

POLITECHNIKA WARSZAWSKA

INŻYNIERIA MATERIAŁOWA
NAUKI INŻYNIERYJNO-TECHNICZNE

Rozprawa doktorska

mgr inż. Urszula Szataj

**Inżynieria nano-powłok hydroksyapatytowych nanoszonych
metodą ultradźwiękową na implanty ortopedyczne.**

Promotor
prof. dr hab. Witold Łojkowski

WARSZAWA 2023

PODZIĘKOWANIA

Pragnę podziękować mojemu Promotorowi Panu prof. dr hab. Witoldowi Łojkowskiemu, za przekazaną wiedzę, udzielone wsparcie przy realizacji niniejszej rozprawy oraz zaufanie przy realizacji zadań badawczo-rozwojowych i pomoc w osiągnięciu wyznaczonych celów naukowych.

Chciałabym również podziękować całemu zespołowi Laboratorium Nanostruktur Instytutu Wysokich Ciśnień Polskiej Akademii Nauk, w szczególności mgr inż. Bartoszowi Woźniakowi oraz mgr inż. Agnieszce Chodarze za wdrożenie w świat hydrotermalnej syntezy mikrofalowej nanomateriałów oraz metod ultradźwiękowych, wsparcie i dzielenie się cenną wiedzą merytoryczną oraz doświadczeniem.

Dziękuję także Dyrekcji Instytutu Wysokich Ciśnień Polskiej Akademii Nauk za możliwość realizacji badań do mojej rozprawy doktorskiej, korzystając z zaawansowanej infrastruktury laboratoryjnej, będącej własnością instytutu.

Niniejszą pracę dedykuję mojej mamie oraz pamięci mojego taty,
za włożony trud w to, kim jestem dziś.

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Urazy ortopedyczne i inne uszkodzenia układu kostnego są bardzo powszechne, a ich leczenie wymaga zastosowania implantów wykonanych z zaawansowanych biomateriałów. Do ich wytworzenia stosowany jest szereg materiałów, od metali, poprzez ceramikę, polimery, materiały biodegradowalne, po materiały kompozytowe. Powierzchnia implantu odgrywa kluczową rolę w biologicznej reakcji organizmu na implant. Modyfikacja powierzchni implantów poprzez nakładanie powłok hydroksyapatytowych stosowana jest w celu przyspieszenia przerastania implantu nową tkanką kostną i jego dobrej stabilizacji. Jednakże istniejące metody osadzania powłok hydroksyapatytowych mają istotne ograniczenia.

Obecne metody modyfikacji powierzchni nie wykorzystują pełnego potencjału nanotechnologii. Efekt rozmiaru w skali nano determinuje właściwości materiałów. Sterowanie tymi właściwościami otwiera nowe możliwości projektowania materiałów do regeneracji tkanki kostnej, jak np. regulacja czasu degradacji oraz ilości wydzielanych jonów wapnia Ca^{2+} , i inne. W pracy wykazano zalety ultradźwiękowego osadzania nano-powłok hydroksyapatytowych jako uniwersalnej metody osadzania programowanych pod względem aktywności nano-powłok, nieograniczonej rodzajem, kształtem, czy złożoną strukturą pokrywanego podłoża. Ten rodzaj osadzania nano-powłok nazwano metodą SonoNanoCoating (SNC). Metoda SNC pozwala także na wykorzystanie w pełni technologii mikrofalowej hydrotermalnej syntezy nanocząstek (MHS), w której otrzymuje się hydroksyapatyt GoHAPmed o regulowanej wielkości cząstek (10 nm, 14 nm, 26 nm, 30 nm, 42 nm).

W rozprawie wykazano, że metoda SonoNanoCoating przełamuje ograniczenia obecnie stosowanych metod pokrywania powierzchni implantów poprzez: I. Wytworzenie nano-powłok składających się z regulowanej wielkości nanocząstek umożliwiając, tym samym regulację właściwości powłok; II. Uzyskanie jednorodnych powłok hydroksyapatytowych zarówno na powierzchniach zewnętrznych, jak i wewnątrz porowatych struktur 3D oraz materiałach włóknistych. III. Osadzanie nano-powłok w niskich temperaturach, co umożliwia modyfikację powierzchni materiałów wrażliwych na temperaturę IV. Wykorzystanie wszechstronności metody i dobór parametrów osadzania nano-powłok niezależnie od rodzaju, kształtu i struktury modyfikowanego materiału.

Słowa kluczowe: nanohydroksyapatyt (nHAP), hydrotermalna synteza mikrofalowa, modyfikacja powierzchni, pokrywanie ultradźwiękowe, SonoNanoCoating, nano-powłoki, implanty ortopedyczne, regeneracja tkanki kostnej, nanotechnologia.

STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Orthopaedic injuries and other damages to the skeletal system are very common and their treatment requires the employment of implants made of advanced biomaterials. Numerous materials are used for their fabrication: from metals, to ceramics, polymers, biodegradable materials, to composite materials. The key role in the biological reaction of the organism to the implant is played by the implant surface. The modification of the implant surface through application of hydroxyapatite coatings is employed for the purpose of acceleration of the implant regrowth with new bone tissue and of achievement of a good stabilisation of the implant. However, the existing methods of deposition of hydroxyapatite coatings are characterised by significant limitations.

Furthermore, the potential of nanotechnology is not tapped to a sufficient degree. The effect of size in the nano-scale determines the properties of materials. The control of these properties opens new possibilities to design materials for bone tissue regeneration, for example control of degradation time and quantity of released Ca^{2+} ions, and more. The dissertation presents the advantages of ultrasonic deposition of hydroxyapatite nano-coatings as a universal method of deposition of nano-coatings programmed in terms of activity. This method is not limited by type, shape or the complex structure of the substrate that is covered. This kind of application of nano-coatings is called the SonoNanoCoating (SNC) method. The SNC method makes it possible also to make a full use of the method of microwave hydrothermal synthesis (MHS) of nanoparticles, by which GoHAPmed hydroxyapatite with a controlled particle size (10 nm, 14 nm, 26 nm, 30 nm, 42 nm) is obtained.

The dissertation proves that the SonoNanoCoating method overcomes the limitations of the currently employed methods of coating of implant surface, by: I. Fabricating nano-coatings composed of nanoparticles of a controlled size, thereby enabling the control of the properties of the coatings; II. Obtaining homogeneous hydroxyapatite coatings both on the outer surfaces and inside the porous 3D structures and fibrous materials. III. Depositing nano-coatings at low temperatures, which enables the modification of surface of materials that are sensitive to temperature. IV. Taking advantage of the versatility of the method and selecting the parameters of nano-coating deposition regardless of the type, shape and structure of the material to be modified. The SNC method has the potential to become the primary method of improvement of the biological properties of orthopaedic implants.

Keywords: nanohydroxyapatite (nHAP), microwave hydrothermal synthesis, surface modification, ultrasonic coating, SonoNanoCoating, nano-layers, orthopaedic implants, bone tissue regeneration, nanotechnology.

Spis treści

PODZIĘKOWANIA	3
STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM	5
STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM.....	6
WYKAZ SKRÓTÓW	11
1. WPROWADZENIE	13
2. PRZEGLĄD LITERATURY	17
2.1. Ubytki kostne i ich leczenie	17
2.1.1. Złoty standard.....	17
2.1.2. Substytuty kości	18
2.1.2.1. Syntetyczne substytuty kości	18
2.1.2.1.1. Fosforan trójwapniowy (TCP)	19
2.1.2.1.2. Hydroksyapatyt	19
2.1.2.1.3. Dwufazowy fosforan wapnia	20
2.1.2.1.4. Nanohydroksyapatyt.....	20
2.1.2.1.5. Nanohydroksyapatyt w kompozytach	22
2.2. Implanty ortopedyczne	23
2.2.1. Biomateriały metaliczne.....	24
2.2.1.1. Stal.....	24
2.2.1.2. Tytan i jego stopy	25
2.2.2. Biomateriały ceramiczne	26
2.2.2.1. Tlenek glinu oraz tlenek cyrkonu.....	26
2.2.2.2. Fosforany wapnia	27
2.2.3. Biomateriały polimerowe	29
2.2.3.1. Polietylen o ultrawysokiej masie cząsteczkowej (UHMWPE)	29
2.2.3.2. Polieteroeteroketon (PEEK)	29
2.2.3.4. Polimery biodegradowalne.....	30
2.2.3.4.1. Polikaprolakton (PCL)	30
2.2.3.4.2. Kwas L-polimlekowy (PLLA)	31
2.3. Modyfikacja powierzchni implantów powłokami hydroksyapatytowymi.....	33
2.3.1. Natryskiwanie plazmowe	34
2.3.2. Metoda osadzania elektroforetycznego	34
2.3.2. Metoda zol-żel.....	35
2.3.3. Metoda ultradźwiękowa	36

2.4. Podsumowanie	40
3. TEZA I CEL PRACY	41
3.1. Teza pracy	41
3.2. Cel pracy	42
4. METODY EKSPERYMENTALNE	43
4.1. Hydrotermalna synteza mikrofalowa nanocząstek hydroksyapatytu GoHAPmed..	43
4.2. Ultradźwiękowe osadzanie powłok nanocząstek hydroksyapatytu SonoNanoCoating (SNC)	46
4.2.1. Budowa stanowiska ultradźwiękowego	46
4.2.2. Osadzanie nano-powłok hydroksyapatytowych metodą SonoNanoCoating.	49
4.2.2.1. Regulacja amplitudy procesu ultradźwiękowego SonoNanoCoating	50
4.2.2.2. Regulacja temperatury procesu ultradźwiękowego SonoNanoCoating	51
4.2.2.3. Regulacja koncentracji nanocząstek w zawieszynie GoHAPmed	51
4.2.2.4. Wpływ wielkości nanocząstek oraz czasu procesu ultradźwiękowego SonoNanoCoating	52
4.2.2.5. Metoda SonoNanoCoating – jako uniwersalna metoda modyfikacji powierzchni materiałów.	52
4.2.2.5.1. Modyfikacja powierzchni płaskich podłoży tytanu grade 2.....	53
4.2.2.5.2. Modyfikacja powierzchni płaskich podłoży PEEK.	53
4.2.2.5.3. Modyfikacja powierzchni podłoży tytanowych drukowanych 3D.	53
4.2.2.5.4. Modyfikacja powierzchni implantów kręgosłupowych oraz śrub mocujących.....	54
4.2.2.5.5. Modyfikacja powierzchni implantów sztucznego więzadła krzyżowego. ...	54
4.2.2.5.6. Modyfikacja powierzchni rusztowań kompozytowych (PCL/HAP/TCP) powłoką GoHAPmed Typ 3.....	54
4.3. Metody charakteryzacji.....	56
4.3.1 Charakteryzacja nanocząstek	56
4.3.1.1. Dyfrakcja rentgenowska (XRD).....	56
4.3.1.2. Analiza gęstości, powierzchni właściwej (SSA) i całkowitej objętości porów (TPV).....	56
4.3.1.3. Uwalnianie jonów Ca^{2+} z nanocząstek GoHAP	57
4.3.1.4. Badanie pH roztworów PBS i SBF	57
4.3.2. Charakteryzacja powłok hydroksyapatytowych.....	58
4.3.2.1. Obrazowanie SEM oraz analiza pierwiastkowa EDS	58
4.3.2.2. Pomiar jonów PO_4^{3-}	58
4.3.2.3. Analiza obrazów SEM	59
4.3.2.4. Pomiar kąta zwilżania powierzchni.....	60
4.3.2.5. Badanie degradacji powłok hydroksyapatytowych.....	60

4.3.2.6. Pomiar adhezji przy pomocy scratch test z zastosowaniem AFM	62
4.3.2.7. Ocena żywotności osteoblastów na podłożach Ti 3D, których powierzchnię modyfikowano powłokami hydroksyapatytowymi.	64
4.3.2.8. Ocena proliferacji osteoblastów.	65
4.3.2.9. Ocena żywotności oraz efektywności zasiedlenia kompozytowych rusztowań kostnych modyfikowanych powłoką GoHAPmed Typ 3 przez komórki macierzyste. ...	65
5. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	67
5.1. Właściwości otrzymanych nanocząstek hydroksyapatytu GoHAPmed.....	67
5.1.1. Dyfrakcja rentgenowska (XRD).....	67
5.1.2. Powierzchnia właściwa i pojemność sorpcyjna	68
5.1.3. Badania uwalniania jonów Ca^{2+}	71
5.2. Dobór podstawowych parametrów osadzania powłok hydroksyapatytowych metodą SonoNanoCoating.....	76
5.2.1. Regulacja amplitudy procesu ultradźwiękowego.....	76
5.2.2. Regulacja temperatury procesu ultradźwiękowego.....	78
5.2.3. Regulacja koncentracji nanocząstek w zawiesinie GoHAPmed	80
5.2.4. Wpływ wielkości nanocząstek oraz czasu procesu na osadzanie powłok	81
5.3. Metoda ultradźwiękowa – jako uniwersalna metoda modyfikacji powierzchni materiałów.....	90
5.3.1. Modyfikacja powierzchni płaskich podłoży tytanu grade 2.....	90
5.3.2. Modyfikacja powierzchni płaskich podłoży PEEK.	103
5.3.3. Modyfikacja powierzchni podłoży tytanowych drukowanych 3D.	114
5.3.4. Modyfikacja powierzchni implantów kręgosłupowych oraz śrub mocujących.	122
5.3.5. Modyfikacja powierzchni implantów sztucznego więzadła krzyżowego.	126
5.4. Wpływ nano-powłok hydroksyapatytowych nakładanych metodą SonoNanoCoating na biologiczne właściwości materiałów.	136
5.4.1. Adhezja, żywotność i proliferacja osteoblastów hFOB 1.19.....	136
5.3.6. Ocena żywotności oraz efektywności zasiedlenia kompozytowych rusztowań kostnych modyfikowanych powłoką GoHAPmed Typ 3 przez komórki macierzyste.	139
5.3.5. Zastosowanie powłok GoHAPmed jako warstwy zarodkowej	142
6. DYSKUSJA I PODSUMOWANIE WYNIKÓW	145
7. WNIOSKI	154
FINANSOWANIE.....	155
LITERATURA:.....	156

SPIS RYSUNKÓW	180
SPIS TABEL.....	185

WYKAZ SKRÓTÓW

BET – metody adsorpcji gazu, opisana izotermą Brunauer-Emmett-Teller

Ca:P – stosunek molowy jonów wapnia do fosforu

CAL – z ang. clinical attachment loss, kliniczna utrata przyczep

ClAp – chloroapatyt

CVD – z ang. cheical vapour deposition, chemiczne osadzanie z fazy gazowej

DBM – z ang. demineralized bone matrix, demineralizowana macierz kostna

DEN – z ang. density, gęstość materiału

ECM – z ang. extracellular matrix, macierz pozakomórowa

EFG – z ang. epidermal growth factor, naskórkowy czynnik wzrostu

EPD – ang. electrophoretic deposition, metoda elektroforetycznego osadzania powłok

FAp – fluoroapatyt

GoHAPmed – nanoproszek hydroksyapatytu o regulowanej wielkości nanocząstek

HAP – hydroksyapatyt $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)\text{OH}_2$

hFOB – ludzkie komórki osteoblastyczne

ICP-OES – spektrometria emisyjna z plazmą indukcyjnie sprzężoną

OHAp – hydrksylapatyt

REC – z ang. gingival recession, recesja dziąsłowa

MHS – mikrofalowa hydrotermalna synteza, technologia syntezy nanomateriałów

MSC – z ang. mesenchymal stem cells, komórki macierzyste

nHAP – nanocząstki hydroksyapatytu $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)\text{OH}_2$

PBF – z ang. powder bed fusion, metoda druku 3D w technice warstwowego spiekania proszku

PBS – z ang. phosphate-buffered saline, roztwór buforowy soli fizjologicznej

PCL – polikaprolakton, polimer biodegradowalny

PEEK – polieteroeteroketon, tworzywo wysokotemperaturowe

PPD – probing pocket depth, głębokość kieszonek przy zgłębnikowaniu

PGA – kwas poliglikolowy

PMMA – poli(metakrylan metylu)

PLGA – kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego

PLLA – kwas L-polimlekowy

PTD – z ang. plasma diffusion treatment, powlekanie metodą dyfuzji plazmowej

PVD – z ang. phisical vapour deposition, fizyczne osadzanie z fazy gazowej

SBF – z ang. simulated body fluid, roztwór buforowy symulujący osocze ludzkie

SEM – skaningowa mikroskopia elektronowa

SNC – SonoNanoCoating, ultradźwiękowa metoda osadzania powłok składających się z nanocząstek o regulowanej wielkości

SSA – z ang. specific surface area, powierzchnia właściwa

SMD – średnica zastępcza według Sautera

TCP – z ang. tricalcium phosphate, fosforan trójwapniowy ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)

TPV – z ang total pore volume, całkowita objętość porów materiału

Ti 3D – ażurowy krążek tytanowy drukowany 3D, mający odwzorować powierzchnię tytanowego implantu kręgosłupa

UHMWPE – polietylen o ultrawysokiej masie cząsteczkowej

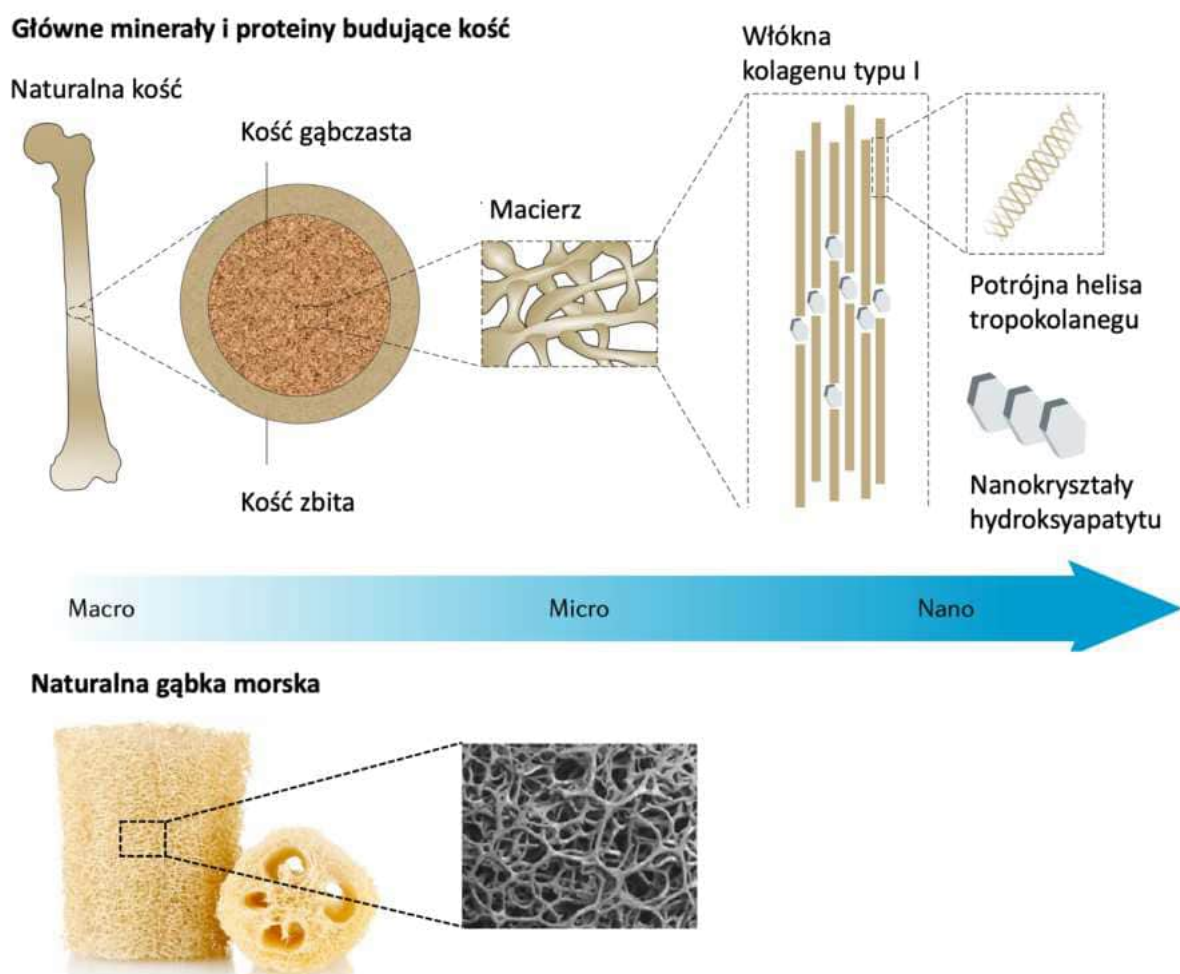
XRD – dyfrakcja rentgenowska

1. Wprowadzenie

Inżynieria tkankowa kości zajmuje się wspomaganie zarastania krytycznych defektów układu kostnego, które nie mogą goić się samoistnie. Ubytki te, są częstym problemem klinicznym w ortopedii i chirurgii czaszkowo-twarzowej, w leczeniu utraty kości spowodowanej urazem, infekcją i resekcją guza. W konwencjonalnym paradygmacie inżynierii tkankowej, kombinacje komórek i bioaktywnych cząsteczek są wysiewane na trójwymiarowe rusztowania biomateriałowe w celu stworzenia implantu "osteogennego". Do tej pory, pomimo wielu ekscytujących postępów w modelach przedklinicznych, bariery regulacyjne, wyzwania biznesowe i związane z nimi kwestie dotyczące cyklu życia własności intelektualnej utrudniały przełożenie kliniczne z laboratorium do zastosowań u pacjenta [1]. Skuteczne projektowanie materiałów dla inżynierii tkanki kostnej wymaga zrozumienia składu i struktury natywnej tkanki kostnej, a także odpowiedniego doboru biomateriałów naturalnych lub biomimetycznych biomateriałów syntetycznych, takich jak polimery, ceramika, metale i kompozyty [2]. Hierarchiczna struktura kości i jej naturalne procesy formowania nowej tkanki kostnej i gojenia złamań stanowią inspirację dla nowych rozwiązań inżynierii tkanki kostnej. Jak każda tkanka biologiczna, kość składa się z charakterystycznych typów komórek otoczonych macierzą zewnątrzkomórkową (ECM, z ang. extracellular matrix), z biologicznie aktywnymi cząsteczkami zintegrowanymi z ECM lub wytwarzanymi przez komórki [3,4]. Tkanka kostna jest naturalnym nanokompozytem, zawierającym białka organiczne (głównie kolagen typu I), minerały nieorganiczne (głównie fosforan wapnia) i wiele typów komórek [5,6,7]. ECM kości, składa się ze struktury usieciowanych włókien kolagenowych [8], które samoorganizują się we włókna, a następnie w arkusze lub wiązki włókien lub wiązki włókien. Hydroksyapatyt (główny minerał kostny), który jest naturalnie występującą formą mineralną apatytu wapnia o wzorze chemicznym $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, jest umieszczony zarówno wewnątrz, jak i pomiędzy włóknami kolagenu [9]. Ta kombinacja składników strukturalnych i ich hierarchiczny układ nadają kości właściwości mechaniczne. Kość w swojej budowie wykazuje odmienną gęstość: zewnętrzne obszary składają się z istoty zbitiej, podczas gdy obszary wewnętrzne składają się z istoty gąbczastej, która obejmuje porowatą sieć kostnych wypustek, zwanych beleczkami [9].

Projektowanie materiałów do inżynierii tkanek kostnych skupia się na wspieraniu odtworzenia fizycznych struktur i/lub funkcji białkowych, mineralnych i komórkowych składników kości, aby ułatwiać i wspierać wzrost nowej tkanki kostnej oraz przywrócić jej funkcjonalność. Ponadto struktura i skład tkanek w organizmach innych niż ludzkie, od roślin

po zwierzęta morskie, również inspirują do projektowania materiałów w inżynierii tkanki kostnej o ulepszonej funkcjonalności [1,10,11,12], (Rysunek 1). Materiały inspirowane biologią stały się nowym, ważnym narzędziem zwiększającym możliwości zastosowania systemów hybrydowych, np. nieorganicznych/organicznych i hydrofobowych/hydrofilowych w medycynie. Jednak dogłębna analiza ostatnich osiągnięć w zakresie polimerowo-polimerowych systemów hybrydowych nie została jeszcze kompleksowo wykonana [13].



Rysunek 1. Budowa kości w odniesieniu do struktury naturalnej gąbki morskiej. Opracowanie własne na podstawie [1].

Jako kluczowy podmiot większości strategii inżynierii tkanki kostnej, materiały takie jak polimery, ceramiczne lub ich kombinacje mogą być stosowane w różnych formach, takich jak membrany elektroprzędzone czy trójwymiarowe rusztowania (3D). Materiały te zazwyczaj służą jako rusztowanie podczas procesu regeneracji tkanek, zapewniając wsparcie mechaniczne i odpowiednie środowisko do przyłączania, proliferacji i różnicowania komórek. Komórki mogą być wysiewane na system materiałowy przed implantacją lub rekrutowane z otaczającej

tkanki natywnej po implantacji *in vivo* [14,15]. Chociaż włączenie składników biologicznych (takich jak komórki i czynniki wzrostu) w strategich inżynierii tkanki kostnej jest potencjalnie cenne, w praktyce systemy biomateriałów zawierające składniki biologiczne są ograniczone wysokimi kosztami i złożonymi wymogami regulacyjnymi [16]. Wysiłki badawcze, rozwiązania kliniczne i strategie komercjalizacji w znacznym stopniu korzystają z podejść opartych wyłącznie na materiałach, które wykluczają składniki biologiczne, a zamiast tego mają na celu rekrutację własnych komórek organizmu do regeneracji kości [17,18,19,20]. Dziedzina badań dotycząca inżynierii tkanki kostnej ma na celu opracowanie materiałów, które przewyższają autoprzeszczepy i alloprzeszczepy kości [21,22]. Ogólnym celem jest przygotowanie materiałów, które mogą być wprowadzone do ubytku kostnego, a następnie przebudowane przez własne komórki biorcy. Materiały te są często montowane w postaci rusztowania, które służy jako struktura wspierająca przyczepianie komórek i odkładania zmineralizowanej macierzy i ma za zadanie tymczasowo pełnić rolę ECM w tworzącej się tkance. W zależności od miejsca uszkodzenia i stanu zdrowia pacjenta, konieczne są różne właściwości strukturalne i funkcjonalne materiału, aby zapewnić użyteczność wybranej strategii. Projektowanie materiałów do inżynierii tkanki kostnej uwzględnia również właściwości zdrowej tkanki kostnej, które są krytyczne w odniesieniu do możliwości odbudowy uszkodzonego miejsca.

Pomimo znacznych postępów w rozwoju biomateriałów do zastosowań w inżynierii tkanki kostnej, wciąż istnieje szereg niezaspokojonych potrzeb, które stanowią wyzwanie w dalszym postępie naukowym i klinicznym zastosowaniu biomateriałów. Jedną z takich potrzeb jest lepsze zrozumienie mechanizmów działania biomateriałów i wynikającej z nich odpowiedzi komórkowej. Zaspokojenie tej potrzeby wymaga systematycznych badań. Wyzwanie stanowi konieczność spełnienia wielu sprzecznych oczekiwań. Na przykład, chociaż stabilność mechaniczna rusztowań jest pożądana w wielu zastosowaniach, konieczna jest również zdolność do regulowanej prędkości degradacji, dostosowanej do prędkości przyrastania nowej tkanki. Materiały kompozytowe oferują potencjał do opracowania przestrajalnych systemów, które spełniają szeroki zakres tych potrzeb. Jednak różne rodzaje materiałów często wymagają różnych warunków przetwarzania (takich jak temperatura i rodzaj rozpuszczalnika), co komplikuje rozwój systemów złożonych z różnych biomateriałów. Zdolność do łączenia wielu materiałów jest szczególnie ważna dla pokonania przeszkód, związanych z inżynierią tkanek międzyfazowych, która wymaga materiałów odwzorowujących przejście między kością a sąsiadującą tkanką, ścięgnami, mięśniami, tkanką łączną, więzadłami i chrząstką, która tworzy powierzchnie stawowe. Te oddziaływania często wykazują gradienty

w architekturze, składzie i właściwościach mechanicznych, co zwiększa złożoność projektowania materiałów i wytwarzania konstrukcji [23,24,25].

Takie wyzwania stwarzają potrzebę opracowania materiałów do regeneracji tkanki kostnej, dobieranych pod kątem specyficznej potrzeby pacjenta, z uwzględnieniem miejsca i wielkości uszkodzenia. Dotychczasowe prace nie w pełni sprostają stawianym oczekiwaniom, jednakże zastosowanie nanotechnologii oraz dobór odpowiednich metod, pozwalających na kontrolę i zachowanie ich cennych właściwości oraz biomimetycznego charakteru materiałów. Daje to szansę na wypełnienie istniejących luk w projektowaniu i wytwarzaniu implantów ortopedycznych.

Powszechnie stosowaną metodą doskonalenia biomateriałów jest modyfikowanie ich powierzchni. Rozwiązuje to częsty konflikt pomiędzy wymaganymi własnościami mechanicznymi a działaniem kościotwórczym. W rozprawie skupiono uwagę na modyfikacji powierzchni biomateriałów powszechnie stosowanych do wytwarzania implantów ortopedycznych, takich jak tytan, polietylen o ultrawysokiej masie cząsteczkowej (UHMWPE), polieteroeteroketon (PEEK), polikaprolaktonu (PCL) oraz kompozyty polimerowo-ceramiczne. Modyfikacja polega na zastosowaniu metody ultradźwiękowej do osadzenia powłok, składających się z nanocząstek biomimicznego hydroksyapatytu (GoHAPmed) o regulowanej wielkości. Taki sposób modyfikacji powierzchni implantów ma na celu poprawę adhezji osteoblastów do powierzchni oraz przyspieszenie formowania tkanki kostnej w miejscu implantacji. Nadanie nanostruktury powierzchni implantów zwiększa powierzchnię kontaktu komórek, adsorpcję białek oraz porowatość. Zastosowanie nanocząstek o regulowanej wielkości powierzchni właściwej pozwala na dodatkową kontrolę rozwinięcia powierzchni materiału oraz właściwości powłok.

2. Przegląd literatury

2.1. Ubytki kostne i ich leczenie

Układ kostny pełni wiele niezmiernie ważnych funkcji. Zapewnia odpowiednią postawę ciała, tworząc podtrzymujące rusztowanie. Jest miejscem przyczepu mięśni, a także chroni narządy wewnętrzne. Magazynuje również takie mikroelementy, jak wapń, fosfor czy magnez [1]. Tkanka kostna może zostać utracona w wyniku urazu, infekcji, nowotworu, operacji ortopedycznej, chirurgii stomatologicznej, usunięcia zęba czy z powodu zmian, związanych ze starzeniem się organizmu [27]. Uszkodzenia tkanki kostnej należą do jednych z najczęściej spotykanych w praktyce klinicznej. Układ kostny może wytrzymywać duże obciążenia mechaniczne i ma zdolność do samoregeneracji [28]. Małe ubytki kostne goją się bez dodatkowego leczenia, jednak, gdy przekroczą wielkość krytyczną (około > 2 cm) lub ponad 50% utraty obwodu kości [29], może dojść do braku zrostu, nieprawidłowego zrostu lub złamania patologicznego [30]. Przeszczep kości jest drugim najczęściej wykonywanym przeszczepem na świecie [31]. Rynek wyrobów medycznych do regeneracji tkanki kostnej w 2023 roku szacowany jest na 5 380,8 milionów dolarów. Szacowania rynkowe wskazują na dalszą ekspansję rynku w tej dziedzinie i osiągnięcie wartości 7 827,8 miliona dolarów w roku 2033. W odniesieniu do typów produktów, substytuty przeszczepów kostnych zajmowały 81% procent tego rynku w 2022 roku [32].

2.1.1. Złoty standard

Aktualnie złotym standardem rekonstrukcji ubytków kostnych jest leczenie chirurgiczne, a jedną czwartą wszystkich zabiegów stanowią przeszczepy kości. Są one szeroko stosowane przez ortopedów, chirurgów plastycznych, neurochirurgów, chirurgów szczękowo-twarzowych i periodontologów [27]. Przeszczepy kości można podzielić na autologiczne, allogeniczne i ksenogeniczne. W przypadku przeszczepów autologicznych (autoprzyszczepy) tkanki pobierane są od pacjenta, najczęściej z grzebienia kości biodrowej i rzadziej z kości piszczelowej lub kości udowej [27]. W przypadku alloprzeszczepów tkanka kostna jest pobierana od dawcy lub zwłok. Przeszczep ksenogeniczny polega na transplantacji kości między osobnikami różnych gatunków [33]. Wadami przeszczepów allogenicznych i ksenogenicznych jest ich niewystarczająca integracja i unaczynienie u gospodarza, ryzyko odrzucenia immunologicznego oraz przenoszenia patogenów [33]. Przeszczepy autologiczne

są obecnie „złotym standardem”, jeśli chodzi o leczenie ubytków kostnych, ponieważ są nieimmunogenne, histokompatybilne i osteogenne (promują osteogenezę i tworzenie nowej kości) [27]. Ich wadami są powikłania związane z pobieraniem, takie jak bliznowacenie w miejscu pobrania czy przewlekły ból, zakażenie i krwawienie [34]. Przeszczepy autologiczne nie są też odpowiednim rozwiązaniem w przypadku osób starszych i dzieci [27].

2.1.2. Substytuty kości

Substytut kości to syntetyczny, nieorganiczny lub organiczny materiał, który można wykorzystać w leczeniu ubytku kości zamiast kości autogennej, allogennej lub ksenogennej (materiał kośćcozastępczy) [35]. Idealny substytut kości powinien być biokompatybilny i nie wywoływać niepożądanego reakcji zapalnej. Powinien być także osteogenny, osteoindukcyjny i bioresorbowalny, a także zapewniać podobną do naturalnej kości wytrzymałość na obciążenia [36]. Substytuty kości można podzielić na zawierające materiał organiczny i syntetyczne. Do pierwszej grupy należą między innymi demineralizowana macierz kostna (DBM, z ang. Demineralized Bone Matrix), czy hydroksyapatyt (HAP) pozyskany z naturalnych źródeł organicznych (korale, algi). Syntetyczne (alloplastyczne) substytuty kości to między innymi HAP, fosforan trójwapniowy i szkła bioaktywne [37].

2.1.2.1. Syntetyczne substytuty kości

Jednym z najstarszych syntetycznych preparatów używanych do uzupełniania ubytków kostnych jest siarczan wapnia – gips (CaSO_4). Pierwsze jego użycie jako preparatu kośćcozastępczego opisał w 1892 roku Dressman [38]. Ze względu na duże podobieństwo do składników kości, obecnie największe znaczenie wśród kośćcozastępczych preparatów alloplastycznych mają fosforany wapnia. Mogą one krystalizować do form takich jak HAP lub fosforan trójwapniowy (tricalcium phosphate, TCP), mających różny stosunek Ca:P [40]. Substytuty alloplastyczne, można także podzielić ze względu na odmienne właściwości fizyczne i różnice w procesach wytwarzania na ceramiki (bioceramiki) oraz cementy. Bioceramiki powstają podczas spiekania, czyli w czasie procesu wielokrotnego rozgrzewania i schładzania materiału, aż do uzyskania twardych, zbitych bloków. Cementy są wytwarzane w postaci proszków, past, które twardnieją dopiero w miejscu podania [40]. Bioceramika produkowana z fosforanów wapnia jest używana do produkcji powłok implantów, rusztowań

tkankowych i dostarczania leków. Ze względu na swoją kruchość nie może być jednak stosowana do tworzenia implantów, które muszą wytrzymywać duże obciążenia [41].

2.1.2.1.1. Fosforan trójwapniowy (TCP)

Jako preparat kośćcozastępczy TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) jest znany już od 1920 roku, po publikacji Albeego i Morrisona [42]. TCP występuje w dwóch odmianach polimorficznych: niskotemperaturowej β -TCP, o strukturze heksagonalnej i wysokotemperaturowej α -TCP, o strukturze jednoskośnej. β -TCP jest stechiometrycznie podobny do amorficznego biologicznego prekursora minerału kości i charakteryzuje się stosunkiem molowym Ca:P=1:5 [43]. Jest to stosunek niższy niż w przypadku hydroksyapatytu, dzięki czemu tworzy gęstsze porowate struktury. Ma jednak gorsze właściwości mechaniczne niż HAP. Hydroksyapatyt jest stosunkowo obojętną substancją, która jest zatrzymywana "in vivo" przez dłuższy czas, nawet przez wiele lat. Podczas gdy bardziej porowaty TCP zwykle ulega biodegradacji w ciągu 6 tygodni od wprowadzenia do obszaru tworzenia kości [31].

2.1.2.1.2. Hydroksyapatyt

Tkanka kostna zbudowana jest z macierzy kostnej, składającej się z części mineralnej, zawierającej kryształy HAP, komórek kostnych i włókien kolagenowych. Można uznać, że kość to kompozyt ceramiczno-polimerowy, którego fazą ceramiczną jest HAP, a organiczną włókna kolagenowe [1]. Hydroksyapatyt, sól fosforanu wapnia o wzorze $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ i stosunku molowym Ca:P=1:67, jest głównym związkiem mineralnym występującym w prawidłowej kości ludzkiej [44]. Mineral kostny jest apatytem z niedoborem wapnia, ze stosunkiem Ca:P mniejszym niż 1.67, co jest wartością teoretyczną dla czystego HAP. Hydroksyapatyt uważany jest za bioaktywną ceramikę, a jego wyjątkową zaletą jest zdolność do integracji z tkanką kostną. Ze względu na kruchość bioceramiki HAP nie jest jednak możliwe stosowanie go w czystej postaci, w miejscach narażonych na duże naprężenia [45]. Ponadto wysoki stosunek Ca:P i krystaliczność dodatkowo zmniejszają szybkość resorpcji mikrometrycznego HAP, i może zająć ona lata, a nawet dziesięciolecia [46]. Hydroksyapatyt często stosowany jest jako pokrycie implantów, czy dodawany do innych materiałów, takich jak np. kolagen [48]. Promuje adhezję i proliferację komórek osteoblastycznych na powierzchni implantu oraz umożliwia biologiczne mocowanie między tkanką kostną a implantem [49].

2.1.2.1.3. Dwufazowy fosforan wapnia

W literaturze przedmiotu wskazuje się również na materiały będące połączeniem HAP i TCP. Taki rodzaj materiału nazywany jest dwufazowym fosforanem wapnia, który jest szeroko stosowaną ceramiką syntetyczną. Otrzymywany jest poprzez zmieszanie HAP i TCP w różnych proporcjach procentowych, w celu poprawy właściwości obu minerałów. Ponadto szybkość rozpuszczania i właściwości mechaniczne tych mieszanin można kontrolować poprzez modulowanie składu, zarówno w zastosowaniach strukturalnych, jak i w powłokach implantów kostnych [50].

2.1.2.1.4. Nanohydroksyapatyt

Faza krystaliczna kości składa się nanocząstek hydroksyapatytu o igłowym kształcie, szerokości 5-20 nm i długości ok. 60 nm [51,52,53]. Bioceramika, która naśladuje minerał kostny pod względem składu i struktury, łatwiej promuje osteointegrację i tworzenie tkanki kostnej. W przeszłości, wiele syntetycznych fosforanów wapnia stosowanych do wspomagania rekonstrukcji szkieletu miało wielkość kryształów od submikrometrowej do 10 μm [54]. Obecnie większość materiałów kościozastępczych dostępnych na rynku wyrobów medycznych ma wielkość mikrometryczną, a w przypadku nanomateriałów hydroksyapatytowych najczęściej spotykane są materiały o wielkości nanocząstek powyżej 40 nm [55]. Nanohydroksyapatyt (nHAP), ze względu na swoje szczególne właściwości powierzchniowe (duża powierzchnia aktywna), wykazuje zwiększoną resorbowalność i wyższą bioaktywność. Promuje w ten sposób lepszą adhezję komórek i interakcje komórka-macierz, niż w przypadku materiałów w skali mikro [53]. Wykazano lepszą odpowiedź komórkową komórek kościotwórczych na nHAP niż na HAP, o rozmiarach mikrometrycznych [56]. W nanotechnologii wykorzystuje się zależność właściwości materiałów od ich rozmiaru – rozmiar jest zmienną materiałową lub termodynamiczną. Wpływ wielkości cząstek na ich rozpuszczalność i biodostępność został udokumentowany przez wielu badaczy [57,58,59,60,61,62,63,66,68]. Zależność ta jest wykorzystywana głównie w farmacji, w celu zwiększenia bioaktywności leków [58,59,60,61,62,63]. Rozpuszczalność nanocząsteczek wzrasta wraz ze zmniejszeniem rozmiaru ziarna. Im większa rozpuszczalność HAP, tym szybsze uwolnienie jonów wapnia do organizmu, co stanowi sygnał do tworzenia i namnażania komórek kościotwórczych [64,65]. Lee i współautorzy wykazali zwiększoną bioaktywność nHAP, w porównaniu ze spiekaną i grubszą ceramiką: nHAP promuje różnicowanie osteogenne komórek przyzębia oraz większą skuteczność adhezji komórek, podobnych do osteoklastów

[66]. Liczne badania potwierdziły biokompatybilność nHAP i jego przydatność w regeneracji tkanki kostnej [67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80]. Stwierdzono, że wpływ nHAP na proliferację komórek w przyzębiu [82] może być związany z uczestnictwem w szlaku sygnałowym receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGF, z ang. epidermal growth factor receptor) [83,84]. W badaniach przedklinicznych wykazano także wpływ nHAP na regenerację kości [85], aktywność makrofagów [86], uwalnianie czynników wzrostu [87], angiogenezę [88]. Ponadto wykazano, że rozmiar cząstek HAP odgrywa również kluczową rolę w odpowiedzi biologicznej, w tym na ukierunkowanie różnicowania i apoptozę komórek [89]. W ostatnich latach badania koncentrowały się na opracowaniu syntetycznego nHAP, który jest jak najbardziej zbliżony do naturalnego HAP pod względem struktury [52, 90, 91, 92].

W opublikowanym w 2021 roku przeglądzie systematycznym i metaanalizie Shaikh i współautorzy dokonali analizy badań porównujących leczenie za pomocą nHAP ubytków kostnych, spowodowanych przez paradontozę z leczeniem za pomocą innych typów przeszczepów kostnych [93]. Do przeglądu włączono 7 badań klinicznych z randomizacją (w 5 wykorzystano syntetyczne przeszczepy inne niż nHAP, w 1 przeszczep autogeny i w 1 przeszczep ksenogeniczny). Przeprowadzono też metaanalizę zmian w klinicznej utracie przyczepu (CAL, clinical attachment loss), głębokości kieszonek przy zgłębnikowaniu (PPD, probing pocket depth) i recesji dziąsłowych (REC, gingival recession). W przypadku leczenia za pomocą nHAP nie stwierdzono znaczących różnic w poprawie powyższych wyników, w porównaniu z zastosowaniem innych przeszczepów kości. Wyjątek stanowią zmiany w recesjach dziąsłowych, które są znacząco większe w przypadku przeszczepów syntetycznych. Autorzy pracy stwierdzili, że wyniki leczenia, za pomocą nHAP są równoważne z wynikami leczenia za pomocą innych przeszczepów, ale zalecili przeprowadzenie dalszych badań z dłuższym okresem obserwacji.

W opublikowanym w 2022 roku systematycznym przeglądzie dokonano analizy 14 badań z użyciem komercyjnie dostępnych preparatów nHAP stosowanych do regeneracji kości przyzębia [94]. Wyniki badań wskazały, że nHAP jest odpowiednim materiałem kościozastępczym do regeneracji kości przyzębia, z wynikami porównywalnymi do konwencjonalnie stosowanych materiałów do przeszczepów, takich jak ksenograft bydlęcy i inne syntetyczne materiały alloplastyczne. Użycie preparatów z nHAP, w znaczący sposób zwiększało regenerację kości już po 6 miesiącach, w porównaniu do innych metod leczenia ubytków kostnych w periodontologii. Autorka przeglądu wskazała na konieczność przeprowadzenia dalszych badań z randomizacją i długim okresem obserwacji.

2.1.2.1.5. Nanohydroksyapatyt w kompozytach

Dużą popularnością wśród badaczy cieszy się zastosowanie nHAP w materiałach kompozytowych do regeneracji tkanki kostnej [41,96,97,98,98,100,101]. Głównym powodem zastosowania nHAP w kompozytach polimerowych takich jak PCL/nHAP jest nadanie właściwości osteokonduktywnych, poprawa adhezji osteoblastów do powierzchni materiału oraz formowania kości *in vivo* [103,104] oraz zmniejszenie zakwaszenia otoczenia implantu wynikającego z rozkładu polimerów [105]. Ponadto, istotne jest nadanie nano-struktury. W porównaniu do mikro-strukturalnych powierzchni, powierzchnie nanostrukturalne oferują wyższą porowatość, większą powierzchnię kontaktu oraz wyższą początkową adsorpcję białka [101,102]. W badaniach wykazano lepszą adhezję oraz proliferację osteoblastów mysich (MC3T3-E1) do powierzchni rusztowań kompozytowych, zawierających nHAP niż w przypadku analogicznych rusztowań zawierających mikronowy hydroksyapatyt [105]. Topografia powierzchni ma również istotny wpływ na przyczepność komórek do podłoża [106]. Powierzchnia rusztowania powinna wpływać na transport składników odżywczych/odpadów, integralność mechaniczną, różnicowanie komórek i zdolność do indukowania transdukcji sygnału w komórkach [107]. Lim i współautorzy wykazali, że nanopory o mniejszej gęstości (14 i 29 nm), indukowały znacznie większe rozprzestrzenianie się i przyleganie ludzkich płodowych komórek osteoblastycznych (hFOB) niż głębsze nanopory (45 nm) na powierzchni poli(kwasu L-mlekowego) [107]. Co więcej, chropowatość powierzchni wpływa na proliferację, różnicowanie i produkcję macierzy osteoblastów *in vitro*. Chropowatość w skali nano, którą można uzyskiwać poprzez zastosowanie nHA na powierzchni nanostruktur 3D jest preferowana dla adhezji osteoblastów. Wykazano, że nanochropowatość skutecznie zwiększała początkową absorpcję białek (takich jak fibronektyna i witronektyna), które pośredniczyły w późniejszej adhezji komórek [108]. Zhu i współautorzy udowodnili, że na powierzchni rusztowań nHAP zapewniła odpowiednie warunki do rozwoju zmian morfologicznych komórek osteoblastów, jak np. filopodia i lamellopodia, które umożliwiają migrację komórek do powierzchni materiału [109].

2.2. Implanty ortopedyczne

Osoby, które ucierpiały w wyniku wypadku, urazu, choroby stawów, takie jak choroba zwyrodnieniowa stawów, reumatoidalne zapalenie stawów i pourazowe zapalenie stawów, lub wymagające resekcji fragmentu kości ze względu na chorobę nowotworową mogą potrzebować operacji wymagających implantów, np. całkowitej wymiany stawu biodrowego i kolanowego, stabilizacji złamań, stabilizacji dynamicznej, rekonstrukcji fragmentów kości, stabilizacji kręgosłupa [110,111]. Taki rodzaj leczenia wymaga zastosowania implantów rekonstrukcyjnych, w tym indywidualnych rusztowań kostnych drukowanych 3D, implantów ścięgien i więzadeł, implantów do leczenia złamań, w tym płytek, śrub, drutów, gwoździ śródszpikowych, implantów kręgosłupowych, itp. Biomateriały ortopedyczne są zazwyczaj materiałami, które mogą wytrzymać duże obciążenia. Biomateriały, takie jak polimery i ceramika są stosowane w ortopedii, ale to głównie metale przez lata zapewniały odpowiednie właściwości materiałowe, takie jak wysoka wytrzymałość, plastyczność, odporność na pękanie, twardość, odporność na korozję, odkształcalność i biokompatybilność, niezbędne do noszenia i przenoszenia obciążeń, wymaganych w mocowaniu złamań i całkowitej artroplastyce stawów (TJA, z ang. Total Joint Arthroplasty) [112]. Zastosowanie biomateriałów ortopedycznych zasadniczo należy do jednej z trzech kategorii specjalizacji chirurgicznych: kończyn górnych, kręgosłupa lub kończyn dolnych, a każda specjalizacja jest zwykle podzielona na trzy ogólne kategorie: pediatriczną, urazową i rekonstrukcyjną. Pomimo tych licznych specjalizacji i setek zastosowań ortopedycznych, istnieje tylko kilka ortopedycznych metali, ceramiki i polimerów, które dominują we wszystkich materiałach ortopedycznych. Znajomość ogólnych właściwości, zastosowań i ograniczeń "podstawowych" biomateriałów ortopedycznych jest niezbędna do zrozumienia, co jest potrzebne do poprawy wydajności obecnych materiałów implantologicznych i dlatego tylko kilka z nich dominuje w branży.

Główne cechy implantów ortopedycznych to dokładność wymiarowa, odpowiednie właściwości mechaniczne, stabilność chemiczna i toksyczność. Szczególną uwagę należy zwrócić na biokompatybilność przez cały okres życia implantu, który może trwać kilka lat. Zatem połączenie właściwości mechanicznych i biologicznych determinuje kliniczną przydatność biomateriałów w chirurgii ortopedycznej i urazowej układu mięśniowo-szkieletowego [111]. Materiały powszechnie wykorzystywane w tych zastosowaniach obejmują stal nierdzewną, stopy kobaltowo-chromowe i tytanowe, ceramikę, polietylen, cement kostny z poli(metakrylanu metylu) (PMMA), polietylen o ultra-dużej masie

cząsteczkowej (UHMWPE), polieteroetroketon (PEEK), polimery biodegradowalne takie jak polikaprolakton (PCL), kwas L-polimlekowy (PLLA). W ostatnich dziesięcioleciach procedury stosowane w leczeniu układu kostnego, w tym implanty, znacznie poprawiły jakość życia, poprzez wdrożenie struktur wspierających, które wytrzymują obciążenia mechaniczne w celu wsparcia złamań kości lub całkowitego zastąpienia nieodwracalnie uszkodzonych kości. Niestety, materiały stosowane we wczesnych interwencjach charakteryzowały się niewystarczającą trwałością, niską biokompatybilnością i ograniczoną dostępnością [115]. Ciągły rozwój zarówno medycyny, jak i materiałów stosowanych w chirurgii ortopedycznej i traumatologii wymaga znajomości ich właściwości mechanicznych i mikrostrukturalnych. Chociaż klinicyści znają pewne podstawowe informacje, zrozumienie zachowania materiałów jest nadal ograniczone [111].

Rynek implantów ortopedycznych pod względem przychodów został oszacowany na 36,3 bilionów w 2022 i osiągnie 48,1 bilionów w 2028 roku [113]. Szacowanie to uwzględnia nowe badania trendów w branży, analizę cen, analizę patentów, materiały z konferencji i webinarów, kluczowych interesariuszy oraz zachowania zakupowe na rynku. Wzrost branży implantów ortopedycznych jest napędzany głównie przez takie czynniki, jak rosnąca liczba pacjentów z zaburzeniami ortopedycznymi, szybki wzrost populacji pacjentów geriatrycznych, rosnąca liczba urazów sportowych, postępy w chirurgii ortopedycznej i rosnące zastosowanie minimalnie inwazyjnych operacji. Ponadto, trwająca współpraca i partnerstwo między graczami przemysłowymi i instytucjami badawczymi, w celu przyspieszenia rozwoju zaawansowanych implantów ortopedycznych oraz inicjatywy rządowe, dążące do wzmocnienia infrastruktury opieki zdrowotnej w wielu krajach wschodzących odegrały znaczącą rolę w stymulowaniu wzrostu rynku w okresie prognozy [113].

2.2.1. Biomateriały metaliczne

2.2.1.1. Stal

Nierdzewna stal chirurgiczna pozostaje jednym z najczęściej stosowanych stopów do produkcji implantów i narzędzi chirurgicznych. Stopy te służą do produkcji co najmniej połowy wszystkich implantów ortopedycznych stosowanych w USA [116], chociaż są one stopniowo wypierane z rynku przez inne stopy, zwłaszcza CoCrMo i stopy tytanu. Właściwości mechaniczne stali 316 L predysponują ją do różnych zastosowań medycznych, w tym: szpilek, prętów, gwoździ śródszpikowych, śrub i płytek, a nawet protez stawów [117]. Stal nierdzewna

posiada kilka pożądanых właściwości. Materiał ten jest trwały, plastyczny, a przez to stosunkowo łatwy w obróbce. Jest również nietoksyczny i biokompatybilny, ponieważ nie wywołuje niepożądanych reakcji ze strony sąsiadujących tkanek. Technologia jej produkcji (wytapianie, odlewanie i kucie) oraz przetwarzania (walcowanie na zimno, obróbka skrawaniem i gwintowanie) jest dobrze znana i stosunkowo tania. Produkty końcowe wykonane ze stali są dostępne w praktycznie nieograniczonych ilościach za akceptowalną cenę [111]. Chociaż stal 316 L jest wysoce odporna na korozję, jest podatna na pękanie naprężeniowe i korozję szczelinową. Pierwsza z nich wynika z dostępu do chlorków występujących w płynach biologicznych. Drugi z nich wynika z pęknięcia ultracienkiej, ochronnej warstwy tlenku, która zapewnia pasywację zewnętrzną powierzchni materiału. Podatność na pękanie korozyjne naprężeniowe wzrasta wraz z ekspozycją na bogate w chlorki środowisko biologiczne. Taka ekspozycja wymaga usunięcia implantów ze stali nierdzewnej, gdy tylko spełnią one swoją funkcję, ograniczając tym samym materiał do zastosowań w procedurach leczenia chirurgicznego [117].

2.2.1.2. Tytan i jego stopy

Tytan i jego stopy są znane od końca XVIII wieku. Tytan, wykorzystywany do produkcji kilku stopów charakteryzujących się stosunkowo wysoką twardością i odpornością na korozję, znalazł swoje pierwsze zastosowanie medyczne w latach czterdziestych ubiegłego wieku w dziedzinie implantów dentystycznych. Stopy te były również wykorzystywane w ortopedii ze względu na pożądane właściwości mechaniczne i zdolność do osteointegracji, definiowanej jako zdolność do wiązania się z sąsiednią kością, poprawy stabilności implantu i zmniejszenia ryzyka obłuzowania implantu [118,119]. Ponadto wysoka odporność na korozję umożliwiła przyjęcie implantu przez kilka dziesięcioleci bez widocznego podrażnienia tkanek lub skutków toksyczności [120]. Niska gęstość, wysoka wytrzymałość i wysoka odporność na korozję predysponują ten metal do produkcji implantów chirurgicznych, zwłaszcza w postaci beta-alotropowej i stopowej z molibdenem, wanadem, niobem, tantalem i cyrkonem. Obecnie stopy tytanu są szeroko stosowane do produkcji implantów urazowych i ortopedycznych ze względu na zwiększoną biokompatybilność, brak toksyczności, osteointegrację, wysoki stosunek wytrzymałości na rozciąganie do gęstości i odporność na korozję. Najpopularniejszym stopem tytanu stosowanym do produkcji implantów jest stop z domieszką aluminium i wanadu (Ti6Al4V) [114,121,122]. Jednak nowo zaprojektowane stopy, w tym TiNbZrTaSiFe [123], TiMoFe [124] i TiMoNbZr [125], charakteryzują się zmodyfikowanymi lub ulepszonymi

właścivościami mechanicznymi i stały się alternatywą dla tradycyjnie stosowanych stopów. Stopy tytanu nowej generacji wykazują większą elastyczność (np. moduł Younga ok. 50-65 GPa), która jest podobna do kości, co predysponuje je jako bardziej odpowiedni materiał do celów ortopedycznych. Aby wytwarzać skomplikowane komponenty z tych nowych stopów, coraz częściej badano nowe metody, w tym metodologię spersonalizowanego, zaprojektowanego komputerowo "drukowania" implantów 3D przy użyciu technologii spiekania wiązką laserową [126]. Ogromny potencjał tej metody nie został powszechnie przyjęty na dużą skalę. Obecnie praktycznie każdy rodzaj implantu ortopedycznego ma tytanowy "wariant", w tym śruby, płytki, gwoździe śródszpikowe i pręty, stabilizatory zewnętrzne i protezy stawów. Ponieważ tytan nie jest dielektrykiem i nie zwiększa temperatury pod wpływem zmiennych pól magnetycznych, jest idealny jako implant, ponieważ nie zakłóca również obrazowania metodą rezonansu magnetycznego [127]. Ta istotna zaleta tytanu zdominowała zastosowanie tego materiału w traumatologii i endoprotezoplastyce stawów oraz praktycznie zmonopolizowała rynek implantów stosowanych w chirurgii kręgosłupa [122,128]. Ponadto jego elastyczność jest znacznie bardziej porównywalna z żywą kością niż ze stalą. Podobne właściwości implantu i kości pozwalają uniknąć niepożądanych składowych odkształcenia i przeciążenia na styku kość-implant, zmniejszając w ten sposób ryzyko utraty lub złamania okołoprotezowego [129].

2.2.2. Biomateriały ceramiczne

2.2.2.1. Tlenek glinu oraz tlenek cyrkonu

Tlenek glinu (Al_2O_3) oraz tlenek cyrkonu (ZrO_2) to dwa najważniejsze tlenki ceramiczne do celów biomedycznych, które są wykorzystywane do naprawy uszkodzonych tkanek kostnych i stawów oraz ich wymiany, jak w przypadku całkowitej artroplastyki stawu biodrowego i kolanowego, ze względu na ich doskonałą odporność na zużycie i biokompatybilność. Są to materiały obojętne, ale mogą być stosowane w połączeniu z innymi materiałami, takimi jak biodegradowalne polimery, w celu dostarczania leków i promowania regeneracji tkanek. Biokompatybilność tych materiałów jest związana ze stabilnością chemiczną sieci krystalicznej, symetrycznym trójwymiarowym układem strukturalnym jonów składowych wewnątrz krystalicznego ciała stałego, co zapewnia tlenkowi glinu i tlenkowi cyrkonu wysoką odporność na korozję i niezawodne zachowanie *in vivo*. Wolne rodniki hydroksylowe (-OH) są powszechnie spotykane na powierzchniach implantów wykonanych

z tych materiałów, które oddziałują z płynami ustrojowymi, zapewniając warstwę smarującą wokół implantów. Wytrzymałość mechaniczna, wytrzymałość zmęczeniowa i kruchość Al_2O_3 zależą od czystości, wielkości i rozmieszczenia jego kryształów, a także jego gęstości. Ze względu na wysoką wytrzymałość mechaniczną jest on stosowany do produkcji implantów śródkostnych zarówno w ortopedii, jak i chirurgii szczękowo-twarzowej [130]. Implanty wykonane z Al_2O_3 łączą w sobie mały rozmiar ziarna poniżej $4\text{ }\mu\text{m}$ i niską chropowatość powierzchni poniżej $0,02\text{ }\mu\text{m}$, wykazując doskonałe właściwości trybologiczne [131]. Czysty tlenek cyrkonu ma strukturę monokrystaliczną w temperaturze pokojowej i przechodzi w strukturę tetragonalną i sześcienną w wyższych temperaturach. Aby ustabilizować siatkę kwadratową i sześcienną struktury cyrkonu, dodaje się różne tlenki, w tym tlenek magnezu (MgO), tlenek itru (Y_2O_3), tlenek wapnia (CaO) i tlenek ceru (Ce_2O_3) [132]. Czysty tlenek cyrkonu występuje w trzech głównych strukturach fazy krystalicznej: sześcienną (c), tetragonalną (t) i jednoskośną (m). Mikropęknięcia w strukturze siatki krystalicznej cyrkonu są samoograniczające, jeśli kontrolowana jest transformacja z tetragonalnej do jednoskośnej struktury krystalicznej. Tlenek cyrkonu wykazuje ponad dwukrotnie większą wytrzymałość niż polikrystaliczny tlenek glinu, niższy moduł sprężystości i większą kruchość [133]. Ogromna liczba cyrkonowych głów kości udowych oraz implantów dentystycznych została wszczepiona z dobrymi wynikami pod względem biokompatybilności i zachowania mechanicznego [134].

2.2.2.2. Fosforany wapnia

Inna ważna klasa bioceramiki obejmuje ortofosforany wapnia, takie jak hydroksyapatyt (HAP , $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) i fosforan trójwapniowy (TCP , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Ogólnie rzecz biorąc, apatyty są związkami nieorganicznymi o ogólnym wzorze $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{X}_2$, gdzie X mogą być jonami fluoru (takimi jak fluorapatyty (FAp)), jonami chlorkowymi (chloroapatyty (ClAp)) lub jonami hydroksylowymi (hydroksyapatyty (OHAp)). Jak opisano w rozdziale I, Hydroksyapatyt jest głównym strukturalnym składnikiem mineralnym kości i zębów i ma zazwyczaj niską krystaliczność. Skład stechiometryczny składa się z 39,68% Ca i 18,45% P. Wraz ze wzrostem stosunku Ca:P zwiększa się odporność, osiągając maksymalną wartość dla stosunku $\sim 1,67$, a po tej wartości zmniejsza się [135,137]. Substancja kostna, choć podobna do hydroksyapatytu, zawiera sód, chlor i magnez oraz inne dodatkowe jednostki jonowe i jest stabilna przy pH 9-12. Kluczową właściwością hydroksyapatytu jest jego wysoka biokompatybilność, co sprzyja osteointegracji i czyni go jednym z najbardziej odpowiednich materiałów do zastosowań związanych z naprawą i wymianą kości. Z tych samych powodów

hydroksyapatyt jest powszechnie wybierany jako optymalny materiał na implanty dentystyczne. Co więcej, zaletą tego materiału jest jego zdolność do wbudowywania różnych substancji chemicznych i stopniowego przypisywania ich do mikrośrodowiska. Może być stosowany jako platforma dostarczania leków do uwalniania środków terapeutycznych w kontrolowanym okresie. Ponadto, promuje syntezę kości i regenerację tkanki kostnej. Jego główną wadą jest stosunkowo niska wytrzymałość mechaniczna [137]. Wytrzymałość maleje wykładniczo wraz ze wzrostem porowatości. Moduł Weibulla należy do zakresu wartości 5-18, co wskazuje, że hydroksyapatyt zachowuje się jak typowa krucha ceramika, a moduł Younga waha się między 35-120 MPa. Niska wytrzymałość w połączeniu z podatnością na powolny wzrost pęknięć (szczególnie w warunkach wilgotnych), potwierdzają niską niezawodność gęstych implantów hydroksyapatytowych [138]. Wraz ze wzrostem porowatości, odporność na pękanie spada. Na uwagę zasługuje fakt, że porowata ceramika hydroksyapatytowa jest mniej odporna na zmęczenie niż gęsty hydroksyapatyt. Właściwości mechaniczne można modyfikować poprzez zmianę procentowej zawartości składników lub wielkości ziarna fazy stałej [139]. Porowata ceramika hydroksyapatytowa była szeroko stosowana jako substytut kości, ponieważ porowaty hydroksyapatyt umożliwia kontakt z kością, a pory zapewniają stabilną matrycę do przyłączania komórek i czynników osteogennych. Tkanka kostna rozwija się w porach, zwiększając wytrzymałość implantu. Zwykłą metodą przygotowania porowatej ceramiki hydroksyapatytowej (wielkość porów 100-600 μm) jest proces spiekania proszków z odpowiednimi dodatkami, takimi jak parafina, naftalen i nadtlenek wodoru, które umożliwiają tworzenie porów poprzez gazy uwalniane w podwyższonej temperaturze [140,141].

Fosforan trójwapniowy ma kilka zastosowań, takich jak chirurgia szczękowo-twarzowa, otolaryngologia, protezy ortopedyczne, neurochirurgia (chirurgia rdzenia kręgowego), implanty dentystyczne, urządzenia przezskórne, terapia przyzębia i przyrost wyrostka zębodołowego [142,143]. Zachowanie biochemiczne fosforanów wapnia wchodzących w interakcje z płynami ustrojowymi zależy od zmian temperatury i pH. W rzeczywistości niezhydratyzowane fazy fosforanu wapnia w środowisku o wysokiej temperaturze oddziałują z płynami ustrojowymi w temperaturze 37 °C, tworząc hydroksyapatyt, który ujawnia się na odsłoniętych powierzchniach fosforanu trójwapniowego [144,144]. Jednak cementy wapniowo-fosforanowe mają pewne wady, głównie związane są ze słabymi właściwościami mechanicznymi, które posiadają ograniczone lub żadne zastosowanie w odniesieniu do czystych materiałów ceramicznych [146,147].

2.2.3. Biomateriały polimerowe

2.2.3.1. Polietylen o ultrawysokiej masie cząsteczkowej (UHMWPE)

Polietylen (PE; $(C_2H_4)_n$) jest obecnie najczęściej stosowanym tworzywem sztucznym na świecie. Jest to liniowy homopolimer składający się z wodoru i węgla. Jest to wytrzymały, odporny na ścieranie i korozję, obojętny biologicznie, samosmarujący, śliski i półkryształiczny polimer. Charakteryzuje się również gęstością $0,93 \text{ g/cm}^3$, granicą plastyczności 20 MPa i modułem Younga 700 GPa [148]. Nie jest to jednak polimer odpowiedni do celów ortopedycznych ze względu na ich nieodpowiednie właściwości fizyczne. W związku z tym rozpoczęto prace nad modyfikacją PE w celu poprawy twardości i wytrzymałości na rozciąganie przy jednoczesnym zmniejszeniu elastyczności. W wyniku tych prac zsyntetyzowano polietylen o ultrawysokiej masie cząsteczkowej (UHMWPE), którego łańcuchy składają się z 200 000 monomerów na cząsteczkę (HDPE tylko około 1 700) i masie cząsteczkowej od 2 do 6 milionów gramów (HDPE: 0,05-0,25) [149,150,151]. UHMWPE jest predysponowany do produkcji panewek stawu biodrowego i wkładek protez kolanowych, a także sztucznych dysków międzykręgowych a także sztucznych w ścięgien czy więzadeł ze względu na dobry stosunek wytrzymałości do masy, niską absorpcję wilgoci, wyjątkowo wysoką odporność na ścieranie dzięki wysokiemu stopniu polimeryzacji [152]. Co więcej, UHMWPE jest około 15 razy bardziej odporny na ścieranie niż stal i ma niższy współczynnik tarcia. Jego produkcja jest również prosta i tania. Należy zauważyć, że pożądane właściwości fizyczne UHMWPE, w tym odporność na obciążenia rozciągające i naprężenia ścinające, są związane z bardzo długimi łańcuchami i ich przyciąganiem międzycząsteczkowym indukowanym przez siły Van der Waalsa [151].

2.2.3.2. Polieteroeteroketon (PEEK)

Pod koniec lat 90. PEEK stał się wiodącym, wysokowydajnym tworzywem termoplastycznym, które może zastąpić metalowe elementy implantów, zwłaszcza w ortopedii [153,154] i traumatologii [155,156]. Istotną przewagą tego materiału jest wysoka odporność na symulowaną degradację in vivo, w tym uszkodzenia spowodowane ekspozycją na lipidy. W literaturze pojawiają się liczne badania dokumentujące pomyślne wyniki kliniczne polimerów PEEK w zastosowaniach ortopedycznych i chirurgii kręgosłupa [157,158,159,160,161]. Badania dotyczące biotribologii wykazały również dobre właściwości kompozytów

PEEK jako materiałów łożyskowych i elastycznych implantów stosowanych w artroplastyce stawów [162,163]. Ze względu na zainteresowanie dalszą poprawą mocowania implantów, badania biomateriałów PEEK skupiły się również na kompatybilności polimeru z materiałami bioaktywnymi, w tym hydroksyapatytem (HAP), zarówno jako wypełniaczem kompozytowym, jak i powłoką powierzchniową [164,165,166,167]. W wyniku trwających badań nad biomateriałami, PEEK i pokrewne kompozyty mogą być obecnie projektowane z szerokim zakresem właściwości fizycznych, mechanicznych i powierzchniowych, w zależności od zastosowania implantu. PEEK dobrze odpowiada koncepcyjnemu modelowi dwufazowego polimeru półkrystalicznego, składającego się z fazy amorficznej i fazy krystalicznej. Podobnie jak w przypadku wielu polimerów półkrystalicznych, w tym polietylenu o ultrawysokiej masie cząsteczkowej (UHMWPE), zawartość krystaliczna PEEK zmienia się w zależności od historii przetwarzania termicznego. Krystaliczna zawartość formowanego wtryskowo PEEK w implantach wynosi zazwyczaj od 30% do 35%, jednak w przypadku tego materiału można napotkać szerszy zakres (0-40%), w zależności od sposobu jego przetworzenia [168,169]. W przeszłości wskazywano na jego słabą wytrzymałość zmęczeniową [170], co stanowi istotną wadę tego materiału, jednak w ostatnich latach prowadzono prace nad rozwiązaniem tego problemu [171].

2.2.3.4. Polimery biodegradowalne

Coraz częściej jako materiały przypominające organiczny składnik macierzy zewnątrzkomórkowej stosowane są degradowalne i resorbowalne polimery, które należą do rodziny alifatycznych poliestrów, a mianowicie poliglikolidu, polilaktydów, polikaprolaktonu i ich kopolimerów. Główną zaletą tych materiałów jest to, że ulegają one degradacji hydrolitycznej, powodując rozpad łańcucha polimerowego i uwalnianie związków naturalnie występujących w organizmie, które są ostatecznie metabolizowane [172,173].

2.2.3.4.1. Polikaprolakton (PCL)

W klasie materiałów syntetycznych, polikaprolakton (PCL) przyciągnął ostatnio wiele uwagi do zastosowań biomedycznych, w tym inżynierii tkanki kostnej [174,175,176]. Polikaprolakton należy do biodegradowalnych poliestrów (inne to PGA, PLLA). Jest to półkrystaliczny polimer alifatyczny o temperaturze topnienia w zakresie od 59 do 64 °C i temperaturze zeszklenia -60 °C. W związku z tym w temperaturze fizjologicznej półkrystaliczny PCL osiąga stan gumy, co skutkuje jego wysoką wytrzymałością [177]

i doskonałymi właściwościami mechanicznymi (wysoka wytrzymałość, elastyczność w zależności od masy cząsteczkowej). Jest nietoksyczny i kompatybilny z tkankami, dlatego jest szeroko stosowany jako resorbowalne szwy, jako rusztowania w terapii regeneracyjnej i do dostarczania leków. PCL wykazuje dłuższy czas degradacji (2-3 lata) i jest rozkładany przez mikroorganizmy lub przez hydrolizę jego alifatycznego wiązania estrowego w warunkach fizjologicznych [179]. Ze względu na obecność pięciu hydrofobowych ugrupowań $-CH_2$ w powtarzających się jednostkach, PCL ulega degradacji najwolniej ze wszystkich poliestrów. Matryce nanowłókien wykonane z poliestrów charakteryzują się szybkością erozji, odpowiednio: $PGA > PLGA > PLLA > PCL$ [180,181]. PCL bardzo często stosowany jest do wytwarzania implantów w postaci rusztowań kostnych drukowanych 3D. Ze względu na słabe właściwości biologiczne popularne stało się wytwarzanie kompozytów PCL/HAP celu uzyskania zwiększenia odpowiedzi komórkowej i regeneracji kości [181,182].

2.2.3.4.2. Kwas L-polimlekowy (PLLA)

Kwas L-polimlekowy również cieszy się zainteresowaniem w inżynierii tkankowej jako materiał do wytwarzania czystych lub kompozytowych rusztowań kostnych o wysokiej skuteczności w zakresie regeneracji tkanek [182,183,184]. PLLA jest homopolimerem z rodziny PLA, która obejmuje również homopolimer PDLA i kopolimer PDLLA (Rysunek 1) [185]. Ze względu na nietoksyczność oraz doskonałe właściwości fizyczne i mechaniczne, atrakcyjne właściwości tej rodziny zmotywowały naukowców do skoncentrowania badań na tych polimerach [186]. W oparciu o swoje właściwości kompozycyjne i strukturalne, PLA jest termoplastycznym poliestrem alifatycznym. Może zawierać formy stereochemiczne, które nadają materiałom określone właściwości. Na przykład PLLA i PDLA są polimerami semikrystalicznymi, podczas gdy PDLLA jest zwykle amorficzny [187]. PLLA reprezentuje większość komercyjnych gatunków PLA. Są to przyjazne dla środowiska polimery otrzymywane w 100% z zasobów naturalnych, takich jak skrobia kukurydziana i trzcina cukrowa [188]. PLLA składa się z cyklicznego dimeru laktydu LL- i ma strukturę krystaliczną między 30 a 40% [189], która może mieć kilka form (α , α' , β i γ). Forma α jest najbardziej stabilna ze względu na pseudo-ortomorficzną komórkę elementarną, z łańcuchem $(10/3)$ przyjmującym konformację helikalną [188]. W rezultacie nie ma symetrii z każdej strony, co prowadzi do zniekształcenia upakowania łańcucha w sieci krystalicznej i stabilności energetycznej ułożonych łańcuchów [190]. PLLA jest polimerem zatwierdzonym przez FDA, znanym z niskiej toksyczności w porównaniu do innych polimerów syntetycznych [185]. Działanie przeciwinfekcyjne PLLA zostało potwierdzone w eksperymentach *in vivo* i *in vitro*,

ułatwiając regenerację zainfekowanej tkanki [191,192]. Jedną ze znaczących zalet PLLA, w odniesieniu do innych biopolimerów jest zapewnienie odpowiednich właściwości mechanicznych podczas długotrwałych procesów regeneracyjnych [184]. Badacze zgłaszali jednak pewne wątpliwości dotyczące hydrofobowej powierzchni tego polimeru, która może zagrażać jego biokompatybilności, ponieważ wpływa na ilość wchłanianych białek i adhezję komórek [184,194,195]. Innym kluczowym parametrem, który należy wziąć pod uwagę przy określaniu właściwości biologicznych tego materiału, są jego produkty uboczne biodegradacji, które mogą powodować miejscową lub ogólnoustrojową toksyczność po implantacji [184,193,196]. Podczas degradacji PLLA poprzez hydrolizę, polimer tworzy kwas mlekowy jako produkt uboczny, zwykle obecny w organizmie i wydalany w postaci wody i dwutlenku węgla [185]. Optymalna szybkość degradacji podłoża 3D powinna odpowiadać szybkości odkładania się macierzy pozakomórkowej w określonej tkance [197]. Kinetyka degradacji PLLA zależy od jego krystaliczności, odkształcenia i mikrostruktury, które następują po jego rozmieszczeniu [198]. Niższa krystaliczność i wyższe odkształcenia prowadzą do szybszej degradacji. PLLA jest opisywany jako resorbowalny polimer syntetyczny o powolnej kinetyce degradacji. Cecha ta wynika z dodatkowej grupy metylowej, co prowadzi do zwiększonej hydrofobowości i stabilności przed hydrolizą [199]. Czas degradacji PLLA wynosi odpowiednio około 40 i 30 tygodni in vitro [200] i in vivo [201].

2.3. Modyfikacja powierzchni implantów powłokami hydroksyapatytowymi

Jak wcześniej wspomniano implanty muszą charakteryzować się biokompatybilnością, wysoką wytrzymałością mechaniczną, odpornością na korozję i zużycie, hydrofilowością oraz osteointegracją. Osteointegracja to "bezpośredni - na poziomie mikroskopii świetlnej - kontakt między żywą kością a przenoszącym obciążenia implantem kostnym" [202]. Osteointegracja obejmuje głównie kilka kluczowych punktów opisanych jako:

- stabilność protezy pod skutecznym obciążeniem,
- przyleganie kości do implantu kostnego,
- brak względnego ruchu sąsiadujących tkanek,
- brak względnego ruchu między sąsiednimi tkankami a implantem w warunkach obciążenia,
- morfologia implantu kostnego rozpoznawana jako typowy składnik kości na poziomie mikroskopowym [203].

W związku z tym podstawowym wymogiem trwałego implantu kostnego jest silniejsze wiązanie implantu z otaczającą kością gospodarza, co zmniejsza ryzyko osteolizy. Parametry takie jak chropowatość powierzchni, ilość i rodzaj wydzielanych jonów, zwilżalność, fizykochemia powierzchni są niezbędne dla uzyskania dobrej osteointegracji implantów. Zatem, w celu uzyskania biokompatybilności, osteointegracji i wytrzymałości mechanicznej, stosowane są modyfikacje powierzchni implantów przy użyciu różnych materiałów bioaktywnych [204].

Szczególne zainteresowanie wśród naukowców, jak również w przemyśle budzi modyfikacja powierzchni implantów powłokami hydroksyapatytowymi. Istnieje wiele metod modyfikacji powierzchni implantów jak np. chemiczne osadzanie z fazy gazowej (CVD, z ang. Chemical Vapour Deposition), fizyczne osadzanie z fazy gazowej (PVD, z ang. Physical Vapour Deposition), natryskiwanie plazmowe (PTD, z ang. Plasma Diffusion Treatment), osadzanie laserem impulsowym (PLD, z ang. Pulsed Laser Deposition), metoda zol-żel (ang. sol-gel method), metoda elektroforetycznego osadzania (EPD, ang. electrophoretic deposition), metoda zanurzeniowa (ang. dip coating), spin coating, metoda ultradźwiękowa (ang. ultrasonic coating). Modyfikacja powierzchni pozwala na uzyskanie materiałów kompozytowych o pożądanych właściwościach, np. połączenie implantów metalicznych z powłokami hydroksyapatytowymi może przewyciężyć wady, takie jak słaba wytrzymałość mechaniczna, kruchość, słaba adhezja komórek, tym samym zyskując pożądane właściwości – biogodność,

porowatość odpowiednia dla wzrostu kości oraz wysoka wytrzymałość mechaniczna [205,206]. Nadanie odpowiedniej chropowatości oraz zwilżalności powierzchni ma szczególnie istotne znaczenie w przypadku implantów polimerowych. Osadzenie powłok hydroksyapatytowych na implantach polimerowych może obniżać kąt zwilżania powierzchni, niejednokrotnie zmieniając przy tym właściwości powierzchni z hydrofobowych na hydrofilowe, co sprzyja adhezji komórek. Ponadto, nadanie mikro- lub nanostruktury powierzchni sprzyja mocowaniu implantu w tkankach. Oprócz tego jony wapnia (Ca^{2+}), które mogą być uwalniane z powłok hydroksyapatytowych stanowią wewnątrzkomórkowy przekaźnik, który kontroluje kilka procesów komórkowych, takich jak proliferacja komórek, transkrypcja genów i skurcz mięśni. Sygnały Ca^{2+} obejmują szereg mechanizmów homeostatycznych i sensorycznych. Sygnały te mogą indukować ekspresję genów, które są związane z proliferacją komórek [207]. Co więcej, w przypadku polimerów biodegradowalnych może niwelować efekt zakwaszania tkanek w czasie degradacji materiału [207].

2.3.1. Natryskiwanie plazmowe

W technikach natryskiwania plazmowego materiał wejściowy może mieć postać proszku, roztworu prekursora lub ciekłej zawiesiny, który jest wtryskiwany bezpośrednio do płomienia plazmowego. Materiał uwięziony w strumieniu plazmy jest podgrzewany i topiony (częściowo lub całkowicie). Krople materiału powlekającego, które uderzają w podłoże, przywierają do niego i zestalają się, tworząc powłokę [208]. Jednakże natryskiwanie plazmowe ma ograniczenia związane z wysoką szybkością krzepnięcia materiału powlekającego i tworzeniem się fazy amorficznej, a także pojawianiem się pęknięć lub problemów z wiązaniem między warstwą HAP a tytanem [209,210]. Ponadto zaobserwowano problemy takie jak tworzenie się pustych przestrzeni między tytanem a amorficzną powłoką fosforanu wapnia, co prowadzi do szybkiej kolonizacji bakterii i ułatwia infekcję [209,211].

2.3.2. Metoda osadzania elektroforetycznego

Osadzanie elektroforetyczne (EPD) spotkało się z dużym zainteresowaniem ze względu na jego zalety w przypadku warstw i powłok ceramicznych, a także laminarnych kompozytów ceramicznych [212,213]. Fascynacja tą metodą wynika również z jej prostoty, niskich kosztów sprzętu i możliwości formowania powłok o złożonym kształcie [214]. W latach 90. XX wieku odkryto potencjał tej metody w zastosowaniach biomedycznych [215,216]. Dobrą kontrolę

morfologii powłoki można uzyskać poprzez dostosowanie warunków osadzania oraz wielkości i kształtu proszku ceramicznego [218]. Oprócz tych zalet, powłoki ceramiczne na podłożach metalicznych stwarzają problemy, takie jak niska przyczepność, pojawianie się pęknięć na powierzchniach powłok w wyniku skurczu po procesie suszenia i spiekania powłok [218,219]. Proces spiekania poprawia wiązanie i zagęszczenie powłok, ale również sprzyja dekompozycji hydroksyapatytu. Dekompozycja hydroksyapatytu zawartego w powłoce jest niepożądana, ponieważ prowadzi do przyspieszenia rozpuszczania powłoki *in vivo* [220]. Podobne problemy zaobserwowano stosując metodę zanurzeniową do uzyskania powłoki hydroksyapatytowej [215,230]. Ciekawą alternatywą metody EPD jest metoda opisana przez T. Kokubo i współautorów [221], rozwiązanie to polega na uzyskaniu dodatnio naładowanej powierzchni poprzez absorpcję grup kwasowych w wyniku mieszanej obróbki kwasem H_2SO_4/HCl oraz przez tworzenie dodatnio naładowanej warstwy TiO_2 na powierzchni Ti w wyniku późniejszej obróbki cieplnej. Zbadano zdolność do hydrotermalnego tworzenia HAP na powierzchni tytanu poddanej różnej obróbce cieplnej i kwasowej. Wyniki wskazują, że modyfikacja powierzchni w kwasie i temperaturze $650^{\circ}C$ była najskuteczniejszą metodą indukującą tworzenie dobrej jakości powłok HAP podczas syntezy hydrotermalnej [221,222].

2.3.2. Metoda zol-żel

Metoda zol-żel służy głównie do otrzymywania materiałów, w szczególności nanomateriałów i obejmuje wytwarzanie zolu z jego żelowaniem poprzez odparowanie rozpuszczalnika [223,224,225,226,227]. Metoda ta umożliwia uzyskanie równomiernego rozkładu elementów układów wieloskładnikowych na powierzchni różnych ciał stałych. Do osadzania powłoki HAP metodą zol-żel można zastosować kilka metod, z których najbardziej powszechne to powlekanie zanurzeniowe i wirowe „spin coating”. W metodzie powlekania zanurzeniowego podłoże jest zanurzane i wyciągane pionowo ze stałą prędkością z pożądanego zolu powlekającego [228]. W niektórych badaniach po zanurzeniu wprowadzono mieszanie w celu uzyskania jednorodności w całej objętości zolu [229]. Prędkość wyciągania podłoża z zolu, lepkość zolu, czas zanurzenia oraz liczba zanurzeń są czynnikami kontrolującymi grubość powłoki [228,230]. W powlekaniu wirowym krople zolu są dozowane na powierzchnię podłoża, a następnie podłoże jest wirowane z dużą prędkością. Gotowa powłoka zwykle zostaje wypalona w piecu. Lepkość zolu, prędkość wirowania i napięcie powierzchniowe są parametrami kontrolującymi grubość powłoki [231]. Zwykle powlekanie zanurzeniowe jest stosowane do powlekania złożonych kształtów, podczas gdy powlekanie wirowe jest

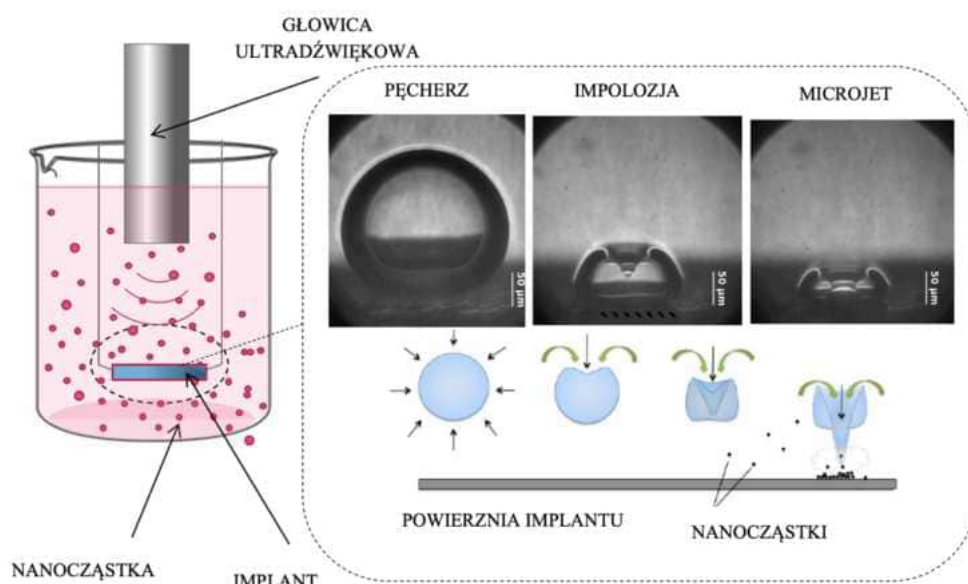
preferowane w przypadku płaskich powierzchni [232]. Jednak powłoki HAP uzyskiwane na drodze metody zol-żel zwykle są amorficzne lub słabo krystaliczne [233], podczas gdy preferowane są wysoce krystaliczne powłoki HAP, Xue et al. [234] zilustrowali znaczenie wysokiej krystaliczności w redukcji rozpuszczania in vivo powłok HAP. Zauważono również, że wyższa zawartość krystalicznego HAP zwiększa siłę adhezji między HAP a podłożem [235].

2.3.3. Metoda ultradźwiękowa

Zastosowanie ultradźwięków do reakcji i procesów chemicznych nazywane jest sonochemią. Sonochemia może być kojarzona z syntezą nanocząstek, czy wytwarzaniem katalizatorów [236]. Ponadto ultradźwięki mogą być kojarzone z zaawansowanymi procesami mycia powierzchni w szczególności w odniesieniu do mycia trudnodostępnych powierzchni materiałów porowatych. Jednakże ultradźwięki mogą być również wykorzystywane do osadzania nanomateriałów na różnego rodzaju powierzchniach. Pierwsze prace dotyczące osadzania nanomateriałów (metali, tlenków metali, półprzewodników) na podłożach ceramicznych z zastosowaniem metody sonochemicznej [237,238] były realizowane pod koordynacją Aharona Gedanken pod koniec lat 90. Rozwiązanie te dotyczyło osadzania nanocząstek bezpośrednio podczas syntezy sonochemicznej. Inne rozwiązanie dotyczące osadzania nanocząstek przy pomocy ultradźwięków opracowano w Laboratorium Nanostruktur Instytutu Wysockich Ciśnień Polskiej Akademii Nauk [239]. Wspomniana metoda dotyczy osadzania powłok z zawiesiny nanocząstek hydroksyapatytu, gdzie udział wagowy nanocząstek hydroksyapatytu wynosi 0,01% do 2%, a temperatura prowadzenia procesu nie przekracza 100°C, korzystnie nie przekracza 40°C. Niska temperatura procesu osadzania oraz brak konieczności wygrzewania powłoki stanowi istotną przewagę nad innymi metodami osadzania powłok. Grubość powłok uzyskanych tą metodą można sterować w zakresie 50 – 1000 nm, korzystnie od 50 nm do 300 nm [239].

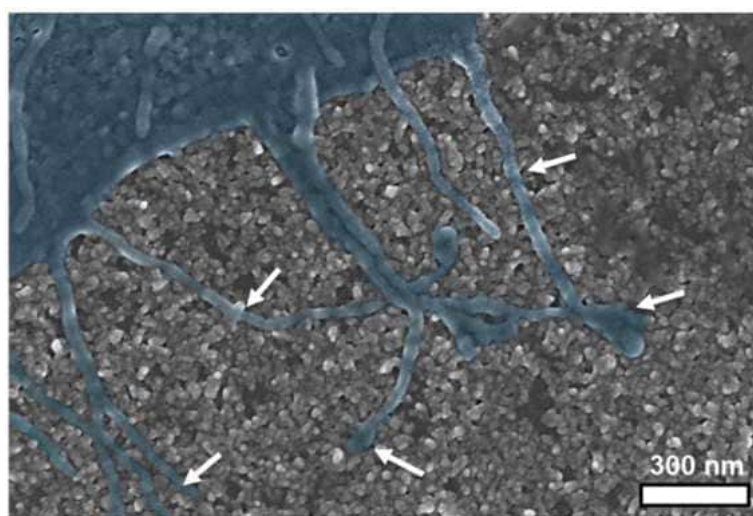
Zasada działania ultradźwiękowego osadzania powłok składających się z nanocząstek (Rysunek 2) polega na dostarczeniu energii fal ultradźwiękowych do zawiesiny nanocząstek w której zanurzony jest obiekt, na którym osadzana będzie powłoka. Fale ultradźwiękowe dostarczone do zawiesiny powodują powstawanie pęcherzy kawitacyjnych na zarodkach nukleacji, które mogą występować w postaci cząstek stałych, artefaktów powierzchni materiałów, molekuł czy zawirowań kwantowych [240,241]. W przypadku zawiesiny nanocząstek zarodków nukleacji w postaci cząstek stałych jest bardzo wiele. Wytworzenie pola ultradźwiękowego w zawieszynie nanocząstek prowadzi do powstawania cykli podwyższonego

(kompresja) i obniżonego (refrakcja) ciśnienia akustycznego. Zgodnie z cyklem zmiennego ciśnienia pęcherze kawitacyjne kurczą się w fazie podwyższonego ciśnienia i rozkurczają oraz rosną w fazie obniżonego ciśnienia, aż do momentu osiągnięcia wielkości krytycznej pęcherza – wówczas następuje gwałtowna i egzoenergetyczna implozja [240,242]. W wodzie pęcherzyk osiąga wielkość krytyczną w granicach 170 μm dla częstotliwości 20 kHz [243]. Skutkiem gwałtownej implozji jest powstanie obszarów zwanych z ang. „hot spot”. Obszary te charakteryzują się wysoką temperaturą do 5000K oraz ciśnieniem do 1000 bar [244,245]. Natomiast szybkość zapadania pęcherza kawitacyjnego może osiągać prędkość nawet do 1000 m/s, co jest przyczyną powstawania intensywnych fal uderzeniowych [246]. W przypadku wytworzenia kawitacji akustycznej w pobliżu powierzchni ciał stałych obserwuje się powstawanie zjawiska kawitacji asymetrycznej z ang. „microjet” [244,247,248]. W tym przypadku również obserwuje się obszary w postaci „hot spot” wytworzonych na skutek implozji microjet-ów. Tego rodzaju pęcherze zapadają się z prędkością ok 100 m/s w kierunku powierzchni materiału [249,250] i mogą powodować przytwierdzenie do niej nanocząstek napotkanych na drodze strumienia wytworzonego na skutek implozji. Obecność cząstek stałych w cieczy jest dodatkowym czynnikiem wpływającym na zarodkowanie microjet-ów [241,244,251,252], co sprzyja procesowi ultradźwiękowego osadzania nanocząstek hydroksyapatytu na powierzchni implantów.



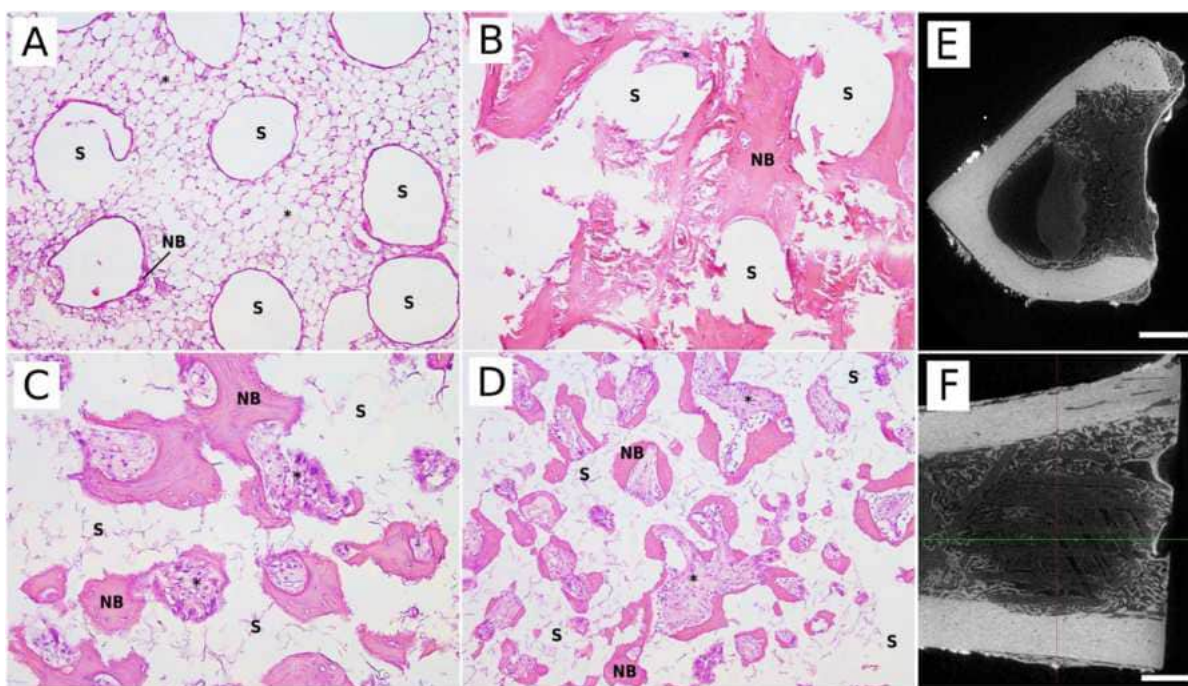
Rysunek 2. Zasada działania ultradźwiękowego osadzania powłok nanocząstek. Opracowanie własne na podstawie [69].

W pracach [69,239,105,254,255] opisano zastosowanie metody ultradźwiękowej do osadzenia powłok hydroksyapatytowych. W publikacji Rogowskiej-Tylman i współautorów [69] wykazano, że rozplaszczanie komórek MG-63 sprzyjające proliferacji było znacznie lepsze próbkach PCL na które naniesiono powłoki hydroksyapatytowe metodą ultradźwiękową, niż na próbkach czystego PCL. Ponadto zidentyfikowano wykształcenie charakterystycznych filopodii komórkowych (Rysunek 3), co potwierdza, że nanostruktura powierzchni była odpowiednia dla rozwoju komórek MG-63.



Rysunek 3. Kolorowy obraz SEM filopodii komórki MG-63 (strzałki) na powierzchni pokrytej nHAP (powiększenie 50 000×) [69].

Ponadto w pracy tej dowiedziono, że powłoka składająca się z nanocząstek hydroksyapatytu naniesionych ultradźwiękowo sprzyja tworzeniu kości in vivo [69], (Rysunek 4).



Rysunek 4. Przekroje poprzeczne A) rusztowania PCL, B) rusztowania PCL pokrytego nHAP, C) rusztowania β -TCP i D) rusztowania β -TCP pokrytego nHAP, gdzie: S - materiał rusztowania; NB - nowa kość; * - tkanka miękka (barwienie Hem-Eos., powiększenie 100 $\times$). E) i F) Skany μ -CT rusztowania PCL pokrytego nHAP w kości piszczelowej królika po 3 miesiącach od implantacji (pasek skali 2 mm) [69].

Z kolei w pracach [105,254] wykazano, że metoda ultradźwiękowa umożliwia osadzanie powłok na biodegradowalnych włóknach elektroprzędzonych, a powłoki wytworzone w ten sposób sprzyjają adhezji i proliferacji komórek, jak również spowalniają degradację materiału. Metoda ultradźwiękowa to innowacyjna technologia, rozwijana od 2010 roku, w której opracowaniu uczestniczyła autorka rozprawy, a pełny zakres możliwości oferowany przez tę metodę nie jest znany i wymaga dalszych badań. Konieczna jest weryfikacja czy technologia ta pozwala na powtarzalne osadzanie jednorodnych nano-powłok hydroksyapatytowych, weryfikacja jaki wpływ ma zastosowanie różnej wielkości nanocząstek na właściwości powłok oraz sprawdzenie, czy metoda nadaje się do osadzania nano-powłok na różnego rodzaju powierzchniach, kształtach i strukturze implantów ortopedycznych.

2.4. Podsumowanie

Jak wynika z przeglądu literatury urazy ortopedyczne i inne uszkodzenia układu kostnego są bardzo powszechne i wymagają zastosowania zaawansowanych biomateriałów w postaci implantów. Do wytworzenia implantów ortopedycznych stosowany jest szereg różnych grup materiałów, od metali, poprzez ceramikę, polimery, materiały biodegradowalne, po materiały kompozytowe o skomplikowanej strukturze. Powierzchnia implantu odgrywa kluczową rolę w biologicznej reakcji organizmu na implant. Jest to powierzchnia, która początkowo wchodzi w interakcje z płynami fizjologicznymi, komórkami i otaczającymi tkankami. Dlatego też, dużą wagę przywiązuje się do właściwości chemicznych i morfologicznych powierzchni biomateriałów, w celu poprawy biokompatybilności, migracji, proliferacji i różnicowania komórek, stabilności mechanicznej i endogenego wrastania tkanek. Właściwości te są kluczowe do uzyskania odpowiednich interakcji implantu z tkankami i jego poprawnego funkcjonowania. Modyfikacja powierzchni implantów poprzez nakładanie powłok hydroksyapatytowych stosowana jest w celu uzyskania pożądanых właściwości, przyspieszenia przerastania implantu nową tkanką kostną i dobrej stabilizacji. Jednakże istniejące metody osadzania powłok hydroksyapatytowych na implantach ortopedycznych mają istotne ograniczenia, a mianowicie:

- Nie pozwalają na zastosowanie pełnego potencjału nanotechnologii, czyli wykorzystania efektu rozmiaru nanocząstek, w celu uzyskania pożądanых właściwości.
- Technologie osadzania powłok na powierzchniach skomplikowanych struktur komórkowych drukowanych 3D, czy materiałów włóknistych nie są wystarczająco skuteczne i/lub nie są wystarczająco powtarzalne.
- Powłoki osadzone na materiałach wrażliwych na temperaturę nie są wystarczającej jakości, przez co często ulegają pęknięciom i delaminacji.
- Na chwilę obecną nie opracowano uniwersalnej metody, która pozwala na osadzenie powłok hydroksyapatytowych na dowolnym materiale.

Uzasadnione jest zatem podejmowanie dalszych wysiłków w kierunku inżynierii powłok hydroksyapatytowych na implantach ortopedycznych.

3. Teza i cel pracy

3.1. Teza pracy

Połączenie technologii mikrofalowej hydrotermalnej syntezy nanocząstek oraz ultradźwiękowego nanoszenia powłok otwiera nowe możliwości nano-inżynierii i przełamanie ograniczeń w obecnie stosowanych metodach pokrywania powierzchni implantów hydroksyapatytem poprzez:

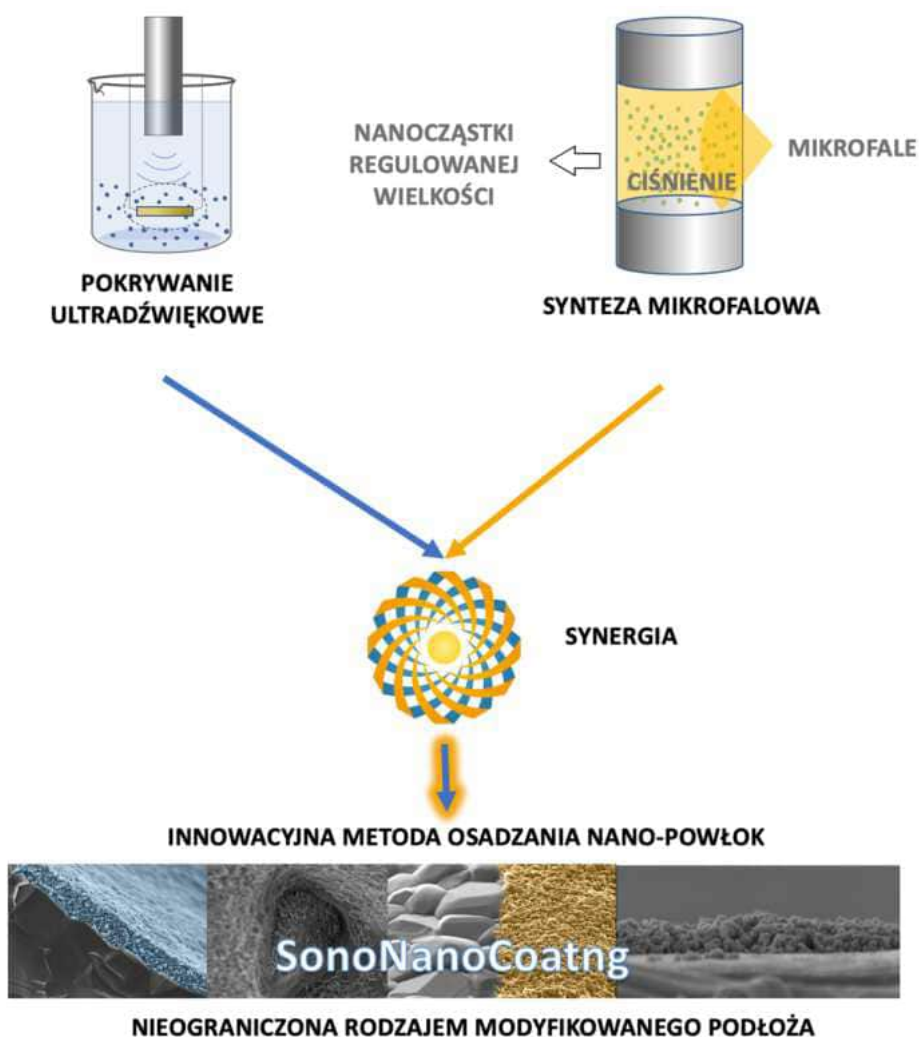
1. Regulację wielkości nanocząstek w powłokach hydroksyapatytowych, co daje nowe perspektywy w dziedzinie modyfikacji powierzchni implantów ortopedycznych.

2. Uzyskanie jednorodnych powłok hydroksyapatytowych obecnych zarówno na powierzchniach zewnętrznych jak i wewnątrz porowatych struktur 3D oraz materiałach włóknistych.

3. Osadzanie nano-powłok w niskich temperaturach, co umożliwia modyfikację powierzchni materiałów wrażliwych na temperaturę oraz zachowanie właściwości nano-hydroksyapatytu.

4. Wykorzystanie wszechstronności metody i dobór parametrów osadzania nano-powłok niezależnie od rodzaju, kształtu i struktury modyfikowanego materiału.

Zatem połączone technologie pozwalają na znaczący postęp w inżynierii nano-powłok hydroksyapatytowych. Konsolidacja tych metod umożliwia skuteczne osadzanie nano-powłok hydroksyapatytowych o zaprogramowanej wielkości nanocząstek oraz regulowanej grubości, równomiernie na powierzchni materiałów porowatych, włóknistych i wykonanych w technologii 3D, w ekologicznym procesie o niskiej temperaturze, bez stosowania toksycznych chemikaliów. Według autorki technologia SNC stanie się standardem w zakresie nanoszenia powłok i warstw na implanty ortopedyczne w nadchodzących latach.



Rysunek 5. Łączenie dwóch metod: ultradźwiękowego pokrywania oraz mikrofalowej syntezy nanocząstek.

3.2. Cel pracy

Celem pracy jest udowodnienie tezy poprzez wykonanie następujących prac:

- zbudowanie stanowiska do pokrywania ultradźwiękowego,
- optymalizacja metody ultradźwiękowego osadzania nano-powłok pod kątem wytwarzania powłok hydroksyapatytowych składających się z nanocząstek o różnej wielkości oraz różnorodności materiałów stosowanych do wytwarzania implantów ortopedycznych, w tym implantów tytanowych, polimerowych oraz kompozytowych,
- wytworzenie i charakteryzacja nano-powłok hydroksyapatytowych składających się z różnej wielkości nanocząstek,
- wykazanie wpływu wielkości nanocząstek na właściwości nano-powłok,
- Wykazanie biokompatybilności opracowanych nano-powłok.

4. Metody eksperymentalne

4.1. Hydrotermalna synteza mikrofalowa nanocząstek hydroksyapatytu GoHAPmed

Synteza nanocząstek hydroksyapatytu (GoHAPmed) została przeprowadzona metodą hydrotermalnej syntezy mikrofalowej. W procesie syntezy zastosowano dwa etapy: I - strącenie nanocząstek hydroksyapatytu w roztworze wodnym oraz II – mikrofalowy proces hydrotermalny. Mikrofalowy proces hydrotermalny to wygrzewanie zawiesiny w zamkniętym naczyniu ogrzewanym mikrofalami, w ciśnieniu wyższym od atmosferycznego oraz w temperaturze ponad 100°C. Synteza bazowała na wcześniej publikowanym opracowaniu [52]. Autorka pracy opracowała procedury syntezy nanohydroksyapatytu GoHAPmed zgodnie ze standardami normy ISO 13485 System Zarządzania Jakością dla Wyrobów Medycznych, potwierdzony certyfikatem numer PL55499H. Proces udoskonalono pod kątem doboru odczynników medycznych wysokiej czystości niezbędnych dla produktu do zastosowania w klinice. Proces zautomatyzowano częściowo poprzez zastosowanie zaawansowanego reaktora MSS-4 z ramieniem robota (Rysunek 6 (A)). Reaktor MSS-4 został opracowany przez Laboratorium IWC PAN we współpracy z Instytutem Technologii Eksploatacji (ITEE) w Radomiu na potrzeby zwiększenia i automatyzacji produkcji nanocząstek hydroksyapatytu (GoHAPmed) oraz certyfikacji wytwarzania tego materiału jako wyrobu medycznego. Reaktor MSS-4 posiada 2 komory w których zachodzi wygrzewanie mikrofalowe (Rysunek 6 (B)). W komorach zamieszczane są teflonowe naczynia reakcyjne o pojemności 300 ml. Do naczyń teflonowych wlewana jest zawiesina nanocząstek z etapu I, która następnie jest wygrzewana w ściśle kontrolowanej temperaturze, czasie i ciśnieniu procesu. Temperatura została obliczona na podstawie równowagi para-ciecz dla wody [252]. Po procesie syntezy komory reakcyjne są chłodzone za pomocą płaszcza wodnego w celu szybszego schłodzenia zawiesiny i obniżenia ciśnienia. Po zakończonym procesie ramię robota zmienia naczynia teflonowe na kolejne i rozpoczyna kolejny proces wygrzewania mikrofalowego według receptury zadanej w oprogramowaniu komputerowym.

W celu przeprowadzenia strącania nanocząstek hydroksyapatytu wykorzystano 10,346 g wodorotlenku wapnia ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, EMPROVE® ESSENTIAL Ph Eur, BP, USP, JP, FCC, E 526, Merck, Darmstadt, Niemcy) oraz 5,7 ml kwasu ortofosforowego (85% H_3PO_4 , EMPROVE® ESSENTIAL Ph Eur, BP, JPE, NF, E 338, Merck, Darmstadt, Niemcy). Wodorotlenek wapnia zawieszono w 450 ml wody dejonizowanej o przewodności 0,06 μS

oczyszczanej w podwójnym systemie dejonizacji (dejonizator HLP 20UV, Hydrolab, Straszyn, Polska oraz Ultra Toc/UV/UF, Hydrolab, Straszyn, Polska). Kwas wkraplano do mieszającej się z prędkością 450 rpm zawiesiny wodorotlenku wapnia przy użyciu biurety cyfrowej (SI Analytics, Titronic universal, TZ3260, Niemcy). Parametry czasu i ciśnienia wyselekcjonowane dla uzyskania odpowiedniej wielkości nanocząstek GoHAPmed zestawiono w tabeli poniżej (Tabela 1). Nanocząstki hydroksyapatytu GoHAPmed pogrupowano na Typy, odpowiednio: Typ 1, Typ 2, Typ 3, Typ 4, Typ 5, Typ 6, dla których zastosowano różne parametry hydrotermalnej syntezy mikrofalowej. Zastosowana moc generowana przez reaktor mikrofalowy MSS-4 wynosiła 3 kW dla każdej przeprowadzonej reakcji.

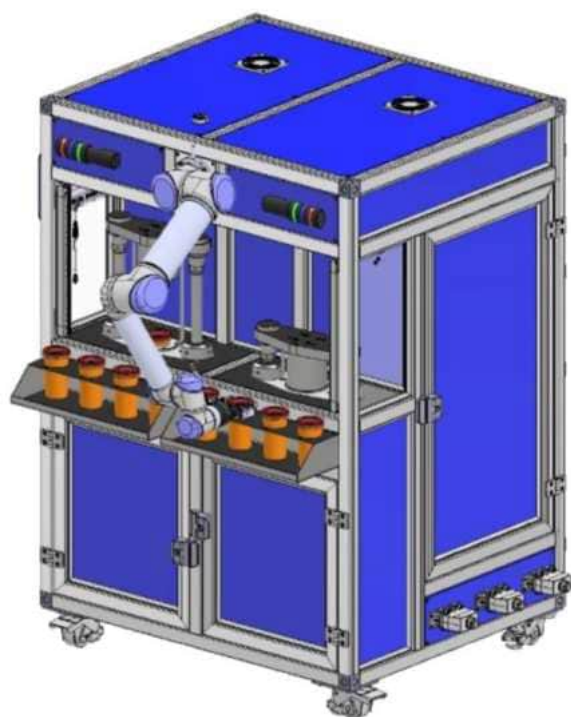
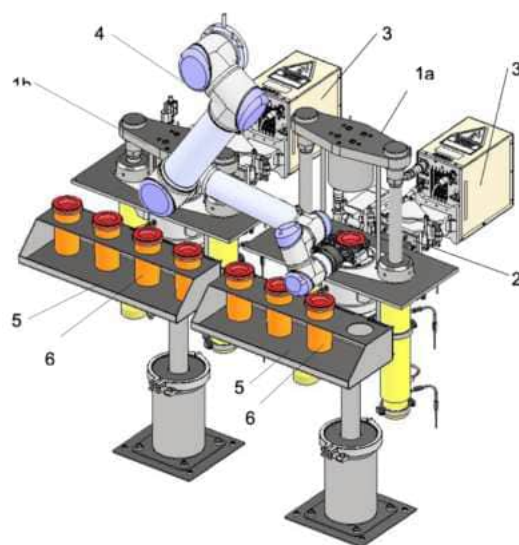
Istotą metody syntezy z wykorzystaniem mikrofal w reaktorze MSS 4 jest:

- Możliwość precyzyjnej regulacji czasu syntezy. Czas nagrzewania i studzenia zawiesiny nanocząstek jest bardzo krótki.
- Możliwość precyzyjnej regulacji ciśnienia i temperatury syntezy. Reaktor wyposażony jest w odpowiednie czujniki i automatyzację.

Dzięki temu, możliwa jest precyzyjna regulacja stopnia krystaliczności wytworzonych nanocząstek HAP oraz ich rozmiaru.

Tabela 1 - Parametry syntezy GoHAPmed - czas syntezy mikrofalowej, ciśnienie, temperatura w komorze reakcyjnej reaktora MSS-4.

GoHAPmed	Czas wygrzewania (s)	Ciśnienie (MPa)	Temperatura (°C)
Typ 1	-	-	-
Typ 2	55	0,02	115
Typ 3	90	0,03	125
Typ 4	600	0,33	130
Typ 5	600	1	175
Typ 6	1200	5	260

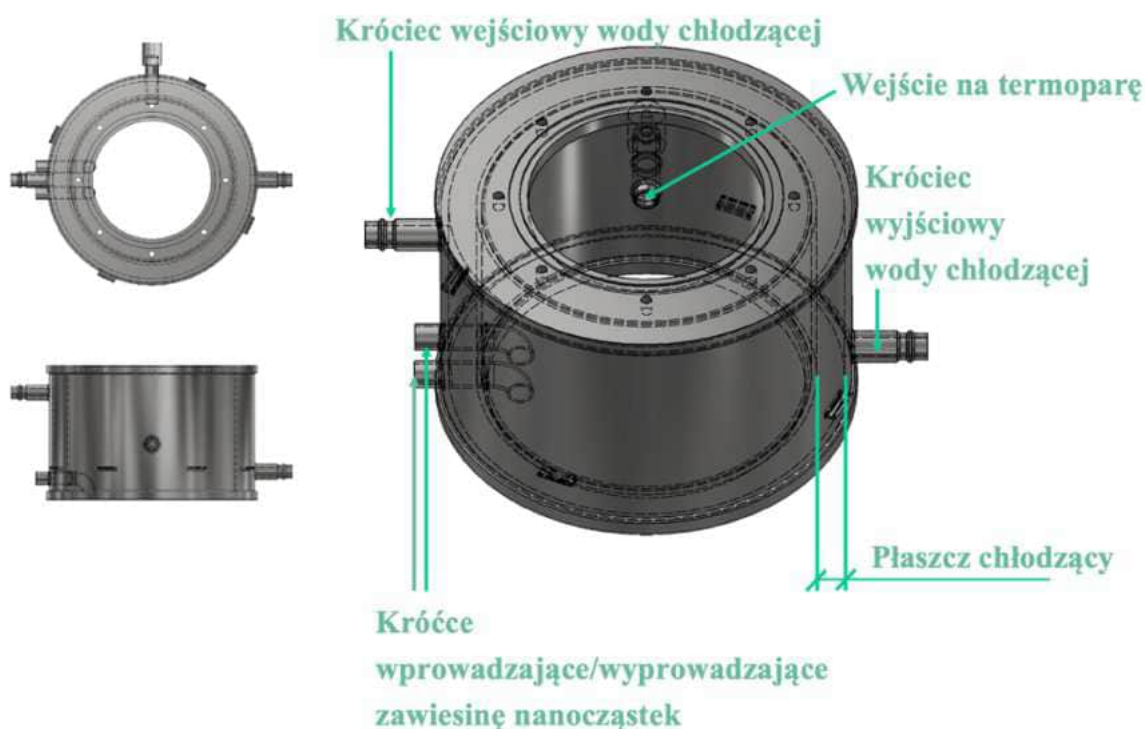
A**B**

Rysunek 6. (A) Rysunek reaktora Mikrofalowego MSS-4; (B) Moduł komór procesowych 1a – kompletny reaktor jednokomorowy (otwarty), 1b kompletny reaktor jednokomorowy (zamknięty), 2 – falowód, 3 – generator mikrofal (magnetron), 4 – sześćoosiowy manipulator uniwersalny UR5e, 5 – czteropozycyjny magazyn, 6 – pojemnik reakcyjny.

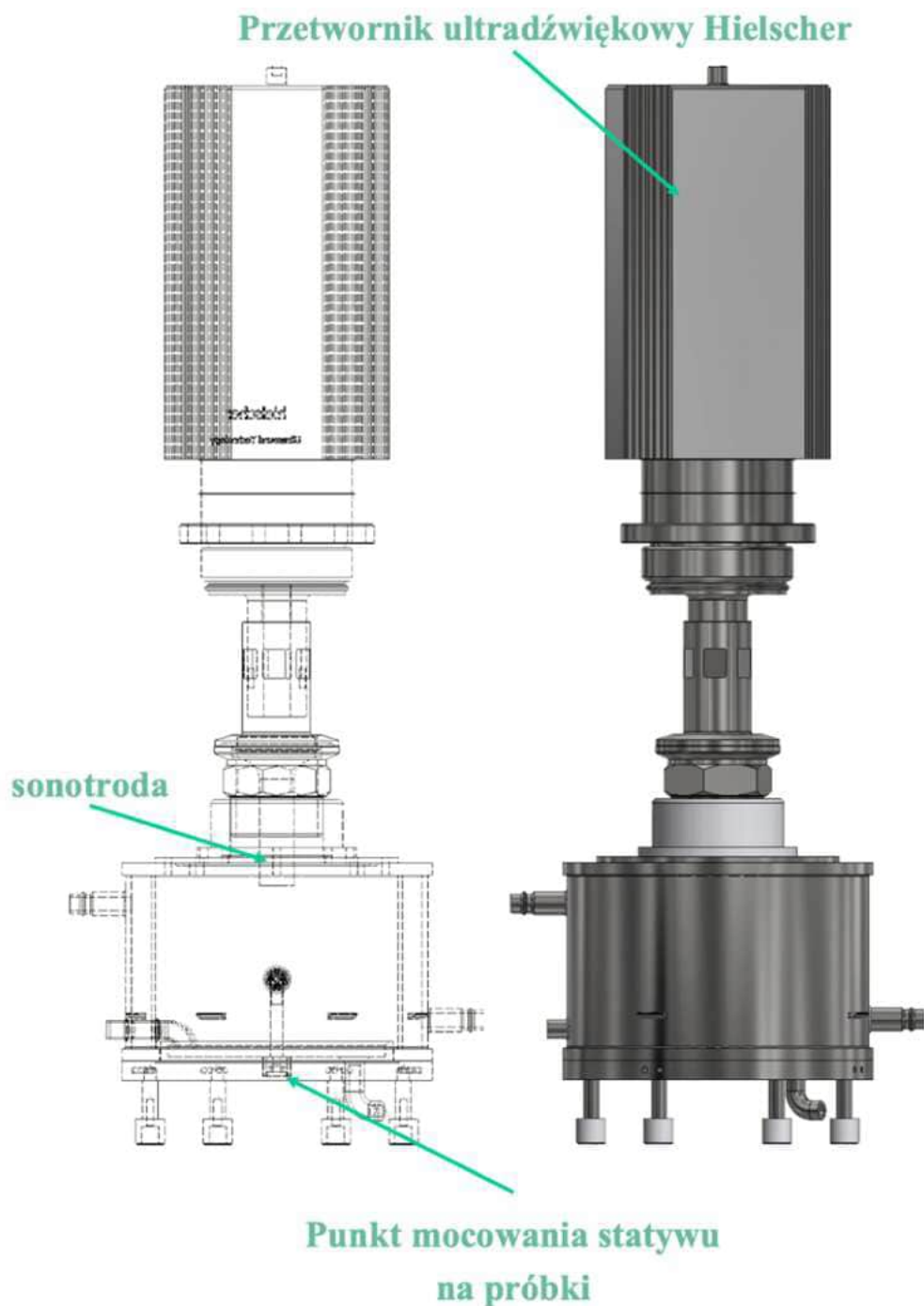
4.2. Ultradźwiękowe osadzanie powłok nanocząstek hydroksyapatytu SonoNanoCoating (SNC)

4.2.1. Budowa stanowiska ultradźwiękowego

Autorka proponuje wprowadzenie nazwy SonoNanoCoating SNC dla opracowanej technologii. W celu zapewnienia odpowiednich warunków procesu SonoNanoCoating oraz powtarzalności osadzania powłok, składających się z nanocząstek hydroksyapatytu zaprojektowano zbiornik, w którym prowadzono proces. Schemat zbiornika przedstawiono na Rysunek 7. Ze względu na nagrzewanie cieczy pod wpływem dostarczanej energii ultradźwiękowej, kluczowym elementem zbiornika jest zastosowany płaszcz chłodzący. Dzięki temu rozwiązaniu możliwe jest utrzymanie temperatury procesu na stałym poziomie. Na podstawie projektu zbiornik został wykonany we współpracy z ITEE w Radomiu. Zbiornik skompletowano i zmontowano z pozostałymi elementami stanowiska do ultradźwiękowego osadzania powłok nanocząstek hydroksyapatytu.



Rysunek 7. Schemat zbiornika do procesu ultradźwiękowego osadzania powłok na powierzchni implantów.



Rysunek 8. Widok zbiornika do procesu ultradźwiękowego osadzania powłok na powierzchni implantów z zamontowanym przetwornikiem ultradźwiękowym Hielscher.

Stanowisko ultradźwiękowego osadzania powłok (Rysunek 10) skompletowano z elementów takich jak: Generator Ultradźwiękowy (Hielscher, UIP500hdT), Przetwornik ultradźwiękowy z głowicą ultradźwiękową z zakończeniem $\phi 16$ (UIP500hdT), zbiornik ultradźwiękowy, pompa perystaltyczna (ISMATEC, BVP), mieszadło magnetyczne (IKA, RCT digital), statyw na próbki (Rysunek 9), agregat chłodzący (Buchi, Recirculating Chiller F-105), czujnik temperatury z termoparą (CENTER, 520 Datalogger Thermometer). Wszystkie elementy

stanowiska zostały zamknięte w komorze dźwiękoszczelnej w celu zapewnienia bezpieczeństwa i higieny pracy operatora. Zastosowanie pompy perystaltycznej w stanowisku ultradźwiękowym pozwalało na powtarzalne wprowadzanie/wyprowadzanie zawiesiny nanocząstek do/z zbiornika oraz ograniczenia prawdopodobieństwa wprowadzenia zanieczyszczeń do procesu. Z kolei punkt mocowania statywu na próbki umożliwił unieruchomienie pokrywanych materiałów. Statywy do unieruchomienia próbek wykonywano z teflonu (PTFE) w celu zapewnienia czystości oraz inertności w stosunku do materiałów, których powierzchnię modyfikowano powłokami nHAP. Przykład statywu przedstawiono na Rysunku 9.



Rysunek 9. Statyw teflonowy do mocowania próbek.



Rysunek 10. Zdjęcie stanowiska ultradźwiękowego.

4.2.2. Osadzanie nano-powłok hydroksyapatytowych metodą SonoNanoCoating.

Po skompletowaniu stanowiska rozpoczęto badania nad osadzaniem powłok nanocząstek hydroksyapatytu na powierzchniach materiałów, popularnie stosowanych jako surowce do wytwarzania implantów ortopedycznych.

Ogólny schemat prowadzenia procesu ultradźwiękowego przebiegał następująco:

1. Uruchomienie i kalibracja generatora ultradźwiękowego.
2. Uruchomienie agregatu chłodzącego i ustalenie temperatury płaszcza wodnego.

3. Podgrzanie zawiesiny nanocząstek na mieszadle magnetycznym do ustalonej temperatury procesu.
4. Umieszczenie próbek implantów na statywie teflonowym, który następnie mocowano w centralnym punkcie zbiornika ultradźwiękowego opisanego w podrozdziale 4.2.2.
5. Dostarczenie do zbiornika zawiesiny nanocząstek za pomocą pomy perystaltycznej.
6. Zanurzenie głowicy ultradźwiękowej w zawieszynie nanocząstek prostopadle do powierzchni implantu, na której osadzano powłokę.
7. Uruchomienie generatora ultradźwięków i dostarczenie energii fal ultradźwiękowych do zawiesiny nanocząstek.
8. Kontrola temperatury płaszcza wodnego w celu utrzymania pożądanej temperatury procesu.
9. Po ustalonym czasie działania ultradźwiękami na powierzchnię implantu zanurzanego w zawieszynie nanocząstek próbki wyjmowano i opłukiwano w 50 ml wody dejonizowanej.
10. Następnie próbki implantów suszono pod komorą laminarną w temperaturze pokojowej.

Proces ultradźwiękowego nanoszenia powłok w celu uzyskania powłok składających się z nHAP o regulowanej wielkości nazwano metodą SonoNanoCoating (SNC).

Autorka pracy opracowała procedury pokrywania powierzchni implantów medycznych warstwą nHAP, zgodnie z wymaganiami normy ISO 13485 dla wyrobów medycznych, które zostały wdrożone w certyfikowanym Systemie Zarządzania Jakością (certyfikat numer PL55499H).

4.2.2.1. Regulacja amplitudy procesu ultradźwiękowego SonoNanoCoating

Parametrem regulowanym w procesie SonoNanoCoating jest amplituda drgań sonotrody. W tej części badań zadaniem było ustalenie amplitudy, przy której proces SonoNanoCoating przebiega najbardziej efektywnie. W badaniach analizy wpływu amplitudy na jakość i efektywność osadzania powłok hydroksyapatytowych zastosowano warianty regulacji amplitudy dostępne w menu generatora ultradźwiękowego, odpowiednio: 50%, 75%, 100%. Amplituda drgań przy ustawieniu 100% wynosi 40 μm , 75% odpowiada amplitudzie drgań 30 μm , a ustawienie 50% odpowiada amplitudzie 20 μm . Jako substrat do osadzania powłok przy wyznaczaniu optymalnej amplitudy zastosowano próbki rusztowania kostnego (PCL 0/90°, MaterialsCare, Warszawa, Polska), wykonane w technice druku 3D z polikaprolaktonu (PCL). W procesie ultradźwiękowym zastosowano zawiesinę wodną

nanocząstek GoHAPmed Typ 3 o koncentracji 0,2% na 50 ml wody dejonizowanej (0,6 μ S). Czas procesu SonoNanoCoating wynosił 15 min, a temperatura 30 °C. Substraty, których powierzchnię modyfikowano zamocowano na statywie teflonowym w odległości 15 mm od sonotrody.

4.2.2.2. Regulacja temperatury procesu ultradźwiękowego SonoNanoCoating

Temperatura zawiesiny, w której zachodzi proces SonoNanoCoating jest ważnym parametrem. Może ona ulegać zmianie, gdyż energia ultradźwięków może podgrzewać zawiesinę. W celu zapewnienia jak największej powtarzalności osadzania powłok temperatura procesu SonoNanoCoating jest stabilizowana dzięki zastosowaniu płaszcza wodnego w konstrukcji zbiornika ultradźwiękowego. W celu doboru optymalnej temperatury procesu SonoNanoCoating przeprowadzono eksperyment, w którym powłokę składającą się z hydroksyapatytu GoHAPmed Typ 3 osadzano z zawiesiny o koncentracji 0,2% w temperaturze 15 °C, 30 °C, 45 °C. Czas procesu SonoNanoCoating wynosił 15 min. Materiałem modyfikowanym były próbki rusztowań kostnych (PCL 0/90°, MaterialsCare, Warszawa, Polska), wykonane w technice druku 3D z polikaprolaktanu (PCL).

4.2.2.3. Regulacja koncentracji nanocząstek w zawiesinie GoHAPmed

Kolejnym zmiennym parametrem procesu jest koncentracja zawiesiny. Zawiesina nanocząstek wykorzystywana jest jako medium ultradźwięków, z którego osadzana jest powłoka. W procesie nazwa ultradźwiękowego osadzania powłok składających się z nanocząstek GoHAPmed Typ 3 zastosowano 4 koncentracje zawiesiny nanocząstek, odpowiednio: (1) 0,005% masy, (2) 0,2 % masy, (3) 0,4% masy, (4) 0,8 % masy. Czas procesu ultradźwiękowego wynosił 15 min. Materiałem modyfikowanym były próbki rusztowań kostnych (PCL 0/90°, MaterialsCare, Warszawa, Polska), wykonane w technice druku 3D z polikaprolaktanu (PCL). Zastosowano wyznaczoną wcześniej amplitudę 75% oraz temperaturę procesu na poziomie 30 ± 2 °C.

4.2.2.4. Wpływ wielkości nanocząstek oraz czasu procesu ultradźwiękowego SonoNanoCoating

W procesie SonoNanoCoating do osadzania powłok hydroksyapatytowych zastosowano 2 rodzaje nanocząstek, odpowiednio: GoHAPmed Typ 3 o średniej wielkości nanocząstek 14 nm oraz GoHAPmed Typ 6 o średniej wielkości nanocząstek 42 nm. Koncentracja nanocząstek w zawiesinach wynosiła 0,2% masy. W procesie SonoNanoCoating zastosowano amplitudę ultradźwięków na poziomie 75% (30 μ m). Temperatura procesu wynosiła 30 ± 2 °C. Proces prowadzono w określonych odstępach czasowych, odpowiednio: 1, 4, 6, 8 minut. Materiałem, na który nanoszono powłoki GoHAPmed była pastylka PCL o średnicy ok. 10 mm o grubości ok. 0,5 mm.

Pastylki wykonano przy użyciu granulowanego PCL ((C₆H₁₀O₂)_n, Sigma Aldrich). Granulki PCL umieszczano na szkiełku nakrywkowym (22x22 mm, Delta Do-4222), które podgrzewano do temperatury 130 °C. Granulki podgrzewano na płycie grzewczej mieszadła magnetycznego (Sunlab, SU1350) do momentu zeszklenia, a następnie prasowano od góry szkiełkiem nakrywkowym do uzyskania pożądanego kształtu. Z kolei szkiełka chłodzono poprzez umieszczenie ich w wodzie dejonizowanej i suszono pod komorą laminarną (BIOAIR, Safeflow 1.2).

4.2.2.5. Metoda SonoNanoCoating – jako uniwersalna metoda modyfikacji powierzchni materiałów.

W poprzednim rozdziale opisano metodykę dobru podstawowych parametrów metody SonoNanoCoating. Parametry takie jak amplituda ultradźwięków (30 μ m), temperatura zawiesiny (30 ± 2 °C), odległość amplitudy od podłoża (15 mm) ustalono jako parametry stałe. Parametry zmienne to koncentracja i wielkość nanocząstek w zawieszynie oraz rodzaj podłoża, na które osadzano nano-powłoki. W tym rozdziale omówiono metodykę osadzania nano-powłok na różnego rodzaju podłoża, co miało na celu optymalizację parametrów zmiennych metody SonoNanoCoating oraz wykazanie niezależności jej działania od rodzaju podłoża poddawanego modyfikacji powierzchniowej.

4.2.2.5.1. Modyfikacja powierzchni płaskich podłoży tytanu grade 2.

W pierwszym etapie metodą SonoNanoCoating osadzano hydroksyapatyt GoHAPmed o różnych wielkościach (Typ 1 – Typ 6, Tabela 5) nanocząstek na powierzchni tytanu (Tytan Grade 2, Bibus Metals Sp. z o.o., Dąbrowa, Polska). W celu przygotowania podłoży tytanowych wykorzystano arkusz blachy tytanu grade 2 walcowany na gorąco do grubości 2 mm. Arkusz tytanu pocięto na próbki podłoży tytanowych o wymiarze 9 x 12 mm. Na podłożach tytanowych osadzano powłoki hydroksyapatytowe stosując regulowany czas procesu ultradźwiękowego, odpowiednio: 1 min, 3 min, 6 min, 9 min. Amplituda ultradźwięków wynosiła 30 μ m. Zastosowano koncentrację zawiesin na poziomie 0,2% masy. Odległość próbki od sonotrody wynosiła 15 mm. Temperaturę procesu ustabilizowano na poziomie 30 ± 2 °C.

4.2.2.5.2. Modyfikacja powierzchni płaskich podłoży PEEK.

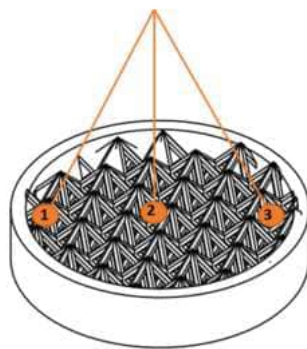
W drugim etapie osadzano powłoki na powierzchniach podłoży polimerowych wytworzonych z polieteroeteroketonu (PEEK). Polimer zakupiono w formie arkuszy o grubości 2 mm (Zero Engineering Plastic Co., Ltd, Chiny), które pocięto na próbki podłoży o wymiarach 9 x 12 mm. Zastosowano identyczne warunki procesu ultradźwiękowego, jak w przypadku modyfikacji powierzchni podłoży tytanu grade 2 (podrozdział 4.2.2.5.1.).

4.2.2.5.3. Modyfikacja powierzchni podłoży tytanowych drukowanych 3D.

W kolejnym etapie zastosowano analogiczne warunki procesu ultradźwiękowego do nanoszenia powłok hydroksyapatytowych na krążkach tytanowych drukowanych 3D (Ti 3D) o specjalnej strukturze imitującej powierzchnię implantu kręgosłupa (Syntropiq, Czechy). Krążki wydrukowano 3D w technologii addytywnej PBF (ang. Powder Bed Fusion) ze stopu Ti64ELI, który jest dobrze znanym, lekkim stopem o bardzo dobrych właściwościach mechanicznych, charakteryzuje się dobrą odpornością na korozję oraz biokompatybilnością.

Jakość pokryć weryfikowano za pomocą Skaningowej Mikroskopii Elektronowej (SEM). Dla każdego typu próbek wykonano obrazowanie SEM w co najmniej trzech punktach implantu – góra, środek, dół. Schemat miejsc obrazowania zaznaczono na rysunku poniżej.

obrazowanie SEM



Rysunek 11. Schemat podłoża Ti 3D wraz z punktami obrazowania SEM.

4.2.2.5.4. Modyfikacja powierzchni implantów kręgosłupowych oraz śrub mocujących.

Powłoki hydroksyapatytowe na powierzchnię implantów oraz śrub mocujących nanoszono metodą ultradźwiękową z zawiesiny nanocząstek o koncentracji 0,2%. Amplituda ultradźwięków wynosiła 30 μm . Odległość implantu od sonotrody wynosiła 15 mm. Temperaturę procesu ustabilizowano na poziomie 30 ± 2 °C. Czas prowadzenia procesu ultradźwiękowego dobrano na podstawie poprzednich badań i zróżnicowano pod względem typu zastosowanego hydroksyapatytu GoHAPmed, odpowiednio: 1 min dla Typu 1 i Typu 3, 3 min dla Typu 4 i Typu 5, 6 min dla Typu 6.

4.2.2.5.5. Modyfikacja powierzchni implantów sztucznego więzadła krzyżowego.

Powierzchnia sztucznych więzadeł krzyżowych dostarczonych przez firmę Ortholigaments sp. z o.o. została zmodyfikowana powłokami GoHAPmed Typ 3. Więzadła umieszczono w statywie teflonowym z uszczelnieniem części śródstawowej więzadła. Powłoki nanoszono w zawieszynie wodnej nanocząstek GoHAPmed Typ 3 o koncentracji 0,05%. Proces ultradźwiękowy prowadzono przez 10 minut w odległości ok. 15 mm od powierzchni więzadła. Temperaturę procesu ustabilizowano na poziomie 30 ± 2 °C.

4.2.2.5.6. Modyfikacja powierzchni rusztowań kompozytowych (PCL/HAP/TCP) powłoką GoHAPmed Typ 3.

Rusztowania kostne wykonane w technice druku 3D z kompozytu PCL/HAP/TCP przekazane w ramach projektu iTE - Metoda leczenia dużych ubytków tkanki kostnej u chorych onkologicznych przez z wykorzystaniem inżynierii tkankowej in vivo, Nr projektu: STRATEGMED3/306888/3/NCBR/2017 przez mgr inż. Żanetę Górecką czyszczono przy użyciu łaźni ultradźwiękowej (Elma Transsonic T 460-H) w mieszaninie wody destylowanej

(przewodność właściwa $<0,1\text{ S/cm}$, HLP 20UV, Hydrolab, Polska) i etanolu (Chempur, Polska) przez 15 minut. Następnie rusztowania wysuszono pod próżnią w suszarce próżniowej (Goldbrun 450) w temperaturze 35°C . Powłoki osadzano metodą ultradźwiękową z zawiesiny nanocząstek GoHAPmed Typ 3 o koncentracji 0,4%. Podłoża mocowano w teflonowym uchwycie i zanurzano w zawiesinie. Ultradźwięki były generowane przez głowicę ultradźwiękową $\varnothing 18\text{ mm}$ (Hielscher UIP500hdT) zanurzoną w zawiesinie 15 mm nad powierzchnią rusztowań. Temperatura procesu została ustabilizowana na poziomie 30°C . Czas trwania prowadzenia procesu ultradźwiękowego wynosił 5 minut. Po procesie ultradźwiękowego osadzania powłok rusztowania kostne płukano w wodzie destylowanej i suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 35°C .

4.3. Metody charakteryzacji

4.3.1 Charakteryzacja nanocząstek

Charakteryzację nanocząstek przeprowadzono w akredytowanym w zakresie nr AB 1503 Laboratorium Nanostruktur Instytutu Wysokich Ciśnień PAN z uwzględnieniem wymagań normy ISO 17025 przeznaczonej dla laboratoriów badawczych.

4.3.1.1. Dyfrakcja rentgenowska (XRD)

Czystość fazy, wielkość ziarna i dyspersję wielkości cząstek określono za pomocą dyfrakcji rentgenowskiej (XRD). Dane dyfrakcyjne proszków zostały zebrane za pomocą dyfraktometru PANalytical X'Pert Pro przy użyciu monochromatycznego promieniowania Cu K α 1 i detektora PIXcel. Zakres pomiarowy kąta 2 Theta wynosił 10-100°, a krok 0,03°. Wzór Scherrera, FW15/45M [257] oraz aplikacja internetowa Nanopowder XRD Processor Demo zostały wykorzystane do określenia średniego rozmiaru krystalitów [258,259] oraz funkcji rozkładu wielkości krystalitów.

Rozkład wielkości krystalitów uzyskano poprzez analizę profili linii dyfrakcyjnych zgodnie ze wzorami podanymi w [259]. Ponieważ kształt krystalitów okazał się znacznie anizotropowy, ich długość i szerokość określono niezależnie poprzez analizę odpowiednio odbić Bragga 002 i 030.

4.3.1.2. Analiza gęstości, powierzchni właściwej (SSA) i całkowitej objętości porów (TPV)

Powierzchnia właściwa (SSA) wraz z całkowitą objętością porów (TPV) GoHAPmed została określona przy użyciu metody adsorpcji BET (Brunauer-Emmett-Teller), zgodnie z normą ISO 9277:2010. W badaniach wykorzystano analizator powierzchni 3Flex firmy Micromeritics. Jako adsorbat zastosowano azot klasy 6.0 (Messer Polska). Gęstość szkieletowa próbek została zmierzona za pomocą piknometru helowego AccuPyc II 1340 firmy Micromeritics, zgodnie z normą ISO 12154:2014. Przed pomiarami powierzchni właściwej (SSA) i gęstości, GoHAPTM został odzyskany w stacji desorpcji (Micromeritics, Smart VacPrep) w temperaturze 150°C przez 3h. Na podstawie eksperymentalnie wyznaczonej powierzchni właściwej (SSA) i gęstości szkieletowej (DEN) obliczono średnicę średnią GoHAPmed, znanej również jako średnica zastępcza według Sautera (SMD), używając równania (1), przy założeniu kształtu sferycznego.

$$\text{SMD} = \frac{A}{\text{SSA} \cdot 10^{18} \cdot \text{DEN} \cdot 10^{-21}} \text{ (nm)} \quad (1)$$

gdzie:

SMD – Średnica zastępcza, tj. długość hipotetycznej średnicy elementu niekulistego opisująca jego rozmiar (nm);

A – współczynnik kształtu, dla kuli równy 6;

SSA – Powierzchnia właściwa (m²/g);

DEN – gęstość (g/cm³).

4.3.1.3. Uwalnianie jonów Ca²⁺ z nanocząstek GoHAP

Technika ICP-OES została wykorzystana do określenia ilości uwolnionych jonów Ca²⁺ z nanocząstek hydroksyapatytu GoHAP o różnej wielkości. Pomiary przeprowadzono przy użyciu optycznej spektrometrii emisyjnej z plazmą indukcyjnie sprzężoną (ICP-OES) z indukcją w plazmie argonowej (Thermo Scientific, iCAP 6000series, Wielka Brytania). W obu przypadkach zastosowano różne techniki przygotowania próbek.

Aby określić ilość jonów Ca²⁺ uwolnionych w teście uwalniania jonów, 57 nanocząstki suszono przez 12 godzin w temperaturze (100 ± 2°C). Następnie odważono 0,1 g każdego rodzaju proszku i dodano pipetą 20 ml roztworu soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS) o pH = 7,4 ± 0,1 (Sigma Aldrich). Zamknięte próbki umieszczono w łaźni wodnej (BUCHI, Heating Bath B-491) w temperaturze 37 ± 1°C z wytrząsaniem w ruchu wzdłużnym z częstotliwością 2 Hz. Analizy stężenia jonów techniką ICP przeprowadzono w dniach: 1, 3, 7, 9, 14. Dla każdego punktu czasowego przeprowadzono analizy 2 próbek każdego typu.

4.3.1.4. Badanie pH roztworów PBS i SBF

Analizę pH roztworów PBS (Phosphate Buffered Saline) wykonano przy użyciu PH metru (SevenExcellence, Multiparameter, Mettler Toledo, Warszawa, Polska). Do urządzenia zamontowano elektrodę pH InLab Expert Pro-ISM z wbudowanym czujnikiem temperatury. Temperaturę buforów utrzymywano na poziomie 35 °C za pomocą podgrzewacza elektrycznego (babyono, Natural Nursing). Elektrodę pH skalibrowano za pomocą buforów technicznych Mettler Toledo w trzech punktach pH, odpowiednio: 4,03; 7,00; 9,01. Pomiaru dokonywano poprzez zanurzenie elektrody w roztworach PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma Aldrich) oraz SBF z protokołu opisanego w normie ISO 10993-15. Po każdym pomiarze

elektrodę opłukiwano wodą dejonizowaną o przewodności 0,06 μS oczyszczanej w podwójnym systemie dejonizacji (dejonizator HLP 20UV, Hydrolab, Straszyn, Polska oraz Ultra Toc/UV/UF, Hydrolab, Straszyn, Polska).

4.3.2. Charakteryzacja powłok hydroksyapatytowych

4.3.2.1. Obrazowanie SEM oraz analiza pierwiastkowa EDS

Obrazowanie wykonano przy użyciu Skaningowego Mikroskopu Elektronowego (SEM) (Ultra Plus, Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Niemcy) przy użyciu detektora wewnątrz kolumnowego InLens. Analiza pierwiastkowa została wykonana przy użyciu dodatkowego sprzętu mikroskopowego – systemu mikroanalizy spektroskopii rentgenowskiej z dyspersją energii (EDS) (Bruker, Quantax 400 z ultraszybkim detektorem o rozdzielczości energetycznej 127 eV i powierzchni aktywnej 30 mm²).

Grubość powłoki obrazowano na przełomach próbek polimerowych. Przełomy płaskich próbek wykonywano poprzez nacięcie skalpelem spodu próbki linii ułatwiającej przełamanie jej a następnie zanurzenie próbki w ciekłym azocie (Messer Polska) na ok. 1 min. Mrożenie ciekłym azotem zastosowano w celu zapobiegnięcia ciągnięcia się polimeru, podczas którego dochodzi do uszkodzenia powłoki w trakcie przełamywania próbki. Po tym czasie zmrożoną próbkę przełamywano wzdłuż linii nacięcia.

4.3.2.2. Pomiar jonów PO_4^{3-}

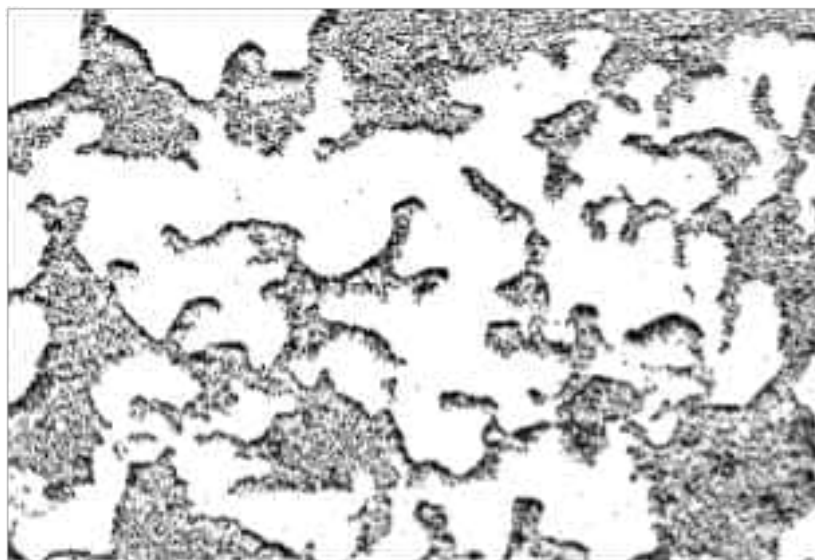
Pomiar jonów PO_4^{3-} wykonywano za pomocą spektrofotometru (DR3900, Hach Lange, Colorado USA). Do pomiaru zastosowano program 490 P React. PP zaprojektowany przez producenta. Procedura pomiaru polegała na umieszczeniu 10 ml próbki analizowanej oraz dodaniu odczynnika PhosVer 3 Phosphate Reagent Powder Cell, a następnie wstrząsaniu kuwety przez 30 s w celu dobrego rozpuszczenia odczynnika. Następnie kuwetę umieszczano w komorze pomiarowej spektrofotometru i rozpoczynano pomiar. Po zakończeniu pomiaru właściwego wykonywano ślepą próbę w celu uwzględnienia obecności analitu w używanych odczynnikach.

Próbki do pomiaru przygotowywano poprzez rozpuszczanie powłok hydroksyapatytowych w 0,1 M kwasie solnym (HCL). W plastikowym pojemniku typu moczówka o pojemności 50 ml umieszczano próbkę a następnie dolewano 20 ml 0,1 M HCL. Pojemnik szczelnie zamykano i umieszczano na wstrząsarce na 24 h. Po tym czasie

wyjmowano próbkę z roztworu, a roztwór analizowano na spektrofotometrze. Dla każdej próbki przeprowadzono min. 3 pomiary spektrofotometryczne. Na podstawie zawartości jonów PO_4^{3-} wyznaczono ilość GoHAPmed, która przeszła do roztworu wyniku rozpuszczenia powłoki. W tym celu obliczono masę atomową cząsteczki hydroksyapatytu, $M \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 = 1011,84$ następnie obliczono masę atomową grup $(\text{PO}_4)_6 = 569,82$ i wyznaczono iloraz zawartości jonów od udziału masy atomowej jonów PO_4^{3-} w masie atomowej cząsteczki hydroksyapatytu.

4.3.2.3. Analiza obrazów SEM

Analizę obrazów SEM wykonywano w programie ImageJ. Powierzchnię pokrycia próbek płaskich analizowano poprzez użycie funkcji Adjust następnie Treshold. Co pozwala na uzyskanie czarno-białego obrazu rozróżniającego powierzchnię materiału modyfikowanego od nanocząstek osadzonych na jej powierzchni metodą ultradźwiękową (Rysunek 12).



Rysunek 12. Przykładowy obraz uzyskany na podstawie analizy obrazu SEM uzyskany w celu analizy stopnia pokrycia powierzchni płaskiej pastylki PCL.

Następnie zastosowano funkcję Fill Holes, w tym kroku powierzchnia, która nie została odpowiednia zaznaczona w poprzedniej funkcji jest wypełniana. Kolejno zastosowano funkcję Measure w menu Analize. Zastosowanie tej funkcji pozwoliło na obliczenie procentowego stopnia pokrycia powierzchni na podstawie obrazu SEM, wynik z analizowanego obrazu w postaci tabeli zapisywany jest w sekcji Results. Analizę obrazy przeprowadzano dla co najmniej 20 zdjęć SEM danej próbki.

4.3.2.4. Pomiar kąta zwilżania powierzchni

Pomiaru kąta zwilżania dokonano poprzez umieszczenie kropli wody dejonizowanej o przewodności 0,2 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (HLP 20UV, Hydrolab, Polska) na powierzchni materiału. Kształt kropli był rejestrowany bezpośrednio przez kamerę cyfrową i przetwarzany za pomocą programu komputerowego Krüss ADVANCE (Krüss, Niemcy). Pomiary powtórzono trzykrotnie dla każdej próbki. Obliczono wartości średnie i odchylenia standardowe (SD).

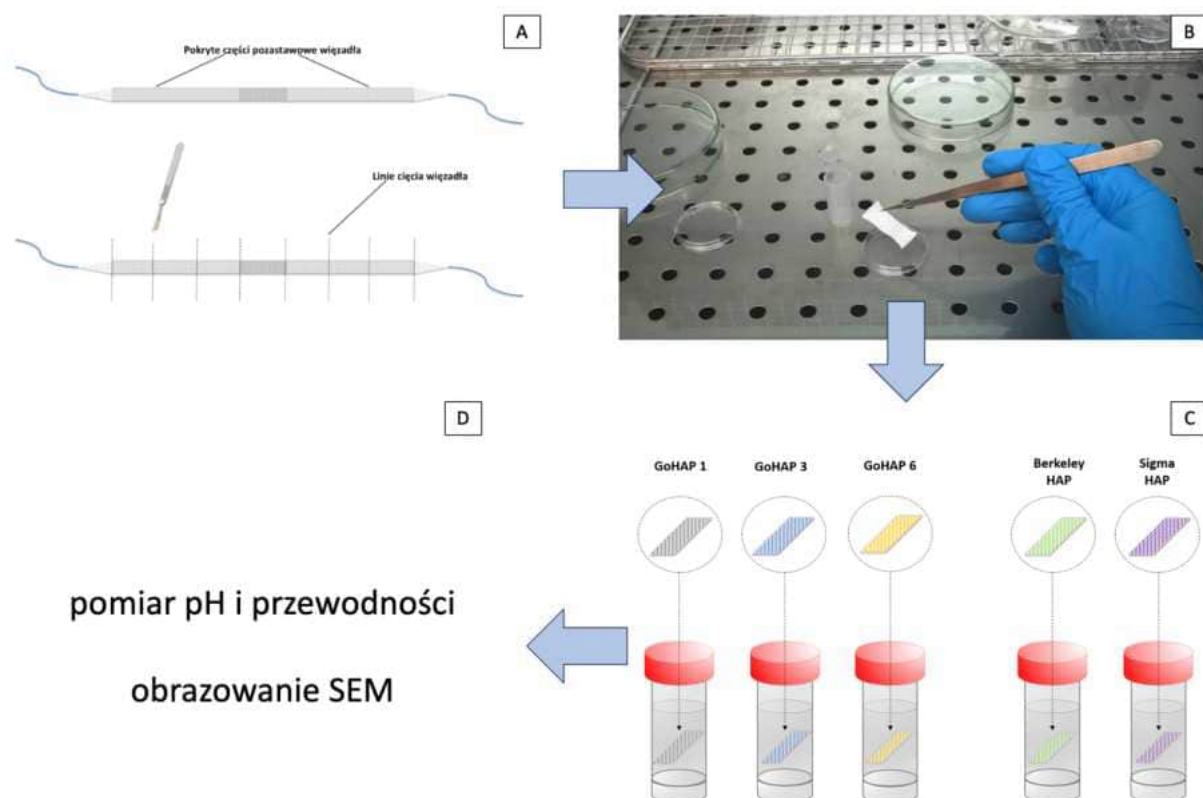
4.3.2.5. Badanie degradacji powłok hydroksyapatytowych

Badania degradacji przeprowadzono poprzez umieszczenie próbek materiałów w mediach buforowych, tj. roztworze soli fizjologicznej (Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7,2 – 7,4, Merck Life Science Sp. z o.o., Polska) oraz roztworze symulującym osocze (Simulated Body Fluid (SBF)). PBS to roztwór buforowy powszechnie stosowany w badaniach biologicznych. Stężenie jonów oraz ciśnienie osmotyczne tego roztworu buforowego jest porównywalne do tego, jakie panuje w ludzkich płynach ustrojowych. Ze względu na brak toksyczności dla żywych komórek oraz izotoniczność roztworu jest buforem powszechnie wykorzystywanym w wielu analizach biologicznych. SBF jest roztworem symulującym płyny ustrojowe organizmu ludzkiego o stężeniu jonów zbliżonym do osocza krwi (Tabela 2). Stosowany jest do projektowania i oceny bioaktywności materiałów stosowanych szczególnie do regeneracji tkanki kostnej. Test degradacji w płynie SBF pozwala zasymulować późniejszą bioaktywność materiału w stosunku do kości w środowisku *in vivo*. Protokół z przygotowania roztworu buforowego SBF przeprowadzono zgodnie z normą ISO 10993-15.

Tabela 2. Stężenie jonów w osoczu krwi ludzkiej, SBF i PBS.

Nazwa jonu	Stężenie mmol/L		
	Osocze ludzkie	SBF	PBS
Na ⁺	142,0	142,0	145,0
K ⁺	5,0	5,0	4,2
Mg ²⁺	1,5	1,5	0,49
Ca ²⁺	2,5	2,5	0,91
Cl ⁻	103,0	147,8	143,0
HCO ³⁻	27,0	4,2	----
HPO ₄ ²⁻	1,0	1,0	9,6
SO ₄ ²⁻	0,5	0,5	----
Wartość pH	7,2-7,4	7,4	7,4

Schemat przygotowania próbek przedstawiono na Rysunku 13. Próbkę materiału do badań zostały wykonane z implantu więzadła, na którego powierzchni osadzono powłoki GoHAPmed Typ 3. Więzadła składające się z mikrometrycznych włókien polimeru UHMPE pociętego skalpelem na fragmenty długości 3 cm. Próbkę więzadeł umieszczano w 20 ml roztworów buforowych, odpowiednio SBF oraz PBS w pojemnikach polipropylenowych o objętości 50 ml. Następnie pojemniki umieszczono na w temperaturze 37°C w cieplarni (Q-Cell, Pol-lab, Polska) wytrząsarce (SU1020, Sunlab Instruments, Niemcy) z wytrząsaniem ustawionym na 100 obrotów/minuta. Zbadano pH (zgodnie z podrozdziałem 3.3.4.) oraz przewodność roztworów buforowych, w których prowadzono degradację. Każdą próbkę po wyjęciu z medium delikatnie opłukano wodą dejonizowaną oraz suszono w komorze laminarnej (BIOAIR, Safeflow 1.2) przez 24h. Po wysuszeniu próbek przeprowadzono obserwacje SEM (zgodnie z podrozdziałem 4.3.8.).



Rysunek 13. Schemat przygotowania próbek więzadeł UHMWPE do badań degradacji powłok hydroksyapatytowych na ich powierzchni.

4.3.2.6. Pomiar adhezji przy pomocy scratch test z zastosowaniem AFM

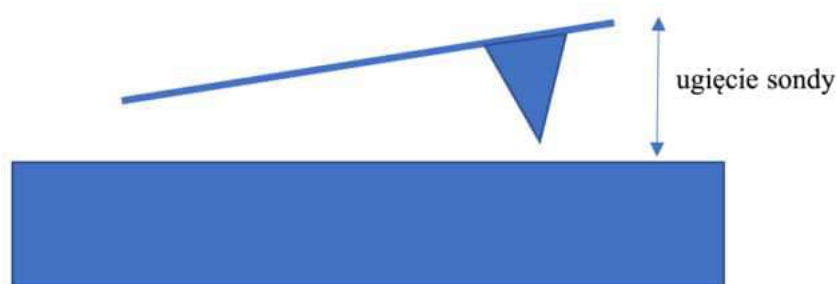
Pomiar siły adhezji nanocząstek GoHAPmed przy pomocy scratch test wykonywano z zastosowaniem mikroskopu sił atomowych AFM. Scratch testom poddano dwa rodzaje próbek. Pierwszy rodzaj - jednorodne powłoki wytworzone z zastosowaniem metody ultradźwiękowej prowadzonej w zoptymalizowanym czasie, odpowiednio 1 min – GoHAPmed Typ 1, 3 min – GoHAPmed Typ 3, 3 min – GoHAPmed Typ 4, 6 min – GoHAPmed Typ 5, 6 min – GoHAPmed Typ 6 dla powłok osadzanych na podłożach tytanowych grade 2 oraz 3 min dla wszystkich rodzajów nanocząstek GoHAPmed nanoszonych na podłoża PEEK. Drugi rodzaj – pojedyncze aglomeraty nanocząstek naniesione na podłoża w czasie 20 s procesu ultradźwiękowego. Do pomiaru wykorzystano mikroskop sił atomowych (AFM) Asylum Research/Oxford Instruments MFP 3Dbio AFM z zastosowaniem sondy ATEC-NC o dużej stałej sprężystości oraz o dłuższym ostrzu pomiarowym (ang. tip). Dane opisujące sondę zestawiono poniżej (Tabela 3). Ponadto ten sam mikroskop AFM wykorzystano do pomiarów chropowatości powierzchni w/w podłoża.

Tabela 3. Parametry sondy ATEC-NC, dane producenta.

Cecha:	Wartość nominalna	Typowy zakres
Częstotliwość rezonansowa [kHz]	335	210 - 490
Stała sprężystości [N/m]	45	12 - 110
Długość [μm]	160	150 - 170
Szerokość [μm]	45	40 - 50
Grubość [μm]	4.6	3.6 - 5.6

Sondy przed pomiarem kalibrowano metodą drgań termalnych wedle algorytmu zaimplementowanego w oprogramowaniu mikroskopu zgodnie z procedurą proponowaną przez producenta mikroskopu. Zadrapanie wykonywano w kierunku prostopadłym do sondy, a pomiarowi podlegało ugięcie w płaszczyźnie sondy (z ang. deflection (V)). Na podstawie kalibracji oraz pomiarowi deflection obliczono nacisk sondy na próbkę. Pomiar polegał na wykonaniu zadrapania o długości ok. 15 mikrometrów z liniowo narastającym obciążeniem od ok 0 do maksymalnej wartości dostępnej dla urządzenia. Maksymalne obciążenie ustalono na 9 V dla bezpieczeństwa (obciążenie maksymalne to 10 V). W każdym obrazowanym miejscu wykonano dwa lub 3 zarysowania o zwiększającym napięciu od 0,1 do 9V. Podczas przemieszczania się do nowego miejsca nacisk ustawiono na 0,1 V, aby uniknąć dodatkowego niszczenia sondy oraz próbki. Urządzenie podaje odchylenie w formie napięcia V zmierzonego na czujniku (deflection). Właściwą siłę przeliczono na podstawie stałej sprężystości sondy (k) oraz stałej kalibracji INVOLS zgodnie z równaniem 2.

$$F = k \cdot \text{INVOLS} \cdot \text{deflection} \quad (2)$$



Rysunek 14. Schemat ugięcia sondy pod wpływem nacisku na powierzchnię podłoża.

W przypadku pomiarów wykonanych dla położy, których powierzchnię modyfikowano jednorodnymi powłokami GoHAPmed podana została wartość krytyczna (z ang. Critical load (LC)), przy której następował gwałtowny wzrost indentacji. A także podano maksymalną indentację (z ang. Max indentation).

W przypadku pojedynczych aglomeratów nanocząstek naniesionych na podłoża celem było wyznaczenie adhezji nanocząstek po podłoża tytanu grade 2. Podczas tego eksperymentu wykorzystano możliwość AFM do skanowania powierzchni w kierunku prostopadłym do dłuższej osi sondy. Podobnie jak w przypadku pierwszej części, tutaj napięcie na fotodiodzie nazywa się napięciem poprzecznym (Lateral voltage) znając wielkość napięcia oraz ustalając czułość diody na wychylenie poprzeczne (Lateral INVOLS) możliwe jest określenie kąta wychylenia dźwigienki. Znając stałą sprężystości poprzeczną oraz czułość możliwe jest wyznaczenie siły, która działa na dźwigienkę. Siłę adhezji nanocząstek wyznaczono analizując zebrane przez urządzenie wartości napięcia skrętnego a następnie obliczono siłę wykorzystując prawo Hooke'a:

$$F = \alpha V \quad (3)$$

Gdzie: α jest tożsame z wychyleniem poprzecznym (Lateral INVOLS), a V jest zmierzonym napięciem wynikającym ze skręcenia belki.

4.3.2.7. Ocena żywotności osteoblastów na podłożach Ti 3D, których powierzchnię modyfikowano powłokami hydroksyapatytowymi.

Eksperyment przeprowadzono przy użyciu normalnych płodowych osteoblastów hFOB 1.19 (ATCC CRL-11372TM). Komórki hodowano zgodnie z zaleceniami producenta. W celu oceny żywotności komórek w bezpośrednim kontakcie z biomateriałami (podłoża Ti 3D modyfikowane powłokami GoHAPmed Typ 1, GoHAPmed Typ 3, GoHAPmed Typ 6, HA Biocer). Komórki hFOB 1.19 wysiano na badane podłoże w stężeniu 1×10^5 komórek/próbkę. Komórki hodowano na biomateriałach przez 24 godziny. Po tym czasie osteoblasty barwiono zestawem do podwójnego barwienia żywych/martwych komórek (Sigma-Aldrich). Komórki obserwowano pod konfokalnym laserowym mikroskopem skaningowym (Olympus Fluoview wyposażony w FV 1000). Komórki były żywe, gdy emitowały zieloną fluorescencję, podczas gdy martwe komórki dawały czerwoną fluorescencję.

4.3.2.8. Ocena proliferacji osteoblastów.

Eksperyment przeprowadzono przy użyciu normalnych płodowych osteoblastów - komórek hFOB 1.19 (ATCC CRL-11372TM). Komórki hodowano zgodnie z zaleceniami producenta. W celu oceny żywotności komórek w bezpośrednim kontakcie z biomateriałami (podłoża TI 3D modyfikowane powłokami GoHAPmed Typ 1, GoHAPmed Typ 3, GoHAPmed Typ 6, HA Biocer), komórki hFOB 1.19 wysiano na próbki w stężeniu 5×10^4 komórek/próbkę. Komórki hodowano na biomateriałach przez 3 i 5 dni. Po upływie czasu inkubacji, aktywność metaboliczna komórek - która jest proporcjonalna do liczby komórek - została oceniona za pomocą testu WST-8 (Sigma-Aldrich). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą jednokierunkowego testu ANOVA, a następnie porównania wielokrotnego Tukeya, a istotne różnice uznano, gdy $p < 0,05$ (oprogramowanie GraphPad Prism 5, wersja 5.04). Ponadto, ponieważ WST-8 nie jest toksyczny dla komórek, te same próbki poddano barwieniu jąder komórkowych przy użyciu Hoechst 33341 (Sigma-Aldrich) i filamentów cytoszkieletu przy użyciu AlexaFluorTM635 Phalloidin (ThermoFisher Scientific). Komórki obserwowano pod konfokalnym laserowym mikroskopem skaningowym (Olympus Fluoview wyposażony w FV 1000). Niebieska fluorescencja pochodziła z jąder, podczas gdy czerwona fluorescencja była emitowana przez filamenty cytoszkieletu.

4.3.2.9. Ocena żywotności oraz efektywności zasiedlenia kompozytowych rusztowań kostnych modyfikowanych powłoką GoHAPmed Typ 3 przez komórki macierzyste.

Ocenę żywotności i efektywności zasiedlenia przez komórki macierzyste z ang. mesenchymal stem cells (MSC) wykonano na rusztowaniach kostnych wytworzonych metodą druku 3D z kompozytu PCL/HAP/TCP w stosunku 9:4.5:4.5. Rusztowanie kompozytowe PCL/HAP/TCP modyfikowano powłoką GoHAPmed Typ 3. Sposób wytworzenia rusztowań kostnych opisano w literaturze [260,260,261,262]. Rusztowania po produkcji czyszczono w płuczce ultradźwiękowej (Elma Transsonic T 460-H), w mieszaninie wody destylowanej (przewodność właściwa $<0,1 \text{ S/cm}$, HLP 20UV, Hydrolab, Polska) i etanolu (Chempur, Polska) przez 15 minut. Następnie rusztowania wysuszono pod próżnią w suszarce próżniowej (Goldbrun 450) w temperaturze 35°C . Powłoki GoHAPmed Typ 3 na rusztowaniach osadzono metodą ultradźwiękową. Osadzanie powłok hydroksyapatytu przeprowadzono w zawiesinie wodnej o koncentracji nanocząstek 0,4%. Podłoża mocowano w teflonowym uchwycie i zanurzano w zawiesinie. Ultradźwięki były generowane przez głowicę ultradźwiękową $\varnothing 18 \text{ mm}$ (Hielscher UIP500hdT) zanurzoną w zawiesinie 10 mm nad powierzchnią rusztowań.

Temperatura procesu została ustabilizowana na poziomie 30°C. Czas trwania powlekania ustalono na 5 minut. Po powlekanii podłoża płukano w wodzie destylowanej i suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 35°C. Rusztowania kostne umieszczono w płytkach wielodołkowych (96 dołków). Na rusztowaniach hodowano komórki MSC, pozyskane ze szpiku kostnego owcy, w gęstości $1 \cdot 10^5$ komórek/ml. MSC pozyskane ze szpiku owcy charakteryzuje ekspresja markerów CD73, CD90 i CD105 specyficznych dla naive MSC oraz brak ekspresji antygenów obecnych na komórkach hematopoetycznych CD34, CD45, MHC - klasy II. Zasiedlenie badanych rusztowań oceniono po hodowli komórek MSC w komercyjnym medium osteogennym (MSCgo™ Osteogenic Differentiation Medium, BI Biological Industries) oraz w medium osteogennym wzbogaconym cytokinami stymulującymi różnicowanie osteogenne FGF-2 (Fibroblast Growth Factor 2) oraz BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein). Zdjęcia obrazujące morfologię komórek oraz efektywność ich zasiedlania na trzech rodzajach rusztowań zostały wykonane przy użyciu mikroskopu fazowo-kontrastowego (Axio Observer Fluorescence Microscope, Zeiss, Jena, Germany) po 7 dniach hodowli, kiedy zaobserwowano największe różnice w tworzeniu sieci komórek w obrębie rusztowań.

Aktywność metaboliczną MSC osadzonych na rusztowaniach kostnych oceniono na trzech rodzajach materiałów: I. Rusztowanie drukowane 3D z PCL, II. Rusztowanie drukowane 3D z kompozytu PCL/HAP/TCP w stosunku 9:4.5:4.5, III. Rusztowanie drukowane 3D z kompozytu PCL/HAP/TCP modyfikowane powłoką GoHAPmed Typ 3. Komórki MSC hodowano na rusztowaniach przez 7 dni w standardowym medium hodowlanym α MEM (Minimum Essential Medium α , IJET PAS, Wrocław, Poland) i oznaczono ich aktywność metaboliczną za pomocą testu MTT po 1, 3 i 7 dniach inkubacji. Jako materiał kontrolny zastosowano PCL.

ultradźwiękowego były identyczne w porównaniu z wynikami uzyskanymi dla GoHAPmed przed procesem ultradźwiękowym, co oznacza, że proces ultradźwiękowy nie zmienił struktury krystalicznej nanocząstek hydroksyapatytu GoHAPmed.

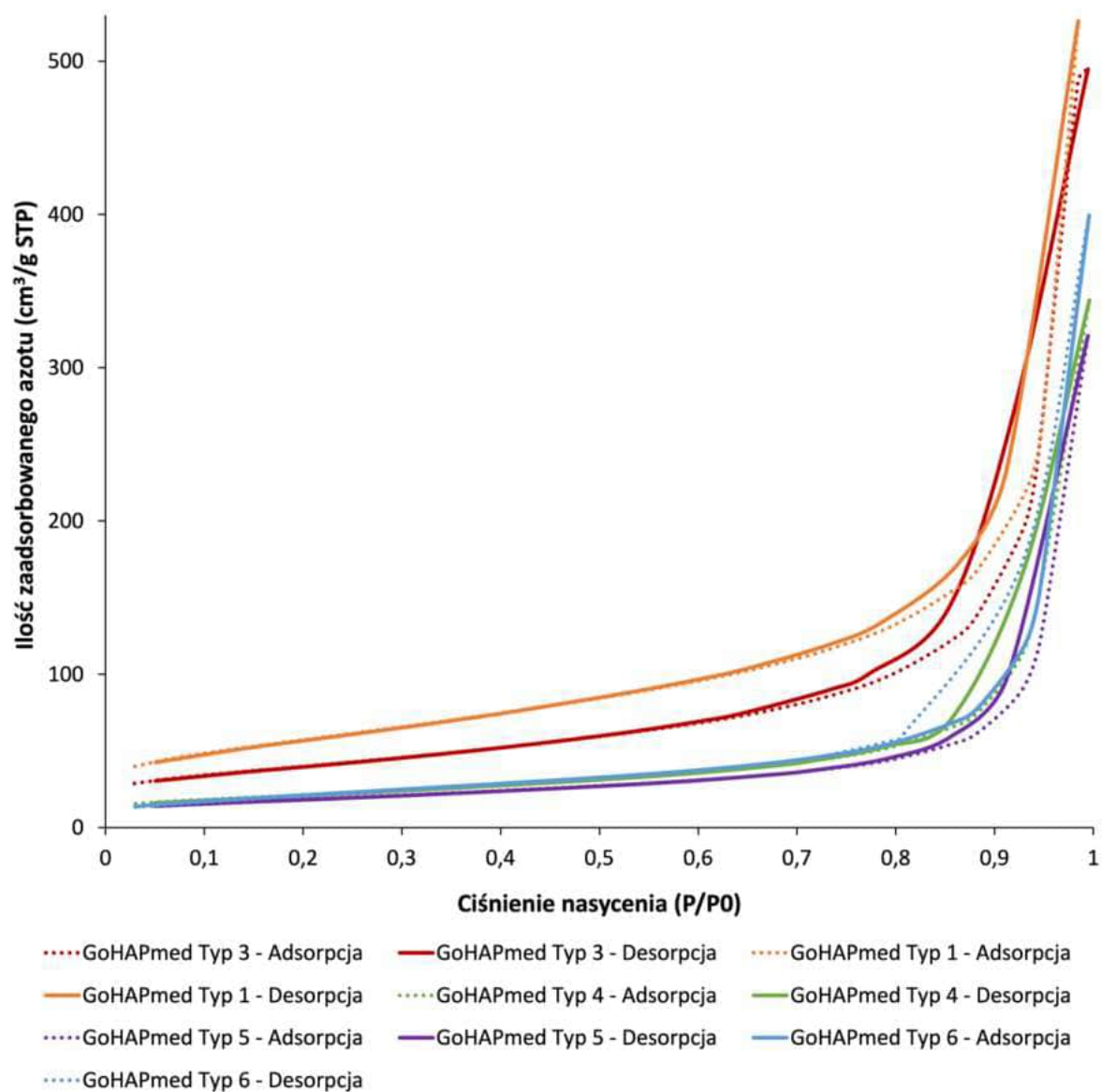
Tabela 4 – Średnia wielkość krystalitów GoHAPmed na podstawie analizy profili linii dyfrakcyjnych

Nazwa próbki	Wielkość krystalitów	
	Długość (nm)	Szerokość (nm)
GoHAPmed Typ 1	$19,6 \pm 7,9$	$7,8 \pm 0,2$
GoHAPmed Typ 3	$28,1 \pm 16,6$	$13,8 \pm 5,1$
GoHAPmed Typ 4	$41,2 \pm 16,8$	$22,5 \pm 5,7$
GoHAPmed Typ 5	$45,7 \pm 18,5$	$24,8 \pm 5,9$
GoHAPmed Typ 6	$52,4 \pm 20$	$28,8 \pm 7,0$

5.1.2. Powierzchnia właściwa i pojemność sorpcyjna

Rysunek 16 przedstawia histerezę sorpcji azotu dla nanocząstek GoHAPmed. Zgodnie z oczekiwaniami pojemność sorpcyjna zwiększa się wraz ze zmniejszeniem wielkości nanocząstek. W przypadku nanocząstek GoHAPmed Typ 1 oraz GoHAPmed Typ 3 zaobserwowano znacznie większą pojemność sorpcyjną. Zjawisko to może być spowodowane przekroczeniem pewnej wielkości, dla której proporcja atomów powierzchniowych do atomów wewnątrz kryształu hydroksyapatytu jest znacząco większa. Im więcej atomów powierzchniowych w kryształach, tym większa jest zdolność sorpcyjna. Inaczej ujmując, im większa powierzchnia zewnętrzna substancji przypada na daną masę, tym większa jest jej powierzchnia właściwa. Im większa powierzchnia właściwa tym więcej molekuł gazu może się do niej wiązać. Co ciekawe wyłącznie w przypadku największych nanocząstek GoHAPmed Typ 6 zaobserwowano, że desorpcja gazu z powierzchni materiału zachodzi przy niższym ciśnieniu względnym jego adsorpcji, co może wiązać się z najmniejszą objętością całkowitą porów, wynoszącą $0,001 \text{ m}^3/\text{g}$ i najniższą powierzchnią właściwą tego materiału (Tabela 5). Znacząco większe pojemności sorpcyjne korelowały z materiałami GoHAPmed Typ 1 oraz Typ 3 o wysoko rozwiniętych powierzchniach właściwych, odpowiednio $143 \text{ m}^2/\text{g}$ oraz $206 \text{ m}^2/\text{g}$. W Tabeli 5 zestawiono parametry powierzchni właściwej (SSA), całkowitej objętości porów (TPV), gęstości (DEN) oraz średniej wielkości nanocząstek (MPS_{BET}) wyznaczoną na

podstawie średnicy zastępczej, uwzględniając parametry SSA i BET oraz współczynnika kształtu dla kuli. Dla uproszczenia w dalszej części pracy parametr MPS_{BET} będzie podawany jako wielkość nanocząstek GoHAPmed.



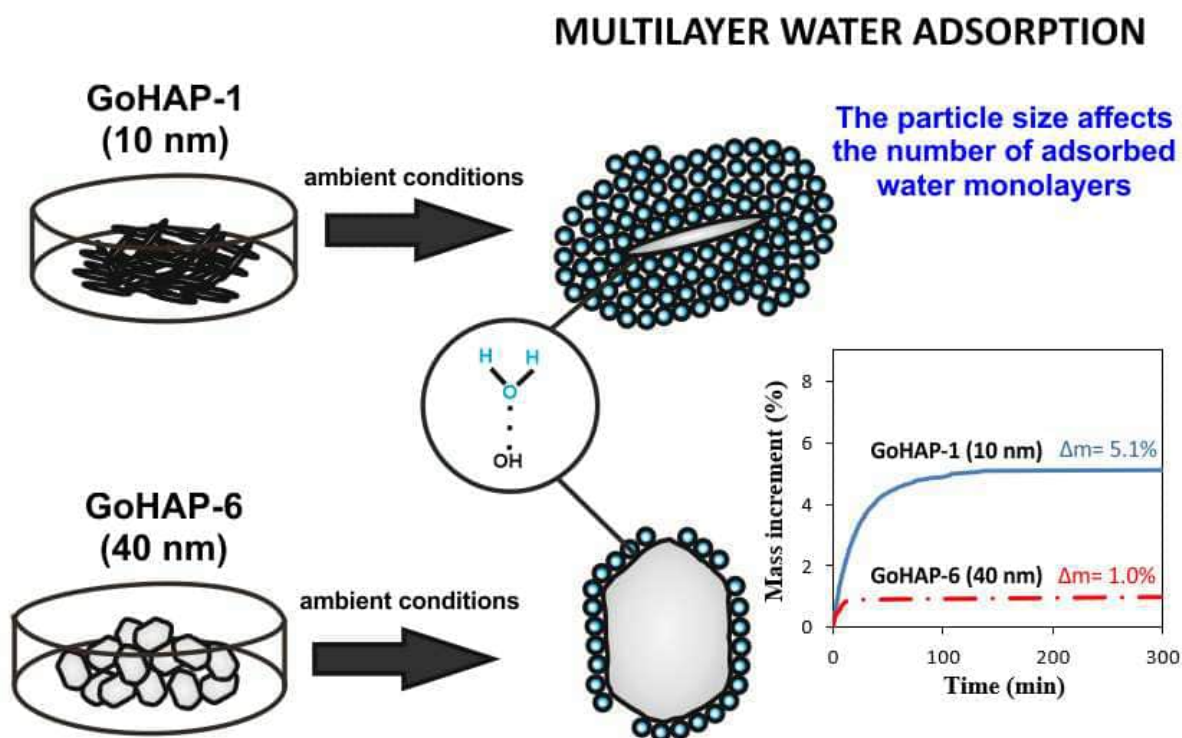
Rysunek 16. Histereza sorpcji azotu przez nanocząstki GoHAPmed.

Tabela 5 – Parametry powierzchni właściwej (SSA), całkowitej powierzchni porów (TPV), gęstości (DEN) oraz średniej wielkości nanocząstek (MPS_{BET}) wyznaczone dla nanocząstek hydroksyapatytu GoHAPmed.

Nazwa próbki:	Powierzchnia Właściwa (m^2/g)	Całkowita objętość porów (m^3/g)	Gęstość (g/cm^3)	Średnia wielkość nanocząstek (nm)
GoHAP Typ 1	206	0,0017	$2,98 \pm 0,06$	10
GoHAP Typ 3	143	0,0044	$3,01 \pm 0,03$	14
GoHAP Typ 4	76	0,0032	$3,05 \pm 0,01$	26
GoHAP Typ 5	66	0,0024	$3,05 \pm 0,01$	30
GoHAP Typ 6	46	0,0011	$3,08 \pm 0,01$	42

Otrzymane wyniki korelują z wcześniej opublikowanymi doniesieniami [52] dla nanocząstek GoHAP wytwarzanych z odczynników niższej czystości w porównaniu do nanocząstek GoHAPmed.

W niniejszej publikacji, wykazano, że nanocząstki GoHAP o wielkości ok. 10 nm adsorbują więcej wody z powietrza na swojej powierzchni w porównaniu do nanocząstek GoHAP o wielkości 40 nm. Zależność tę uzasadniona dwoma czynnikami: (1) wielkość powierzchni, do której molekuły wody mogą przylegać bezpośrednio, (2) większej ilości monowarstw molekuł wody przylegających do nanocząstek o mniejszej wielkości. Zgodnie z tym, że nanocząstki o wymiarach kilku nm składają się głównie z atomów powierzchniowych to ich wkład energii w swobodną energię powierzchniową jest wysoki, to z kolei jest siłą napędową przyciągania kolejnych warstw molekuł wody [264].

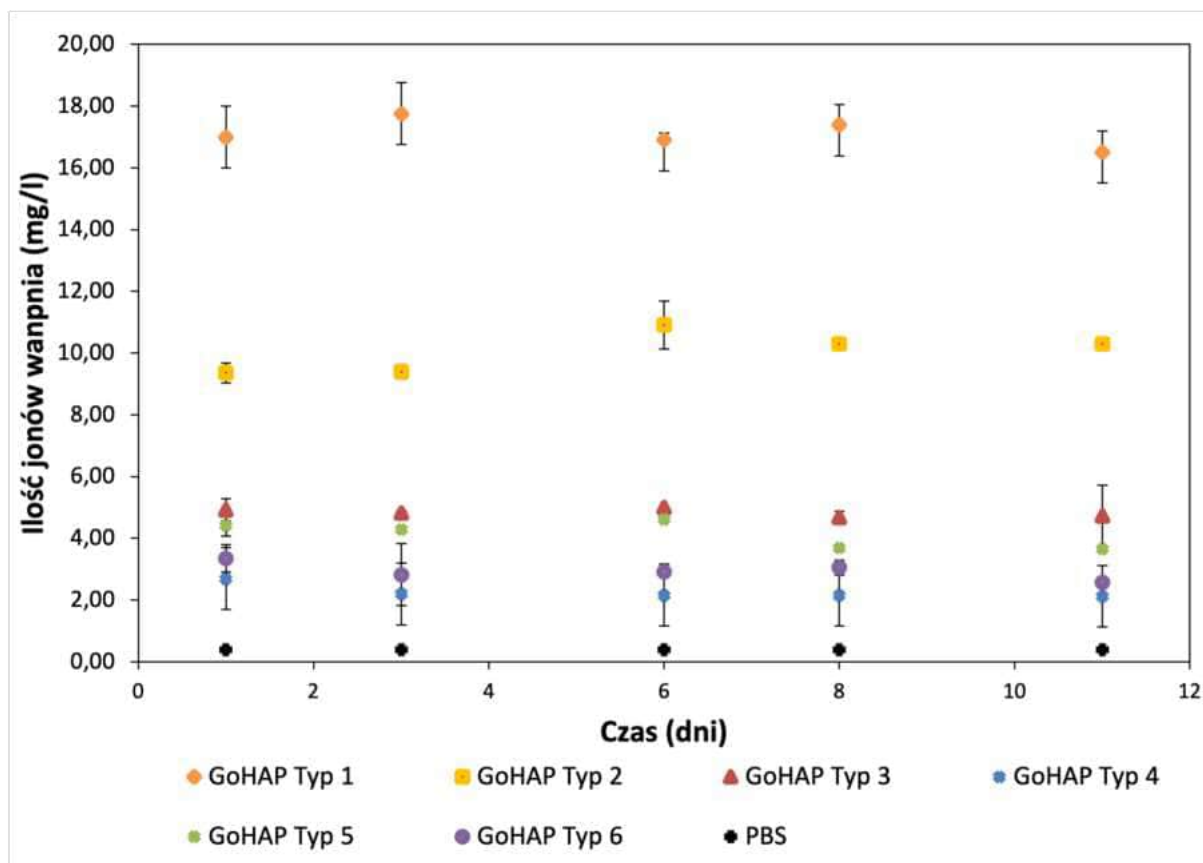


Rysunek 17. Adsorpcja wody z otoczenia na nanocząstkach hydroksyapatytu GoHAP o różnej wielkości [264].

5.1.3. Badania uwalniania jonów Ca^{2+}

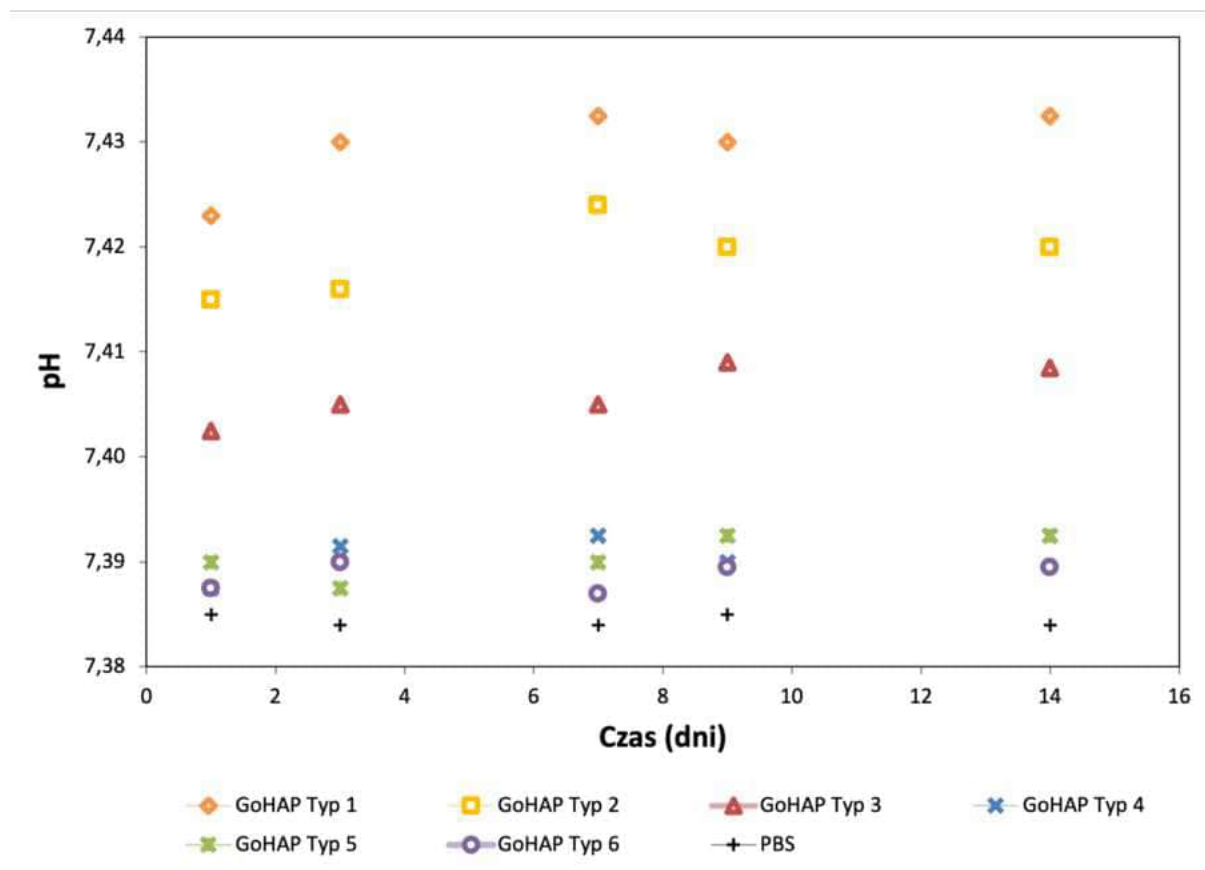
Wpływ wielkości cząstek na ich rozpuszczalność i biodostępność został udokumentowany przez wielu badaczy [270,271,272]. Zależność ta rozpatrywana jest głównie w farmacji dla zwiększenia bioaktywności leków [266,267,268,269,270,271,272]. Literatura przedmiotu wskazuje, że zmniejszenie wielkości cząstek leku do rozmiarów nanometrowych zwiększa całkowitą efektywną powierzchnię, a tym samym szybkość rozpuszczania. Co więcej, zmniejszenie wielkości cząstek prowadzi do zmniejszenia grubości warstwy dyfuzyjnej, otaczającej cząstki leku, co powoduje zwiększenie gradientu stężeń [271]. Smoleń et al., wskazali, że wielkość nanocząstek hydroksyapatytu ma wpływ na szybkość degradacji tego materiału. Znając zależność pomiędzy ilością wydzielanych jonów a wielkością powierzchni właściwej oraz rozmiarem nanocząstek hydroksyapatytu możliwe będzie programowanie resorpcji hydroksyapatytu [273]. Z tego powodu w pracy uwzględniono badania wydzielania jonów wapnia z nanocząstek hydroksyapatytu GoHAP o sześciu różnych wielkościach nanocząstek (GoHAP Typ 1 – GoHAP Typ 6).

Badania uwalniania jonów wapnia wykazały silny wpływ rozwinięcia powierzchni właściwej hydroksyapatytu GoHAP na rozpuszczalność oraz ilość wydzielanych jonów. Wydzielanie jonów wapnia w najwyższych stężeniach tj. ok 18 mg/l zaobserwowano dla nanohydroksyapatytu GoHAP Typ 1 o powierzchni właściwej ok. 240 m²/g oraz średniej wielkości nanocząstek ok. 9 nm. Wraz ze wzrostem wielkości nanocząstek oraz spadkiem powierzchni właściwej spadała ilość wydzielanych jonów wapnia do roztworu buforowego. Znaczny spadek rozpuszczalności oraz związane z tym procesem wydzielanie jonów wapnia zaobserwowano już dla nieznacznie większych nanocząstek hydroksyapatytu GoHAP Typ 2 o średniej wielkości nanocząstek ok. 10 nm oraz GoHAP Typ 3 o średniej wielkości nanocząstek ok. 11 nm. Mimo niewielkiej różnicy w wielkości nanocząstek różnica pomiędzy ich powierzchnią właściwą nanocząstek była znacząca i wynosiła odpowiednio ok.: 30 m²/g i 57 m²/g. W tym przypadku spadek ilości wydzielanych jonów wynosił ok. ↓7 mg/L przy różnicy w rozwinięcia powierzchni właściwej wynoszącej 30 m²/g (GoHAP Typ 2) oraz ok. ↓12 mg/L przy różnicy w rozwinięcia powierzchni właściwej wynoszącej 57 m²/g (GoHAP Typ 3) w stosunku do GoHAP Typ 1. Niewielką ilość wydzielanych jonów wapnia wynoszącą ok. 2,3 mg/L do 4,1 mg/L zaobserwowano dla nanocząstek GoHAP Typ 4 – 6. W zawiązku z tym potwierdzono zależność pomiędzy rozwinięciem powierzchni właściwej nanocząstek, wielkością i kształtem nanocząstek hydroksyapatytu GoHAP a ilością wydzielanych jonów wapnia. Najbardziej charakterystyczną zależnością okazał się wpływ rozwinięcia powierzchni właściwej na rozpuszczalność nanocząstek hydroksyapatytu GoHAP (Rysunek 20). W każdym z badanych Typów hydroksyapatytu GoHAP wyrzut jonów wapniowych następował już po 1 dniu w roztworze buforowym. Niemalże stały poziom jonów wapnia wydzielonych z sześciu typów hydroksyapatytu GoHAP zaobserwowano podczas całego okresu badania. Ilość uwolnionych jonów nie zależała znacząco od czasu, stały poziom jonów obserwowano już od 1 dnia (Rysunek 9). Wyniki dotyczące wpływu powierzchni właściwej nano-hydroksyapatytu na ilość uwalnianych jonów do roztworu PBS opisano w publikacji [270].

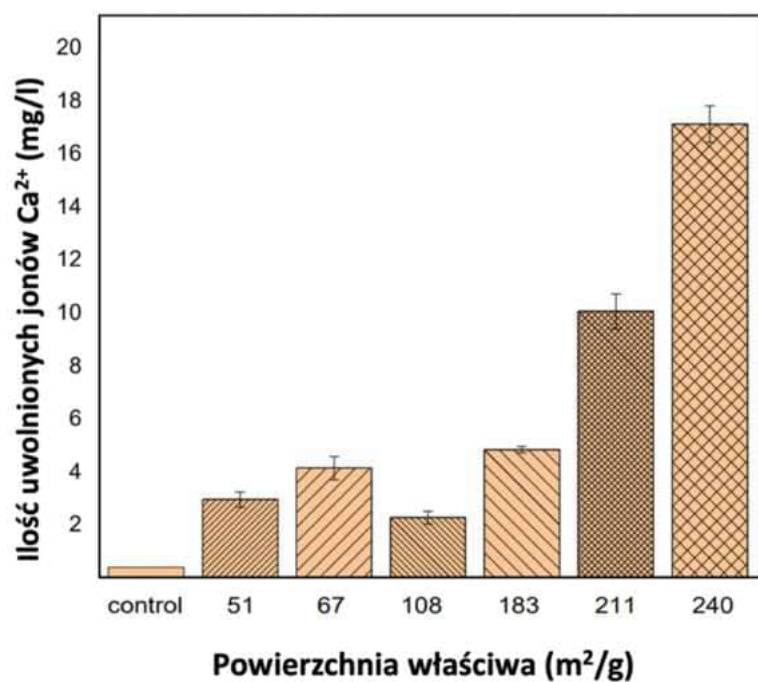


Rysunek 18. Ilość uwolnionych jonów wapnia w zależności od wielkości nanocząstek hydroksyapatytu GoHAP [270].

Zmiana pH buforu była niewielka i mieściła się w zakresie 0.05 w skali pH. Jednakże zmiana pH w kierunku zasadowym korelowała z ilością uwalnianych jonów wapnia i była największa dla nanocząstek o najmniejszym rozmiarze, tj. GoHAP Typ 1. Istotną zmianę w pH zaobserwowano również w przypadku nanocząstek GoHAP Typ 2 oraz GoHAP Typ 3, które charakteryzowały się wysoką powierzchnią właściwą $> 150 \text{ m}^2/\text{g}$.



Rysunek 19. Zmiana pH zaobserwowana w badaniach rozpuszczalności nanohydroksyapatytu GoHAP [270].



Rysunek 20. Wpływ wielkości powierzchni właściwej nanocząstek hydroksyapatytu GoHAP na ilość uwalnianych jonów wapnia [270].

Podsumowując, metoda mikrofalowej hydrotermalnej syntezy nanocząstek pozwala na regulację wielkości nanocząstek. Charakteryzacja nanocząstek hydroksyapatytu GoHAPmed otrzymanego tą metodą wykazała, że rozmiar nanocząstek determinuje ich właściwości takie jak rozwinięcie powierzchni właściwej, gęstość, pojemność sorpcyjna oraz ilość uwalnianych jonów Ca^{2+} . Regulacja i kontrola tych właściwości nanocząstek może być kluczowa do sterowania właściwościami nano-powłok hydroksyapatytowych osadzanych metodą SonoNanoCoating.

5.2. Dobór podstawowych parametrów osadzania powłok hydroksyapatytowych metodą SonoNanoCoating

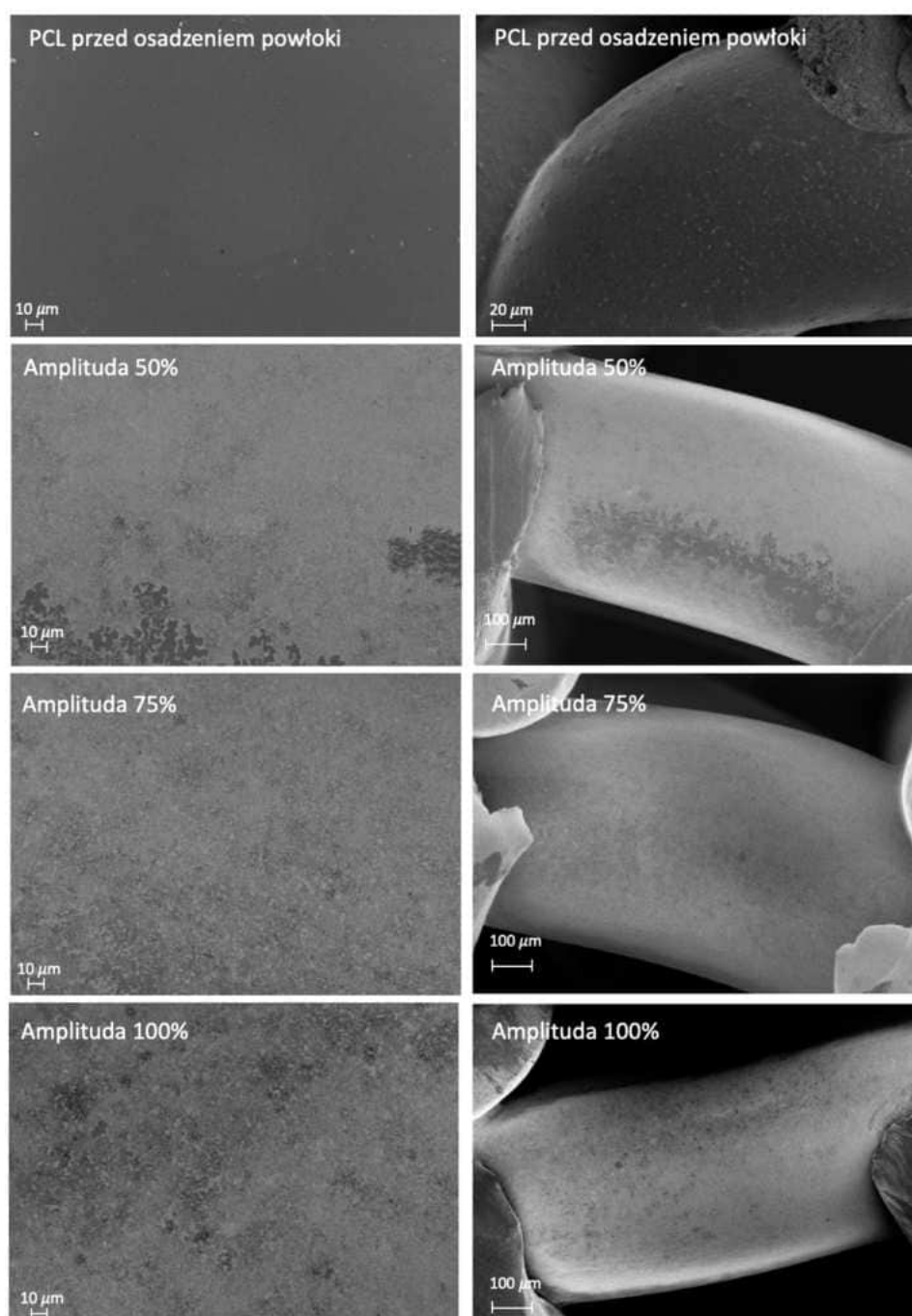
Wpływ na procesy ultradźwiękowe takie jak osadzanie powłok metodą SonoNanoCoating mogą mieć czynniki takie jak:

- Amplituda drgań;
- Temperatura procesu;
- Koncentracja nanocząstek w medium;
- Czas trwania procesu;
- Wielkość nanocząstek składających się na powłokę,
- Rodzaj podłoża, którego powierzchnia jest modyfikowana.

W związku z szeregiem, zmiennych wpływających na jakość oraz efektywność procesu ultradźwiękowego osadzania powłok, składających się z nanocząstek hydroksyapatytu GoHAPmed przeprowadzono szereg eksperymentów, w celu wyznaczenia optymalnych parametrów procesu.

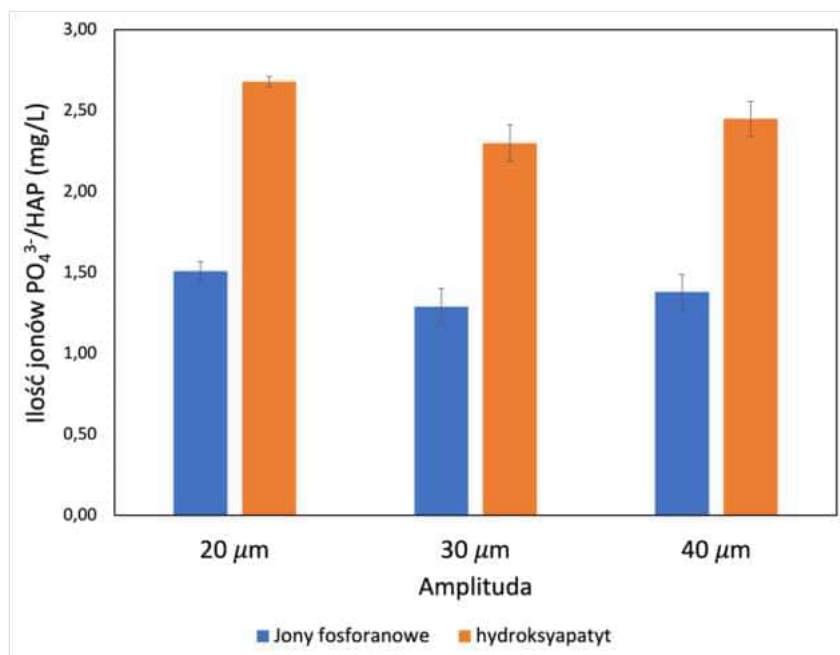
5.2.1. Regulacja amplitudy procesu ultradźwiękowego

Jak opisano w rozdziale 5.2. amplituda drgań ma istotny wpływ na osadzanie powłok w procesie NanoSonoCoating. Przedmiotem badania był dobór optymalnej amplitudy drgań głowicy ultradźwiękowej, w czasie testów z podłożem z PCL. Każda wartość zastosowanych amplitud ultradźwiękowych, tj. 20 μm , 30 μm oraz 40 μm pozwoliła na osadzenie powłoki na rusztowaniu PCL. W przypadku zastosowania amplitudy 40 μm zaobserwowano znacząco szybsze grzanie zawiesziny w procesie ultradźwiękowym (SonoNanoCoating). Z tego powodu należało obniżyć temperaturę płaszcza wodnego z 10 °C do ok. 5 °C, aby utrzymać stałą temperaturę procesu $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Na obrazach SEM zaobserwowano niewielkie różnice w morfologii powłok na rusztowaniach PCL. Obrazowanie ujawniło, że powłoki były najbardziej jednorodne w przypadku zastosowania amplitudy 30 μm . W przypadku Amplitudy 20 μm w pojedynczych miejscach obserwowano dendrytyczną morfologię powłoki, czyli była ona nieciągła. Zastosowanie amplitudy 40 μm pozwoliło na uzyskanie ciągłej powłoki, jednakże na powłoka w niektórych miejscach była cieńsza, a powierzchnia materiału modyfikowanego bardziej widoczna.



Rysunek 21. Obraz SEM rusztowania kostnego PCL oraz analogicznego rusztowania z powłoką GoHAPmed Typ 3 naniesioną z zastosowaniem, odpowiednio: 57%, 75% oraz 100% amplitudy.

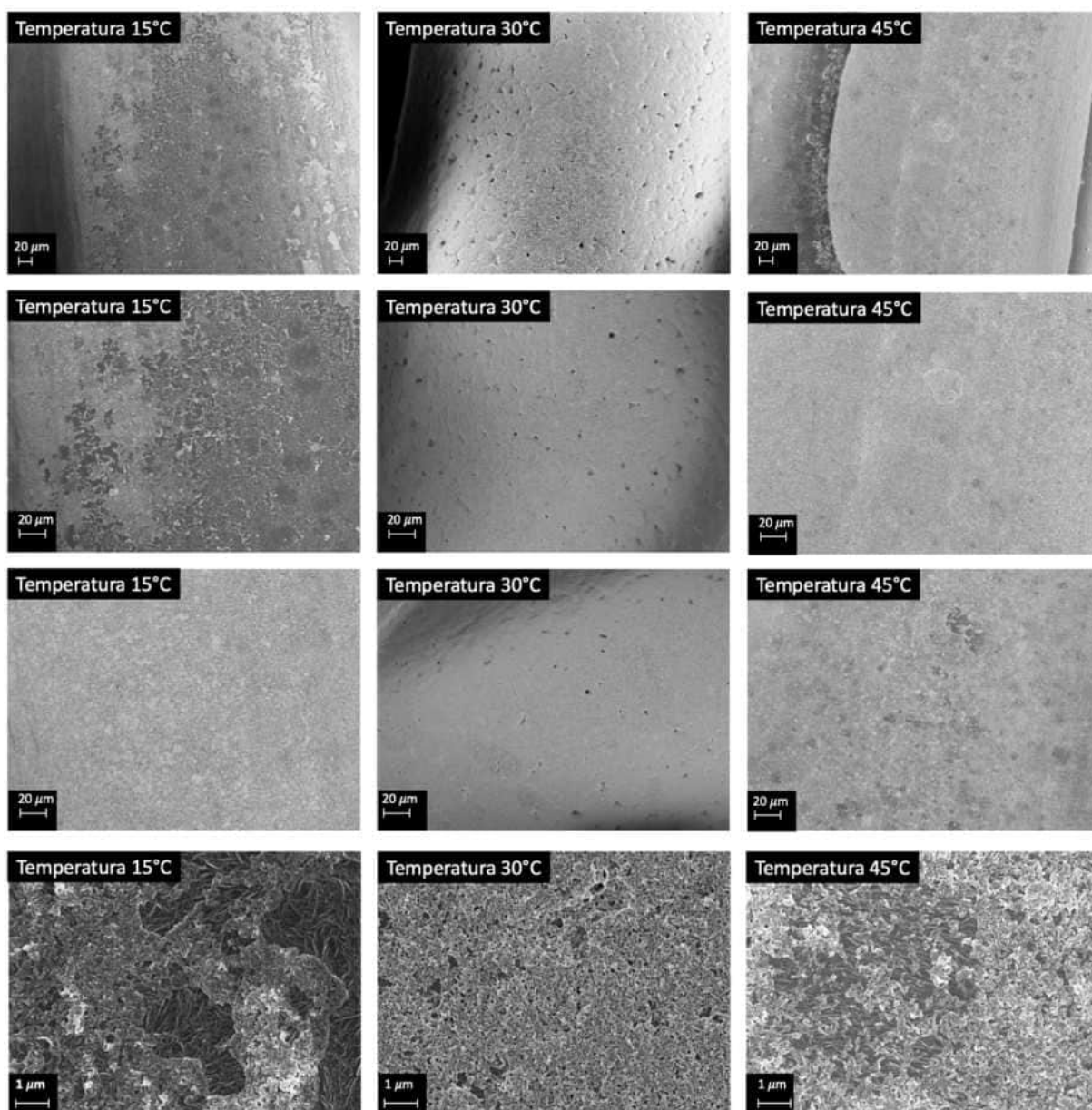
Pomiar jonów PO_4^{3-} w 0,1 M HCl wykazał niewielką zmianę w zawartości hydroksyapatytu przy każdej stosowanej amplitudzie ultradźwięków w procesie SonoNanoCoating (Rysunek 22), jednakże różnice te były nieistotne statystycznie.



Rysunek 22. Zawartość jonów PO_4^{3-} oraz hydroksyapatytu uzyskana na drodze rozpuszczania powłoki GoHAPmed Typ 3 w 0,1 M HCL w zależności od amplitudy procesu ultradźwiękowego.

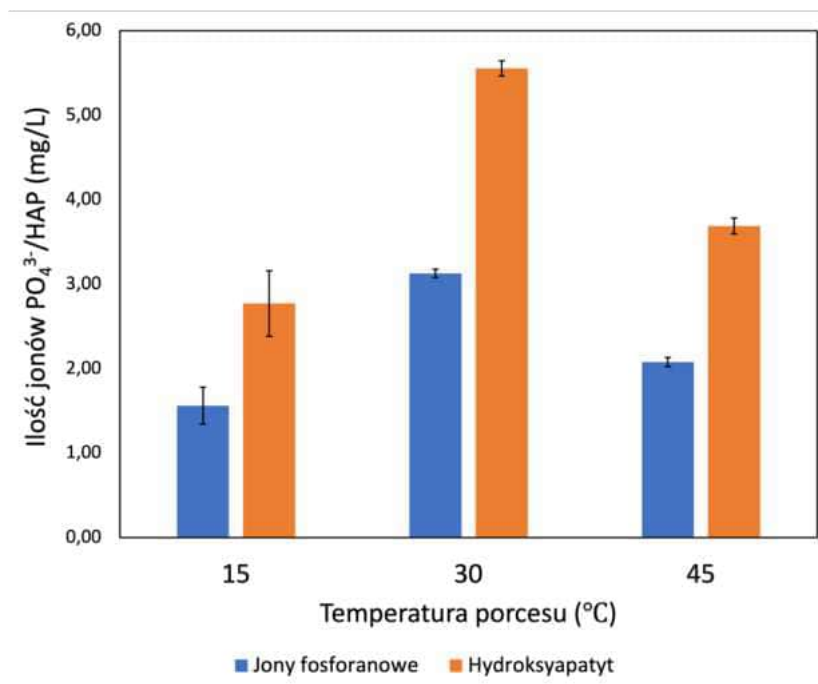
5.2.2. Regulacja temperatury procesu ultradźwiękowego

Temperatura procesu wpływa na morfologię osadzanych powłok. Zastosowanie skrajnych temperatur, tj. 15 °C oraz 45 °C skutkowało uzyskaniem niejednorodnej powłoki na próbce rusztowania kostnego wykonanego techniką druku 3D z PCL. Powłoka uzyskana w temperaturze 15 °C była różna w zależności od badanego miejsca na próbce – w niektórych miejscach miała charakter ciągły, w innych obserwowano prześwity powierzchni materiału, który modyfikowano. Powłoka uzyskana w 45 °C miała charakter ciągły, jednakże obserwowano punktowe pocienienia powłoki. W przypadku zastosowania temperatury 30 °C podczas procesu ultradźwiękowego osadzania powłok z zawiesiny nanocząstek GoHAPmed Typ 3 uzyskano jednorodną powłokę. Morfologia powłoki uzyskanej w 30 °C była zbliżona w każdym miejscu badanej próbki.



Rysunek 23. Obraz SEM rusztowania kostnego modyfikowanego powierzchniowo powłoką GoHAPmed Typ 3 osadzaną metodą ultradźwiękową w temperaturze, odpowiednio: 15 °C, 30 °C, 45 °C.

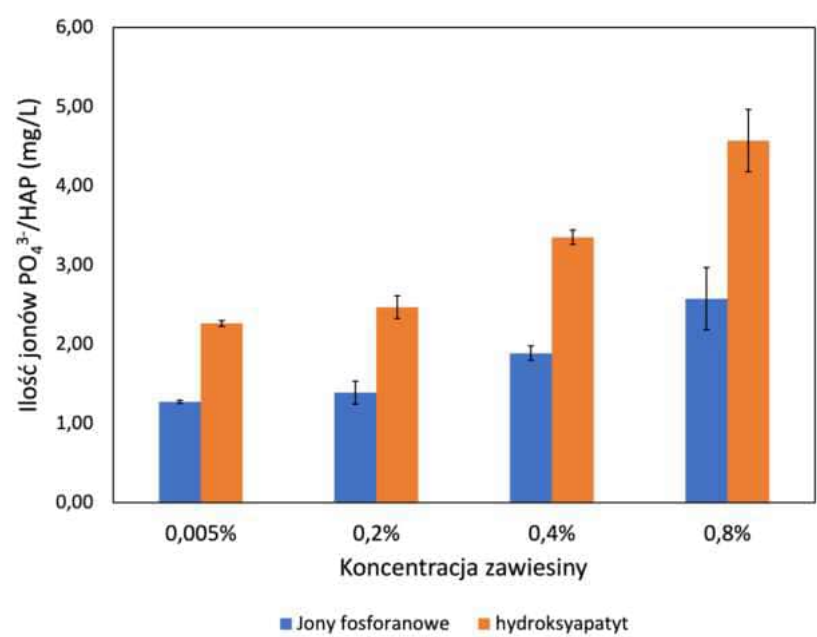
Analiza zawartości jonów PO_4^{3-} w 0,1 M HCL, w którym roztworzano powłoki wykazała, że ilość nanocząstek hydroksyapatytu GoHAPmed Typ 3 była najwyższa w przypadku zastosowania temperatury procesu ultradźwiękowego wynoszącej 30 °C. Wyniki te potwierdziły wnioski wynikające z obrazowania SEM, iż najlepszą efektywność procesu ultradźwiękowego osadzania powłok hydroksyapatytowych uzyskano w temperaturze 30 °C. Natomiast temperatura procesu wynosząca 15 °C była najmniej odpowiednia.



Rysunek 24. Zawartość jonów PO_4^{3-} oraz hydroksyapatytu uzyskana na drodze rozpuszczenia powłoki GoHAPmed Typ 3 w 0,1 M HCL zależności od temperatury procesu ultradźwiękowego.

5.2.3. Regulacja koncentracji nanocząstek w zawiesinie GoHAPmed

Koncentracja nanocząstek GoHAP w zawiesinie ma istotny wpływ na ilość osadzanych nanocząstek w powłoce hydroksyapatytowej na implancie. Zwiększenie koncentracji nanocząstek GoHAP koreluje z zwiększoną ilością osadzanych nanocząstek na powierzchni próbek rusztowań kostnych, co potwierdzono poprzez wykonanie analizy zawartości jonów PO_4^{3-} z roztworzonych powłok.

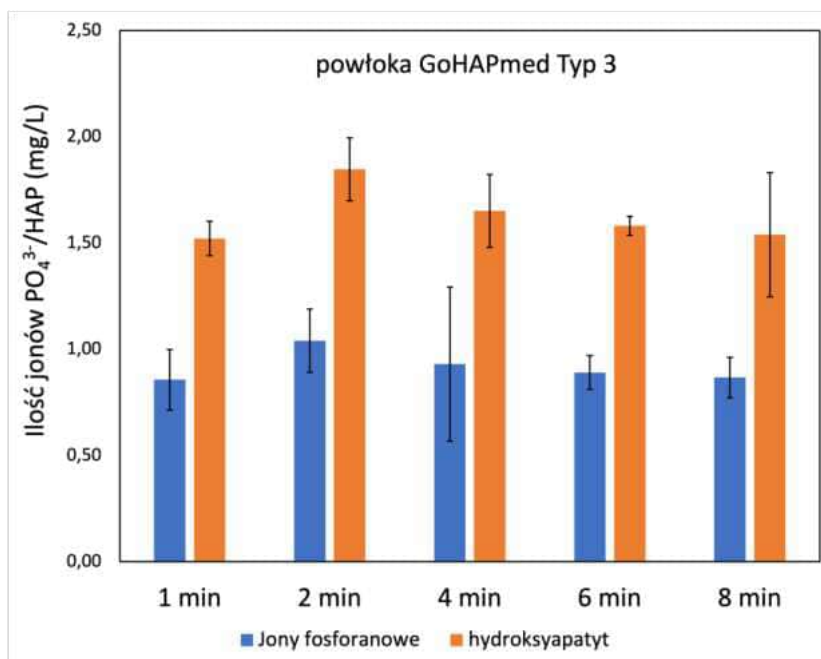


Rysunek 25. Zawartość jonów PO_4^{3-} oraz hydroksyapatytu uzyskana na drodze rozpuszczenia powłoki GoHAPmed Typ 3 w 0,1 M HCL zależności od koncentracji wodnej zawiesiny nanocząstek.

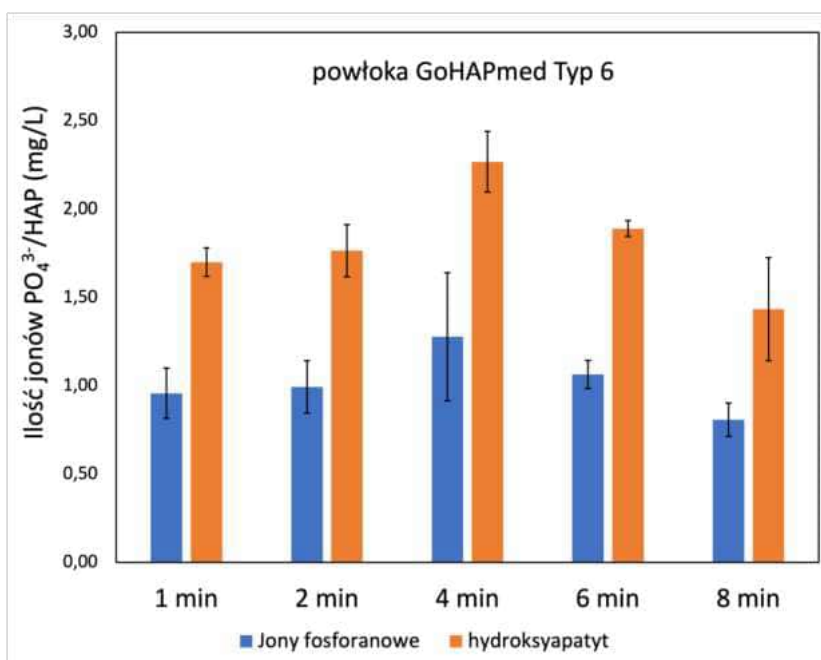
5.2.4. Wpływ wielkości nanocząstek oraz czasu procesu na osadzanie powłok

Dla każdego z zastosowanych parametrów uzyskano powłoki GoHAPmed Typ 3 oraz GoHAPmed Typ 6, co świadczy o poprawnym doborze stałych parametrów procesu SonoNanoCoating takich jak amplituda ultradźwięków, temperatura procesu oraz koncentracja nanocząstek, odległość sonotrody od obiektu oraz wskazuje na konkurencyjność procesu w porównaniu do innych metod modyfikacji powierzchni.

Na podstawie badań spektrofotometrycznych wykazano, że ilość jonów pochodzących z rozpuszczenia powłoki GoHAPmed w 0,1 M HCL nie zwiększała się systematycznie z wydłużeniem czasu prowadzenia procesu ultradźwiękowego. Wbrew oczekiwaniom poziom ilości jonów był na w przybliżeniu stałym poziomie w funkcji czasu i znajdował się w zakresie 0,86 – 1,04 mg/L dla powłoki GoHAP Typ 3 oraz 0,81 – 1,28 mg/L dla GoHAP typ 6. Uzyskane wyniki wskazują na to, że czas prowadzenia procesu ultradźwiękowego w dotychczasowych badaniach (4.2.1 – 4.2.3) badaniach nie był optymalnie dobrany i może zostać znacząco skrócony.

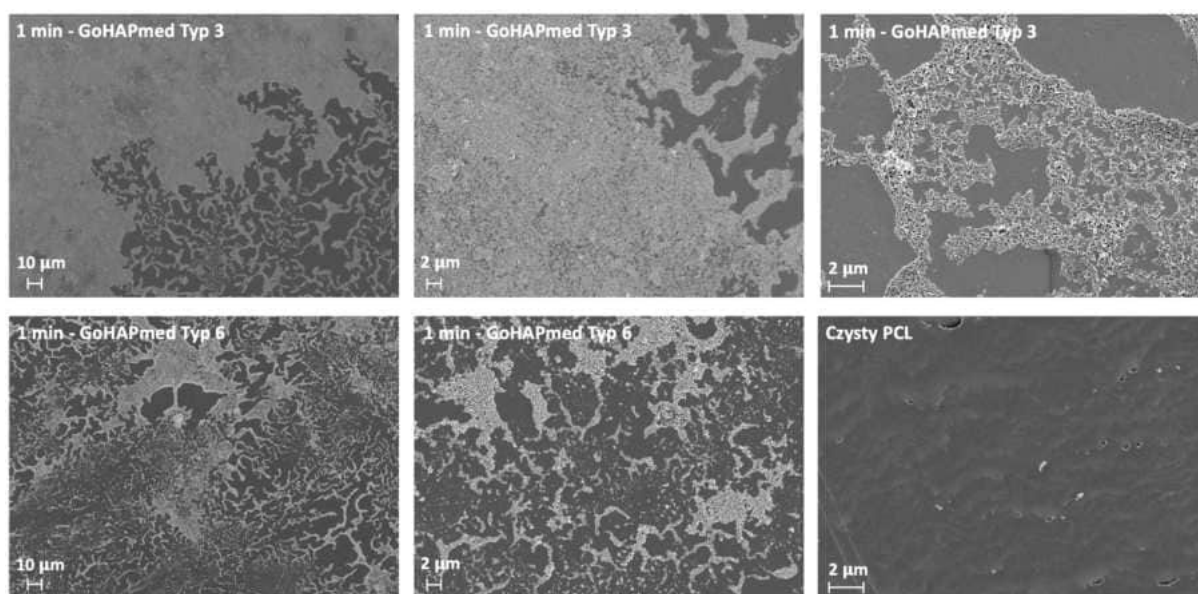


Rysunek 26. Zawartość jonów PO_4^{3-} oraz hydroksyapatytu uzyskana na drodze rozтворzenia powłoki GoHAPmed Typ 3 w zależności od czasu prowadzenia procesu ultradźwiękowego.

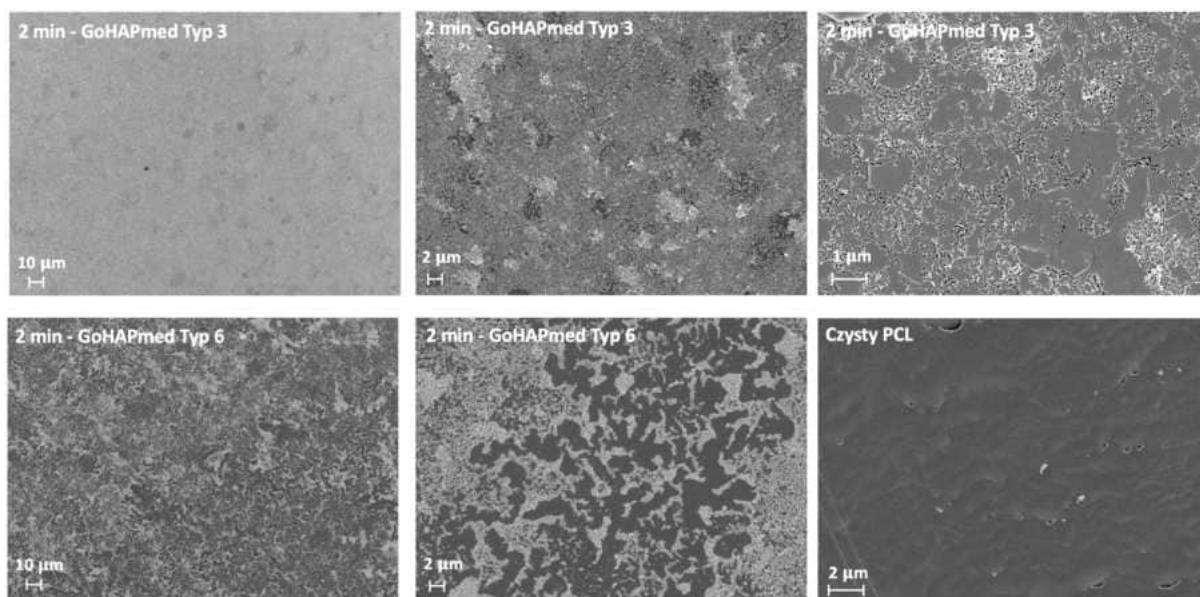


Rysunek 27. Zawartość jonów PO_4^{3-} oraz hydroksyapatytu uzyskana na drodze rozтворzenia powłoki GoHAPmed Typ 6 w zależności od czasu prowadzenia procesu ultradźwiękowego.

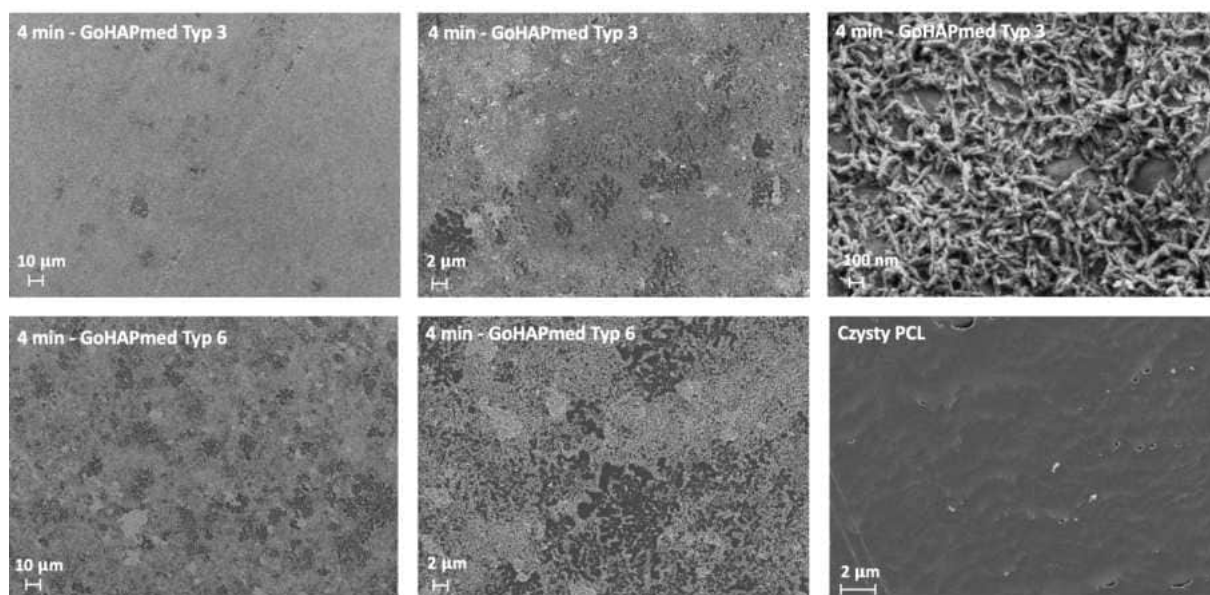
Sugerując się zbliżoną ilością jonów wydzielanych z powłok hydroksyapatytowych uzyskanych w różnym czasie można by założyć, że uzyskane powłoki mają podobną charakterystykę. Jednak ocena morfologii wykonana za pomocą obrazowania SEM wykazała istotne różnice uzyskane dla powłok uzyskanych w różnym czasie prowadzenia procesu SonoNanoCoating. Zaobserwowano również różnice pomiędzy powłokami uzyskanymi w tym samym czasie prowadzenia procesu, jednak osadzanych z różnych wielkości nanocząstek GoHAPmed Typ 3 (14 nm) oraz GoHAPmed Typ 6 (42 nm). Powłoki uzyskane po 1 minucie procesu SonoNanoCoating charakteryzowały się morfologią o charakterze wyspowym, dendrytycznym (Rysunek 28). Obrazowanie powłok uzyskanych poprzez wydłużenie czasu procesu SonoNanoCoating pokazało, że wyspy nanocząstek GoHAPmed stopniowo rozrastały się w czasie, aż do uzyskania jednolitego pokrycia w przypadku nanocząstek o wielkości 14 nm (Rysunek 32). Osadzanie nanocząstek o większym średnim rozmiarze ok. 42 nm (GoHAPmed Typ 6) przebiegało w sposób podobny – osadzenie wysp nanocząstek o dendrytycznej strukturze na powierzchni polimeru a następnie rozrastanie powłoki w kierunku bocznym zwiększającym stopień pokrycia powierzchni przez powłokę (Rysunek 28 - Rysunek 32). Jednakże w przypadku zastosowania zawiesiny nanocząstek o większej wielkości nie uzyskano całkowitego pokrycia powierzchni w czasie 8 minut. Po przekroczeniu pewnego stopnia pokrycia, kolejna warstwa formowała się w podobny sposób. Pojedyncze aglomeraty nanocząstek były rzadko obecne w obszarach między rosnącymi dendrytami.



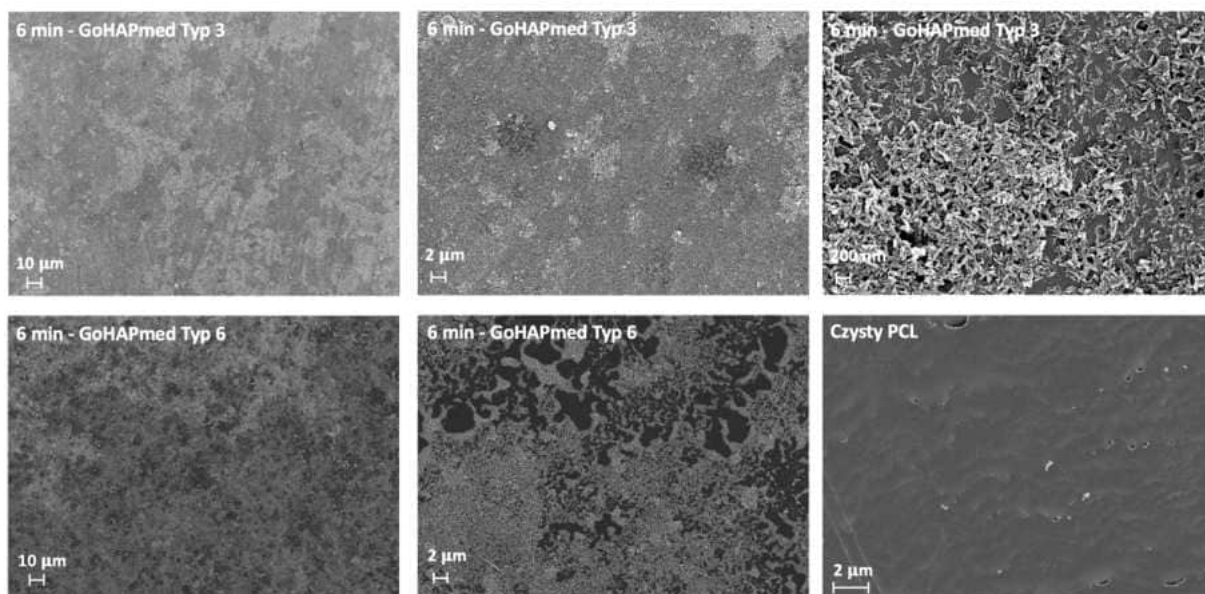
Rysunek 28. Obrazy SEM powłok GoHAPmed Typ 3 (14 nm) oraz GoHAPmed Typ 6 (42 nm) po 1 minucie procesu ultradźwiękowego osadzania powłoki hydroksyapatytowej.



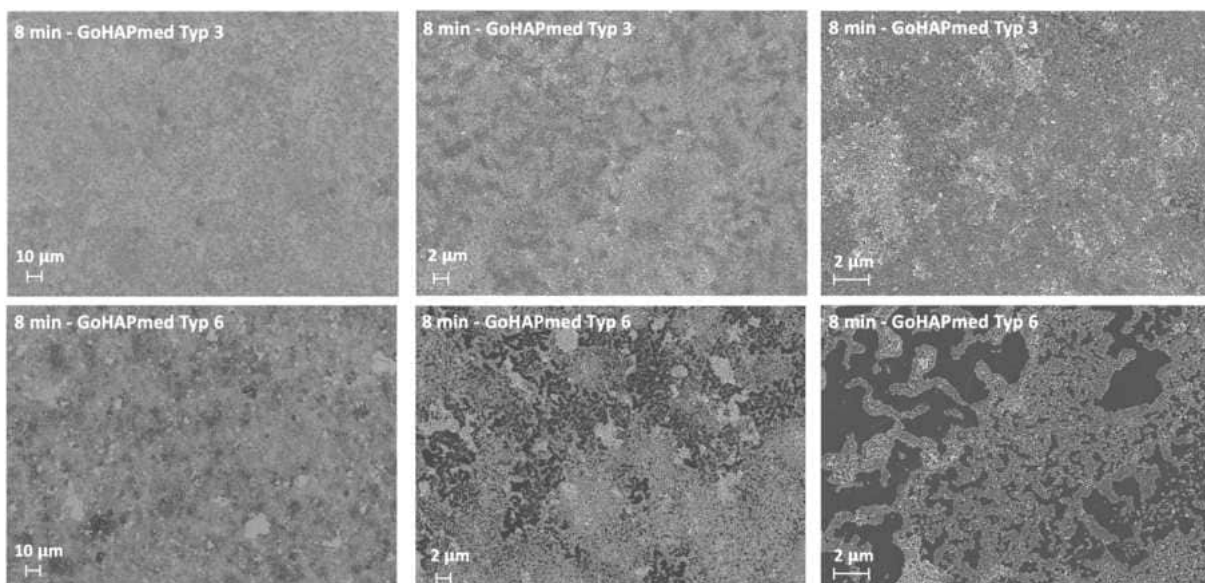
Rysunek 29. Obrazy SEM powłok GoHAPmed Typ 3 (14 nm) oraz GoHAPmed Typ 6 (42 nm) po 2 minutach procesu ultradźwiękowego osadzania powłoki hydroksyapatytowej.



Rysunek 30. Obrazy SEM powłok GoHAPmed Typ 3 (14 nm) oraz GoHAPmed Typ 6 (42 nm) po 4 minutach procesu ultradźwiękowego osadzania powłoki hydroksyapatytowej.



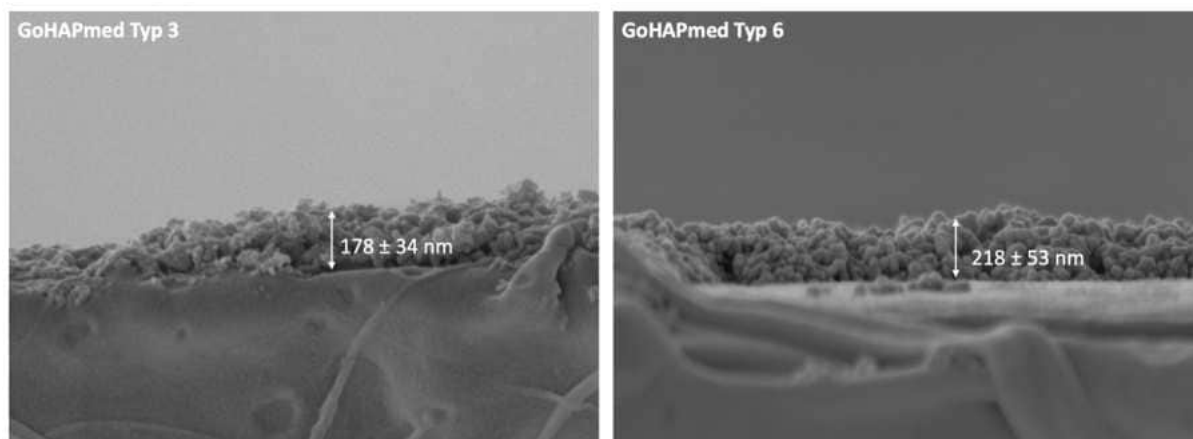
Rysunek 31. Obrazy SEM powłok GoHAPmed Typ 3 (14 nm) oraz GoHAPmed Typ 6 (42 nm) po 6 minutach procesu ultradźwiękowego osadzania powłoki hydroksyapatytowej.



Rysunek 32. Obrazy SEM powłok GoHAPmed Typ 3 (14 nm) oraz GoHAPmed Typ 6 (42 nm) po 8 minutach procesu ultradźwiękowego osadzania powłoki hydroksyapatytowej.

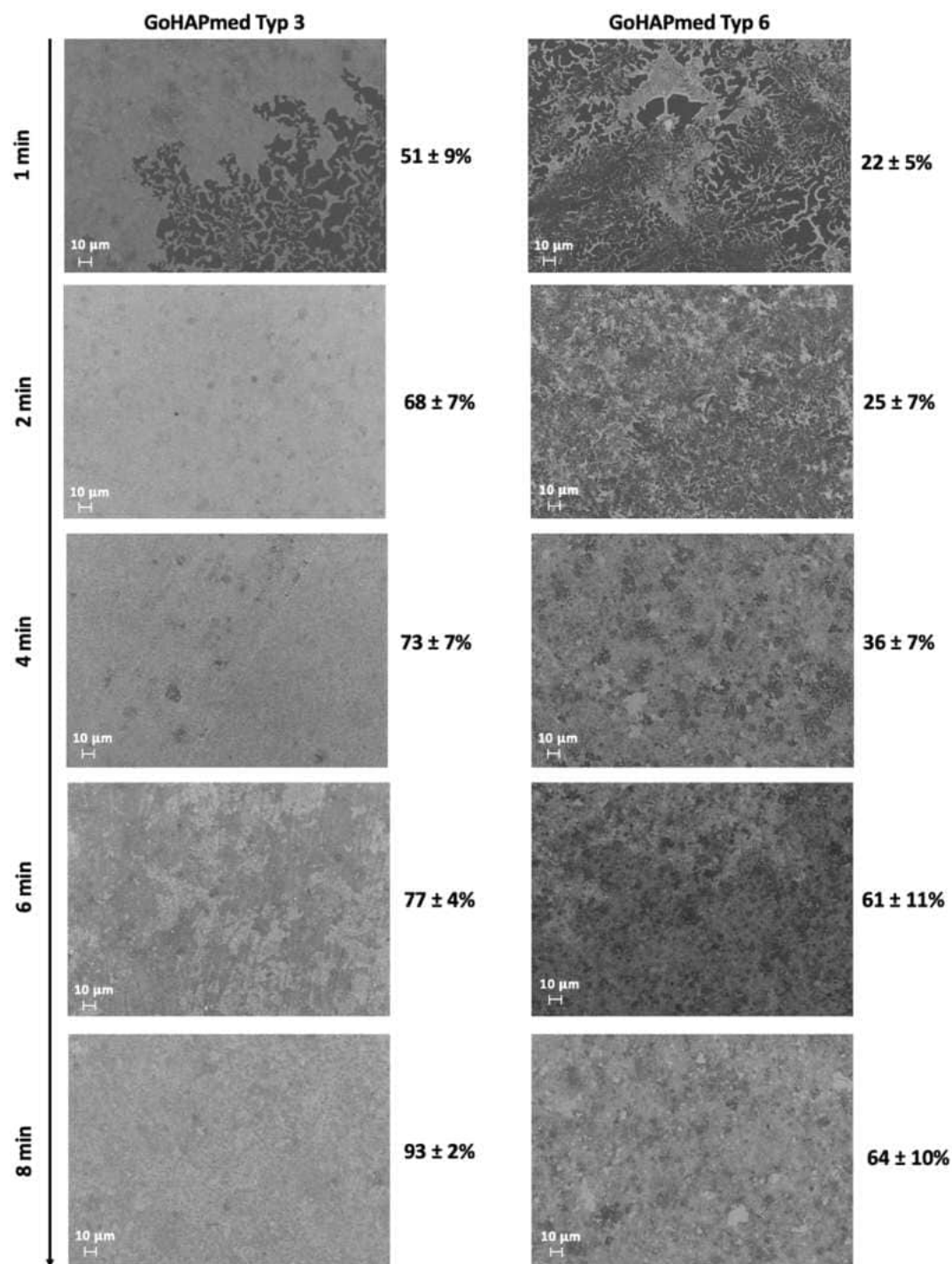
Przeprowadzono obrazowanie SEM przełomów pastylek PCL, na których osadzono powłoki hydroksyapatytowe w czasie 8 min. Obrazowanie te, pozwoliło na ocenę grubości powłoki hydroksyapatytowej, która dla powłoki składającej się z nanocząstek GoHAPmed Typ 3 wynosiła 178 ± 34 nm oraz 218 ± 53 nm dla powłoki osadzonej w procesie SonoNanoCoating z zawiesiny GoHAPmed Typ 6. W obu przypadkach były to powłoki wielowarstwowe,

składające się z nanocząstek GoHAPmed. Powłoka składająca się z większej wielkości nanocząstek była grubsza, jednak charakteryzowała się większym odchyleniem grubości od tej wartości wynoszącym 53 nm.



Rysunek 33. Obraz SEM przełomu pastylki PCL z powłoką składającą się z GoHAP Typ 3 (14 nm) oraz GoHAPmed Typ 6 (42 nm). Powiększenie 100 000 ×.

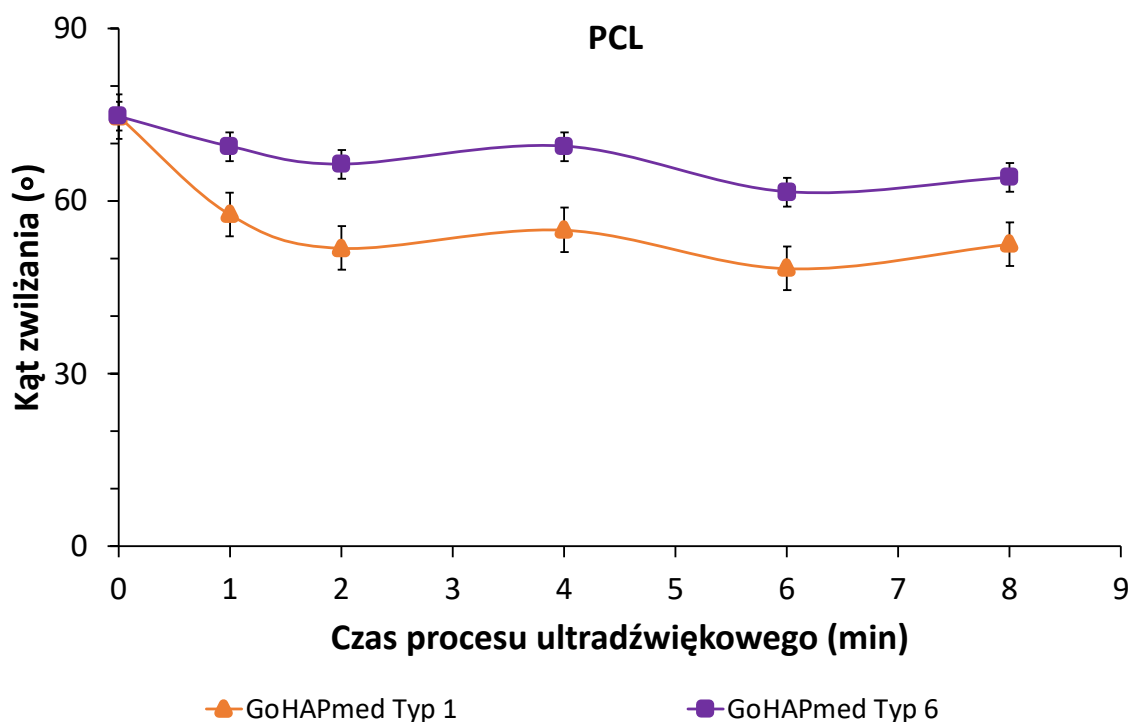
Wpływ czasu procesu ultradźwiękowego SonoNanoCoating oraz wielkości osadzanych w formie powłoki nanocząstek, jak również mechanizm osadzania powłok opisano w publikacji [255]. Poniżej (Rysunek 34) zamieszczono porównanie stopnia pokrycia powierzchni powłoką składającą się z nanocząstek GoHAPmed Typ 3 (14 nm) oraz GoHAPmed Typ 6 (42 nm). Osadzanie nanocząstek GoHAPmed Typ 3 o mniejszej średniej wielkości nanocząstek, prowadzi do uzyskania bardziej jednorodnych powłok w krótszym czasie trwania procesu SonoNanoCoating w porównaniu do osadzania nanocząstek z zawiesiny GoHAPmed Typ 6. Siły przyciągania między nanocząstkami, jak również między nanocząstkami a podłożem to prawdopodobnie siły Van der Waalsa [255,278]. Jednakże, mogą istnieć trzy rodzaje oddziaływań pomiędzy nanocząstkami GoHAPmed a powierzchnią PCL. Jednym z nich jest tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy grupami hydroksylowymi GoHAPmed i grupami funkcyjnymi PCL [255,279,280]. Innymi są oddziaływania elektrostatyczne Ca^{2+} z grupą karboksylową PCL oraz PO_4^{3-} ze szkieletem wodorowęglanowym PCL [255,280]. Trzecim z nich jest rozwinięcie powierzchni właściwej wraz ze zmniejszeniem rozmiaru nanocząstek GoHAP, co wiąże się ze zwiększoną ilością atomów powierzchniowych w stosunku do większych nanocząstek [281]. Może to skutkować lepszą adhezją GoHAPmed Typ 3 o średniej wielkości nanocząstek 14 nm do powierzchni PCL w stosunku do 42 nm GoHAPmed Typ 6.



Rysunek 34. Stopień pokrycia powierzchni PCL powłoką składającą się z nanocząstek GoHAPmed Typ 3 (14 nm) oraz GoHAPmed Typ 6 (42 nm) w funkcji czasu prowadzenia procesu ultradźwiękowego. Powiększenie 1 000 x.

Kąt zwilżania PCL modyfikowanego powłokami GoHAPmed Typ 1 oraz GoHAPmed Typ 6 uległ zmianie już po 1 minucie prowadzenia procesu SonoNanoCoating i ostatecznie został obniżony o ok. 22° poprzez modyfikację powierzchni powłoką GoHAPmed Typ 1 oraz ok. 10° poprzez modyfikację powierzchni powłoką GoHAPmed Typ 6 (Rysunek 35). Po 8

minutach prowadzenia procesu SonoNanoCoating uzyskano powłoki, która charakteryzowały się kątem zwilżania, odpowiednio 53° oraz 64°, korzystnym dla proliferacji komórek.

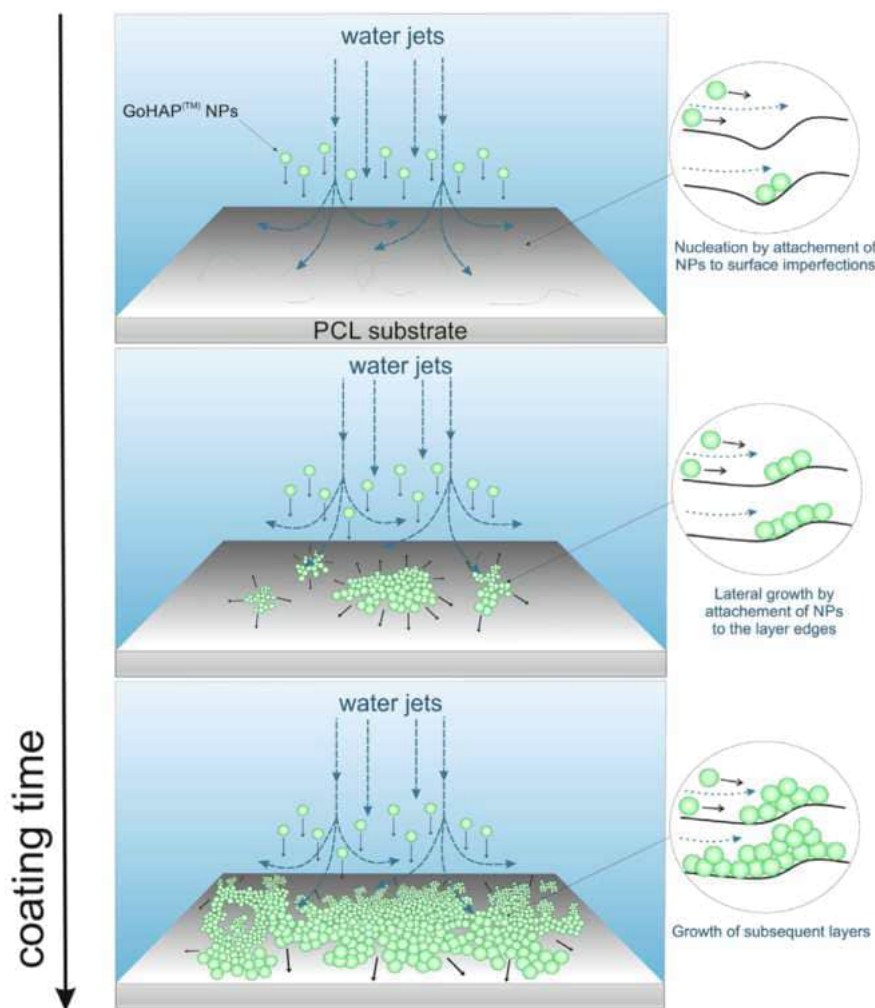


Rysunek 35. Kąt zwilżania podłoża PEEK przed modyfikacją oraz po modyfikacji jego powierzchni powłokami GoHAPmed.

W publikacji [255] opisano mechanizm osadzania powłok hydroksyapatytowych metodą SonoNanoCoating w sposób następujący:

1. Powłoka zarodkuje na niedoskonałościach powierzchni.
2. Powłoka rozprzestrzenia się poprzez przyłączenie nanocząstek do krawędzi powłoki.
3. Powłoka rośnie w kierunku bocznym, tworząc struktury dendrytyczne.

Mniejsze nanocząstki tworzą jednorodne powłoki szybciej w stosunku do ich większych odpowiedników. Materiał modyfikowany metodą ultradźwiękowego osadzania nano-powłok jest silnie hydrofilowy. Wyjątkowość metody polega na utrzymaniu niskiej temperatury procesy ok. 30°C, co pozwala na osadzenie nanocząstek w niezmienionej postaci. Co więcej nie wykorzystuje się substancji chemicznych, które mogłyby negatywnie wpływać na środowisko, bądź w jakimkolwiek stopniu wpływać na cytotoksyczność materiału.



Rysunek 36. Schemat mechanizmu ultradźwiękowego osadzania powłok składających się z nanocząstek hydroksyapatytu GoHAPmed na powierzchni płaskiej pastylki PCL [255].

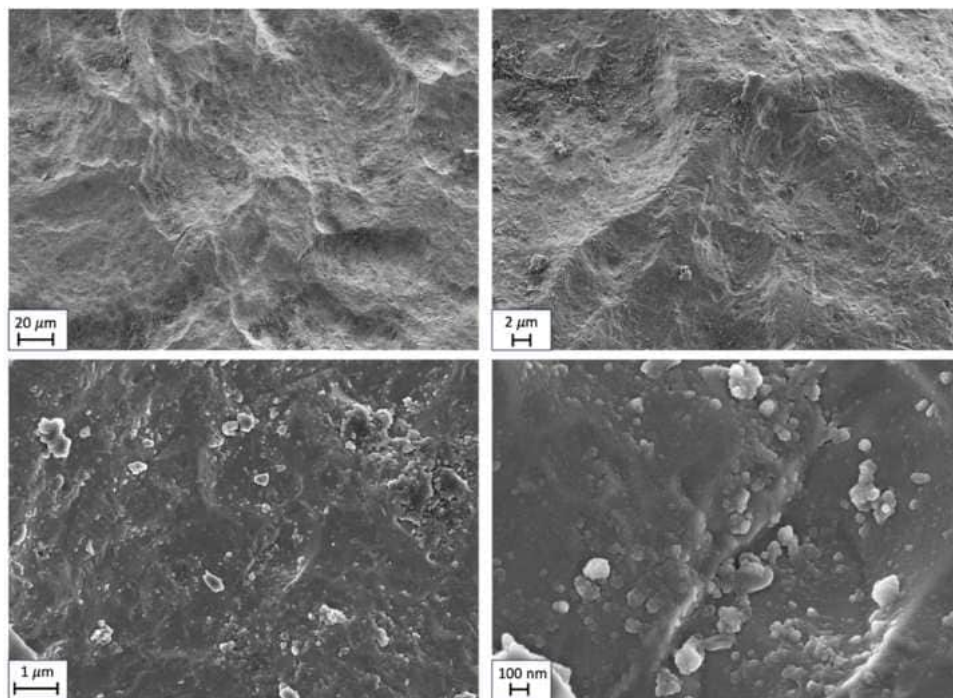
Część wyników dotycząca opisu mechanizmu osadzania powłok zawarta w tym podrozdziale była tematem publikacji pt. Mechanism for sonocoating a polymer surface with nano-hydroxyapatite [255], w której autorka pracy jest drugim autorem. W rozprawie doktorskiej poszerzono zagadnienia mechanizmu osadzania powłok o analizę ilości jonów PO_4^{3-} pochodzących z roztworzenia powłok GoHAPmed Typ 3 oraz GoHAPmed Typ 6 składających się z nanocząstek o wielkości odpowiednio 14 nm oraz 42 nm osadzanych w gradientowo wydłużonym czasie procesu. Ponadto, przeprowadzono rozszerzoną analizę morfologii powłok oraz analizę zmiany kąta zwilżania z uwzględnieniem wielkości nanocząstek składających się na powłokę oraz czasu prowadzenia procesu SonoNanoCoating.

5.3. Metoda ultradźwiękowa – jako uniwersalna metoda modyfikacji powierzchni materiałów.

W rozdziale 4.2. dobrano podstawowe parametry procesu ultradźwiękowego osadzania powłok na podłożu polimerowym z polikaprolaktonu (PCL). Dowiedziono, że możliwe jest osadzanie powłok zarówno na podłożach 3D o strukturze porowatej, jak również płaskich powierzchniach. W tym rozdziale skupiono się na modyfikacji powierzchni różnego rodzaju materiałów (metalicznych, polimerowych, kompozytowych) nanocząstkami GoHAPmed o regulowanej wielkości (10 – 42 nm) w celu wykazania uniwersalności metody ultradźwiękowej.

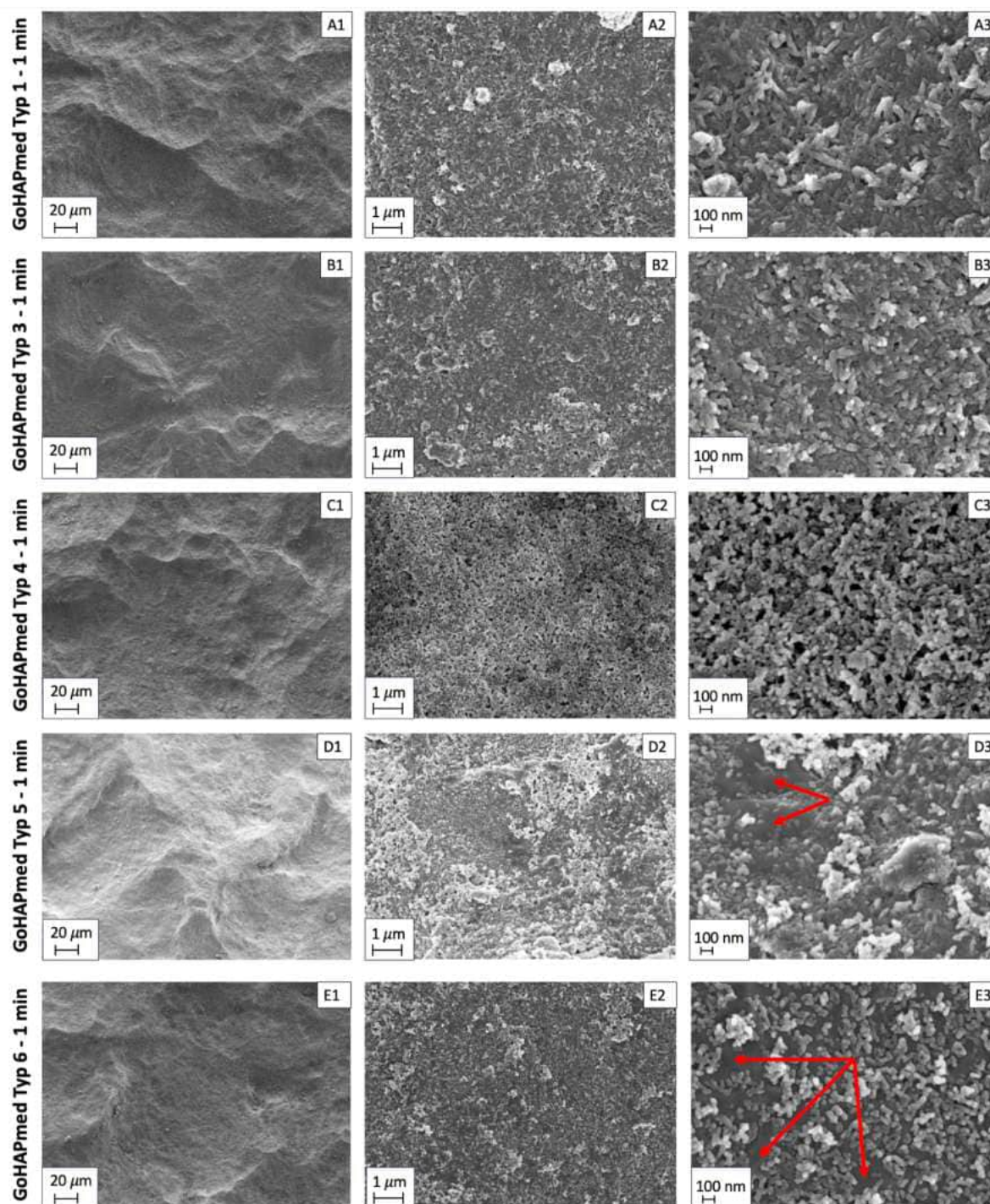
5.3.1. Modyfikacja powierzchni płaskich podłoży tytanu grade 2.

W pierwszym etapie osadzano powłoki nanocząstek GoHAPmed o różnych wielkościach, tj. 10 nm (Typ 1), 14 nm (Typ 3), 26 nm (Typ 4), 30 nm (Typ 5), 42 nm (Typ 6) na próbkach podłoży tytanowych (Rysunek 37). Podłoża tytanu grade 2 miały na celu odwzorowanie powierzchni implantów tytanowych wytworzonych klasycznymi metodami jak np. obróbka skrawaniem.



Rysunek 37. Podłoża tytanowe – próbki blachy tytanowej (titan grade 2) o wymiarach 9 x12 x 2 mm.

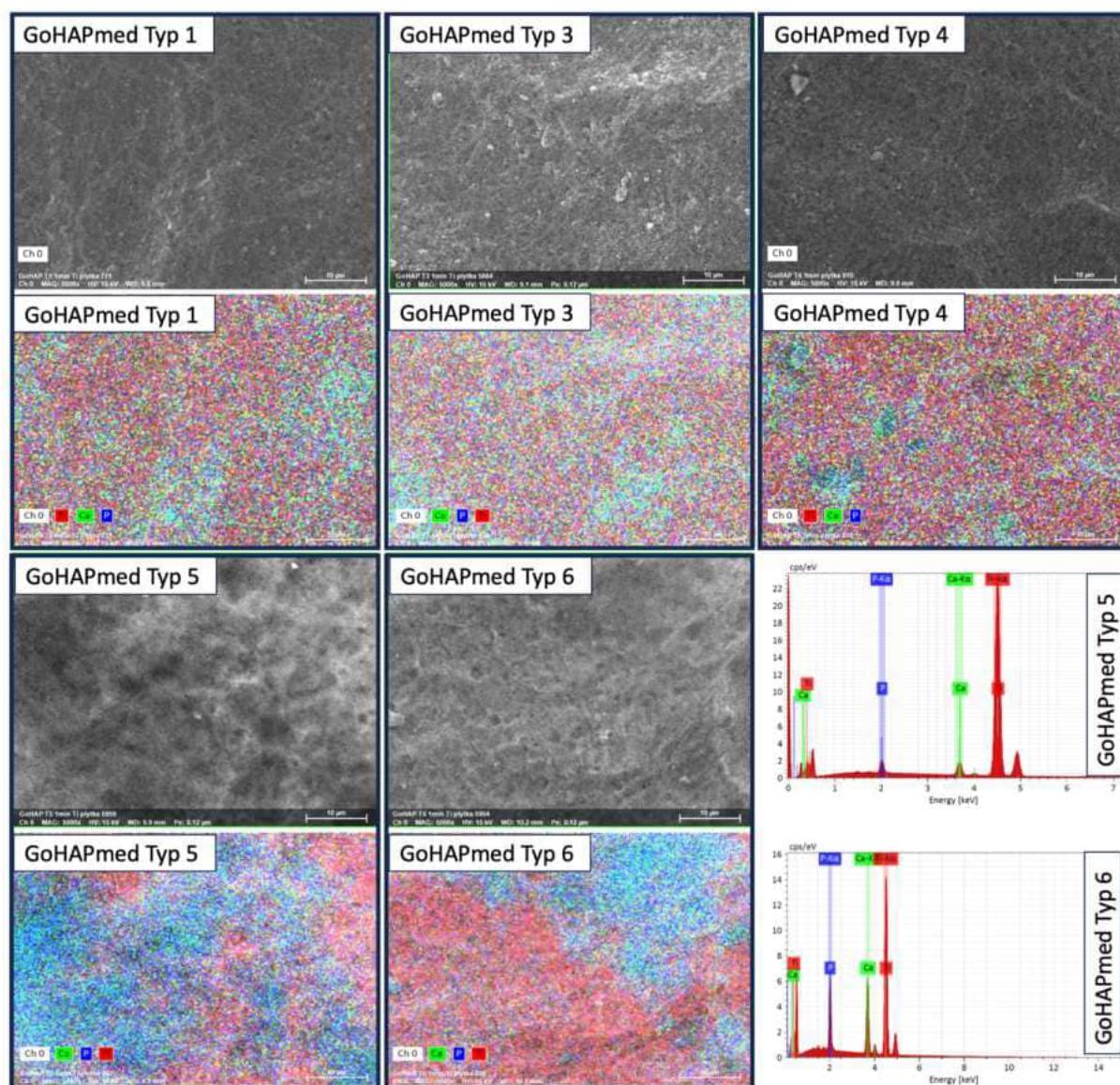
Na Rysunku 38 przedstawiono zdjęcia SEM powłok uzyskanych po 1 minucie prowadzenia procesu ultradźwiękowego. Już jedna minuta procesu SonoNanoCoating pozwoliła na uzyskanie jednorodnych powłok nanocząstek GoHAPmed o wielkości 10 – 26 nm. W przypadku osadzania powłok składających się z nanocząstek o średniej wielkości ok. 30 – 42 nm uzyskano dobre pokrycie powierzchni podłoża tytanowych, jednak na powierzchni próbki obserwowano również prześwity materiału (oznaczone czerwonymi strzałkami), którego powierzchnię powlekano (Rysunek 38, (D3), (E3)). Osadzanie powłok na podłożach tytanowych przeprowadzono również w wydłużonym czasie procesu SonoNanoCoating, odpowiednio 3 min, 6 min, 9 min dla różnych typów nanocząstek GoHAPmed. Obrazowanie SEM wykazało, że dla każdego z tych czasów prowadzenia procesu SonoNanoCoating uzyskano całkowite pokrycie powierzchni powłokami GoHAPmed (Rysunek 40 - Rysunek 44). Powłoki osadzone z zawiesiny nanocząstek GoHAPmed Typ 1 (10 nm) oraz GoHAPmed Typ 3 (14 nm) charakteryzowały się homogeniczną morfologią powłoki, która dla tych typów GoHAPmed była najbardziej jednorodna (Rysunek 40, Rysunek 41). Taki charakter powłok może być powiązany z większymi siłami powierzchniowymi w przypadku mniejszych nanocząstek. Nanocząstki GoHAPmed Typ 1 oraz Typ 3 charakteryzowały się bardzo dużym rozwinięciem powierzchni właściwej, odpowiednio: 206 m²/g oraz 143 m²/g (Tabela 5). Wysokie rozwinięcie powierzchni może przyczyniać się do silniejszych oddziaływań pomiędzy nanocząstkami w warstwie hydroksyapatytu GoHAPmed, co z kolei może wpływać na morfologię powłok. Powłoki osadzone z zawiesin nanocząstek o większej średniej wielkości (26 – 42 nm) zachowywały ciągłość na powierzchni próbki, jednak charakteryzowały się występowaniem wyspowych zgrubień powłoki (Rysunek 42 - Rysunek 44).



Rysunek 38. Powłoki składające się z nanocząstek o różnej wielkości nanocząstek osadzone na podłożach tytanowych (grade 2): A1-A3) GoHAPmed Typ 1 (10 nm); B1-B3) GoHAPmed Typ 3 (14 nm); C1-C3) GoHAPmed Typ 4 (26 nm); D1-D3) GoHAPmed Typ 5 (30 nm); E1-E3) GoHAPmed Typ 6 (42 nm).

Mapa pierwiastkowa wykonana techniką spektroskopii z dyspersją energii (EDS) uzyskana z analizy powierzchni podłoży tytanowych powlekanych nanocząstkami GoHAPmed potwierdziła, że najlepszą jednorodność powłoki uzyskano w przypadku osadzania nanocząstek

o mniejszej średniej wielkości nanocząstek, tj. GoHAPmed Typ 1 (10 nm), GoHAPmed Typ 3 (14 nm), GoHAPmed Typ 4 (26 nm). Dla nanocząstek o średniej wielkości od ok. 30 – 42 nm obserwowano wyspowe skupiska nanocząstek. Wyższa intensywność koloru niebieskiego i seledynowego na mapach EDS w tych miejscach, wskazuje na losowe występowanie skupisk nanocząstek na uzyskanej powłoce (Rysunek 39).



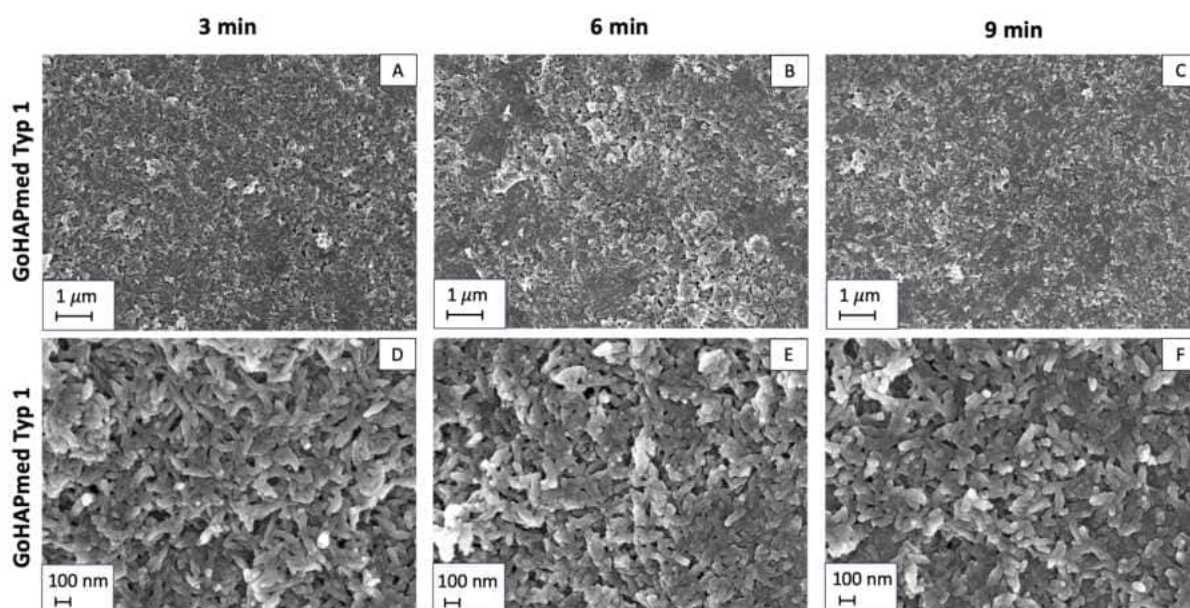
Rysunek 39. Mapa pierwiastkowa EDS powłok hydroksyapatytowych naniesionych na powierzchnię podłoża tytanowego, uzyskane po 1 minucie procesu ultradźwiękowego.

Wydłużenie czasu prowadzenia procesu ultradźwiękowego osadzania nanocząstek na podłożu tytanowym do odpowiednio: 3 min, 6 min oraz 9 min, pozwoliło na uzyskanie ciągłych powłok na powierzchni modyfikowanego materiału osadzanych z każdego typu nanocząstek

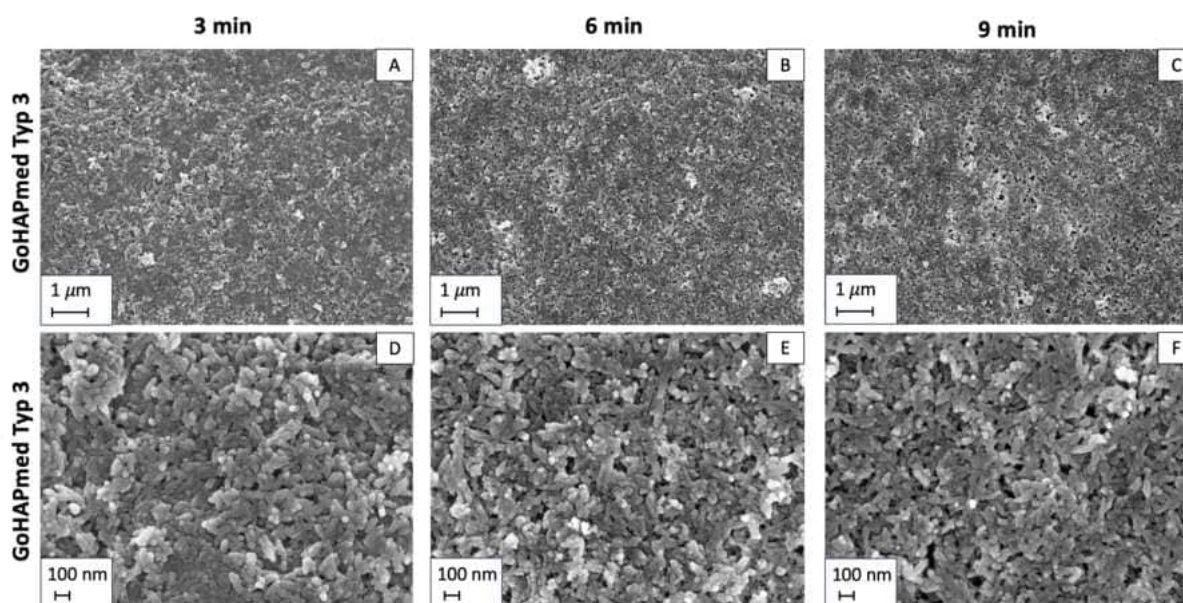
GoHAPmed. Wynik ten dowodzi, że osadzenie ciągłych powłok jest również możliwe dla nanocząstek powyżej 30 nm poprzez wydłużenie czasu procesu SonoNanoCoating. W przypadku tych nanocząstek powłoki miały najbardziej homogeniczny charakter, gdy czas prowadzenia procesu SonoNanoCoating wynosił 6 min (Rysunek 44, Rysunek 50). Regulowany czas prowadzenia procesu ultradźwiękowego nie wpłynął znacząco na morfologię powłok osadzonych z nanocząstek GoHAPmed o wielkości 10 nm oraz 14 nm. W każdym z zastosowanych czasów długości prowadzenia procesu SonoNanoCoating uzyskano homogeniczną morfologię powłok hydroksyapatytowych (Rysunek 40, Rysunek 41). Charakterystyczne struktury „wysp” nanocząstek zaobserwowano w przypadku nanocząstek o wielkości 26 nm. Jednak struktury te nie świadczą o nieciągłym charakterze powłok, tak jak to obserwowano w przypadku pokryć na powierzchni PCL, a wynikają z tworzenia się kolejnej warstwy nanocząstek na powierzchni ciągłej powłoki złożonej z GoHAPmed Typ 4 (Rysunek 42). Wyniki obserwacji wskazują, że optymalnym rozwiązaniem będzie dobór czasu procesu ultradźwiękowego osadzania powłok hydroksyapatytowych zależnie od wielkości osadzanych nanocząstek GoHAPmed. W związku z tym wytypowano optymalne czasy nanoszenia powłok hydroksyapatytowych na powierzchnię płaskich próbek tytanowych.

Tabela 6. Optymalny czas osadzania powłok GoHAPmed na podłożu tytanu grade 2.

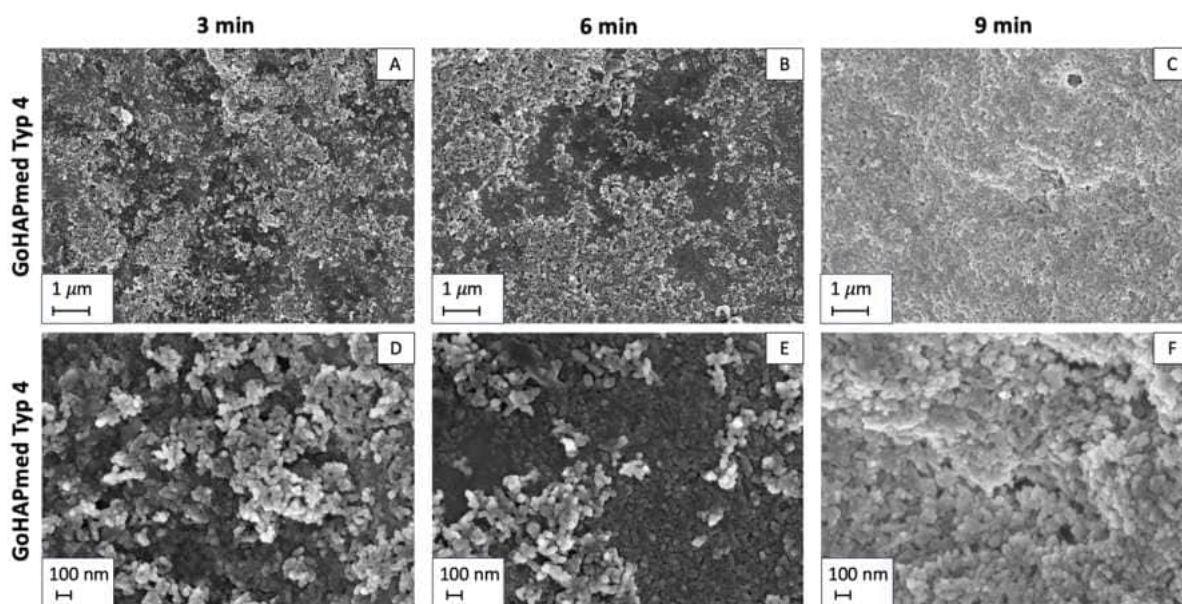
Rodzaj podłoża	Rodzaj powłoki	Optymalny czas osadzania powłoki
Tytan grade 2	GoHAPmed Typ 1	1 min
Tytan grade 2	GoHAPmed Typ 3	3 min
Tytan grade 2	GoHAPmed Typ 4	3 min
Tytan grade 2	GoHAPmed Typ 5	6 min
Tytan grade 2	GoHAPmed Typ 6	6 min



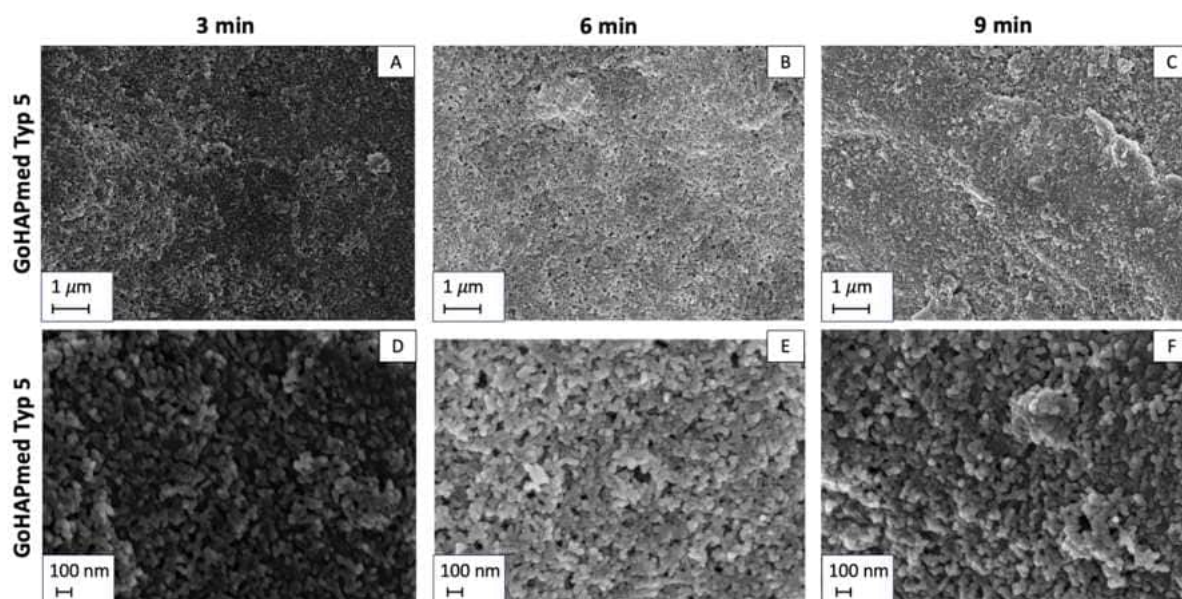
Rysunek 40 - Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 1 (10 nm) osadzone na podłożach tytanowych w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min. Przybliżenia odpowiednio 25 000×, 100 000×.



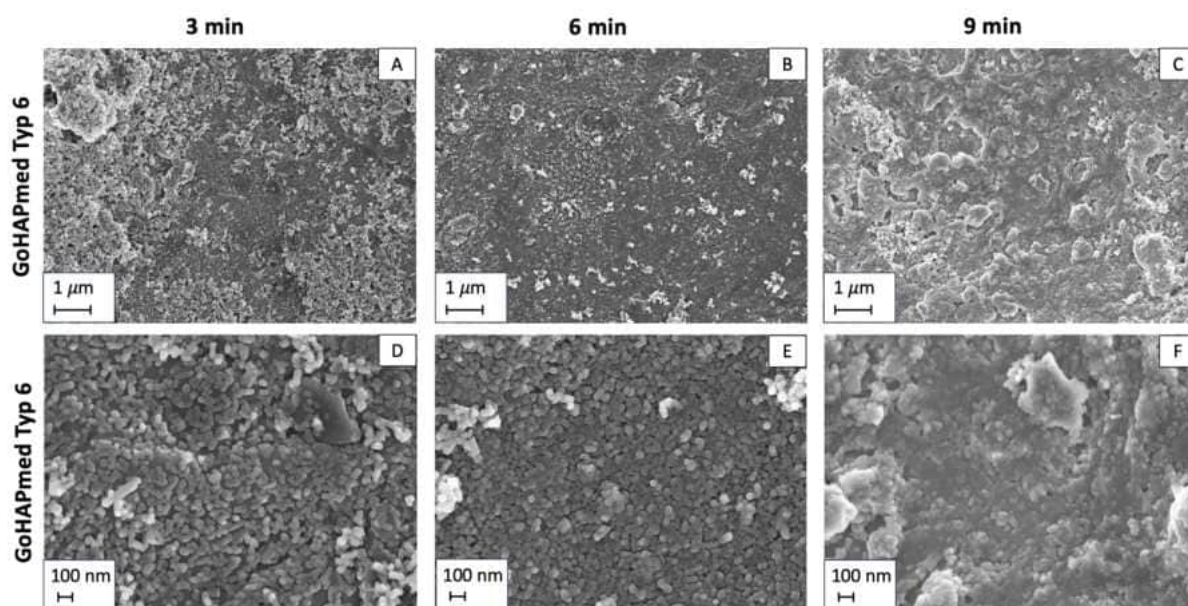
Rysunek 41. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 3 (14 nm) osadzone na podłożach tytanowych w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min. Przybliżenia odpowiednio 25 000×, 100 000×.



Rysunek 42. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 4 (26 nm) osadzone na podłożach tytanowych w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min. Przybliżenia odpowiednio 25 000×, 100 000×.



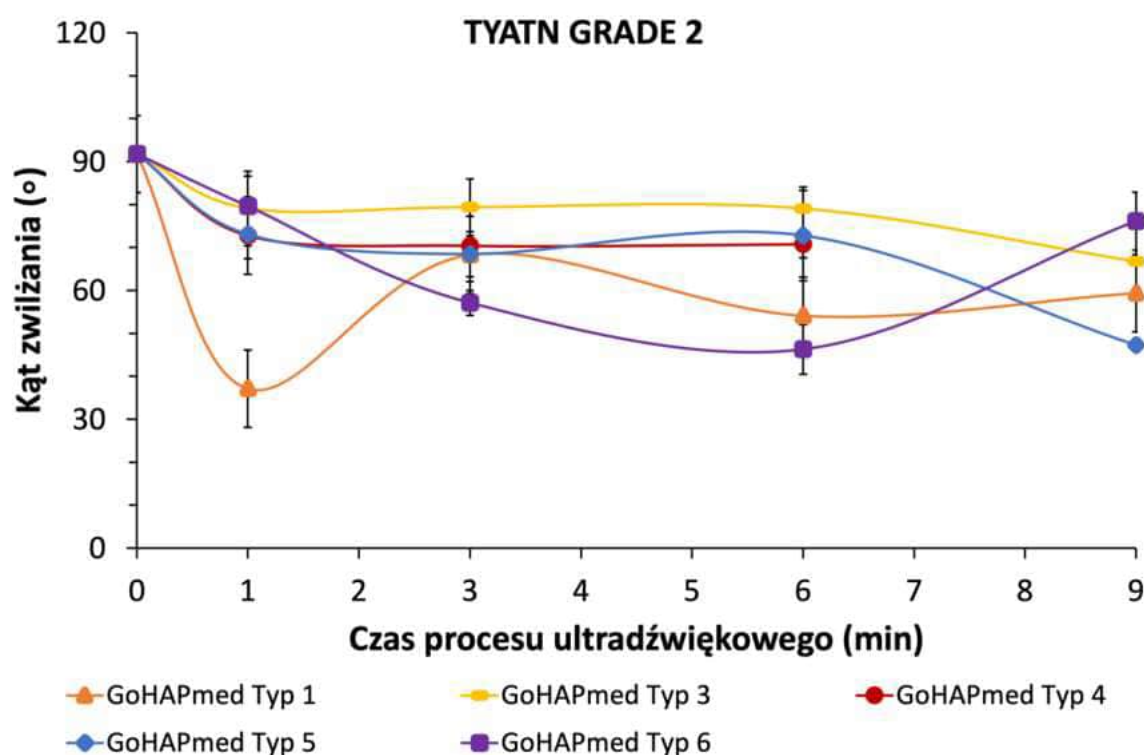
Rysunek 43. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 5 (30 nm) osadzone na podłożach tytanowych w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min. Przybliżenia odpowiednio 25 000×, 100 000×.



Rysunek 44. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 6 osadzone na podłożach tytanowych w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min. Przybliżenia odpowiednio 25 000×, 100 000×.

Badanie kąta zwilżania powierzchni podłoża tytanu grade 2 wykazało, że naniesienie powłoki hydroksyapatytowej zmniejsza kąt zwilżania powierzchni. Doniesienia literaturowe wskazują, że komórki bardzo dobrze przylegają do powierzchni, które charakteryzują się kątem zwilżania pomiędzy 70° a 40° (277,278). Każda powłoka otrzymywana z różnego typu nanocząstek GoHAPmed charakteryzowała się innym kątem zwilżania. Zjawisko to powiązane jest z wielkością nanocząstek, z których składała się powłoka oraz siłą przylegania do siebie nanocząstek. Kąt zwilżania w przypadku nanocząstek o średniej wielkości 14 nm (Typ 3), 26 nm (Typ 4) oraz 30 nm (Typ 5) ustalił się na zbliżonym poziomie dla powłok uzyskanych po 1 min, 3 min oraz 6 min procesu SonoNanoCoating i wnosił odpowiednio ok.: 79° , 71° oraz 71° . Zatem modyfikacja powierzchni tytanu grade 2 nano-powłokami GoHAP Typ 3, GoHAP Typ 4 oraz GoHAP Typ 5 spowodowała obniżenie kąta zwilżania od 12° do 21° . W przypadku najdrobniejszych nanocząstek o średnim rozmiarze ok. 10 nm (GoHAP Typ 1) największą zmianę kąta zwilżania o ok. 54° odnotowano dla powłoki naniesionej w czasie 1 minuty prowadzenia procesu SonoNanoCoating. Kąt zwilżania powłoki GoHAPmed Typ 1 naniesionej w czasie 1 minuty procesu SonoNanoCoating wynosił $37 \pm 4^\circ$ i był to najniższy kąt jaki uzyskano po modyfikacji powierzchni. Powłoki GoHAPmed Typ 1 nanoszone w dłuższym czasie prowadzenia procesu SonoNanoCoating, tj. 3 min, 6 min oraz 9 min charakteryzowały się kątem zwilżania w przedziale od 54° do 68° . Zmiana kąta zwilżania powłoki złożonej z tego samego typu nanocząstek, jednak w innym czasie może wynikać np. z zagęszczenia

nanocząstek. Kąt zwilżania materiału modyfikowanego nanocząstkami o największym średnim rozmiarze, tj. GoHAPmed Typ 6 (42 nm) stopniowo malał, co korelowało z czasem nanoszenia powłoki metodą SonoNanoCoating, aż do osiągnięcia ok. 46°. W tym przypadku najniższy kąt zwilżania powierzchni obserwowano dla 6 min prowadzenia procesu SonoNanoCoating. Czas ten wskazano jako optymalny dla uzyskania powłoki z nanocząstek GoHAPmed o wielkości 42 nm (Tabela 11). Następnie kąt zwilżania wzrósł, co może wiązać się z częściowym wymywaniem nanocząstek powłoki po przekroczeniu optymalnego czasu działania energią fal ultradźwiękowych na powierzchnię materiału.



Rysunek 45. Kąt zwilżania podłoża tytanu grade 2 przed modyfikacją oraz po modyfikacji jego powierzchni powłokami GoHAPmed.

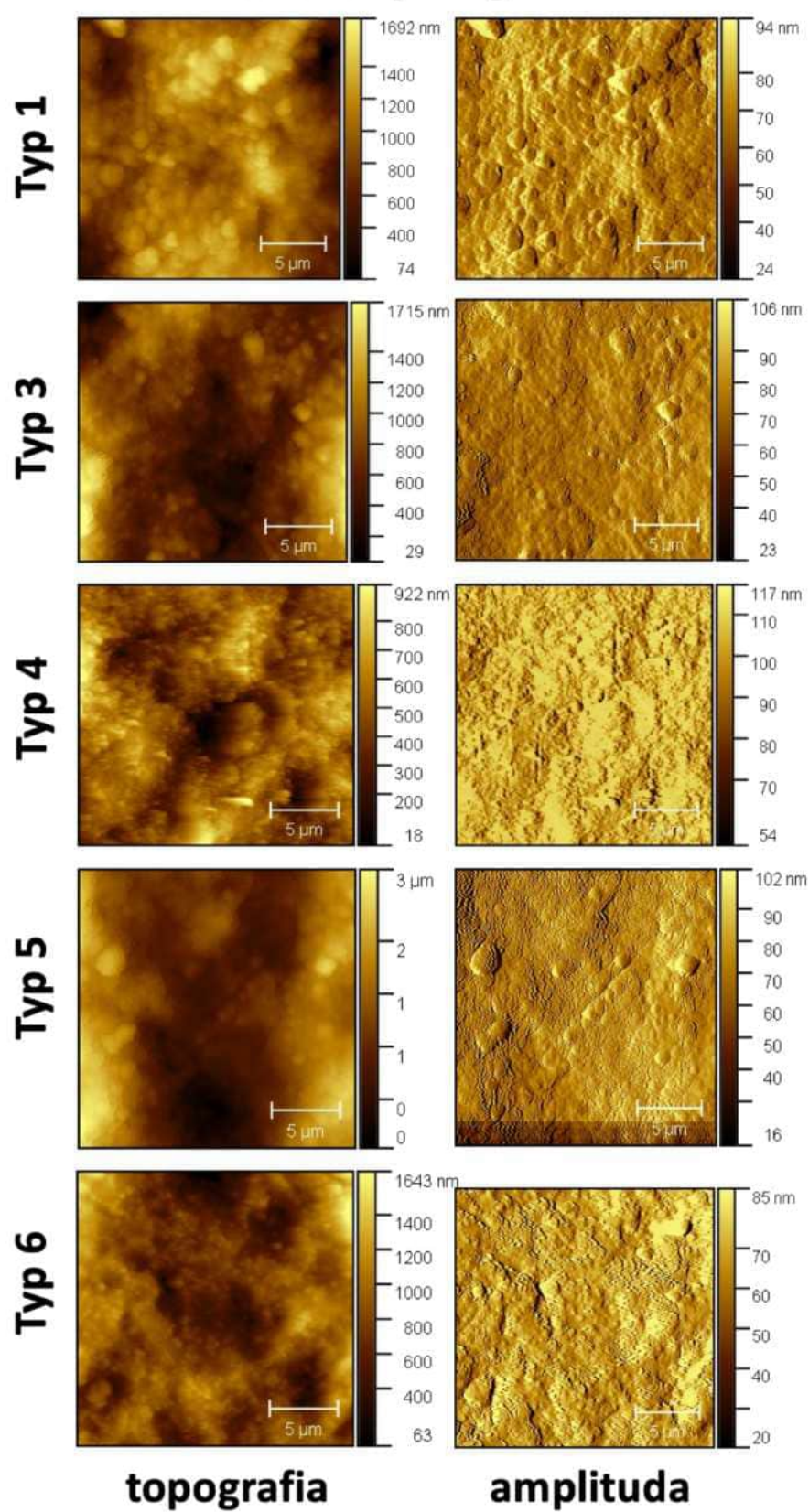
Powłoki GoHAPmed wytworzone na podłożu tytanu grade 2 poddano badaniom typu Scratch Test wykonywanym na mikroskopie sił atomowych (AFM). Powłoki wytworzono z zastosowaniem metody SonoNanoCoating. Czas prowadzenia procesu ustalono na podstawie Tabeli 6. Obrazy podłoży po zarysowaniu sondą AFM przedstawiono na Rysunek 46. Próbkę Ti wykazały bardzo dużą odporność na zarysowanie. Nanocząstki składające się na powłoki GoHAPmed były zwarte i bardzo dobrze przylegały do podłoża tytanowego. Wyznaczono głębokość zadrapań warstw GoHAPmed, na podstawie których możliwa jest ocena grubości powłok hydroksyapatytowych (Tabela 8). Za optymalną grubość powłoki uznano 250 ± 50 nm.

Taka grubość powłoki hydroksyapatytu GoHAPmed pozwala na uzyskanie właściwości powierzchni stwarzających odpowiednie warunki dla komórek takich jak kąt zwilżania, chropowatość powierzchni, biokompatybilność, wydzielanie sygnałów wapniowych, przy czym zachowują dobrą elastyczność i adhezję do podłoża. Zbyt grube powłoki mogą ulegać delaminacji. W przypadku nanocząstek GoHAPmed o średnim rozmiarze 10 nm – 26 nm udało się uzyskać powłoki o grubości odpowiednio 250 nm, 212 nm, 166 nm, przy czym wraz ze wzrostem nanocząstek grubość powłok malała. Zastosowanie nanocząstek o średniej wielkości 30 nm oraz 42 nm skutkowało zaburzeniem tej tendencji i uzyskiwanie powłok o randomowej grubości tj. 50 nm oraz 352 nm. W celu osiągnięcia maksymalnej indentacji najwyższą wartość obciążenia odnotowano dla powłok GoHAPmed Typ 1, GoHAPmed Typ 3 oraz GoHAPmed Typ 5, co oznacza, że powłoki te były najtwardsze. Twardość powłok hydroksyapatytowych naniesionych na podłoża tytanowe może wynikać z tego, że w zależności od typu nanocząstek GoHAPmed powłoki były mniej lub bardziej zwarte. Ponadto powłoki GoHAPmed Typ 1 oraz GoHAPmed Typ 3 naniesione na podłożę tytanu grade 2 charakteryzowały się najwyższymi parametrami chropowatości odpowiednio, 329 oraz 326 nm. Chropowatość powłok składające się z nanocząstek o średnim rozmiarze powyżej 20 nm była znacząco niższa i znajdowała się w przedziale 186 – 276 nm.

Tabela 7. Chropowatość RMS powierzchni tytanu grade 2 modyfikowanego powłokami GoHAPmed [256].

Nazwa powłoki na powierzchni podłoża tytanu grade 2	Chropowatość RMS (nm)
GoHAPmed Typ 1	329 ± 64
GoHAPmed Typ 3	326 ± 56
GoHAPmed Typ 4	186 ± 26
GoHAPmed Typ 5	276 ± 97
GoHAPmed Typ 6	247 ± 4

Podłoże tytan grade 2



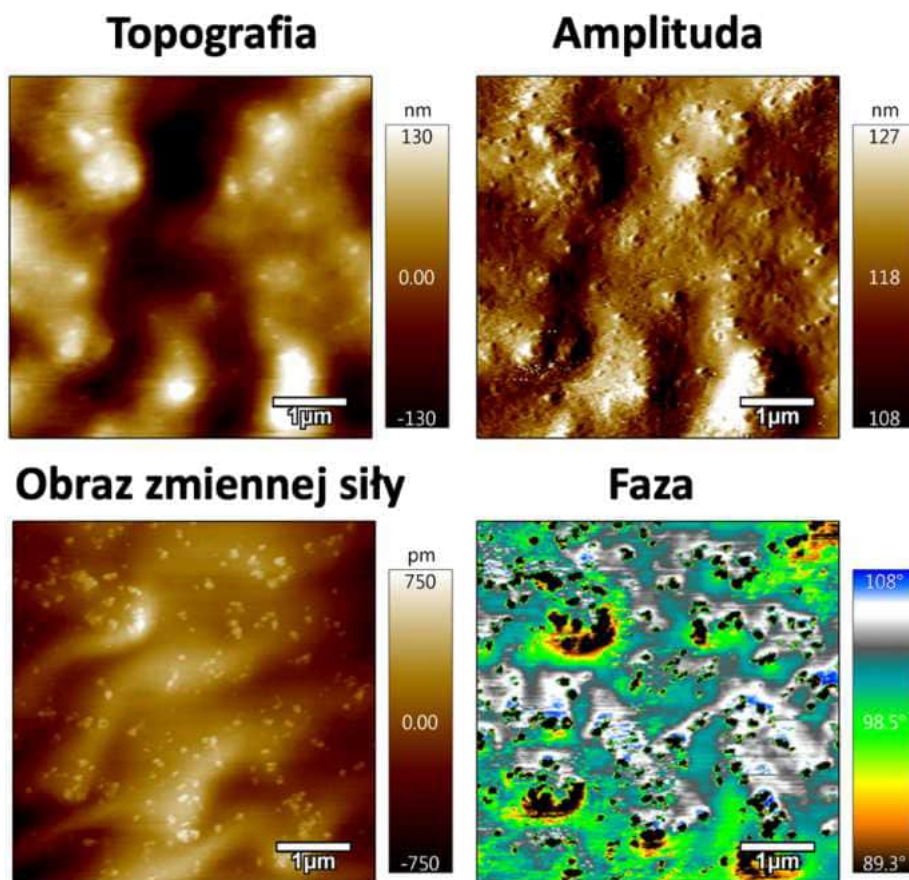
Rysunek 46. Obrazy AFM powłok GoHAPmed składających się z różnej wielkości nanocząstek uzyskane metodą ultradźwiękową na podłożu z tytanu grade 2 [256].

Tabela 8. Parametry powłok GoHAPmed naniesionych na podłoża tytanowe wyznaczone mikroskopią AFM, tj. głębokość zadrapania (z ang. Max. Indentation), obciążenie, przy którym dana głębokość zadrapania została uzyskana oraz obciążenie krytyczne [256].

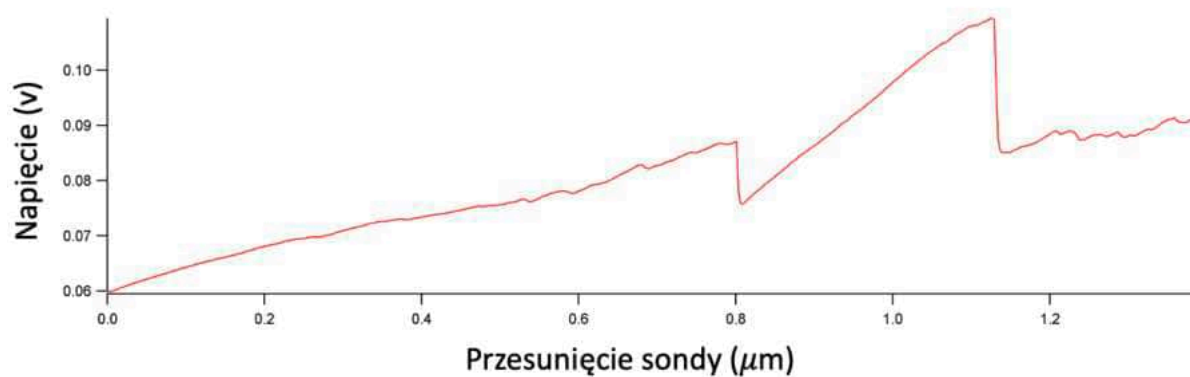
Nazwa powłoki na powierzchni tytanu grade 2	Głębokość zadrapania (Max. Indentation)	Obciążenie (przy max. indentation)	Obciążenie krytyczne
	(nm)	(μN)	(μN)
GoHAPmed Typ 1	250	44	17
GoHAPmed Typ 3	212	45	28
GoHAPmed Typ 4	166	21	15
GoHAPmed Typ 5	50	45	45
GoHAPmed Typ 6	352	39	10

Silę adhezji nanocząstek do podłoża tytanu grade 2 wyznaczono poprzez zdrapywanie (ang. scratch test) pojedynczych aglomeratów nanocząstek GoHAPmed naniesionych na powierzchnię podłoża tytanowych. Przykładowe obrazy uzyskane z mikroskopu AFM dla pojedynczych aglomeratów nanocząstek GoHAPmed Typ 3 (14 nm) na powierzchnię podłoża tytanu grade 2 przedstawiono na Rysunek 47. Na wykresie (Rysunek 48) przedstawiono ślad sondy, która przemieszcza się na powierzchni próbki, napotykając na swojej drodze aglomeraty nanocząstek, stąd pokonana odległości w μm . Sonda poruszając się w poprzek długiej osi ulega skręceniu, co jest rejestrowane w postaci napięcia skrętnego (z ang. lateral voltage (V)). Na przedstawionym wykresie zarejestrowano moment, gdy sonda napotkała na swej drodze aglomerat nanocząstek GoHAPmed. Zmierzono napięcie skrętne dla momentów zadrapania nanocząstek. Napięcie skrętne przeliczono na siłę jaką sonda wywierała na nanocząstki z uwzględnieniem przelicznika $\alpha = 0,67 \mu\text{N/mV}$ wyznaczonego podczas kalibracji. Określono siłę równoległą do powierzchni, z jaką sonda oddziaływała na nanocząstki przylegające do powierzchni w momencie ich oderwania się, którą można utożsamić z siłą adhezji nanocząstek do podłoża (Tabela 9). Najwyższą siłę adhezji odnotowano dla nanocząstek GoHAPmed Typ 3, jednak dla tej powłoki otrzymano również największy błąd pomiarowy. Jednakże warto zwrócić uwagę, iż siła adhezji była znacząco wyższa dla nanocząstek o średniej wielkości nanocząstek pomiędzy 10 a 42 nm.

GoHAPmed Typ 3



Rysunek 47. Obraz AFM uzyskany dla pojedynczych agregatów GoHAPmed Typ 3 naniesionych na podłoże z tytanu grade 2 metodą ultradźwiękową [256].



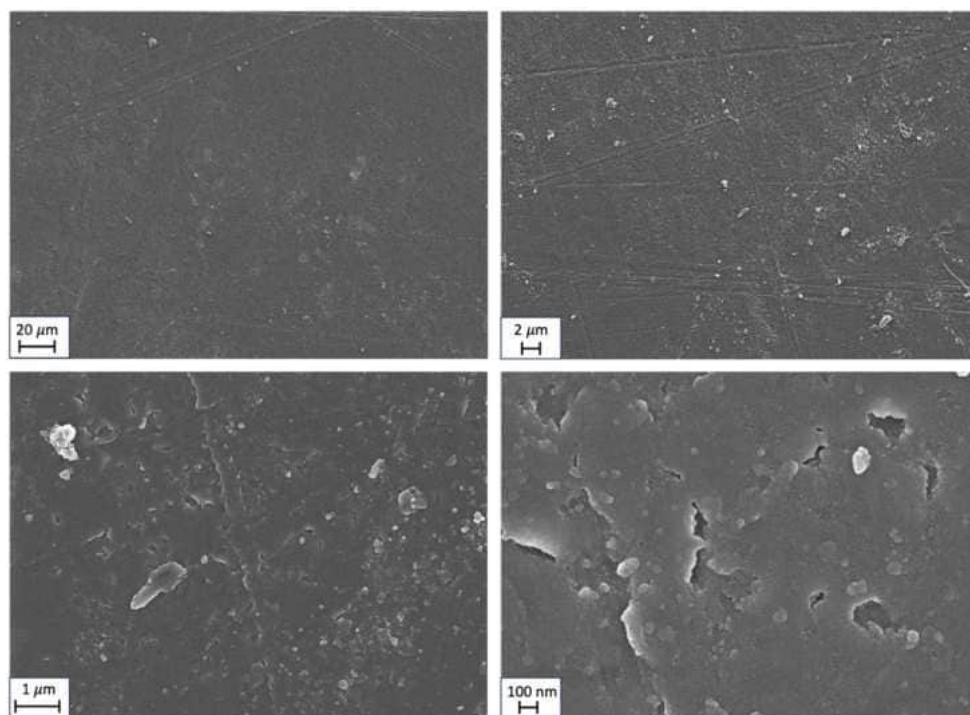
Rysunek 48. Przykład wykresu przebiegu sondy zdrapującej pojedynczy aglomerat [256].

Tabela 9. Siła adhezji powłok GoHAPmed do powierzchni podłoża tytanu grade 2 [256].

Nazwa powłoki na powierzchni podłoża tytanu grade 2	Siła adhezji (μN)
GoHAPmed Typ 1	$7,37 \pm 2,01$
GoHAPmed Typ 3	$10,05 \pm 6,13$
GoHAPmed Typ 4	$8,71 \pm 4,69$
GoHAPmed Typ 5	$5,36 \pm 2,01$
GoHAPmed Typ 6	$6,03 \pm 2,68$

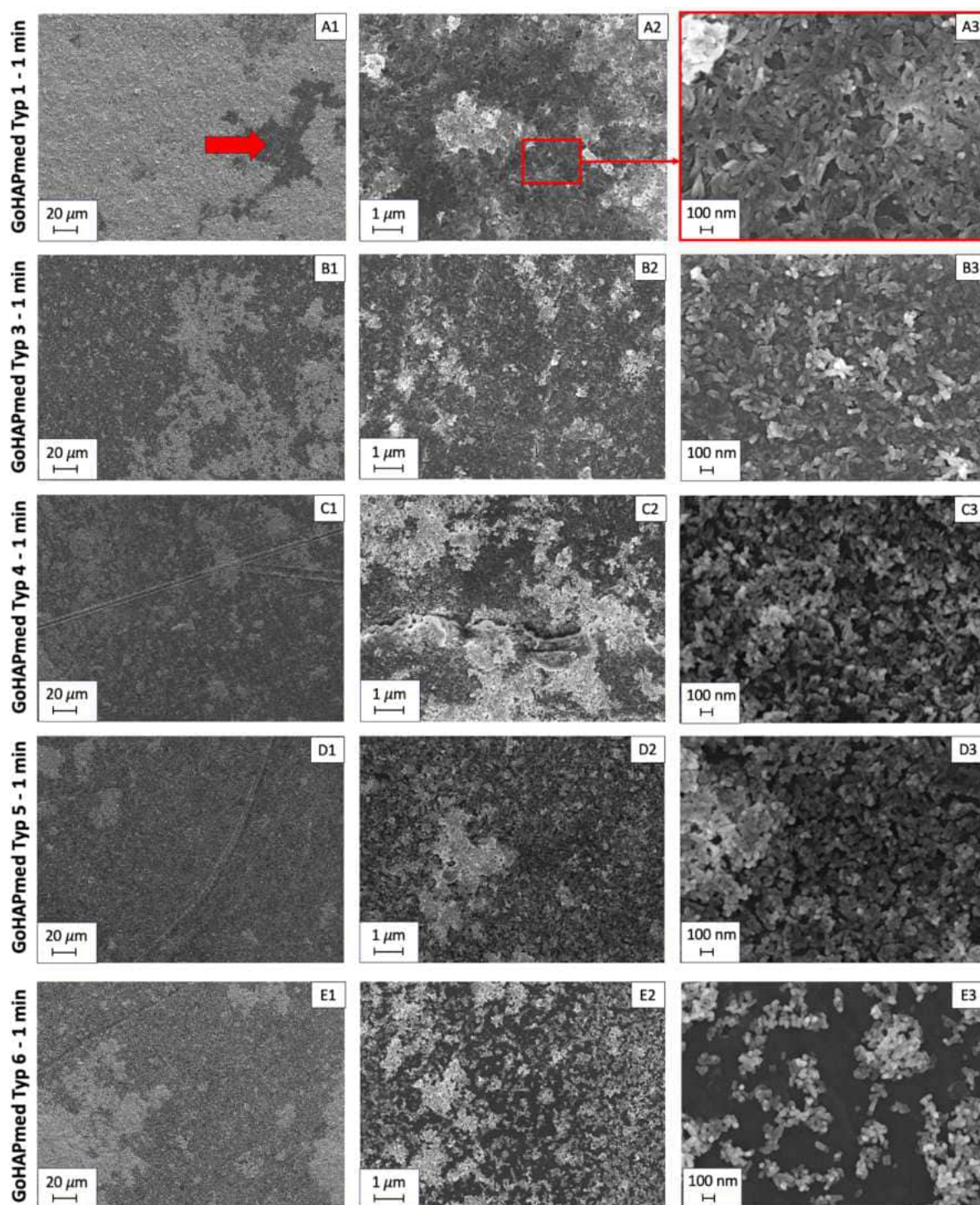
5.3.2. Modyfikacja powierzchni płaskich podłoży PEEK.

W kolejnym etapie modyfikowano powierzchnię płaskich próbek polimerowych o wymiarach ok. 9 x 12 mm wytworzonych z polieteroeteroketnu (PEEK). Powierzchnię próbek modyfikowano z zastosowaniem metody SonoNanoCoating o parametrach analogicznych jak dla podobnych próbek wykonanych z tytanu (Rozdział 4.3.2.1.).



Rysunek 49. Podłoże PEEK – płaska próbka o wymiarach 9 x 12 x 1,5 mm.

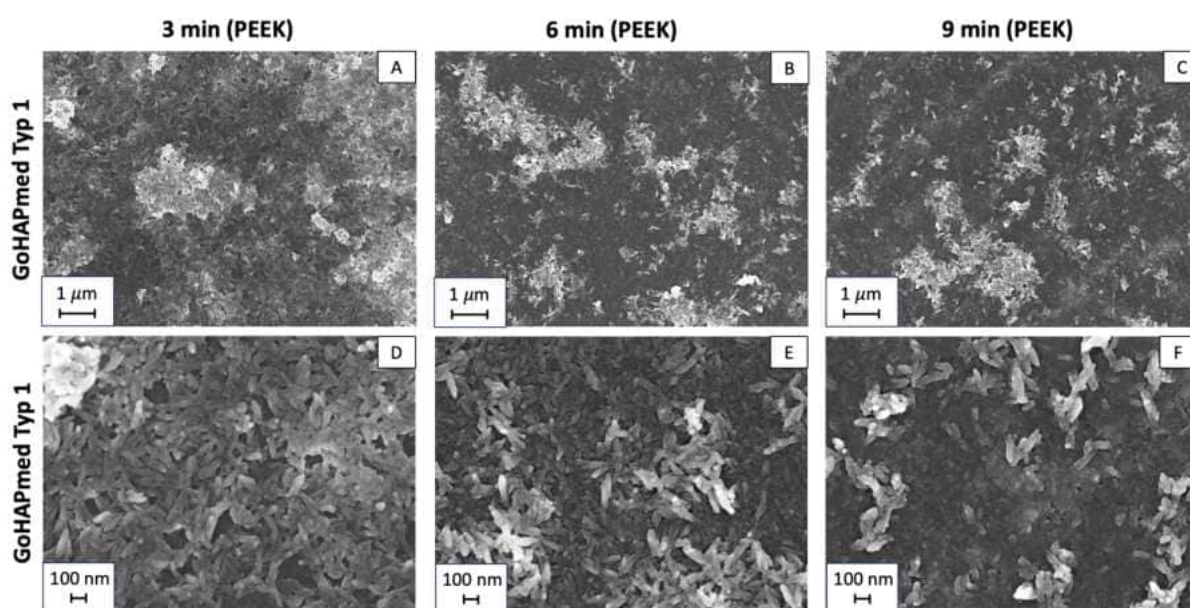
W przypadku prowadzenia procesu SonoNanoCoating przez okres 1 min ciągłość powłoki uzyskano przy osadzaniu nanocząstek o wielkości od 10 – 30 nm. Jednakże wyłącznie powłoka uzyskana z nanocząstek GoHAPmed Typ 3 o średniej wielkości nanocząstek ok. 14 nm miała zbitą strukturę powierzchni powłoki (Rysunek 50 (B1-B3)). Na zdjęciu w przybliżeniu 1000× (Rysunek 50 (A1)) widoczne są ciemniejsze obszary powłoki, które bez odpowiedniego przybliżenia wyglądają jak miejscowe prześwity powierzchni materiału powlekanego. Jednak po uzyskaniu większych powiększeń dowiedziono, że w miejscach tych powłoka zachowuje ciągłość, jednak charakteryzuje się miejscowym pocienieniem. W przypadku nanocząstek GoHAPmed Typ 1 (Rysunek 50 (A1-A3)), GoHAPmed Typ 4 (Rysunek 50 (C1-C3)) oraz GoHAPmed Typ 5 (Rysunek 50 (D1-D3)) obserwowano porowatość powłoki. Natomiast osadzanie nanocząstek o największym średnim rozmiarze – 42 nm, skutkowało uzyskaniem powłoki o wyspowym charakterze (Rysunek 50 (E1-E3)). Dodatkowo na powłokach o charakterze ciągłym zaobserwowano proces tworzenia się kolejnej warstwy nanocząstek – charakterystyczne wyspowe struktury.



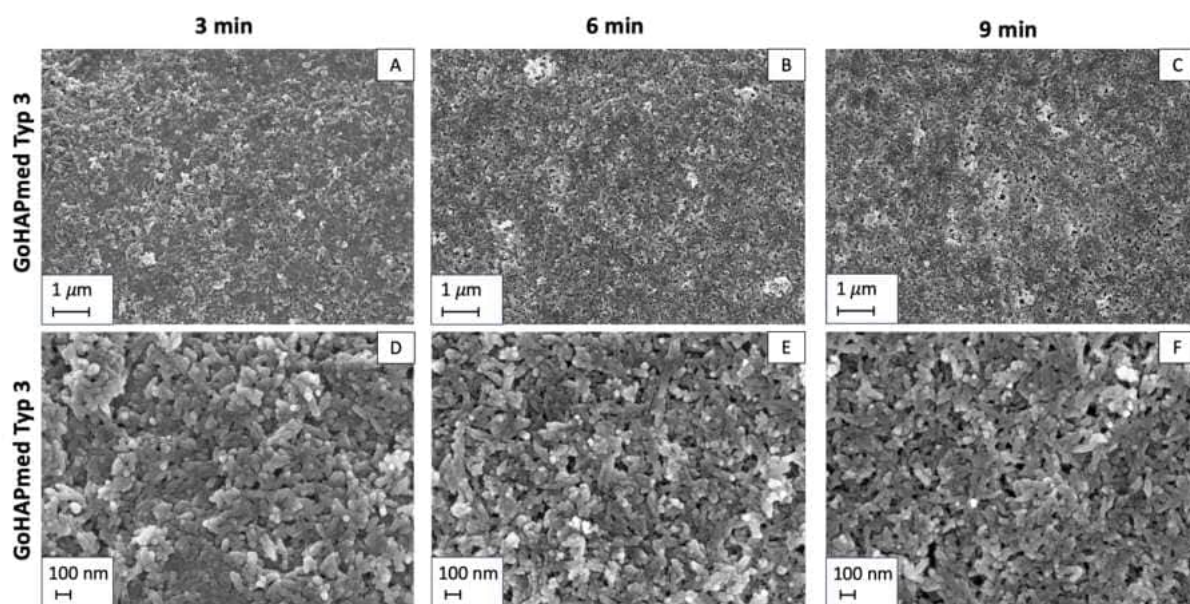
Rysunek 50. Powłoki składające się z nanocząstek o różnej wielkości nanocząstek osadzone na podłożach PEEK: A1-A3) GoHAPmed Typ 1 (10 nm); B1-B3) GoHAPmed Typ 3 (14 nm); C1-C3) GoHAPmed Typ 4 (26 nm); D1-D3) GoHAPmed Typ 5 (30 nm); E1-E3) GoHAPmed Typ 6 (42 nm).

Analiza obrazu SEM wskazuje, że ciągłość powłoki na powierzchni próbek PEEK została uzyskana w każdym z trzech długości zastosowanych czasów (3, 6, 9 min) prowadzenia procesu ultradźwiękowego osadzania nanocząstek GoHAPmed o średniej wielkości 10 – 30 nm.

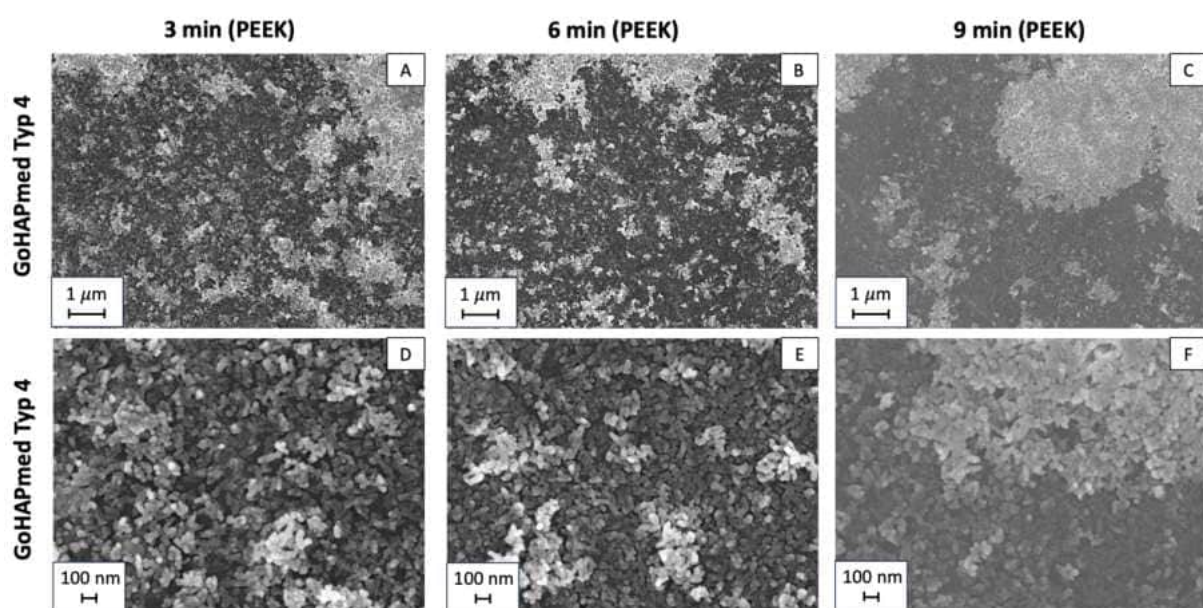
W przypadku prób osadzenia nanocząstek GoHAPmed Typ 6 o średniej wielkości nanocząstek powyżej 40 nm nie udało się uzyskać całkowitego pokrycia modyfikowanego materiału oraz zachować ciągłości powłoki (Rysunek 55). Wyniki te potwierdziły dotychczasowe obserwacje, iż wielkość nanocząstek ma istotny wpływ na formowanie powłok metodą ultradźwiękową. Jednakże na podstawie porównania morfologii powłok uzyskanych z nanocząstek o największym średnim rozmiarze wynoszącym 42 nm uzyskanych na powierzchni podłoża tytanowego (Rysunek 44) a podłoża PEEK (Rysunek 55) można wnioskować, że rodzaj podłoża, którego powierzchnia jest modyfikowana również wywiera istotny wpływ na efektywność osadzania powłok w procesie ultradźwiękowym.



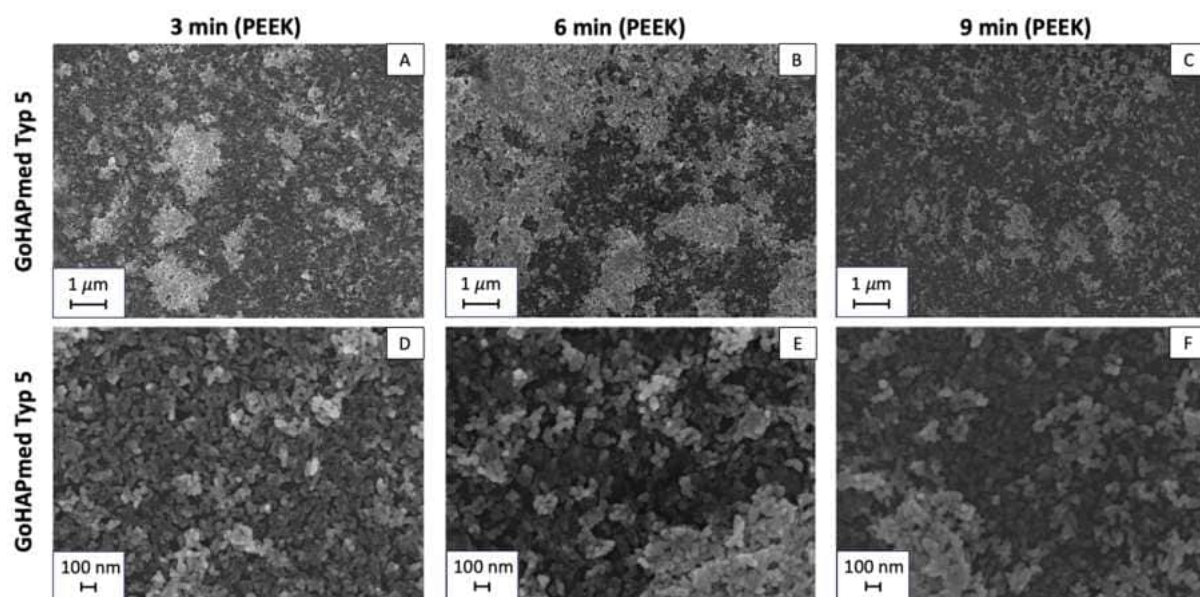
Rysunek 51. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 1 (10 nm) osadzane na podłożach PEEK w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min.



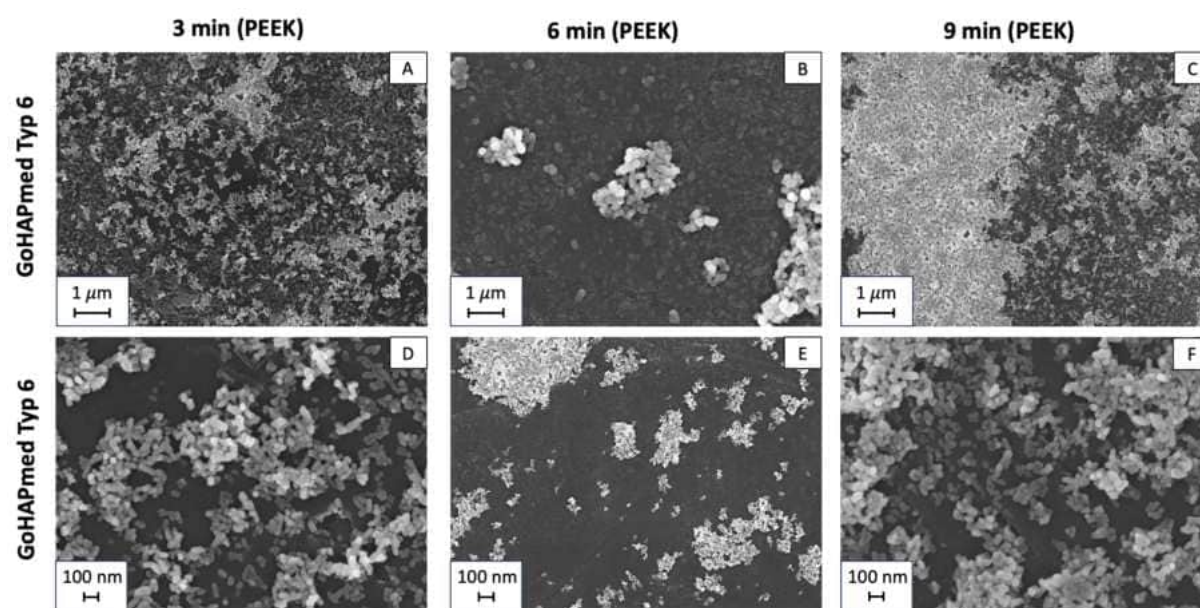
Rysunek 52. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 3 (14 nm) osadzone na podłożach PEEK w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min.



Rysunek 53. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 4 (26 nm) osadzone na podłożach PEEK w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min.

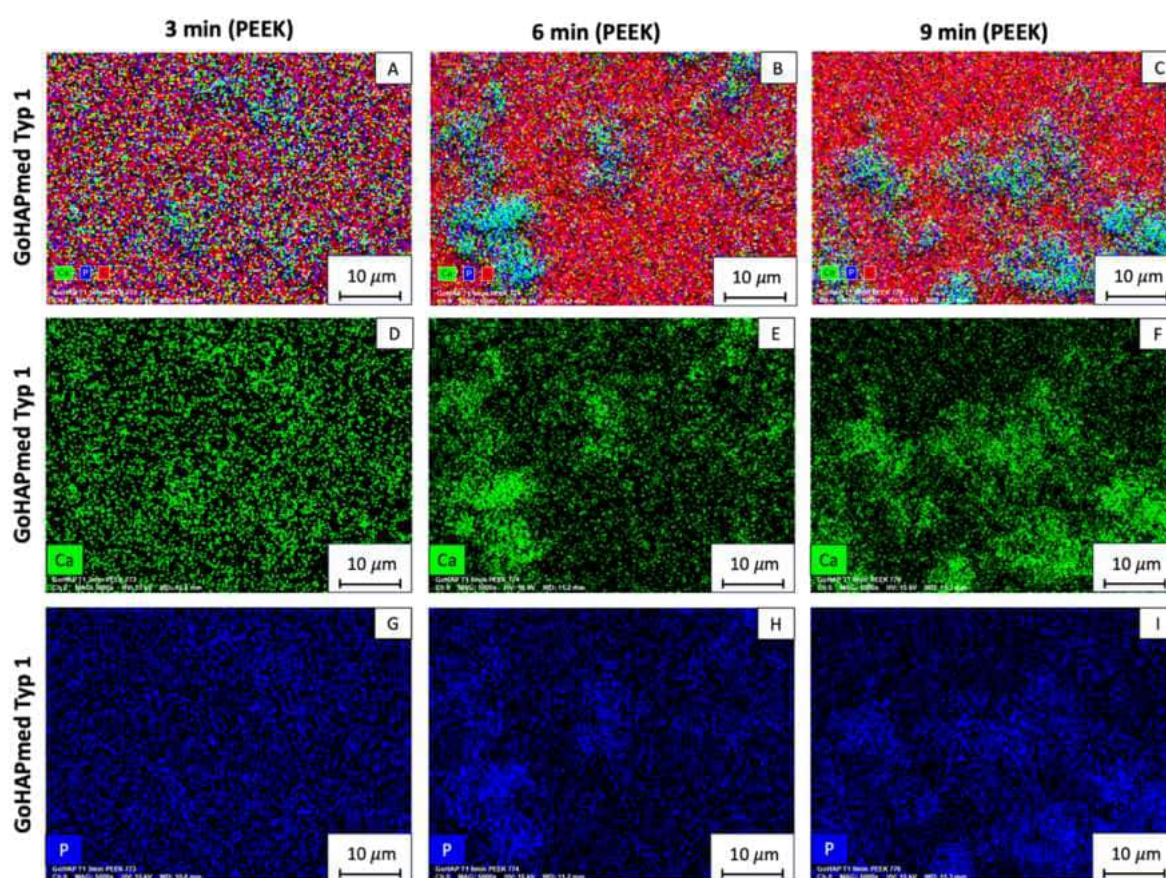


Rysunek 54. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 5 (30 nm) osadzone na podłożach PEEK w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min.

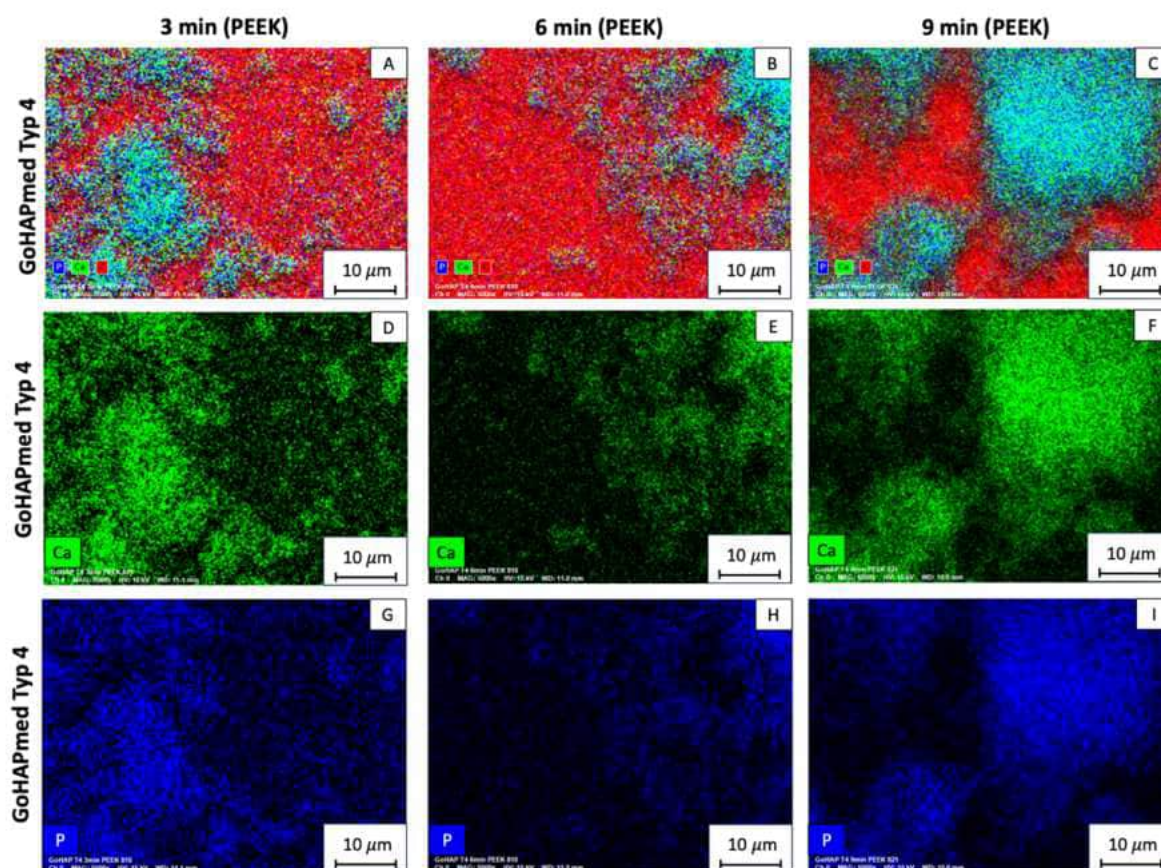


Rysunek 55. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 6 (42 nm) osadzone na podłożach PEEK w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min.

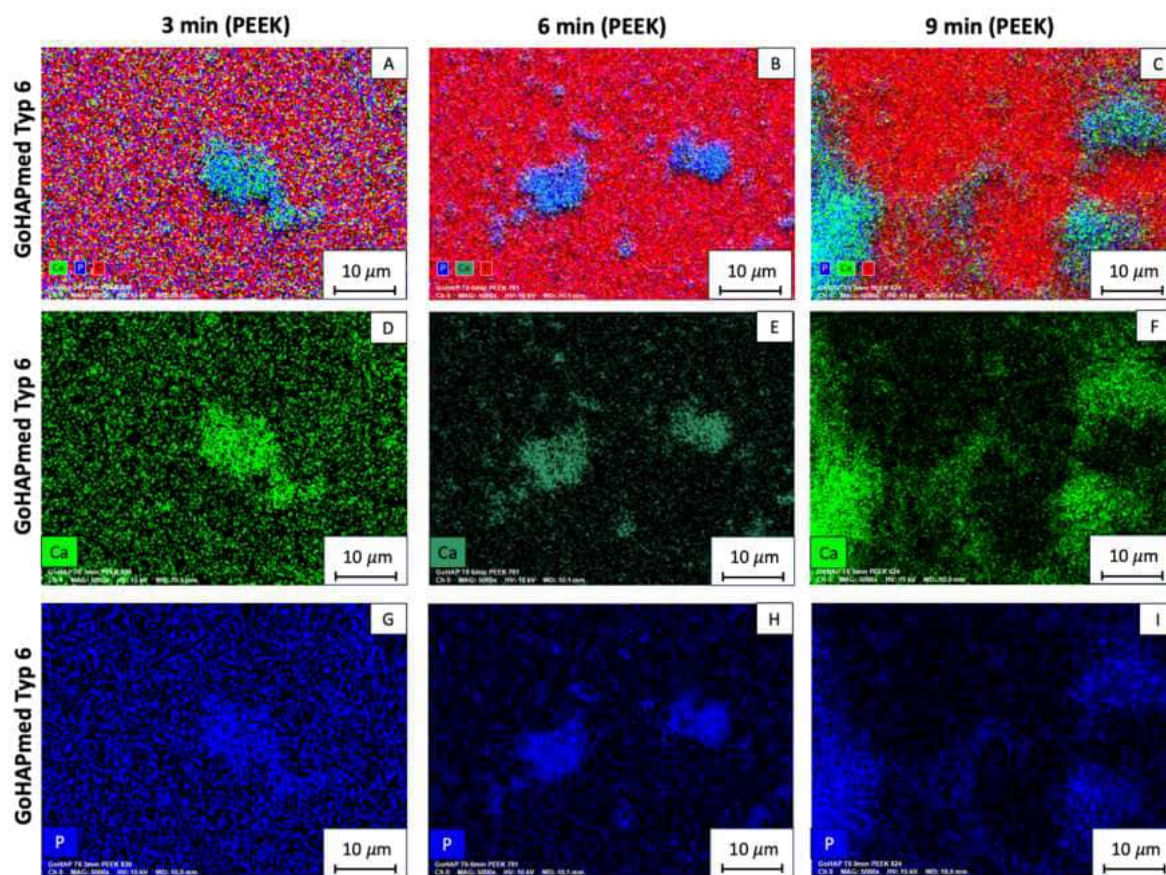
Na podstawie analizy SEM i EDS potwierdzono obserwacje opisane w rozdziale 4.2.4., które wskazują, że wydłużanie czasu prowadzenia procesu ultradźwiękowego osadzania nanocząstek na powierzchni płaskich próbek PEEK nie powoduje systematycznego przyrostu ilości nHAP osadzonego w formie powłoki na powierzchni materiału modyfikowanego. Na mapach EDS poprzez analizę rozmieszczenia pierwiastków takich jak wapń i fosfor, które są składowymi nanocząstek GoHAPmed ujawniono, że najbardziej homogenicznie rozłożenie nanocząstek na powierzchni PEEK osiągane jest po 3 minutach prowadzenia procesu ultradźwiękowego. Zjawisko to może być związane z wymywaniem nanocząstek z powierzchni powłoki w wyniku zbyt długiego narażenia powierzchni na działanie fal ultradźwiękowych.



Rysunek 56. Mapa pierwiastkowa EDS powłok GoHAPmed Typ 1 (10 nm) naniesionych na powierzchnię podłoża PEEK, uzyskanych w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min i 9 min procesu ultradźwiękowego.

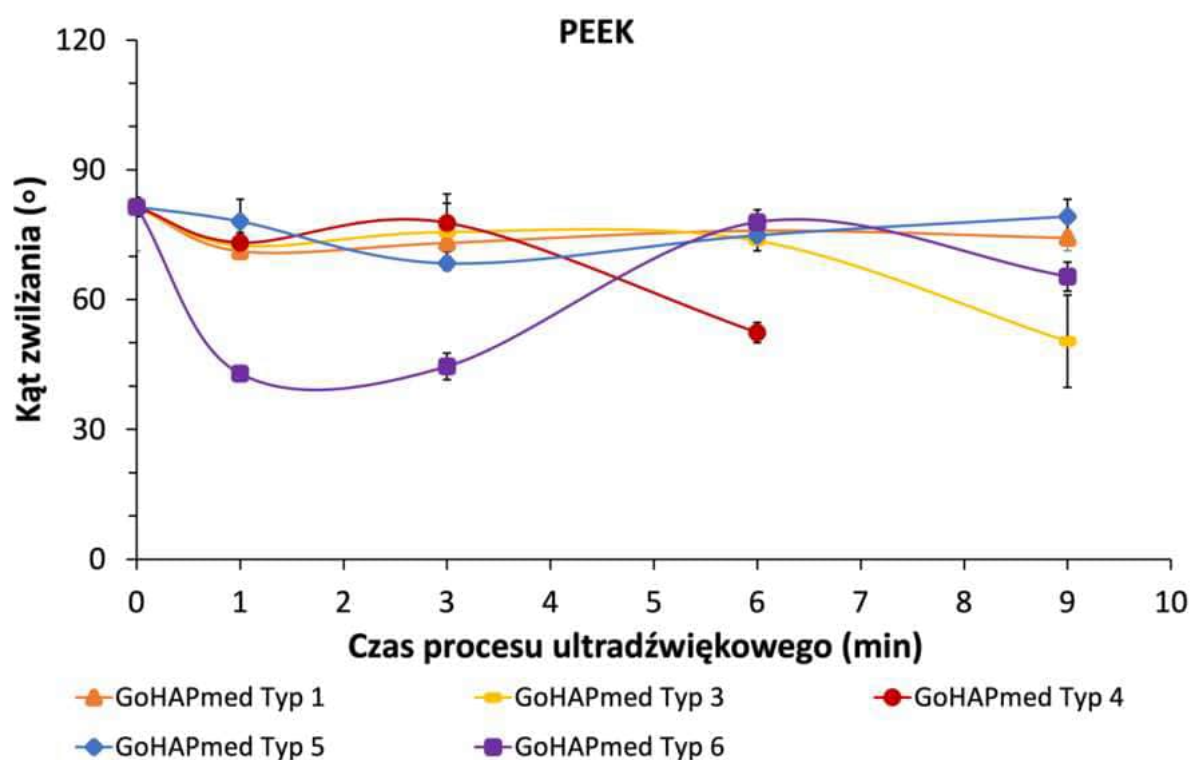


Rysunek 57. Mapa pierwiastkowa EDS powłok GoHAPmed Typ 4 (26 nm) naniesionych na powierzchnię podłoża PEEK, uzyskanych w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min i 9 min procesu ultradźwiękowego.



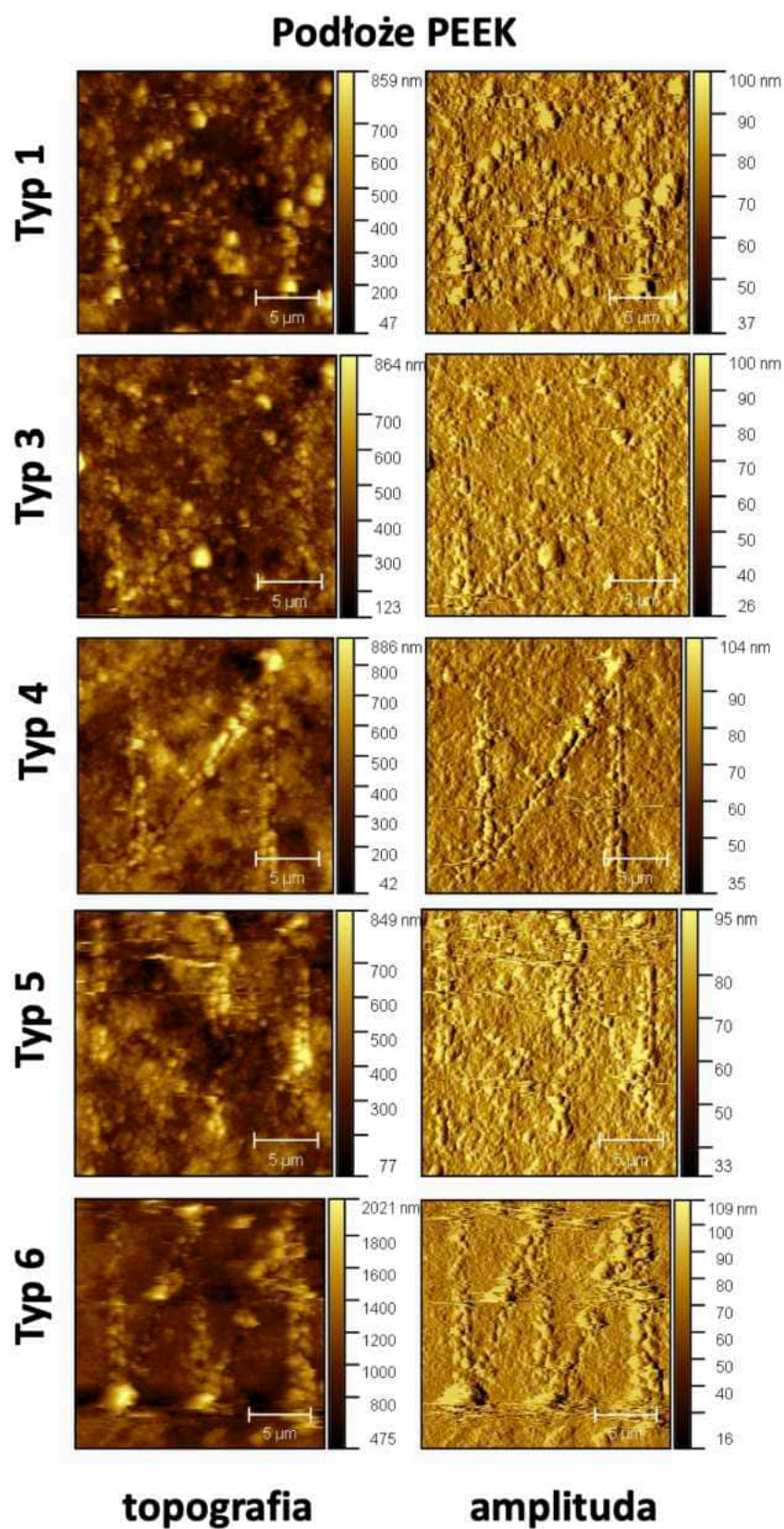
Rysunek 58. Mapa pierwiastkowa EDS powłok GoHAPmed Typ 6 (42 nm) naniesionych na powierzchnię podłoża PEEK, uzyskanych w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min i 9 min procesu ultradźwiękowego.

Kąt zwilżania podłoża polimerowego PEEK przed modyfikacją powierzchni wynosił $81^\circ \pm 2^\circ$. Naniesienie powłok GoHAPmed obniżyło kąt zwilżania powierzchni. Największą zmianę kąta zwilżania podłoża PEEK zaobserwowano w przypadku osadzenia powłoki GoHAPmed Typ 6 przy osadzaniu powłoki w procesie SonoNanoCoating prowadzonym przez 1 minutę oraz 3 minuty. Wówczas kąt zwilżania powierzchni wynosił ok. $42^\circ - 44^\circ$. Kąt zwilżania wynoszący ok. 52° zaobserwowano przy modyfikacji powierzchni nanocząstkami GoHAPmed Typ 4 przy osadzaniu powłoki przez okres 6 min oraz GoHAPmed Typ 6 przez okres 9 min. W przypadku zastosowania dziewięciominutowego czasu osadzania warstwy odnotowano duże odchylenie standardowe w uzyskanym kącie zwilżania powierzchni, co może być związane ze zmniejszeniem powtarzalności otrzymywanych powłok w tym czasie. Pozostałe powłoki naniesione na podłożu PEEK charakteryzowały się zbliżoną wartością kąta zwilżania ustabilizowaną na poziomie ok. $73^\circ \pm 4^\circ$.



Rysunek 59. Kąt zwilżania podłoża PEEK przed modyfikacją oraz po modyfikacji jego powierzchni powłokami GoHAPmed.

Powłoki GoHAPmed wytworzone na podłożu PEEK w czasie 3 min. prowadzenia procesu SonoNanoCoating poddano badaniom typu Scratch Test wykonywanym na mikroskopie sił atomowych (AFM). Powłoki GoHAPmed naniesione na podłoża PEEK znacznie łatwiej podlegały zadrapaniom w stosunku do powłok naniesionych na podłoża tytanu grade 2. Takie zachowanie powłok może być związane z twardością powłok. Rysunek 60 przedstawia obrazy AFM uzyskane po zarysowaniu powłok GoHAPmed naniesionych na podłoża polimerowe. Zobrazowane zarysowania są dobrze widoczne. Powłoka GoHAPmed podczas zarysowania uległa odkształceniu, nanocząstki składające się na powłokę przemieściły się tworząc spulchnienie wokół rysy na powłoce. Zjawisko to jest bardziej widoczne dla nanocząstek o średniej wielkości nanocząstek powyżej 20 nm, co może być związane ze słabszymi wiązaniami Van der Waalsa pomiędzy tymi nanocząstkami. Chropowatość podłoża PEEK, których powierzchnię modyfikowano powłokami GoHAPmed składającymi się z nanocząstek rozróżnionych na typy pod kątem średniego rozmiaru nanocząstek była zbliżona i mieściła się w zakresie 109-124 nm (Tabela 7).



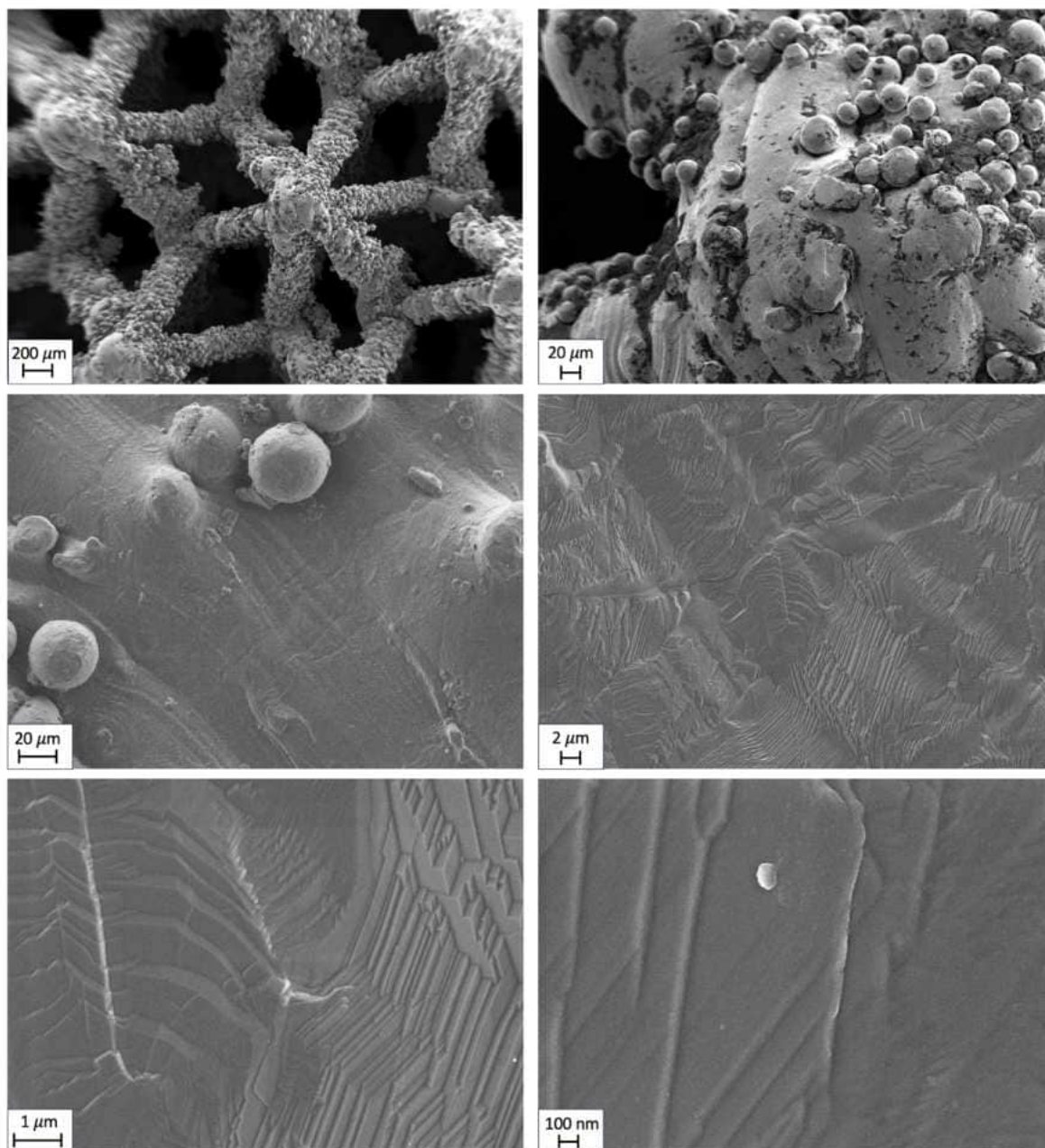
Rysunek 60. Obrazy AFM powłok GoHAPmed składających się z różnej wielkości nanocząstek uzyskane metodą ultradźwiękową na podłożu PEEK [256].

Tabela 10. Chropowatość RMS powierzchni PEEK modyfikowanej powłokami GoHAPmed [256].

Nazwa powłoki na powierzchni podłoża tytanu grade 2	Chropowatość RMS (nm)
GoHAPmed Typ 1	124 ± 28
GoHAPmed Typ 3	104 ± 9
GoHAPmed Typ 4	119 ± 1
GoHAPmed Typ 5	115 ± 22
GoHAPmed Typ 6	109 ± 7

5.3.3. Modyfikacja powierzchni podłoży tytanowych drukowanych 3D.

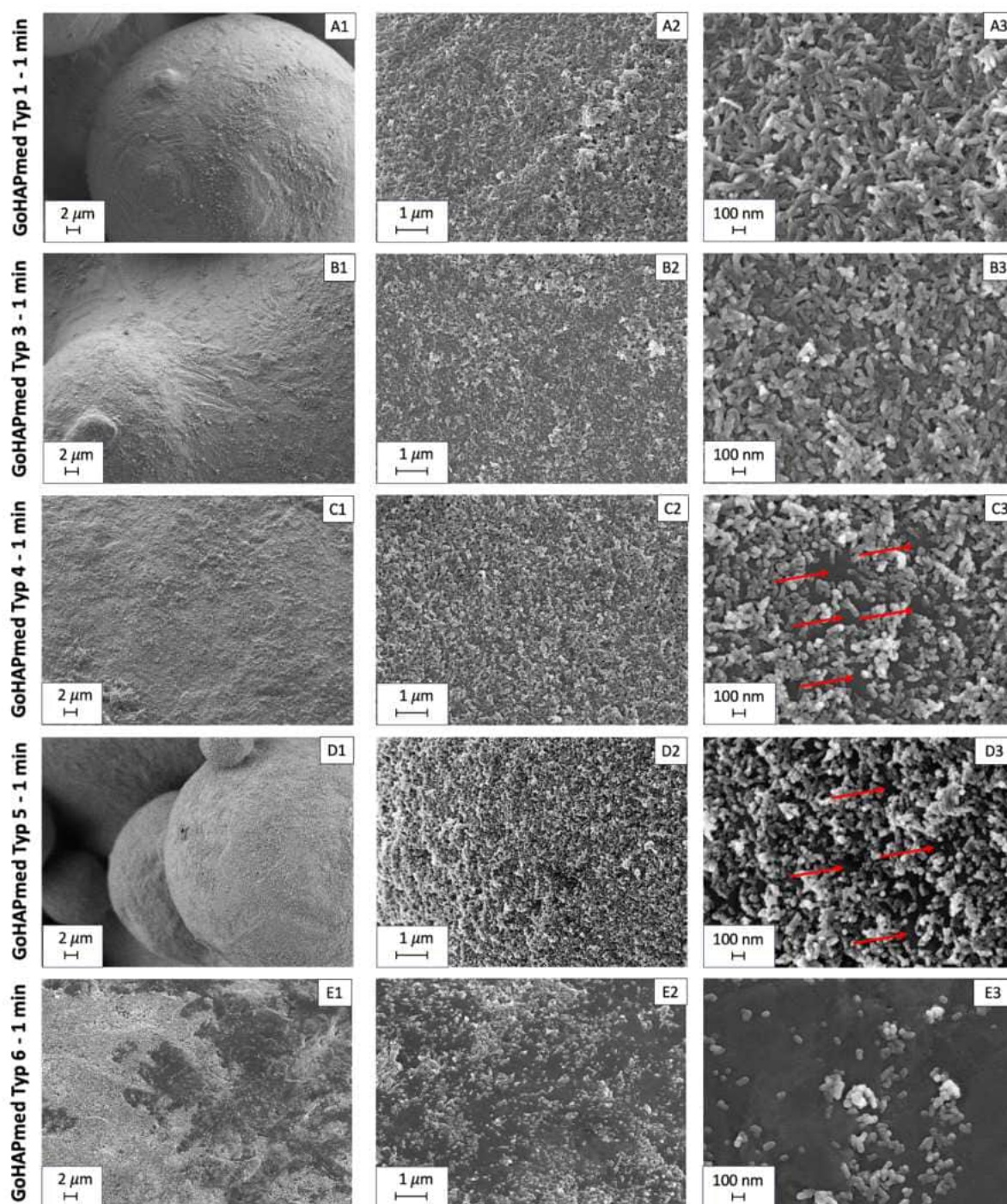
W kolejnym etapie osadzano powłoki hydroksyapatytowe na podłożach tytanowych drukowanych 3D (Ti 3D). Podłoża te były wydrukowane w formie wielostozkowej siatki, pracującej pod wpływem nacisku w celu stymulacji przerostu kostnego (Rysunek 61). Taki rodzaj siatki stosowany jest w implantach kręgosłupowych, wytwarzanych i opatentowanych przez firmę Syntropiq. Dodatkowy czynnik wpływający na przyspieszenie przerośnięcia implantu nową tkanką kostną ma stanowić powłoka hydroksyapatytowa. Na podłożach wykonano powłoki z nanocząstek o różnych wielkościach, tj. 10 nm (Typ 1), 14 nm (Typ 3), 26 nm (Typ 4), 30 nm (Typ 5), 42 nm (Typ 6). Powłoki osadzano w procesie SonoNanoCoating, którego czas regulowano od 1 do 9 minut w celu ustalenia optymalnego czasu osadzania powłok z danej wielkości nanocząstek.



Rysunek 61. Podłoże tytanowe drukowane 3D – krążek o średnicy 10 mm.

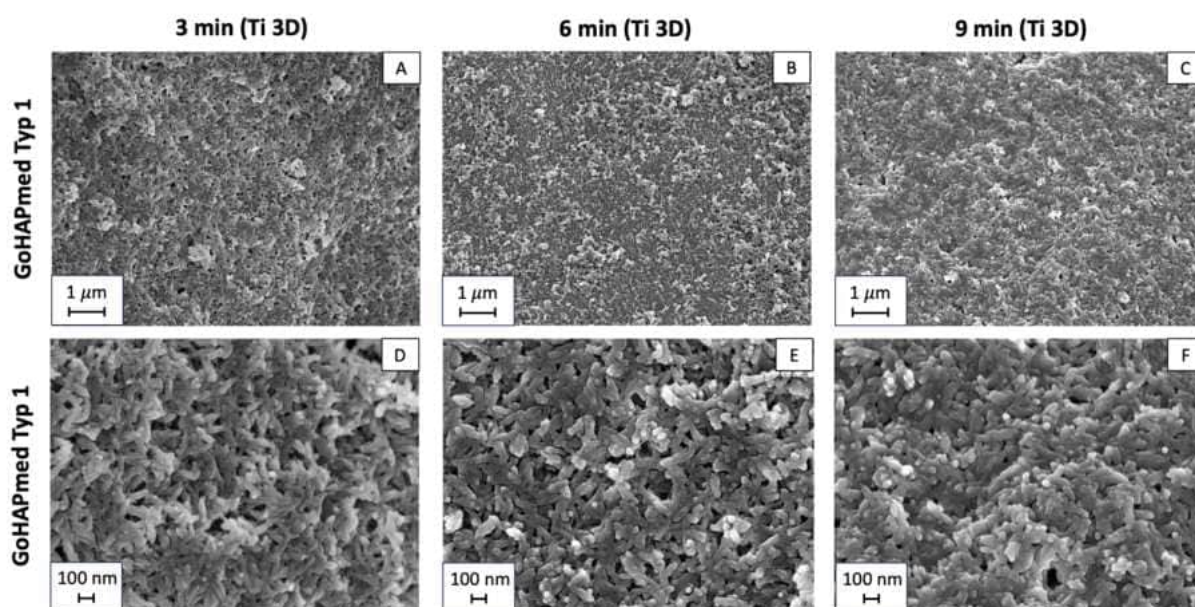
Obrazowanie SEM ujawniło, że już po 1 minucie procesu ultradźwiękowego osadzania powłok hydroksyapatytowych uzyskano całkowite pokrycie powierzchni przy zastosowaniu nanocząstek GoHAPmed o średniej wielkości około 10 nm (Typ 1) oraz 14 nm (Typ 3). W przypadku nanocząstek o średniej wielkości 26 oraz 30 nm uzyskano jednorodne powłoki, jednak widoczne były miejscowe, niewielkie prześwity powierzchni materiału modyfikowanego, które oznaczono czerwonymi strzałkami (Rysunek 62 (C3, D3)). Zastosowanie nanocząstek GoHAPmed o średniej wielkości powyżej 40 nm (Typ 6), podobnie

jak w przypadku osadzania powłok na powierzchni PEEK, skutkowało osadzeniem struktur wyspowych lub pojedynczych nanocząstek na powierzchni Ti 3D (Rysunek 62 (E1-E3)).

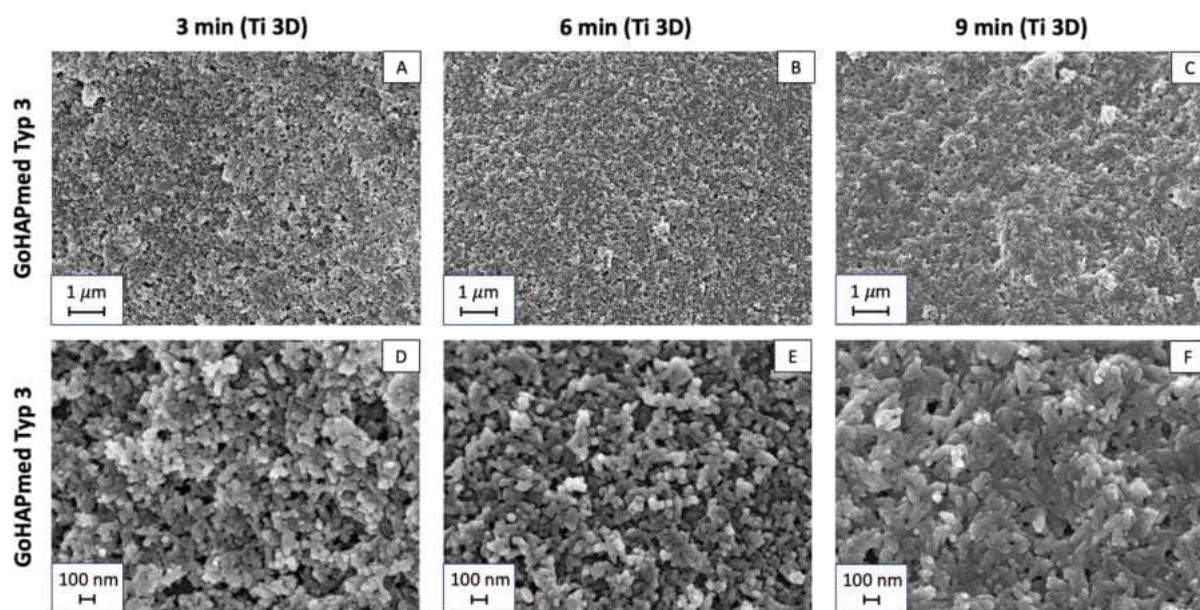


Rysunek 62. Powłoki składające się z nanocząstek o różnej wielkości nanocząstek osadzone na podłożach Ti 3D: A1-A3) GoHAPmed Typ 1 (10 nm); B1-B3) GoHAPmed Typ 3 (14 nm); C1-C3) GoHAPmed Typ 4 (26 nm); D1-D3) GoHAPmed Typ 5 (30 nm); E1-E3) GoHAPmed Typ 6 (42 nm).

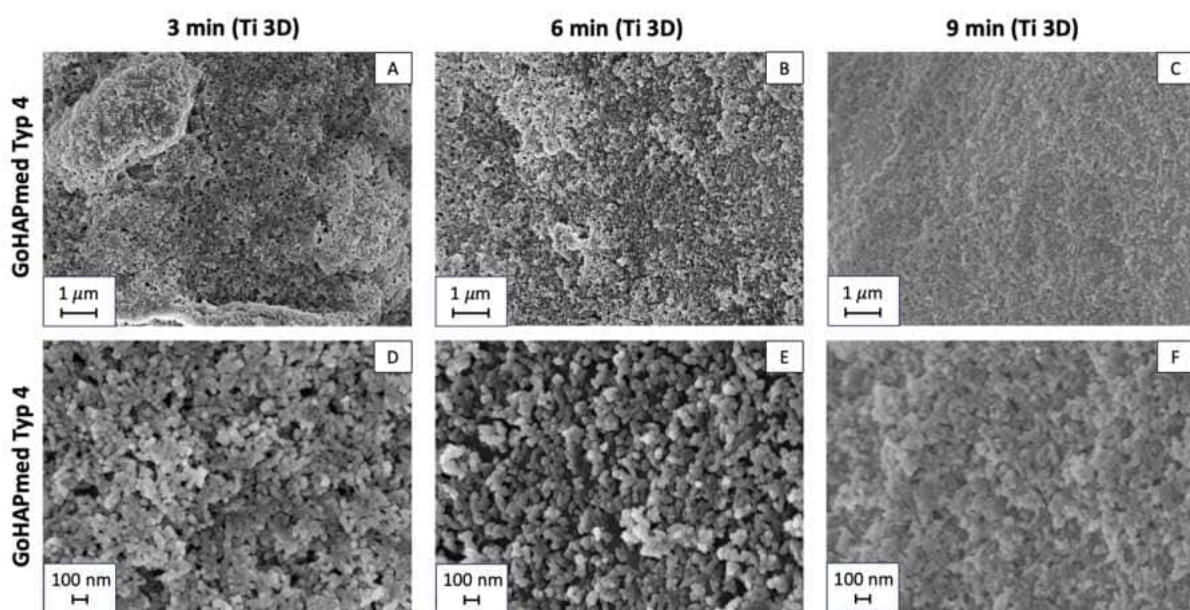
Wydłużenie czasu osadzania nanocząstek pozwoliło na uzyskanie całkowitego, jednorodnego pokrycia powierzchni z zastosowaniem wszystkich typów nanocząstek GoHAPmed. Wydłużenie czasu już do 3 minut skutkowało wypełnieniem pustych przestrzeni w powłoce, które obserwowano w przypadku zastosowania 1 min osadzania ultradźwiękowego powłok (Rysunek 62 (C3, D3)) z zawiesiny nanocząstek GoHAPmed o średnim rozmiarze 26 nm (Typ 4, Rysunek 65) oraz 30 nm (Typ 5, Rysunek 66). Natomiast optymalny czas osadzania najwyższego typu nanocząstek GoHAPmed dobrany na podstawie oceny morfologii powłok wynosił 6 minut (Rysunek 67 (E)). Nanocząstki GoHAPmed osadzone w optymalnie dobranym czasie tworzyły powłoki pokrywające całkowicie powierzchnię oraz wypełniające wszelkie szczeliny na próbce, czy połączenia pomiędzy poszczególnymi ziarnami proszku tytanowego z którego drukowano podłoża (Rysunek 66).



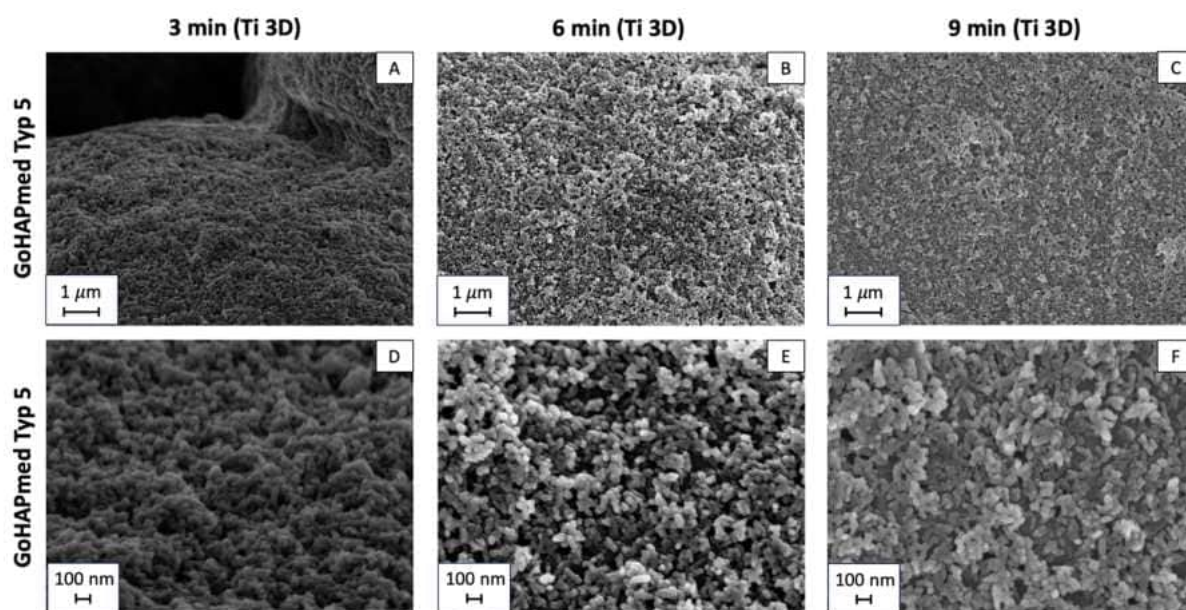
Rysunek 63. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 1 (10 nm) osadzone na podłożach Ti 3D w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min.



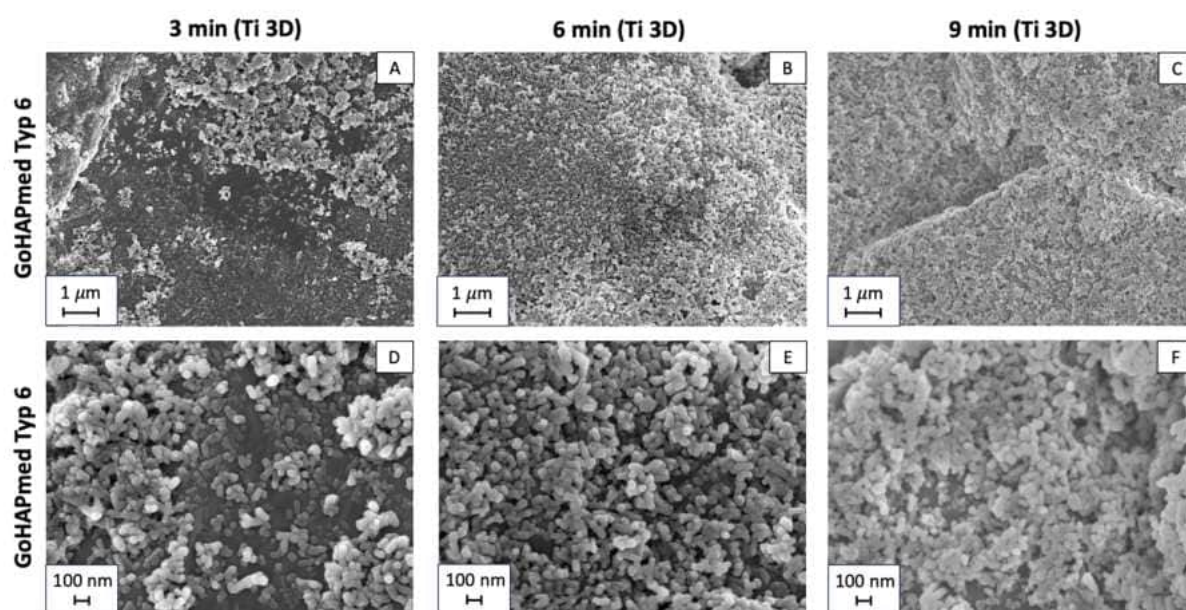
Rysunek 64. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 3 (14 nm) osadzone na podłożach Ti 3D w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min.



Rysunek 65. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 4 (26 nm) osadzone na podłożach Ti 3D w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min.



Rysunek 66. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 5 (30 nm) osadzone na podłożach Ti 3D w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min.

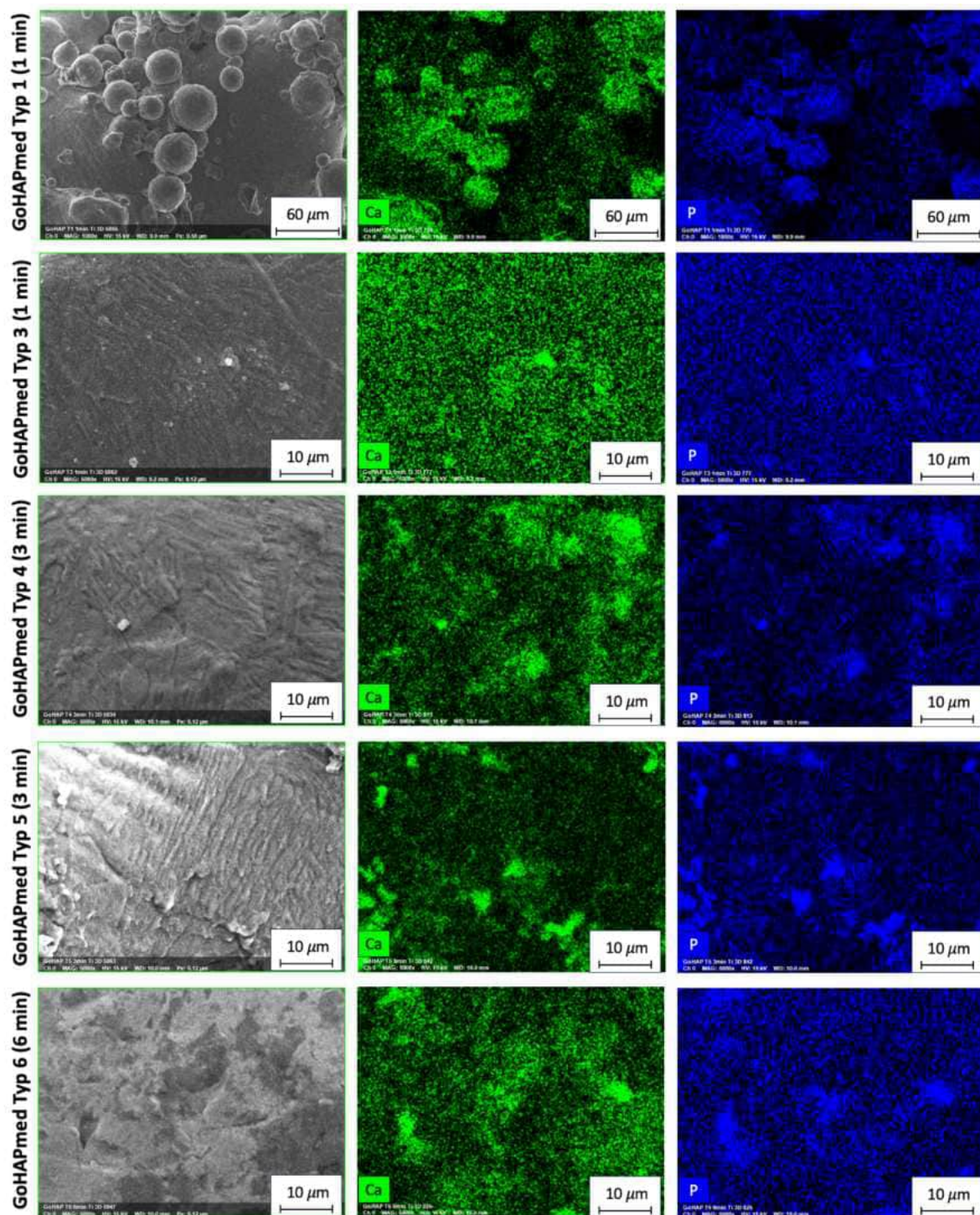


Rysunek 67. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 6 (42 nm) osadzone na podłożach Ti 3D w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min.

Na podstawie obserwacji SEM wytypowano optymalne czasy osadzania nanocząstek GoHAPmed na powierzchni podłoża tytanowego drukowanego 3D. Kryterium wyboru była ciągłość i jednorodność powłoki uzyskana w jak najkrótszym czasie prowadzenia procesu SonoNanoCoating. Dla wybranych czasów uzyskiwania powłok zestawiono mapy pierwiastkowe EDS (Rysunek 68).

Tabela 11. Optymalny czas ultradźwiękowego osadzania na powierzchni Ti 3D nanocząstek GoHAPmed zróżnicowanych pod kątem średniej wielkości nanocząstek.

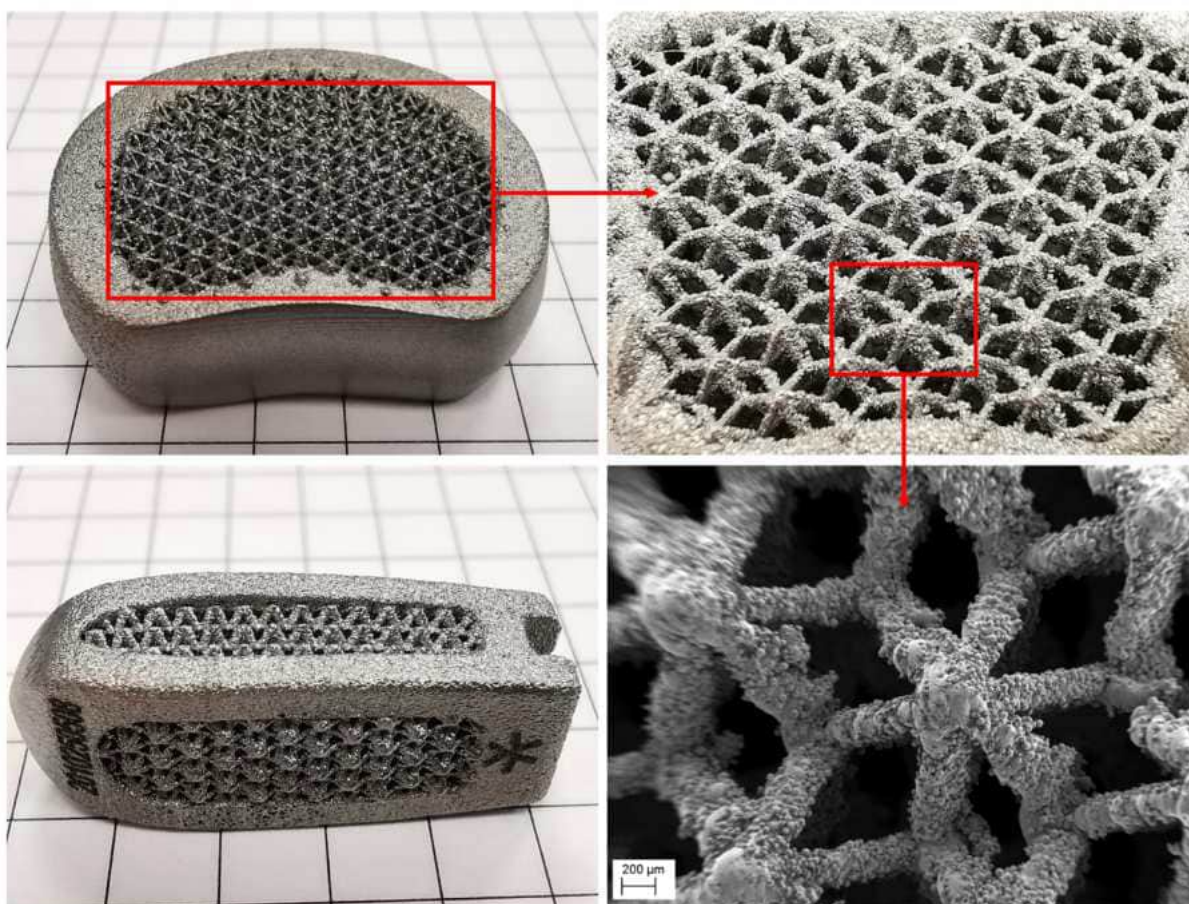
Rodzaj podłoża	Rodzaj powłoki	Optymalny czas osadzania powłoki
Tytan drukowany 3D	GoHAPmed Typ 1	1 min
Tytan drukowany 3D	GoHAPmed Typ 3	1 min
Tytan drukowany 3D	GoHAPmed Typ 4	3 min
Tytan drukowany 3D	GoHAPmed Typ 5	3 min
Tytan drukowany 3D	GoHAPmed Typ 6	6 min



Rysunek 68. Mapy pierwiastkowe EDS powłok GoHAPmed o zróżnicowanej wielkości nanocząstek naniesionych na powierzchnię podłoża tytanu drukowanego, uzyskanych w regulowanym czasie, odpowiednio: 1 min, 3 min i 6 min procesu SonoNanoCoating.

5.3.4. Modyfikacja powierzchni implantów kręgosłupowych oraz śrub mocujących.

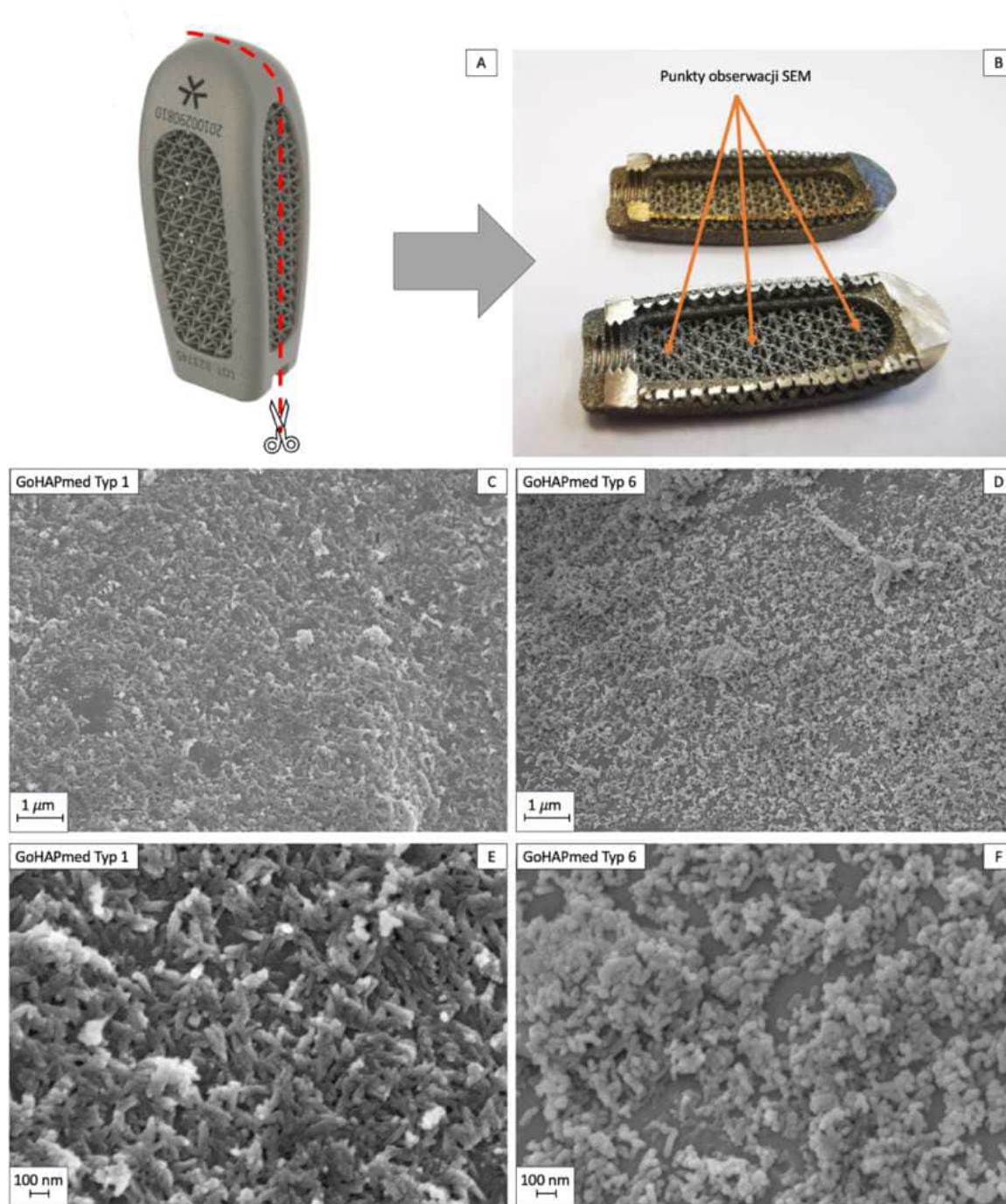
Przeprowadzono modyfikację powierzchni implantów kręgosłupowych (Rysunek 69), tzw. „klatek” (ang. cage) nanocząstkami hydroksyapatytu, które osadzano w formie powłok metodą SonoNanoCoating. Parametry procesu dobrano na podstawie doświadczeń opisanych w poprzednich rozdziałach. Czas nanoszenia powłok zgodnie z Tabelą 11. Uzyskane powłoki charakteryzowały się morfologią bardzo zbliżoną do tej, którą obserwowano na podłożach krążków tytanowych (Ti 3D).



Rysunek 69. Implanty kręgosłupowe (Andromeda oraz Perseus) drukowane 3D ze stopu tytanu Ti64ELI (Syntropiq, Czechy).

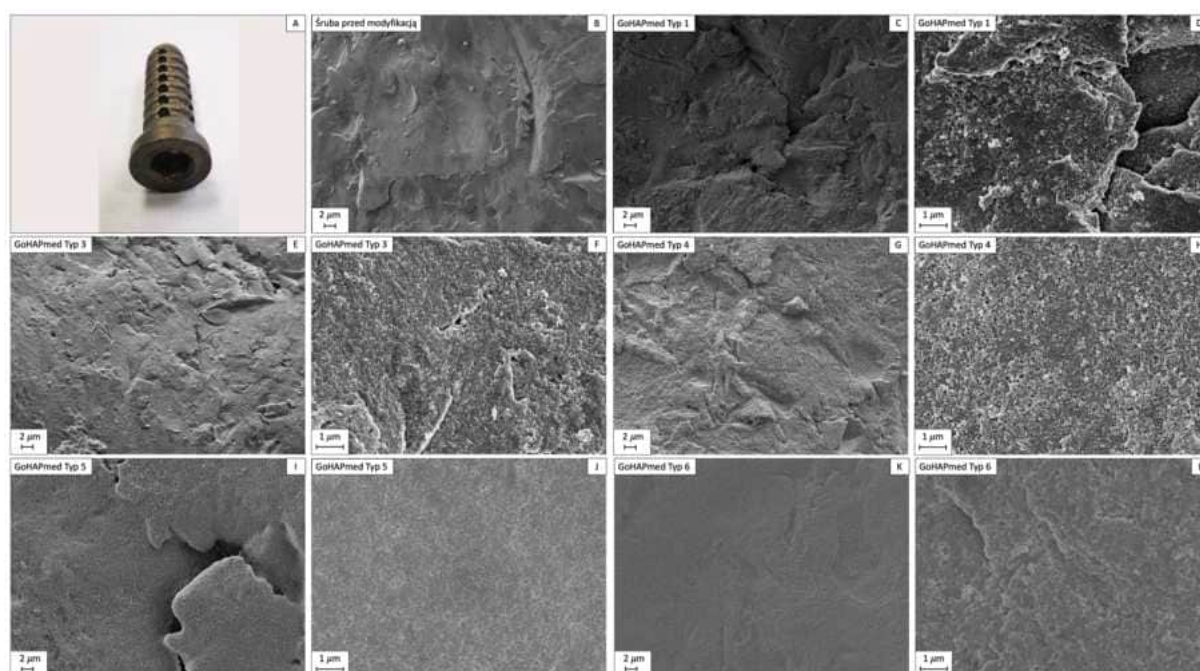
Implant pokryty nanocząstkami GoHAPmed o skrajnych średnich wielkościach nanocząstek tj. GoHAPmed Typ 1 (10 nm) oraz GoHAPmed Typ 6 przecięto na 2 części. Zabieg ten wykonano w celu weryfikacji, czy proces ultradźwiękowego osadzania powłok hydroksyapatytowych pozwala na uzyskanie powłok nie tylko na powierzchni zewnętrznej implantów, ale również wewnątrz porowatych implantów. Obserwacje SEM pozwoliły na potwierdzenie postawionej tezy. Na tym etapie prac potwierdzono, że powłoki GoHAPmed uzyskiwane są również

wewnątrz implantów o porowatej, ażurowej strukturze. Zarówno w przypadku powłok GoHAPmed Typ 1, jak i GoHAPmed Typ 6 zaobserwowano powłokę nanocząstek wewnątrz rozciętego implantu kręgosłupowego (Rysunek 70).



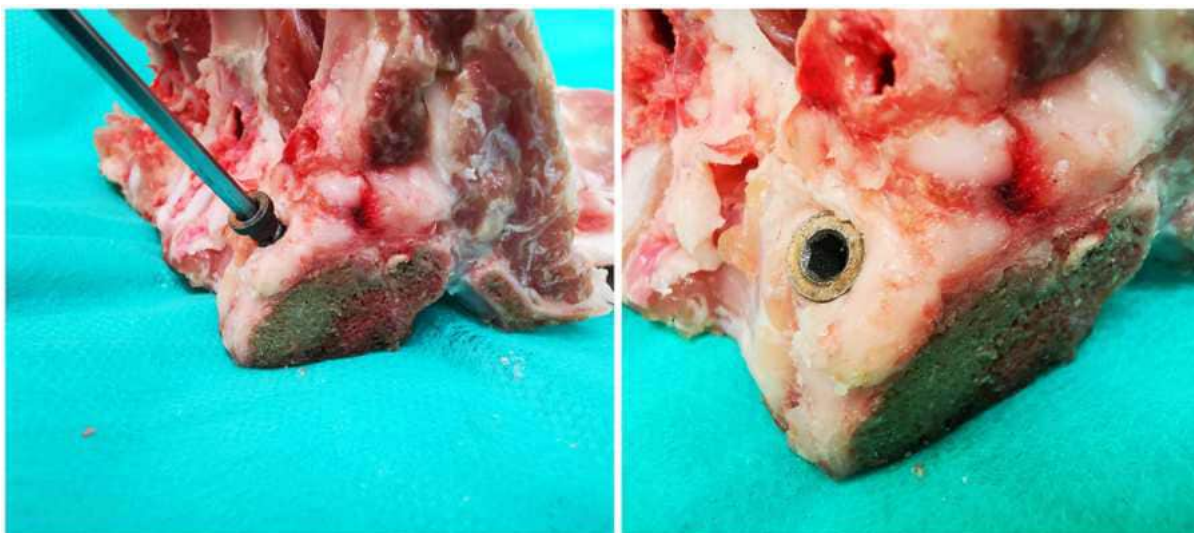
Rysunek 70. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 1 (10 nm) oraz GoHAPmed Typ 6 (42 nm) osadzone wewnątrz implantów kręgosłupowych (Aries, Sytropiq, Czechy).

Przeprowadzono modyfikację powierzchni perforowanej śruby interferencyjnej, zadaniem jest mocowanie i ustabilizowanie implantów, takich jak np. sztuczne więzadło krzyżowe. Śruby modyfikowano poprzez osadzenie powłok hydroksyapatytowych na ich powierzchni metodą ultradźwiękową. Na powierzchni śrub uzyskano jednorodne pokrycie nanocząstkami GoHAPmed o różnym rozmiarze nanocząstek (10 nm – 42 nm) (Rysunek 71).

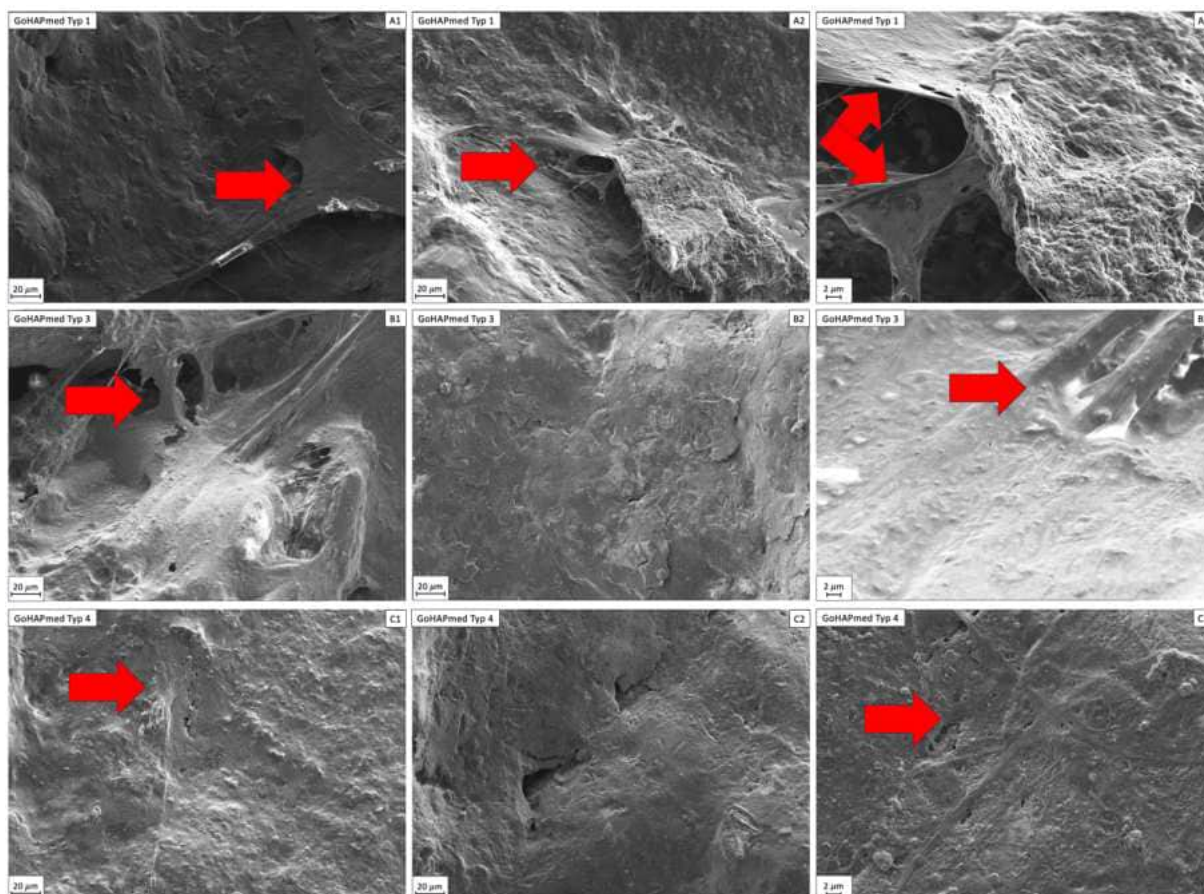


Rysunek 71. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ o różnej wielkości, na powierzchni tytanowych (stop Ti-6Al-4V) śrub interferencyjnych.

W celu symulacji warunków zastosowania przeprowadzono eksperyment, mający na celu potwierdzenia trwałości powłoki hydroksyapatytowej podczas wkręcania śruby interferencyjnej modyfikowanej do kości. Śruby modyfikowane powłokami, składającymi się z nanocząstek GoHAPmed o wielkości odpowiednio: 10 nm, 14 nm oraz 26 nm zostały wkręcone do kości wołowej, a następnie wykręcone i obrazowane SEM. Analiza obrazu na mikroskopie SEM nie wykazała uszkodzenia powłok naniesionych na śruby, które poddano eksperymentowi (Rysunek 73). Ponadto, zaobserwowano bardzo dobre przyleganie tkanek do powierzchni śrub modyfikowanych powłokami hydroksyapatytowa GoHAPmed. Obrazowanie SEM wykazało, że powłoka nie została uszkodzona, a część tkanek ściśle do niej przylgnęła (Rysunek 73).



Rysunek 72. Zdjęcie z operacji wkręcania śrub interferencyjnych w kość wołową.



Rysunek 73. Obraz SEM tkanek przylegających do powłoki GoHAPmed naniesionej na śruby interferencyjne po wykręceniu z kości wołowej.

5.3.5. Modyfikacja powierzchni implantów sztucznego więzadła krzyżowego.

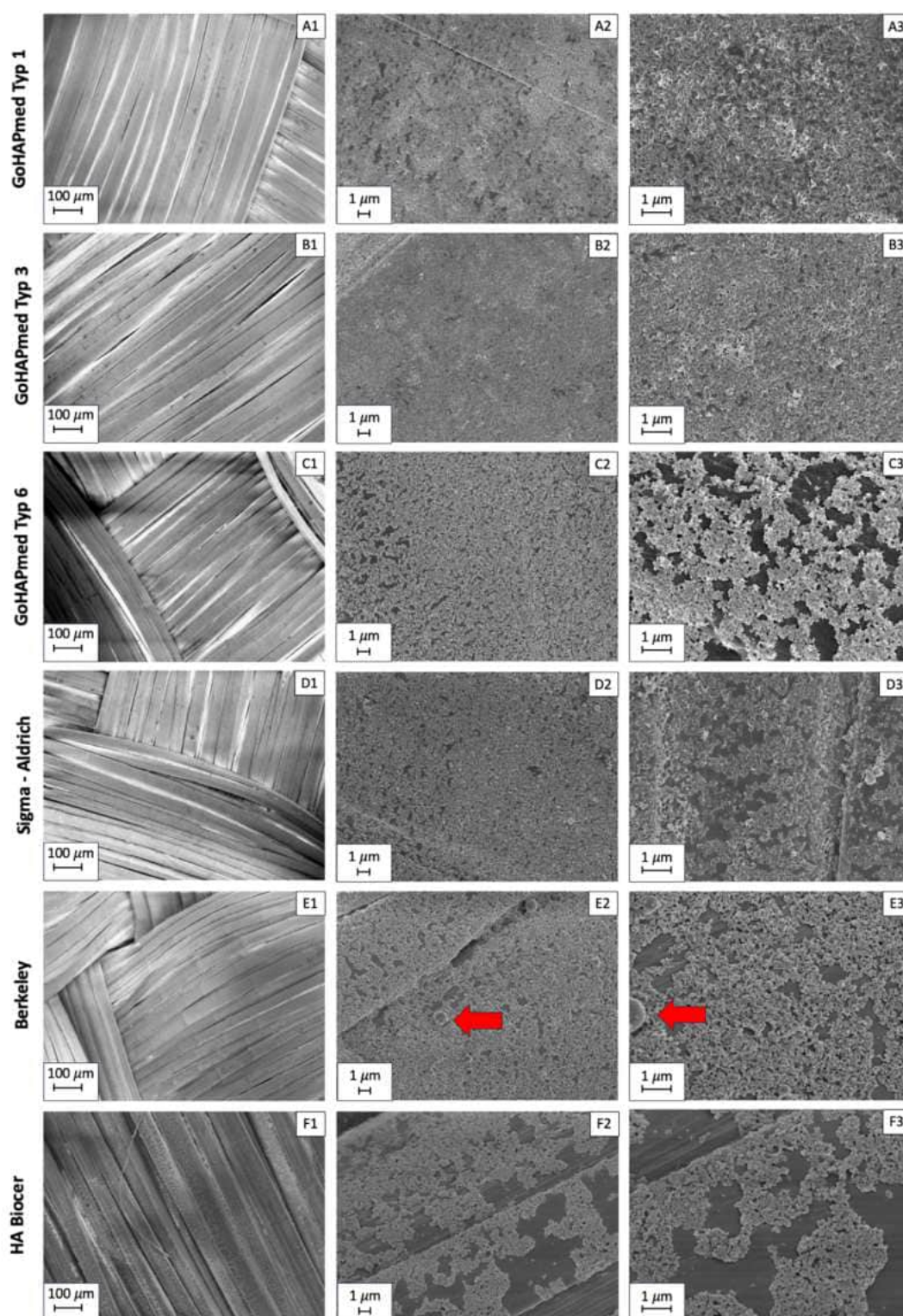
W tej części doświadczeń prowadzono prace nad osadzaniem powłok składających się z nanocząstek hydroksyapatytu na implantach w postaci syntetycznych więzadeł wytworzonych z UHMWPE stosowanych do rekonstrukcji zerwanego więzadła krzyżowego. Sztuczne więzadła modyfikowano powłokami, składającymi się z nanocząstek hydroksyapatytu GoHAPmed o charakterystyce przedstawionej w Tabeli 5, jak również komercyjnie dostępnym hydroksyapatytem: Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany), Berkeley Advanced Biomaterials (Berkeley, USA) oraz HA Biocer (Chema Rzeszów, Polska).

Tabela 12. Parametry powierzchni właściwej (SSA), całkowitej powierzchni portów (TPV), gęstości (DEN) oraz średniej wielkości nanocząstek (MPS_{BET}) wyznaczone dla nanohydroksyapatytów dostępnych komercyjnie.

Nazwa próbki:	Powierzchnia Właściwa (m^2/g)	Całkowita objętość porów (m^2/g)	Gęstość (g/cm^3)	Średnia wielkość nanocząstek (nm)
HAP Berkeley	41	0,252	$2,91 \pm 0,06$	51
HAP Sigma- Aldrich	21	0,042	$3,04 \pm 0,03$	96
HA Biocer	22	-	3,02	90

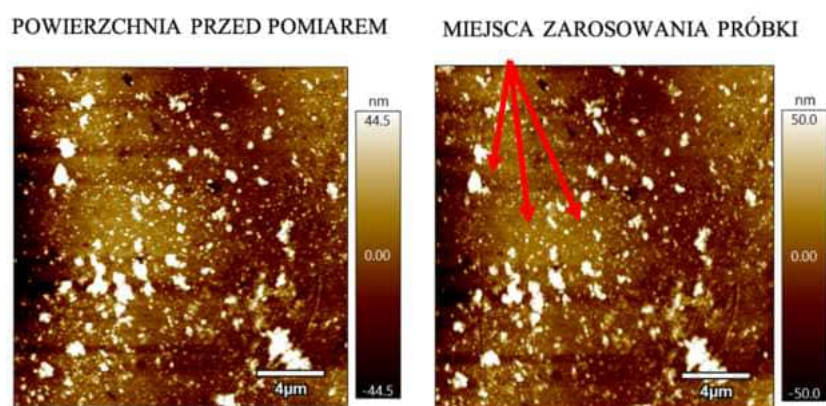
Jednorodny charakter powłok uzyskano w przypadku osadzania powłok składających się z nanocząstek hydroksyapatytu o drobniejszym średnim rozmiarze, tj. 10 nm i 14 nm (Rysunek 74, (A1-B3)). Powłoki o charakterze wysokoporowatym uzyskano w przypadku zastosowania w procesie ultradźwiękowego osadzania powłok nanocząstek GoHAPmed Typ 6, HAP Berkeley, HAP Sigma Aldrich (Rysunek 74, (C1-E3)). Warto zauważyć, że HAP Berkeley charakteryzował się występowaniem pojedynczych mikrometrycznych ziaren, które również zostały przytwierdzone do powierzchni więzadła UHMWPE (Rysunek 74, (E2-E3)). Osadzanie nanocząstek HA Biocer metodą SonoNanoCoating pozwoliło jedynie na osadzenie powłok o charakterze wyspowym (F1-F3). Na podstawie analizy obrazów SEM stwierdzono, iż charakter osadzonej powłoki zależy nie tylko od parametrów procesu ultradźwiękowego, rodzaju modyfikowanego podłoża, rodzaju materiału, ale również bardzo silnie zależy od

właściwości materiału, z którego składa się powłoka, takich jak morfologia, struktura, wielkość czy powierzchnia właściwa i gęstość.

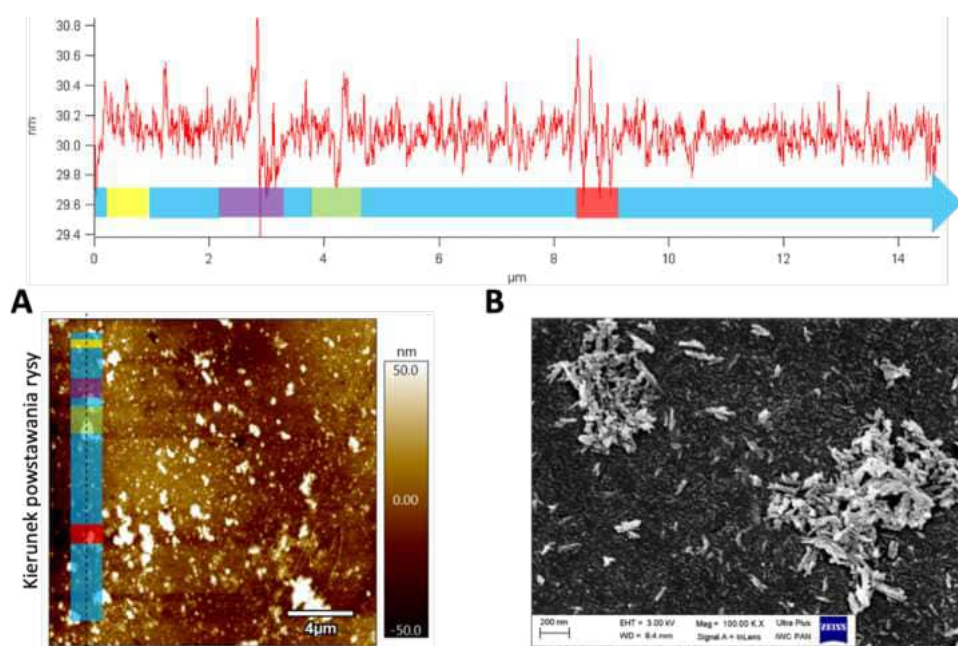


Rysunek 74. Obrazy SEM włókien więzadeł, których powierzchnię modyfikowano powłokami hydroksyapatytu GoHAPmed o różnym rozmiarze wielkości nanocząstek oraz nanohydroksyapatytów HAP Sigma-Aldrich, HAP Berkeley oraz HA Biocer.

Wykonano pomiar siły adhezji nanocząstek GoHAPmed do podłoża UHMWPE. Poniżej umieszczono przykładowe obrazy topograficzne i wykresy ugięcia ramienia sondy zarejestrowane w trakcie badania. Wykresy ugięcia korespondują z mapami topograficznymi po zarysowaniu - większa amplituda ugięcia pojawia się w przypadku miejsc z aglomeratami nanocząstek GoHAPmed.



Rysunek 75. Obrazy AFM topografii podłoża UHMWPE na którym osadzono powłoki GoHAPmed Typ 3 metodą ultradźwiękową. Widok przed i po zarysowaniu powierzchni sondą AFM.



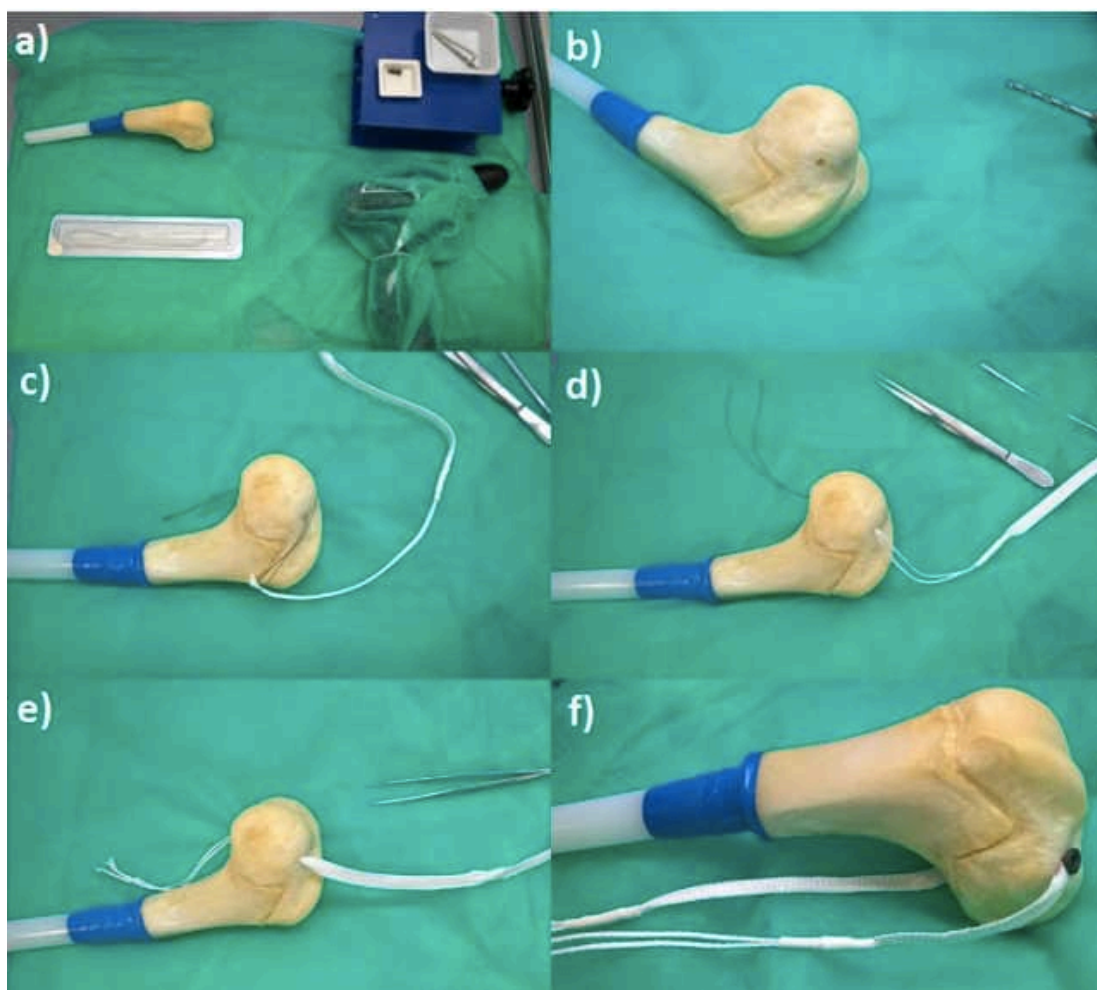
Rysunek 76. Wykres wychylenia (ugięcia) sondy mikroskopu AFM podczas tworzenia rysy na powierzchni próbki; A) topografia powierzchni próbki z zaznaczonym obszarem prowadzenia sondy, B) Obraz SEM powłoki GoHAPmed Typ 3 na powierzchni podłoża UHMWPE w miejscach widocznych na obrazie AFM, jako jasne punkty o większej wysokości.

Silę adhezji wyznaczoną dla próbek podłoża UHMWPE modyfikowanych powłokami GoHAPmed Typ 3 (14 nm) i podłoża UHMWPE modyfikowanych powłokami GoHAPmed Typ 6 (42 nm) zestawiono w Tabelki 13. Adhezja powłoki składającej się z nanocząstek o mniejszym rozmiarze nanocząstek oraz wyższej powichrzeni właściwej (GoHAPmed Typ 3) do podłoża UHMWPE była znacznie wyższa w porównaniu z powłoką złożoną z nanocząstek o większej średniej wielkości (GoHAPmed Typ 6). Podejrzewa się, że bezpośredni wpływ na przyczepność cząstek ma ich kształt, wielkość oraz ułożenie. Warstwa złożona z cząstek GoHAPmed Typ 6 jest luźniejsza (porowata), a oddziaływania van der Waalsa charakterystyczne dla nanocząstek są w tym przypadku słabsze niż dla GoHAPmed Typ 3. Jednakże największy wpływ na siłę adhezji do podłoża ma sam rodzaj podłoża, tj. z jakiego materiału podłoże jest wykonane, jaką ma formę czy porowatość. Wyznaczona siła adhezji powłok GoHAPmed do podłoża UHMWPE jest znacznie słabsza niż siła adhezji tych samych powłok do chropowatego podłoża walcowanego tytanu grade 2 (Tabela 9).

Tabela 13. Siła adhezji powłok składających się z nanocząstek GoHAPmed Typ 3 oraz GoHAPmed Typ 6.

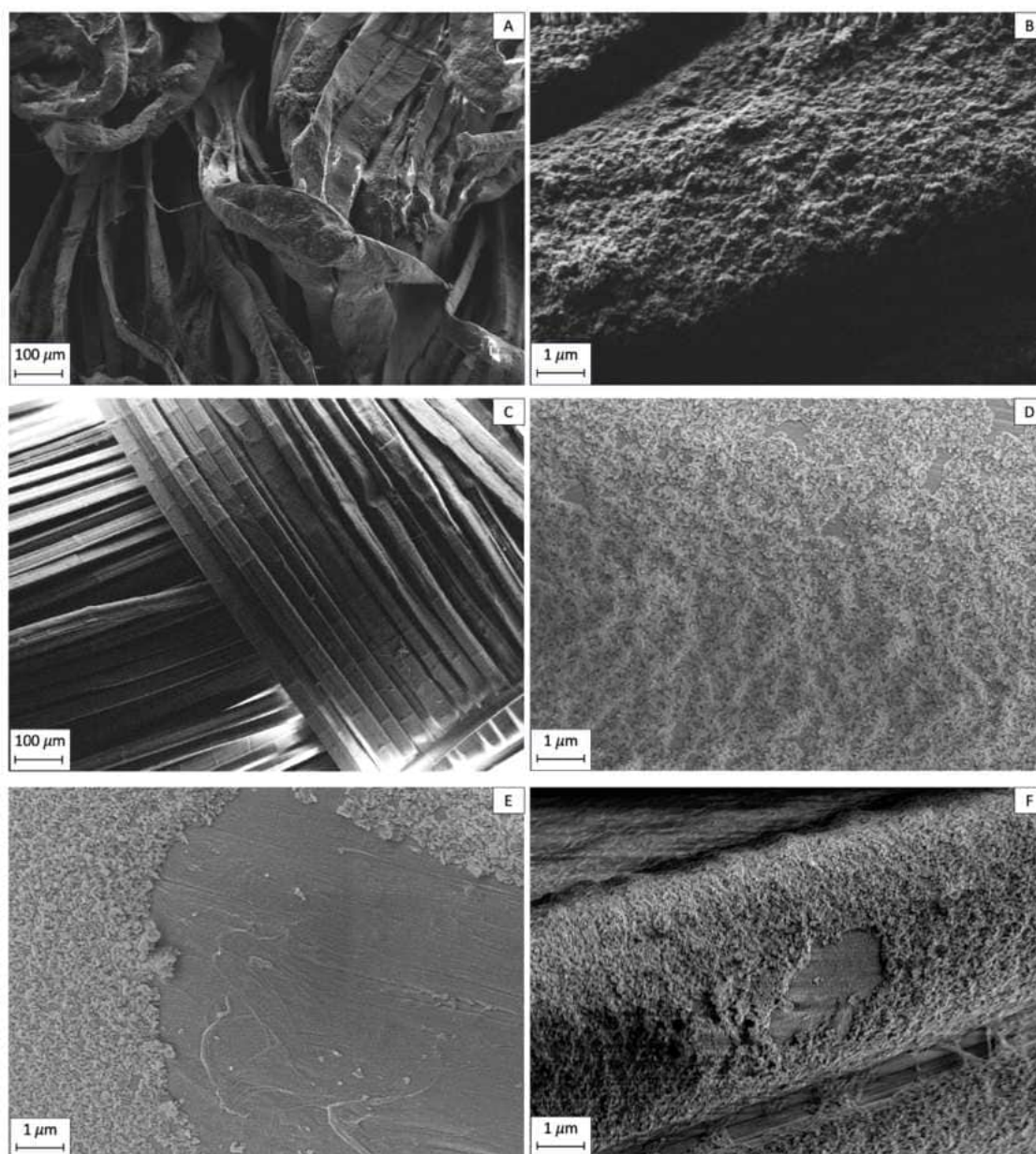
Nazwa próbki	Siła adhezji [μ N]
Powłoka GoHAPmed Typ 3	0,7 - 0,8
Powłoka GoHAPmed Typ 6	0,4 – 0,7

W związku ze znacznie mniejszą siłą adhezji do podłoża UHMWPE w stosunku do położy tytanowych wykonano badanie wytrzymałości powłok na ścieranie w warunkach symulujących prace chirurga z więzadłem, tj. mocowania implantu sztucznego więzadła UHMWPE do kości udowej za pomocą śruby interferencyjnej. W badaniu zastosowano implanty w postaci sztucznych więzadeł krzyżowych, którego włókna zostały pokryte powłoką złożoną z nanocząstek GoHAPmed Typ 3.



Rysunek 77. Etapy badania wytrzymałości powłok GoHAPmed Typ 3 naniesionych na powierzchnie sztucznych więzadeł UHMWPE: a) przygotowanie materiałów, b) nawiercenie otworu w kości, c-e) przewlekanie sztucznego więzadła przez otwór w kości, f) mocowanie więzadła śrubą interferencyjną.

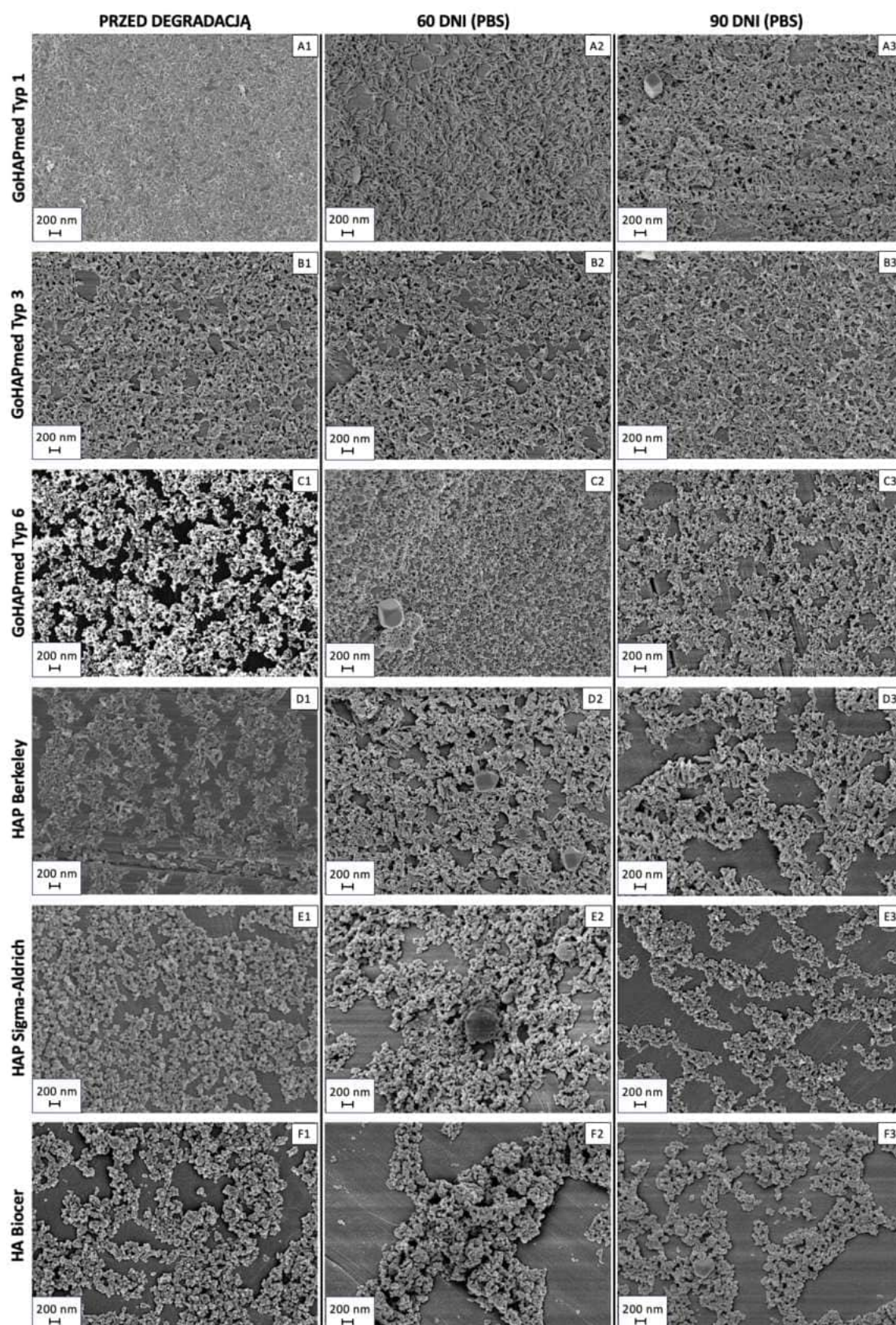
Test mocowania więzadeł wykazał, że operowanie więzadłem poprzez rozciąganie, gięcie i mocowanie śrubą tytanową interferencyjną w kanale kostnym nie powoduje delaminacji, czy niszczenia powłok składających (Rysunek 78, (C-D)) się z nanocząstek GoHAPmed Typ 3. Jednakże mocowanie implantu śrubą interferencyjną powoduje częściowe uszkodzenie zarówno włókien więzadeł, jak i powłoki. Jednak delaminację, uszkodzenia powłok zaobserwowano punktowo w pojedynczych miejscach włókien więzadeł (Rysunek 78, (E-F)). W większości miejsc, obserwowano, iż pomimo deformacji włókien nanocząstki GoHAPmed Typ 3 wciąż przylegały do powierzchni więzadeł (Rysunek 78, (A-B)).



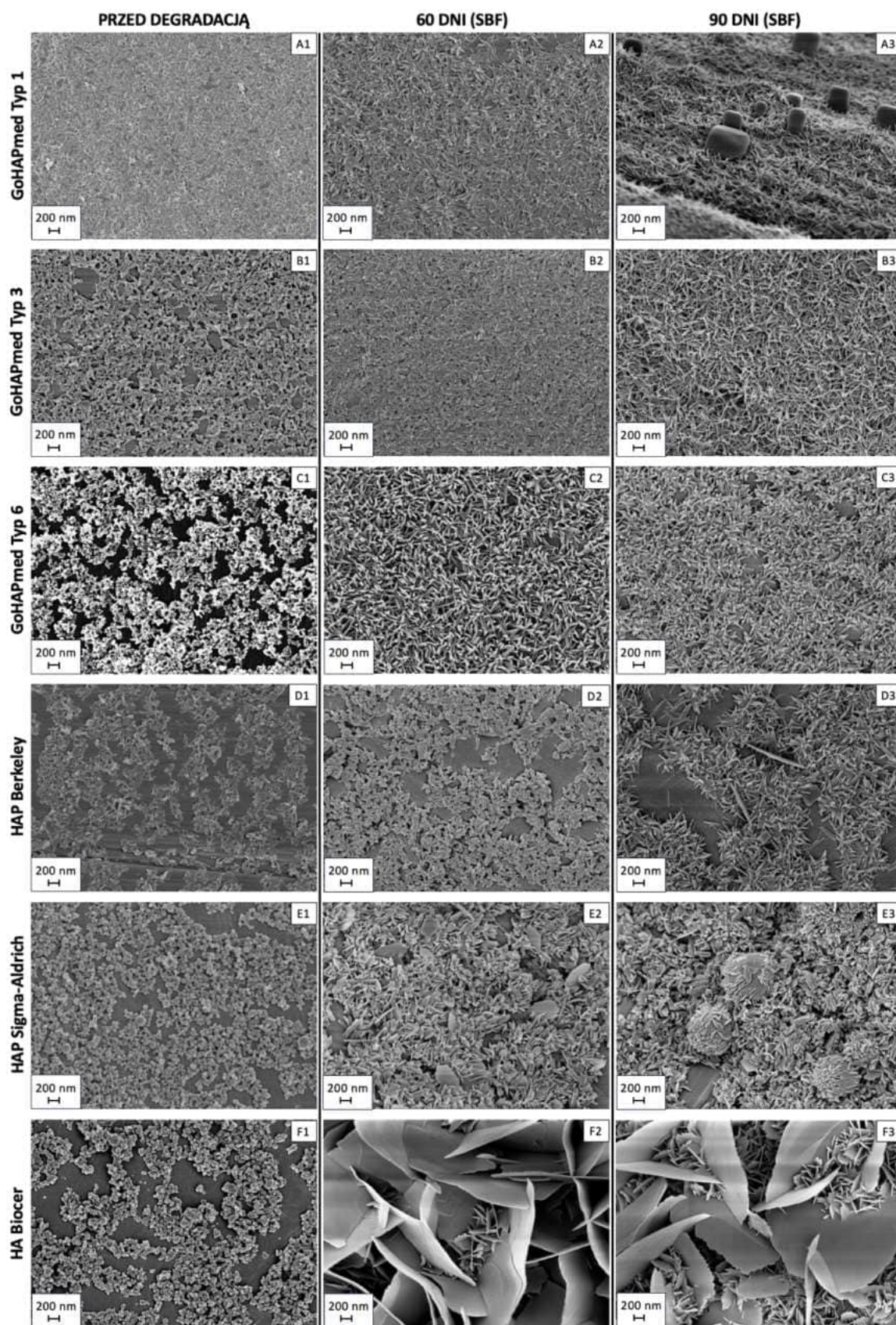
Rysunek 78. Obrazy SEM sztucznego więzadła krzyżowego UHMWPE po badaniu wytrzymałości powłok GoHAPmed Typ 3 w warunkach symulujących kliniczne zastosowanie implantu.

Na obrazach SEM obserwowano zmiany morfologii powłok hydroksyapatytowych powstałe na skutek badań degradacji prowadzonych w roztworze soli fizjologicznej (Rysunek 79) oraz roztworze symulującym osocze (Rysunek 80) przez okres 60 i 90 dni. Analiza obrazów powłok, których badania degradacji prowadzono w PBS nie wykazała znaczących zmian w charakterze powłok GoHAPmed Typ 1 oraz GoHAPmed Typ 3. W przypadku powłok hydroksyapatytowych składających się z nanocząstek o średnim rozmiarze większym niż 20 nm zaobserwowano zwiększenie porowatości powłok po 90 dniach badań. W przypadku każdej z powłok badanej w PBS nie zaobserwowano zmian w morfologii nanocząstek składających

się na powłoki naniesione na powierzchnię sztucznych więzadeł UHMWPE (Rysunek 79). W przeciwieństwie do wyników degradacji w soli fizjologicznej, degradacja w płynie symulującym osocze skutkowała zmianą w morfologii nanocząstek składających się na każdą z powłok hydroksyapatytowych (Rysunek 80). W przypadku powłok składających się z nanocząstek GoHAPmed zaobserwowano wydłużenie ziaren po 60 dniach w SBF (Rysunek 80, (A2, B2, C2)) i ich dalszy wzrost po 90 dniach prowadzenia badań (Rysunek 80, (A3, B3, C3)). Nanocząstki GoHAPmed na powierzchni powłoki przybrały kształt igieł dla każdego z zastosowanych typów. Powłoki osadzone z nanocząstek HAP Berkeley po 60 dniach w SBF nie wykazywały znaczących zmian (Rysunek 80, (D2)), jednak po 90 dniach kształt nanocząstek podobnie, jak w przypadku nanocząstek GoHAPmed zmienił się i przybrał igłowy kształt (Rysunek 80, (D3)). Miejscami obserwowano również pojedyncze struktury płatkowe. Powłoki hydroksyapatytowe składające się z nanocząstek HAP Sigma-Aldrich również zmieniły morfologię na skutek przeprowadzonych badań degradacji w SBF. Nanocząstki Sigma-Aldrich również zmieniły morfologię i przybrały nieregularne płatkowe kształty (Rysunek 80, (E2, E3)). Zaskakująco dużą zmianę morfologii zaobserwowano w przypadku powłok składających się z nanocząstek hydroksyapatytu HA Biocer. Nanocząstki o średniej wielkości ok. 90 nm pod wpływem badań degradacji w SBF rekrystalizowały, tworząc mikronowe struktury płatkowe o ostrych krawędziach (Rysunek 80, (F2, F3)).



Rysunek 79. Obrazy SEM sztucznych więzadeł składających się z włókien UHMWPE, których powierzchnię modyfikowano powłokami hydroksyapatytowymi GoHAPmed oraz HAP Berkeley i HAP Sigma-Aldrich. Obrazy po naniesieniu powłok oraz po testach degradacji w PBS, 60 i 90 dni.



Rysunek 80. Obrazy SEM sztucznych więzadeł składających się z włókien UHMWPE, których powierzchnię modyfikowano powłokami hydroksyapatytowymi GoHAPmed oraz HAP Berkeley i HAP Sigma-Aldrich. Obrazy po naniesieniu powłok oraz po testach degradacji w SBF, 60 i 90 dni.

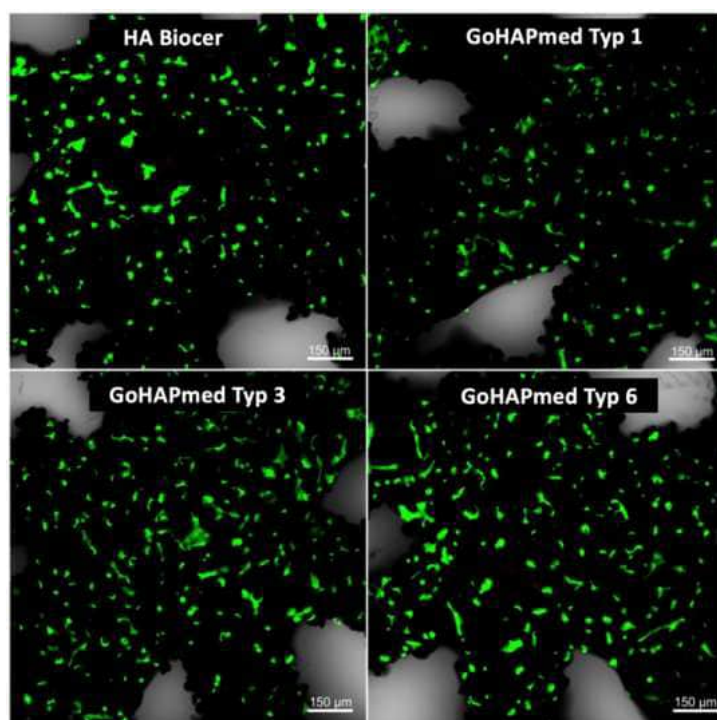
Tkanki twarde wykazują różną morfologię kryształów CaP. Ze zmianą kształtu nanocząstek wiążą się różnice we właściwościach nanostrukturalnych, takie jak wielkość nanocząstek, powierzchnia właściwa, anizotropia itp. [282,284]. Na przykład hydroksyapatyt zawarty w tkance kostnej ma kształt igieł/prętów o wymiarach 50 x 25 x 4 nm. Natomiast w szkliwie zębowym odnaleziono hydroksyapatyt o kształcie graniastosłupa sześciokątnego o wymiarach 100 x 70 x 25 nm. Kryształy te są preferencyjnie równoległe do włókien kolagenowych lub powierzchni szkliwa [284]. Morfologia kryształów nHAP może zależeć od sposobu jego wytwarzania. Czynniki wpływającymi na morfologię cząstek w procesie syntezy jest przesylenie roztworu, substraty, temperatura, pH, czas procesu, domieszki lub zanieczyszczenia [284]. Zatem zmiana morfologii po rekrytalizacji nanocząstek składających się na powłoki hydroksyapatytowe może być związana z metodą ich wytworzenia.

Badania przedstawione w tym podrozdziale były częścią projektu o akronimie NanoLigaBond, pt. Mocowanie sztucznych ścięgien i więzadeł do tkanki kostnej z wykorzystaniem nanotechnologii realizowanego w ramach Działania 4.1 Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014-2020 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego, Nr Umowy: POIR.04.01.02-00-0016/16.

5.4. Wpływ nano-powłok hydroksyapatytowych nakładanych metodą SonoNanoCoating na biologiczne właściwości materiałów.

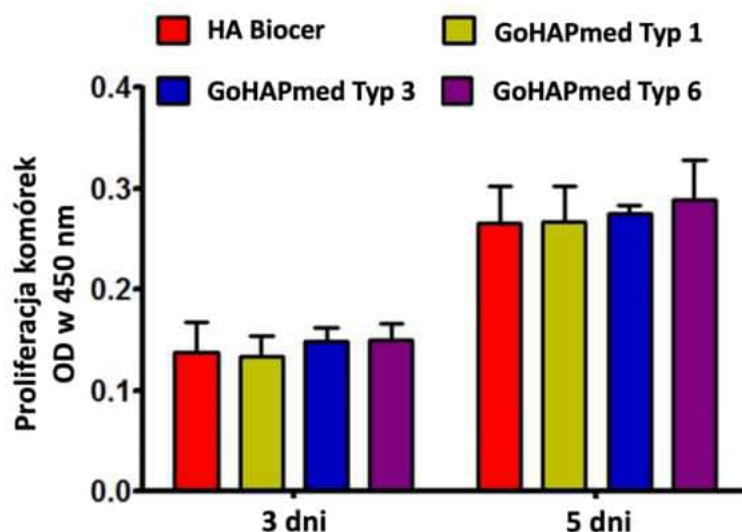
5.4.1. Adhezja, żywotność i proliferacja osteoblastów hFOB 1.19.

Krażki drukowane 3D z tytanu Ti64ELI o strukturze ażurowej, identycznej jak w implantach kręgosłupowych (Andromeda, Syntropiq, Czechy) modyfikowane powłokami hydroksyapatytowymi nanoszonymi metodą SonoNanoCoating, zgodnie z Tabelą 11 zbadano pod kątem cytotoksyczności wobec komórek kościotwórczych osteoblastów ludzkich hFOB 1.19. Dodatkowo naniesiono powłokę, składającą się komercyjnie dostępnych nanocząstek HA Biocer, w tym celu zastosowano czas prowadzenia procesu ultradźwiękowego wynoszący 6 minut. Po 24-godzinnej inkubacji obserwacje pod mikroskopem konfokalnym wykazały, że wszystkie testowane biomateriały wspomagały adhezję i wzrost osteoblastów (Rysunek 81). Co ważne, komórki były żywotne (zielona fluorescencja) i nie zaobserwowano martwych komórek (czerwona fluorescencja). Wyniki te dowiodły, że każda z wytworzonych metodą SonoNanoCoating powłok nie była toksyczna dla osteoblastów in vitro.

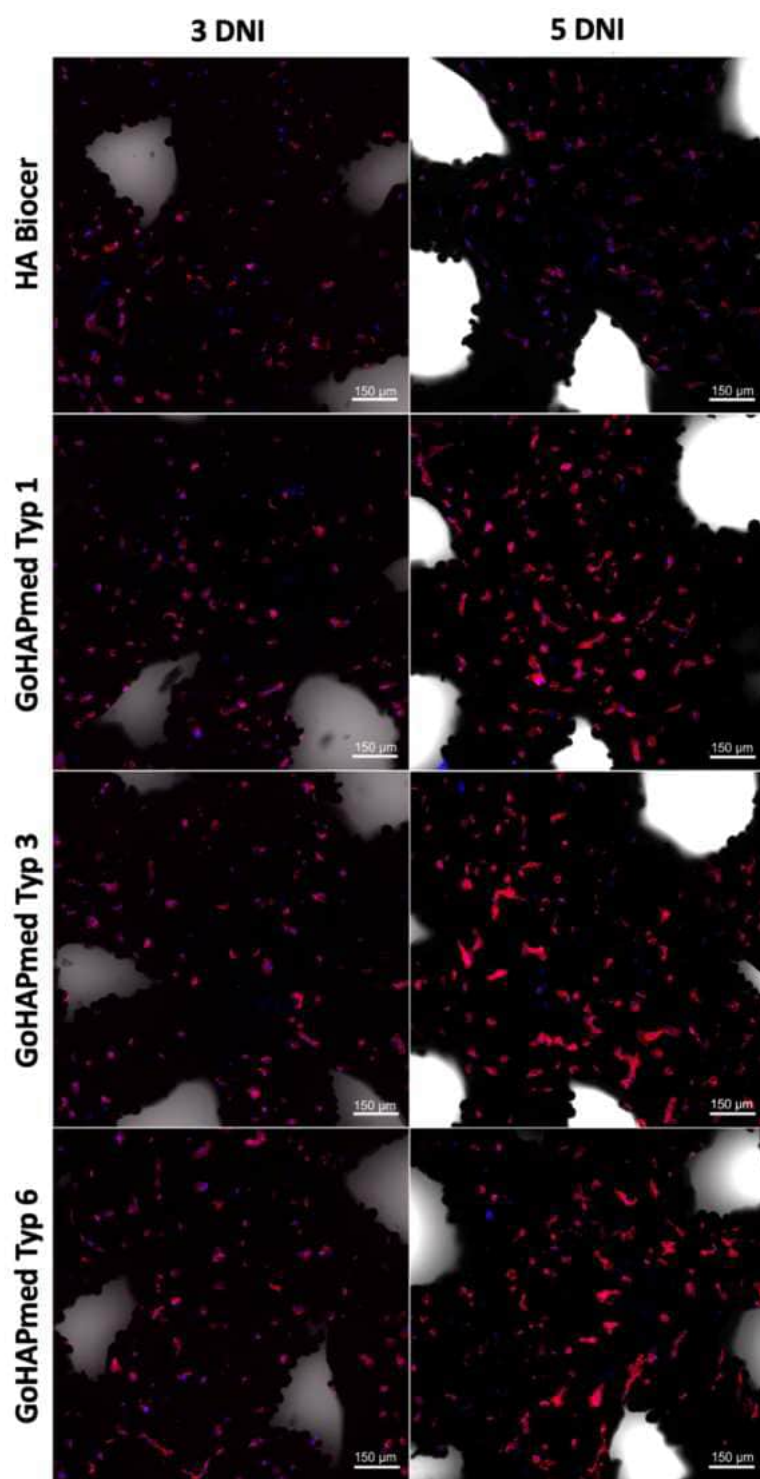


Rysunek 81. Obrazy z mikroskopu konfokalnego przedstawiające żywotność osteoblastów (komórki hFOB 1.19, ATCC CRL-11372TM) po 24-godzinnej hodowli na powierzchni podłoży tytanowych drukowanych 3D modyfikowanych powłokami, odpowiednio: GoHAPmed Typ 1, GoHAPmed Typ 3 i GoHAPmed Typ 6, HA Biocer. W celu wizualizacji struktury biomateriałów zastosowano kontrast Nomarskiego. Żywe komórki emitowały zieloną fluorescencję, podczas gdy martwe komórki emitowały czerwoną fluorescencję.

Test WST-8 wykazał, że wszystkie testowane biomateriały wspierały proliferację osteoblastów, ponieważ aktywność metaboliczna komórek wzrastała wraz z czasem trwania eksperymentu (Rysunek 82). Po 3-dniowej inkubacji gęstość optyczna (OD) roztworu WST-8 wynosiła $0,138 \pm 0,031$ (powłoka HA Biocer), $0,133 \pm 0,021$ (powłoka GoHAPmed Typ 1), $0,148 \pm 0,015$ (powłoka GoHAPmed Typ 3), $0,151 \pm 0,016$ (powłoka GoHAPmed Typ 6). Po 5 dniach hodowli OD roztworu WST-8 wynosiło $0,266 \pm 0,037$ (powłoka HA Biocer), $0,267 \pm 0,035$ (powłoka GoHAPmed Typ 1), $0,276 \pm 0,008$ (powłoka GoHAPmed Typ 3), $0,289 \pm 0,039$ (powłoka GoHAPmed Typ 6). Wstępnie zaobserwowano, że aktywność metaboliczna komórek hodowanych na biomateriałach wzrastała w następującym trendzie: komórki na BIOCER < komórki na GoHAP 1 < komórki na GoHAP 3 < komórki na GoHAP 6, różnice między badanymi biomateriałami były zbyt niskie i nie były istotne statystycznie (jednokierunkowy test ANOVA, a następnie porównanie wielokrotne Tukeya, GraphPad Prism 5, wersja 5.04 oprogramowania). Obserwacje pod mikroskopem konfokalnym (Rysunek 89) potwierdziły wyniki uzyskane za pomocą testu WST-8 (Rysunek 88). Stwierdzono, że liczba komórek hodowanych na wszystkich badanych biomateriałach wzrastała wraz z czasem trwania eksperymentu. Na podstawie wyników uzyskanych za pomocą testu WST-8 i obserwacji mikroskopu konfokalnego należy zauważyć, że wszystkie badane biomateriały promowały proliferację osteoblastów w podobny sposób.



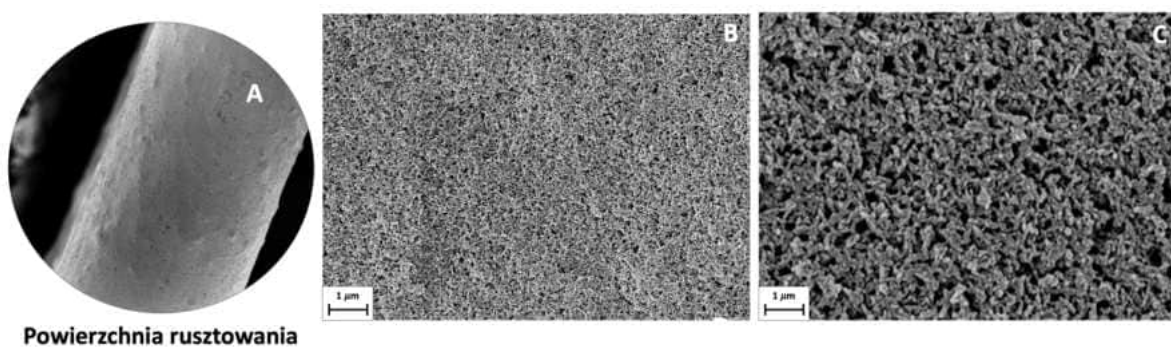
Rysunek 82. Proliferacja osteoblastów po 3- i 5-dniowej hodowli na powierzchni podłoża tytanowych drukowanych 3D modyfikowanych powłokami, odpowiednio: GoHAPmed Typ 1, GoHAPmed Typ 3 i GoHAPmed Typ 6, HA Biocer.



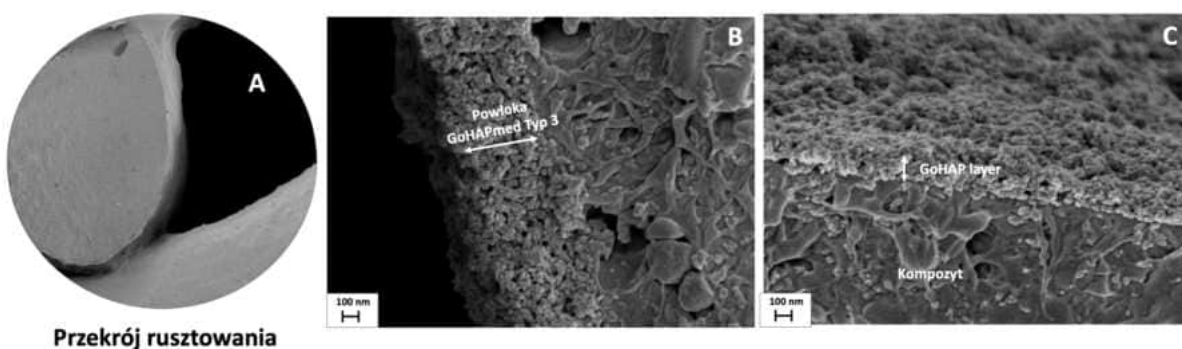
Rysunek 83. Obrazy z mikroskopu konfokalnego przedstawiające morfologię osteoblastów (komórki hFOB 1.19, ATCC CRL-11372TM) po 3- i 5-dniowej hodowli na powierzchni podłoża tytanowych drukowanych 3D modyfikowanych powłokami, odpowiednio: GoHAPmed Typ 1, GoHAPmed Typ 3 i GoHAPmed Typ 6, HA Biocer. W celu wizualizacji struktury biomateriałów zastosowano kontrast Nomarskiego. Jądra - niebieska fluorescencja, filamenty F-aktyny - czerwona fluorescencja. Powiększenie: 100x, pasek skali: 150 µm.

5.3.6. Ocena żywotności oraz efektywności zasiedlenia kompozytowych rusztowań kostnych modyfikowanych powłoką GoHAPmed Typ 3 przez komórki macierzyste.

Poniżej przedstawiono obrazy SEM powierzchni (Rysunek 84) kompozytowego rusztowania kostnego wytworzonego techniką druku 3D z kompozytu PCL/ β TCP/HAP pokrytego powłoką, składającą się z nanocząstek GoHAPmed Typ 3 (14 nm) oraz przekroju tego rusztowania (Rysunek 85). Na przekroju uwidoczniono miejsce łączenia powłoki z podłożem kompozytowym oraz grubość powłoki GoHAPmed Typ 3. Analiza 68 obrazów SEM przekroju powłoki GoHAPmed Typ 3 na tego typu rusztowaniach kompozytowych wykazała, iż grubość powłoki wynosi ok. 220 nm (Tabela 14).



Rysunek 84. Obraz SEM powierzchni kompozytowego rusztowania kostnego modyfikowanej powłoką GoHAPmed Typ 3 [260].



Rysunek 85. Obraz SEM przekroju kompozytowego rusztowania kostnego modyfikowanej powłoką GoHAPmed Typ 3 [260].

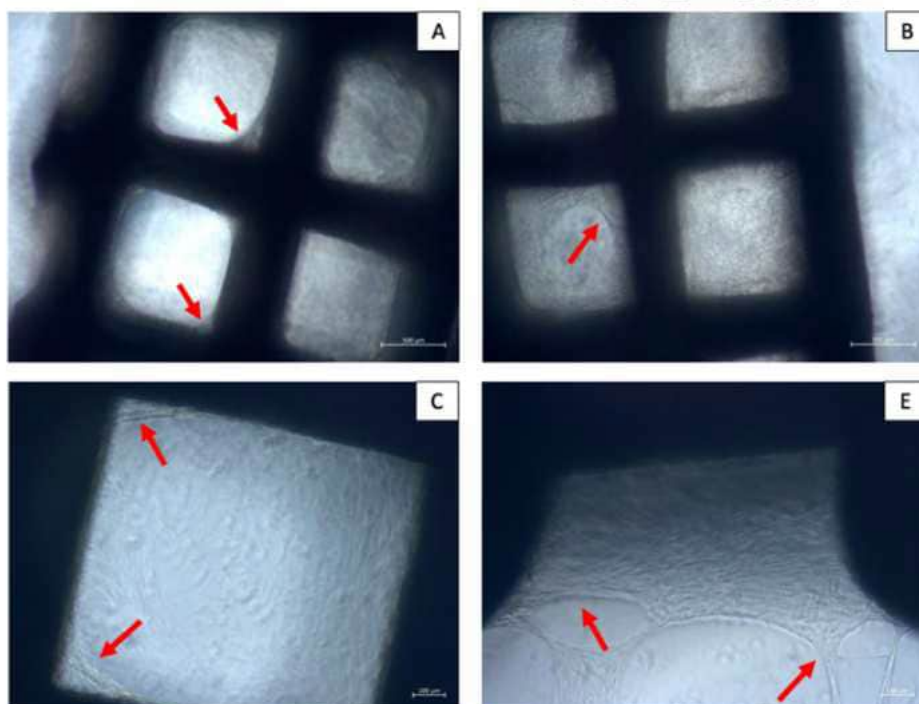
Tabela 14. Grubość powłoki GoHAPmed Typ 3 naniesionej na powierzchnię kompozytowego rusztowania kostnego.

Powłoka GoHAPmed Typ 3 na powierzchni rusztowania kompozytowego	
Liczba pomiarów grubości warstwy	68
Średnia grubość warstwy	220 nm
Odchylenie standardowe	70 nm
Minimalna grubość warstwy	110 nm
Maksymalna grubość warstwy	395 nm

Na rysunkach poniżej przedstawiono obraz komórek MSC po 7 dniach. Komórki MSC tworzą specyficzne struktury przestrzenne przypominające sieć i przylegają do rusztowań kostnych (co zaznaczono czerwonymi strzałkami). Oznacza to, że rusztowania kompozytowe modyfikowane nano-powłokami GoHAPmed Typ 3 (14 nm) naniesionymi metodą SonoNanoCoating stanowią dobre podłoże do adhezji komórek MSC.

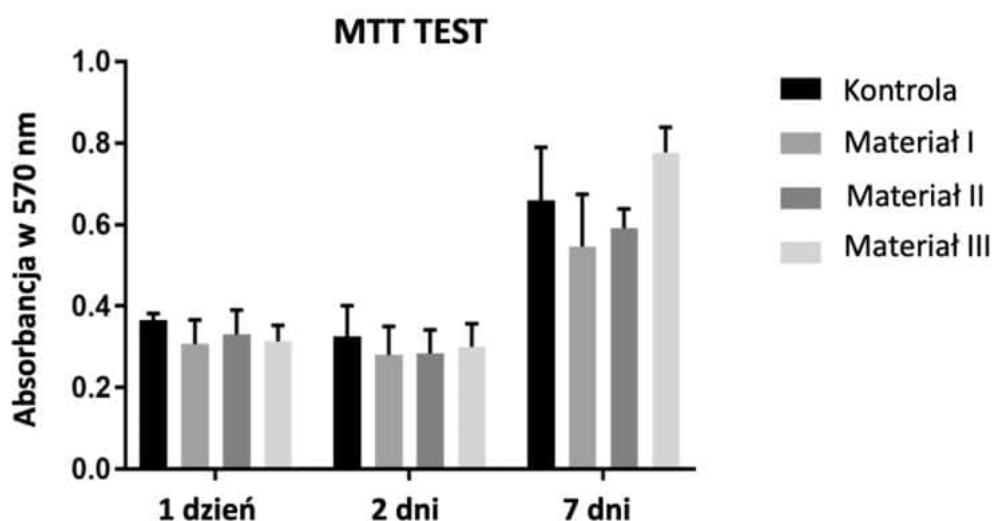
Medium osteogenne

Medium osteogenne + FGF-2 + BMP-2



Rysunek 86. Rusztowanie kostne kompozytowe wykonane z PCL/HAP/TCP, którego powierzchnię modyfikowano powłoką GoHAPmed Typ 3 - po 7 dniach hodowli komórek MSC w medium osteogennym oraz medium osteogennym wzbogacanym FGF-2 i BMP-2. Powiększenie odpowiednio: 4x, 10x.

Po 7 dniach hodowli zaobserwowano również wzrost aktywności metabolicznej komórek (Rysunek 87), co oznacza, że każdy z badanych materiałów jest odpowiedni do hodowli i zasiedlania przez MSC, zwiększa ich aktywność proliferacyjną i nie jest dla nich cytotoksyczny. Materiał w postaci rusztowań kompozytowy PCL/HAP/TCP, którego powierzchnię modyfikowano nano-powłoką GoHAPmed Typ 3 (Materiał III) porównano z analogicznym rusztowaniem kompozytowym bez modyfikacji powierzchni (Materiał II) oraz rusztowaniem z czystego PCL (Materiał I). Największą aktywność proliferacyjną komórek zaobserwowano w przypadku hodowli MSC w obecności Materiału III, tj. rusztowania kostnego wykonanego z kompozytu PCL/HAP/TCP, którego powierzchnię modyfikowano powłoką GoHAPmed Typ 3.

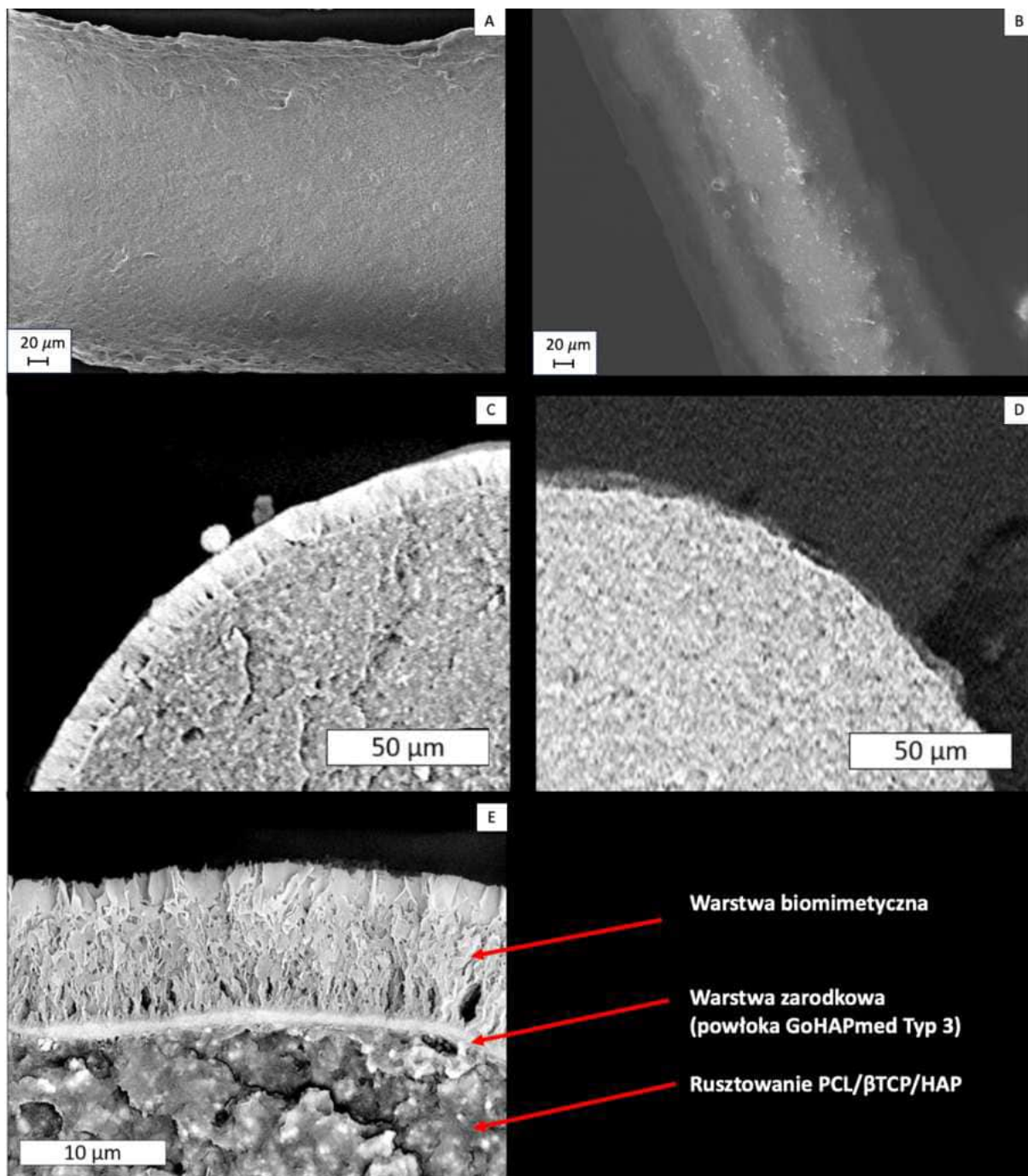


Rysunek 87. Oznaczenie aktywności metabolicznej (MTT test) po 1, 3, 7 dniach hodowli w standardowym medium hodowlanym α MEM [260].

Wyniki zawarte w tym podrozdziale były realizowane w ramach projektu o akronimie iTE oraz tytule „Metoda leczenia dużych ubytków tkanki kostnej u chorych onkologicznych z wykorzystaniem inżynierii tkankowej in vivo”, Nr projektu: STRATEGMED3/306888/3/NCBR/2017. Część wyników przedstawionych w pracy zawarto w publikacji pt. Osteogenic Potential of Sheep Mesenchymal Stem Cells Preconditioned with BMP-2 and FGF-2 and Seeded on an nHAP-Coated PCL/HAP/ β -TCP Scaffold [260], gdzie autorka niniejszej rozprawy była odpowiedzialna za opracowanie metodyki oraz wykonanie części materiałowej, związanej z syntezą nanocząstek GoHAPmed oraz osadzeniem ich w formie nano-powłoki na powierzchni rusztowania kostnego, jak również charakteryzację otrzymanych nano-powłok.

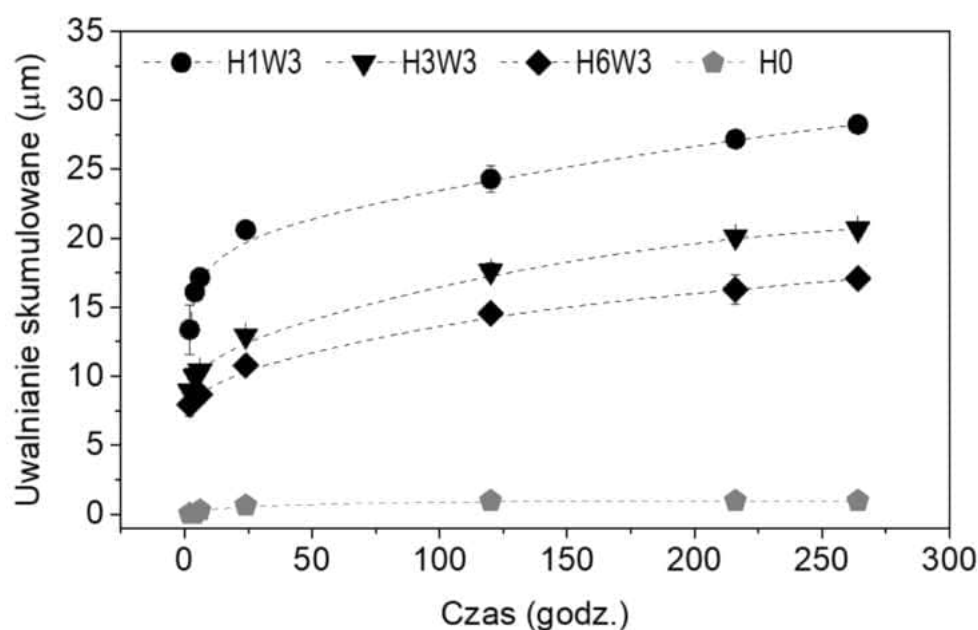
5.3.5. Zastosowanie powłok GoHAPmed jako warstwy zarodkowej

Biorąc pod uwagę rekrytalizację nanocząstek oraz ich rozrost w powłokach naniesionych na implant więzadła UHMWPE zastosowano powłoki GoHAPmed jako warstwę zarodkową dla biomimetycznej powłoki, zawierającą czynniki z wskazanej grupy: antybiotyk, czynniki wzrostu, cytokiny, enzym, hormon, lek przeciwnowotworowy, środek przeciwzapalny, witaminy, i ich kombinacje. Na Rysunek 88 (C i D) przedstawiono wpływ zastosowania warstwy zarodkowej (powłoki GoHAPmed) na uzyskanie powłoki biomimetycznej (Rysunek 88 (E)) zawierającej białko w postaci cytochromu c na podłożu w postaci rusztowania kostnego drukowanego 3D z kompozytu PCL/ β TCP/HAP. Powłoki zarodkowe wytwarzano z nanocząstek GoHAPmed o wielkości od 10 nm do 42 nm. Im mniejsze nanocząstki zastosowane w warstwie zarodkowej, tym większe rozwinięcie powierzchni właściwej i tym więcej leku może do niej dyfundować osiągając wyższe stężenie leku w docelowej powłoce biomimetycznej. Zależność tę udowodniono poprzez wykonanie i inkubację powłok zarodkowych z nanocząstek GoHAPmed o różnej wielkości nanocząstek, tj. 10 nm (Typ 1), 14 nm (Typ 3) oraz 42 nm (Typ 6). Następnie przeprowadzono badania uwalniania białka z powłok biomimetycznych uzyskanych na warstwach zarodkowych. W czasie 11 dni największą ilość (51 μ g) uwolnionego białka odnotowano dla powłoki biomimetycznej wytworzonej na warstwie zarodkowej osadzonej z nanocząstek GoHAPmed 10 nm. Znacznie niższe wartości odnotowano dla powłoki biomimetycznej wytworzonej na warstwach zarodkowych, składających się z większych nanocząstek, tj. 37 μ g przy zastosowaniu GoHAPmed Typ 3 (14 nm) oraz 31 μ g przy zastosowaniu (42 nm), (Rysunek 89).



Rysunek 88. Różnice wynikające z zastosowania warstwy zarodkowej na włóknie rusztowania kostnego drukowanego 3D z kompozytu PCL/ β TCP/HAP; A) włókno rusztowania kostnego, którego powierzchnię modyfikowano warstwą zarodkową (GoHAPmed Typ 1); włókno rusztowania kostnego bez modyfikacji; C) przekrój rusztowania kostnego z powłoką biomimetyczną wytworzona poprzez 24-godziną inkubację rusztowania z warstwą zarodkową w roztworze SBF z dodatkiem białka cytochrom c; D) przekrój rusztowania kostnego bez warstwy zarodkowej inkubowany przez 24 godziny w roztworze SBF z dodatkiem białka cytochrom c; E) przekrój rusztowania kostnego z wytworzoną powłoką biomimetyczną na jego powierzchni. Na podstawie zgłoszenia patentowego [285].

Z ilością stężenia leku powiązano również grubość warstwy zarodkowej – im grubsza powłoka GoHAPmed tym większe stężenie leku w powłoce bioaktywnej [285].



Rysunek 89. Uwalnianie białka cytochrom c w roztworze PBS z biomimetycznych powłok hydroksyapatytowych wytworzonych z zastosowaniem warstw zarodkowych składających się z różnej wielkości nanocząstek GoHAPmed, odpowiednio 10 nm, 14 nm, 42 nm. Gdzie: H1W3 odpowiada warstwie zarodkowej GoHAPmed Typ 1 (10 nm), H3W3 odpowiada warstwie zarodkowej GoHAPmed Typ 3 (14 nm), H6W3 odpowiada warstwie zarodkowej GoHAPmed Typ 6 (42 nm), H0 odpowiada rusztowaniu kostnemu bez zastosowania modyfikacji powierzchni [285].

Badania przedstawione w tym rozdziale są częścią zgłoszenia patentowego P.434340, pt. Bioaktywne hydroksyapatytowe powłoki o hierarchicznej nano/mikrostrukturze, sposób ich wytwarzania oraz zastosowanie. Autorka rozprawy jest współtwórcą niniejszego patentu [285] i była współodpowiedzialna za opracowanie metodyki nakładania powłoki zarodkowej, jej wytworzenie oraz charakteryzację.

6. Dyskusja i podsumowanie wyników

Hydrotermalna synteza mikrofalowa pozwala na otrzymanie nanocząstek hydroksyapatytu o ściśle regulowanej wielkości [52,273]. Efekt rozmiaru w skali nano determinuje właściwości materiałów. Szczególnie istotny jest wpływ wielkości nanocząstek na powierzchnię właściwą nanomateriałów, zdolności sorpcyjne, wydzielanie jonów z powierzchni, szybkość degradacji [273]. Sterowanie tymi właściwościami otwiera nowe możliwości projektowania materiałów do regeneracji tkanki kostnej, np. poprzez regulację ilości wydzielanych jonów wapnia Ca^{2+} . W przeglądzie literaturowym wykazano, że jony wapnia stanowią wewnątrzkomórkowe sygnały regulujące przebieg kilku procesów komórkowych takich jak proliferacja komórek, transkrypcja genów i skurcz mięśni [207]. Co więcej, badania *in vitro* wykazały, że wapń zawarty w rusztowaniach do wzrostu kości wspomaga zwiększoną adhezję, proliferację i różnicowanie osteoblastopodobnych komórek MG-63 [207,286]. Badania *in vivo* wykazały, że jony Ca^{2+} uwalniane z rusztowań kompozytowych HAP/TCP zwiększają tworzenie kości w ubytkach kości łydki szczura [58]. Ponadto implanty tytanowe pokryte Ca^{2+} spowodowały zwiększenie gęstości kości i osteointegrację w modelu kości piszczelowej owcy [207,286]. W związku z czym kontrola ilości uwalnianych jonów Ca^{2+} jest szczególnie ważna w aspekcie indukcji naprawy tkanki kostnej, a dobór ich odpowiedniej ilości jest niezbędny do odpowiedniego zastosowania materiałów wapniowo-fosforanowych w inżynierii tkankowej i medycynie regeneracyjnej [65]. W badaniach zawartych w podrozdziale 5.1.3. wykazano, że rozwinięcie powierzchni właściwej nanocząstek GoHAPmed ma silny wpływ na rozpuszczalność oraz ilość wydzielanych jonów. Zatem możliwa jest regulacja ilości jonów wapnia wydzielanych do otoczenia poprzez zastosowanie nanocząstek GoHAPmed o różnej wielkości. Innym istotnym parametrem, jaki można relegować poprzez wykorzystanie efektu rozmiaru nano jest pojemność sorpcyjna opisana w podrozdziale 5.1.2., dzięki której możliwa jest kontrola ilości substancji zaadsorbowanej na powierzchni materiału. Efekt ten między innymi wykorzystano do adsorpcji leku na powierzchni powłoki hydroksyapatytowej [284,287].

W pracy przeprowadzono szereg eksperymentów w celu wyznaczenia optymalnych parametrów procesu SonoNanoCoating takich jak, amplituda drgań, temperatura zawiesiny, koncentracja nanocząstek w medium, czas trwania procesu, wielkość nanocząstek hydroksyapatytu składających się na powłokę oraz rodzaj podłoża, którego powierzchnię modyfikowano powłokami hydroksyapatytowymi. Ustalono, że metoda SonoNanoCoating jest najbardziej efektywna przy następującym doborze podstawowych parametrów procesu

ultradźwiękowego: amplituda 30 μm , temperatura zawiesiny nanocząstek wynosząca 30 °C, prostopadłe ułożenie sonotrody w odległości 15 mm od powierzchni próbki. Parametry podstawowe ustalono parametrami stałymi w procesie SonoNanoCoating. Wielkość nanocząstek hydroksyapatytu zawieszonych w medium oraz rodzaj podłoża, na powierzchni którego w procesie SonoNanoCoating osadzano powłoki, jak również koncentracja nanocząstek w zawieszynie są parametrami kluczowymi, od których uzależniono czas prowadzenia procesu SonoNanoCoating. Parametry te określono jako zmienne parametry procesu (Tabela 15).

Tabela 15. Optymalne parametry zmienne procesu ultradźwiękowego osadzania powłok hydroksyapatytowych metodą SonoNanoCoating na różnego rodzaju podłoża.

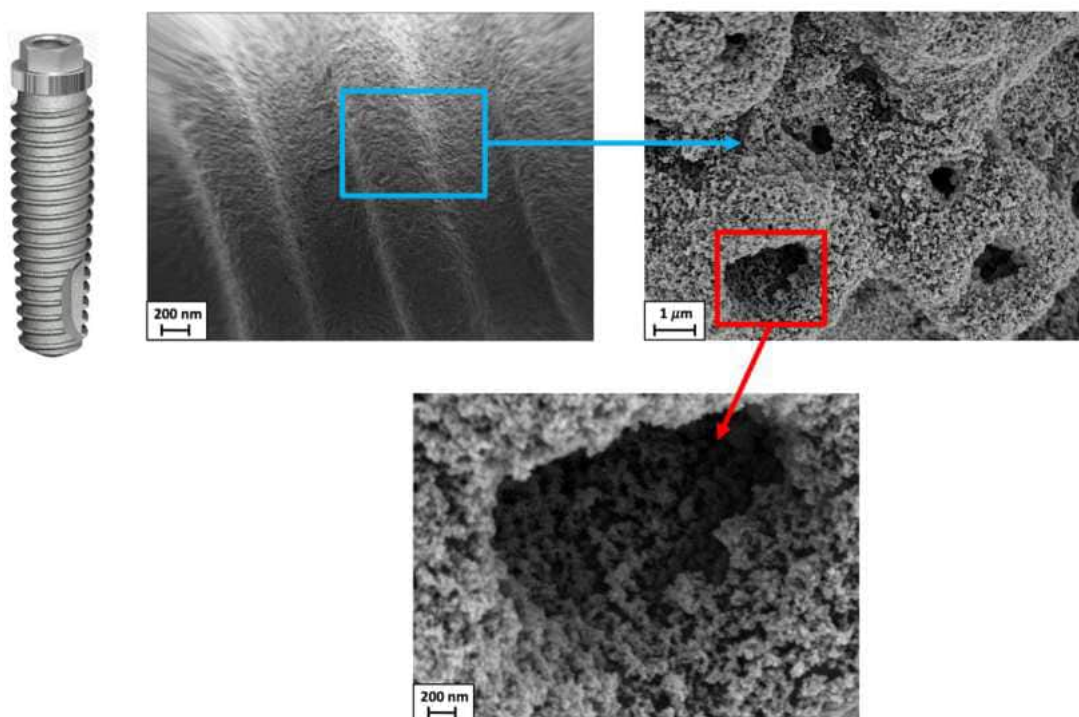
Rodzaj podłoża	Nazwa powłoki	Śr. wielkość nanocząstek (nm)	Czas procesu SNC (min)	Koncentracja nanocząstek (% masy)
Rusztowanie PCL drukowane 3D	GoHAPmed Typ 3	14	15	0,2
Płaskie podłoże PCL	GoHAPmed Typ 3	14	8	0,2
Płaskie podłoże PCL	GoHAPmed Typ 3	42	12	
Płaskie podłoże tytanu grade 2	GoHAPmed Typ 1	10	1	0,2
Płaskie podłoże tytanu grade 2	GoHAPmed Typ 3	14	3	
Płaskie podłoże tytanu grade 2	GoHAPmed Typ 4	26	3	
Płaskie podłoże tytanu grade 2	GoHAPmed Typ 5	30	6	
Płaskie podłoże tytanu grade 2	GoHAPmed Typ 6	42	6	
Tytan drukowany 3D	GoHAPmed Typ 1	10	1	0,2

Tytan drukowany 3D	GoHAPmed Typ 3	14	1	
Tytan drukowany 3D	GoHAPmed Typ 4	26	3	
Tytan drukowany 3D	GoHAPmed Typ 5	30	3	
Tytan drukowany 3D	GoHAPmed Typ 6	42	6	
Płaskie podłoże PEEK	GoHAPmed Typ 1	10	3	0,2
Płaskie podłoże PEEK	GoHAPmed Typ 3	14	3	0,2
Płaskie podłoże PEEK	GoHAPmed Typ 4	26	3	0,2
Płaskie podłoże PEEK	GoHAPmed Typ 5	30	3	0,2
Płaskie podłoże PEEK	GoHAPmed Typ 6	42	3	0,2
Włókna UHMWPE	GoHAPmed Typ 1	10	10	0,05
Włókna UHMWPE	GoHAPmed Typ 3	14	10	
Włókna UHMWPE	GoHAPmed Typ 6	42	10	
Rusztowanie kompozytowe PCL/HAP/TCP	GoHAPmed Typ 3	14	5	0,4

Otrzymane wyniki jasno wskazują, że zwiększenie wielkości nanocząstek osadzanych na różnego rodzaju podłożach powoduje obniżenie efektywności procesu SonoNanoCoating oraz pogorszenie jakości otrzymywanych powłok. Najlepszą efektywność procesu SonoNanoCoating obserwowano dla nanocząstek GoHAPmed o średniej wielkości od 10 nm do 14 nm. Jednakże odpowiednio dobrane parametry procesu pozwalały na otrzymywanie

powtarzalnych, dobrej jakości nano-powłok składających się z nanocząstek o większym średnim rozmiarze.

Inżynieria procesu ultradźwiękowego SonoNanoCoating obejmująca projektowanie i wytworzenie odpowiedniego zbiornika procesowego oraz optymalizację parametrów procesu SonoNanoSoating pod kątem wielkości osadzanych nanocząstek hydroksyapatytu oraz rodzaju podłoża modyfikowanego nano-powłokami pozwoliła na wykazanie uniwersalności metody SonoNanoCoting w zakresie nanoszenia powłok hydroksyapatytowych. W pracy dowiedziono, że możliwe jest zastosowanie tej metody do uzyskania nano-powłok na powierzchniach materiałów wykonanych z różnego rodzaju stopów tytanu, polimerów wysokotemperaturowych takich jak PEEK, polimerów termoplastycznych jak np. UHMWPE, polimerów biodegradowalnych takich jak PCL, kompozytów biodegradowalnych PCL/HAP/TCP. Kształt i morfologia powierzchni również nie stanowi ograniczenia dla metody SonoNanoCoating, co udowodniono poprzez osadzenie jednorodnych nano-powłok na struktury komórkowe drukowane 3D, chropowate oraz gładkie powierzchnie płaskie, ażurowe struktury implantów oraz włókna sztucznych więzadeł krzyżowych. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że metoda SonoNanoCoating pozwala na osadzanie powłok wewnątrz porów powierzchni materiału (Rysunek 90), jak również wewnątrz biodegradowalnych struktur komórkowych rusztowań PCL, PCL/HAP/TCP, a ponadto dociera do wnętrza ażurowych implantów kręgosłupa (Rysunek 70).



Rysunek 90. Obrazy SEM powłoki GoHAPmed Typ 3 na powierzchni porowatej śruby drukowanej 3D ze stopu tytanu Ti6Al4V.

Przedstawiona w pracy charakteryzacja powłok wykazała, że powłoki osadzone przy optymalnie dobranych parametrach SonoNanoCoating charakteryzują się jednorodną morfologią. Nano-powłoki osadzone z zawiesiny nanocząstek GoHAPmed o regulowanej wielkości w zakresie od 10 nm do 42 nm cechują się zwilżalnością powierzchni od 46° do 73° , która jest korzystna dla adhezji i proliferacji komórek [277,278]. Siła adhezji powłok jest wystarczająca do swobodnego operowania materiałami, co udokumentowano poprzez eksperymenty symulujące warunki operacyjne, takie jak: mocowanie sztucznego więzadła krzyżowego pokrytego powłoką GoHAPmed Typ 3, wkręcanie i wykręcanie implantów śrub tytanowych w obrębie kości wołowej. Dobra adhezja nano-powłok do podłoża może wynikać z efektu nano rozmiaru, a będąc bardziej precyzyjnym – z dużego rozwinięcia powierzchni właściwej oraz działania sił powierzchniowych nanomateriałów. Rozważając adhezję powłok do podłoża, należy również zwrócić uwagę na grubość powłok, która korzystnie powinna zawierać się pomiędzy 50 nm a 350 nm [239]. Stosując metodę SonoNanoCoating nie występuje potrzeba poprocesowej obróbki termicznej w celu poprawy adhezji powłok do podłoża, jak w przypadku innych metod, dających możliwość modyfikacji powierzchni materiałów o skomplikowanych kształtach [230,231]. Wysoka temperatura procesu lub poprocesowe wygrzewanie powłok hydroksyapatytu, może prowadzić do spiekania

i dekompozycji HAP oraz przyspieszonej degradacji powłok [219], a bardzo często pękania powłok [208,209]. W związku z tym niska temperatura procesu oraz brak konieczności wysokotemperaturowego wygrzewania powłok osadzanych metodą SonoNanoCoating stanowi przewagę nad aktualnie stosowanymi metodami nakładania powłok hydroksyapatytowych. Co istotne, niskotemperaturowa metoda SonoNanoCoating nie wpływa na właściwości nanocząstek osadzanych na powierzchni implantu w formie powłoki, zachowując ich biomimetyczny charakter. Ponadto, niska temperatura procesu umożliwia osadzanie powłok również na powierzchniach materiałów biodegradowalnych, wrażliwych na wysoką temperaturę, które coraz częściej znajdują swoje zastosowanie w leczeniu ubytków tkanki kostnej.

Badania degradacji nano-powłok uzyskanych metodą SonoNanoCoating nie wykazały istotnych zmian powłok składających się z nanocząstek o średniej wielkości 10 nm i 14 nm po 60 oraz 90 dniach w roztworze PBS. Natomiast dla nano-powłok, składających się z nanocząstek o średniej wielkości powyżej 20 nm zaobserwowano zwiększenie porowatości nano-powłok spowodowane procesem degradacji w PBS po 90 dniach. Powłoki poddane testom degradacji w 37°C w roztworze SBF przez 60 i 90 dni zmieniły morfologię. Obrazowanie SEM wykazało, że nano-powłoki w warunkach symulujących umieszczenie próbek w organizmie ludzkim przekształciły się w kryształy biomimicznego hydroksyapatytu o kształcie igłowym w przypadku powłok osadzonych z nanocząstek GoHAPmed Typ 1 (10 nm), GoHAPmed Typ 3 (14 nm), GoHAPmed Typ 6 (42 nm), w przypadku powłok osadzonych z HAP Berkeley morfologia nanocząstek na powierzchni powłoki przybrała mieszane kształty – igieł i płytek, natomiast w przypadku powłok osadzonych z HAP Sigma-Aldrich oraz HA Biocer zaobserwowano płytkowy kształt kryształów składających się na powłokę zarówno po 60 dniach jak i 90 dniach testu degradacji w SBF. Taki sposób rozrostu nanocząstek hydroksyapatytu może mieć związek z temperaturą jego wytwarzania oraz stosunkiem wapnia do fosforu w kryształach [288].

Niniejsza praca porusza aspekt efektu nano rozmiaru, dlatego zweryfikowano wpływ powłok składających się z nanocząstek zróżnicowanych pod kątem rozmiaru (odpowiednio: 10 nm, 14 nm, 42 nm oraz mikrometryczny HA Biocer) na osteoblasty ludzkie. Obserwacje przeprowadzone z użyciem mikroskopu konfokalnego dowiodły, że powłoki hydroksyapatytowe naniesione metodą SonoNanoCoating na podłoża Ti64ELI drukowane 3D składające się z nanocząstek o rozmiarze od 10 nm po wielkości mikrometryczne wspomagają adhezję i wzrost osteoblastów ludzkich hFOB 1.19. Zwiększoną proliferację osteoblastów potwierdzono również w teście WST-8.

Dokonano oceny żywotności oraz zasiedlenia kompozytowych rusztowań kostnych modyfikowanych nano-powłoką hydroksyapatytową (GoHAPmed Typ 3) przez komórki macierzyste (MSC). Materiał ten stanowił dobre podłoże do adhezji komórek MSC. Co więcej, zaobserwowano zwiększoną proliferację komórek w obecności rusztowań kompozytowych pokrytych nano-powłokami GoHAPmed Typ 3 (14 nm) w odniesieniu do analogicznych rusztowań kostnych bez nano-powłoki GoHAPmed oraz rusztowań wykonanych z PCL. Wynik ten potwierdza, iż modyfikacja materiałów nano-powłokami GoHAPmed Typ 3 metodą SonoNanoCoating jest skuteczna, a oddziaływania na granicy komórki – powłoka są odpowiednie do zastosowań w medycynie regeneracyjnej.

Nano-powłoki nanoszone metodą SonoNanoCoating mogą być wykorzystywane do dalszej funkcjonalizacji powierzchni implantów. Przykładowo, mogą one stanowić warstwę zarodkową do uzyskania powłoki biomimetycznego hydroksyapatytu dostarczającej leki. Powstawanie powłok biomimetycznego hydroksyapatytu poprzez zanurzenie materiału w roztworze SBF znacząco przyspiesza powolny proces dip coating [284]. Również w tym zastosowaniu nano-powłok istotne znaczenie ma wielkość cząstek i rozwinięcie powierzchni powłoki. Im mniejsze nanocząstki zastosowane w warstwie zarodkowej, tym większe rozwinięcie powierzchni właściwej, i tym więcej leku może do niej dyfundować osiągając wyższe stężenie leku w docelowej powłoce biomimetycznej.

Podsumowując przeprowadzone postępowanie badawcze pozwoliło na uzyskanie nowej wiedzy, pozwalającej na stwierdzenie, że:

- Metoda SonoNanoCoating może stanowić uniwersalną metodę pozwalającą na osadzanie nano-powłok hydroksyapatytowych na materiałach stosowanych w inżynierii tkanki kostnej, z uwzględnieniem materiałów wrażliwych na temperaturę.
- Metoda SonoNanoCoating jest odpowiednia do osadzania jednorodnych i powtarzalnych nano-powłok na skomplikowanych strukturach komórkowych i/lub materiałach włóknistych.
- Metoda SonoNanoCoating pozwala na osadzanie nano-powłok hydroksyapatytu, w sposób nie zmieniający struktury krystalicznej hydroksyapatytu użytego w procesie.
- Połączenie technologii hydrotermalnej syntezy mikrofalowej oraz metody SonoNanoCoating pozwala na osadzanie jednorodnych nano-powłok hydroksyapatytowych składających się z nanocząstek o średniej wielkości regulowanej w zakresie 10 nm – 42 nm.
- Możliwe jest sterowanie właściwościami powierzchni materiałów poprzez ich modyfikację nano-powłokami składającymi się z regulowanej wielkości nanocząstek.

- Wielkość nanocząstek w zawiesinie ma istotny wpływ na efektywność procesu SonoNanoCoating oraz morfologię nano-powłok hydroksyapatytowych.
- Nano-powłoki hydroksyapatytowe osadzone metodą SonoNanoCoating mogą docierać do wnętrza ażurowych struktur tytanowych implantów kręgosłupowych.
- Nano-powłoki hydroksyapatytowe osadzone metodą SonoNanoCoating mogą być stosowane jako warstwa zarodkowa przyspieszająca powstawanie powłoki biomimicznego hydroksyapatytu metodą dip coating.
- Nano-powłoki uzyskane metodą SonoNanoCoating charakteryzują się właściwościami odpowiednimi dla adhezji i proliferacji komórek.

W wyniku przeprowadzonych badań zdobyto powyższą wiedzę i osiągnięto cele pracy, polegające na udowodnieniu tezy pracy, iż połączenie technologii mikrofalowej hydrotermalnej syntezy nanocząstek oraz ultradźwiękowego nanoszenia powłok otwiera nowe możliwości nano-inżynierii i przełamanie ograniczeń w obecnie stosowanych metodach pokrywania powierzchni implantów poprzez:

1. Regulację wielkości nanocząstek w powłokach hydroksyapatytowych, umożliwiając tym samym regulację właściwości powłok oraz wpływ na nano-architekturę powierzchni, co daje nowe perspektywy w dziedzinie modyfikacji powierzchni implantów ortopedycznych.
2. Uzyskanie jednorodnych powłok hydroksyapatytowych obecnych zarówno na powierzchniach zewnętrznych, jak i wewnątrz porowatych struktur 3D oraz materiałach włóknistych.
3. Osadzanie nano-powłok w niskich temperaturach, co umożliwia modyfikację powierzchni materiałów wrażliwych na temperaturę oraz zachowanie właściwości nano-hydroksyapatytu.
4. Wykorzystanie wszechstronności metody i dobór parametrów osadzania nano-powłok niezależnie od rodzaju, kształtu i struktury modyfikowanego materiału.

Cele pracy osiągnięto poprzez wykonanie następujących prac:

1. Zbudowanie stanowiska do pokrywania ultradźwiękowego.
2. Optymalizację metody ultradźwiękowego osadzania nano-powłok pod kątem wytwarzania powłok hydroksyapatytowych składających się z nanocząstek o różnej wielkości oraz różnorodności materiałów stosowanych do wytwarzania implantów ortopedycznych, w tym implantów tytanowych, polimerowych oraz kompozytowych.
3. Wytworzenie i charakteryzacja nano-powłok hydroksyapatytowych składających się z różnej wielkości nanocząstek.
4. Wykazanie wpływu wielkości nanocząstek na właściwości nano-powłok.

5. Wykazanie biokompatybilności opracowanych nano-powłok.

Wykazano, że metoda SNC ma potencjał stać się wiodącą technologią modyfikowania powierzchni implantów ortopedycznych w celu uzyskania poprawy adhezji osteoblastów do powierzchni oraz przyspieszenie formowania tkanki kostnej w miejscu implantacji i dobrej stabilizacji implantu w ciele pacjenta. Metodę SNC cechuje nie tylko wysoka skuteczność w modyfikacji powierzchni implantów, lecz jest ona również wyjątkowo przyjazna pod względem technologicznym.

7. WNIOSKI

1. SonoNanoCoating to wszechstronna metoda odsadzania nano-powłok hydroksyapatytowych. Optymalizacja stałych i zmiennych parametrów metody SonoNanoCoating pozwoliła na uzyskanie nano-powłok hydroksyapatytowych na materiałach metalicznych, polimerach wysokotemperaturowych, polimerach termoplastycznych oraz polimerach biodegradowalnych i kompozytach. Metoda ta pozwala na inżynierię innowacyjnych nano-powłok hydroksyapatytowych na implantach ortopedycznych.
2. Skonstruowanie odpowiedniego zbiornika do prowadzenia procesu SonoNanoCoating umożliwiło precyzyjne utrzymanie temperatury procesu osadzania nano-powłok na poziomie $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Niska temperatura osadzania nano-powłok przełamuje ograniczenia konwencjonalnych metod nakładania powłok na powierzchnie materiałów biodegradowalnych, wrażliwych na temperaturę.
3. Połączenie technologii hydrotermalnej syntezy mikrofalowej oraz metody SonoNanoCoating stwarza nowe możliwości nano-inżynierii, wynikające z regulacji wielkości nanocząstek składających się na nano-powłoki hydroksyapatytowe GoHAPmed, dzięki czemu możliwe jest kontrolowanie właściwości powłok nanoszonych na implanty ortopedyczne.
4. Optymalizacja metody SonoNanoCoating pozwoliła na przełamanie problemu inżynierii powierzchni w postaci osadzania powłok na trudnodostępnych powierzchniach implantów, np. wewnątrz porów implantów drukowanych 3D, czy wewnątrz struktur komórkowych.
5. Nano-powłoki hydroksyapatytowe osadzone metodą SonoNanoCoating, składające się z nanocząstek GoHAPmed od 10 nm do 42 nm są biozgodne i mają pozytywny wpływ na adhezję i proliferację komórek macierzystych.

FINANSOWANIE

Poszczególne elementy niniejszej pracy finansowane były ze środków:

- POIR.04.01.02-00-0016/16 „Mocowanie sztucznych ścięgien i więzadeł do tkanki kostnej z wykorzystaniem nanotechnologii”, akronim: NANOLIGABOND, realizowanego w ramach Działania 4.1 Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014-2020 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego.
- STRATEGMED3/306888/3/NCBR/2017 „Metoda leczenia dużych ubytków tkanki kostnej u chorych onkologicznych z wykorzystaniem inżynierii tkankowej in vivo” akronim: iTE, współfinansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu STRATEGMED III.

Do badań wykorzystano infrastrukturę wytworzoną w ramach projektów:

- Centrum Badań Przedklinicznych i Technologii CePT I (POIG.02.02.00-14-024/08).
- Centrum Badań Przedklinicznych i Technologii CePT II (RPMA.01.01.00-14-8476/17-04).

LITERATURA:

1. Awad HA, Keefe RJO, Lee CH, Mao JJ, Bone tissue engineering: clinical challenges and emergent advances in orthopedic and craniofacial surgery. *Prin.Tis. Eng.* 2014; 1733-1743.
2. Koons GL, Diba M, Mikos AG. Materials design for bone-tissue engineering. *Nat Rev Mater.* 2020;5:584–603.
3. Woodruff MA, Lange C, Reichert J, Berner.A, et al. Bone tissue engineering: from bench to bedside. *Mater. Today.* 2012;15:430–435.
4. Martino MM, Briquez PS, Güç E, et al. Growth factors engineered for super-affinity to the extracellular matrix enhance tissue healing. *Science.* 2014;343:885–888.
5. Liu Y, Luo D., Wang T. Hierarchical structures of bone and bioinspired bone tissue engineering. *Small.* 2016;12:4611–4632.
6. Gentleman E, Swain RJ, Evans ND, et al. Comparative materials differences revealed in engineered bone as a function of cell-specific differentiation. *Nat. Mater.* 2009;8:763–770.
7. Bohner M, Miron RJ. A proposed mechanism for material-induced heterotopic ossification. *Mater. Today.* 2019;22:132–141.
8. Gautieri A, Vesentini S, Redaelli A, Buehler M. J. Hierarchical structure and nanomechanics of collagen microfibrils from the atomistic scale up. *Nano Lett.* 2011;11:757–766.
9. Liu Y, Luo D, Kou X. Hierarchical intrafibrillar nanocarbonated apatite assembly improves the nanomechanics and cytocompatibility of mineralized collagen. *Adv. Funct. Mater.* 2013;23:1404–1411.
10. Feng C, Zhang W, Deng C, et al. 3D printing of lotus root-like biomimetic materials for cell delivery and tissue regeneration. *Adv. Sci.* 2017;4:1700401.
11. Zhou T, Yan L, Xie C, et al. A mussel-inspired persistent ROSscavenging, electroactive, and osteoinductive scaffold based on electrochemical-driven in situ nanoassembly. *Small.* 2019;15:e1805440.
12. Ryu J, Ku SH, Lee H, Park CB. Mussel-inspired polydopamine coating as a universal route to hydroxyapatite crystallization. *Adv. Funct. Mater.* 2010;20:2132–2139.
13. Demirci G, Niedzwiedz M, Kantor-Malujdy N, El Fray M. Bio-Inspired Polymer-Polymer Hybrids for Medical Applications. *Preprints.* 2021:2021060026.

14. Hu X, Wang Y, Tan Y, et al. A difunctional regeneration scaffold for knee repair based on aptamer-directed cell recruitment. *Adv. Mater.* 2017;29:1605235.
15. Yu L, Dawson LA, Yan M, et al. BMP9 stimulates joint regeneration at digit amputation wounds in mice. *Nat. Commun.* 2019;10:424.
16. Hunter NL, Sherman RE. Combination products: modernizing the regulatory paradigm. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2017;16:513–514.
17. Burdick JA, Mauck RL, Gorman JH, Gorman RC. Acellular biomaterials: an evolving alternative to cell-based therapies. *Sci. Transl. Med.* 2013;5:176ps4.
18. Wang S, Yang Y, Zhao Z, et al. Mineralized collagen-based composite bone materials for cranial bone regeneration in developing sheep. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2017;3, 1092–1099.
19. Wang S, Zhao Z, Yang Y, et al. A high-strength mineralized collagen bone scaffold for large-sized cranial bone defect repair in sheep. *Regen. Biomater.* 2018;5:283–292.
20. Kim YS, Smoak MM, Melchiorri AJ, Mikos AG. An overview of the tissue engineering market in the United States from 2011 to 2018. *Tissue Eng. A.* 2019;25:1–8.
21. Kretlow JD, Young S, Klouda L, Wong M., Mikos AG, Injectable biomaterials for regenerating complex craniofacial tissues. *Adv. Mater.* 2009;21:3368–3393.
22. Reichert JC, Cipitria A, Epari DR, et al. A tissue engineering solution for segmental defect regeneration in load-bearing long bones. *Sci. Transl. Med.* 2019;4:141ra93.
23. Lausch AJ, Chong LC, Uludag H, Sone ED, Multiphasic collagen scaffolds for engineered tissue interfaces. *Adv. Funct. Mater.* 2018;28:1804730.
24. Du Y, Liu H, Yang Q, et al. Selective laser sintering scaffold with hierarchical architecture and gradient composition for osteochondral repair in rabbits. *Biomaterials.* 2017;137:37–48.
25. Canadas R, Tanchen R, Marques AP, et al. Biochemical gradients to generate 3D heterotypic-like tissues with isotropic and anisotropic architectures. *Adv. Funct. Mater.* 2018;28:1804148.
26. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2008;3(Suppl. 3):S131–S139.
27. Xue N, Ding X, Huang R, et al. Bone Tissue Engineering in the Treatment of Bone Defects. *Pharmaceuticals.* 2022,15,879.
28. Alves NM, Leonor IB, Azevedo HS, Reis RL, Mano JF. Designing biomaterials based on biomineralization of bone. *J. Mater. Chem.* 2010;20:2911–2921.

29. Keating JF, Simpson AH, Robinson CM. The management of fractures with bone loss. *J. Bone Jt. Surg. Br.* 2005;87:142–150.
30. Annamalai RT, Hong X, Schott NG, Tiruchinapally G; Levi B; Stegemann JP. Injectable osteogenic microtissues containing mesenchymal stromal cells conformally fill and repair critical-size defects. *Biomaterials.* 2019;208:32–44.
31. Campana V, Milano G, Pagano E, et al. Bone substitutes in orthopaedic surgery: From basic science to clinical practice. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2014;25:2445–2461.
32. Bone regeneration Market Outlook (2023 to 2033), Future Market Insights, dostęp przez stronę internetową: <https://www.futuremarketinsights.com/reports/bone-regeneration-market>, w dniu 05.10.2023.
33. Bharadwaz A, Jayasuriya AC. Recent trends in the application of widely used natural and synthetic polymer nanocomposites in bone tissue regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2020;110:110698.
34. Ebraheim NA, Elgafy H, Xu R. Bone-graft harvesting from iliac and fibular donor sites: techniques and complications. *J Am Acad Orthop Surg.* 2001;9:210–8.
35. Schlickewie W, Schlickewie C. The use of bone substitutes in the treatment of bone defects—the clinical view and history. *Macromol Symp.* 2007;253:10–23.
36. Pryor LS, Gage E, Langevin CJ, et al. Review of bone substitutes. *Craniofac Trauma Reconstr.* 2009;2(3):151–60.
37. Fernandez de Grado G, Keller L, Idoux-Gillet Y, et al. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *J Tissue Eng.* 2018;9:2041731418776819.
38. Peltier LF, Bickel EY. The use of plaster of Paris to fill defects in bone. *Ann Surg.* 1957;146(1):61–9.
39. Sanz M, Dahlin C, Apatzidou D, et al. Biomaterials and regenerative technologies used in bone regeneration in the craniomaxillofacial region: Consensus report of group 2 of the 15th European Workshop on Periodontology on Bone Regeneration. *J. Clin. Periodontol.* 2019;46(Suppl. S21),82–91.
40. Aldini NN, Fini M, Giavaresi G, et al. Improvement in zirconia osseointegration by means of a biological glass coating: An in vitro and in vivo investigation. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002;61,282–289.
41. Pietrzykowska E, Romelczyk-Baishya B, Wojnarowicz J, et al. Preparation of a Ceramic Matrix Composite Made of Hydroxyapatite Nanoparticles and Polylactic Acid by Consolidation of Composite Granules. *Nanomaterials.* 2020 May 30;10(6):1060.

42. Albee FH. STUDIES IN BONE GROWTH: TRIPLE CALCIUM PHOSPHATE AS A STIMULUS TO OSTEOGENESIS. *Ann Surg.* 1920;71(1):32-39.
43. Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater.* 2017;2(4):224-247.
44. Ielo I, Calabrese G, De Luca G, Conoci S. Recent Advances in Hydroxyapatite-Based Biocomposites for Bone Tissue Regeneration in Orthopedics. *Int J Mol Sci.* 2022;23(17):9721.
45. Ogoose A, Kondo N, Umezue H, et al. Histological assessment in grafts of highly purified beta-tricalcium phosphate (OSferion) in human bones. *Biomaterials.* 2006;27(8):1542-1549.
46. Crisan L, Crisan B, Soritau O, et al. In vitro study of biocompatibility of a graphene composite with gold nanoparticles and hydroxyapatite on human osteoblasts. *J Appl Toxicol.* 2015;35(10):1200-1210.
47. Goto T, Kojima T, Iijima T, Yokokura S, Kawano H, Yamamoto A, Matsuda K. Resorption of synthetic porous hydroxyapatite and replacement by newly formed bone. *J Orthop Sci.* 2001;6(5):444-7.
48. Sinha A, Nayar S, Agrawal A, Bhattacharyya D, Ramachandrarao P. Synthesis of nanosized and microporous precipitated hydroxyapatite in synthetic polymers and biopolymers. *J. Am. Ceram. Soc.* 2003;86:357–359.
49. Mohseni E, Zalnezhad E, Bushroa AR. Comparative investigation on the adhesion of hydroxyapatite coating on Ti–6Al–4V implant: A review paper. *Int. J. Adhes. Adhes.* 2014;48:238–257.
50. Depprich R, Zipprich H, Ommerborn M. Osseointegration of zirconia implants compared with titanium: An in vivo study. *Head Face Med.* 2008;4:30.
51. Smoleń D, Kędzierska A, Pietrzykowska E. Sposób otrzymywania nanopłytek z syntetycznego hydroksyapatytu. Opis patentowy PL 235291 (B1), 07.11.2011.
52. Kuśnieruk S, Wojnarowicz J, Chodara A, Chudoba T, Gierlotka S, Lojkowski W. Influence of hydrothermal synthesis parameters on the properties of hydroxyapatite nanoparticles. *Beilstein J Nanotechnol.* 2016;7:1586-601.
53. Sadat-Shojai M, Khorasani MT, Dinpanah-Khoshdargi E, Jamshidi A. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomater.* 2013 Aug;9(8):7591-621.
54. Lewandrowski K. *Tissue Engineering and Biodegradable Equivalents: Scientific and Clinical Applications.* Boca Raton, Fl: CRC Press LLC. 2002:403–404.

55. Ramesh SC, Dental applications of nanotechnology. Switzerland: Springer Nature, 2018.
56. Zhou H, Lee J. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 2011;7(7):2769-2781.
57. Ojeda E, García-Barrientos Á, Martínez de Cestafe N, Alonso JM, Pérez-González R, Sáez-Martínez V. Nanometric Hydroxyapatite Particles as Active Ingredient for Bioinks: A Review. *Macromol.* 2022;2:20–29.
58. Seol YJ, Park JY, Jung JW, et al. Improvement of bone regeneration capability of ceramic scaffolds by accelerated release of their calcium ions. *Tissue Eng Part A.* 2014;20(21-22):2840-2849.
59. Sun J, Wang F, Sui Y, et al. Effect of particle size on solubility, dissolution rate, and oral bioavailability: evaluation using coenzyme Q₁₀ as naked nanocrystals. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:5733-5744.
60. Saentho A, Wisawapipat W, Lawongsa P, et al. Speciation and pH- and particle size-dependent solubility of phosphorus in tropical sandy soils. *Geoderma.* 2022;408:115590.
61. Jinno J, Kamada N, Miyake M, et al. Effect of particle size reduction on dissolution and oral absorption of a poorly water-soluble drug, cilostazol, in beagle dogs. *J Control Release.* 2006;111(1-2):56-64.
62. Babu VR, Areefulla S, Mallikarjun V. Solubility and dissolution enhancement: An overview. *J. Pharm. Res.* 2010;3,141–145.
63. Dinh H, Tran P, Duan W, Lee B.-J, Tran T. Nano-sized solid dispersions based on hydrophobic-hydrophilic conjugates for dissolution enhancement of poorly water-soluble drugs. *Int. J. Pharm.* 2017;533:93–98.
64. Fan C, Chen J, Chen Y, Ji J, Teng HH. Relationship between solubility and solubility product: The roles of crystal sizes and crystallographic directions. *Geochem Cosmochim Acta.* 2006;70:3820-9.
65. Szałaj U, Chodara A, Gierlotka S, Wojnarowicz J, Łojkowski W. Enhanced Release of Calcium Ions from Hydroxyapatite Nanoparticles with an Increase in Their Specific Surface Area. *Materials.* 2023; 16(19):6397.
66. Lee J-W, Yun H-S, Nakano T. Induction of biological apatite orientation as a bone quality parameter in bone regeneration using hydroxyapatite/poly caprolactone composite scaffolds. *Tissue Engineering. Part C, Methods.* 2016;22(9):856-863.

67. Tang R, Wang L, Nancollas GH. Size-effects in the dissolution of hydroxyapatite: An understanding of biological demineralization. *J. Mater. Chem.* 2004;14:2341–2346.
68. Jassim Z, Rajab N. Review on preparation, characterization, and pharmaceutical application of nanosuspension as an approach of solubility and dissolution enhancement. *J. Pharm. Res.* 2018;12:771–774.
69. Rogowska-Tylman J, Locs J, Salma I, et al. In Vivo and in Vitro Study of a Novel Nanohydroxyapatite Sonocoated Scaffolds for Enhanced Bone Regeneration. *Mater. Sci. Eng. C.* 2019;99:669–684.
70. Cavalcante MD, de Menezes LR, Rodrigues E, Tavares M, In vitro characterization of a biocompatible composite based on poly (3-hydroxybutyrate)/hydroxyapatite nanoparticles as a potential scaffold for tissue engineering. *J. Mech. Behav. Biomed.* 2022;128:105138.
71. Kavasi RM, Coelho CC, Platania V, Quadros PA, Chatzinikolaïdou M. In Vitro Biocompatibility Assessment of Nano-Hydroxyapatite. *Nanomaterials (Basel).* 2021;11(5):1152.
72. Cintra CCV, Ferreira-Ermita DAC, Loures FH, et al. In vitro characterization of hydroxyapatite and cobalt ferrite nanoparticles compounds and their biocompatibility in vivo. *J Mater Sci Mater Med.* 2022;33(2):21.
73. Biazar E, Daliri JM, Heidari SK, et al. Characterization and biocompatibility of hydroxyapatite nanoparticles extracted from fish bone. *J. Bioeng. Res.* 2020;2:10–19.
74. Turon P, Del Valle LJ, Alemán C, Puiggalí J. Biodegradable and Biocompatible Systems Based on Hydroxyapatite Nanoparticles. *Appl. Sci.* 2017;7,60.
75. Torres ECL, De Sousa EMB, Cipreste MF. A Brief Review on Hydroxyapatite Nanoparticles Interactions with Biological Constituents. *J. Biomater. Nanobiotechnol.* 2022;13:24–44.
76. Borkowski L, Jojczuk M, Belcarz A, et al. Comparing the Healing Abilities of Fluorapatite and Hydroxyapatite Ceramics in Regenerating Bone Tissue: An In Vivo Study. *Materials* 2023;16:5992.
77. Nalesso PRL, Vedovatto M, Gregório JES, et al. Early In Vivo Osteogenic and Inflammatory Response of 3D Printed Polycaprolactone/Carbon Nanotube/Hydroxyapatite/Tricalcium Phosphate Composite Scaffolds. *Polymers (Basel).* 2023;15(13):2952.
78. George SM, Nayak C, Singh I, Balani K. Multifunctional Hydroxyapatite Composites for Orthopedic Applications: A Review. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2022;8:3162–3186.

79. Oliveira HL, Da Rosa WLO, Cuevas-Suárez CE, et al. Histological Evaluation of Bone Repair with Hydroxyapatite: A Systematic Review. *Calcif Tissue Int.* 2017;101(4):341-354.
80. Bal Z, Kaito T, Korkusuz F, Yoshikawa H. Bone regeneration with hydroxyapatite-based biomaterials. *Emergent Mater.* 2020;3:521–544.
81. Dizaj SM, Vazifehasl Zh, Salatin S, Adibkia Kh, Javadzadeh Y. Nanosizing of drugs: Effect on dissolution rate. *Res Pharm Sci.* 2015;10(2):95-108.
82. Hecq J, Deleers M, Fanara D, Vranckx H, Amighi K. Preparation and characterization of nanocrystals for solubility and dissolution rate enhancement of nifedipine. *Int J Pharm.* 2005;299(1-2):167-177.
83. Al Machot E, Hoffmann T, Lorenz K, Khalili I, Noack B. Clinical outcomes after treatment of periodontal intrabony defects with nanocrystalline hydroxyapatite (Ostim) or enamel matrix derivatives (Emdogain): a randomized controlled clinical trial. *Biomed Res Int.* 2014;2014:786353.
84. Pepla E, Besharat LK, Palaia G, Tenore G, Migliau G. Nano-hydroxyapatite and its applications in preventive, restorative and regenerative dentistry: a review of literature. *Ann Stomatol (Roma).* 2014;5(3):108-114.
85. Dini F, Palumbo A, Spaterna A. Use of Nanohydroxyapatite in Regenerative Therapy in Dogs Affected by Periodontopathy: Preliminary Results. *Ann. Clin. Lab. Res.* 2015;3(2).
86. Scheel J, Weimans S, Thiemann A, Heisler E, Hermann M. Exposure of the murine RAW 264.7 macrophage cell line to hydroxyapatite dispersions of various composition and morphology: assessment of cytotoxicity, activation and stress response. *Toxicol In Vitro.* 2009;23(3):531-538.
87. Jain A, Chaturvedi R, Pahuja B. Comparative Evaluation of the Efficacy of Calcium Sulfate Bone Grafts in Crystalline and Nano-Crystalline Forms in Fresh Extraction Socket Sites: A Radiographic and Histological Pilot Study. *Int. J. Oral Implant. Clin. Res.* 2012;3,58–61.
88. Zhou L, Du B, Liu W, Deng Y, Li S, Liu X, Gao Y. Angiogenesis and bone regeneration of porous nanohydroxyapatite/coralline blocks coated with rhVEGF165 in critical-size alveolar bone defects in vivo. *Int. J. Nanomed.* 2015;10:2555–2565.
89. Li R, Cai Y, Yang Y. et al. Dimensionally and morphologically controlled growth of calcium phosphate crystals by an organic-free hydrothermal process. *Ceramics International.* 2016;42(15):17387-17397.

90. Leena M, Rana D, Webster TJ, Ramalingam M. Accelerated synthesis of biomimetic nano hydroxyapatite using simulated body fluid, *Materials Chemistry and Physics*. 2016;180:166-172.
91. Hassan MN, Mahmoud MM. El-Fattah A, Kandil S. Microwave-assisted preparation of Nano-hydroxyapatite for bone substitutes, *Ceramics International*, Volume 42, Issue 3, 2016, Pages 3725-3744, ISSN 0272-8842.
92. Correa-Piña BA, Gomez-Vazquez OM, Londoño-Restrepo SM, Zubieta-Otero LF, Millan-Malo BM, Rodriguez-García ME, Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite added with magnesium obtained by wet chemical precipitation, *Progress in Natural Science: Materials International*. 2021;31:575-582.
93. Shaikh MS, Zafar MS, Alnazzawi A. Comparing Nanohydroxyapatite Graft and Other Bone Grafts in the Repair of Periodontal Infrabony Lesions: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(21):12021.
94. Shaheen MY. Nanocrystalline hydroxyapatite in periodontal bone regeneration: A systematic review. *Saudi Dent J*. 2022;34(8):647-660.
95. Kalpana M., Nagalakshmi R. Nano Hydroxyapatite for Biomedical Applications Derived from Chemical and Natural Sources by Simple Precipitation Method. *Appl Biochem Biotechnol*. 2023;195:3994–4010.
96. Pietrzykowska E, Romelczyk-Baishya B, Chodara A, Koltsov I, Smogór H, Mizeracki J, Pakieła Z, Łojkowski W. Microstructure and Mechanical Properties of Inverse Nanocomposite Made from Polylactide and Hydroxyapatite Nanoparticles. *Materials*. 2022; 15(1):184.
97. Mo X, Zhang D, Liu K, Zhao X, Li X, Wang W. Nano-Hydroxyapatite Composite Scaffolds Loaded with Bioactive Factors and Drugs for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(2):1291.
98. Zhang G, Lu Y, Song J, et al. A multifunctional nano-hydroxyapatite/MXene scaffold for the photothermal/dynamic treatment of bone tumours and simultaneous tissue regeneration. *J Colloid Interface Sci*. 2023;652(Pt B):1673-1684.
99. Solechan S, Suprihanto A, Widyanto SA, Triyono J, Fitriyana DF, Siregar JP, Cionita T. Characterization of PLA/PCL/Nano-Hydroxyapatite (nHA) Biocomposites Prepared via Cold Isostatic Pressing. *Polymers*. 2023; 15(3):559.
100. Hwan Kim MH, Yun Ch, Chalisserry EP, et al. Quantitative analysis of the role of nanohydroxyapatite (nHA) on 3D-printed PCL/nHA composite scaffolds, *Materials Letters*, 2018;220:112-115.

101. Saranya N, Saravanan S, Moorthi A, Ramyakrishna B, Selvamurugan N, Enhanced Osteoblast Adhesion on Polymeric Nano-Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2011;7(2):238–244.
102. Pietrzykowska E, Małysa M, Chodara A, Romełczyk-Baishya B, Szlązak K, Świąszkowski W, Pakieła Z, Lojkowski W. Biodegradable ceramic matrix composites made from nanocrystalline hydroxyapatite and silk fibers via crymilling and uniaxial pressing. *Materials Letters*. 2021;293,129672.
103. Ishaug-Riley SL, Okun LE, Prado G, Applegate MA, Ratcliffe A. Human articular chondrocyte adhesion and proliferation on synthetic biodegradable polymer films. *Biomaterials*. 1999;20(23-24):2245-2256.
104. Chang YL, Stanford CM, Keller JC. Calcium and phosphate supplementation promotes bone cell mineralization: implications for hydroxyapatite (HA)-enhanced bone formation. *J Biomed Mater Res*. 2000;52(2):270-278.
105. Higuchi J, Fortunato G, Woźniak B, Chodara A, Domaschke S, Męczyńska-Wielgosz S, Kruszewski M, Dommann A, Łojkowski W. Polymer Membranes Sonocoated and Electrospayed with Nano-Hydroxyapatite for Periodontal Tissues Regeneration. *Nanomaterials*. 2019;9(11):1625.
106. Smith IO, McCabe LR, Baumann MJ. MC3T3-E1 osteoblast attachment and proliferation on porous hydroxyapatite scaffolds fabricated with nanophase powder. *Int J Nanomedicine*. 2006;1(2):189-194.
107. Lim JY, Dreiss AD, Zhou Z, et al. The regulation of integrin-mediated osteoblast focal adhesion and focal adhesion kinase expression by nanoscale topography. *Biomaterials*. 2007;28(10):1787-1797.
108. Khang D, Kim SY, Liu-Snyder P, Palmore GT, Durbin SM, Webster TJ. Enhanced fibronectin adsorption on carbon nanotube/poly(carbonate) urethane: independent role of surface nano-roughness and associated surface energy. *Biomaterials*. 2007;28(32):4756-4768.
109. Zhu X, Eibl O, Berthold C, Scheideler L, Geis-Gerstorfer J. Structural characterization of nanocrystalline hydroxyapatite and adhesion of pre-osteoblast cells. *Nanotechnology* 2006;17:2711.
110. Jin W, Chu PK. Orthopedic Implants, Editor(s): Roger Narayan, *Encyclopedia of Biomedical Engineering*. Elsevier. 2019:425-439.

111. Radha R, Sreekanth D. Insight of magnesium alloys and composites for orthopedic implant applications – a review. *Journal of Magnesium and Alloys*. Volume 2017;5:286-312.
112. Hallab NJ, Jacobs JJ. 2.5.4 - Orthopedic Applications, *Biomaterials Science* (Fourth Edition). Academic Press. 2020:1079-1118.
113. Orthopedic Devices Market by Product (Fixation, Replacement Devices (knee, hip, shoulder), Braces, Spinal Implants, Arthroscopy, Orthobiologics), Application (Fracture Treatment, Osteoarthritis), End User (Hospital, ASCs) & Region – Global Forecast to 2023, dostępny przez witrynę internetową: https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/orthopedic-device-280.html?gclid=CjwKCAjwyY6pBhA9EiwAMzmfwTRhgB8pxLSTDeb7tXcxpNx6t3aXYIbuS3FiDtnTpYeLOmW3ymxolhoCum8QAvD_BwE, w dn. 09.10.2023.
114. Szczęsny G, Kopec M, Politis DJ, Kowalewski ZL, Łazarski A, Szolc T. A Review on Biomaterials for Orthopaedic Surgery and Traumatology: From Past to Present. *Materials*. 2022;15(10):3622.
115. Marin E, Boschetto F, Pezzotti G. Biomaterials and biocompatibility: An historical overview. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 2020;108:1617–1633.
116. Beaupré GS, Csongradi JJ. Refracture Risk After Plate Removal in the Forearm. *J. Orthop. Trauma*. 1996;10:87–92.
117. Lautenschlager EP, Sarker NK, Acharya A, Galante JO, Rostoker W. Anodic polarization of porous fiber metals. *J. Biomed. Mater. Res*. 1974;8:189–191.
118. Levanthal GC. Titanium: A metal for surgery. *J. Bone Jt. Surg*. 1951;33-A:473–474.
119. Wang H, Su K, Su L, Liang P, Ji P, Wang C. Comparison of 3D-printed porous tantalum and titanium scaffolds on osteointegration and osteogenesis. *Mater. Sci. Eng. C*. 2019;104:109908.
120. Neuman G, Spångberg L, Langeland S. Methodology and criteria in the evaluation of dental implants. *J. Endod*. 1975;1:193–202.
121. Semlitsch M. Concept and material properties of a cementless hip prosthesis system with Al₂O₃ ceramic ball heads and wrought Ti-6Al-4V Stems. *Arch. Orthop. Trauma. Surg*. 1982;100:229–236.
122. Li Q, Min X, Bai P, Wang W, Tao X., Zhong G., Bai S, Zhao J. Microstructure, mechanical properties and springback behaviour of Ti-6Al-4V alloy connection rod for spinal fixation device. *Mater. Sci. Eng. C*. 2018;94:811–820.

123. Kopova I, Stráský J, Harcuba P, Landa M, Janeček M, Bačáková L. Newly developed Ti–Nb–Zr–Ta–Si–Fe biomedical beta titanium alloys with increased strength and enhanced biocompatibility. *Mater. Sci. Eng. C*. 2016;60:230–238.
124. Abdelrhman Y, Gepreel MA-H, Kobayashi S, Okano S, Okamoto T. Biocompatibility of new low-cost ($\alpha + \beta$)-type Ti–Mo–Fe alloys for long-term implantation. *Mater. Sci. Eng. C*. 2019;99:552–562.
125. Nnamchi P, Obayi C, Todd I, Rainforth M. Mechanical and electrochemical characterisation of new Ti–Mo–Nb–Zr alloys for biomedical applications. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2016;60:68–77.
126. Ghosh S, Abanteriba S, Wong S, Houshyar S. Selective laser melted titanium alloys for hip implant applications: Surface modification with new method of polymer grafting. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2018;87:312–324.
127. Henk CB, Brodner W, Grampp S, Breitenseher M, Thurnher M, Mostbeck GH, Imhof H. The Postoperative Spine. *Top. Magn. Reson. Imaging*. 1999;10:247–264.
128. García-Gareta E, Hua J, Orera A, Kohli N, Knowles JC, Blunn G.W. Biomimetic surface functionalization of clinically relevant metals used as orthopaedic and dental implants. *Biomed. Mater.* 2017;13:015008.
129. Head WC, Bauk DJ, Emerson RH. Titanium as the material of choice for cementless femoral components in total hip arthroplasty. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1995;311:85–90.
130. Maccauro G, Cittadini A, Magnani G, et al. In vivo characterization of Zirconia Toughened Alumina material: a comparative animal study. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2010;23(3):841-846.
131. Contuzzi N, Casalino G, Boccaccio A, et al. Metals Biotribology and Oral Microbiota Biocorrosion Mechanisms. *J Funct Biomater.* 2022;14(1):14.
132. Denry I, Abdelaal M, Dawson DV, Holloway JA, Kelly JR. Effect of crystalline phase assemblage on reliability of 3Y-TZP. *J Prosthet Dent.* 2021;126(2):238-247.
133. Hernigou P, Bahrami T. Zirconia and alumina ceramics in comparison with stainless-steel heads. Polyethylene wear after a minimum ten-year follow-up. *J Bone Joint Surg Br.* 2003;85(4):504-509.
134. Gil J, Delgado-García-Menocal JA, Velasco-Ortega E, et al. Comparison of zirconia degradation in dental implants and femoral balls: an X-ray diffraction and nanoindentation study. *Int J Implant Dent.* 2021;7(1):103.

135. Prakasam M, Locs J, Salma-Ancane K, Loca D, Largeteau A, Berzina-Cimdina L. Fabrication, Properties and Applications of Dense Hydroxyapatite: A Review. *J Funct Biomater*. 2015;6(4):1099-1140.
136. Pajor K, Pajchel L, Kolmas J. Hydroxyapatite and Fluorapatite in Conservative Dentistry and Oral Implantology-A Review. *Materials (Basel)*. 2019;12(17):2683.
137. Aslankoohi N, Mondal D, Rizkalla AS, Mequanint K. Bone Repair and Regenerative Biomaterials: Towards Recapitulating the Microenvironment. *Polymers (Basel)*. 2019;11(9):1437.
138. Hassanajili S, Karami-Pour A, Oryan A, Talaei-Khozani T. Preparation and characterization of PLA/PCL/HA composite scaffolds using indirect 3D printing for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019;104:109960.
139. Lew KS, Othman R, Ishikawa K, Yeoh FY. Macroporous bioceramics: a remarkable material for bone regeneration. *J Biomater Appl*. 2012;27(3):345-358.
140. Gittens RA, Olivares-Navarrete R, Schwartz Z, Boyan BD. Implant osseointegration and the role of microroughness and nanostructures: lessons for spine implants. *Acta Biomater*. 2014;10(8):3363-3371.
141. Yoshikawa H, Tamai N, Murase T, Myoui A. Interconnected porous hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering. *J R Soc Interface*. 2009;6 Suppl 3(Suppl 3):S341-S348.
142. Benzing J, Hrabe N, Quinn T, White R, Rentz R, Ahlfors M. Hot isostatic pressing (HIP) to achieve isotropic microstructure and retain as-built strength in an additive manufacturing titanium alloy (Ti-6Al-4V). *Mater Lett*. 2019;257, 126690.
143. Du X, Lee SS, Blugan G, Ferguson SJ. Silicon Nitride as a Biomedical Material: An Overview. *Int J Mol Sci*. 2022;23(12):6551.
144. Skaria S, Berk KJ. Experimental Dental Composites Containing a Novel Methacrylate-Functionalized Calcium Phosphate Component: Evaluation of Bioactivity and Physical Properties. *Polymers (Basel)*. 2021;13(13):2095.
145. Eliaz N, Metoki N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. *Materials*. 2017; 10(4):334.
146. Lodoso-Torrecilla I, van den Beucken JJJP, Jansen JA. Calcium phosphate cements: Optimization toward biodegradability. *Acta Biomater*. 2021;119:1-12.
147. Fiume E, Magnaterra G, Rahdar A, Verné E, Baino F. Hydroxyapatite for Biomedical Applications: A Short Overview. *Ceramics* 2021;4,542–563.

148. Buechel F.F., Pappas M.J. Properties of Materials Used in Orthopaedic Implant Systems. Principles of Human Joint Replacement. Springer; Cham, Switzerland: 2015.
149. Ruso JM, Messina PV. Biopolymers for Medical Applications. CRC Press; Boca Raton, FL, USA: 2021.
150. Li S, Burstein AH. Ultra-high molecular weight polyethylene. The material and its use in total joint implants. J. Bone Jt. Surg. 1994;76:1080–1090.
151. Kurtz S.M., The UHMWPE Handbook: Ultra-High Molecular Weight Polyethylene in Total Joint Replacement. Elsevier; San Diego, CA, USA: 2004.
152. Veruva SY, Lanman TH, Isaza JE, MacDonald DW, Kurtz SM, Steinbeck MJ. UHMWPE wear debris and tissue reactions are reduced for contemporary designs of lumbar total disc replacements. Clin Orthop Relat Res. 2015;473(3):987-998.
153. Liao K, Performance characterization and modeling of a composite hip prosthesis, Exp Tech, 1994:33-38.
154. Maharaj GR, Jamison RD. Intraoperative impact: characterization and laboratory simulation on composite hip prostheses, R.D. Jamison, L.N. Gilbertson (Eds.), STP 1178: composite materials for implant applications in the human body: characterization and testing, ASTM, Philadelphia, 1993:98-108.
155. Kelsey DJ, Springer GS, Goodman S.B. Composite implant for bone replacement, J Compos Mater. 1997;31:1593-1632.
156. Corvelli AA, Biermann PJ, Roberts JC. Design, analysis, and fabrication of a composite segmental bone replacement implant, J Adv Mater, 1997:2-8.
157. Toth JM, Wang M, Estes BT, Scifert JL, Seim HB 3rd, Turner AS. Polyetheretherketone as a biomaterial for spinal applications. Biomaterials. 2006;27(3):324-334.
158. Brantigan JW, Neidre A, Toohey JS. The Lumbar I/F Cage for posterior lumbar interbody fusion with the variable screw placement system: 10-year results of a Food and Drug Administration clinical trial. Spine J. 2004;4(6):681-688.
159. Akhavan S, Matthiesen MM, Schulte L, et al. Clinical and histologic results related to a low-modulus composite total hip replacement stem. J Bone Joint Surg Am. 2006;88(6):1308-1314.
160. Glassman AH, Crowninshield RD, Schenck R, Herberts P. A low stiffness composite biologically fixed prosthesis. Clin Orthop Relat Res. 2001;(393):128-136.

161. Kärrholm J, Anderberg C, Snorrason F, et al. Evaluation of a femoral stem with reduced stiffness. A randomized study with use of radiostereometry and bone densitometry. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84(9):1651-1658.
162. Joyce TJ, Rieker C, Unsworth A. Comparative in vitro wear testing of PEEK and UHMWPE capped metacarpophalangeal prostheses. *Biomed Mater Eng.* 2006;16(1):1-10.
163. Manley M, Ong K, Kurtz SM, Rushton N, Field RE, Biomechanics of a PEEK horseshoe-shaped cup: comparisons with a predicate deformable cup, *Transactions of the 53rd Orthopedic Research Society*, 2007;32:1717.
164. Yu S, Hariram KP, Kumar R, Cheang P, Aik KK. In vitro apatite formation and its growth kinetics on hydroxyapatite/polyetheretherketone biocomposites. *Biomaterials.* 2005;26(15):2343-2352.
165. Fan JP, Tsui CP, Tang CY, Chow CL. Influence of interphase layer on the overall elasto-plastic behaviors of HA/PEEK biocomposite. *Biomaterials.* 2004;25(23):5363-5373.
166. Abu Bakar MS, Cheng MH, Tang SM, et al. Tensile properties, tension-tension fatigue and biological response of polyetheretherketone-hydroxyapatite composites for load-bearing orthopedic implants. *Biomaterials.* 2003;24(13):2245-2250.
167. Ha SW, Kirch M, Birchler F, et al. Surface activation of polyetheretherketone (PEEK) and formation of calcium phosphate coatings by precipitation. *J Mater Sci Mater Med.* 1997;8(11):683-690.
168. Blundell DJ, Osborn BN. The morphology of poly(aryl-ether-ketone). *Polymer.* 1983;24:953.
169. Kurtz SM, Devine JN. PEEK biomaterials in trauma, orthopedic, and spinal implants. *Biomaterials.* 2007;28(32):4845-4869.
170. Brillhart M, Gregory BL, Botsis J. Fatigue fracture behaviour of PEEK: 1. Effects of load level, *Polymer*, 1991;32:1605-1611.
171. Avanzini A, Petrogalli C, Battini D, Donzella G. Influence of micro-notches on the fatigue strength and crack propagation of unfilled and short carbon fiber reinforced PEEK. *Materials & Design.* 2018;139:447-456.
172. Pamula E, Filová E, Bačáková L, Lisá V, Adamczyk D. Resorbable polymeric scaffolds for bone tissue engineering: the influence of their microstructure on the growth of human osteoblast-like MG 63 cells. *J. Biomed. Mater. Res. Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and*

- The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 2009;89:432-443.
173. Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices *Biomaterials* 2000;21:2335–2346.
 174. Nair LS, Laurencin TC. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polym Sci.* 2007;32:762-798.
 175. Gunatillake PA, Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater.* 2003;5:1-16.
 176. Mondal D, Griffith M, Venkatraman SS, Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: current scenario and challenges. *Int J Polym Mater Polym Biomater.* 2016;65:255-265.
 177. Bezwada RS, Jamiolkowski DD, Lee IY, et al. Monocryl suture, a new ultra-pliable absorbable monofilament suture. *Biomaterials.* 1995;16(15):1141-1148.
 178. Shive MS, Anderson JM. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997;28(1):5-24.
 179. Engelberg I, Kohn J. Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: a comparative study. *Biomaterials.* 1991;12(3):292-304.
 180. Cho YS, Choi S, Lee SH, Kim KK, Cho YS. Assessments of polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffold with Enhanced biomimetic mineralization by exposure to hydroxyapatite via a 3D-printing system and alkaline erosion. *Eur Polym J.* 2019;113:340-348.
 181. Dwivedi R, Kumar S, Pandey R, et al. Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: Review of literature. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2020;10(1):381-388.
 182. Bittner SM, Smith BT, Diaz-Gomez L, et al. Fabrication and mechanical characterization of 3D printed vertical uniform and gradient scaffolds for bone and osteochondral tissue engineering. *Acta Biomater.* 2019;90:37-48.
 183. Bisht B, Hope A, Mukherjee A, Paul MK. Advances in the Fabrication of Scaffold and 3D Printing of Biomimetic Bone Graft. *Ann Biomed Eng.* 2021;49(4):1128-1150.
 184. Basu B. Three Dimensional Porous Scaffolds: Mechanical and Biocompatibility Properties. In *Biomaterials for Musculoskeletal Regeneration*; Springer: Singapore, 2017:353–384.

185. Casalini T, Rossi F, Castrovinci A, Perale G. A Perspective on Polylactic Acid-Based Polymers Use for Nanoparticles Synthesis and Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019;7:259.
186. Lopresti F, Carfi Pavia F, Vitrano I, Kersaudy-Kerhoas M, Brucato V, La Carrubba V. Effect of hydroxyapatite concentration and size on morpho-mechanical properties of PLA-based randomly oriented and aligned electrospun nanofibrous mats. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2020;101:103449.
187. Donate R, Monzón M, Alemán-Domínguez ME. Additive manufacturing of PLA-based scaffolds intended for bone regeneration and strategies to improve their biological properties. *e-Polymers.* 2020;20:571–599.
188. Pandey AK, Sakurai S. Recent Developments in the Crystallization of PLLA-Based Blends, Block Copolymers, and Nanocomposites. In *Crystallization*; IntechOpen: Rijeka, Croatia, 2021.
189. Sangroniz A, Chaos A, Iriarte M, Del Río J, Sarasua JR, Etxeberria. A. Influence of the Rigid Amorphous Fraction and Crystallinity on Polylactide Transport Properties. *Macromolecules.* 2018;51:3923–3931.
190. Tashiro K, Kouno N, Wang H, Tsuji H. Crystal Structure of Poly(lactic acid) Stereocomplex: Random Packing Model of PDLA and PLLA Chains As Studied by X-ray Diffraction Analysis. *Macromolecules.* 2017;50:8048–8065.
191. Neumann IA, Flores-Sahagun THS, Ribeiro AM, Biodegradable poly (l-lactic acid) (PLLA) and PLLA-3-arm blend membranes: The use of PLLA-3-arm as a plasticizer. *Polym. Test.* 2017, 60, 84–93.
192. Mariano, M.; Pilate, F.; De Oliveira, F.B.; Khelifa, F.; Dubois, P.; Raquez, J.M.; Dufresne, A. Preparation of Cellulose Nanocrystal-Reinforced Poly(lactic acid) Nanocomposites through Noncovalent Modification with PLLA-Based Surfactants. *ACS Omega.* 2017;2:2678–2688.
193. Ware HOT, Akar B, Sun C, Ameer G. PLLA-infused citric acid-based bioresorbable vascular scaffolds 3D printed via microCLIP (Conference Presentation). In *Proceedings of the Emerging Digital Micromirror Device Based Systems and Applications XI*, San Francisco, CA, USA, 2–7 February 2019; p. 109320B.
194. Ju J, Peng X, Huang, K.; Li, L.; Liu, X.; Chitrakar, C.; Chang, L.; Gu, Z.; Kuang, T. High-performance porous PLLA-based scaffolds for bone tissue engineering: Preparation, characterization, and in vitro and in vivo evaluation. *Polymer* 2019;180: 121707.

195. Lou T, Wang X, Yan X, et al. Fabrication and biocompatibility of poly(l-lactic acid) and chitosan composite scaffolds with hierarchical microstructures. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016;64:341-345.
196. Gregor A, Filová E, Novák M, et al. Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer. *J Biol Eng.* 2017;11:31.
197. Eberli D. *Tissue Engineering for Tissue and Organ Regeneration.* InTech: , Croatia, 2011.
198. Lin S, Dong P, Zhou C, et al. Degradation modeling of poly-l-lactide acid (PLLA) bioresorbable vascular scaffold within a coronary artery. *Nanotechnol Rev.* 2020;9(1):1217-1226.
199. Ang HY, Huang YY, Lim ST, Wong P, Joner M, Foin N. Mechanical behavior of polymer-based vs. metallic-based bioresorbable stents. *J Thorac Dis.* 2017;9(Suppl 9):S923-S934.
200. Qiu T, Zhao L. Research into biodegradable polymeric stents: A review of experimental and modelling work. *Vessel Plus.* 2018;2:12.
201. Woodard LN, Grunlan MA. Hydrolytic Degradation and Erosion of Polyester Biomaterials. *ACS Macro Lett.* 2018;7:976–982.
202. Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindström J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand.* 1981;52(2):155-70.
203. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci.* 1998;106(1):527-51.
204. Awasthi S, Pandey SK, Arunan E, Srivastava C. A Review on Hydroxyapatite Coatings for Biomedical Application: Experimental and Theoretical Perspectives, *Journal of Materials Chemistry B.*, 2021;9:228-249.
205. Ramakrishna S, Mayer J, Wintermantel E, Leong KW, *Compos. Sci. Technol.* 2001;61:1189–1224.
206. Sridhar TM, Kamachi Mudali U, Subbaiyan M, *Corros. Sci.* 2003;45:237–252.
207. O'Neill E, Awale G, Daneshmandi L, Umerah O, Lo KW. The roles of ions on bone regeneration. *Drug Discov Today.* 2018;23(4):879-890.
208. Kowalski S, Gonciarz W, Belka R, et al. Plasma-Sprayed Hydroxyapatite Coatings and Their Biological Properties. *Coatings.* 2022; 12(9):1317.

209. Awasthi S, Pandey SK, Arunan E, Srivastava C. A review on hydroxyapatite coatings for the biomedical applications: Experimental and theoretical perspectives. *J. Mater. Chem. B*. 2020;9:228–249.
210. Nazirah R, Zuhailawati H, Siti Nur Hazwani MR, Abdullah TK, Azzura I, Dhindaw BK. The Influence of Hydroxyapatite and Alumina Particles on the Mechanical Properties and Corrosion Behavior of Mg-Zn Hybrid Composites for Implants. *Materials*. 2021; 14(21):6246.
211. Park E, Condrate RA, Hoelzer DT, Fischman GS. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1998;9(11):643–649.
212. Sarkar P, Nicholson PS. Electrophoretic Deposition (EPD): Mechanisms, Kinetics, and Application to Ceramics. *Journal of the American Ceramic Society*. 1996;79:1987-2002.
213. Fischer R, Fischer E, De Portu G, Roncari E. Preparation of ceramic micro-laminate by electrophoresis in aqueous system. *J Mater Sci Lett*. 1995;14:25–27.
214. Szaraniec B, Zych Ł. Otrzymywanie bioaktywnych powłok na podłożu tytanu metodą osadzania elektroforetycznego (EPD). *Inżynieria materiałowa*; 2012.
215. Ducheyne P, Radin S, Heughebaert M, Heughebaert JC. Calcium phosphate ceramic coatings on porous titanium: effect of structure and composition on electrophoretic deposition, vacuum sintering and in vitro dissolution [published correction appears in *Biomaterials* 1990 Oct;11(8):540]. *Biomaterials*. 1990;11(4):244-254.
216. Umegaki T, Hisano Y, Yamashita K, Kanazawa T. Preparation of apatite film by electrophoresis. *Gypsum Lime*. 1989;218:24-28.
217. I Zhitomirsky I, Gal-Or L. Electrophoretic deposition of hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med*. 1997;8(4):213-219.
218. Wei M, Ruys A, Milthorpe B, et al. Electrophoretic Deposition of Hydroxyapatite Coatings on Metal Substrates: A Nanoparticulate Dual-Coating Approach. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. 2001;21:39–48.
219. Wang ZC, Chen F, Huang LM, Lin CJ. Electrophoretic deposition and characterization of nano-sized hydroxyapatite particles. *J. Mater. Sci*. 2005;40-18:4955.
220. Baptista R, Gadelha D, Bandeira M, et al. Characterization of Titanium-Hydroxyapatite Biocomposites Processed by Dip Coating. *Bull. Mater. Sci*. 2016;39(1):263–272.

221. Kokubo T, Pattanayak DK, Yamaguchi S, et al. Positively charged bioactive Ti metal prepared by simple chemical and heat treatments. *J R Soc Interface*. 2010;7 Suppl 5(Suppl 5):S503-S513.
222. Suchanek K, Bartkowiak A, Gdowik A, et al. Crystalline hydroxyapatite coatings synthesized under hydrothermal conditions on modified titanium substrates. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015;51:57-63.
223. Grigoriev S, Sotova C, Vereschaka A, Uglov V, Cherenda N. Modifying Coatings for Medical Implants Made of Titanium Alloys. *Metals*. 2023;13(4):718.
224. Asri RI, Harun WS, Hassan MA, Ghani SA, Buyong Z. A review of hydroxyapatite-based coating techniques: Sol-gel and electrochemical depositions on biocompatible metals. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2016;57:95-108.
225. Weng W, Zhuang J, Lin S, Dong L, Cheng K. Recent development of electrochemical deposition of biologically functionalized coatings. *Kuei Suan Jen Hsueh Pao/J. Chin. Ceram. Soc*. 2017;45:1539–1547.
226. Chouirfa H, Bouloussa H, Migonney V, Falentin-Daudré C. Review of titanium surface modification techniques and coatings for antibacterial applications. *Acta Biomater*. 2019;83:37-54.
227. Andrina K, Finšgar KM. A review of techniques for the application of bioactive coatings on metal-based implants to achieve controlled release of active ingredients. *Mater. Design*. 2022;27:110653.
228. Lončarević D, Čupić Ž. The perspective of using nanocatalysts in the environmental requirements and energy needs of industry. In *Industrial Applications of Nanomaterials*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier BV; 2019:91–122.
229. Svagrova K. Optimization of Composition and Formation of Titania Sol-Gel Coatings on Titanium Substrate Using Dip-Coating Technique. *Ceram. Silik*. 2019;63:255–260.
230. Neacșu IA, Nicoară A, Vasile OR, Vasile BȘ. Inorganic micro- and nanostructured implants for tissue engineering. In *Nanobiomaterials in Hard Tissue Engineering*. Norwich, NY, USA: William Andrew; 2016:271–295.
231. Nguyen N-T. Fabrication Technologies. In *Micromixers: Fundamentals, Design and Fabrication (Micro and Nano Technologies)*. Norwich, NY, USA: William Andrew; 2012.

232. Faustini M, Louis B, Albouy PA, Kuemmel M, Grosso D. Preparation of Sol-Gel Films by Dip-Coating in Extreme Conditions. *J. Phys. Chem. C*. 2010;114:7637–7645.
233. Liu D, Savino K, Yates MZ. Coating of hydroxyapatite films on metal substrates by seeded hydrothermal deposition. *Surf. Coat. Technol.* 2011;205:3975–3986.
234. Xue W, Tao S, Liu X, Zheng X, Ding C. In vivo evaluation of plasma sprayed hydroxyapatite coatings having different crystallinity. *Biomaterials*. 2004;25(3):415-421.
235. Harun W, Asri R, Alias J, et al. A comprehensive review of hydroxyapatite-based coatings adhesion on metallic biomaterials. *Ceram. Int.* 2018;44:1250–1268.
236. Gedanken A. Using sonochemistry for the fabrication of nanomaterials. *Ultrason Sonochem.* 2004;11(2):47-55.
237. Pol VG, Reisfeld R, Gedanken A. Sonochemical Synthesis and Optical Properties of Europium Oxide Nanolayer Coated on Titania. *Chem. Mater.* 2002;14:3920–3924.
238. Ramesh S, Koltypin Y, Prozorov R, Gedanken A. Sonochemical Deposition and Characterization of Nanophasic Amorphous Nickel on Silica Microspheres. *Chemistry of Materials*. 1997;9(2):546–551.
239. Świążkowski W, Chudoba T, Kuśnieruk S, i in. Sposób wytwarzania implantu kostnego i implant kostny. Opis patentowy,. PL 226891 (B1), 05.05.2015.
240. Leighton T. The acoustic bubble. Academic Press. 2012.
241. G Cravotto G, Cintas P. Introduction to sonochemistry: A historical and conceptual overview. *Handbook on application of ultrasound: Sonochemistry and sustainability*. Taylor & Francis Group; 2012:2340.
242. Flynn H. Physics of acoustic cavitation in liquids. *Phys. Acoust.* 1964;1:57-172.
243. Shchukin DG, Skorb E, Belova V, Möhwald H. Ultrasonic cavitation at solid surfaces. *Adv Mater.* 2011;23(17):1922-1934.
244. Suslick KS, Price GJ. Applications of ultrasound to materials chemistry. *J. Ann. Rev. Mater.* 1999;29: 295-326.
245. Flint EB, Suslick KS. The temperature of cavitation. *Science*. 1991;253(5026):1397-1399.
246. Thangavadivel K, Megharaj M, Mudhoo A, Naidu R. Degradation of organic pollutants using ultrasound. *Handbook on application of ultrasound: Sonochemistry and sustainability*. Taylor & Francis Group; 2012:447-474.

247. Benjamin TB, Ellis AT. The collapse of cavitation bubbles and the pressures thereby produced against solid boundaries. *Philocs. Trans. R.Soc.* 1966;A260:221-240.
248. Ishida H, Nuntadusit C, Kimoto H & Nakagawa T, Yamamoto T. *Cavitation Bubble Behavior Near Solid Boundaries*. 2001.
249. A Cobley A, Mason TJ, Paniwnyk L, Saez V. Aspects of ultrasound and materials science. *Handbook on application of ultrasound: Sonochemistry and sustainability*. Taylor & Francis Group; 2012:41-74.
250. Maisonhaute E, Prado C, White PC, Compton RG. Surface acoustic cavitation understood via nanosecond electrochemistry. Part III: Shear stress in ultrasonic cleaning. *Ultrason Sonochem.* 2002;9(6):297-303.
251. Brennen CE. *Cavitation and bubble dynamics*. Oxford University Press. New York. 1995.
252. Moholkar VS, Sivasnagar T, Nalajala VS. Mechanistic aspects of ultrasound-enhanced physical and chemical processes. *Handbook on application of ultrasound: Sonochemistry and sustainability*. Taylor & Francis Group; 2012:501-534.
253. Majcher A, Wiejak J, Przybylski J, Chudoba T, Wojnarowicz J. A Novel Reactor for Microwave Hydrothermal Scale-up Nanopowder Synthesis. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*. 2013;11(1):1–8.
254. Higuchi J, Klimek K, Wojnarowicz J, et al. Electrospun Membrane Surface Modification by Sonocoating with HA and ZnO:Ag Nanoparticles—Characterization and Evaluation of Osteoblasts and Bacterial Cell Behavior In Vitro. *Cells*. 2022; 11(9):1582.
255. Woźniak B, Szałaj U, Chodara A, et al. Mechanism for sonocoating a polymer surface with nano-hydroxyapatite. *Materials Letters*. 2019;249:155-159.
256. Łojkowski M. Raport wewnętrzny IWC PAN, pt. Wykonanie pomiarów adhezji nanocząstek hydroksyapatytu przy pomocy scratch test wykonywanego wykorzystując mikroskopie sił atomowych AFM, 2023.
257. Legeros RZ. *Hydroxyapatite and related materials*. CRC Press. Brown PW. Boca Raton, 1994:3-28.
258. Vorholz J, Harismiadis V, Rumpf B, Panagiotopoulos A, Maurer G. Vapor+liquid equilibrium of water, carbon dioxide, and the binary system, water+carbon dioxide, from molecular simulation. *Fluid Phase Equilibria*. 2000;170(2):203-234.

259. Pielaszek R. FW15/45M method for determination of the grain size distribution from powder diffraction line profile. *J Alloy Compd.* 2004;37:128–132.
260. Stammnitz S, Krawczenko A, Szałaj U, et al. Osteogenic Potential of Sheep Mesenchymal Stem Cells Preconditioned with BMP-2 and FGF-2 and Seeded on an nHAP-Coated PCL/HAP/ β -TCP Scaffold. *Cells.* 2022;11(21):3446.
261. Górecka Ż, Teichmann J, Nitschke M, et al. Biodegradable fiducial markers for X-ray imaging—Soft tissue integration and biocompatibility. *J. Mater. Chem. B.* 2016;4:5700–5712.
262. Górecka Ż, Idaszek J, Kołbuk D, Choińska E, Chlanda A, Świąszkowski W. The effect of diameter of fibre on formation of hydrogen bonds and mechanical properties of 3D-printed PCL. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2020;114:111072.
263. Walejewska E, Idaszek J, Heljak M, et al. The effect of introduction of filament shift on degradation behaviour of PLGA- and PLCL-based scaffolds fabricated via additive manufacturing. *Polym. Degrad. Stab.* 2020;171:109030.
264. Szałaj U, Świdarska-Środa A, Chodara A, Gierlotka S, Łojkowski W. Nanoparticle Size Effect on Water Vapour Adsorption by Hydroxyapatite. *Nanomaterials.* 2019; 9(7):1005.
265. Quadros ME, Marr LC. Environmental and human health risks of aerosolized silver nanoparticles. *J Air Waste Manag Assoc.* 2010;60(7):770-781.
266. Ojeda E, García-Barrientos Á, Martínez de Cestafe N, Alonso JM, Pérez-González R, Sáez-Martínez V. Nanometric Hydroxyapatite Particles as Active Ingredient for Bioinks: A Review. *Macromol.* 2022; 2(1):20-29.
267. Jinno J, Kamada N, Miyake M, et al. Effect of particle size reduction on dissolution and oral absorption of a poorly water-soluble drug, cilostazol, in beagle dogs. *J Control Release.* 2006;111(1/2):56–64.
268. Babu VR, Areefulla S, Mallikarjun V. Solubility and dissolution enhancement: an overview. *J Pharm Res.* 2010;3(1):141–145.
269. Dinh HTT, Tran PHL, Duan W, Lee BJ, Tran TTD. Nano-sized solid dispersions based on hydrophobic-hydrophilic conjugates for dissolution enhancement of poorly water-soluble drugs. *Int J Pharm.* 2017;533(1):93-98.
270. Szałaj U, Chodara A, Gierlotka S, Wojnarowicz J, Łojkowski W. Enhanced Release of Calcium Ions from Hydroxyapatite Nanoparticles with an Increase in Their Specific Surface Area. *Materials.* 2023; 16(19):6397.

271. Hecq J, Deleers M, Fanara D, Vranckx H, Amighi K. Preparation and characterization of nanocrystals for solubility and dissolution rate enhancement of nifedipine. *Int J Pharm.* 2005;299(1-2):167-177.
272. Dizaj SM, Vazifehasl Zh, Salatin S, Adibkia Kh, Javadzadeh Y. Nanosizing of drugs: Effect on dissolution rate. *Res Pharm Sci.* 2015;10(2):95-108.
273. Jassim ZE, Rajab NA. Review on preparation, characterization, and pharmaceutical application of nanosuspension as an approach of solubility and dissolution enhancement. *Journal of Pharmacy Research.* 2018;12:771-774.
274. Smolen D, Chudoba T, Gierlotka S, et al. Hydroxyapatite Nanopowder Synthesis with a Programmed Resorption Rate. *Journal of Nanomaterials.* 2012.
275. Strona producenta Labindeks. <https://www.labindex.eu/p/homogenizator-ultradzwickowy-procesowy-uip500hdt>. dostęp dnia 18.08.2023.
276. Hielsher Ultrasoonics. https://www.hielscher.com/pl/i500_p.htm. dostęp dnia 18.08.20203
277. Arima Y, Iwata H. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials.* 2007;28(20):3074-3082.
278. Al-Azzam N, Alazzam A. Micropatterning of cells via adjusting surface wettability using plasma treatment and graphene oxide deposition. *PLoS One.* 2022;17(6):e0269914.
279. Bhowmik R, Katti KS, Katti D. Molecular interactions of degradable and non-degradable polymers with hydroxyapatite influence mechanics of polymer-hydroxyapatite nanocomposite biomaterials. *International Journal of Nanotechnology - INT J NANOTECHNOL.* 2009;6:511–528.
280. Daiwon C, Kacey M, Prashant K. Chemical Synthesis of Hydroxyapatite/Poly ??-Caprolactone) Composites. *Materials Research Bulletin.* 2014;39:417-432.
281. A Sharma A, Payne S, Katti KS, et al. Evaluating Molecular Interactions in Polycaprolactone-Biomaterialized Hydroxyapatite Nanocomposites using Steered Molecular Dynamics. *JOM.* 2015;67:733–743.
282. Quadros ME, Linsey C. Environmental and Human Health Risks of Aerosolized Silver Nanoparticles. *Journal of the Air & Waste Management Association.* 2010;60:7:770-781.

283. Nakano T, Kaibara K, Tabata Y, et al. Unique alignment and texture of biological apatite crystallites in typical calcified tissues analyzed by microbeam X-ray diffractometer system. *Bone*. 2002;31(4):479-487.
284. Ruffini A, Sprio S, Preti L, Tampier A. Synthesis of Nanostructured Hydroxyapatite via Controlled Hydrothermal Route. *Biomaterial-supported Tissue Reconstruction or Regeneration*. IntechOpen. 2019.
285. Hipś I, Świążkowski W, Łojkowski W, Woźniak B, Szałaj U. Zgłoszenie patentowe: P.434340, pt. Bioaktywne hydroksyapatytowe powłoki o hierarchicznej nano/mikrostrukturze, sposób ich wytwarzania oraz zastosowanie, 16.06.2020.
286. Liu D, Genetos DC, Shao Y, et al. Activation of extracellular-signal regulated kinase (ERK1/2) by fluid shear is Ca^{2+} - and ATP-dependent in MC3T3-E1 osteoblasts. *Bone*. 2008;42(4):644-652.
287. Lim SS, Chai CY, Loh HS. In vitro evaluation of osteoblast adhesion, proliferation and differentiation on chitosan-TiO₂ nanotubes scaffolds with Ca^{2+} ions. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;76:144-152.
288. AbouAitah K, Bil M, Pietrzykowska E, et al. Drug-Releasing Antibacterial Coating Made from Nano-Hydroxyapatite Using the Sonocoating Method. *Nanomaterials (Basel)*. 2021;11(7):1690.
289. Kobayashi T, Ono S, Hirakura S, Oaki Y, Imai H. Morphological variation of hydroxyapatite grown in aqueous solution based on simulated body fluid. *CrystEngComm*. 2012;14(3):1143–1149.

SPIS RYSUNKÓW

Rysunek 1. Budowa kości w odniesieniu do struktury naturalnej gąbki morskiej. Opracowanie własne na podstawie [1].	14
Rysunek 2. Zasada działania ultradźwiękowego osadzania powłok nanocząstek. Opracowanie własne na podstawie [69].	37
Rysunek 3. Kolorowy obraz SEM filopodii komórki MG-63 (strzałki) na powierzchni pokrytej nHAP (powiększenie 50 000×) [69].	38
Rysunek 4. Przekroje poprzeczne A) rusztowania PCL, B) rusztowania PCL pokrytego nHAP, C) rusztowania β -TCP i D) rusztowania β -TCP pokrytego nHAP, gdzie: S - materiał rusztowania; NB - nowa kość; * - tkanka miękka (barwienie Hem-Eos., powiększenie 100×). E) i F) Skany μ -CT rusztowania PCL pokrytego nHAP w kości piszczelowej królika po 3 miesiącach od implantacji (pasek skali 2 mm) [69].	39
Rysunek 5. Łączenie dwóch metod: ultradźwiękowego pokrywania oraz mikrofalowej syntezy nanocząstek.	42
Rysunek 6. (A) Rysunek reaktora Mikrofalowego MSS-4; (B) Moduł komór procesowych 1a – kompletny reaktor jednokomorowy (otwarty), 1b kompletny reaktor jednokomorowy (zamknięty), 2 – falowód, 3 – generator mikrofal (magnetron), 4 – sześćoosiowy manipulator uniwersalny UR5e, 5 – czteropozycyjny magazynek, 6 – pojemnik reakcyjny	45
Rysunek 7. Schemat zbiornika do procesu ultradźwiękowego osadzania powłok na powierzchni implantów.	46
Rysunek 8. Widok zbiornika do procesu ultradźwiękowego osadzania powłok na powierzchni implantów z zamontowanym przetwornikiem ultradźwiękowym Hielscher.	47
Rysunek 9. Statyw teflonowy do mocowania próbek.	48
Rysunek 10. Zdjęcie stanowiska ultradźwiękowego.	49
Rysunek 11. Schemat podłoża Ti 3D wraz z punktami obrazowania SEM.	54
Rysunek 12. Przykładowy obraz uzyskany na podstawie analizy obrazu SEM uzyskany w celu analizy stopnia pokrycia powierzchni płaskiej pastylki PCL.	59
Rysunek 13. Schemat przygotowania próbek wiązań UHMWPE do badań degradacji powłok hydroksyapatytowych na ich powierzchni.	62
Rysunek 14. Schemat ugięcia sondy pod wpływem nacisku na powierzchnię podłoża.	63
Rysunek 15. Widma dyfrakcji rentgenowskiej (XRD) dla poszczególnych typów GoHAPmed.	67
Rysunek 16. Histereza sorpcji azotu przez nanocząstki GoHAPmed.	69
Rysunek 17. Adsorpcja wody z otoczenia na nanocząstkach hydroksyapatytu GoHAP o różnej wielkości [260].	71
Rysunek 18. Ilość uwolnionych jonów wapnia w zależności od wielkości nanocząstek hydroksyapatytu GoHAP [269].	73
Rysunek 19. Zmiana pH zaobserwowana w badaniach rozpuszczalności nanohydroksyapatytu GoHAP [269].	74
Rysunek 20. Wpływ wielkości powierzchni właściwej nanocząstek hydroksyapatytu GoHAP na ilość uwalnianych jonów wapnia [269].	74
Rysunek 21. Obraz SEM rusztowania kostnego PCL oraz analogicznego rusztowania z powłoką GoHAPmed Typ 3 naniesioną z zastosowaniem, odpowiednio: 57%, 75% oraz 100% amplitudy.	77
Rysunek 22. Zawartość jonów PO_4^{3-} oraz hydroksyapatytu uzyskana na drodze rozpuszczania powłoki GoHAPmed Typ 3 w 0,1 M HCL w zależności od amplitudy procesu ultradźwiękowego.	78

Rysunek 23. Obraz SEM rusztowania kostnego modyfikowanego powierzchniowo powłoką GoHAPmed Typ 3 osadzaną metodą ultradźwiękową w temperaturze, odpowiednio: 15 °C, 30 °C, 45 °C.	79
Rysunek 24. Zawartość jonów PO_4^{3-} oraz hydroksyapatytu uzyskana na drodze rozpuszczenia powłoki GoHAPmed Typ 3 w 0,1 M HCL zależności od temperatury procesu ultradźwiękowego.	80
Rysunek 25. Zawartość jonów PO_4^{3-} oraz hydroksyapatytu uzyskana na drodze rozpuszczenia powłoki GoHAPmed Typ 3 w 0,1 M HCL zależności od koncentracji wodnej zawiesiny nanocząstek.	81
Rysunek 26. Zawartość jonów PO_4^{3-} oraz hydroksyapatytu uzyskana na drodze roztworzenia powłoki GoHAPmed Typ 3 w zależności od czasu prowadzenia procesu ultradźwiękowego.	82
Rysunek 27. Zawartość jonów PO_4^{3-} oraz hydroksyapatytu uzyskana na drodze roztworzenia powłoki GoHAPmed Typ 6 w zależności od czasu prowadzenia procesu ultradźwiękowego.	82
Rysunek 28. Obrazy SEM powłok GoHAPmed Typ 3 (14 nm) oraz GoHAPmed Typ 6 (42 nm) po 1 minucie procesu ultradźwiękowego osadzania powłoki hydroksyapatytowej.....	83
Rysunek 29. Obrazy SEM powłok GoHAPmed Typ 3 (14 nm) oraz GoHAPmed Typ 6 (42 nm) po 2 minutach procesu ultradźwiękowego osadzania powłoki hydroksyapatytowej.....	84
Rysunek 30. Obrazy SEM powłok GoHAPmed Typ 3 (14 nm) oraz GoHAPmed Typ 6 (42 nm) po 4 minutach procesu ultradźwiękowego osadzania powłoki hydroksyapatytowej.....	84
Rysunek 31. Obrazy SEM powłok GoHAPmed Typ 3 (14 nm) oraz GoHAPmed Typ 6 (42 nm) po 6 minutach procesu ultradźwiękowego osadzania powłoki hydroksyapatytowej.....	85
Rysunek 32. Obrazy SEM powłok GoHAPmed Typ 3 (14 nm) oraz GoHAPmed Typ 6 (42 nm) po 8 minutach procesu ultradźwiękowego osadzania powłoki hydroksyapatytowej.....	85
Rysunek 33. Obraz SEM przełomu pastylki PCL z powłoką składającą się z GoHAP Typ 3 (14 nm) oraz GoHAPmed Typ 6 (42 nm). Powiększenie 100 000 ×.	86
Rysunek 34. Stopień pokrycia powierzchni PCL powłoką składającą się z nanocząstek GoHAPmed Typ 3 (14 nm) oraz GoHAPmed Typ 6 (42 nm) w funkcji czasu prowadzenia procesu ultradźwiękowego. Powiększenie 1 000 X.	87
Rysunek 35. Kąt zwilżania podłoża PEEK przed modyfikacją oraz po modyfikacji jego powierzchni powłokami GoHAPmed.	88
Rysunek 36. Schemat mechanizmu ultradźwiękowego osadzania powłok składających się z nanocząstek hydroksyapatytu GoHAPmed na powierzchni płaskiej pastylki PCL [255].	89
Rysunek 37. Podłoże tytanowe – próbki blachy tytanowej (tytan grade 2) o wymiarach 9 x12 x 2 mm.....	90
Rysunek 38. Powłoki składające się z nanocząstek o różnej wielkości nanocząstek osadzone na podłożach tytanowych (grade 2): A1-A3) GoHAPmed Typ 1 (10 nm); B1-B3) GoHAPmed Typ 3 (14 nm); C1-C3) GoHAPmed Typ 4 (26 nm); D1-D3) GoHAPmed Typ 5 (30 nm); E1-E3) GoHAPmed Typ 6 (42 nm).	92
Rysunek 39. Mapa pierwiastkowa EDS powłok hydroksyapatytowych naniesionych na powierzchnię podłoża tytanowego, uzyskane po 1 minucie procesu ultradźwiękowego.	93
Rysunek 40 - Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 1 (10 nm) osadzone na podłożach tytanowych w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min. Przybliżenia odpowiednio 25 000×, 100 000×.....	95
Rysunek 41. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 3 (14 nm) osadzone na podłożach tytanowych w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min. Przybliżenia odpowiednio 25 000×, 100 000×.....	95

Rysunek 42. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 4 (26 nm) osadzone na podłożach tytanowych w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min. Przybliżenia odpowiednio 25 000×, 100 000×.....	96
Rysunek 43. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 5 (30 nm) osadzone na podłożach tytanowych w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min. Przybliżenia odpowiednio 25 000×, 100 000×.....	96
Rysunek 44. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 6 osadzone na podłożach tytanowych w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min. Przybliżenia odpowiednio 25 000×, 100 000×.....	97
Rysunek 45. Kąt zwilżania podłoża tytanu grade 2 przed modyfikacją oraz po modyfikacji jego powierzchni powłokami GoHAPmed.	98
Rysunek 46. Obrazy AFM powłok GoHAPmed składających się z różnej wielkości nanocząstek uzyskane metodą ultradźwiękową na podłożu z tytanu grade 2 [256].	100
Rysunek 47. Obraz AFM uzyskany dla pojedynczych agregatów GoHAPmed Typ 3 naniesionych na podłoże z tytanu grade 2 metodą ultradźwiękową [256].	102
Rysunek 48. Przykład wykresu przebiegu sondy zdrapującej pojedynczy aglomerat [256].	102
Rysunek 49. Podłoże PEEK – płaska próbka o wymiarach 9 x 12 x 1,5 mm. Przybliżenia odpowiednio 1 000×, 5 000×, 25 000×, 100 000×.	103
Rysunek 50. Powłoki składające się z nanocząstek o różnej wielkości nanocząstek osadzone na podłożach PEEK: A1-A3) GoHAPmed Typ 1 (10 nm); B1-B3) GoHAPmed Typ 3 (14 nm); C1-C3) GoHAPmed Typ 4 (26 nm); D1-D3) GoHAPmed Typ 5 (30 nm); E1-E3) GoHAPmed Typ 6 (42 nm).	105
Rysunek 51. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 1 (10 nm) osadzone na podłożach PEEK w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min.	106
Rysunek 52. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 3 (14 nm) osadzone na podłożach PEEK w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min.	107
Rysunek 53. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 4 (26 nm) osadzone na podłożach PEEK w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min.	107
Rysunek 54. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 5 (30 nm) osadzone na podłożach PEEK w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min. Przybliżenia odpowiednio 25 000×, 100 000×.....	108
Rysunek 55. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 6 (42 nm) osadzone na podłożach PEEK w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min.	108
Rysunek 56. Mapa pierwiastkowa EDS powłok GoHAPmed Typ 1 (10 nm) naniesionych na powierzchnię podłoża PEEK, uzyskanych w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min i 9 min procesu ultradźwiękowego.....	109
Rysunek 57. Mapa pierwiastkowa EDS powłok GoHAPmed Typ 4 (26 nm) naniesionych na powierzchnię podłoża PEEK, uzyskanych w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min i 9 min procesu ultradźwiękowego.....	110
Rysunek 58. Mapa pierwiastkowa EDS powłok GoHAPmed Typ 6 (42 nm) naniesionych na powierzchnię podłoża PEEK, uzyskanych w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min i 9 min procesu ultradźwiękowego.....	111
Rysunek 59. Kąt zwilżania podłoża PEEK przed modyfikacją oraz po modyfikacji jego powierzchni powłokami GoHAPmed.	112
Rysunek 60. Obrazy AFM powłok GoHAPmed składających się z różnej wielkości nanocząstek uzyskane metodą ultradźwiękową na podłożu PEEK [256].	113
Rysunek 61. Podłoże tytanowe drukowane 3D – krążek o średnicy 10 mm. Przybliżenia odpowiednio 75×, 500×, 1 000×, 5 000×, 25 000×, 100 000×.....	115
Rysunek 62. Powłoki składające się z nanocząstek o różnej wielkości nanocząstek osadzone na podłożach Ti 3D: A1-A3) GoHAPmed Typ 1 (10 nm); B1-B3) GoHAPmed Typ 3 (14 nm);	

C1-C3) GoHAPmed Typ 4 (26 nm); D1-D3) GoHAPmed Typ 5 (30 nm); E1-E3) GoHAPmed Typ 6 (42 nm).....	116
Rysunek 63. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 1 (10 nm) osadzone na podłożach Ti 3D w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min.....	117
Rysunek 64. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 3 (14 nm) osadzone na podłożach Ti 3D w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min.....	118
Rysunek 65. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 4 (26 nm) osadzone na podłożach Ti 3D w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min.....	118
Rysunek 66. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 5 (30 nm) osadzone na podłożach Ti 3D w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min.....	119
Rysunek 67. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 6 (42 nm) osadzone na podłożach Ti 3D w regulowanym czasie, odpowiednio: 3 min, 6 min, 9 min.....	119
Rysunek 68. Mapy pierwiastkowe EDS powłok GoHAPmed o zróżnicowanej wielkości nanocząstek naniesionych na powierzchnię podłoża tytanu drukowanego, uzyskanych w regulowanym czasie, odpowiednio: 1 min, 3 min i 6 min procesu SonoNanoCoating.	121
Rysunek 69. Implanty kręgosłupowe (Andromeda oraz Perseus) drukowane 3D ze stopu tytanu Ti64ELI (Syntropiq, Czechy).....	122
Rysunek 70. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ 1 (10 nm) oraz GoHAPmed Typ 6 (42 nm) osadzone wewnątrz implantów kręgosłupowych (Aries, Sytropiq, Czechy).	123
Rysunek 71. Powłoki składające się z nanocząstek GoHAPmed Typ o różnej wielkości, na powierzchni tytanowych (stop Ti-6Al-4V) śrub interferencyjnych.	124
Rysunek 72. Zdjęcie z operacji wkręcania śrub interferencyjnych w kość wołową.	125
Rysunek 73. Obraz SEM tkanek przylegających do powłoki GoHAPmed naniesionej na śruby interferencyjne po wykręceniu z kości wołowej.	125
Rysunek 74. Obrazy SEM włókien więzadeł, których powierzchnię modyfikowano powłokami hydroksyapatytu GoHAPmed o różnym rozmiarze wielkości nanocząstek oraz nanohydroksyapatytów HAP Sigma-Aldrich, HAP Berkeley oraz HA Biocer.	127
Rysunek 75. Obrazy AFM topografii podłoża UHMWPE na którym osadzono powłoki GoHAPmed Typ 3 metodą ultradźwiękową. Widok przed i po zarysowaniu powierzchni sondą AFM.	128
Rysunek 76. Wykres wychylenia (ugięcia) sondy mikroskopu AFM podczas tworzenia rysy na powierzchni próbki; A) topografia powierzchni próbki z zaznaczonym obszarem prowadzenia sondy, B) Obraz SEM powłoki GoHAPmed Typ 3 na powierzchni podłoża UHMWPE w miejscach widocznych na obrazie AFM, jako jasne punkty o większej wysokości.	128
Rysunek 77. Etapy badania wytrzymałości powłok GoHAPmed Typ 3 naniesionych na powierzchnię sztucznych więzadeł UHMWPE: a) przygotowanie materiałów, b) nawiercenie otworu w kości, c-e) przewlekanie sztucznego więzadła przez otwór w kości, f) mocowanie więzadła śrubą interferencyjną.	130
Rysunek 78. Obrazy SEM sztucznego więzadła krzyżowego UHMWPE po badaniu wytrzymałości powłok GoHAPmed Typ 3 w warunkach symulujących kliniczne zastosowanie implantu.....	131
Rysunek 79. Obrazy SEM sztucznych więzadeł składających się z włókien UHMWPE, których powierzchnię modyfikowano powłokami hydroksyapatytowymi GoHAPmed oraz HAP Berkeley i HAP Sigma-Aldrich. Obrazy po naniesieniu powłok oraz po testach degradacji w PBS, 60 i 90 dni.....	133
Rysunek 80. Obrazy SEM sztucznych więzadeł składających się z włókien UHMWPE, których powierzchnię modyfikowano powłokami hydroksyapatytowymi GoHAPmed oraz HAP Berkeley i HAP Sigma-Aldrich. Obrazy po naniesieniu powłok oraz po testach degradacji w SBF, 60 i 90 dni.....	134

Rysunek 81. Obrazy z mikroskopu konfokalnego przedstawiające żywotność osteoblastów (komórki hFOB 1.19, ATCC CRL-11372TM) po 24-godzinnej hodowli na powierzchni podłoża tytanowych drukowanych 3D modyfikowanych powłokami, odpowiednio: GoHAPmed Typ 1, GoHAPmed Typ 3 i GoHAPmed Typ 6, HA Biocer. W celu wizualizacji struktury biomateriałów zastosowano kontrast Nomarskiego. Żywe komórki emitowały zieloną fluorescencję, podczas gdy martwe komórki emitowały czerwoną fluorescencję. Powiększenie: 100x, pasek skali: 150 μ m.	136
Rysunek 82. Proliferacja osteoblastów po 3- i 5-dniowej hodowli na powierzchni podłoża tytanowych drukowanych 3D modyfikowanych powłokami, odpowiednio: GoHAPmed Typ 1, GoHAPmed Typ 3 i GoHAPmed Typ 6, HA Biocer.	137
Rysunek 83. Obrazy z mikroskopu konfokalnego przedstawiające morfologię osteoblastów (komórki hFOB 1.19, ATCC CRL-11372TM) po 3- i 5-dniowej hodowli na powierzchni podłoża tytanowych drukowanych 3D modyfikowanych powłokami, odpowiednio: GoHAPmed Typ 1, GoHAPmed Typ 3 i GoHAPmed Typ 6, HA Biocer. W celu wizualizacji struktury biomateriałów zastosowano kontrast Nomarskiego. Jądra - niebieska fluorescencja, filamenty F-aktyny - czerwona fluorescencja. Powiększenie: 100x, pasek skali: 150 μ m.	138
Rysunek 84. Obraz SEM powierzchni kompozytowego rusztowania kostnego modyfikowanej powłoką GoHAPmed Typ 3.	139
Rysunek 85. Obraz SEM przekroju kompozytowego rusztowania kostnego modyfikowanej powłoką GoHAPmed Typ 3.	139
Rysunek 86. Rusztowanie kostne kompozytowe wykonane z PCL/HAP/TCP, którego powierzchnię modyfikowano powłoką GoHAPmed Typ 3 - po 7 dniach hodowli komórek MSC w medium osteogennym oraz medium osteogennym wzbogacanym FGF-2 i BMP-2. Powiększenie odpowiednio: 4x, 10x.	140
Rysunek 87. Oznaczenie aktywności metabolicznej (MTT test) po 1, 3, 7 dniach hodowli w standardowym medium hodowlanym α MEM.	141
Rysunek 88. Różnice wynikające z zastosowania warstwy zarodkowej na włóknie rusztowania kostnego drukowanego 3D z kompozytu PCL/ β TCP/HAP; A) włókno rusztowania kostnego, którego powierzchnię modyfikowano warstwą zarodkową (GoHAPmed Typ 1); włókno rusztowania kostnego bez modyfikacji; C) przekrój rusztowania kostnego z powłoką biomimetyczną wytworzona poprzez 24-godziną inkubację rusztowania z warstwą zarodkową w roztworze SBF z dodatkiem białka cytochrom c; D) przekrój rusztowania kostnego bez warstwy zarodkowej inkubowany przez 24 godziny w roztworze SBF z dodatkiem białka cytochrom c; E) przekrój rusztowania kostnego z wytworzoną powłoką biomimetyczną na jego powierzchni. Na podstawie zgłoszenia patentowego [284].	143
Rysunek 89. Uwalnianie białka cytochrom c w roztworze PBS z biomimetycznych powłok hydroksyapatytowych wytworzonych z zastosowaniem warstw zarodkowych składających się z różnej wielkości nanocząstek GoHAPmed, odpowiednio 10 nm, 14 nm, 42 nm. Gdzie: H1W3 odpowiada warstwie zarodkowej GoHAPmed Typ 1 (10 nm), H3W3 odpowiada warstwie zarodkowej GoHAPmed Typ 3 (14 nm), H6W3 odpowiada warstwie zarodkowej GoHAPmed Typ 6 (42 nm), H0 odpowiada rusztowaniu kostnemu bez zastosowania modyfikacji powierzchni [284].	144
Rysunek 90. Obrazy SEM powłoki GoHAPmed Typ 3 na powierzchni porowatej śruby drukowanej 3D ze stopu tytanu Ti6Al4V.	149

SPIS TABEL

Tabela 1 - Parametry syntezy GoHAPmed - czas syntezy mikrofalowej, ciśnienie, temperatura w komorze reakcyjnej reaktora MSS-4	44
Tabela 2. Stężenie jonów w osoczu krwi ludzkiej, SBF i PBS.	61
Tabela 3. Parametry sondy ATEC-NC, dane producenta.	63
Tabela 4 – Średnia wielkość krystalitów GoHAPmed na podstawie analizy profili linii dyfrakcyjnych.....	68
Tabela 5 – Parametry powierzchni właściwej (SSA), całkowitej powierzchni portów (TPV), gęstości (DEN) oraz średniej wielkości nanocząstek (MPS_{BET}) wyznaczone dla nanocząstek hydroksyapatytu GoHAPmed.	70
Tabela 6. Optymalny czas osadzania powłok GoHAPmed na podłożu tytanu grade 2.	94
Tabela 7. Chropowatość RMS powierzchni tytanu grade 2 modyfikowanego powłokami GoHAPmed [256].	99
Tabela 8. Parametry powłok GoHAPmed naniesionych na podłoża tytanowe wyznaczone mikroskopią AFM, tj. głębokość zadrapania (z ang. Max. Indentation), obciążenie, przy którym dana głębokość zadrapania została uzyskana oraz obciążenie krytyczne [256].	101
Tabela 9. Siła adhezji powłok GoHAPmed do powierzchni podłoża tytanu grade 2 [256]. .	103
Tabela 10. Chropowatość RMS powierzchni PEEK modyfikowanej powłokami GoHAPmed [256].	114
Tabela 11. Optymalny czas ultradźwiękowego osadzania na powierzchni Ti 3D nanocząstek GoHAPmed zróżnicowanych pod kątem średniej wielkości nanocząstek.....	120
Tabela 12. Parametry powierzchni właściwej (SSA), całkowitej powierzchni portów (TPV), gęstości (DEN) oraz średniej wielkości nanocząstek (MPS_{BET}) wyznaczone dla nanohydroksyapatytów dostępnych komercyjnie.	126
Tabela 13. Siła adhezji powłok składających się z nanocząstek GoHAPmed Typ 3 oraz GoHAPmed Typ 6.....	129
Tabela 14. Grubość powłoki GoHAPmed Typ 3 naniesionej na powierzchnię kompozytowego rusztowania kostnego.	140
Tabela 15. Optymalne parametry zmienne procesu ultradźwiękowego osadzania powłok hydroksyapatytowych metodą SonoNanoCoating na różnego rodzaju podłoża.....	146