pp. 384–390, Oct. 2012, doi: 10.1002/COL.20683.
- [60] K. S. Brammer, C. J. Frandsen, and S. Jin, "TiO₂ nanotubes for bone regeneration," *Trends Biotechnol*, vol. 30, no. 6, pp. 315–322, Jun. 2012, doi: 10.1016/J.TIBTECH.2012.02.005.
- [61] M. Aliofkhazraei *et al.*, "Review of plasma electrolytic oxidation of titanium substrates: Mechanism, properties, applications and limitations," *Applied Surface Science Advances*, vol. 5, 2021, doi: 10.1016/j.apsadv.2021.100121.
- [62] D. Wei, Y. Zhou, and C. Yang, "Characteristic, cell response and apatite-induction ability of microarc oxidized TiO₂-based coating containing P on Ti6Al4V before and after chemical-treatment and dehydration," *Ceram Int*, vol. 35, no. 7, pp. 2545–2554, Sep. 2009, doi: 10.1016/J.CERAMINT.2008.12.014.
- [63] M. Du, W. Dong, L. Dong, X. Li, and L. Wang, "Nanostructure modification of titanium alloy to achieve ultra-high interfacial bond strength between titanium alloy and

- polyphenylene sulfide,” *Journal of Materials Research and Technology*, vol. 26, pp. 3383–3394, Sep. 2023, doi: 10.1016/J.JMRT.2023.08.116.
- [64] “Gwoździe śródszpikowe blokowane - Medgal.” Accessed: Sep. 30, 2024. [Online]. Available: <https://medgal.com.pl/product?id=9>
- [65] T. XLVIII Rok and M. Biel-Gołaska, “Zastosowanie warstw diamentowych oraz powłok diamentopodobnych na narzędziach medycznych i implantach,” *Prace Instytutu Odlewnictwa*, vol. T. 48, z. 2, pp. 5–18, 2008.
- [66] M. Madej, D. Ozimina, and M. Pająk, “Właściwości powłok węglowych uzyskiwanych w procesach fizycznego osadzania z fazy gazowej,” *Mechanik*, no. 4, pp. 329/151-329/156, Apr. 2015, doi: 10.17814/MECHANIK.2015.4.190.
- [67] B. Ahmed, C. Xia, and H. N. Alshareef, “Electrode surface engineering by atomic layer deposition: A promising pathway toward better energy storage,” *Nano Today*, vol. 11, no. 2, pp. 250–271, Apr. 2016, doi: 10.1016/J.NANTOD.2016.04.004.
- [68] A. Woźniak, O. Bialas, and M. Adamiak, “Improvement of the properties of Ti6Al7Nb titanium alloy in terms of the type of surface modification,” *Archives of Metallurgy and Materials*, vol. 65, no. 2, 2020, doi: 10.24425/amm.2020.132813.
- [69] M. Basiaga, W. Kajzer, W. Walke, A. Kajzer, and M. Kaczmarek, “Evaluation of physicochemical properties of surface modified Ti6Al4V and Ti6Al7Nb alloys used for orthopedic implants,” *Materials Science and Engineering: C*, vol. 68, pp. 851–860, Nov. 2016, doi: 10.1016/J.MSEC.2016.07.042.
- [70] K. Piotrowska and M. Madej, “Influence of Thin Coatings Formed by ALD Techniques on the Properties of Ti13Nb13Zr Titanium Alloy,” *Tribologia*, vol. nr 1, no. 1, pp. 65–73, May 2022, doi: 10.5604/01.3001.0015.8985.
- [71] M. Azizi-Lalabadi, A. Ehsani, B. Divband, and M. Alizadeh-Sani, “Antimicrobial activity of Titanium dioxide and Zinc oxide nanoparticles supported in 4A zeolite and evaluation the morphological characteristic,” *Scientific Reports 2019 9:1*, vol. 9, no. 1, pp. 1–10, Nov. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-54025-0.
- [72] V. Kumaravel *et al.*, “Antimicrobial TiO₂ nanocomposite coatings for surfaces, dental and orthopaedic implants,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 416, p. 129071, Jul. 2021, doi: 10.1016/J.CEJ.2021.129071.
- [73] M. H. Lin *et al.*, “Hybrid ZnO/chitosan antimicrobial coatings with enhanced mechanical and bioactive properties for titanium implants,” *Carbohydr Polym*, vol. 257, p. 117639, Apr. 2021, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2021.117639.

- [74] A. Jaafar, C. Hecker, P. Árki, and Y. Joseph, "Sol-Gel Derived Hydroxyapatite Coatings for Titanium Implants: A Review," *Bioengineering 2020, Vol. 7, Page 127*, vol. 7, no. 4, p. 127, Oct. 2020, doi: 10.3390/BIOENGINEERING7040127.
- [75] F. Anene, J. Aiza, I. Zainol, A. Hanim, and M. T. Suraya, "Additively manufactured titanium alloys and effect of hydroxyapatite coating for biomedical applications: A review," 2020. doi: 10.1177/1464420720942560.
- [76] Q. Bi, X. Song, Y. Chen, Y. Zheng, P. Yin, and T. Lei, "Zn-HA/Bi-HA biphasic coatings on Titanium: Fabrication, characterization, antibacterial and biological activity," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 189, p. 110813, May 2020, doi: 10.1016/J.COLSURFB.2020.110813.
- [77] S. Jafari, M. Atabaki, J. I.-Assoc. Metall. Eng. S. AMES, and undefined 2012, "Comparative study on bioactive coating of Ti-6Al-4V alloy and 316 L stainless steel," *metalurgija.org.rs* Jafari, MM Atabaki, J Idris Assoc. Metall. Eng. Serbia AMES, 2012 • *metalurgija.org.rs*, Accessed: Sep. 30, 2024. [Online]. Available: http://www.metalurgija.org.rs/mjom/vol18/No2/6_Jafari_MME_1802.pdf
- [78] D. E. Heath and S. L. Cooper, "Polymers: Basic Principles," *Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition*, pp. 64–79, Jan. 2013, doi: 10.1016/B978-0-08-087780-8.00008-5.
- [79] J. G. Speight, "Monomers, polymers, and plastics," *Handbook of Industrial Hydrocarbon Processes*, pp. 597–649, Jan. 2020, doi: 10.1016/B978-0-12-809923-0.00014-X.
- [80] A. Shrivastava, "Polymerization," *Introduction to Plastics Engineering*, pp. 17–48, Jan. 2018, doi: 10.1016/B978-0-323-39500-7.00002-2.
- [81] P. Santos Beato, G. Poologasundarampillai, A. Nommeets-Nomm, and D. M. Kalaskar, "Materials for 3D printing in medicine: metals, polymers, ceramics, and hydrogels," *3D Print Med*, pp. 59–103, Jan. 2023, doi: 10.1016/B978-0-323-89831-7.00002-X.
- [82] R. V. Moharir and S. Kumar, "Challenges associated with plastic waste disposal and allied microbial routes for its effective degradation: A comprehensive review," *J Clean Prod*, vol. 208, pp. 65–76, Jan. 2019, doi: 10.1016/J.JCLEPRO.2018.10.059.
- [83] J. R. Smith, D. A. Lamprou, C. Larson, and S. J. Upson, "Biomedical applications of polymer and ceramic coatings: a review of recent developments," *Transactions of*

- the IMF*, vol. 100, no. 1, pp. 25–35, Jan. 2022, doi: 10.1080/00202967.2021.2004744.
- [84] A. S. K. Kiran, T. S. S. Kumar, R. Sanghavi, M. Doble, and S. Ramakrishna, “Antibacterial and bioactive surface modifications of titanium implants by PCL/TiO₂ nanocomposite coatings,” *Nanomaterials*, vol. 8, no. 10, Oct. 2018, doi: 10.3390/NANO8100860.
- [85] L. L. Guo *et al.*, “Simultaneous deposition of tannic acid and poly(ethylene glycol) to construct the antifouling polymeric coating on Titanium surface,” *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 200, Apr. 2021, doi: 10.1016/J.COLSURFB.2021.111592.
- [86] G. Ahmadi Lakalayeh, M. Rahvar, E. Haririan, R. Karimi, and H. Ghanbari, “Comparative study of different polymeric coatings for the next-generation magnesium-based biodegradable stents,” *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, vol. 46, no. 7, pp. 1380–1389, Oct. 2018, doi: 10.1080/21691401.2017.1369424.
- [87] S. Liu, C. Chen, L. Chen, H. Zhu, C. Zhang, and Y. Wang, “Pseudopeptide polymer coating for improving biocompatibility and corrosion resistance of 316L stainless steel,” *RSC Adv*, vol. 5, no. 119, pp. 98456–98466, 2015, doi: 10.1039/C5RA17802A.
- [88] N. Sazali, H. Ibrahim, A. S. Jamaludin, M. A. Mohamed, W. N. W. Salleh, and M. N. Z. Abidin, “Degradation and stability of polymer: A mini review,” *IOP Conf Ser Mater Sci Eng*, vol. 788, no. 1, p. 012048, Apr. 2020, doi: 10.1088/1757-899X/788/1/012048.
- [89] J. Kasperczyk, Y. Hu, J. Jaworskam, P. Dobrzynski, J. Wei, and S. Li, “Comparative study of the hydrolytic degradation of glycolide/L-lactide/ ϵ -caprolactone terpolymers initiated by zirconium(IV) acetylacetonate or stannous octoate,” *J Appl Polym Sci*, vol. 107, no. 5, pp. 3258–3266, Mar. 2008, doi: 10.1002/APP.27404.
- [90] K. Park *et al.*, “Injectable, long-acting PLGA formulations: Analyzing PLGA and understanding microparticle formation,” *Journal of Controlled Release*, vol. 304, pp. 125–134, Jun. 2019, doi: 10.1016/J.JCONREL.2019.05.003.
- [91] G. Yurtdaş Kırımlioğlu, “History, introduction, and properties of PLGA as a drug delivery carrier,” *Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) Nanoparticles for Drug Delivery*, pp. 3–25, Jan. 2023, doi: 10.1016/B978-0-323-91215-0.00001-7.
- [92] J. M. Lü *et al.*, “Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology,” *Expert Rev Mol Diagn*, vol. 9, no. 4, pp. 325–341, May 2009, doi: 10.1586/ERM.09.15.

- [93] R. P. F. Lanao, A. M. Jonker, J. G. C. Wolke, J. A. Jansen, J. C. M. Van Hest, and S. C. G. Leeuwenburgh, "Physicochemical Properties and Applications of Poly(lactic-co-glycolic acid) for Use in Bone Regeneration," *Tissue Eng Part B Rev*, vol. 19, no. 4, p. 380, Aug. 2013, doi: 10.1089/TEN.TEB.2012.0443.
- [94] "Poly(dl-lactide-co-glycolide) (PLGA) Polymer Manufacturer." Accessed: Sep. 30, 2024. [Online]. Available: <https://polylactide.com/plga/>
- [95] S. Kumar *et al.*, "Polymeric (PLGA-based) nanocomposites for application in drug delivery: Current state of the art and forthcoming perspectives," *Bioresorbable Polymers and their Composites: Characterization and Fundamental Processing for Pharmaceutical and Medical Device Development*, pp. 277–324, Jan. 2024, doi: 10.1016/B978-0-443-18915-9.00004-5.
- [96] F. Yang *et al.*, "Development of poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) based implants using hot melt extrusion (HME) for sustained release of drugs: The impacts of PLGA's material characteristics," *Int J Pharm*, vol. 663, p. 124556, Sep. 2024, doi: 10.1016/J.IJPHARM.2024.124556.
- [97] C. Zhang and R. Bodmeier, "Dexamethasone-releasing PLGA films containing sucrose particles as porogens," *J Drug Deliv Sci Technol*, vol. 101, p. 106217, Nov. 2024, doi: 10.1016/J.JDDST.2024.106217.
- [98] R. P. Félix Lanao, S. C. G. Leeuwenburgh, J. G. C. Wolke, and J. A. Jansen, "In vitro degradation rate of apatitic calcium phosphate cement with incorporated PLGA microspheres," *Acta Biomater*, vol. 7, no. 9, pp. 3459–3468, 2011, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2011.05.036.
- [99] T. Yoshioka, N. Kawazoe, T. Tateishi, and G. Chen, "In vitro evaluation of biodegradation of poly(lactic-co-glycolic acid) sponges," *Biomaterials*, vol. 29, no. 24–25, pp. 3438–3443, Aug. 2008, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2008.04.011.
- [100] É. Kiss, I. Bertóti, and E. I. Vargha-Butler, "XPS and Wettability Characterization of Modified Poly(lactic acid) and Poly(lactic/glycolic acid) Films," *J Colloid Interface Sci*, vol. 245, no. 1, pp. 91–98, Jan. 2002, doi: 10.1006/JCIS.2001.7954.
- [101] J. Deng *et al.*, "Wettability regulation of membranes based on biodegradable aliphatic polyester," *J Memb Sci*, vol. 711, p. 123199, Nov. 2024, doi: 10.1016/J.MEMSCI.2024.123199.

- [102] S. Malekhosseini *et al.*, "Fabrication and characterization of hydrocortisone loaded Dextran-Poly Lactic-co-Glycolic acid micelle," *Heliyon*, vol. 6, no. 5, p. e03975, May 2020, doi: 10.1016/J.HELIYON.2020.E03975.
- [103] A. H. Ghassemi *et al.*, "Preparation and characterization of protein loaded microspheres based on a hydroxylated aliphatic polyester, poly(lactic-co-hydroxymethyl glycolic acid)," *J Control Release*, vol. 138, no. 1, pp. 57–63, Aug. 2009, doi: 10.1016/J.JCONREL.2009.04.025.
- [104] A. J. Nathanael and T. H. Oh, "Biopolymer Coatings for Biomedical Applications," *Polymers 2020, Vol. 12, Page 3061*, vol. 12, no. 12, p. 3061, Dec. 2020, doi: 10.3390/POLYM12123061.
- [105] H. Yu *et al.*, "Development of a rapidly made, easily personalized drug-eluting polymer film on the electrode array of a cochlear implant during surgery," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 526, no. 2, pp. 328–333, May 2020, doi: 10.1016/J.BBRC.2020.02.171.
- [106] M. A. Sevostyanov *et al.*, "Biodegradable stent coatings on the basis of PLGA polymers of different molecular mass, sustaining a steady release of the thrombolytic enzyme streptokinase," *React Funct Polym*, vol. 150, May 2020, doi: 10.1016/J.REACTFUNCTPOLYM.2020.104550.
- [107] K. Ita, "Iontophoresis, magnetophoresis, and electroporation," *Transdermal Drug Delivery*, pp. 183–229, Jan. 2020, doi: 10.1016/B978-0-12-822550-9.00009-0.
- [108] M. Toledano-Osorio *et al.*, "Dexamethasone and doxycycline functionalized nanoparticles enhance osteogenic properties of titanium surfaces," *Dental Materials*, vol. 39, no. 6, pp. 616–623, Jun. 2023, doi: 10.1016/J.DENTAL.2023.05.004.
- [109] M.; Toledano *et al.*, "Dexamethasone and Doxycycline Doped Nanoparticles Increase the Differentiation Potential of Human Bone Marrow Stem Cells," *Pharmaceutics 2022, Vol. 14, Page 1865*, vol. 14, no. 9, p. 1865, Sep. 2022, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS14091865.
- [110] C. Wu *et al.*, "Proliferation, differentiation and gene expression of osteoblasts in boron-containing associated with dexamethasone deliver from mesoporous bioactive glass scaffolds," *Biomaterials*, vol. 32, no. 29, pp. 7068–7078, Oct. 2011, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2011.06.009.

- [111] P. Ghaffari-Bohlouli, P. Zahedi, and M. Shahrousvand, "Enhanced osteogenesis using poly (l-lactide-co-d, l-lactide)/poly (acrylic acid) nanofibrous scaffolds in presence of dexamethasone-loaded molecularly imprinted polymer nanoparticles," *Int J Biol Macromol*, vol. 165, pp. 2363–2377, Dec. 2020, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2020.10.078.
- [112] "Dexamethasone | The Merck Index Online." Accessed: Sep. 30, 2024. [Online]. Available: <https://merckindex.rsc.org/monographs/m4215>
- [113] B. K. Paul, D. Mondal, D. Bhattacharya, A. Ghosh, and S. Das, "Processing of thin-film electrode based supercapacitors: Progress during the last decade," *Comprehensive Materials Processing*, pp. 179–199, Jan. 2024, doi: 10.1016/B978-0-323-96020-5.00071-6.
- [114] A. S. H. Makhoul, "Current and advanced coating technologies for industrial applications," *Nanocoatings and Ultra-Thin Films*, pp. 3–23, Jan. 2011, doi: 10.1533/9780857094902.1.3.
- [115] B. S. Yilbas, A. Al-Sharafi, and H. Ali, "Surfaces for Self-Cleaning," *Self-Cleaning of Surfaces and Water Droplet Mobility*, pp. 45–98, Jan. 2019, doi: 10.1016/B978-0-12-814776-4.00003-3.
- [116] X. Chen, Y. Hu, Z. Xie, and H. Wang, "Materials and Design of Photocatalytic Membranes," *Current Trends and Future Developments on (Bio-) Membranes: Photocatalytic Membranes and Photocatalytic Membrane Reactors*, pp. 71–96, Jan. 2018, doi: 10.1016/B978-0-12-813549-5.00003-7.
- [117] F. Mandoj, S. Nardis, C. Di Natale, and R. Paolesse, "Porphyrinoid Thin Films for Chemical Sensing," *Encyclopedia of Interfacial Chemistry: Surface Science and Electrochemistry*, pp. 422–443, Jan. 2018, doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.11677-4.
- [118] N. Inagaki, "Polymer Films Produced by Plasma Polymerization," *Materials Surface Processing by Directed Energy Techniques*, pp. 659–707, Jan. 2006, doi: 10.1016/B978-0-08044496-3/50021-6.
- [119] J. A. Gan and C. C. Berndt, "Plasma surface modification of metallic biomaterials," *Surface Coating and Modification of Metallic Biomaterials*, pp. 103–157, Jan. 2015, doi: 10.1016/B978-1-78242-303-4.00004-1.
- [120] M. Montazer and T. Harifi, "Nanocoating and lamination," *Nanofinishing of Textile Materials*, pp. 95–107, Jan. 2018, doi: 10.1016/B978-0-08-101214-7.00007-8.

- [121] E. Yilmaz and M. Soylak, "Functionalized nanomaterials for sample preparation methods," *Handbook of Nanomaterials in Analytical Chemistry: Modern Trends in Analysis*, pp. 375–413, Jan. 2020, doi: 10.1016/B978-0-12-816699-4.00015-3.
- [122] "LP100dip - kamush.com Laboratory products." Accessed: Sep. 30, 2024. [Online]. Available: <https://kamush.com/pl/lp100dip>
- [123] T. Kerdcharoen and C. Wongchoosuk, "Carbon nanotube and metal oxide hybrid materials for gas sensing," *Semiconductor Gas Sensors*, pp. 386–407, Jan. 2013, doi: 10.1533/9780857098665.3.386.
- [124] S. Liu, X. Zhang, L. Zhang, and W. Xie, "Ultrasonic spray coating polymer and small molecular organic film for organic light-emitting devices," *Scientific Reports 2016 6:1*, vol. 6, no. 1, pp. 1–10, Nov. 2016, doi: 10.1038/srep37042.
- [125] S. Bose, S. S. Keller, T. S. Alstrøm, A. Boisen, and K. Almdal, "Process optimization of ultrasonic spray coating of polymer films," *Langmuir*, vol. 29, no. 23, pp. 6911–6919, Jun. 2013, doi: 10.1021/LA4010246/ASSET/IMAGES/MEDIUM/LA-2013-010246_0014.GIF.
- [126] S. Slegers, M. Linzas, J. Drijkoningen, J. D'Haen, N. K. Reddy, and W. Deferme, "Surface Roughness Reduction of Additive Manufactured Products by Applying a Functional Coating Using Ultrasonic Spray Coating," *Coatings 2017, Vol. 7, Page 208*, vol. 7, no. 12, p. 208, Nov. 2017, doi: 10.3390/COATINGS7120208.
- [127] K. X. Steirer, "Advancing spray deposition for low-cost solar cell production," *SPIE Newsroom*, 2009, doi: 10.1117/2.1200903.1555.
- [128] "ISO 5832-11:2014 - Implants for surgery — Metallic materials — Part 11: Wrought titanium 6-aluminium 7-niobium alloy".
- [129] K. Goldsztajn, J. Lisoń-Kubica, J. Jaworska, K. Jelonek, W. Kajzer, and J. Szewczenko, "Mechanical Properties of Polymer Coatings Containing HAp and Active Substance on a Metal Substrate," *Tribologia*, vol. 304, no. 2, pp. 17–25, Jun. 2023, doi: 10.5604/01.3001.0053.6120.
- [130] K. Goldsztajn *et al.*, "Properties of biodegradable polymer coatings with hydroxyapatite on a titanium alloy substrate," *Acta Bioeng Biomech*, vol. 26, no. 1, Jul. 2024, doi: 10.37190/ABB-02351-2023-03.
- [131] J. C. Dupin, D. Gonbeau, P. Vinatier, and A. Levasseur, "Systematic XPS studies of metal oxides, hydroxides and peroxides," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 2, no. 6, pp. 1319–1324, Jan. 2000, doi: 10.1039/A908800H.

- [132] L. Q. Wu *et al.*, "Method for estimating ionicities of oxides using O1s photoelectron spectra," *AIP Adv*, vol. 5, no. 9, p. 97210, Sep. 2015, doi: 10.1063/1.4931996/902550.
- [133] M. C. Biesinger *et al.*, "Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Sc, Ti, V, Cu and Zn," *ApSS*, vol. 257, no. 3, pp. 887–898, Nov. 2010, doi: 10.1016/J.APSUSC.2010.07.086.
- [134] J. Szewczenko *et al.*, "Influence of surface modification of Ti6Al7Nb alloy on adhesion of poly (lactide-co-glycolide) coating (PLGA)," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 196, 2020, doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.111280.
- [135] H. M. Rietveld, "Line profiles of neutron powder-diffraction peaks for structure refinement," *urn:issn:0365-110X*, vol. 22, no. 1, pp. 151–152, Jan. 1967, doi: 10.1107/S0365110X67000234.
- [136] H. M. Rietveld, "A profile refinement method for nuclear and magnetic structures," *urn:issn:0021-8898*, vol. 2, no. 2, pp. 65–71, Jun. 1969, doi: 10.1107/S0021889869006558.
- [137] B. H. Toby, "R factors in Rietveld analysis: How good is good enough?," *Powder Diffr*, vol. 21, no. 1, pp. 67–70, Mar. 2006, doi: 10.1154/1.2179804.
- [138] M. Karolus and E. Łagiewka, "Crystallite size and lattice strain in nanocrystalline Ni–Mo alloys studied by Rietveld refinement," *J Alloys Compd*, vol. 367, no. 1–2, pp. 235–238, Mar. 2004, doi: 10.1016/J.JALLCOM.2003.08.044.
- [139] "NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database." Accessed: Sep. 30, 2024. [Online]. Available: <https://srdata.nist.gov/xps/>
- [140] P. Liu, T. Kendelewicz, G. E. Brown, E. J. Nelson, and S. A. Chambers, "Reaction of water vapor with α -Al₂O₃(0001) and α -Fe₂O₃(0001) surfaces: synchrotron X-ray photoemission studies and thermodynamic calculations," *Surf Sci*, vol. 417, no. 1, pp. 53–65, Nov. 1998, doi: 10.1016/S0039-6028(98)00661-X.
- [141] M. T. Marques, A. M. Ferraria, J. B. Correia, A. M. B. do Rego, and R. Vilar, "XRD, XPS and SEM characterisation of Cu-NbC nanocomposite produced by mechanical alloying," 2008. doi: 10.1016/j.matchemphys.2007.10.032.
- [142] J. Anderud, R. Jimbo, P. Abrahamsson, E. Adolfsson, J. Malmström, and A. Wennerberg, "The impact of surface roughness and permeability in hydroxyapatite bone regeneration membranes," *Clin Oral Implants Res*, vol. 27, no. 8, pp. 1047–1054, Aug. 2016, doi: 10.1111/CLR.12717.

- [143] M. Zuldesmi, A. Waki, K. Kuroda, and M. Okido, "High Osteoconductive Surface of Pure Titanium by Hydrothermal Treatment," *J Biomater Nanobiotechnol*, vol. 2013, no. 03, pp. 284–290, Jun. 2013, doi: 10.4236/JBNC.2013.43036.
- [144] J. W. Park, J. H. Jang, C. S. Lee, and T. Hanawa, "Osteoconductivity of hydrophilic microstructured titanium implants with phosphate ion chemistry," *Acta Biomater*, vol. 5, no. 6, pp. 2311–2321, Jul. 2009, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2009.02.026.
- [145] D. Yamamoto, I. Kawai, K. Kuroda, R. Ichino, M. Okido, and A. Seki, "Osteoconductivity and Hydrophilicity of TiO₂ Coatings on Ti Substrates Prepared by Different Oxidizing Processes," *Bioinorg Chem Appl*, vol. 2012, no. 1, p. 495218, Jan. 2012, doi: 10.1155/2012/495218.
- [146] K. V. Holmberg, M. Abdolhosseini, Y. Li, X. Chen, S. U. Gorr, and C. Aparicio, "Bio-inspired stable antimicrobial peptide coatings for dental applications," *Acta Biomater*, vol. 9, no. 9, 2013, doi: 10.1016/j.actbio.2013.06.017.
- [147] A. Valor, F. Caleyó, L. Alfonso, D. Rivas, and J. M. Hallen, "Stochastic modeling of pitting corrosion: A new model for initiation and growth of multiple corrosion pits," *Corros Sci*, vol. 49, no. 2, 2007, doi: 10.1016/j.corsci.2006.05.049.
- [148] P. Hu *et al.*, "Influence of concentrations of chloride ions on electrochemical corrosion behavior of titanium-zirconium-molybdenum alloy," *J Alloys Compd*, vol. 708, pp. 367–372, Jun. 2017, doi: 10.1016/J.JALLCOM.2017.03.025.
- [149] K. Suchanek, A. Bartkowiak, M. Perzanowski, M. Marszałek, M. Sowa, and W. Simka, "Electrochemical properties and bioactivity of hydroxyapatite coatings prepared by MEA/EDTA double-regulated hydrothermal synthesis," *Electrochim Acta*, vol. 298, pp. 685–693, Mar. 2019, doi: 10.1016/J.ELECTACTA.2018.12.140.
- [150] N. T. C. Oliveira and A. C. Guastaldi, "Electrochemical stability and corrosion resistance of Ti-Mo alloys for biomedical applications," *Acta Biomater*, vol. 5, no. 1, pp. 399–405, 2009, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2008.07.010.
- [151] "ISO 25178-2:2021 — Geometrical product specifications (GPS) — Surface texture: ArealPart 2: Terms, definitions and surface texture parameters"
- [152] "ISO 10993-5:2009 — Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity"

Ocena własności fizycznych i chemicznych biodegradowalnych powłok polimerowych zawierających hydroksyapatyt i substancję aktywną

Streszczenie

W rozprawie doktorskiej podjęto tematykę modyfikacji utlenianego anodowo stopu tytanu Ti6Al7Nb, przeznaczonego na implanty do osteosyntezy. Pomimo jego popularności, ze względu na degradację w środowisku tkankowym, a co za tym idzie, uwalnianie produktów degradacji do organizmu, niezbędne jest zapewnienie mu biokompatybilności przez modyfikację powierzchni. Kolejny poważny problem, związany z operacyjnym leczeniem złamań, stanowi wysokie ryzyko infekcji i zakażeń okołowszczepowych, które mogą prowadzić do zaburzeń zrostu kostnego, wydłużenia czasu rekonwalescencji i pogorszenia komfortu życia pacjenta. W celu ograniczenia tych problemów zaproponowano modyfikację powierzchni poprzez nałożenie biodegradowalnej powłoki polimerowej, zawierającej hydroksyapatyt oraz substancję aktywną (deksametazon).

Realizacja opracowanego programu badawczego umożliwiła ocenę właściwości fizycznych i chemicznych biodegradowalnej powłoki polimerowej zawierającej deksametazon i hydroksyapatyt, oraz ocenę jej przydatności do zastosowań na implanty w ortopedii i traumatologii. W celu realizacji podjętej tematyki dla naniesionej metodą natryskiwania ultradźwiękowego powłoki przeprowadzono badania właściwości fizycznych i chemicznych, badania odporności korozyjnej, cytotoksyczności oraz oznaczenia cytokin prozapalnych. Otrzymana powłoka charakteryzuje się ciągłością, jednorodnością i dobrą adhezją do podłoża. Ponadto wykazuje właściwości hydrofilowe. Zastosowana powłoka polimerowa wpłynęła na poprawę odporności korozyjnej stopu oraz zmniejszenie ilości jonów pierwiastków stopowych, przenikających do środowiska. Zawarty w powłoce deksametazon wpływa na ograniczenie aktywności cytokin prozapalnych, a wytworzona powłoka nie powoduje efektu cytotoksycznego.

Otrzymane w pracy wyniki badań wskazują, że powłoka PLGA, zawierająca HAP oraz DEX może poprawiać biokompatybilność implantów do osteosyntezy, stanowiąc barierę dla uwalnianych z powierzchni jonów metali stopowych. Omawiana powłoka może wspierać proces rekonwalescencji przez obniżanie ryzyka zakażenia okołowszczepowego i ograniczenie konieczności ogólnoustrojowej farmakoterapii oraz stymulację zrostu kostnego przez uwalnianie z powierzchni hydroksyapatyt.

Evaluation of physical and chemical properties of biodegradable polymer coatings containing hydroxyapatite and active substance

Abstract

The doctoral dissertation addresses the modification of anodically oxidized Ti6Al7Nb titanium alloy for osteosynthesis implants. Despite its popularity, due to its degradation in the tissue environment and the resulting release of degradation products into the body, it is necessary to ensure its biocompatibility by surface modification. Another major problem associated with surgical treatment of fractures is the high risk of peri-implant infections and contamination, which can lead to impaired bone fusion, prolonged recovery time and decreased patient comfort. In order to reduce these problems, it was proposed to modify the surface by applying a biodegradable polymer coating containing hydroxyapatite and an active substance (dexamethasone).

Implementation of the developed research program made it possible to evaluate the physical and chemical properties of the biodegradable polymer coating containing dexamethasone and hydroxyapatite, and to assess its suitability for implant applications in orthopedics and traumatology. In order to implement the undertaken subject matter, physical and chemical properties, corrosion resistance, cytotoxicity and pro-inflammatory cytokine determination were carried out for the coating applied by ultrasonic spraying. The obtained coating is characterized by continuity, homogeneity and good adhesion to the substrate. In addition, it exhibits hydrophilic properties. The applied polymer coating improved the corrosion resistance of the alloy and reduced the amount of alloying element ions penetrating into the environment. The dexamethasone contained in the coating has an effect on reducing the activity of pro-inflammatory cytokines, and the produced coating does not cause a cytotoxic effect.

The results obtained in this study indicate that the PLGA coating, containing HAp and DEX, can improve the biocompatibility of osteosynthesis implants by acting as a barrier to alloy metal ions released from the surface. The coating in question may support the recovery process by lowering the risk of peri-implant infection and reducing the need for systemic pharmacotherapy, as well as stimulating bone fusion by hydroxyapatite released from the surface.