



Imię i nazwisko autora rozprawy: Magda Rościszewska  
Dyscyplina naukowa: Inżynieria Materiałowa

## ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: „Wytwarzanie i modyfikacja powierzchni porowatych struktur tytanowych przeznaczonych na implanty.”

Tytuł rozprawy w języku angielskim: “Manufacturing and modification of porous titanium structures for implants.”

|  |  |
|--|--|
| Promotor<br><br><i>podpis</i>            | Drugi promotor<br><br>Nie dotyczy<br><br><i>podpis</i> |
| Prof. dr hab. inż. Andrzej Zieliński     |  |
| Promotor pomocniczy<br><br><i>podpis</i> | Kopromotor<br><br>Nie dotyczy<br><br><i>podpis</i>     |
| Dr inż. Tomasz Seramak                   |  |



## OŚWIADCZENIE

Autor rozprawy doktorskiej: Magda Rościszewska

Ja, niżej podpisana, oświadczam, iż jestem świadoma, że zgodnie z przepisem art. 27 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (t.j. Dz.U. z 2021 poz. 1062), uczelnia może korzystać z mojej rozprawy doktorskiej zatytułowanej:

„Wytwarzanie i modyfikacja powierzchniowa porowatych materiałów tytanowych przeznaczonych na implanty” do prowadzenia badań naukowych lub w celach dydaktycznych.<sup>1</sup>

Świadoma odpowiedzialności karnej z tytułu naruszenia przepisów ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych i konsekwencji dyscyplinarnych określonych w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2021.478 t.j.), a także odpowiedzialności cywilnoprawnej oświadczam, że przedkładana rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie.

Oświadczam, że treść rozprawy opracowana została na podstawie wyników badań prowadzonych pod kierunkiem i w ścisłej współpracy z promotorem prof. dr. hab. inż. Andrzejem Zielińskim i promotorem pomocniczym dr. inż. Tomaszem Serakiem.

Niniejsza rozprawa doktorska nie była wcześniej podstawą żadnej innej urzędowej procedury związanej z nadaniem stopnia doktora.

Wszystkie informacje umieszczone w ww. rozprawie uzyskane ze źródeł pisanych i elektronicznych, zostały udokumentowane w wykazie literatury odpowiednimi odnośnikami, zgodnie z przepisem art. 34 ustawy o prawie autorskim i prawach pokrewnych.

Potwierdzam zgodność niniejszej wersji pracy doktorskiej z załączoną wersją elektroniczną.

Gdańsk, dnia .....

.....

*podpis doktoranta*

Ja, niżej podpisany(a), wyrażam zgodę na umieszczenie ww. rozprawy doktorskiej w wersji elektronicznej w otwartym, cyfrowym repozytorium instytucjonalnym Politechniki Gdańskiej.

Gdańsk, dnia .....

.....

*podpis doktoranta*

*\*niepotrzebne usunąć*

<sup>1</sup> Art. 27. 1. Instytucje oświatowe oraz podmioty, o których mowa w art. 7 ust. 1 pkt 1, 2 i 4–8 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, mogą na potrzeby zilustrowania treści przekazywanych w celach dydaktycznych lub w celu prowadzenia działalności naukowej korzystać z rozpowszechnionych utworów w oryginale i w tłumaczeniu oraz zwielokrotnić w tym celu rozpowszechnione drobne utwory lub fragmenty większych utworów.

2. W przypadku publicznego udostępniania utworów w taki sposób, aby każdy mógł mieć do nich dostęp w miejscu i czasie przez siebie wybranym korzystanie, o którym mowa w ust. 1, jest dozwolone wyłącznie dla ograniczonego kręgu osób uczących się, nauczających lub prowadzących badania naukowe, zidentyfikowanych przez podmioty wymienione w ust. 1.



## OPIS ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**Autor rozprawy doktorskiej:** Magda Rościszewska

**Tytuł rozprawy doktorskiej w języku polskim:** „Wytwarzanie i modyfikacja powierzchni porowatych struktur tytanowych przeznaczonych na implanty”

**Tytuł rozprawy w języku angielskim:** „ Manufacturing and modification of porous titanium structures for implants”

**Język rozprawy doktorskiej:** polski

**Promotor rozprawy doktorskiej:** prof. dr hab. inż. Andrzej Zieliński

**Drugi promotor rozprawy doktorskiej\*:**

**Promotor pomocniczy rozprawy doktorskiej\*:** dr inż. Tomasz Seramak

**Kopromotor rozprawy doktorskiej\*:**

**Data obrony:**

**Słowa kluczowe rozprawy doktorskiej w języku polskim:** Stop tytanu, Selektywne topienie laserowe (SLM), Utlenianie mikrołukowe (MAO), Biofunkcjonalizacja, Implanty

**Słowa kluczowe rozprawy doktorskiej w języku angielskim:** Titanium alloy, Selective laser melting (SLM), Micro-arc oxidation (MAO), Biofunctionalization, Implants

**Streszczenie rozprawy w języku polskim:** Celem pracy było wytworzenie stopu Ti-13Nb-13Zr z wykorzystaniem technologii selektywnego topienia laserowego (SLM) oraz jego biofunkcjonalizacja za pomocą utleniania mikrołukowego (MAO), a następnie określenie wpływu parametrów procesowych na właściwości otrzymanych materiałów pod kątem ich zastosowania na implanty. Oceniono wpływ napięcia, natężenia i czasu procesu MAO przeprowadzanego w elektrolicie zawierającym wapń i fosfor na charakterystykę warstw. Następnie zbadano wpływ bioaktywnych dodatków srebra i galu na charakterystykę otrzymanych warstw, oraz porównano właściwości uzyskanych warstw MAO w zależności od metody wytwarzania materiału referencyjnego. Metodyka badań obejmowała charakteryzację topografii powierzchni (SEM, AFM), składu chemicznego (EDS) i fazowego (XRD), pomiary kąta zwilżania (tensjometr optyczny), badania mechaniczne (nanoindentacja i test zarysowania), ocenę wstępnej bioaktywności (test immersji), badania uwalniania jonów (MP-AES), test żywotności komórek (MTT) oraz ocenę cytotoksyczności (zliczanie kolonii bakterii). Badania wykazały, że warstwy MAO, zawierające wapń i fosfor z dodatkiem srebra lub galu, wytworzone przy odpowiedniej kombinacji parametrów procesu zwiększają biogodność oraz aktywność biologiczną implantu tytanowego, a charakterystyka materiałów wytworzonych SLM, w tym ich mikrostruktura, istotnie wpływa na właściwości warstw MAO.

**Streszczenie rozprawy w języku angielskim:** The study aimed to manufacture a Ti-13Nb-13Zr alloy using selective laser melting (SLM) technology, followed by biofunctionalization through micro-arc oxidation (MAO). The effects of MAO process parameters (applied voltage, current, time) on implant material properties were investigated. The influence of bioactive silver and gallium additives on MAO layer characteristics was assessed, along with a comparison between different methods of producing reference materials. The research methodology included characterization of the surface topography (SEM, AFM), chemical composition (EDS) and phase composition (XRD), contact angle measurements (optical tensiometer), mechanical tests (nanoindentation and scratch test), evaluation of initial bioactivity (immersion test), active ion release (MP-AES), cell viability (MTT), and cytotoxicity tests (counting bacterial colonies) was performed. Results showed that properly controlled MAO processes with calcium, phosphorus, silver, or gallium enhanced the biocompatibility and biological activity of titanium implants. The microstructure of SLM-manufactured materials significantly affected MAO layer properties.

\* *niepotrzebne skreślić*

**„Podróż tysiąca mil zaczyna się od jednego kroku.”**

– Lao Tzu

*Składam serdeczne podziękowania Promotorowi pracy Panu prof. dr hab. inż. Andrzejowi Zielińskiemu za bycie drogowskazem, inspiracją i nieocenionym wsparciem w tej naukowej podróży.*

*Dziękuję Mamie i Tacie, za przekazaną mi odwagę i możliwość podążania własną drogą, bezcenną otuchę oraz wszystko, co każdego dnia dla mnie robią.*

*Dziękuję Mężowi za to, że jest od pierwszego kroku i wspiera na każdym rozdrożu, za cierpliwość i niezachwianą ostoję.*

*Oraz wszystkim przyjaciołom i towarzyszom podróży, dzięki którym poznałam nie tylko nowe miejsca, naukowe obszary, ale również nowe części siebie.*

*Magda Rościszewska*





## SPIS TREŚCI

|  |    |
|--|----|
| STRESZCZENIE.....  | 13 |
| ABSTRACT.....  | 14 |
| WYKAZ WAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW I OZNACZEŃ .....                                | 15 |
| WSTĘP .....  | 19 |
| CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....   | 23 |
| 1. Tytan i jego stopy wykorzystywane w implantologii.....                  | 25 |
| 2. Główne przyczyny odrzucenia implantów .....                             | 30 |
| 2.1. Powikłania infekcyjne .....   | 30 |
| 2.2. Powikłania nieinfekcyjne.....   | 32 |
| 3. Wymagania stawiane implantom.....                                       | 33 |
| 3.1. Biokompatybilność i bioaktywność.....                                 | 33 |
| 3.2. Skład chemiczny .....   | 34 |
| 3.3. Topografia.....   | 35 |
| 3.4. Zwilżalność.....  | 35 |
| 3.5. Właściwości mechaniczne .....   | 36 |
| 4. Metody wytwarzania materiałów na implanty.....                          | 36 |
| 4.1. Konwencjonalne metody wytwarzania implantów i ich obróbka .....       | 36 |
| 4.1.1. Metalurgia proszków .....   | 36 |
| 4.1.2. Odlewanie .....   | 37 |
| 4.1.3. Obróbka cieplna i plastyczna stopów tytanu .....                    | 38 |
| 4.2. Przyrostowe metody wytwarzania implantów .....                        | 39 |
| 4.2.1. Selektywne topienie laserowe SLM .....                              | 40 |
| 4.2.2. Topienie wiązką elektronów .....                                    | 41 |
| 4.2.3. Osadzanie ukierunkowaną wiązką energii.....                         | 41 |
| 4.2.4. Natryskiwanie spoiwa.....   | 42 |
| 4.3. Wpływ wytwarzania przyrostowego na mikrostrukturę stopów tytanu ..... | 42 |
| 5. Metody modyfikacji powierzchni implantów .....                          | 45 |
| 5.1. Techniki modyfikacji stopów tytanu .....                              | 45 |
| 5.1.1. Metody powłokowe .....  | 46 |
| 5.1.2. Metody bezpowłokowe.....  | 50 |
| 5.2. Mikrołukowe utlenianie stopów tytanu .....                            | 51 |
| 5.2.1. Mechanizm budowania warstw MAO .....                                | 51 |
| 5.2.2. Determinanty procesu MAO.....                                       | 55 |

|                      |  |    |
|----------------------|--|----|
| 5.2.3.               | Bioaktywność warstw MAO na stopie tytanu.....  | 58 |
| 5.2.4.               | Antybakteryjność warstw MAO na stopach tytanu.....   | 60 |
| 6.                   | Zastosowanie wybranych dodatków bioaktywnych w implantacji.....  | 64 |
| 6.1.                 | Zastosowanie srebra.....   | 64 |
| 6.2.                 | Zastosowanie galu.....   | 66 |
| CZEŚĆ BADAWCZA ..... |  | 77 |
| 7.                   | TEZA, CEL I ZAKRES PRACY .....   | 79 |
| 8.                   | MATERIAŁY I METODYKA BADAWCZA .....  | 81 |
| 8.1.                 | Materiały do badań.....  | 81 |
| 8.1.1.               | Stop tytanu Ti-13Zr-13Nb wytworzony metodą SLM.....  | 81 |
| 8.1.2.               | Komercyjny stop tytanu Ti-13Zr-13Nb .....  | 82 |
| 8.2.                 | Modyfikacja powierzchni – wytworzenie warstw MAO .....   | 83 |
| 8.3.                 | Analiza przebiegu procesu MAO.....   | 87 |
| 8.4.                 | Badanie mikrostruktury i powierzchni.....  | 87 |
| 8.4.1.               | Badanie mikrostruktury oraz powierzchni próbek referencyjnych .....  | 87 |
| 8.4.2.               | Badanie powierzchni warstw MAO wytworzonych przy zmiennych parametrach procesu – napięcia, natężenia i czasu .....                       | 87 |
| 8.4.3.               | Badanie powierzchni warstw MAO wytworzonych przy zmiennym składzie elektrolitu i zmiennym napięciu.....                                  | 88 |
| 8.5.                 | Badanie składu chemicznego i fazowego .....  | 88 |
| 8.5.1.               | Badanie składu chemicznego i fazowego warstw MAO wytworzonych przy zmiennych parametrach procesu MAO – napięcia, natężenia i czasu ..... | 88 |
| 8.5.2.               | Badanie składu chemicznego i fazowego warstw MAO wytworzonych przy zmiennym składzie elektrolitu i zmiennym napięciu.....                | 89 |
| 8.6.                 | Badania mechaniczne i nanomechaniczne .....  | 89 |
| 8.7.                 | Badania siły adhezji warstw MAO do podłoża.....  | 90 |
| 8.8.                 | Pomiary kąta zwilżania .....   | 90 |
| 8.9.                 | Badania bioaktywności .....  | 90 |
| 8.10.                | Badania szybkości uwalniania bioaktywnych i antybakteryjnych dodatków.....   | 91 |
| 8.11.                | Badania odpowiedzi komórkowej.....   | 92 |
| 8.11.1.              | Hodowla komórek .....  | 92 |
| 8.11.2.              | Test żywotności.....   | 92 |
| 8.12.                | Badania skuteczności przeciwbakteryjnej.....   | 93 |

|         |   |     |
|---------|---|-----|
| 8.12.1. | Hodowla bakterii.....   | 93  |
| 8.12.2. | Określenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej .....                           | 93  |
| 8.12.3. | Badanie stanu fizjologicznego bakterii - obserwacje LIVE/DEAD .....           | 95  |
| 8.12.4. | Obserwacje morfologii bakterii .....  | 95  |
| 8.13.   | Statystyka.....   | 95  |
| 9.      | WYNIKI .....  | 97  |
| 9.1.    | Charakterystyka stopu Ti-13Zr-13Nb wytworzonego metodą SLM.....               | 97  |
| 9.2.    | Ocena wpływu parametrów procesu MAO na charakterystykę powstałych warstw..... | 98  |
| 9.2.1.  | Charakterystyka procesu MAO .....   | 98  |
| 9.2.2.  | Charakterystyka powierzchni warstw MAO.....                                   | 101 |
| 9.2.3.  | Charakterystyka składu chemicznego i fazowego .....                           | 105 |
| 9.2.4.  | Ocena kąta zwilżania .....  | 107 |
| 9.2.5.  | Ocena bioaktywności warstw MAO .....  | 108 |
| 9.2.6.  | Ocena właściwości nanomechanicznych .....                                     | 110 |
| 9.2.7.  | Adhezja warstw MAO do podłoża.....  | 114 |
| 9.2.8.  | Podsumowanie rozdziału .....  | 117 |
| 9.3.    | Charakterystyka warstw MAO z dodatkami bioaktywnymi i antybakteryjnymi .....  | 119 |
| 9.3.1.  | Wpływ dodatków na charakterystykę powierzchni i mikrostruktury warstw .....   | 119 |
| 9.3.2.  | Wpływ dodatków na charakterystykę składu chemicznego i fazowego warstw.....   | 125 |
| 9.3.3.  | Wpływ dodatków na zwilżalność warstw.....                                     | 131 |
| 9.3.4.  | Wpływ dodatków na właściwości nanomechaniczne.....                            | 132 |
| 9.3.5.  | Wpływ dodatków na siłę adhezji warstwy do podłoża.....                        | 134 |
| 9.3.6.  | Badanie szybkości uwalniania bioaktywnych i antybakteryjnych jonów .....      | 139 |
| 9.3.7.  | Wpływ dodatków na odpowiedź komórkową .....                                   | 140 |
| 9.3.8.  | Wpływ dodatków na właściwości bakteriobójcze .....                            | 143 |
| 9.3.9.  | Podsumowanie rozdziału .....  | 147 |
| 9.4.    | Wpływ metody wytwarzania implantów na charakterystykę warstw MAO.....         | 148 |

|         |  |     |
|---------|--|-----|
| 9.4.1.  | Porównanie mikrostruktury, morfologii, składu chemicznego i fazowego materiałów referencyjnych i wytworzonych na nich warstw MAO ..... | 148 |
| 9.4.2.  | Porównanie właściwości mechanicznych materiałów referencyjnych ...   | 155 |
| 9.4.3.  | Porównanie szybkości uwalniania czynnika aktywnego .....   | 155 |
| 9.4.4.  | Porównanie zwilżalności powierzchni materiałów kontrolnych i warstw MAO .....  | 156 |
| 9.4.5.  | Podsumowanie rozdziału.....  | 157 |
| 10.     | DYSKUSJA .....   | 159 |
| 10.1.   | Determinanty mechanizmu tworzenia, budowy i właściwości warstw MAO .....   | 159 |
| 10.1.1. | Formowanie warstw MAO.....   | 159 |
| 10.1.2. | Wpływ stosowanych parametrów procesu na charakterystykę warstw MAO .....   | 162 |
| 10.2.   | Biofunkcjonalizacja warstw MAO.....  | 177 |
| 10.2.1. | Wpływ bioaktywnych dodatków na odpowiedź komórkową warstw MAO .....  | 177 |
| 10.2.2. | Wpływ bioaktywnych dodatków na odpowiedź bakteryjną wytworzonych warstw MAO.....   | 183 |
| 10.3.   | Wpływ addytywnego wytwarzania próbek referencyjnych na charakterystykę otrzymanych warstw MAO .....                                    | 189 |
| 11.     | PODSUMOWANIE I WNIOSKI .....   | 195 |
|         | PODZIĘKOWANIA .....  | 201 |
|         | LITERATURA.....  | 203 |
|         | SPIS RYSUNKÓW.....   | 225 |
|         | SPIS TABEL.....  | 231 |

## STRESZCZENIE

Celem pracy było addytywne wytworzenie stopu Ti-13Nb-13Zr z wykorzystaniem technologii selektywnego topienia laserowego (SLM) oraz jego biofunkcjonalizacja za pomocą utleniania mikrołukowego (MAO), a następnie określenie wpływu parametrów procesowych na właściwości otrzymanych materiałów pod kątem ich zastosowania na implanty.

Praca została podzielona na trzy główne etapy. Pierwszy etap polegał na ocenie wpływu parametrów procesu MAO na charakterystykę warstw wytworzonych na stopie Ti-13Zr-13Nb otrzymanym metodą SLM. Zmiennymi parametrami były napięcie, natężenie prądu i czas utleniania. Metodyka badań obejmowała charakteryzację topografii powierzchni (SEM, AFM), składu chemicznego (EDS) i fazowego (XRD), pomiary kąta zwilżania (tensjometr optyczny), badania mechaniczne (nanoindentacja i test zarysowania) oraz ocenę wstępnej bioaktywności (test immersji). Kolejny etap obejmował ocenę wpływu bioaktywnych dodatków srebra i galu na charakterystykę otrzymanych warstw. Powtórzono badania topografii, właściwości fizycznych, chemicznych i mechanicznych, a dodatkowo przeprowadzono badania uwalniania jonów aktywnych (MP-AES), test żywotności komórek (MTT) oraz badania cytotoksyczności (zliczanie kolonii bakterii). Ostatni etap badań obejmował porównanie właściwości uzyskanych warstw MAO w zależności od metody wytwarzania materiału referencyjnego. W tym celu badania przeprowadzono na próbkach otrzymanych metodą SLM i próbkach pozyskanych od komercyjnego dostawcy w postaci pręta walcowanego na gorąco. Porównano mikrostrukturę, morfologię, skład chemiczny i fazowy materiałów referencyjnych oraz wytworzonych na nich warstw, zmierzono właściwości mechaniczne, porównano stopień uwalniania jonów aktywnych i oceniono zwilżalność powierzchni.

Badania wykazały, że warstwy MAO, zawierające wapń i fosfor z dodatkiem srebra lub galu, wytworzone przy odpowiedniej kombinacji parametrów procesu zwiększają biogodność oraz aktywność biologiczną implantu tytanowego, a charakterystyka materiałów wytworzonych SLM, w tym ich mikrostruktura, istotnie wpływa na proces wzrostu i właściwości warstw MAO.

## ABSTRACT

The aim of the work was the additive manufacturing of Ti-13Nb-13Zr alloy using the selective laser melting (SLM) technology, followed by its biofunctionalization with micro-arc oxidation (MAO), and then determining the effect of process parameters on the properties of the obtained materials in terms of their use for implants.

The work was divided into three main stages. The first stage consisted in assessing the influence of the MAO process parameters on the characteristics of the layers created on the Ti-13Zr-13Nb alloy produced by the SLM method. The variable parameters were voltage, current, and oxidation time. The research methodology included characterization of the surface topography (SEM, AFM), chemical composition (EDS) and phase composition (XRD), contact angle measurements (optical tensiometer), mechanical tests (nanoindentation and scratch test), and evaluation of initial bioactivity (immersion test). The next step involved the assessment of the effect of bioactive silver and gallium additives on the characteristics of the obtained layers. The tests of topography, physical, chemical, and mechanical properties were repeated, and in addition, active ion release (MP-AES), cell viability (MTT), and cytotoxicity tests (counting bacterial colonies) were performed. The last stage of the research included a comparison of the properties of the obtained MAO layers depending on the method of producing the reference material. For this purpose, the tests were carried out on samples obtained by the SLM method and samples obtained from a commercial supplier in the form of a hot-rolled bar. The microstructure, morphology, chemical, and physical composition of reference materials and the layers produced on them were compared, mechanical properties were measured, the degree of active ion release was determined and surface wettability was assessed.

Studies have shown that MAO layers containing calcium and phosphorus with the addition of silver or gallium, produced with the appropriate combination of process parameters, increase the biocompatibility and biological activity of the titanium implant, and the characteristics of the materials manufactured by SLM, including their microstructure, significantly affect the growth process and properties of the layers MAO.

## WYKAZ WAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW I OZNACZEŃ

$\alpha$  - faza  $\alpha$ ;

$\alpha'$  – faza martenzytyczna  $\alpha'$ ;

$\alpha''$  - faza martenzytyczna  $\alpha''$ ;

AFM- mikroskopia sił atomowych (*ang. Atomic Force Microscope*);

AM- technologia addytywna (*ang. Additive Manufacturing*);

$\beta$ - faza  $\beta$ ;

bcc- struktura regularna przestrzennie centrowana (*ang. Body Centered Cubic*)

BJ - natryskiwanie spoiwa (*ang. Binder Jetting*);

CA- kąt zwilżania (*ang. Contact Angle*);

CA- octan wapnia (*ang. Calcium Acetate*);

CoCr- stop kobaltu z chromem (*ang. Cobalt-Chromium Alloy*);

CFU- jednostka tworząca kolonię (*ang. Colony Forming Unit*);

CaP- fosforan wapniowy (*ang. Calcium Phopshate*);

DED- osadzanie ukierunkowaną wiązką energii (*ang. Directed Energy Deposition*);

DIW- technologia drukowania atramentowego (*ang. Direct Inc Writing*);

E- moduł Younga [GPa];

EBM - topienie wiązką elektronów (*ang. Electron Beam Melting*);

E.c. – *lac. Escherichia Coli*;

EDS- spektroskopia dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (*ang. Energy dispersive X-ray spectroscopy*);

ELI- stop Ti-6Al-4V z ograniczoną ilością domieszek (*ang. Extremely Low Impurities*);

EPD- osadzanie elektroforetyczne (*ang. Electrophoretic Deposition*);

EPS- pozakomórkowe substancje polimerowe (*ang. Extracellular Polymeric Substances*);

$F_n$ - siła mierzona w kierunku prostopadłym do powierzchni (normalnym) [N];

$F$ - siła trąca [N];

Fc- krytyczna siła trąca [N];

GP- glicerofosforan wapnia (*ang. Calcium Glycerophosphate*);

H- twardość [GPa];

HAp- hydroksyapatyt (*ang. Hydroxyapatite*);

hcp – struktura krystaliczna heksagonalna zwarta (*ang. Hexagonal Close Packed*)

HIP- prasowanie izostatyczne na gorąco (*ang. Hot Isostatic Pressing*);

HV- twardość Vickersa (*ang. Vickers Hardness*);

Lc – siła krytyczna [N];

Lc<sub>1</sub>- siła krytyczna powodująca deformację kohezyjną [N];

Lc<sub>2</sub>- siła krytyczna powodująca deformację adhezyjną [N];

Lc<sub>3</sub>- siła krytyczna powodująca całkowitą delaminację [N];

LENS- laserowe kształtowanie siatki (*ang. Laser Engineered Net Shaping*);

LPBF- laserowe spajanie w złożu proszku (*ang. Laser Powder Bed Fusion*);

MAO- utlenianie mikrołukowe (*ang. Micro-Arc Oxidation*);

MS- spiekanie mikrofalowe (*ang. Microwave Sintering*);

PBS- zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (*ang. Phosphate-buffered Saline*)

PEO- plazmowe utlenianie elektrolityczne (*ang. Plasma Electrochemical Oxidation*);

Ppb- liczba części na bilion (*ang. Parts per bilion*);

Ppm- liczba części na milion (*ang. Parts per milion*);

PM- metalurgia proszków (*ang. Powder metallurgy*);

PVD- fizyczne osadzanie z fazy gazowej (*ang. Plasma Vapor Deposition*);

Ra- parametr chropowatości liniowej [ $\mu\text{m}$ ];

ROS - reaktywne formy tlenu (*ang. Reactive Oxygen Scavengers*);

Sa- parametr chropowatości powierzchni [ $\mu\text{m}$ ];

S.a. – *lac. Staphylococcus aureus*;

SBF- sztuczny płyn ustrojowy (*ang. Simulated Body Fluid*);

SEM- skaningowa mikroskopia elektronowa (*ang. Scanning Electrone Microscope*);



SLM- selektywne topienie laserowe (*ang. Selective Laser Melting*);

SPS- spiekanie plazmowo-iskrowe (*ang. Spark Plasma Sintering*);

TBS- bulion tryptozowo-sojowy (*ang. Tryptic Soy Bulion*);

Ti  $\alpha$ - tytan o strukturze krystalicznej  $\alpha$ ;

Ti  $\beta$ - tytan o strukturze krystalicznej  $\beta$ ;

UV- promieniowanie ultrafioletowe (*ang. Ultraviolet*);

XRD- dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego (*ang. X-ray Diffraction*);



## WSTĘP

Postęp cywilizacyjny, zmiana trybu życia i rozkładu populacji w stronę geriatrycznej to tylko niektóre czynniki, które w ostatnim czasie doprowadziły do rozwoju przewlekłych schorzeń układu mięśniowo-szkieletowego, takich jak np. choroba zwyrodnieniowa stawów. W sytuacji, gdy leczenie doraźne (fizjoterapia, analgezja) staje się niewystarczające, interwencja chirurgiczna w postaci artroplastyki (wymiany stawu) stanowi efektywne rozwiązanie stosowane w celu złagodzenia bólu i przywrócenia funkcjonalności stawu, poprawiając tym samym jakość życia pacjenta.

Operacja implantacji, choć mocno inwazyjna, stała się pewnego rodzaju standardem medycznym, o dużej skuteczności. Jednak współczesny problem z implantacją związany jest przede wszystkim z operacjami rewizyjnymi, których konieczność pojawia się w momencie odrzucenia implantu zarówno we wczesnej, jak i późnej fazie użytkowania.

Przyczyny odrzucenia implantu w pierwszym okresie związane są przede wszystkim z zakażeniami bakteryjnymi wynikającymi z wprowadzenia bakterii do organizmu w trakcie trwania operacji, jak również wynikają z niedostatecznej integracji implantu z kością wynikającą z powolnego procesu osteointegracji prowadzącą do destabilizacji oraz odrzucenia implantu.

Z drugiej strony, poprawa średniej długości życia stworzyła obecnie konieczność zapewnienia znacznie dłuższej trwałości artroplastyki, a niedawna publikacja sugeruje, że tylko 58% pacjentów może oczekiwać, że żywotność implantu stawu biodrowego będzie wynosiła 25 lat [1]. Wymiana implantu wiąże się z dużym ryzykiem dla pacjenta i jest kluczowym wyzwaniem współczesnej implantologii. Jeśli mamy rozważyć jeszcze niższy poziom odniesienia dla wskaźnika rewizji, wymagana jest innowacja w zakresie biomateriałów.

Badania prowadzone wokół poprawy żywotności implantów opierają się głównie na projektowaniu materiałów metalicznych w celu zminimalizowania infekcyjnych i nieinfekcyjnych przyczyn odrzucania implantów. Poprawę skuteczności implantacyjnej można uzyskać na drodze doboru materiału, metody jego wytworzenia, aż w końcu inżynierii jego powierzchni. Materiały przeznaczone na implanty muszą być przede

wszystkim biokompatybilne, czyli nie wywoływać reakcji alergicznych i być dostosowane do funkcji, które mają pełnić w organizmie. W przypadku omawianych w niniejszej pracy implantów stawu biodrowego czy kolanowego, czyli układów podlegających ciągłym obciążeniom, implanty muszą dodatkowo zapewniać wytrzymałość mechaniczną przy jednoczesnym minimalizowaniu efektu ekranowania naprężeń, wynikającego z niedopasowania modułu sprężystości i twardości wprowadzanych materiałów w stosunku do wartości występujących w kościach.

Biorąc pod uwagę powyższe, stopy tytanu typu  $\beta$  zawierające pierwiastki takie jak V, Nb, Mo, Ta, np. Ti-13Zr-13Nb, stanowią interesującą grupę materiałów przeznaczonych na implanty ortopedyczne, gdyż oprócz wysokiej biokompatybilności, ich stosunek gęstości do ciężaru właściwego jest korzystniejszy w porównaniu do wcześniej stosowanych stali lub implantów wytwarzanych ze stopów tytanu typu  $\alpha$ .

Jednak bioobojętność materiałów metalicznych, czyli brak możliwości aktywnego uczestniczenia w walce z infekcjami, a także brak możliwości pobudzania komórek kostnych do aktywnego nabudowywania tkanki kostnej wokół implantu, wymusza wprowadzanie modyfikacji powierzchni, w tym m.in. projektowanie topografii i chemii powierzchni, czy wprowadzanie szeroko pojętej biofunkcjonalizacji, poprzez dodawanie czynników aktywnych promujących funkcje danego implantu.

Powierzchnie można modyfikować na drodze mechanicznej, fizycznej czy chemicznej. Do jednej z perspektywicznych metod modyfikacji materiałów metalicznych należy utlenianie mikrołukowe (MAO/PEO), które zalicza się do elektrochemicznych metod ingerencji w powierzchnię i polega na plazmowym utlenianiu powstającym na skutek intensywnej reakcji prądowych przeprowadzanych w elektrolicie zawierającym jony, o które planuje się wzbogacić daną powierzchnię. Warstwy składające się z wapnia i fosforu preferencyjnie wpływają na proces budowania kości wokół implantu, natomiast wybrane dodatki metaliczne takie jak np. srebro lub gal, mogą poprawić bioaktywność tworzonych warstw.

Dodatkowo, postęp technologiczny ukierunkowuje współczesną implantologię w stronę wytwarzania spersonalizowanych rozwiązań, które polegają na projektowaniu implantów na podstawie skanów ciała człowieka, a następnie odwzorowaniu zastępowanej tkanki w postaci wydruku. Takie podejście pomaga nadać implantom

oczekiwane cechy produktu już na wstępnym etapie produkcji, dostosować do indywidualnych potrzeb pacjenta i zminimalizować wady implantów powstałe na drodze konwencjonalnych procesów produkcyjnych. Addytywne techniki wytwarzania, w tym m.in. selektywne topienie laserowe (SLM), pozwalają na produkcję elementów 3D o skomplikowanych kształtach, zapewniając wysoką precyzję i jakość wykończenia. Drukowane implanty stanowią nadzieję dla rozwoju implantologii, ale i niosą za sobą wiele wyzwań. Charakterystyka, w tym m.in. mikrostruktura powstałych elementów, jest ściśle zależna od dobranej metody wytwarzania.

Chociaż problematyka minimalizowania efektu odrzucenia implantów poprzez modyfikacje powierzchni i nadawania właściwości bioaktywnych jest szeroko badana, większość badań koncentruje się wokół materiałów uzyskanych na drodze konwencjonalnych metod wytwarzania. Biofunkcjonalizacja powierzchni dotychczas znanymi i stosowanymi metodami może okazać się nie do odwzorowania i wymagać tworzenia nowych strategii, w tym dostrojenia parametrów przetwarzania dopasowanych do otrzymanych struktur.

W niniejszej pracy postawiono tezę, że modyfikacja powierzchniowa stopu tytanu za pomocą utleniania mikrołukowego o odpowiedniej kombinacji parametrów procesu i wytworzenie warstw zawierających wapń i fosfor z dodatkiem srebra lub galu, zwiększa biogodność oraz aktywność biologiczną implantu tytanowego, nie wpływając niekorzystnie na właściwości mechaniczne i adhezję warstw. Jak również postawiono tezę, że nierównowagowa mikrostruktura materiałów wytworzonych metodą SLM istotnie wpływa na proces wzrostu i właściwości warstw MAO wymagając opracowania dedykowanej strategii parametrów procesu modyfikacji w stosunku do materiałów wytwarzanych w konwencjonalny sposób.

Celem pracy było addytywne wytworzenie stopu tytanu przeznaczonego na implanty, z wykorzystaniem technologii selektywnego topienia laserowego (SLM), a następnie jego biofunkcjonalizacja za pomocą utleniania mikrołukowego (MAO), w celu oceny wpływu zastosowanych parametrów na potencjał implantacyjny. Cele szczegółowe obejmowały ocenę wpływu parametrów procesu MAO na charakterystykę otrzymanych warstw, ocenę wpływu czynników bioaktywnych na odpowiedź komórkową i właściwości antybakteryjne otrzymanych warstw, a także ocenę wpływu metody wytwarzania materiału bazowego na zastosowaną modyfikację.

Celem użytkowym pracy była poprawa skuteczności implantacyjnej biomateriałów wytwarzanych metodą druku 3D poprzez minimalizację przyczyn odrzucania implantów na drodze zmniejszenia prawdopodobieństwa wystąpienia wczesnych odczynów zapalnych, poprawy odpowiedzi komórkowej i przyczepności warstwy do podłoża.

Praca badawcza podzielona została na 3 główne etapy. W pierwszym etapie na próbkach wytworzonych metodą SLM przeprowadzono utlenianie mikrołukowe przy zmiennych parametrach procesu: napięcia, natężenia i czasu w elektrolicie zawierającym jony wapnia i fosforu. Na podstawie badań określono wpływ poszczególnych paramentów na topografię powierzchni, skład fizyczny i chemiczny, kąt zwilżania, bioaktywność, a także właściwości nanomechaniczne wytworzonych warstw. Drugi etap badań polegał na biofunkcjonalizacji powierzchni poprzez włączenie do warstw jonów srebra lub galu w jednakowych stężeniach i porównania ich wpływu na właściwości. Oprócz charakterystyki topograficznej, chemicznej, fizycznej i nanomechanicznej, zbadano również wpływ dodatków bioaktywnych na odpowiedź komórkową i efektywność antybakteryjną. Ostatni etap badań obejmował ocenę wpływu metody wytwarzania materiału referencyjnego na charakterystykę powstałych warstw. W tym celu wytworzone warstwy MAO porównano na materiałach dostarczonych komercyjnie i otrzymanych metodą SLM.

Uzyskane wyniki wykazały, że dobór odpowiednich parametrów procesu MAO, w tym napięcia, natężenia, czasu oraz składu elektrolitu pozwoliły z powodzeniem wytworzyć warstwy MAO, które istotnie poprawiły właściwości stopu Ti-13Zr-13Nb w odniesieniu do zastosowania implantacyjnego, a charakterystyka warstw MAO istotnie zależała od metody wytwarzania materiału bazowego.

Połączenie addytywnego wytwarzania implantów i odpowiedniej modyfikacji powierzchni może stanowić perspektywiczną strategię poprawiającą potencjał implantacyjny, ale dalsze badania pozwalające zrozumieć wpływ bioaktywnych dodatków i zależności wpływu metody wytwarzania materiału na charakterystykę powstałych warstw są niezbędne.

## **CZEŚĆ TEORETYCZNA**

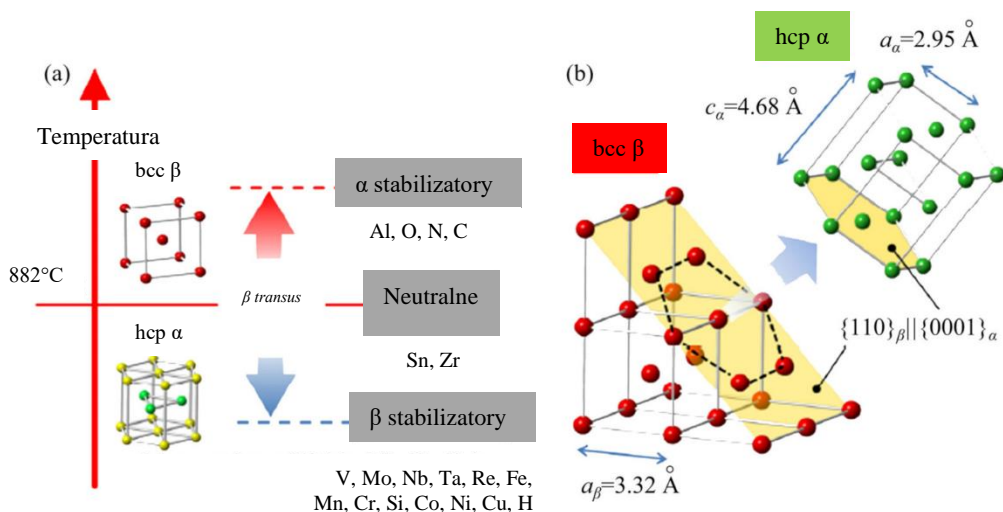




# 1. Tytan i jego stopy wykorzystywane w implantologii

Podczas opracowywania implantów ortopedycznych w ciągu ostatniego stulecia szeroko badano trzy rodzaje metali: stal nierdzewną, stop kobaltu z chromem (CoCr) i tytan (Ti) [1]. z uwagi na niedostosowane właściwości mechaniczne, problemy korozyjne oraz odczyny alergiczne, stal nierdzewna i stop CoCr skutecznie zostały wyparte przez tytan i jego stopy jako materiały bardziej przystosowane do zastosowań w implantologii [2]. Tytan i jego stopy okazały się doskonałymi kandydatami do zastosowania jako biomateriały ortopedyczne. Swoją popularność zawdzięczają m.in. wysokiej biogodności, dobremu stosunkowi wytrzymałości do gęstości (wysokiej wytrzymałości właściwej) i wysokiej odporności na korozję (dzięki samorzutnemu tworzeniu ochronnej warstwy tlenkowej) [3]. Najczęstszym zastosowaniem klinicznym tytanu i jego stopów są protezy stawu biodrowego, gdzie tytan używany jest jako trzpień kości udowej, lub protezy stawu kolanowego, w których tytan zastępuje autogeny komponent stawu piszczelowego [1]. Czysty tytan może posiadać dwie odmiany alotropowe. W niższych temperaturach tytan występuje w fazie  $\alpha$ , która ma strukturę krystaliczną heksagonalną zwartą (hcp), jednak w temperaturze 882 °C ulega ona przemianie w fazę  $\beta$  o strukturze regularnej przestrzennie centrowanej (bcc) [1].

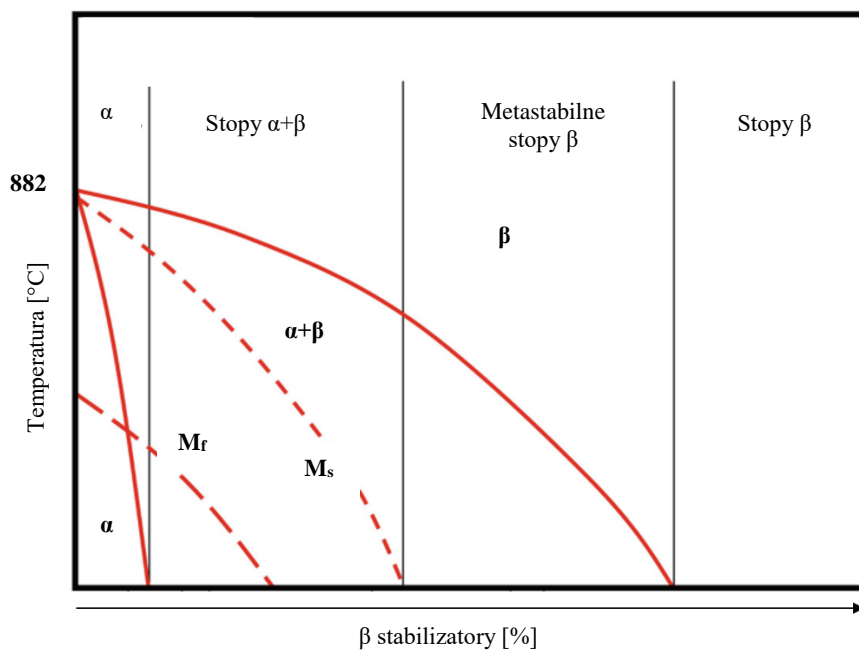
Schemat przemiany fazowej  $\alpha \rightarrow \beta$  przedstawiono na rysunku 1.



Rysunek 1 Schemat przemiany fazowej  $\alpha \rightarrow \beta$  stopów stopów na osnowie Ti, na bazie pierwiastków stopowych (a) i odpowiadających im struktur krystalograficznych hcp- $\alpha$  i bcc- $\beta$  (b) (Parametry sieci odpowiadają wartościom czystego tytanu w temperaturze pokojowej i 900°C), na podstawie [2]

Modyfikując skład pierwiastkowy stopów tytanu można zmienić temperaturę przemiany fazowej. Pierwiastki stabilizujące fazę  $\alpha$  (Al, N, O) podwyższają temperaturę przemiany fazowej, natomiast stabilizatory fazy  $\beta$  (V, Nb, Cr, Fe) obniżają tę temperaturę. Neutralne stabilizatory (Sn, Zr) mają znikomy wpływ na temperaturę, w której zachodzi przemiana alotropowa [4].

Na podstawie zastosowanych stabilizatorów, stopy tytanu można podzielić na 4 podstawowe grupy: stopy  $\alpha$ , stopy  $\alpha+\beta$ , metastabilne stopy  $\beta$  oraz stopy  $\beta$  (Rys.2) [2], [5].



Rysunek 2 Klasyfikacja stopów tytanu, na podstawie [5]

W Tabeli 1 przedstawiono klasyfikację stopów tytanu uwzględniającą przemiany fazowe.

Tabela 1 Klasyfikacja stopów tytanu uwzględniająca przemiany fazowe

| Fazy                             | $\alpha$  | $\alpha+\beta$  | Metastabilne $\beta$  | Faza $\beta$   |
|----------------------------------|---|---|---|--|
| <b>Pierwiastki stabilizujące</b> | Pierwiastki stabilizujące:<br>Al, O, N, C, B<br>+   | 4-6% mas.<br>stabilizatorów $\beta$   | 10-15% mas.<br>stabilizatorów fazy $\beta$  | Pierwiastki stabilizujące:<br>Mo, V, Nb, Ta,<br>Fe, Cr, Ni, Cu,<br>W, Co |
|                                  | Neutralne: Zr, Sn   |   |   | ~30 % mas.<br>stabilizatorów fazy $\beta$                                |
| <b>Charakterystyka</b>           | -nie nadaje się do obróbki cieplnej (ze względu na stabilną strukturę hcp),<br>-dobra spawalność,<br>-dobra odporność na pęczanie,<br>-doskonała odporność na korozję,<br>-wytrzymałość mechaniczna jest zwykle ograniczona i stosunkowo niska w temperaturze pokojowej | -możliwość obróbki cieplnej,<br>-wysoka wytrzymałość w temperaturze pokojowej (umiarkowana w wysokiej),<br>-wyższa granica plastyczności niż $\alpha$ -Ti,<br>-bardzo dobra odporność na korozję,<br>-samopopasywacja poprawiająca osteointegrację,<br>-niedopasowanie modułu sprężystości do kości | -możliwość obróbki cieplnej,<br>-wyższa hartowność,<br>-wysoka biokompatybilność,<br>-niższy moduł sprężystości |  |
| <b>Przykłady stopów</b>          | cP-Ti   | Ti-6Al-4V<br>Ti-6Al-7Nb<br>Ti-5Al-2,5Fe   | Ti-(10-80) Nb<br>Ti-13Nb-13Zr<br>Ti-23Nb-0.7Ta-2Zr<br>Ti-15Mo<br>Ti-15Mo  |  |

Większość stopów tytanu stosowanych w dziedzinie biomateriałów to stopy  $\alpha+\beta$  lub metastabilne  $\beta$ , ponieważ zwykle spełniają one dużą liczbę właściwości materiałów pożądaných na implanty [1].

Jednym z najpowszechniej stosowanych stopów  $\alpha+\beta$  przez lata wykorzystywanych w implantologii m.in. do zespołen kostnych lub na implanty ortopedyczne, był stop Ti-6Al-4V ELI (*ang. extremely low impurities ELI*), który w porównaniu z używanymi wcześniej stalami, wykazywał się m.in. wysoką bioobojętnością i obniżonym modułem Younga (120 GPa), w porównaniu do stali nierdzewnej (200 GPa), czy stopu CoCr (240 GPa) [6].

Wcześniejsze badania wykazały możliwą toksyczność składników stopu Ti64 ELI przez wieloletnie odkładanie się w organizmie aluminium i wanadu, co może doprowadzić do rozwoju nowotworów i/lub chorób neurodegeneracyjnych (choroby Alzheimera i demencji) [7]. Dodatkowo, wciąż trwały poszukiwania materiałów, które oprócz braku toksyczności będą charakteryzowały się obniżonym modułem Younga, zbliżonym do wartości występujących w tkance kostnej [8].

Na tej podstawie wzrosło zainteresowanie opracowywaniem stopów składających się z fazy  $\beta$ , do których należą m.in. Ti-15Mo, Ti-Nb-Ta, Ti-24Nb-4Zr-8Sn, Ti-35Nb-2Ta-3Zr, Ti-35Nb-5Ta-7Zr, Ti-30Nb-4Sn, Ti-35Nb, Ti-15Nb-3Mo-3Zr-2Sn [9]. Według literatury, stopy Ti- $\beta$  wykazują lepsze właściwości mechaniczne ze względu na moduły sprężystości bliższe wartościom dla kości ludzkiej w porównaniu ze stopami Ti- $\alpha$  i stopami Ti- $\alpha + \beta$ , a także lepszą biogodność ze względu na nietoksyczny charakter stabilizatorów fazy  $\beta$  [8]. Na przykład, moduł sprężystości ludzkiej kości korowej wynosi około 30 GPa, natomiast moduł Younga stopów Ti-6Al-7Nb i Ti-6Al-4V wynosi odpowiednio 110 GPa i 112 GPa, a stopu Ti-24Nb-4Zr-8Sn poniżej 50 GPa [6].

W tabeli 2 przedstawione zostały przykładowe stopy tytanu, wraz z metodami wytworzenia i charakterystyką fazową, a także wartościami modułu Younga i właściwościami biologicznymi.

Tabela 2 Wybrane stopy tytanu wraz z różnymi metodami wytworzenia, charakterystyką fazową, właściwościami biologicznymi i modulem Younga

| Material                            | Faza                              | Metoda wytwarzania                                  | Moduł Younga (GPa) | Właściwości biologiczne                                  | Literatura |
|-------------------------------------|-----------------------------------|---|--------------------|--|------------|
| <b>Cp-Ti</b>                        | $\alpha$                          | Addytywne (SLM)                                     | 105-115            | -  | [10]       |
| <b>Ti-6Al-4V</b>                    | $\alpha'$                         | Addytywne (SLM)                                     | -                  | -  | [11]       |
| <b>Ti-50Ta</b>                      | $\alpha''$                        | Odlewanie+wyżarzanie+kucie na gorąco+starzenie      | 77-78              | -  | [12]       |
| <b>iTi-50Ta</b>                     | $\beta$                           | Addytywne (SLM)                                     | -                  | -  | [13]       |
| <b>Ti-xNb (x=5-20)</b>              | $\alpha$<br>$+\beta$<br>$+\omega$ | Odlewanie+starzenie                                 | 114-149            | Brak cytotoksyczności, Ti-10Nb: najwyższy wzrost komórek | [14]       |
| <b>Ti-20Nb</b>                      | $\alpha''$                        | Odlewanie+wyżarzanie+starzenie+kucie na gorąco      | 110                | Dobra biokompatybilność                                  | [15]       |
| <b>Ti-33Nb</b>                      | $\beta$                           | Metalurgia proszków                                 | 107                | Wysoka biokompatybilność                                 | [16]       |
| <b>Ti-xMo (x=15-18)</b>             | $\beta+$<br>$\omega$              | Odlewanie+walcowanie na gorąco+ walcowanie na zimno | 73-84              | -  | [17]       |
| <b>Ti-xCr (x=10-14)</b>             | $\beta$                           | Odlewanie+walcowanie na gorąco +walcowanie na zimno | 68-82              | -  | [18]       |
| <b>Ti-Fe-11Nb</b>                   | $\beta$                           | Odlewanie   | 129                | -  | [19]       |
| <b>Ti-Nb-Zr-Mo</b>                  | $\beta$                           | Odlewanie   | 68-73              | -  | [20]       |
| <b>Ti-6Al-2Zr-1Mo-1V</b>            | $\alpha'$                         | Addytywne (SLM)                                     | -                  | -  | [21]       |
| <b>Ti-35Nb-4Sn-6Mo-xZr (x=0-15)</b> | $\beta$                           | Odlewanie+kucie na gorąco                           | 68-92              | -  | [22]       |
| <b>Ti-6Al-4V-5Cu</b>                | $\alpha$<br>$+\beta$              | Addytywne (SLM)                                     | 110                | Poprawa antybakteryjności                                | [23]       |
| <b>Ti-13Nb-13Zr</b>                 | Met<br>$\beta$                    | Metalurgia proszków                                 | 70                 | -  | [24]       |

Przy wyborze pierwiastków stabilizujących fazę  $\beta$  należy wziąć pod uwagę, że pierwiastki takie jak Mo, Zr, Ta i Nb są znacznie droższe i mają większą gęstość niż Ti i wyższą temperaturę topnienia, co prowadzi do pogorszenia właściwości stopu. Aby obniżyć koszt stopu Ti- $\beta$ , wprowadza się mniejsze ilości pierwiastków stabilizujących fazę  $\beta$  lub stosuje się tańsze dodatki stopowe, jak Fe, Mn, Sn i Cr [1].

Jednym z interesujących przykładów stopu Ti- $\beta$ , który w ostatnich latach zyskał na popularności wśród materiałów implantacyjnych, jest stop tytanu z dodatkiem cyrkonu i niobu. Jego przykładem jest stop Ti-13Zr-13Nb, który charakteryzuje się doskonałą biogodnością, wysoką odpornością na korozję, dużą wytrzymałością właściwą, dobrą odpornością na zmęczenie, niższym modułem Younga w porównaniu z większością stopów [25], [26] i co ważne, jest to stop certyfikowany do zastosowań chirurgicznych zgodnie z ASTM F1713 [27].

Mimo postępu w projektowaniu stopów tytanu coraz bardziej przyjaznych tkankom kostnym, wykazujących się wysoką biokompatybilnością i poprawą właściwości mechanicznych, należy pamiętać, że wprowadzanie do organizmu ciała obcego może spowodować odpowiedź organizmu prowadzącą do odrzucenia implantu.

## **2. Główne przyczyny odrzucenia implantów**

### **2.1. Powikłania infekcyjne**

Artroplastyka, polegająca na zastąpieniu fragmentu lub całości stawu z układu szkieletowego, należy do procedur wysoko inwazyjnych i jest związana z ryzykiem zarówno powikłań infekcyjnych, jak i niezakaźnych, które mogą skutkować niepowodzeniem zabiegu implantacji [28].

Infekcje poimplantacyjne należą do najczęstszych i najbardziej skomplikowanych problemów, z którymi boryka się chirurgia ortopedyczna [29]. Ryzyko infekcji szacuje się w granicach 2-5% wszystkich implantacji [30]. Zakażenie okołoprotezowe odnosi się do zakażenia tkanki przylegającej do wszczepionego wyrobu medycznego. Powikłania wszczepienia implantów są wysoko problematyczne zarówno w diagnostyce, jak i leczeniu, niejednokrotnie prowadząc do konieczności reoperacji i usunięcia implantu. Wtórne operacje rewizyjne są kosztowne, mają stosunkowo niski wskaźnik powodzenia i są bolesne dla pacjentów [28].

Zakażenie stawu protetycznego jest wynikiem tworzenia się biofilmu bakteryjnego na powierzchni implantu. Rozpoznanie infekcji bakteryjnej często opiera się na objawach klinicznych odczuwanych przez pacjenta oraz niespecyficznych markerach wskazujących na przebieg infekcji, jak np. podwyższona liczba leukocytów. Przypuszcza się, że pojawienie się bakterii wokół implantu spowodowane jest m.in. przeniesieniem mikroorganizmów, głównie szczepu *S. aureus* ze skóry pacjenta w trakcie trwania operacji i zasiedlenie ich w organizmie. Kolonizacja powierzchni implantu prowadzi do powstania biofilmu [31].

Adhezja bakterii do powierzchni zaczyna się od fazy odwracalnej, w której pośredniczą oddziaływania fizykochemiczne, chemiczne i fizyczne, które umożliwiają mikroorganizmom przyleganie do powierzchni biomateriału. Druga faza, wtórnej nieodwracalnej adhezji, związana jest z tworzeniem przez przylegające bakterie macierzy międzykomórkowej (extracellular polymeric substances EPS), która chroni mikroorganizmy przed komórkami gospodarza i antybiotykami. W miarę dalszego rozwoju biofilmu mikroorganizmy zmieniają swój fenotyp, co powoduje, że bakterie dostosowują się do bardziej heterogenicznej natury, przyczyniając się do odporności biofilmów na środki przeciwbakteryjne. Niektóre bakterie są w stanie wrócić do planktonicznej formy, opuścić biofilm i przenieść się w celu skolonizowania nowego podłoża [30], [32]. W badaniu prowadzonym *in vivo* na zwierzętach, biofilm bakteryjny na powierzchni implantu rozprzestrzenił się na otaczającą kość w ciągu sześciu dni [33].

Badania wskazują, że bakterie w biofilmie są do 5000 razy bardziej odporne na terapię przeciwbakteryjną niż ich odpowiedniki planktonowe [34]. Biorąc pod uwagę, że macierz międzykomórkowa pomaga przetrwać bakteriom i sprzyja ich rozwojowi, warto zaplanować strategię walki z bakteriami na początkowym etapie adhezji (4-6 h) [35], czyli wstrzymaniu lub zakłóceniu powstawania środowiska sprzyjającego ich przyłączeniu, a w dalszej kolejności tworzeniu biofilmu.

Niektóre z najczęstszych gatunków bakterii obecnych w biofilmach na implantach to *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus viridians*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Escherichia faecalis*, *Proteus mirabilis* i *Pseudomonas aeruginosa* [29]. Pośród nich, jak się szacuje, *S. aureus* jest jedną z głównych przyczyną zakażeń, stanowiąc ok. 31-52% infekcji protez ortopedycznych [32].



Obecnie, standardowym sposobem wyeliminowania infekcji w momencie, gdy antybiotykoterapia zawodzi, jest usunięcie implantu, oczyszczenie i ponowne jego wszczepienie, co wiąże się z licznymi konsekwencjami zdrowotnymi [28].

Sposób projektowania materiałów, skuteczność leczenia/zapobiegania infekcjom bakteryjnym *in situ* i nadawanie implantom właściwości antybakteryjnych, w szczególności w dobie stale rosnącej antybiotykoodporności, stały się kierunkiem wspólnych wysiłków klinicystów i badaczy.

## **2.2. Powikłania nieinfekcyjne**

Do powikłań niezwiązanych z infekcjami okołowszczepowymi należy obluzowanie aseptyczne, które rozumiane jest jako rozległa resorpcja kości (osteoliza) powodująca obluzowanie implantu i utratę integracji. Osteoliza może mieć formę ogniskową, czyli utraty masy w formie lokalnej lub przebiegać wokół całego implantu [36].

Istnieje kilka możliwych przyczyn powstawania aseptycznego obluzowania kostnego. Jedną z teorii, zaproponowaną przez dr Williama Harrisa [37] jest „choroba cząsteczkowa”, która polega na odkładaniu się cząsteczek powstałych na skutek zużycia i/lub korozji protezy indukujących odpowiedź immunologiczną pacjenta i prowadzących do procesów osteoresorpcji w następstwie do stanów zapalnych i w konsekwencji uszkodzeń kości.

Kolejną możliwą przyczyną pojawienia się obluzowania aseptycznego są mikroruchy między implantem a kością, powstałe na skutek normalnej fizycznej aktywności pacjenta. Taka niestabilność zaburza proces gojenia i osteointegracji [29].

Ekranowanie naprężeń mechanicznych jest kolejnym procesem przyczyniającym się do obluzowania implantów. Wynika ono przede wszystkim z nowych warunków obciążenia nałożonych na kość przez obecność implantu. Niezgodność między właściwościami mechanicznymi kości i biomateriału może powodować nierównomierny rozkład naprężeń, prowadzący do resorpcji kości w obszarach nieobciążonych, która jest wynikiem procesów przebudowy kości, zamiast osteolizy [38].



Ponieważ właściwości mechaniczne kości zależą od wielu czynników, np. wieku, stylu życia, genetyki, stanu zdrowia, właściwe dopasowanie stanowi duże wyzwanie dla inżynierii tkankowej [39].

W tabeli 3 przedstawiono podstawowe właściwości mechaniczne kości gąbczastej i korowej.

Tabela 3 Właściwości mechaniczne kości gąbczastej i korowej

| Właściwości mechaniczne kości |           |         |            |
|-------------------------------|-----------|---------|------------|
|                               | Gąbczasta | Korowa  | Literatura |
| Moduł Younga [GPa]            | 0,1-2,94  | 10-34,3 |            |
| Twardość [GPa]                | 0,02-0,5  | 3,30    | [40]       |

W celu zminimalizowania prawdopodobieństwa odrzucenia implantu, istotne jest odpowiednie zaprojektowanie materiału, z którego będzie wykonany.

### 3. Wymagania stawiane implantom

#### 3.1. Biokompatybilność i bioaktywność

Prawdopodobnie najważniejszą cechą biomateriału jest potrzeba biokompatybilności (biozgodności) *in vivo*. Biozgodność jest ogólnie definiowana jako zdolność obcego materiału do przyjęcia w środowisko ludzkiego ciała obcego nie powodując żadnych działań niepożądanych, takie jak stany zapalne lub reakcje alergiczne.

Uważa się, że tytan i jego stopy mają doskonałą biokompatybilność wśród metali nadających się do implantacji [2]. Pomimo tego, implanty na bazie stopów Ti napotykają prawdziwe problemy kliniczne związane z bioinertnością (bioobojętnością) metali, która nie wspiera chemicznego połączenia z kością w celu aktywnego indukowania jej wzrostu, procesu określanego jako osteointegracja, powodując brak lub powolną odpowiedź biologiczną w kontakcie z powierzchnią materiałów. W celu poprawy odpowiedzi organizmu na wprowadzony tytan należy zadbać o jego bioaktywność [41].

Bioaktywność jest ważną właściwością, która odnosi się do zdolności materiału do indukowania specyficznych aktywności biologicznych i pobudzania reakcji między

kością a materiałem implantu [2]. Dodatkowo, powłoki bioaktywne powinny charakteryzować się poprawą szybkości gojenia się ran i minimalizować powikłania pooperacyjne.

Zagadnienia te stawiają przed naukowcami ogromne wyzwanie, tym bardziej, że cele są szczególnie trudne do pogodzenia, gdyż zarówno bakterie, jak i komórki preferują zbliżoną charakterystykę powierzchni i prowadzą pewnego rodzaju „wyścig o powierzchnię”, w którym natywne komórki gospodarza (fibroblasty, płytki krwi, makrofagi) konkurują z bakteriami o początkowe przyleganie do wszczepionego implantu [42].

Stopień biokompatybilności i bioaktywności materiałów związany jest z wieloma czynnikami, które zostały omówione poniżej.

### **3.2.Skład chemiczny**

Skład chemiczny ma ogromne znaczenie w biomateriałach ortopedycznych i należy go rozważać wielopoziomowo. Po pierwsze, zastosowany biomateriał nie powinien zawierać związków o potencjale cytotoksycznym [2]. Niektóre składniki stopowe, takie jak np. aluminium lub wanad mogą wywoływać choroby nowotworowe lub neurodegradacyjne, chrom ma potencjalne działanie genotoksyczne i cytotoksyczne, a nikiel może prowadzić do powstania alergii. W ostatnich latach preferowane jest włączanie pierwiastków stabilizujących fazę  $\beta$  do składu stopów, gdyż charakteryzują się one brakiem toksyczności [28].

Z drugiej strony, skład chemiczny powinien być tak dobrany, by pobudzać tkankę kostną do narastania. Badania wskazują, że powłoki zawierające dodatki wapnia i fosforu mogą pozytywnie wpływać na osteointegrację ze względu na skład odpowiadający kości [43].

Wskazane jest, aby projektowanie składu chemicznego obejmowało również strategię włączającą stosowanie środków antybakteryjnych w celu wyeliminowania odrzucenia implantu na drodze infekcyjnej [44].

### 3.3. Topografia

Topografia biomateriału uznawana jest za czynnik krytyczny dla adhezji bakteryjnej i komórkowej [45].

Wiele wcześniejszych badań sugeruje, że w porównaniu z gładką powierzchnią, właściwa chropowatość w mikroskali służy wzmocnieniu różnicowania osteoblastów i zwiększeniu szybkości kontaktu kości z implantem *in vivo* [46]. Niektórzy autorzy sugerują działanie synergiczne nano i mikrochropowatości [47]. Uważa się, że chropowatość w nanoskali odzwierciedla wewnętrzną chropowatość powierzchni kości, pomagając promować osteointegrację przy jednoczesnym ograniczaniu adhezji bakterii [48]. Z drugiej strony, wzrost chropowatości powoduje zwiększenie powierzchni właściwej, do której bakterie/komórki mogą adherować i zapewnia większą ochronę przed otoczeniem, w szczególności siłami ścinającymi [49].

Niektórzy autorzy zgłaszali poprawę właściwości biologicznych przy chropowatości mieszczącej się w granicach  $Ra = 0,39-1,6 \mu m$  [50].

### 3.4. Zwilżalność

Zwilżalność opisuje oddziaływanie kropli cieczy z powierzchnią, zwykle mierzona za pomocą tensjometru.

Uznaje się, że powierzchnia jest zwilżalna (hydrofilowa), gdy kąt zwilżania (contact angle CA) wynosi  $<90^\circ$ , natomiast gdy kąt wynosi  $>90^\circ$ , powierzchnia jest niezwilżalna (hydrofobowa) [28]. Badania wskazują, że zwilżalność powierzchni wpływa na adhezję mikroorganizmów do powierzchni [2]. Wykazano, że zarówno komórki, jak i bakterie preferują powierzchnie hydrofilowe ( $40-70^\circ$  CA) [51]. Powierzchnia hydrofilowa, a nawet superhydrofilowa może promować osteointegrację we wczesnym stadium [52]. Z drugiej strony, obserwowano również, że w związku z hydrofobowym charakterem większości bakterii (w tym *S. aureus*), preferowanym wyborem tych bakterii będzie przyleganie do hydrofobowych powierzchni [53]. Nie ma obecnie jednoznacznej zgody odnośnie do najbardziej preferowanej wartości zwilżalności powierzchni.

### 3.5. Właściwości mechaniczne

Kluczowym parametrem wpływającym na właściwości mechaniczne implantów jest moduł sprężystości materiału, który charakteryzuje odporność materiału na odkształcenia pod wpływem naprężeń. Dostosowanie tych właściwości jest ściśle związane z prawem Wolffa, które opisuje odpowiedź kości na zadane obciążenia wskazując, że jeśli zastosowany biomateriał będzie miał znacznie wyższy moduł sprężystości niż otaczająca go kość, znacznie on przyjmować na siebie większość obciążeń mechanicznych. Odciążenie kości prowadzi do wzrostu aktywności osteoklastów i zaniku kości, aż w końcu aseptycznego obluzowania implantu (zjawisko ekranowania naprężeń) [54].

Znajomość wymagań stawianym materiałom na implanty pozwala częściowo wprowadzić pożądane właściwości już na etapie wytwarzania materiałów.

## 4. Metody wytwarzania materiałów na implanty

### 4.1. Konwencjonalne metody wytwarzania implantów i ich obróbka

#### 4.1.1. Metalurgia proszków

Tytan i jego stopy mogą być wytwarzane w sposób konwencjonalny (metalurgia proszków, odlewanie) [55] lub przy pomocy technik bardziej zaawansowanych takich jak addytywne otrzymywanie np. poprzez selektywnie spiekanie proszków [56].

Metalurgia proszków (*Powder metallurgy*, PM) wykorzystuje jako surowce (prekursory) proszki czystych metali, mieszanek lub stopów oraz wytwarza części metalowe poprzez formowanie i/lub spiekanie [57].

Prekursor przechodzi przez proces mieszania lub mechanicznego stapiania w celu wywołania stopowania między proszkami metali. Kolejno, konsolidację stopowych proszków metali uzyskuje się poprzez prasowanie pod optymalnym ciśnieniem, a następnie spiekanie. Ta seria etapów umożliwia zbliżenie gęstości produktu do 100% wartości względem materiału litego przy jednoczesnym zwiększeniu siły wiązania między cząstkami. Podczas spiekania, pory między cząstkami proszku stopniowo kurczą się. Zmniejszone pory i niższa energia międzyfazowa między granicami ziaren zawsze korzystnie wpływają na zagęszczenie i zapewniają precyzyjną kontrolę wielkości ziarna, gęstości spieku i rozkładu faz w stopie [55].

Wyróżnia się spiekanie wspomagane ciśnieniem (spiekanie plazmowo-iskrowe; *Spark Plasma Sintering, SPS*) i spiekanie bezciśnieniowe (spiekanie mikrofalowe; *Microwave Sintering, MS*). W porównaniu do tradycyjnej metody prasowania i spiekania, spiekanie plazmowo-iskrowe jest dużo szybsze i może trwać kilka minut zamiast kilku godzin, odbywa się w niższych temperaturach. Dodatkowo otrzymane stopy charakteryzują się drobnym ziarnem. Metoda ta opiera się na wykorzystaniu prądu stałego, który w sposób pulsacyjny, w połączeniu z wysoką temperaturą, wspiera zagęszczanie proszków [2]. Mendens i wsp. badali wytwarzanie stopu Ti-27Nb-13Zr przy użyciu iskrowego spiekania plazmowego i stwierdzili, że mikrostruktura otrzymanego stopu była strukturą dupleksową z ziarnami fazy  $\alpha$  otaczającymi ziarna fazy  $\beta$ , która tworzyła osnowę [58].

Bezcisnieniowe spiekanie, takie jak metoda mikrofalowa, także polega na spiekaniu proszków prekursorowych, ale proces ten odbywa się zwykle w próżni lub przy ciśnieniu atmosferycznym. W porównaniu do SPS uzyskuje się elementy o większej porowatości, które mogą pomagać w zmniejszeniu modułu Younga oraz poprawić osteointegrację [59].

#### **4.1.2. Odlewanie**

Kolejną konwencjonalną metodą wytwarzania implantów jest odlewanie, który to proces składa się z dwóch etapów. Na początku przygotowuje się ciekły tytan lub stop tytanu w indukcyjnym piecu próżniowym w chłodzonych wodą tyglach miedzianych lub w łukowym piecu próżniowym z zimnym tygłem. Dobór odpowiedniego tygla musi zapobiegać wchodzeniu w reakcję z tytanem. Następnie otrzymany ciekły metal przelewa się do formy odlewniczej umieszczonej na obrotowym stole.

Jedną z odmian metody odlewania wykorzystywaną na implanty jest odlewanie precyzyjne, które umożliwia wytwarzanie elementów medycznych o bardziej złożonych kształtach. Formy o ustalonym kształcie wytwarza się ze skrawanego grafitu, grafitu ze spoiwem organicznym, jest również możliwe odlewanie do form metalowych.

Ze względu na wysoką reaktywność chemiczną tytanu w wysokich temperaturach proces odlewania musi zachodzić w atmosferze ochronnej lub próżni. Kolejnym wyzwaniem metody odlewania są ewentualne reakcje, które zachodzą między tytanem a formą, mogące prowadzić do wzrostu niejednorodności mikrostruktury oraz mikrosegregacji podczas procesu krzepnięcia. Istnieje możliwość powstawania wadliwej

warstwy, która po procesie odlewania musi zostać usunięta. Kolejną wadą produkcyjną jest powstawanie porowatości gazowej związanej z dużą rozpuszczalnością tlenu i wodoru w ciekłym tytanie. Wysoka temperatura topnienia tytanu w porównaniu z pozostałymi dodatkami stopowymi może doprowadzić do powstawania reakcji egzotermicznych, negatywnie wpływając na strukturę i właściwości otrzymanego materiału.

W związku z powyższym wszystkie odlewy stopów tytanu muszą podlegać dalszej obróbce cieplnej: wyżarzaniu odprężającemu i chłodzeniu z piecem oraz procesowi gorącego dogęszczania (prasowania) izostatycznego (*Hot Isostatic Pressing, HIP*) w celu usunięcia porowatości.

Zaletą odlewania jest stosunkowo niski koszt wytwarzania związany z minimalizacją ilości zbędnego materiału po procesie.

#### **4.1.3. Obróbka cieplna i plastyczna stopów tytanu**

W celu wyeliminowania wad powstałych w procesie wytwarzania materiałów i nadania stopom odpowiedniej mikrostruktury stosuje się obróbkę cieplną połączoną niejednokrotnie z obróbką plastyczną. Proces obróbki cieplnej opiera się na odpowiednim nagrzewaniu i chłodzeniu materiału.

Stopy tytanu  $\alpha+\beta$  lub  $\beta$  poddaje się obróbce cieplnej polegającej na przesycaaniu i starzeniu, ewentualnie wyżarzaniu rekrytalizującym i odprężającym. Przesycanie i starzenie polegają na nagrzaniu stopu tytanu do temperatury występowania fazy  $\alpha+\beta$  lub  $\beta$ , ujednorodnieniu, a następnie starzeniu w temperaturze 480-650°C w celu umocnienia stopu poprzez częściowe zmiany w fazie  $\beta$ . Wyżarzanie rekrytalizujące i odprężające przeprowadza się w temperaturze 700-800°C, stosuje się je najczęściej po zgnioście [60].

Proces odkształcania plastycznego prowadzi się w temperaturze 882°C, w której zachodzi przemiana  $\alpha+\beta \rightarrow \beta$ . Dla stopów  $\alpha+\beta$  odkształcenie zachodzi przez poślizg i bliźniakowanie. W stopach jednofazowych  $\beta$  pojawia się dodatkowo martenzyt  $\alpha'$  lub  $\alpha''$  lub faza  $\omega$ .

Obróbka na gorąco prowadzona w temperaturze stabilności fazy  $\beta$  prowadzi do większego rozdrobnienia ziaren i powstawania ziaren pierwotnej fazy  $\beta$ , a następnie płytek fazy  $\alpha$  wewnątrz fazy  $\beta$ . Obróbka prowadzona w temperaturze przemiany  $\alpha+\beta \rightarrow \beta$  prowadzi do jednoczesnego formowania ziaren pierwotnych fazy  $\beta$  i płytek fazy  $\alpha$ .

Podstawowe procesy obróbki plastycznej stopów tytanu obejmują kucie (otrzymany materiał ma wielokrotnie większą wytrzymałość na rozciąganie, odporność na kruche pękanie oraz wyższą wytrzymałość zmęczeniową) i walcowanie (na zimno lub na gorąco), natomiast wtórne kształtowanie plastyczne obejmuje wyciskanie lub ciągnięcie (pręty), wyoblanie, tłoczenie głębokie i kształtowanie nadplastyczne [60].

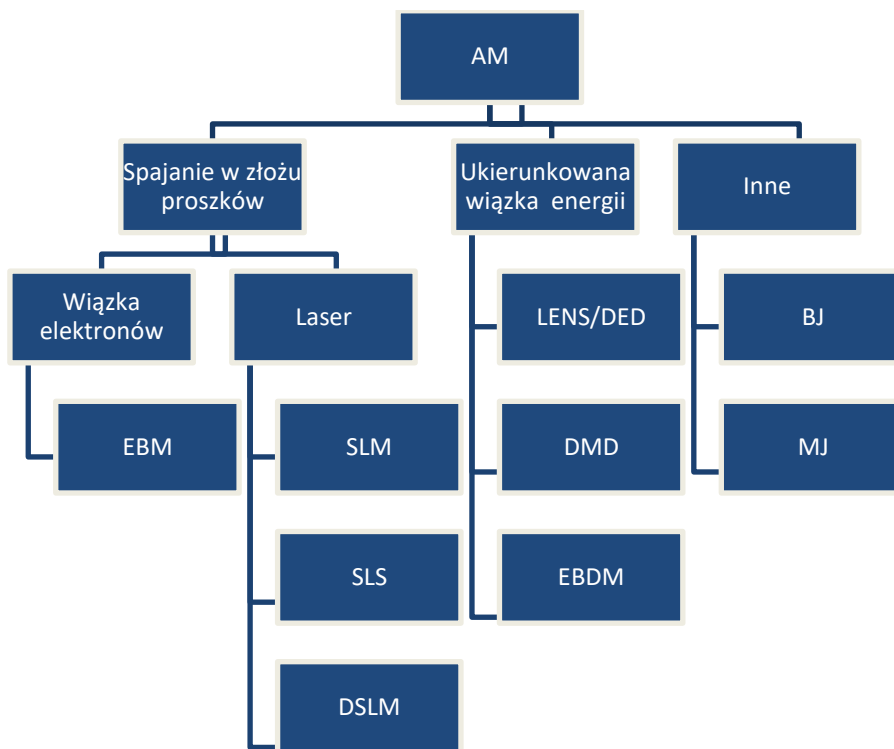
Konwencjonalne metody wytwarzania implantów są nadal szeroko stosowane w masowej produkcji głównie ze względu na niskie koszty przy jednoczesnej wysokiej wydajności procesu. Otrzymane elementy charakteryzują się wysoce jednorodną strukturą. Ograniczeniem tych metod przede wszystkim jest produkcja skomplikowanych kształtów i długi czas wytwarzania. Pomimo wielu niezaprzeczalnych zalet, tytan i jego stopy są bardzo trudne w obróbce ze względu na swoją reaktywność i niskie przewodnictwo cieplne. Jednym z najbardziej obiecujących rozwiązań tych problemów jest zastosowanie niekonwencjonalnych metod wytwarzania implantów, które mogą zwiększyć przydatność tytanu [2].

## **4.2. Przyrostowe metody wytwarzania implantów**

Najbardziej obiecujące techniki szybkiego prototypowania, wprowadzone w celu przezwyciężenia ograniczeń konwencjonalnej produkcji, nazywane są procesami wytwarzania addytywnego (*Additive Manufacturing*, AM) lub przyrostowego. Techniki te pozwalają na wytworzenie trójwymiarowego obiektu poprzez nałożenie na siebie warstw, z użyciem projektowania wspomaganego komputerowo (CAD), które pozwala na stworzenie modelu trójwymiarowego. Najnowsza generacja implantów obejmuje addytywne wytwarzanie spersonalizowanych rozwiązań na podstawie obrazowania komputerowego uszkodzonego narządu [61].

Metody AM pozwalają na produkcję detali o złożonej geometrii z wysoką dokładnością wymiarową, znacznie niższym odsetkiem defektów i dopasowanymi właściwościami mechanicznymi, a wszystko to w krótszym czasie i przy mniejszych stratach materiałowych [26].

Metody addytywne można podzielić m.in. według źródła ciepła: laserowe, wiązka elektronów, ultradźwięki [61] lub np. według właściwości surowca i mechanizmu wiązania między połączonymi ze sobą warstwami materiału [62]. Jedną z klasyfikacji metod addytywnych została przedstawiona na rys. 4.



Rysunek 3 Klasyfikacja technologii addytywnej AM, na podstawie [61]

W niniejszym opracowaniu skupiono się na technikach najbardziej rozpowszechnionych w wytwarzaniu implantów metalicznych, w szczególności na selektywnym topieniu laserowym (SLM), topieniu wiązką elektronów (EBM), kształtowaniu siatki metodą inżynierii laserowej (DED/LENS) oraz natryskiwaniu spoiwa (BJ).

#### 4.2.1. *Selektywne topienie laserowe SLM*

Selektywne topienie laserowe jest obecnie najczęściej stosowaną techniką wśród AM. Polega ono na wytwarzaniu detali poprzez stapianie proszków metali warstwa po warstwie za pomocą lasera o dużej mocy. Plamka lasera sterowana jest za pomocą wspomaganie komputerowego na podstawie zaprojektowanego wcześniej modelu CAD. Stapiane proszki tworzą jezioro ciecży, które następnie jest szybko zestalane. Proces topienia i krzepnięcia prowadzi do konsolidacji proszków. Przyrostowe budowanie warstwa po warstwie polega na każdorazowym opuszczaniu przestrzeni roboczej i spiekaniu proszków kolejnej warstwy, aż do utworzenia produktu końcowego [2].

Zaletą SLM w porównaniu z innymi metodami jest zdolność do wytwarzania złożonych kształtów z dużą precyzją i zachowaniem drobnej struktury otrzymanego elementu. Główne problemy występujące w tym procesie to porowatość lub wady materiałowe powstałe na skutek procesu nakładania warstwa po warstwie, a co za tym



idzie, nakładania ścieżek przetopień lasera, gradient temperatur w kolejnych warstwach i szybkie krzepnięcie spowodowane przez szybko poruszające się źródło lasera. W celu ograniczenia błędów wydruku należy dokładnie opracować parametry procesu, takie jak: prędkość skanowania, rozdzielczość, moc lasera, rodzaj i jakość proszku, grubość warstwy [62].

#### **4.2.2. Topienie wiązką elektronów**

W metodzie topienia z zastosowaniem wiązki elektronów elementy strukturalne także powstają w wyniku selektywnego stapiania proszków przewodzących prąd elektryczny, natomiast źródłem ciepła nie jest laser, ale wiązka elektronów w kontrolowanej próżni [61].

W stosunku do pozostałych metod, proces EBM wykorzystuje znacznie wyższą temperaturę, przez co wytwarzanie detali przebiega szybciej [63]. Z kolei wysoka temperatura wytwarzania w połączeniu ze stosunkowo niską szybkością chłodzenia może prowadzić do otrzymywania fazy  $\alpha+\beta$ , zamiast czystej fazy  $\beta$ , co ma swoje skutki w wyższym module Younga. W porównaniu z metodą SLM, w topieniu wiązką elektronów potrzebna jest wysoka próżnia. Plamka wiązki elektronów jest znacznie większa niż plamka lasera, przez co powierzchnie mogą być bardziej chropowate w przypadku wytwarzania metodą EBM [63]. Jednakże za pomocą EBM można uzyskać wysoce jednorodne struktury z niewielkimi jedynie defektami wewnętrznymi [64].

#### **4.2.3. Osadzanie ukierunkowaną wiązką energii**

Technika osadzania ukierunkowaną wiązką energii (*Directed Energy Deposition*, DED) lub inaczej laserowego kształtowania siatki LENS (*Laser Engineered Net Shaping*) wykorzystuje wiązkę laserową do wytwarzania jeziora stopionego metalu na podłożu, do którego jednocześnie podawany jest proszek metaliczny (lub drut), również ulegający stopieniu [61]. Dochodzi wówczas do wiązania między osadzonym metalem i materiałem bazowym umożliwiając drukowanie wielomateriałowe. W porównaniu do innych metod AM, w większości systemów DED to górna dysza przesuwa się w górę warstwa po warstwie [62]. Zaletą tej metody jest wykorzystywanie niższej temperatury procesu niż w przypadku SLM i EBM, co pomaga zachować większą wytrzymałość materiału. Również niektórzy autorzy wskazują, że metoda ta może być bardziej ekonomiczna przez redukcję odpadów w trakcie procesu (jeziorko topliwe nie jest stale otoczone proszkiem),

a po drugie proces ten charakteryzuje się dużą szybkością budowania objętościowych elementów [65]. Technika ta wykazała ponadto zdolność wytworzenia porowatych implantów biomedycznych.

Główne ograniczenia metody DED związane są z powstawaniem naprężeń szczątkowych i skurczy związanych z lokalnymi zmianami temperatury. Dodatkowo, produkowane detale charakteryzują się większą chropowatością i niższą rozdzielczością wymiarową w porównaniu do pozostałych metod AM [66].

#### **4.2.4. Natryskiwanie spoiwa**

Natryskiwanie spoiwa (*Binder Jetting*, BJ) to oparty na proszkach proces wytwarzania addytywnego, który wykorzystuje płynne spoiwo zamiast źródła lasera lub wiązki elektronów do lokalnego wiązania proszków i tworzenia złożonych struktur metalicznych, polimerowych i ceramicznych [67]. W tym procesie metalowy proszek rozprowadzany jest na platformie roboczej za pomocą wałka, a płynne spoiwo jest selektywnie wtryskiwane warstwa po warstwie przez głowicę drukującą. Wydrukowany element poddaje się odpyleniu, a następnie wypala w piecu w celu usunięcia spoiwa.

W procesie BJ powstają liczne porowatości, dlatego koniecznością jest przeprowadzenie dalszej obróbki. Metoda BJ wykorzystuje znacznie niższe temperatury procesu niż omówione powyżej techniki AM, dlatego naprężenia szczątkowe są znacznie obniżone. Jednak liczne mikroporowatości obniżają właściwości mechaniczne otrzymanych elementów, a konieczność prowadzenia obróbki poprocesowej wydłuża czas i podwyższa koszty druku [62].

### **4.3. Wpływ wytwarzania przyrostowego na mikrostrukturę stopów tytanu**

W zależności od metody wytwarzania i parametrów zastosowanych w procesie AM, takich jak szybkość chłodzenia i ponownego ogrzewania, można uzyskać różne mikrostruktury, niekoniecznie przypominające te uzyskiwane ze stopów odlewniczych. W metodach AM struktura materiału zależy od źródła wiązki ciepła, mocy, prędkości skanowania, czystości stopu czy geometrii części [68].

Technologia SLM to proces wykorzystujący źródło lasera o dużej mocy. W procesie wytwarzania uzyskuje się wysokie szybkości chłodzenia wynoszące ok.  $10^3$ -

$10^8$  K/s (w porównaniu z odlewami, hartowaniem wodnym i chłodzeniem w piecu, gdzie temperatura jest  $< 10^2$  K/s), które powodują szybkie procesy krzepnięcia, hamując przy tym zachodzenie procesów dyfuzyjnych i sprzyjając powstawaniu faz nierównowagowych i metastabilnych [6], [69]. W zależności od składu stopu, szybkości chłodzenia podczas hartowania i różnych obróbek termomechanicznych, oprócz stabilnych faz  $\alpha$  i  $\beta$ , może pojawić się kilka metastabilnych faz, takich jak hcp-martenzytyczna  $\alpha'$ , rombowa martenzytyczna  $\alpha''$ , heksagonalna lub trygonalna  $\omega$  [69].

Na konkurencję między przemianami martenzytycznymi  $\alpha'$  i  $\alpha''$  mają wpływ pierwiastki stopowe i skład chemiczny [6]. Na przykładzie dwuskładnikowych stopów Ti-Nb wykazano, że struktura krystaliczna jest bardzo wrażliwa na zawartość Nb i warunki krzepnięcia. Stopy zawierające do 15% mas. Nb uzyskały strukturę martenzytyczną  $\alpha'$ , gdy zawartość Nb wzrosła od 17,5 do 25% mas., uzyskano strukturę martenzytyczną  $\alpha''$ , dopiero od 27,5% mas. Nb zaczęła się pojawiać faza  $\beta$  (bcc). Wartością krytyczną dla pojawienia się wyłącznie fazy  $\beta$  bez metastabilnych faz dodatkowych jest 35% mas. niobu [69].

W trakcie procesu SLM środek jeziorka topliwego lokalnie uzyskuje temperaturę ok.  $3000^\circ\text{C}$ , co przewyższa temperaturę topnienia stopu Ti-13Nb-13Zr (wynoszącą ok.  $1700^\circ\text{C}$ ), czyli w trakcie procesu SLM stop ulega całkowitemu procesowi stopienia i krzepnięcia [70].

Warstwowe topienie proszku powoduje powstanie gradientu termicznego. Temperatura pierwszej warstwy jest powyżej temperatury topnienia (tj. temperatury likwidusu). Pozostaje powyżej temperatury topnienia także w czasie, gdy dodawana jest druga warstwa. Temperatura pierwszej warstwy spada, ale nadal pozostaje powyżej temperatury przemiany fazowej aż do dodania czwartej warstwy. Powoduje to powstanie charakterystycznych kolumnowych ziaren wydzielenia fazy  $\beta$  [68]. Wykazano, że ziarna fazy  $\beta$  zarodkują i rosną epitaksjalnie na górnej powierzchni poprzednich warstw, prostopadle do roztopionego jeziorka. Rozmiar ziaren fazy  $\beta$  jest bardzo różny w zależności od zastosowanej metody AM i dobranych parametrów [71].

Wczesniejsze prace nad pomyslnie wytworzonymi przy zastosowaniu AM stopami Ti- $\beta$  do zastosowań implantologicznych obejmowały głównie stopy dwuskładnikowe Ti-X (Cr, Mo), Ti-10Nb, Ti-42Nb, Ti-45Nb, Ti-27,5Nb i Ti-50Ta lub stopy wieloskładnikowe, takie jak TNZT (Tytan-Niob-Cyrkon-Tantal) i Ti2448

(Ti-24Nb-4Zr-8Sn) [72]. Większość z tych badań koncentrowała się na optymalizacji właściwości mechanicznych i zrozumieniu tworzenia faz  $\beta$  przy wytwarzaniu metodą AM w porównaniu ze stopami wytwarzanymi konwencjonalnie.

Nagase i inni [73] analizowali tworzenie się tekstury krystalograficznej gęstych komponentów dla różnych stopów tytanu o strukturze  $\beta$  wytworzonych metodą SLM. Dominujące mikrostruktury to fazy  $\beta$  i  $\alpha'$ .

Kolejna grupa [74], charakteryzując mikrostrukturę stopu Ti-13Nb-13Zr wytworzonego przez SLM wykazała, że udział objętościowy fazy  $\alpha'$  (w postaci drobnych płatek o rozmiarze  $< 50$  nm) w stopie wyniósł 35,8%. Faza  $\alpha'$  była losowo rozproszona w osnowie  $\beta$ , której udział objętościowy wynosił 64,18%.

Z kolei Zhou L. i in. [75] wykazali, że wraz ze wzrostem szybkości krzepnięcia i stopnia przechłodzenia, mikrostruktura stopu Ti-13Zr-13Nb zmieniała się ze stosunkowo grubej iglastej struktury ziarna  $\alpha'$  w rozdrobnione igielkowate ziarna  $\alpha'$ . Autorzy przypuszczali, że proces krzepnięcia z cieczy powoduje powstanie fazy  $\beta$ , która przechodzi w fazę  $\alpha'$ , dodatkowo faza  $\alpha'$  wytrąca się na granicach  $\beta$ .

Inni autorzy [76], niezależnie od strategii skanowania (kierunku pracy wiązki lasera) wykazali, że wszystkie próbki stopu Ti-13Zr-13Nb posiadały mikrostrukturę martenzytu z listwami martenzytu  $\alpha'$  rosnącymi wewnątrz kolumnowych wcześniejszych ziaren fazy  $\beta$ .

Część autorów podjęła się także przeprowadzenia analizy porównawczej mikrostruktury wytworzonej przez SLM i za pomocą tradycyjnych metod.

Hariharan i in. [77] przeprowadzili badania na wytworzonym addytywnie stopie Ti-13Nb-13Zr przy użyciu procesu SLM i porównali wyniki z konwencjonalnie produkowanym stopem (kutym) Ti-13Nb-13Zr. Mikrostruktura kutego materiału składała się z płytek  $\alpha + \beta$ , przy czym stop wytworzony metodą SLM posiadał nanometryczną strukturę listkową odpowiadającą fazie typowej dla martenzytu  $\alpha'$  oraz widoczne grube ziarna  $\beta$  zlokalizowane wzdłuż kierunku budowy. Badania były prowadzone pod kątem wpływu mikrostruktury na właściwości mechaniczne i korozyjne.

Również Zhou i in. [78] podjęli się porównania mikrostruktury i właściwości mechanicznych biomateriału Ti-13Nb-13Zr przygotowanego przez selektywne stapianie

laserowe (SLM) do stopu uzyskanego tradycyjną metodą kucia na gorąco. Wykazali oni, że w stopie wytworzonym metodą SLM występowały zarówno faza  $\beta$  (17,5%), jak i  $\alpha'$  (82,5%). Drobniejszy martenzyt  $\alpha'$ , którego rozmiar wynosił 2-5 nm, miał skłonność do wytrącania się na granicach ścieżek lasera, podczas gdy faza  $\beta$  miała tendencję do tworzenia dużych ziaren. Natomiast w materiale komercyjnym oprócz fazy  $\beta$  (16,2%) występowała faza  $\alpha$  (83,8%).

Większość badań koncentrowała się wokół analizy mikrostruktury otrzymanych stopów pod kątem właściwości mechanicznych i strukturalnych. W badaniach wykazywano wady powstające w trakcie metody SLM, wynikające z warstwowej charakterystyki procesu, prowadzącej do anizotropowości właściwości. Proponowanym rozwiązaniem może być wykorzystanie obróbki cieplnej po procesie wytwarzania, ale są to dodatkowe, czasochłonne kroki, które generują koszty, dlatego też część autorów uważa za priorytet dostosowanie odpowiednich parametrów wytwarzania.

Bez względu na wybraną metodę wytwarzania, konwencjonalną czy addytywną, problem bioobojętności stopów tytanu wymaga przeprowadzenia dalszej modyfikacji otrzymanych elementów, w celu nadania im bioaktywności i zwiększenia prawdopodobieństwa skutecznej implantacji.

## **5. Metody modyfikacji powierzchni implantów**

### **5.1. Techniki modyfikacji stopów tytanu**

Tytan jest biologicznie obojętny ze względu na tworzenie się na powierzchni niereaktywnej warstwy tlenku o grubości  $\sim 5$  nm (nazywanej również warstwą pasywną) [3]. W związku z brakiem bioaktywności materiałów metalicznych wymagana jest modyfikacja powierzchni implantów poprawiająca właściwości powierzchniowe, w tym wspomagająca gojenie kości podczas pierwszego dnia implantacji [79].

Metody modyfikacji powierzchni tytanu i jego stopów można podzielić m.in. na metody: fizyczne, mechaniczne i chemiczne (w tym elektrochemiczne). W niniejszym opracowaniu modyfikacje zostały sklasyfikowane na metody powłokowe i bezpowłokowe [28], co zostało przedstawione na rysunku 5.

Metody powłokowe dotyczą nanoszenia warstwy innego materiału na powierzchnię materiału rodzimego w celu nadania jej określonych właściwości, np.

włączenia czynników aktywnych poprawiających odpowiedź komórkową i/lub o działaniu antybakteryjnym, bez zasadniczej zmiany właściwości materiału macierzystego. Metody bezpowłokowe natomiast dotyczą modyfikacji warstwy wierzchniej materiału macierzystego, która przyjmuje budowę strefową lub gradientową, wykazując ciągłe lub nieciągłe zmiany właściwości fizycznych i/lub chemicznych w stosunku do cech materiału rdzenia.

Manipulowanie topografią powierzchni reguluje początkowe przyleganie i dalszą żywotność komórek i bakterii. Obie metody mogą być synergiczne, jak i wykorzystywać oba mechanizmy bioaktywności [28].



Rysunek 4 Podział modyfikacji powierzchni, na podstawie [28]

### 5.1.1. Metody powłokowe

#### ***Osadzanie elektroforetyczne (Electrophoretic Deposition, EPD)***

Osadzanie elektroforetyczne polega na zanurzeniu elektrod w zawiesinie koloidalnej i wytworzeniu pola elektrycznego powodującego migrację naładowanych cząsteczek do przeciwnie naładowanej elektrody (podłoża), a następnie osadzaniu się tych cząsteczek na podłożu, tworząc warstwę o grubości do ok. 2 mm [80].

EPD jest stosunkowo prostą i ekonomiczną metodą wytwarzania jednolitych powłok. Wyzwaniem tej metody jest odpowiednia adhezja powłok do podłoża

i eliminacja powstających spękań. Konieczna jest obróbka wykańczająca polegająca na spiekaniu powstałych powłok [28].

Jedną z najczęściej otrzymywanych powłok metodą EPD, są powłoki ceramiczne, np. hydroksyapatytowe [81].

### ***Powlekanie zanurzeniowe***

Jest to metoda polegająca na zanurzeniu próbki z określoną prędkością w przygotowanym roztworze, następnie pozostawienie jej przez określony czas i wynurzenie również z określoną prędkością. Czynności mogą być powtarzane kilkukrotnie. Po zakończonym procesie nadmiar cieczy na próbce jest usuwany przez osuszanie, a próbka może podlegać dalszym modyfikacjom, np. spiekaniu.

Parametrami decydującymi o charakterystyce otrzymanych powłok, są min.: dobór elektrolitu (lepkość, stężenie, szybkość parowania), prędkość i/lub kąt wynurzania/zanurzania, czas zanurzenia, liczba cykli zanurzeniowych, siła grawitacji.

Metoda jest powszechnie stosowana ze względu na jej prostotę oraz możliwość włączania składników aktywnych. Wadą powstałych powłok jest brak jednorodności i problem ze spiekaniem w wysokich temperaturach powłok zawierających związki organiczne [79].

Jednym z popularnych polimerów stosowanych w metodzie zanurzeniowej jest syntetyczny poli(laktyd-ko-glikolid) (PLGA). Zastosowanie polimeru wzbogaconego w substancje biologicznie czynne, np. antybiotyk doksycyklinę, pozwala na zmniejszenie ryzyka infekcji w kontrolowany sposób [82].

### ***Zol-żel***

Modyfikacja powierzchni zol-żel to metoda polegająca na zanurzeniu próbki w roztworze koloidalnym (zol), który stopniowo ulega polikondensacji, prowadząc do powstania cienkiej warstwy żelu na powierzchni [28].

Zol tworzy się przez zdyspergowanie cząstek w rozpuszczalniku w celu utworzenia zawiesiny koloidalnej. Dodatek katalizatorów do zolu sprzyja reakcjom polimeryzacji obejmującym hydrolizę i polikondensację. Stąd powstaje żel, który z definicji jest systemem dwufazowym składającym się z trójwymiarowej sieci i ciekłego rozpuszczalnika uwięzionego w porach sieci. Następnie, próbka ulega procesowi

suszenia w celu usunięcia nadmiaru płynu. W metodzie zol-żel potrzebna jest obróbka cieplna, która wzmocni sieć i wprowadzi stabilność mechaniczną.

Metoda zol-żel oprócz swojej wysokiej prostoty charakteryzuje się niskim zużyciem materiałów, co sprzyja obniżaniu kosztów powlekania. Powstające powłoki są homogeniczne i dobrze przylegające do podłoża, nawet w przypadku powlekania mocno złożonych kształtów (choć nie zawsze udaje się utrzymać jednakową grubość). Do podstawowych wad należy pękanie powłoki związane z kurczeniem się żelu w trakcie obróbki cieplnej [79].

Jak dotąd powłoki zolowo-żelowe na bazie tlenków metali stosowano np. w celu zmniejszenia korozji metalowych implantów, a powłoki składające się ze srebra okazały się skuteczne w zapobieganiu infekcji bakteryjnych związanych z implantem [83].

### ***Biomimetyczne osadzanie***

Biomimetyczne (naśladujące naturę lub biologię) osadzanie polega na zarodkowaniu i wzroście powłoki o właściwościach kościopodobnych. Ważnym czynnikiem w tej metodzie jest odpowiednie aktywowanie podłoża za pomocą roztworu zasadowego (NaOH) lub kwaśnego (HF lub HCl), bądź przez zastosowanie obróbki cieplnej [84]. Następnie powłoki są zanurzane w symulowanym płynie ustrojowym (*Simulated Body Fluid, SBF*) o stężeniu jonów odpowiadającym ludzkiemu osoczu krwi i utrzymywane w warunkach fizjologicznych (temp. 37 °C i pH 7,4). W trakcie zanurzenia dochodzi do szeregu reakcji chemicznych. Oczekiwany rezultatem jest utworzenie powłoki wapniowo-fosforanowej [79].

Do zalet tej metody należy możliwość włączania do powłoki bioaktywnych dodatków, a dzięki przeprowadzaniu procesu w temp. 37 °C metoda ta może być stosowana na podłożach wrażliwych na wysokie temperatury. Wadą jest wydłużony czas tworzenia biomimetycznych powłok (nawet kilkanaście dni) oraz problem z utrzymywaniem stałego składu i pH roztworu SBF [85].

### ***Natryskiwanie plazmowe***

Natryskiwanie plazmowe jest obecnie najczęściej stosowaną techniką komercyjną modyfikacji implantów ortopedycznych i dentystycznych [86]. Polega ono na nakładaniu stopionych lub ogrzanych materiałów na powierzchnię podłoża. Zasada działania opiera się na wykorzystaniu palnika plazmowego, który generuje łuk prądu



stałego. Materiał wtryskuje się do strumienia plazmy i w ten sposób następuje jego zmiękczenie lub stopienie i osadzenie z dużą prędkością na powierzchni podłoża. Natryskiwanie plazmowe wykonuje się w różnych warunkach ciśnienia (niskie ciśnienie/atmosfera/próżnia).

Chociaż ta technika zapewnia doskonałe wyniki w przypadku powlekania metalicznych implantów materiałem CaP/HAp, to bardzo wysokie temperatury procesu ograniczające dobór modyfikowanych materiałów oraz słaba adhezja do podłoża, niejednokrotnie prowadząca do delaminacji, mała odporność na pękanie, brak jednorodności i mała odporność na zużycie, stanowią poważne wady tej metody [79].

### ***Fizyczne osadzanie z fazy gazowej (Plasma Vapor Deposition, PVD)***

Zalicza się do metod osadzania próżniowego, które opiera się na powstawaniu pary w postaci atomów, jonów lub cząsteczek z materiału wyjściowego. Metoda ta bazuje na dwóch możliwych procesach fizycznych: parowaniu termicznym, które powstaje na skutek ogrzewania materiału, aż prężność pary przekroczy ciśnienie otoczenia, lub rozpyleniu, gdzie rozpędzone jony bombardują powierzchnię materiału, wybijając atomy, jony lub cząsteczki podłoża. Powstała skondensowana para osadza się na podłożu tworząc cienkie powłoki [79].

Metoda PVD obejmuje szereg technik, takich jak: osadzanie łukiem katodowym, osadzanie wiązką elektronów, laserem impulsowym, napyłanie magnetronowe, powlekanie jonowe itp. Jednak dla osadzania bioaktywnych powłok na bazie CaP osadzanie wiązką jonów i napyłanie magnetronowe stanowią najczęstsze metody wytwarzania gładkich i jednolitych powłok [87].

Złożoność przedstawionej techniki i stosunkowo wysoki koszt stanowią podstawowe wady PVD. Do zalet z kolei należy możliwość wytwarzania powłok na materiałach wrażliwych temperaturowo.

### ***Chemiczne osadzanie z fazy gazowej (CVD)***

Metoda ta również opiera się na tworzeniu pary, jednak jej źródłem nie jest stałe lub ciekłe źródło w komorze próżniowej (tak jak to było w przypadku PVD), ale para lub gaz dostarczone do komory z zewnętrznego źródła. Wprowadzone opary/gazy osadzają się na powierzchni podłoża i w wyniku reakcji chemicznych tworzą powłoki.

Do podstawowych technik CVD zalicza się: CVD prowadzone w ciśnieniu niskim/ atmosferycznym lub w ultrawysokiej próżni, CVD wspomagane laserem lub wzmocnione plazmą. Wśród badań nad powłokami na implanty ortopedyczne, najczęściej stosuje się CVD wzmocnione plazmą [79].

Zaletą tych metod jest możliwość osadzania warstw w stosunkowo niskich temperaturach, jak też wysoka jakość przy krótkim czasie wytwarzania. Do głównych wad zalicza się brak możliwości wykorzystywania materiałów, które są lotne w temperaturze otoczenia, a także ryzyko powstania toksycznych produktów ubocznych [88].

### ***5.1.2. Metody bezpowłokowe***

#### ***Mechaniczne***

Mechaniczna modyfikacja obejmuje obróbkę skrawaniem, śrutowanie i szlifowanie. Jest najprostszą metodą nadania topografii powierzchni, często traktowaną jako metoda pośrednia, przygotowująca powierzchnię do dalszych modyfikacji. Wadą tej metody jest pozostawianie na powierzchni pozostałości materiałów powstałych w trakcie obróbki, np. węgla krzemu z papierów ściernych [28].

#### ***Trawienie***

Trawienie powierzchni wiąże się z wykorzystaniem kwasu w celu usunięcia zanieczyszczeń i warstwy tlenku z powierzchni. Głównym problemem związanym z tą metodą jest tendencja do osadzania się reszkowych jonów na powierzchni tytanu, które mogą oddziaływać na sąsiadujące tkanki [28].

#### ***Laserowa modyfikacja***

Koncentracja dużej gęstości mocy lasera na obrabianym obszarze pozwala na schropowacenie powierzchni, stworzenie warstwy tlenkowej czy lokalne utwardzenie.

Wzrost zainteresowania laserową modyfikacją związany jest z możliwością lokalnej obróbki, zadowalającą wydajnością procesu, brakiem deformacji przedmiotu obrabianego, stosunkowo niskimi kosztami, szerokimi możliwościami modyfikacji struktury materiału oraz możliwością automatyzacji procesu i jego sterowania [89].

### ***Elektrochemiczne utlenianie***

Anodowanie, znane również jako utlenianie anodowe, to utlenianie metalu w obecności pola elektrycznego. w układzie dwuelektrodowym zanurzonym w kąpeli, tytan stanowi anodę, natomiast materiał obojętny – katodę. Przyłożenie prądu elektrycznego powoduje polaryzację i utlenianie powierzchni tytanu. Jest to metoda o niskim stopniu skomplikowania i niskim koszcie wytwarzania [2].

Przykładem zastosowania anodowania jest tworzenie nanorurek  $\text{TiO}_2$ , szeroko badanych w kontekście materiałów na implanty ze względu na ich zdolność do promowania osteointegracji poprzez naśladowanie topografii kości rodzimej [90].

### ***Utlenianie mikrołukowe (Micro-Arc Oxidation MAO/Plasma Electrochemical Oxidation PEO)***

Utlenianie mikrołukowe jest metodą elektrochemiczną polegającą na osadzaniu warstwy tlenku na powierzchni anodowej metalowego podłoża za pomocą pola elektrycznego wspomagającego jonizację pierwiastków w wodnym elektrolicie i ich dyfuzję do metalu. W porównaniu do standardowego utleniania, MAO wykonuje się w wyższych warunkach prądowych i napięciowych [91]. Obróbkę MAO prowadzi się typowo przez 5–180 min przy gęstości prądu w zakresie od 100 do 2000  $\text{A}/\text{m}^2$  i napięciu do 1000 V [92]. Tak duży potencjał może generować plazmę na powierzchni podłoża, w wyniku czego tworzone są warstwy.

Regulując parametry procesu, np. parametry elektryczne, składniki elektrolitu, czas i temperaturę utleniania można wytworzyć wysoko porowate warstwy poprawiające właściwości stopów tytanu poprzez nadanie im topografii i składu chemicznego promującego osteointegrację i aktywność antybakteryjną. Inne zalety tej techniki to dobra siła wiązania z podłożem, wysoka twardość, możliwość równomiernego powlekania metali o skomplikowanych kształtach geometrycznych, a także włączanie substancji aktywnych do warstwy. Metoda MAO jest ponadto łatwa w obsłudze i ekonomiczna [93].

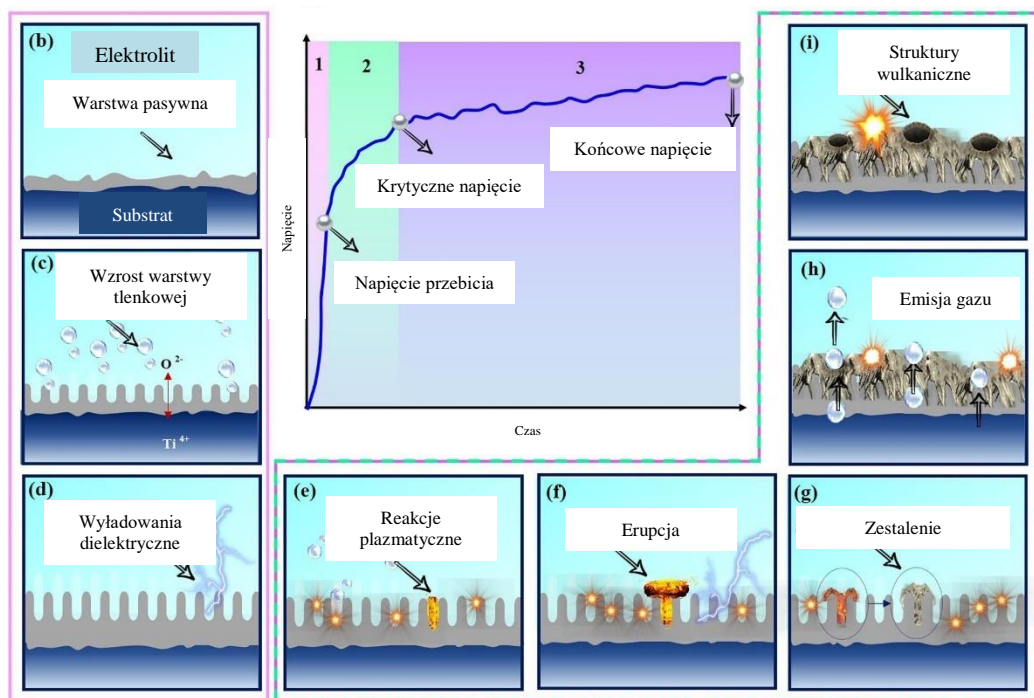
## **5.2. Mikrołukowe utlenianie stopów tytanu**

### ***5.2.1. Mechanizm budowania warstw MAO***

Plazmowe utlenianie mikrołukowe można podzielić na trzy charakterystyczne etapy zależące od zmiany napięcia: (i) pierwotne utlenianie anodowe (trwające

do osiągnięcia napięcia krytycznego), (ii) dynamiczne MAO (przebiega od napięcia krytycznego do napięcia maksymalnego), (iii) końcowe MAO w stanie ustalonym (trwające od maksymalnego napięcia aż do zakończenia procesu) [94].

Rysunek 5 przedstawia typowy wykres zależności zmiany napięcia procesu od czasu oraz etapy temu towarzyszące.



Rysunek 5 Schematy powiązanych zjawisk podczas procesu MAO [94]

Reakcje zachodzące w poszczególnych etapach zostały scharakteryzowane przez wielu badaczy [94], [95] [96], [97].

Pierwszy etap charakteryzuje się liniowym wzrostem napięcia, w którym zachodzą reakcje typowe dla konwencjonalnego procesu utleniania anodowego, oparte na dyfuzji jonów napędzanych powstałym polem elektrycznym. Na powierzchni próbki dochodzi wówczas do penetracji jonów tlenu, rozpuszczania podłoża, uwalniania się gazu, aż ostatecznie wytworzenia bariery tlenkowej (warstwy pasywnej) prostopadłej do powierzchni substratu.

W miarę wzrostu napięcia do poziomu krytycznego (napięcie rozkładowe/przebicia), rozpoczyna się drugi etap procesu polegający na przebiciu dielektrycznym utworzonej warstwy tlenkowej. Następuje wówczas obniżenie szybkości wzrostu napięcia (spadek nachylenia krzywej zależności napięcia od czasu). Na powierzchni próbki dochodzi do kluczowego w procesie MAO zjawiska

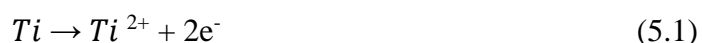
wyładowania iskrowego. Wizualnie ten etap objawia się powstaniem licznych małych, jasnych iskier, które pojawiają się na całej powierzchni i prowadzą do powstania wielu małych porów.

Trzeci etap wiąże się ze względnym ustabilizowaniem napięcia. Na powierzchni, widoczne wcześniej małe, jasne iskry wyładowcze zastępowane są rzadkimi, większymi, pomarańczowymi iskrami – wyładowaniami łukowymi, poruszającymi się powoli po całej powierzchni i prowadzącymi do powstawania większych porów.

Mechanizm budowania warstwy MAO opiera się w pierwszej kolejności na tworzeniu warstwy tlenkowej, w której jony  $Ti^{2+}$  migrują z materiału macierzystego na zewnątrz, natomiast  $O^{2-}$  z elektrolitu do wewnątrz [97].

Reakcje chemiczne powstawania warstwy tlenkowej zachodzą następująco (5.1 - 5.4) [97]:

Na granicy Ti/TiO<sub>2</sub> (5.1):



Następuje także w warunkach plazmy rozpad wody na jony tlenowe i wodorowe (5.2):



Powstający gazowy tlen wydziela się i ucieka do atmosfery lub przylega do granicy elektroda-elektrolit tworząc tlenek tytanu (5.3-5.4):

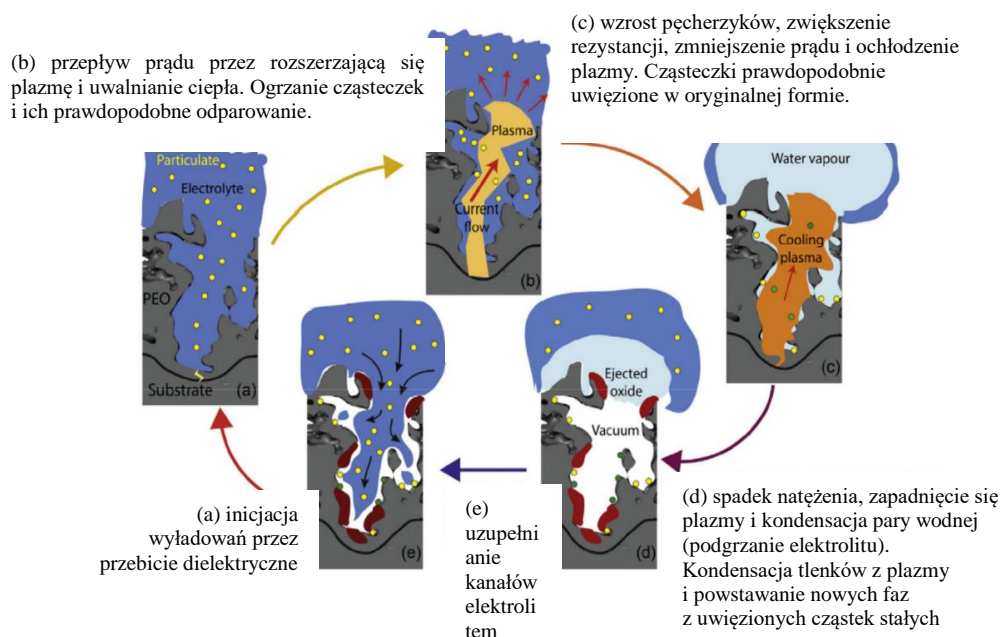


Na skutek powyższych reakcji powstaje amorficzna warstwa przylegająca do substratu [98]. Dalszy etap związany ze wzrostem napięcia prowadzi do wyładowań dielektrycznych. W wyniku spadku stabilności dielektrycznej w obszarach o niskim przewodnictwie, w warstwie tlenkowej powstaje kilka odrębnych kanałów wyładowczych. Na skutek tych procesów, lokalna temperatura i ciśnienie wzrastają odpowiednio do 10 000 K i 1000 MPa - są to warunki powstawania plazmy [99]. W tych warunkach aniony znajdujące się w elektrolicie migrują do kanałów wyładowczych na zasadzie elektroforezy. Jednocześnie, w efekcie wysokiej temperatury podłoża, pierwiastki stopowe oddzielają się i migrują do kanałów wyładowczych, gdzie zostają

stopione, a następnie utlenione. Utleniony materiał wydostaje się z kanałów wyładowczych na powierzchnię warstwy, gdzie gwałtownie zostaje schłodzony na skutek kontaktu ze znacznie zimniejszym elektrolitem. Procedura ta jest powtarzana w wielu miejscach równocześnie prowadząc do miejscowego tworzenia i pogrubienia porowatej warstwy tlenkowej [94]. W międzyczasie porowata struktura tlenkowa jest także formowana i pogrubiana przez utlenione gazy uwalniające się z kanałów wyładowczych, które tworzą charakterystyczny okrągły obszar z zagłębieniem w środku, przypominający strukturę krateru wulkanicznego [100].

Charakterystyka poszczególnych etapów procesu MAO prowadzi w konsekwencji do powstania dwuwarstwowej morfologii warstw zbudowanej ze zbitej warstwy - bariery tworzącej się tuż przy substracie oraz porowatej warstwy zewnętrznej.

W celu lepszego zrozumienia fenomenu utleniania mikrołukowego, należy bliżej przyjrzeć się zjawisku pojawiania się plazmy, które zostało przedstawione na rysunku 6.



Rysunek 6 Schematyczny przebieg pojedynczego wyładowania plazmowego w elektrolicie, na podstawie [92]

W etapie ustabilizowanych wyładowań, powierzchnia jest pokryta pęcherzykami gazu, wokół których występuje koncentracja jonów dodatnich. Na skutek lokalnego wysokiego natężenia pola elektrycznego powstałego między ujemnie naładowaną próbką, a dodatnio naładowanymi jonami, dochodzi do jonizacji powierzchni wewnątrz pęcherzyków gazowych i powstania plazmy. Wysokotemperaturowe wyładowanie

plazmy w kontakcie z zimnym elektrolitem prowadzi do gwałtownego ochłodzenia pęcherzyka plazmy i powstania fali uderzeniowej, która prowadzi do zapadnięcia się bańki plazmy. Implozja plazmy prowadzi do pojawienia się energii kinetycznej, która przyspiesza jony dodatnie w stronę anody, a dalej następuje ich osadzenie na powierzchni [101], [102].

Morfologia warstw jest ściśle skorelowana z warunkami przeprowadzania procesu.

### **5.2.2. *Determinanty procesu MAO***

Istnieją różne czynniki odpowiedzialne za formowanie warstwy tlenkowej. do czynników związanych z elektrolitem należą: skład chemiczny, stężenie, temperatura i pH; do parametrów procesu: natężenie, napięcie i jego czas trwania; zmienne związane z samym podłożem to: skład chemiczny i mikrostruktura modyfikowanego materiału [94].

#### ***Rodzaj elektrolitu***

Jednym z kluczowych czynników decydujących o charakterystyce warstwy MAO jest dobór elektrolitu. Rodzaj jonów znajdujących się w elektrolicie wpływa na reakcje elektrochemiczne zachodzące w trakcie procesu, determinując tym samym morfologię i topografię warstwy, ale także poprzez włączenie danych jonów do warstwy nadaje jej określone funkcje, np. wpływa na poprawę bioaktywności, antybakteryjności, odporności na korozję itp. [94], [100].

Elektrolity wykorzystywane w procesie MAO dzieli się na zasadowe, kwasowe i obojętne. Dodanie KOH lub NaOH do elektrolitu powoduje zmniejszenie oporności roztworu i stabilizację wyładowań, a co za tym idzie, wytworzone warstwy są amorficzne, bardziej regularne i mniej porowate. Odwrotny mechanizm występuje w środowiskach kwaśnych (np. kwas siarkowy, fosforowy, octowy) i obojętnych roztworach (siarczan sodu), gdzie wyższa przewodność elektryczna prowadzi do powstania wysoce krystalicznych i porowatych warstw [2].

W zastosowaniu biomedycznym modyfikacji tytanu i jego stopów, najczęściej spotyka się roztwory zawierające fosforany, krzemiany i/lub gliniany [103]. Jednak w przypadku powłok biokompatybilnych wprowadza się do nich związki wapnia i fosforu. W związku z tym często stosuje się elektrolity zawierające octan wapnia,

kompleks chelatowy EDTA-Ca, glicerofosforan wapnia lub diwodorofosforan wapnia itp. [94].

### ***Stężenie elektrolitu***

Stężenie elektrolitu również wykazuje dodatnią korelację z morfologią powierzchni [94]. W pracy [104] wykazano, że wraz ze wzrostem stężenia  $\text{NaAlO}_2$  z 10 do  $12 \text{ g/dm}^3$  wzrasta ilość gazu w kąpeli i liczba pęcherzyków osadzających się na anodzie, zwiększenie stężenia w elektrolicie prowadzi zaś do skrócenia czasu inicjacji wyładowań iskrowych, zwiększenia rozmiarów mikroporów i do niejednorodności warstwy. Podobne wyniki otrzymała inna grupa badawcza [105], która wykazała, że wzrost stężenia  $\text{K}_2\text{SiO}_3$  w roztworze powodował wzrost średnicy i liczby porów w warstwie wytworzonej na stopie Ti-13Nb-13Zr.

### ***Temperatura elektrolitu***

Temperatura procesu jest kolejnym czynnikiem wpływającym na charakterystykę warstw MAO [106]. Wskazuje się, że wyższe temperatury prowadzą do zwiększonej migracji reagentów, a co za tym idzie, powstawania mniej porowatych warstw. Dodatkowo, przy wyższych temperaturach zmniejsza się rozpuszczalność gazu w elektrolicie, a pojawienie się większej ilości pęcherzyków gazu na anodzie blokuje ciągłość procesów elektrochemicznych [107]. W jednej z prac [108] wykazano, że grubość warstwy zmniejsza się wraz ze wzrostem temperatury, MAO prowadzone w temperaturze  $-3 \text{ }^\circ\text{C}$  doprowadziło do powstania warstwy o grubości równej  $13,6 \pm 0,8 \text{ }\mu\text{m}$ , natomiast w  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  grubość wynosiła  $10,8 \pm 0,4 \text{ }\mu\text{m}$ .

### ***Mieszanie elektrolitu***

Badania prowadzone w kierunku wpływu działania mieszania magnetycznego na powstawanie warstw MAO pokazują, że wraz ze wzrostem prędkości mieszania również rośnie porowatość, chropowatość i krystaliczność warstw [109], [110]. Związane jest to ze zintensyfikowaniem procesu poprzez usuwanie pęcherzyków gazu osadzających się na anodzie, które powodują zmniejszenie pola powierzchni dla reakcji elektrochemicznych [111]. Niektórzy autorzy zgłaszali, że maksymalna prędkość mieszadła powinna wynosić 300 obr./min, gdyż powyżej tej prędkości powstaje przepływ turbulentny, który negatywnie wpływa na jednorodność warstw [112].



### ***Skład podłoża***

Również dobór składu podłoża istotnie wpływa na charakterystykę warstw MAO, co związane jest z uwalnianiem się jonów z substratu i włączeniem ich do warstwy tlenkowej [109]. W [113] określono charakterystykę powierzchni warstwy hydroksyapatytowej na tytanie i stopie Ti-30Nb-1Fe-1Hf wytwarzanej metodą utleniania anodowego i obróbki hydrotermicznej wykazując, że niob może negatywnie wpływać na tworzenie warstw krystalicznych.

### ***Napięcie procesu***

Podstawowy podział procesów utleniania anodowego w zależności od stosowanych warunków prądowych to: utlenianie galwanostaticzne i potencjostaticzne. W procesie galwanostaticznym natężenie prądu jest stałe, a napięcie ulega zmianie. W procesie potencjostaticznym napięcie jest stałe przy zmiennym prądzie [103].

Liczne badania wskazują, że wraz ze wzrostem napięcia, przyspieszane są procesy elektrochemiczne prowadząc do zwiększenia grubości warstwy. Należy pamiętać, że wraz ze wzrostem grubości naprężenia szczątkowe w powłokach wzrastają, a uwalnianie energii może sprzyjać pękaniu na granicy faz podłoże/powłoka [114].

Wraz ze wzrostem grubości warstwy, do rozbicia warstwy dielektrycznej potrzebna jest wyższa energia, co prowadzi do wzrostu porowatości, chropowatości i poprawy zwilżalności warstwy tlenkowej. Wyższe napięcia prowadzą także do lokalnego wzrostu temperatury i zintensyfikowanego nadtapiania powierzchni tytanu i jej rekrytalizacji, zwiększając tym samym krystaliczność  $\text{TiO}_2$  (anataz, rutil). Wraz ze wzrostem napięcia rośnie zawartość rutilu w warstwie [114]. Niektóre badania wskazały, że wraz ze wzrostem napięcia w zakresie od 300 do 530 V obserwowany jest wzrost skuteczności antybakteryjnej z 88,3% do 97,22% [115].

### ***Natężenie procesu***

Gęstość prądu rozumiana jako ilość prądu przepływającego przez pole poprzeczne przekroju, podobnie jak napięcie, silnie decyduje o wielkości porów i poziomie porowatości otrzymanych warstw MAO. Wyższa gęstość prądu zwiększa natężenie wyładowań, powodując powstawanie wysoce krystalicznych, porowatych warstw tlenkowych [114].

Na podstawie badań porównujących zastosowane wartości gęstości prądu, stwierdzono, że przy wyższym natężeniu ( $0,5 \text{ A/cm}^2$ ) powierzchnie charakteryzowały się wyższą aktywnością osteogenną przy niższej antybakteryjności, w porównaniu do próbek wytworzonych przy gęstości prądu równej  $0,1 \text{ A/cm}^2$  [116].

### ***Czas trwania procesu***

Również wydłużenie procesu skutkuje zwiększoną intensywnością wyładowania iskrowego i prowadzi do powstania warstw o większej grubości, porowatości i krystaliczności.

Badania wskazują, że wysokie napięcie, wysokie natężenie i wydłużony czas procesu ułatwiają różnicowanie komórek *in vitro* i osteointegrację *in vivo* dzięki zwiększeniu powierzchni właściwej. Np. w badaniach [114] wykazano, że dla najwyższego napięcia (400 V) skrócenie czasu z 15 min do 10 min w tych samych warunkach prądowych (32 mA) skutkowało zmniejszeniem rozmiaru porów. Natomiast Zhang i in. stwierdzili, że wzrost czasu trwania procesu MAO od 0,5 do 2 min poprawił działanie antybakteryjne warstw utworzonych w elektrolicie zawierającym Ag i Zn przeciwko przylegającym i planktonicznym bakteriom *S. aureus* [117].

### ***5.2.3. Bioaktywność warstw MAO na stopie tytanu***

Miarą bioaktywności może być zdolność danego materiału do indukowania apatytu, promowanie odpowiedzi komórkowej oraz uwalnianie cząsteczek bioaktywnych w celu eliminacji zakażeń pooperacyjnych.

Stymulowanie wrastania kości może mieć podłoże morfologiczne, jak i chemiczne. Badania wskazują, że warstwy ceramiczne zawierające Ca i P mogą znacząco przyczynić się do zwiększenia bioaktywności implantów. Wapń i fosfor, jako główne składniki kości człowieka, są kluczowymi pierwiastkami sprzyjającymi wytrącaniu się fosforanu wapnia wokół implantu i są często stosowane do pokrywania powierzchni stopów tytanu w celu zwiększenia bioaktywności i skuteczności implantów, ponieważ z literatury wiadomo, że tworzenie się apatytu na powierzchni materiału sprzyja adhezji osteoblastów i tworzeniu nowych komórek, co skutkuje lepszym wzrostem kości [118].

Ważnym rodzajem badań *in vitro* sprawdzającym bioaktywność jest zdolność powierzchni zanurzonej w symulowanych płynach ustrojowych lub w roztworze Hanksa,

o stężeniu jonów zbliżonych do ludzkiego osocza krwi, do tworzenia apatytów [119]. Badania wskazują, że testy zanurzania próbek w płynach zbliżonych do płynów ustrojowych ze sporą dokładnością są w stanie przewidzieć właściwości biomateriałów w warunkach *in vivo* [119].

Popularnymi źródłami wapnia i fosforu wykorzystywanymi w warstwach MAO są elektrolity na bazie octanu wapnia, glicerofosforanu lub  $\beta$ -glicerofosforanu, chlorku wapnia, fosforanu trójsodowego, fosforanu potasu i fosforanu sodu [103].

Kinetyka zarodkowania apatytu zależy m.in. od składu chemicznego, stopnia krystaliczności, chropowatości czy porowatości powierzchni. Wiele badań wskazuje, że nanostruktura korzystnie wpływa na tworzenie się apatytu ze względu na zwiększoną powierzchnię zarodkowania związaną z większymi efektami dyfuzji jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{PO}_4^{3-}$ . Również warstwy krystaliczne mają większe zdolności promowania zarodkowania apatytu niż amorficzne [91].

Bioaktywność warstw wyrażana jest także w interakcji powierzchni w kontakcie z komórkami, która jest ściśle zależna od czynników powierzchniowych, takich jak: skład chemiczny, stopień krystaliczności, zwilżalność, topografia, chropowatość czy porowatość [103]. Do badań odpowiedzi komórkowej wykorzystuje się w warunkach laboratoryjnych różne linie komórkowe, do których najczęściej należą: mezenchymalne komórki macierzyste HBMMSC, komórki osteoblastów SAOS-2, komórki osteoblastopodobne MG-63, komórki zrębowe szpiku kostnego MSC, mysie linie komórkowe osteoblastów, czy ludzkie komórki fibroblastów CCD-18Co [106].

Krzakała i in. [120] przeprowadzili badania bioaktywności w symulowanych płynach ustrojowych (SBF) oraz badania komórkowe wykorzystując ludzkie komórki zrębowe szpiku kostnego (MSC) i wykazali, że po anodowaniu w kąpeli zawierającej  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_2)_2$  ( $100 \text{ g/dm}^3$ ) i  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ( $2 \text{ mol/dm}^3$ ) przy napięciu 150 V i obróbce alkalicznej, stop Ti–6Al–7Nb wykazywał właściwości osteoindukcyjne.

Kazek-Kęsik i in. [121], [122] w badaniu biologicznym z wykorzystaniem komórek MG-63 uzyskali poprawę bioaktywności warstwy stopu Ti–13Nb–13Zr wykonując proces MAO w 0,1 M roztworze podfosforanu wapnia ( $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_2)_2$ ) z dodatkiem fosforanu trójwapniowego ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), wollastonitu ( $\text{CaSiO}_3$ ) lub proszku krzemionki ( $\text{SiO}_2$ ) o zawartości od 50 do  $150 \text{ g/dm}^3$ .

Tsutsumi i in. [123] udowodnili, że na stopie tytanu TNTZ poddanym obróbce MAO w elektrolicie glicerofosforanu wapnia i octanu magnezu powstała gruba warstwa fosforanu wapnia po zanurzeniu w roztworze Hanksa. Z kolei w innych badaniach tej samej grupy badawczej wykazano, że na stopie Ti-15Zr-7,5Mo poddanym obróbce MAO nie zaobserwowano fosforanów wapnia po zanurzeniu przez 7 dni w roztworze Hanksa. Wynikało to prawdopodobnie z dużej zawartości Zr w warstwie otrzymanej po procesie MAO, który zmniejszał zdolność do tworzenia fosforanu wapnia [124].

Z kolei Song i in., na podstawie badań prowadzonych w elektrolicie zawierającym  $0,04 \text{ mol/dm}^3$   $\beta$ -glicerofosforanu wapnia i  $0,4 \text{ mol/dm}^3$  octanu wapnia wykazali, że napięcie procesu mieszczące się w granicach od 350 do 500 V sprzyjało powstawaniu warstwy krystalicznej z jonami wapnia i fosforu po 28 dniach w SBF [125].

Correa i in. [126] z powodzeniem otrzymali warstwy tlenkowe bogate w Ca i P na stopach Ti-15Zr-xMo przez utlenianie mikrołukowe w elektrolicie składającym się z  $0,15 \text{ mol/dm}^3$  octanu wapnia i  $0,10 \text{ mol/dm}^3$  glicerofosforanu wapnia. Badania wykazały, że zanurzenie w roztworze Hanksa na 7 dni spowodowało zauważalną poprawę odpowiedzi bioaktywnej i wyższą żywotność osteoblastów.

Można zauważyć, że wyniki badań bioaktywności różniły się w zależności od zastosowanego medium, czasu zanurzenia, czy od samych parametrów procesu MAO.

#### **5.2.4. Antybakteryjność warstw MAO na stopach tytanu**

Przyjmuje się różne strategie funkcjonalizacji powierzchni MAO zwiększające potencjał antybakteryjny, w tym: modyfikacja morfologii powierzchni prowadząca do powstania nanochropowatości/porowatości, funkcjonalizacja powierzchni światłem UV, inkorporacja nanocząstek o działaniu antybakteryjnym (np. nanosrebro, nanomiedź, nanocynk), wprowadzanie antybakteryjnych jonów metali (np. srebra, miedzi, cynku), stosowanie antybiotyków (np. gentamecyna, amoksycylina), funkcjonalizacja powierzchni polimerami o właściwościach antybakteryjnych (np. chitozan), aż w końcu techniki łączące wyżej wymienione strategie w postaci warstw kompozytowych z biodegradowalnym polimerem, który wydłuży czas uwalniania czynnika biobójczego do organizmu [93].

Każda z metod opiera się na innym antybakteryjnym mechanizmie, do których należą: mechanizmy oparte na uwalnianiu substancji bakteriobójczej, mechanizm

kontaktowy, mechanizm pułapkowy typu “trap & kill”, czyli „złap i zabij”, czy mechanizm fotokatalityczny i fototermiczny [94], [127].

### ***Mechanizm oparty na uwalnianiu substancji bakteriobójczej***

Istnieje wiele rozwiązań warstw MAO, których działanie bakteriobójcze opiera się na lokalnym uwalnianiu substancji czynnych, a tym samym zmniejszeniu toksyczności ogólnoustrojowej i minimalizacji lekooporności w stosunku do substancji czynnych przyjmowanych doustnie. Kierunek postępu prac nad efektywnością tej metody wiąże się z zapewnieniem maksymalnej skuteczności biobójczej przy zachowaniu braku cytotoksyczności, a także wydłużeniu efektów terapeutycznych.

### ***Mechanizm kontaktowy***

Polega na łączeniu bakterii z powierzchnią implantu poprzez absorpcję fizyczną lub nieodwracalne wiązanie kowalencyjne. W rezultacie struktura błony bakterii może zostać zniszczona przez strukturę topologiczną, stan ładunku i/lub skład chemiczny powierzchni implantu, które mogą prowadzić do wycieku zawartości wewnątrzkomórkowej. Ponadto, niektóre powierzchnie kontaktowe mogą bezpośrednio zapobiec tworzeniu biofilmów poprzez niszczenie składników w EPS bez bezpośredniego zabijania bakterii. Ponieważ bakterie mogą infekować zarówno otaczającą tkankę, jak i powierzchnię implantu, ważne jest, by mechanizm kontaktowy uzupełniany był przez mechanizm oparty na uwalnianiu substancji bakteriobójczych.

### ***Mechanizm pułapkowy typu “trap & kill”, czyli „złap i zabij”***

Mechanizm ten oparty jest na dwutorowej strategii przyciągnięcia bakterii, a następnie ich dezaktywacji np. poprzez zaprojektowanie powierzchni o porowatości i składzie chemicznym sprzyjającym adhezji drobnoustrojów, a następnie ich wyeliminowanie poprzez selektywne działanie środków bakteriobójczych „ukrytych” w początkowo zapraszającej warstwie. Przykładem może być elektrostatyczne przyciąganie bakterii przez jony srebra, a następnie uszkodzenie ich membrany i śmierć i/lub uszkodzenie membrany poprzez mechaniczny kontakt z chropowatą powierzchnią.

### ***Mechanizm fotokatalityczny i fototermiczny***

Metoda ta oparta jest na wytwarzaniu aktywnych form tlenu (*Reactive Oxygen Scavengers ROS*) przy użyciu światła UV, które są w stanie inaktywować bakterie. Dezaktywacja bakterii polega min. na zatrzymaniu oddychania, krytycznym uszkodzeniu DNA, białek i innych składników wewnątrzkomórkowych na skutek nadmiernej

kumulacji ROS w komórce. Mechanizm fototermiczny wiąże się ze zjawiskiem generowania miejscowego ciepła pod wpływem napromieniowania światłem, prowadzącym do zakłócenia przepuszczalności błony i sygnałów metabolicznych, denaturacji białek/enzymów, a tym samym indukowania śmierci drobnoustrojów.

Dzięki występowaniu w MAO faz rutylu i anatazu, warstwy mogą wykazywać właściwości antybakteryjne wykorzystujące mechanizm fotokatalityczny. Jednak w celu zwiększenia możliwości biobójczych i uruchomienia innych mechanizmów antybakteryjnych konieczne jest włączenie środków przeciwdrobnoustrojowych.

Z przeglądu literaturowego na temat biofunkcjonalizacji warstw MAO wynika, że 100% powierzchni zawierających Ag, 93% powierzchni zawierających Cu, 73% powierzchni zawierających Zn i 100% powierzchni zawierających Ag, Cu i Zn spowodowało znaczną (tj. >50%) redukcję ładunku bakteryjnego [128].

Bezpośrednie dodawanie cząstek do elektrolitu jest skutecznym sposobem na poprawę różnych właściwości powłoki. Częstą praktyką jest wbudowywanie antybakteryjnych cząstek srebra, miedzi, cynku [44], [129].

Pierwiastki Ag, Cu i Zn są albo całkowicie rozpuszczane w elektrolicie, albo są dodawane w postaci nanocząstek, które tworzą zawiesinę. Te pierwsze znajdują się w postaci związków chemicznych obecnych na całej powierzchni, podczas gdy te drugie (NPs) rozprzestrzeniają się po powierzchni [128].

Na przykład Zhang i in. [130] badali wpływ stężenia nanocząstek miedzi (0; 0,3 i 3 g/dm<sup>3</sup>) na zachowanie antybakteryjne warstw MAO wobec bakterii *S. aureus*. Próbkę pokrytą Cu NPs wykazały doskonałą aktywność przeciwbakteryjną poprzez zabijanie kontaktowe i uwalnianie jonów, natomiast ocena cytokompatybilności *in vitro* ujawniła, że przy najwyższym stężeniu miedzi pojawia się cytotoksyczność.

Thukkaram i in. włączyli nanocząstki srebra (0,1; 0,5 i 1,0 g/dm<sup>3</sup>) do komercyjnie czystego tytanu wykorzystując metodę MAO. Wraz ze wzrostem zawartości srebra rosła aktywność przeciwbakteryjna przeciwko *E. coli* i *S. aureus*, głównie na podstawie mechanizmu kontaktowego i mechanizmu uwalniania jonów [131].

Niedawno Hengel i in. przeprowadzili proces MAO na próbkach wytworzonych metodą SLM przy użyciu elektrolitów opartych na CaP z dodatkiem nanocząstek srebra i cynku w proporcjach od 0 do 100%. Jony srebra i cynku były uwalniane z powierzchni

implantu przez 28 dni. Ponadto powierzchnie generowały reaktywne formy tlenu przyczyniając się w ten sposób do działania mechanizmu kontaktowego zabijania bakterii. Powierzchnie implantów zawierające do 75% srebra i 25% nanocząstek cynku całkowicie wyeliminowały bakterie przylegające, jak i planktoniczne *in vitro*. Dodatkowo, potwierdzono obecność silnego synergistycznego zachowania przeciwbakteryjnego, które można wykorzystać w celu zmniejszenia ilości wymaganych jonów srebra o dwa rzędy wielkości [132].

Kolejną strategią na włączenie substancji antybakteryjnych jest wykorzystywanie soli zawierających srebro, miedź lub cynk [133]–[135].

Na przykład, Shimabukuro i in. z powodzeniem wprowadzili cynk do warstw MAO z wykorzystaniem różnych stężeń soli cynku  $ZnCl_2$  (0; 0,5; 1,0; 2,5 mM). Badanie to przede wszystkim dowiodło, że stan chemiczny cynku wbudowanego w warstwę tlenu odegrał kluczową rolę w rozwoju jego działania przeciwbakteryjnego. Początkowo wykazano, że same jony Zn nie wykazywały żadnej aktywności przeciwbakteryjnej. Jednak w trakcie inkubacji w soli fizjologicznej, jony  $Zn^{2+}$  przekształciły się w nierozpuszczalny tlenek cynku ZnO, który przyczynił się do wytworzenia reaktywnych form tlenu i w sposób pośredni wpłynął na antybakteryjność. W połączeniu z wychwytywaniem bakterii przez porowaty dwutlenek tytanu, autorzy wskazali, że w ich badaniu zachodził mechanizm pułapkowy „złap i zabij” [135].

Oprócz nanocząstek i jonów metali, kolejną strategią wprowadzającą antybakteryjność do warstw MAO jest wykorzystywanie antybiotyków. Jednak w tym przypadku substancję czynną nie wprowadza się na drodze utleniania mikrołukowego, ale poprzez tworzenie kompozytów z polimerami nanoszonymi na uzyskane warstwy MAO, np. za pomocą metody zol-żel lub powlekania zanurzeniowego, które pozwalają na kontrolowane uwalnianie substancji aktywnej [82].

Stosowanie soli zawierających antybakteryjne związki metali jest bardziej ekonomicznym sposobem w porównaniu ze stosowaniem nanocząstek ze względu na ich wysoki koszt.

## 6. Zastosowanie wybranych dodatków bioaktywnych w implantacji

### 6.1. Zastosowanie srebra

W związku z postępem badań prowadzonym w kierunku długotrwałej szkodliwości nanocząstek na organizm, potencjalnej toksyczności komórkowej i hamowania osteointegracji, a także w dobie ogólnoświatowej oporności antybiotykowej, naukowcy ponownie kierują swoją uwagę ku antybakteryjnym metalicznym jonom, takim jak srebro ( $\text{Ag}^+$ ), które posiada silne działanie przeciwbakteryjne o szerokim spektrum, może przewyciężyć oporność na antybiotyki u Gram-dodatnich i Gram-ujemnych bakterii, a dodatkowo jest ekonomicznym rozwiązaniem w porównaniu do kosztownych nanocząstek [136].

Powszechnie uznaje się, że antybakteryjny mechanizm nieorganicznych środków przeciwbakteryjnych polega na uwalnianiu dodatnio naładowanych jonów metali, które oddziałują z ujemnie naładowanymi błonami komórkowymi bakterii, co powoduje naprzemienną przepuszczalność komórek bakteryjnych, prowadząc ostatecznie do przerwania integralności błony komórkowej i wycieku cytoplazmy wewnątrzkomórkowej [128], [129], [136].

Jednym z głównych wyzwań związanych z dodawaniem związków metalicznych na bazie soli, w tym srebra, jest dobranie odpowiedniego stężenia i tempa uwalniania jonów do organizmu, które przy zachowaniu oczekiwanego działania bakteriobójczego nie wywoła cytotoksyczności [129]. Stąd opracowanie odpowiednich parametrów procesu MAO, które pozwoli dostosować morfologię, grubość i skład warstwy tlenkowej, skład i stężenie stosowanych dodatków, jest niezwykle istotne.

Badania wykazały, że dla warstw MAO modyfikowanych srebrem, dostosowanie składu powierzchni, gdzie  $\text{Ag} \leq 1,5\%$  at. i szybkości uwalniania jonów  $\text{Ag} \leq 0,04 \text{ mg/m}^2/\text{dzień}$  zapewnia odpowiednie właściwości antybakteryjne i kompatybilność z komórkami osteogennymi bez jakiegokolwiek cytotoksyczności [137]. Z drugiej strony w badaniach powłoki HAp napyłanych srebrem (2,05% mas. Ag) nie obserwowano cytotoksyczności komórek prekursorowych osteoblastów przy zachowaniu właściwości antybakteryjnych [138]. W innych badaniach stwierdzono, że w zakresie 1,0-3,5% at. Ag, warstwa zachowuje niską toksyczność i wysokie



działanie przeciwdrobnoustrojowe [139]. Kumar i in. podali, że minimalne stężenie Ag wymagane dla skuteczności przeciwbakteryjnej wynosi 0,1 ppb [140].

W badaniach prowadzonych przez Song i wsp., tytan anodowano w roztworze elektrolitycznym zawierającym 0,04 mol/dm<sup>3</sup> pentahydratu soli disodowej  $\beta$ -glicerofosforanu i 0,4 mol/dm<sup>3</sup> monohydratu octanu wapnia, natomiast srebro wprowadzano w postaci AgNO<sub>3</sub> w stężeniu 0,00003 mol/dm<sup>3</sup> lub CH<sub>3</sub>COOAg w stężeniu 0,004 mol/dm<sup>3</sup>. Przy wyższym stężeniu srebra nie zaobserwowano proliferacji komórek MG63, a warstwy MAO były cytotoksyczne, chociaż zawartość Ag nie przekraczała 0,21–0,45% mas. Antybakteryjność w obu przypadkach wynosiła >99,8% względem bakterii *S. aureus* [141].

Z kolei w innych badaniach [142] porównano jedno- i dwuetapową metodę włączenia srebra. W przypadku jednoetapowej metody MAO użyto roztworu elektrolitycznego zawierającego 0,15 mol/dm<sup>3</sup> octanu wapnia, 0,05 mol/dm<sup>3</sup> diwodorofosforanu sodu i 0,00025 mol/dm<sup>3</sup> azotanu srebra. Podczas gdy w przypadku metody dwuetapowej do uzyskania warstwy MAO użyto roztworu zawierającego tylko 0,15 mol/dm<sup>3</sup> octanu wapnia i 0,05 mol/dm<sup>3</sup> diwodorofosforanu sodu, a następnie próbkę traktowano dalej jako katodę w elektrolicie zawierającym 0,0003 mol/dm<sup>3</sup> AgNO<sub>3</sub>. Z warstw otrzymanych dwuetapowo uwalniało się więcej jonów i uwalnianie to miało bardziej stabilny charakter niż w przypadku warstw uzyskanych w procesie jednoetapowym. W obu przypadkach po 24 h inkubacji wskaźnik działania przeciwbakteryjnego wynosił ponad 99,9% przeciwko *E. coli*. W żadnym przypadku nie wykazano cytotoksyczności warstw.

Z wyników testów antybakteryjnych przeprowadzonych przez grupę badawczą Shimabukuro i in. wynika, że wszystkie traktowane MAO próbki zawierające  $\geq 0,004$  mM Ag wykazały doskonałe działanie przeciwbakteryjne przeciwko *E. coli*. Zwłaszcza *E. coli* została całkowicie wyeliminowana w próbkach wykonanych w elektrolicie zawierającym 0,05 mM AgNO<sub>3</sub> lub wyższym. Ponadto, wszystkie próbki potraktowane MAO zawierające  $\geq 0,5$  mM Ag również wykazywały doskonałe działanie przeciwbakteryjne przeciwko bakterii *S. aureus*. W teście proliferacji większość próbek traktowanych MAO ( $\leq 0,5$  mM AgNO<sub>3</sub>) wykazała takie same wyniki jak próbki nietraktowane i traktowane MAO bez Ag. Granicznym stężeniem było 2,5 mM AgNO<sub>3</sub>, przy którym stwierdzono istotne zahamowanie wzrostu komórek [137].



W innych badaniach Tsutsumi i in. wykazali, że progowe stężenie  $\text{AgNO}_3$  dla uzyskania właściwości antybakteryjnych stopu TNTZ wynosiło od 0,05 do 0,5 mM [143].

W porównaniu do warstw powstałych z elektrolitów z dodatkiem 0,1 lub 0,4 g  $\text{AgNO}_3$ , według autorów,  $0,1 \text{ g/dm}^3 \text{ AgNO}_3$  wydaje się być bardziej obiecującym stężeniem dla elektrolitu MAO do syntezy bioaktywnej warstwy na implantach na bazie tytanu, wykazując wystarczającą aktywność przeciwbakteryjną przy zmniejszonym ryzyku cytotoksyczności. Jednak wnioski dotyczące potencjalnej biokompatybilności przeprowadzono na podstawie analizy morfologii otrzymanych warstw i w teście zanurzeniowym w SBF, nie przeprowadzono tu natomiast testów komórkowych sprawdzających potencjalną cytotoksyczność. Antybakteryjność w obu przypadkach wynosiła  $>97\%$  [144].

W tabeli 4 przedstawiono dane literaturowe odnośnie badań przeprowadzonych z użyciem azotanu srebra jako źródła jonów Ag.

## 6.2. Zastosowanie galu

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie galem - półmetalicznym pierwiastkiem zorientowanym w 13 (IIIa) kolumnie w układzie okresowym, który wykazuje potencjał w leczeniu chorób związanych z kośćmi. Oprócz zdolności do stymulowania komórek osteoblastycznych, hamowania resorpcji kości (poprzez hamowanie utraty wapnia), poprawy angiogenezy, właściwości przeciwnowotworowych, gal wykazuje także znaczące działanie antybakteryjne. Cechy te odróżniają gal od innych powszechnie występujących jonów terapeutycznych i motywują naukowców do opracowywania strategii zwiększenia efektywności wykorzystania galu jako materiał bioaktywny do zastosowań wielofunkcyjnych [145].

Istnieją 3 podstawowe sposoby dostarczania galu do organizmu: doustne aplikowanie galu w postaci soli (mała dawka trafia do kości), dożylnie wlewy przez 5 - 7 dni (czasochłonne) oraz dodawanie galu bezpośrednio do wymaganego miejsca i kontrola jego uwalniania (np. jako aktywny dodatek do powłok) [146].

Gal występuje na trzecim stopniu utlenienia ( $\text{Ga}^{3+}$ ) i chociaż sam nie pełni żadnej istotnej funkcji w organizmie, ma istotne podobieństwo do  $\text{Fe}^{3+}$  (zbliżone promienie

jonowe, potencjał jonizacji, wartość powinowactwa elektronowego). Dzięki tym podobieństwom, gal może wiązać się z białkami poprzez receptory transferyny wychwytyjące żelazo. Gal po wnikięciu do komórki łączy się z reduktazą rybonukleotydową, odpowiedzialną za replikację i naprawę DNA oraz zapobiega jego aktywności, czego efektem jest apoptoza (samobójstwo) komórki drogą mitochondrialną. Przedstawiony mechanizm destrukcji zachodzi tylko i wyłącznie w przypadku zwiększenia zapotrzebowania danej komórki na żelazo, a co za tym idzie, zwiększenia poboru galu. Taka sytuacja zachodzi m.in. w kontakcie z nowotworem lub z bakteriami. Żelazo jest kluczowym elementem w metabolizmie bakterii. W trakcie infekcji bakterie stają przed problemem deficytu żelaza, gdyż układ odpornościowy ogranicza jego dostępność w celu zapobiegania namnażaniu się bakterii. Prowadzi to do powstawania mechanizmu zwiększenia powinowactwa do żelaza, które skutecznie wykorzystuje gal. Nie bez przyczyny działanie galu kojarzone jest ze strategią „Konia Trojańskiego” [85], [146], [147].

Badania wskazują, że gal ma silne działanie hamujące wzrost wielu istniejących szczepów bakterii: *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. gingivalis*, *S. pyogenes*, *S. gordonii*, czy *P. gingivalis*, *E. coli* [148].

Oprócz właściwości antybakteryjnych i przeciwnowotworowych, gal wykazuje także właściwości osteogenne. Mechanizm ten polega na zapobieganiu rozkładowi kości na drodze redukcji aktywności osteoklastów odpowiedzialnych za resorpcję tkanki kostnej, bez negatywnego wpływu na żywotność osteoblastów. Dodatkowo badania wykazują, że kości w towarzystwie galu zwiększają zawartość wapnia i fosforu. Zakłada się, że zastosowanie galu jako dodatek do powłok ceramicznych może wywołać efekt synergii do regeneracji kości [147].

Pomimo doskonałych właściwości terapeutycznych, gal ma kilka wad w zastosowaniu, na przykład  $Ga^{3+}$  praktycznie hydrolizuje do nierozpuszczalnego wodorotlenku w warunkach fizjologicznych. Co więcej, uwalnianie  $Ga^{3+}$  w kontrolowany sposób jest trudne. Aby uniknąć tych problemów, jony galu są włączane do innych biomateriałów, zwiększając tym samym wartość użytkową [147].

$Ga(III)$ , występuje m.in. w postaci azotanów, chlorków i maltolanów. Ze względu na możliwość powstania niebezpiecznego gazowego chlorowodoru niektórzy autorzy

przestrzegają przed stosowaniem chlorku galu jako źródła galu, a w zamian za to proponują dużo bezpieczniejszy azotan galu  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ , który również wykazuje doskonałe właściwości terapeutyczne, a ponadto został zatwierdzony przez amerykańską agencję do spraw żywności i leków (FDA) [149].

W ostatnich latach wykonano wiele cennych prac badawczych z udziałem galu w zastosowaniach medycznych, badano m.in. metalurgiczne wprowadzanie galu do stopów tytanu [150] lub włączanie jonów galu do fosforanów wapnia, m.in. hydroksyapatytu [151],  $\beta$ -fosforanu trójwapniowego [152], cementu fosforanowo-wapniowego [153], czy bioszklą [146].

Istnieje wiele sposobów włączania  $\text{Ga}^{3+}$  do fosforanów wapniowych, może on znajdować się w strukturze lub być adsorbowany na powierzchni. Proces domieszkowania polega na śródmiąższowym wbudowaniu jonu lub jego umieszczeniu pomiędzy warstwami atomów. Wpływ tego, jak jony  $\text{Ga}^{3+}$  są domieszkowane lub podstawione w konwencjonalnych fosforanach, nie został jeszcze poznany [154]. Wprowadzanie galu do powłok opierało się głównie na metodzie zanurzeniowej [155], hydrotermalnej wymianie jonów [156], rozpylaniu magnetronowym [157], czy elektroforetycznym osadzaniu [158].

W literaturze przedmiotu, nie ma wielu badań dotyczących implementacji galu na drodze utleniania mikrołukowego. Jednym z przykładów są badania na stopie Ti–6Al–4V poddanym obróbce MAO w roztworach alkalicznych składających się z fosforanu sodu ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ), azotanu galu ( $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ ), krzemianu sodu ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ) i siarczanu sodu ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Wykorzystano elektrolity zawierające 2-6  $\text{g}/\text{dm}^3$  azotanu galu, a wytworzone warstwy zawierały gal w zakresie od 3,13 do 13,50% mas. Badając wpływ poszczególnych składników na właściwości powstałych warstw wykazano, że azotan galu negatywnie wpływa na formowanie warstw MAO [159].

Inna grupa badawcza podjęła także badania polegające do porównaniu działania jonów galu i srebra. Cochis i in. przeprowadzili utlenianie mikrołukowe w elektrolitach z azotanem galu lub azotanem srebra w jednakowym stężeniu równym 0,004 M. Wyniki w obu przypadkach wykazały brak efektów cytotoksycznych, poprawę adhezji i proliferacji fibroblastów oraz właściwości antybakteryjnych. Ponadto, przeprowadzone badania *in vivo* wykazały wyższą skuteczność galu niż srebra w zmniejszeniu kolonii

bakterii. Jednak w badaniu tym kluczową rolę wykazywało użycie związku chelatującego jony galu (cysteina lub kwas szczawiowy) [160].

W innym badaniu, Cochis i in. przeprowadzili modyfikację MAO i sprawdzili wpływ tytanu domieszkowanego srebrem lub galem na lekooporny szczep *A. baumannii*. W badaniu wykorzystano nanocząstki srebra ( $3\text{g/dm}^3$ ) lub azotan srebra (0,004 M) lub azotan galu (0,004 M) z dodatkiem cysteiny lub kwasu szczawiowego. Badania wskazały, że próbki domieszkowane galem działały najlepiej pod względem hamowania rozwoju bakterii zmniejszając ich żywotność w granicach 53-71%. Wszystkie modyfikacje wykazywały brak cytotoksyczności [161].

W literaturze przedmiotu pojawiły się badania wykorzystujące azotan galu do modyfikacji materiałów otrzymywanych metodą addytywną. Rodríguez-Contreras, i in. przeprowadzili modyfikację skafoldów drukowanych metodą 3D (*direct ink writing*, *DIW*), wykorzystując hydrotermalną wymianę jonową. Próbki moczoano zanurzeniowo w roztworze chlorku wapnia (100 mM), zawierającym różne stężenia azotanu galu 5, 10, 50 lub 100 mM. Badania wykazały brak cytotoksyczności modyfikowanych próbek, a proliferacja komórek malała wraz ze wzrostem stężenia galu. Badania właściwości antybakteryjnych wykazały, że dla szczepu *E. coli* zahamowanie wzrostu stwierdzono tylko przy najwyższym zastosowanym stężeniu azotanu galu (100 mM), natomiast wobec bakterii *S. aureus* próbki w ogóle nie wykazały właściwości antybakteryjnych [149].

Jednak powyższe badania nie uwzględniają modyfikacji metodą MAO, a techniką wytworzenia nie jest SLM, a odmienna technika przyrostowa - DIW.

Według najlepszej wiedzy autorki, nie wykonano badań warstw otrzymanych metodą MAO w elektrolicie zawierającym azotan galu na materiałach wytworzonych poprzez selektywnie topienie laserowe.

W tabeli 4 przedstawiono przykłady literaturowe uwzględniające badania przeprowadzone z użyciem azotanu srebra jako źródła jonów srebra, azotanu galu jako źródła jonów galu oraz badań uwzględniających porównanie działania azotanu galu i azotanu srebra.

Tabela 4 Przykłady literaturowe wykorzystujące elektrolity zawierające wapń i fosfor z dodatkiem azotanu srebra i/lub galu do wytwarzania warstw MAO, wraz z parametrami procesu MAO i wybraną charakterystyką otrzymanych warstw

| Stop tytanu | Elektrolit   | Parametry procesu                            | Topografia powierzchni   | Fazy XRD   | Zawartość Ag na powierzchni | Uwalnianie Ag             | Antybakteryjność   | Biokompatybilność   | Literatura |
|-------------|--|--|--|--|-----------------------------|---------------------------|--|---|------------|
| <b>Ag</b>   |  |  |  |  |                             |                           |  |   |            |
| CP-Ti       | 0,15 M CA,<br>0,05 M<br>NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,<br>0,25 mM<br>AgNO <sub>3</sub> | 280–320 V<br>DC:<br>300 Hz,<br>50%<br>6 min. | Porowata<br>powierzchnia,<br>Rozmiar porów<br>ok. 1,5 μm                             | Anataz,<br>rutyl   | 0,13% at.                   | 3-5 ppb (po<br>18 dniach) | <u>Metodologia:</u><br><i>E. coli</i> , 24 h,<br>10 <sup>6</sup> CFU/ml.<br>Badanie bakterii<br>adherentnych.<br>Fluorescencyjny<br>Zliczanie kolonii<br><br><u>Wyniki:</u><br>>99,9%<br>bakteriobójczości | <u>Metodologia:</u><br>Test MTS, 24 h,<br>komórki: HEP.<br><br><u>Wyniki:</u><br>Brak cytotoksyczności,<br>wzrost proliferacji<br>w związku z dodatkiem<br>Ag   | [142]      |
| CP-Ti       | 0,04 M β-<br>GP, 0,4 M<br>CA,<br>0,00003M<br>AgNO <sub>3</sub>                             | 380-450 V,<br>180 min                        | Nieregularna<br>i chropowata<br>morfologia<br>z kulistymi<br>cząstkami<br>i płatkami | Rutyl, α-<br>TCP, β-<br>Ca <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ,<br>HAp | 0,21–0,45%<br>mas.          | -                         | <u>Metodologia:</u><br><i>S. epidermidis</i> i <i>S.</i><br><i>aureus</i> , 24h, 1,6·10 <sup>5</sup><br>CFU/mL<br>Planktoniczne,<br>zliczanie kolonii<br><br><u>Wyniki:</u>                                | <u>Metodologia:</u><br>Komórki MC3T3-E1,<br>5 × 10 <sup>4</sup> kom./cm <sup>2</sup> , 1, 4,<br>7 dni, liczenie<br>zestawem CCK-8<br>+SEM<br><br><u>Wyniki:</u> | [138]      |

|       |  |                                  |  |                 |              |   |   |  |       |
|-------|--|----------------------------------|--|-----------------|--------------|---|---|--|-------|
|       |  |                                  |  |                 |              |   | Po 24 h: >99,8<br>redukcja dzięki<br>włączeniu >0,1%<br>mas. Ag,<br>w porównaniu<br>z redukcją o 20%<br>przy braku Ag   | Nie zaobserwowano<br>proliferaacji komórek<br>MG63   |       |
| Cp-Ti | 100 mM<br>GP, 150<br>mM CA, 0-<br>10 mM<br>AgNO <sub>3</sub> | 251 A/m <sup>2</sup> ,<br>10 min | Porowata<br>warstwa tlenku<br>dla 0 i 5 mM<br>Ag,<br>5mM Ag jest<br>górną granicą<br>tworzenia<br>warstwy MAO,<br>nieporowata<br>powierzchnia<br>dla 10 mM Ag, | Anataz,<br>α-Ti | 0,5-3,2% at. | - | <u>Metodologia:</u><br><i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> ,<br>10 <sup>8</sup> CFU/dm <sup>3</sup> , 24 h<br>Bakterie adheretne,<br><br><u>Wyniki:</u><br>Po 24 h: >0,05 mM<br>Ag w elektrolicie<br>PEO redukcja<br>bakterii >90%. Przy<br>2,5mM wynosił<br>>99,9%<br>Efekt hamujący był<br>silniejszy<br>w przypadku <i>E. coli</i><br>w porównaniu z <i>S.</i><br><i>aureus</i><br>Zliczanie kolonii | <u>Metodologia:</u><br>MC3T3-E1, 10 000<br>kom/cm <sup>2</sup> , 1,2,3 dni,<br>liczenie komórek:<br>CCK-8, czytnik<br>mikroplątek, test ALP,<br>Analiza zwapnień<br><br><u>Wyniki:</u><br>2,5 mM wykazywało<br>cytotoksyczność | [137] |

|                   |   |                               |  |  |               |   |   |     |       |
|-------------------|---|-------------------------------|--|--|---------------|---|---|-----|-------|
| CP-Ti,<br>Ti-40Nb | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>NaOH,<br>β-Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ,<br>0,3—1,0<br>g/dm <sup>3</sup><br>AgNO <sub>3</sub> | 200–450<br>V, 5-10<br>min, DC | Jednociele<br>rozmeszczone<br>cząstki β-TCP<br>na porowatej<br>powierzchni<br>z porami<br>o wielkości<br>do 8 μm | Anataz,<br>α-TCP, β-<br>TCP                            | 0,2 -0,8% at. | -   | <i>S. aureus</i> , 2 h,<br>500CFU/ml,<br>planktoniczne,<br>Po 2 godzinach:<br>53% redukcja CFU<br><br>Zliczanie kolonii,<br>gęstość optyczna  | -   | [162] |
| Ti-6Al-4V         | CA, β-GP<br>and 0,1 i 0,4<br>g/dm <sup>3</sup><br>AgNO <sub>3</sub>   | 400 V, 5<br>min               | Ziarnista<br>i igłowa<br>morfologia<br>z Ag Np 20–30<br>nm   | Ti,<br>anataz,<br>rutyl, HA<br>i<br>CaTiO <sub>3</sub> | 0,6-2,1% mas. | 2,85-3,83<br>ppm/dzień,<br>a po 14<br>dniach:<br>0,20-0,50<br>ppm/dzień | <u>Metodologia:</u><br><i>E. coli</i> , 24 h,<br>10 <sup>9</sup> CFU/mL,<br>bakterie<br>planktoniczne,<br>liczenie<br>kolonii+strefa<br>zahamowania<br>wzrostu<br><br><u>Wyniki:</u><br>Po 24 h: redukcja<br>o 97,4 i 99,2%<br>przez dodanie 0,6<br>i 2,1% mas. Ag,<br>w porównaniu<br>z redukcją o 22,7%<br>przy braku Ag. | SBF | [144] |



|                    |   |   |   |                   |   |   |  |  |       |
|--------------------|---|---|---|-------------------|---|---|--|--|-------|
| Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr | 0,15 M CA,<br>0,1 M Ca-GP,<br>0 - 5 mM AgNO <sub>3</sub>  | 251 A/m <sup>2</sup> ,<br>10 min                    | Porowata struktura, rozmiar porów <10 μm                            | -                 | 0,01% mas.                                | -   | <u>Metodologia:</u><br><i>E. coli</i> , 24 h, 106 CFU/ml,<br>planktoniczne bakterie<br><br><u>Wyniki:</u><br>100% martwych bakterii<br>w obecności 0,01% mas. Ag po 24 h | Hanks  | [143] |
| <b>Ga</b>          |   |   |   |                   |   |   |  |  |       |
| Ti6Al4V            | Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ,<br>Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub><br>Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub><br>2-6g/dm <sup>3</sup><br>Ga(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> | 2-4 min.,<br>150-250 mA/cm <sup>2</sup>             | Porowata struktura, wraz ze wzrostem zawartości Ga mniejsza grubość | Anataz, rutil, Ti | 3,13-13,50% mas.                          | -   | -  | SBF  | [159] |
| <b>Ag+Ga</b>       |   |   |   |                   |   |   |  |  |       |
| Cp-Ti              | 0,004M:<br>Ga(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> /<br>AgNO <sub>3</sub> ,<br>Cysteina (Ciss)/kwas szczawiowy (Oss)  | 295-325 V,<br>10 mA/cm <sup>2</sup> ,<br>10-13 min. | nanometrowe-3 μm, dodatek galu obniżył grubość warstw               | Ti, anataz,       | Analiza jakościowa: widoczny gal i srebro | Ag Cis po 24 h: 23 μg/Lcm <sup>2</sup> , po 2 4h brak uwalniania. | <u>Metodologia:</u><br><i>A. baumannii</i> , 72 h, adherentne, zliczanie kolonii, SEM,   | <u>Metodologia:</u><br><i>Saos-2</i> , 10 <sup>4</sup> kom./cm <sup>2</sup> , 1, 4, 7, 14 i 21 dni, żywotność komórek, ALP, SEM, mikrofluorescencyjny, | [160] |

|  |  |  |  |  |  |  |  |   |  |
|--|--|--|--|--|--|--|--|---|--|
|  |  |  |  |  |  | <p>GaCiss: 4-21 dni: 1,1-1,3 <math>\mu\text{g/Lcm}^2</math>,<br/>GaOss: wzrost uwalniania od 1-7 dni: 62 -120 <math>\mu\text{g/Lcm}^2</math>, do 21 dnia ok 70-80 <math>\mu\text{g/Lcm}^2</math></p> | <p><u>Wyniki:</u><br/>AgCis: redukcja ok. 45%,<br/>GaCiss: 53%,<br/>GaOss: 72%</p> | <p><u>Wyniki:</u><br/>Brak statystycznych różnic między próbkami, brak cytotoksyczności.<br/>Po 21 dniach GaOss wykazywał wyższe ALP.</p> |  |
|--|--|--|--|--|--|--|--|---|--|

Niewiele literatury przedstawia badania stosowania warstw MAO na drukowanych materiałach przeznaczonych na implantach.

Jedna z grup zbadala wpływ utleniania mikrołukowego na właściwości stopu tytanu wytworzonego metodą SLM. W tym celu wykorzystano stop Ti-6Al-4V oraz elektrolit wodnego roztworu 0,1 M  $C_4H_6CaO_4 \cdot H_2O$ , 0,06 M  $Na_2HPO_4$  i NaOH. MAO było przeprowadzane w trybie prądu zmiennego. Badania wykazały, że nierównowagowa mikrostruktura stopu TC4 powstała na skutek wytwarzania metodą SLM istotnie wpływa na proces wzrostu warstw MAO. Między innymi, na powierzchni warstw wytworzyło się więcej mniejszych porów w porównaniu z innymi pracami, co autorzy tłumaczyli powstaniem struktury o mniejszych ziarnach na skutek zastosowanej metody SLM, co zapewniło znacznie więcej mniejszych kanałów wyladowczych dla procesu MAO. Dodatkowo, brak wykrycia  $CaTiO_3$  w badaniu XRD skorelowano z dużą powierzchnią międzyfazową na granicach ziaren w stopie TC4 wytwarzanym metodą SLM, przez co gęstość energii była niewystarczająca do przeniesienia CaO do fazy  $CaTiO_3$  [163].

Z przeprowadzonego przeglądu literaturowego można zauważyć, że ilość Ag wbudowanego w powierzchnie materiałów wynosiła  $1,35 \pm 1,82\%$  mas. Jednak dane dotyczące granicznej zawartości srebra, która mogła powodować cytotoksyczność, były różne w zależności od warunków prowadzonych badań. Gal także miał bardzo różne zakresy aktywności, w zależności od metody jego stosowania, jak i występowania związków towarzyszących.

Działanie bakteryjne i bioaktywne zależało od wielu czynników, takich jak zastosowanie środka antybakteryjnego i jego dawki, rodzaju testu, wielkości i rodzaju inokulum bakteryjnego/zawiesiny komórkowej, morfologii powierzchni, składu chemicznego warstwy i stopu, itd. Ponadto przegląd metod wytwarzania i ich wpływu na mikrostrukturę otrzymanego stopu ukazuje istotny, choć wciąż mało poznany, wpływ na formowanie się warstw MAO. Mechanizmy włączania antybakteryjnego srebra lub galu do materiałów wytworzonych metodą SLM będą się różniły od tych wytworzonych metodą tradycyjną.

Według najlepszej wiedzy autorki w literaturze przedmiotu nie badano porównania włączania srebra i galu na drodze mikrołukowego utleniania anodowego na materiały wytworzone metodą selektywnego topienia laserowego.



## **CZEŚĆ BADAWCZA**



## 7. TEZA, CEL i ZAKRES PRACY

Tezy:

1. Modyfikacja powierzchniowa stopu tytanu za pomocą utleniania mikrołukowego o odpowiedniej kombinacji parametrów procesu i wytworzenie warstw zawierających wapń i fosfor z dodatkiem srebra lub galu, zwiększa biogodność oraz aktywność biologiczną implantu tytanowego, nie wpływając niekorzystnie na właściwości mechaniczne i adhezję warstw.

2. Nierównowagowa mikrostruktura materiałów wytworzonych metodą SLM istotnie wpływa na proces wzrostu i właściwości warstw MAO wymagając opracowania dedykowanej strategii parametrów procesu modyfikacji w stosunku do materiałów wytwarzanych w konwencjonalny sposób.

Cel główny:

Addytywne wytworzenie stopu tytanu przeznaczonego na implanty, z wykorzystaniem technologii selektywnego topienia laserowego (SLM), a następnie jego biofunkcjonalizacja za pomocą utleniania mikrołukowego (MAO), w celu oceny wpływu zastosowanych parametrów na właściwości otrzymanych materiałów pod kątem zastosowania na implanty.

Cele szczegółowe:

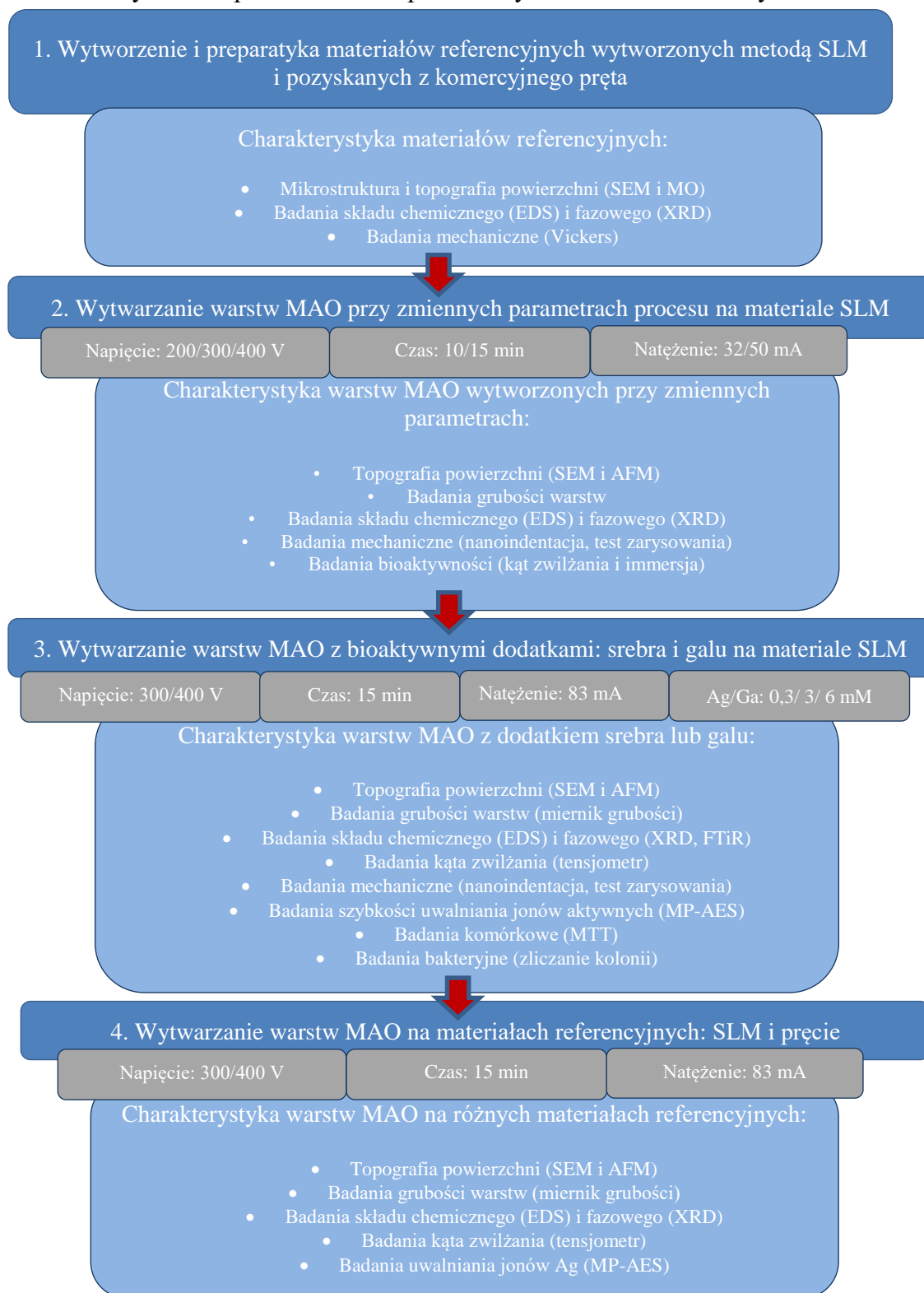
- 1.1. Ocena wpływu parametrów procesu MAO na charakterystykę otrzymanych warstw;
- 1.2. Ocena wpływu czynników bioaktywnych na odpowiedź komórkową i właściwości antybakteryjne otrzymanych warstw;
- 1.3. Ocena wpływu metody wytwarzania materiału bazowego na zastosowaną modyfikację.

Cel użytkowy:

Poprawa skuteczności implantacyjnej biomateriałów wytwarzanych metodą druku 3D poprzez minimalizację przyczyn odrzucania implantów na drodze zmniejszenia

prawdopodobieństwa wystąpienia wczesnych odczynów zapalnych, poprawy odpowiedzi komórkowej i przyczepności warstwy do podłoża.

Na rysunku 7 przedstawiono uproszczony schemat badań własnych.



Rysunek 7 Uproszczony schemat badań własnych



## 8. MATERIAŁY I METODYKA BADAWCZA

### 8.1. Materiały do badań

#### 8.1.1. Stop tytanu Ti-13Zr-13Nb wytworzony metodą SLM

Cylindryczne próbki (krążki o średnicy 20 mm i grubości 3 mm) wytworzono techniką addytywną selektywnego topienia laserowego (SLM) przy użyciu sferycznego proszku Ti - 13Zr-13Nb (TLS Technik GmbH & Co. Spezialpulver KG, Bitterfeld-Wolfen, Niemcy) o składzie chemicznym [164] przedstawionym w tabeli 5 i wielkości cząstek w zakresie od 20 do 70  $\mu\text{m}$ .

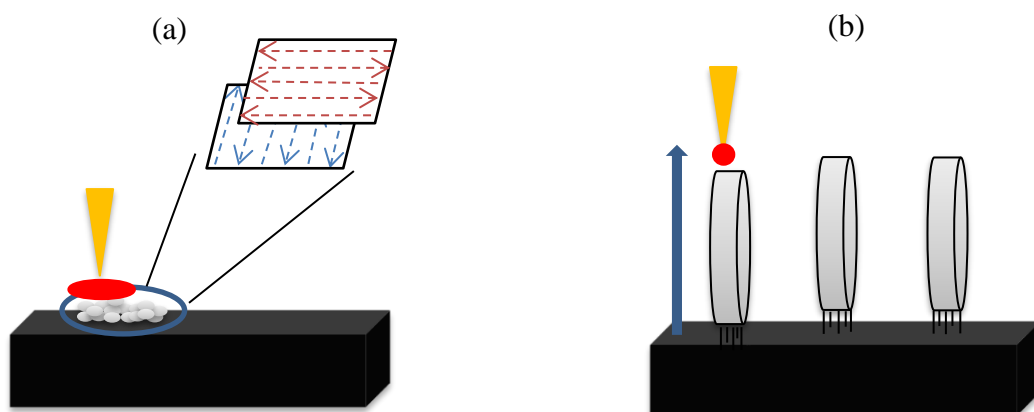
Tabela 5 Skład chemiczny proszku stopu Ti-13Zr-13Nb

| Skład chemiczny proszku stopu Ti-13Zr-13Nb |       |       |       |       |       |       |       |           |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|
| Pierwiastek                                | Nb    | Zr    | Fe    | C     | N     | O     | H     | Ti        |
| Stężenie mas. [%]                          | 13,00 | 13,00 | 0,005 | 0,004 | 0,019 | 0,011 | 0,001 | pozostałe |

Próbki zaprojektowano przy użyciu oprogramowania Materialise Magics (Materialise NV, Ghent, Belgia). Za pomoc programu CAD modele 3D przekształcono do plików \*.stl (formatu na potrzeby drukowania przestrzennego) i wraz z wygenerowanymi podporami wydrukowano z wykorzystaniem urządzenia SLM 100 (Realizer GmbH, Borchon, Niemcy) wyposażonego w iterbowy jednotrybowy laser światłowodowy CW YLR-100-SM (IPG Laser GmbH, Burbach, Niemcy) wykorzystujący długość fali 1070 nm.

Dobór parametrów procesu SLM dokonany był na podstawie wcześniejszych badań [164]. Proces odbył się w ochronnej atmosferze argonu (jakość 4.8), przy użyciu lasera o mocy 76 W. Średnica plamki wiązki lasera wynosiła 120  $\mu\text{m}$ , grubość warstw proszkowych 25  $\mu\text{m}$ , czas ekspozycji 40  $\mu\text{s}$ , a odległość między punktami skanowania 20  $\mu\text{m}$ .

Orientacja próbek względem platformy roboczej SLM wyniosła 90°. Natomiast ścieżka skanowania w ramach jednej warstwy była naprzemienna (dwukierunkowa), a w każdej kolejnej warstwie następował obrót orientacji ścieżki lasera o 90°, co zostało schematycznie przedstawione na rys. 8.



Rysunek 8 Schemat procesu SLM: początek procesu budowania próbki, spiekanie proszku wiązką lasera według przedstawionej ścieżki skanowania (a), końcowy etap budowania próbek ukazujący próbki umieszczone na podporach, kierunek budowania elementu i orientację względem platformy roboczej pod kątem 90°(b)

Po procesie drukowania, podpory usunięto mechanicznie z użyciem obcęgów i obróbki strumieniowo-ścierniej cząstkami tlenku glinu (50  $\mu\text{m}$ ). Następnie, próbki szlifowano mechanicznie na mokro, z wykorzystaniem szlifierko-polerki Saphir 330 (ATM GmbH, Mammelzen, Niemcy) i papierów ściernych wykonanych z węgliku krzemu (SiC) o gradacji P150, P500 i P800  $\mu\text{m}$ . Po szlifowaniu, próbki poddano trzyetapowemu czyszczeniu i odtłuszczeniu przy użyciu myjki ultradźwiękowej (Sonic 3, Polsonic, Polska) w acetonie, następnie izopropanolu i na końcu w wodzie destylowanej (10 min na każdy etap). Bezpośrednio po czyszczeniu, próbki suszono strumieniem powietrza i pozostawiono w temperaturze pokojowej.

### 8.1.2. Komercyjny stop tytanu Ti-13Zr-13Nb

Do badania wpływu metody wytwarzania próbek referencyjnych na charakterystykę zmodyfikowanej warstwy wierzchniej zastosowano walcowany na gorąco pręt ze stopu Ti - 13Zr-13Nb dostarczony przez dostawcę komercyjnego (Xi'an SAITE Metal Materials Development Co., Ltd., Xi'an, Chiny) o składzie przedstawionym w tabeli 6.

Tabela 6 Skład chemiczny stopu Ti-13Zr-13Nb

| Skład chemiczny stopu Ti-13Zr-13Nb |            |           |           |      |           |      |       |           |
|------------------------------------|------------|-----------|-----------|------|-----------|------|-------|-----------|
| Pierwiastek                        | Nb         | Zr        | Fe        | C    | N         | O    | H     | Ti        |
| Stężenie mas. [%]                  | 13,5-14,00 | 13,5-13,8 | 0,06-0,06 | 0,04 | 0,01-0,02 | 0,11 | 0,001 | pozostałe |

Próbki zostały pocięte na krążki o średnicy 20 mm i grubości 3 mm. Powierzchnię próbek poddano szlifowaniu, czyszczeniu i suszeniu utrzymując te same procedury, co w przypadku materiałów wytworzonych metodą SLM.

## **8.2. Modyfikacja powierzchni – wytworzenie warstw MAO**

W celu określenia wpływu parametrów wytwarzania warstw MAO na ich właściwości, proces utleniania mikrołukowego przeprowadzono z wykorzystaniem zasilacza prądu stałego (PL-650-0.1, Matsusada Precision Inc., Shiga, Japonia) w Tokyo Medical and Dental University.

Zmiennymi parametrami procesu było: napięcie (200, 300 i 400 V), natężenie (32, 50 mA) oraz czas (15 i 10 min). Gęstość prądu wynosiła odpowiednio 175 i 283 A/m<sup>2</sup>. Proces utleniania mikrołukowego przeprowadzono w mieszaninie 0,1 M glicerofosforanu wapnia C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>CaO<sub>6</sub>P (GP) i 0,15 M octanu wapnia Ca(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> (CA) (dalej zwanej elektrolitem bazowym), stanowiących źródło jonów wapnia i fosforu. Dobór elektrolitu bazowego dokonany został na podstawie wcześniejszych badań [135], [165].

Oznaczenia warstw MAO wytworzonych przy różnych parametrach procesu przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7 Oznaczenia warstw MAO wytwarzanych przy zmiennych parametrach procesu: napięcia, natężenia i czasu

| Parametry procesu MAO      |                                |              |                |            |  |
|----------------------------|--------------------------------|--------------|----------------|------------|--|
| Oznaczenie próbek w grupie | Oznaczenie próbek w podgrupach | Napięcie [V] | Natężenie [mA] | Czas [min] | Elektrolit i stężenie [mol/dm <sup>3</sup> ] |
| MAO_200                    | MAO_32_15_200                  | 200          | 32             | 15         | 0,1 GP<br>0,15 CA                            |
|                            | MAO_32_10_200                  |              | 32             | 10         |  |
|                            | MAO_50_10_200                  |              | 50             | 10         |  |
| MAO_300                    | MAO_32_15_300                  | 300          | 32             | 15         |  |
|                            | MAO_32_10_300                  |              | 32             | 10         |  |
|                            | MAO_50_10_300                  |              | 50             | 10         |  |
| MAO_400                    | MAO_32_15_400                  | 400          | 32             | 15         |  |
|                            | MAO_32_10_400                  |              | 32             | 10         |  |
|                            | MAO_50_10_400                  |              | 50             | 10         |  |
| Kontrola                   | -                              | -            | -              | -          | -  |

Kontynuację badań przeprowadzono na zaprojektowanym i zbudowanym na Politechnice Gdańskiej stanowisku do utleniania mikrołukowego z wykorzystaniem zasilacza prądu stałego (MR100020, B&K PRECISION Corp., Stany Zjednoczone).

Zmiennymi parametrami procesu były napięcie: 300 i 400 V, oraz skład elektrolitu: elektrolit bazowy składający się z GP (Tokyo Chemical Industry) i CA (Chempur), elektrolit bazowy z dodatkiem trzech stężeń azotanu srebra AgNO<sub>3</sub> (Ag) (Stanlab), elektrolit bazowy z dodatkiem trzech stężeń azotanu galu Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (Ga) (Sigma Aldrich) oraz elektrolit bazowy z mieszaniną azotanu srebra i azotanu galu w jednym stężeniu. Proces przeprowadzano przez 15 min przy natężeniu prądu 83 mA (gęstość prądu 500 A/m<sup>2</sup>).

Przygotowanie roztworu z azotanem galu rozpoczynano od rozpuszczenia Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> w wodzie destylowanej, następnie pH roztworu doprowadzano do wartości 9,0 za pomocą NaOH, a dopiero na koniec dodawano GP i CA i pozostawiano na 12 h przy ciągłym mieszaniu.

Oznaczenia warstw MAO wytworzonych w różnych elektrolitach, przy dwóch napięciach przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8 Oznaczenia warstw MAO wytwarzanych w zmiennych parametrach procesu: napięcia i składu elektrolitu

| Parametry procesu MAO |              |                |            |                                   |     |        |        |
|-----------------------|--------------|----------------|------------|-----------------------------------|-----|--------|--------|
| Oznaczenie próbek     | Napięcie [V] | Natężenie [mA] | Czas [min] | Elektrolit [mol/dm <sup>3</sup> ] |     |        |        |
|                       |              |                |            | CA                                | GP  | Ag     | Ga     |
| MAO_300               | 300          | 83             | 15         | 0,15                              | 0,1 | -      | -      |
| MAO_400               | 400          |                |            |                                   |     |        |        |
| MAO_300_03Ag          | 300          | 83             | 15         | 0,15                              | 0,1 | 0,0003 | -      |
| MAO_400_03Ag          | 400          |                |            |                                   |     |        |        |
| MAO_300_3Ag           | 300          | 83             | 15         | 0,15                              | 0,1 | 0,003  | -      |
| MAO_400_3Ag           | 400          |                |            |                                   |     |        |        |
| MAO_300_6Ag           | 300          | 83             | 15         | 0,15                              | 0,1 | 0,006  | -      |
| MAO_400_6Ag           | 400          |                |            |                                   |     |        |        |
| MAO_300_03Ga          | 300          | 83             | 15         | 0,15                              | 0,1 | -      | 0,0003 |
| MAO_400_03Ga          | 400          |                |            |                                   |     |        |        |
| MAO_300_3Ga           | 300          | 83             | 15         | 0,15                              | 0,1 | -      | 0,003  |
| MAO_400_3Ga           | 400          |                |            |                                   |     |        |        |
| MAO_300_6Ga           | 300          | 83             | 15         | 0,15                              | 0,1 | -      | 0,006  |
| MAO_400_6Ga           | 400          |                |            |                                   |     |        |        |
| MAO_300_3Ag_3Ga       | 300          | 32/50/83       | 15         | 0,15                              | 0,1 | 0,003  | 0,003  |
| MAO_400_3Ag_3Ga       | 400          | 32/50/83       | 15         | 0,15                              | 0,1 | 0,003  | 0,003  |
| Kontrola              | -            | -              | -          | -                                 | -   | -      | -      |

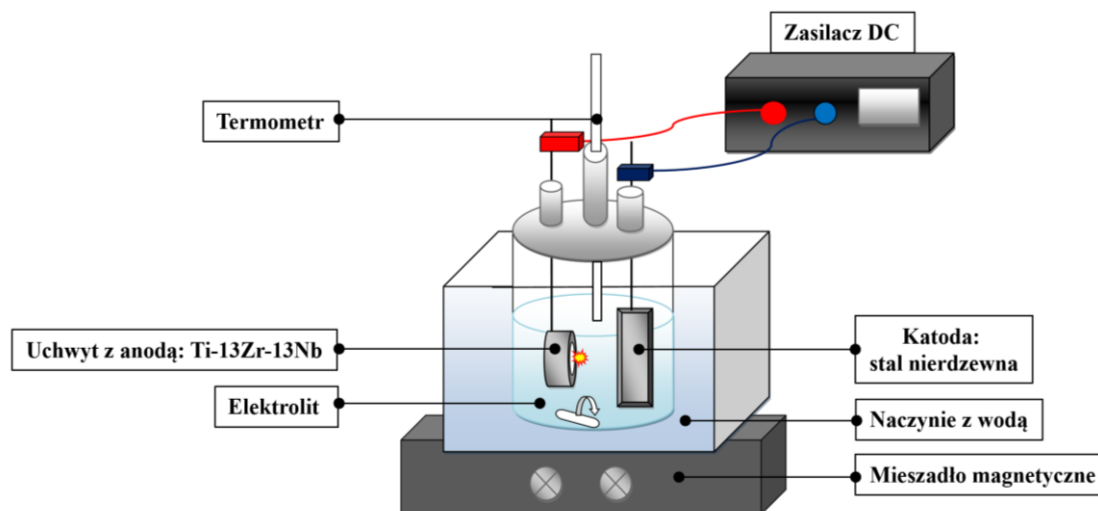
W celu określenia wpływu metody wytwarzania materiału kontrolnego na charakterystykę warstw MAO, stop Ti-13Zr-13Nb wytworzony metodą SLM i komercyjny stop tytanu Ti-13Zr-13Nb wytworzony metodą walcowania na gorąco poddano utlenianiu mikrołukowemu w elektrolicie bazowym GP i CA z dodatkiem 0,006 M azotanu srebra. Proces MAO przeprowadzano przez 15 min pod natężeniem prądu równym 83 mA.

Oznaczenia warstw MAO na materiale referencyjnym wytworzonym metodą SLM i materiale referencyjnym w postaci komercyjnego pręta przedstawiono w tabeli 9.

Tabela 9 Oznaczenia warstw MAO w zależności od metody wytwarzania materiału kontrolnego i napięcia procesu MAO

| Oznaczenie       | Metoda wytwarzania materiału | Parametry procesu MAO |                |            |                                   |
|------------------|------------------------------|-----------------------|----------------|------------|-----------------------------------|
|                  |                              | Napięcie [V]          | Natężenie [mA] | Czas [min] | Elektrolit [mol/dm <sup>3</sup> ] |
| SLM_MAO_300_6Ag  | SLM                          | 300                   | 83             | 15         |                                   |
| SLM_MAO_400_6Ag  |                              | 400                   | 83             | 15         | 0,1 GP                            |
| Pręt_MAO_300_6Ag | Walcowanie                   | 300                   | 83             | 15         | 0,15 Ca                           |
| Pręt_MAO_400_6Ag |                              | 400                   | 83             | 15         | 0,006 Ag                          |
| SLM_Kontrola     | SLM                          | -                     | -              | -          | -                                 |
| Pręt_Kontrola    | Walcowanie                   | -                     | -              | -          | -                                 |

Rysunek 9 przedstawia schemat wykorzystywanego stanowiska do utleniania mikrołukowego.



Rysunek 9 Schemat stanowiska MAO

We wszystkich przypadkach utleniania mikrołukowego anodę stanowił stop tytanu Ti-13Zr-13Nb, a katodę cylinder ze stali nierdzewnej (AISI 304). Próbkę mocowano w uchwycie z politetrafluoroetylenu z wyeksponowaną powierzchnią o średnicy 14 mm. Mieszadło magnetyczne obracające się z szybkością 200 obr./min zastosowano do wytworzenia turbulentnego przepływu elektrolitu, a szklane naczynie

z elektrolitem utrzymywano w łaźni chłodzonej wodą w celu zapewnienia stałej temperatury ( $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

Po obróbce MAO, próbki przemywano wodą dejonizowaną i suszono strumieniem powietrza.

Grupę referencyjną zwaną „Kontrolą” stanowił stop tytanu Ti-13Zr-13Nb po szlifowaniu, bez wykonanej modyfikacji MAO.

### **8.3. Analiza przebiegu procesu MAO**

Parametry procesu MAO (napięcie, natężenie, czas) były rejestrowane w sposób ciągły w odstępach 0,1 s przez interfejs czujnika (PCD-300A; Kyowa Electronic Instruments Co., Ltd., Tokio, Japonia).

### **8.4. Badanie mikrostruktury i powierzchni**

#### ***8.4.1. Badanie mikrostruktury oraz powierzchni próbek referencyjnych***

Obserwacje powierzchni i mikrostruktury próbek referencyjnych prowadzono z wykorzystaniem mikroskopu optycznego (Olympus BX51, Tokio, Japonia) i elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM, QUANTA 250 FEG, FEI, Hiszpania). W celu ujawnienia mikrostruktury, próbki poddano polerowaniu i trawieniu roztworem Kroll'a ( $\text{HNO}_3$ , HF,  $\text{H}_2\text{O}$ ), a następnie przemyto wodą destylowaną.

#### ***8.4.2. Badanie powierzchni warstw MAO utworzonych przy zmiennych parametrach procesu – napięcia, natężenia i czasu***

Do scharakteryzowania morfologii powierzchni utworzonych przy zmiennych parametrach procesu MAO (rozdział 2.1-2.2) zastosowano skaningową mikroskopię elektronową (SEM; S-3400NX, Hitachi High-Technologies Corp., Tokio, Japonia).

Topografię, chropowatość i średnicę porów oceniono za pomocą laserowego mikroskopu skaningowego (LSM; Olympus LEXT OLS4100 3D, Tokio, Japonia).

Grubość warstw MAO mierzono za pomocą miernika grubości Elcometer 456 (Elcometer Inc, Michigan, MI, USA) w zakresie 0–1500  $\mu\text{m}$  z dokładnością  $\pm 1\%$ .

### **8.4.3. Badanie powierzchni warstw MAO wytworzonych przy zmiennym składzie elektrolitu i zmiennym napięciu**

Obserwacje morfologii powierzchni z dodatkami bioaktywnymi i antybakteryjnymi (rozdział 2.3) na materiale referencyjnym wytworzonym metodą SLM oraz komercyjnym pręcie (rozdział 2.4) przeprowadzono na skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM, QUANTA 250 FEG, FEI, Hiszpania). Średnicę porów zmierzono przy użyciu otwartego oprogramowania Java ImageJ 1.51k (n=250) i przedstawiono w formie histogramów.

Grubość warstw określono z wykorzystaniem miernika grubości powłok FMP10 (SN100146594, Helmut Fischer GmbH, Sindelfingen, Niemcy).

Topografię oraz chropowatość powierzchniową ( $S_a$ ) oceniono przy użyciu mikroskopu sił atomowych (AFM, Nanite AFM, Wielka Brytania) w trybie bezstykowym z siłą 55 mN na powierzchni 50x50  $\mu\text{m}$  (n=3).

Średnie wartości chropowatości ( $R_a$ ) oszacowano za pomocą profilometru kontaktowego z oprogramowaniem EVOVIS (Hommel Etamic Waveline, Jenoptik, Jena, Niemcy). Test został przeprowadzony na odcinku pomiarowym  $l_n = 12,5$  mm przy prędkości pomiaru 0,50 mm/s (n=6).

Przekroje warstw z dodatkami bioaktywnymi i antybakteryjnymi obserwowano za pomocą mikroskopu SEM (Phenom™ XL G2 Desktop SEM, Thermo Fisher Scientific, USA), natomiast grubość zmierzono przy użyciu programu ImageJ.

## **8.5. Badanie składu chemicznego i fazowego**

### **8.5.1. Badanie składu chemicznego i fazowego warstw MAO wytworzonych przy zmiennych parametrach procesu MAO – napięcia, natężenia i czasu**

Skład pierwiastkowy próbek wytworzonych przy zmiennych parametrach procesu MAO (rozdział 2.1-2.2) analizowano za pomocą spektrometrii rentgenowskiej z dyspersją energii (EDS, S-3400NX, Hitachi High-Technologies Corp., Tokio, Japonia).

W celu scharakteryzowania struktury krystalicznej próbek, przeprowadzono dyfrakcję rentgenowską (XRD, Bruker D8 Discover, Bruker AXS KK, Jokohama, Japonia).



### **8.5.2. Badanie składu chemicznego i fazowego warstw MAO wytworzonych przy zmiennym składzie elektrolitu i zmiennym napięciu**

Skład pierwiastkowy próbek z dodatkami bioaktywnymi i antybakteryjnymi (rozdział 2.3) na materiale referencyjnym wytworzonym metodą SLM oraz komercyjnym pręcie (rozdział 2.4) określono przy użyciu EDS (QUANTA 250 FEG, FEI, Hiszpania). Natomiast do analizy ich składu fazowego użyto XRD (Philips X'Pert Pro, Almelo, Holandia).

Widma w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) rejestrowano za pomocą spektrofotometru (Perkin Elmer Frontier, USA) z rozdzielczością  $2\text{ cm}^{-1}$  w zakresie widmowym od  $600$  do  $4000\text{ cm}^{-1}$ .

Badanie składu pierwiastków w przekrojach analizowano za pomocą EDS (SEM/EDS, Phenom™ XL G2 Desktop SEMthermo, Fisher Scientific, USA).

## **8.6. Badania mechaniczne i nanomechaniczne**

Właściwości nanomechaniczne warstw MAO, tj. twardość, maksymalną głębokość odcisku, moduł Younga i współczynniki:  $E_{\text{coating}}/E_{\text{substrate}}$ ,  $H/E$ ,  $H^3/E^2$  zbadano za pomocą nanoindentera (NanoTest Vantage, Micro Materials Ltd., Wrexham, Wielka Brytania) z wykorzystaniem wgłębnika Berkovicha o kształcie trójbocznego rombu piramidalnego o kącie wierzchołkowym równym  $124,4^\circ$ . Badania przeprowadzono z maksymalną siłą  $50\text{ mN}$ , czasy obciążania i odciążania wynosiły odpowiednio  $20$  i  $15\text{ s}$ , przy maksymalnym obciążeniu przez  $5\text{ s}$ . Twardość ( $H$ ), zredukowany moduł Younga ( $E_r$ ) oraz wartości modułu Younga wyznaczono metodą Olivera-Pharra [166], w oparciu o program do analizy wyników NanoTest. W celu przeliczenia zredukowanego modułu Younga na moduł Younga przyjęto następujące współczynniki Poissona: dla powłok ceramicznych  $0,3$ , natomiast dla materiałów referencyjnych  $0,4$  [167]. Dla wszystkich badanych próbek wykonano dwadzieścia pięć niezależnych pomiarów ( $n=25$ ).

Dodatkowo, w celu zbadania twardości próbek referencyjnych Ti-13Zr-13Nb, próbki poddano badaniu twardości z wykorzystaniem mikrotwardościomierza (FM-800, FUTURE-TECH, Kawasaki, Japonia) z wgłębnikiem Vickersa, pod obciążeniem  $490\text{ mN}$ .

## 8.7. Badania siły adhezji warstw MAO do podłoża

Badanie siły adhezji warstw MAO do materiału rodzimego przeprowadzono stosując technikę nanozarysowania (ang. nanoscratch test) z wykorzystaniem nanoindentera z modułem NanoTest™ Vantage (Micro Materials, Wrexham, Wielka Brytania) przy użyciu wgłębnika Berkovicha. Zastosowano obciążenie maksymalne 400 mN, prędkość obciążenia 1,3 mN/s, długość rysy 1000  $\mu\text{m}$ . Sposób obciążania był liniowy i ciągły (z liczbą powtórzeń  $n = 10$ ).

W sytuacji, gdy analiza wyników nie była jednoznaczna, ocenę prowadzono na kilka sposobów: analizując gwałtowną zmianę siły tarcia w trakcie badania skorelowaną z gwałtowną zmianą głębokości wgłębnika i charakterystyką krzywej emisji akustycznej. Wyniki porównano z obrazem mikroskopowym i na tej podstawie wyznaczono obciążenia krytyczne prowadzące do deformacji kohezijnej ( $Lc_1$ ), odkształcenia adhezyjnego ( $Lc_2$ ), aż do całkowitej delaminacji warstwy ( $Lc_3$ ).

W sytuacji, gdy obraz mikroskopowy był jednoznaczny (np. widoczny brak rozwarstwienia), zachowanie się warstw pod wpływem testu zarysowania oceniono za pomocą analizy topografii przed i po zarysowaniu zestawionej z krzywą siły tarcia zależną od obciążenia i obrazem uzyskanym przy użyciu mikroskopu SEM (QUANTA 250 FEG, FEI, Hiszpania).

## 8.8. Pomiary kąta zwilżania

Zwilżalność powierzchni wyznaczono poprzez pomiary kąta zwilżania (CA) metodą spadającej kropli przy użyciu tensjometru optycznego (Attention Theta Life, Biolin Scientific, Espoo, Finlandia). Zastosowaną cieczą była woda destylowana, a objętość kropli wynosiła około 2  $\mu\text{l}$ /próbkę. Odczyt przeprowadzano po wstępnym ustabilizowaniu kropli po 9 s, przy użyciu programu OneAttension (Biolin Scientific, Espoo, Finlandia) ( $n=6$ ).

## 8.9. Badania bioaktywności

Zdolność tworzenia fosforanów wapnia na warstwach MAO oceniano za pomocą testu zanurzeniowego w roztworze Hanksa (0,005  $\text{dm}^3$ ) o wartości pH 7,4 i stężeniu

jonów zbliżonym do płynu pozakomórkowego. Skład chemiczny roztworu Hanksa przedstawiono w tabeli 10.

Tabela 10 Skład chemiczny roztworu Hanksa

| Skład chemiczny roztworu Hanksa [g/dm <sup>3</sup> ] |      |                    |      |                                 |   |                   |  |   |
|--|------|--------------------|------|---------------------------------|---|-------------------|--|---|
| Skład  | NaCl | NaHCO <sub>3</sub> | KCl  | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | MgCl <sub>2</sub><br>·6H <sub>2</sub> O | CaCl <sub>2</sub> | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>·2H <sub>2</sub> O | MgSO <sub>4</sub><br>·7H <sub>2</sub> O |
| Stężenie [g/dm <sup>3</sup> ]                        | 8,00 | 0,35               | 0,40 | 0,06                            | 0,10                                    | 0,14              | 0,06   | 0,06                                    |

Próbki zanurzono w roztworze w temperaturze 37°C na 72 godziny. Po ekspozycji próbki płukano w wodzie dejonizowanej.

Charakterystykę warstw oceniano za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM; S-3400NX, Hitachi High-Technologies Corp., Tokio, Japonia) i spektrometrii rentgenowskiej z dyspersją energii (EDS; S-3400NX, Hitachi High-Technologies Corp., Tokio, Japonia).

## 8.10. Badania szybkości uwalniania bioaktywnych i antybakteryjnych dodatków

Szybkość uwalniania jonów galu i srebra z warstw MAO do roztworu PBS (Merck, Darmstadt, Niemcy) (tabela 11), analizowano za pomocą optycznej emisyjnej spektrometrii ze wzbudzeniem w plazmie mikrofalowej (4210 MP-AES, Agilent, Santa Clara Kalifornia, Stany Zjednoczone).

Próbki zanurzono w 5 ml PBS, pH 7,4 i inkubowano w temperaturze 37°C przez trzy odcinki czasowe: 1, 3 i 7 dni. Zarówno dla oznaczania srebra, jak i galu zastosowano dwie długości fal, aby zapewnić wysoką jakość wyników (Ag - 328,075 nm; 338,289 nm; Ga- 417,205 nm; 403,300 nm). Dla każdej długości fali wyniki uzyskano w czterech powtórzeniach. do wdrożenia techniki kalibracji zewnętrznej użyto odczynników klasy ICP.

Tabela 11 Skład chemiczny roztworu PBS

| Skład chemiczny roztworu PBS [mol/dm <sup>3</sup> ] |      |       |                   |
|---|------|-------|-------------------|
| Skład   | NaCl | KCl   | Bufor fosforanowy |
| Stężenie [mol/dm <sup>3</sup> ]                     | 0,14 | 0,003 | 0,01              |

## 8.11. Badania odpowiedzi komórkowej

### 8.11.1. Hodowla komórek

Linie komórkową hFOB 1,19 (RRID: CVCL 3708) otrzymaną z ATCC (American Type Culture Collection) zastosowano jako model ludzkich osteoblastów. Komórki hodowano w mieszaninie 1:1 pożywki Hama F12 i pożywki DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (bez czerwieni fenolowej), uzupełnionej 0,3 mg/ml G418 (Selektywny antybiotyk Geneticin™) i 10% FBS (Fetal Bovine Serum). Wszystkie produkty zostały dostarczone z firmy Gibco (Thermo Fisher, Scientific, USA). Hodowlę komórkową prowadzono w temperaturze 34°C w wilgotnej atmosferze składającej się z 5% CO<sub>2</sub> i 95% powietrza. Liczba pasaży przed każdym doświadczeniem wynosiła 2.

### 8.11.2. Test żywotności

Test żywotności komórek - MTT przeprowadzono w celu zmierzenia aktywności dehydrogenaz mitochondrialnych. MTT jest metabolizowany przez dehydrogenazy do produktów niebieskiego formazanu przez żywe komórki.

Komórki hFOB 1,19 o gęstości 0,04 mln/cm<sup>2</sup> wysiano bezpośrednio na próbki w trzech powtórzeniach i umieszczono w sterylnej płytce 12-dołkowej. Komórki inkubowano przez 24 i 72 h w temperaturze 34°C. Odpowiednio po 24 i 72 h, do próbek dodano świeżą pożywkę z 0,60 mM/L MTT i hodowlę kontynuowano przez kolejne 4 h. Wytwarzanie formazanu oznaczano ilościowo za pomocą pomiaru spektrofotometrycznego przy długości fali 570 nm [168].

Żywotność komórek na próbkach zmodyfikowanych obliczono i wyrażono jako względne wartości procentowe w stosunku do kontroli – stopu Ti-13Zr-13Nb bez modyfikacji MAO, natomiast żywotność komórek na stopie Ti13Zr13Nb bez modyfikacji MAO wyrażono jako względne wartości procentowe w stosunku do komórek wysianych na dołku.

## 8.12. Badania skuteczności przeciwbakteryjnej

### 8.12.1. Hodowla bakterii

W celu zbadania skuteczności przeciwbakteryjnej badanych warstw MAO zastosowano jeden szczep *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), jako patogenną bakterię Gram-dodatnią i jeden szczep *Escherichia coli* (ATC 25922), jako patogenną bakterię Gram-ujemną. Bakterie hodowano w pożywce Bacto™ Tryptic Soy Broth (TSB, Becton Dickinson) w temperaturze 37°C przez 18 h (inkubator ES-20/60, Biosan), a następnie rozcieńczono do 10<sup>6</sup> jednostek tworzących kolonie (CFU)/mL w roztworze soli fizjologicznej i zastosowano jako inokulum testowe.

### 8.12.2. Określenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej

Uprzednio wysterylizowane próbki umieszczono w jałowych szalkach Petriego. Na każdą próbkę nakroplono 200 µl inokulum, a następnie inkubowano w temperaturze 37°C odpowiednio przez 4 i 24 h (n=3). Aby zapewnić odpowiednią wilgotność środowiska, dno szalek Petriego wypełniono wodą dejonizowaną, tworząc tym samym łaźnię.

W celu określenia całkowitej liczby bakterii planktonowych (nieprzylegających) po odpowiednim czasie inkubacji, z każdej próbki pobrano 200 µl inokulum i wykonano seryjne rozcieńczenia na agarze Mueller Hinton (Merck KGaA, Darmstadt, Niemcy), a następnie policzono szczepy bakterii.

W celu określenia liczby przylegających bakterii (biofilmu), przeprowadzono szereg kroków mających na celu usunięcie nieprzylegających bakterii i odsłonięcie biofilmu. Na początku, próbki umieszczono w sterylnych 12-dółkowych płytkach do hodowli tkankowych i trzykrotnie delikatnie przepłukano 1 ml soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS). Następnie, próbki zanurzono w 1 ml saponiny 0,5% i inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C. Po tym czasie, powierzchnię intensywnie spłukiwano (30 razy każdą z próbek), wykorzystując w tym celu saponinę, w której próbki były inkubowane. Liczbę bakterii w otrzymanej zawieszynie określano tą samą techniką, co w przypadku bakterii planktonowych – seryjnymi rozcieńczeniami na agarze Muellera-Hintona.

Aktywność przeciwdrobnoustrojową bakterii planktonicznych i adherentnych obliczoną za pomocą wzorów [169]:

Dla bakterii planktonowych aktywność przeciwdrobnoustrojową określono na podstawie współczynnika redukcji (R) obliczonego według wzoru (8.1):

$$R = A_i - B \quad (8.1)$$

gdzie  $A_i$  jest logarytmem początkowej liczby bakterii w podstawowym (nietraktowanym) inokulum, a B jest logarytmem liczby żywych bakterii na warstwach MAO.

Dla bakterii adherentnych aktywność przeciwdrobnoustrojową określono na podstawie współczynnika redukcji (R) obliczonego według wzoru (8.2):

$$R = A_c - B \quad (8.2)$$

gdzie  $A_c$  jest logarytmem liczby bakterii w zawiesinie kontrolnej (Ti-13Zr-13Nb bez warstwy MAO), a B jest logarytmem liczby żywych bakterii na warstwach MAO.

We wszystkich przypadkach  $R \geq 2$  oznaczało aktywność biobójczą testowanych materiałów.

Otrzymane wyniki zostały sklasyfikowane następująco:

- brak aktywności przeciwdrobnoustrojowej: redukcja wzrostu drobnoustrojów  $0 \leq 0,5 \log$  (redukcja  $<68,4\%$ );
- niewielka aktywność przeciwdrobnoustrojowa: zmniejszenie wzrostu drobnoustrojów  $0,5-1 \log$  (redukcja od  $<68,4\%$  do  $<90\%$ );
- średnia aktywność przeciwdrobnoustrojowa: zmniejszenie wzrostu drobnoustrojów  $0 >1$  do  $\leq 2 \log$  (zmniejszenie o  $90\%$  do  $<99\%$ );
- dobra aktywność przeciwdrobnoustrojowa: redukcja wzrostu drobnoustrojów od  $2$  do  $<3 \log$  (redukcja od  $99\%$  do  $<99,9\%$ );
- bardzo dobra aktywność przeciwdrobnoustrojowa: redukcja wzrostu drobnoustrojów  $>3 \log$  (redukcja  $>99,9\%$ ).

Dodatkowo, % redukcji zinterpretowano pod względem aktywności bakteriobójczej:  $>99,9\%$  redukcji inokulum lub aktywności bakteriostatycznej: od  $90$  do  $99,9\%$  redukcji inokulum, każdego testowanego materiału.

### **8.12.3. Badanie stanu fizjologicznego bakterii - obserwacje LIVE/DEAD**

Ocenę stanu fizjologicznego bakterii przeprowadzono za pomocą barwienia fluorescencyjnego LIVE/DEAD, które polega na ocenie ciągłości błon cytoplazmatycznych, a tym samym określeniu żywotności bakterii.

Po 4 h inkubacji z bakteriami, próbki delikatnie przepłukano przy użyciu roztworu PBS, wybarwiono zestawem do barwienia LIVE/DEAD (BacLight™ Bacterial Viability Kit, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) oraz obserwowano przy użyciu konfokalnej laserowej mikroskopii skaningowej (IX51 Olympus, Japonia).

### **8.12.4. Obserwacje morfologii bakterii**

Wpływ warstw MAO na adhezję bakterii do podłoża po 4 h inkubacji obserwowano z wykorzystaniem mikroskopu skaningowego (SEM, Phenom™ XL G2 Desktop SEM, Thermo Fisher Scientific, USA).

Przygotowanie próbek do obserwacji obejmowało procedurę utrwalenia bakterii na próbkach, według następujących kroków: inkubacja próbek w 3% aldehydzie glutarowym (4 h), następnie próbki przemywano w 0,1 M buforze fosforanowym i odwadniano w serii stężeń C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (50%–100%). Kolejno, próbki inkubowano przez 30 s w heksametylodisilazanie (HMDS). po utrwaleniu próbki suszono w powietrzu przez 24 h i napyłono srebrem.

## **8.13. Statystyka**

Analizę statystyczną danych przeprowadzono za pomocą komercyjnego oprogramowania OriginPro 64 (OriginLab, Northampton, MA, USA). Do oceny rozkładu normalnego danych zastosowano test Shapiro-Wilka. Wszystkie wyniki przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe (SD) i poddano analizie statystycznej za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (jednokierunkowa ANOVA). Wielokrotne porównania z grupą kontrolną między średnimi przeprowadzono przy użyciu testu t Bonferroniego ze statystyczną istotnością  $p < 0,05$ .

Natomiast analizę statystyczną wyników badań bakteryjnych przeprowadzono za pomocą komercyjnego oprogramowania IBM SPSS Statistics 27 (IBM, New Yourk, USA). Do oceny rozkładu normalnego danych zastosowano test Shapiro-Wilka.

Wszystkie wyniki przedstawiono jako średnią  $\pm$  odchylenie standardowe (SD) i poddano analizie statystycznej za pomocą wieloczynnikowej analizy wariancji (multi-factor ANOVA) wraz z testem post-hoc Bonferroniego ze statystyczną istotnością  $p < 0,05$ .

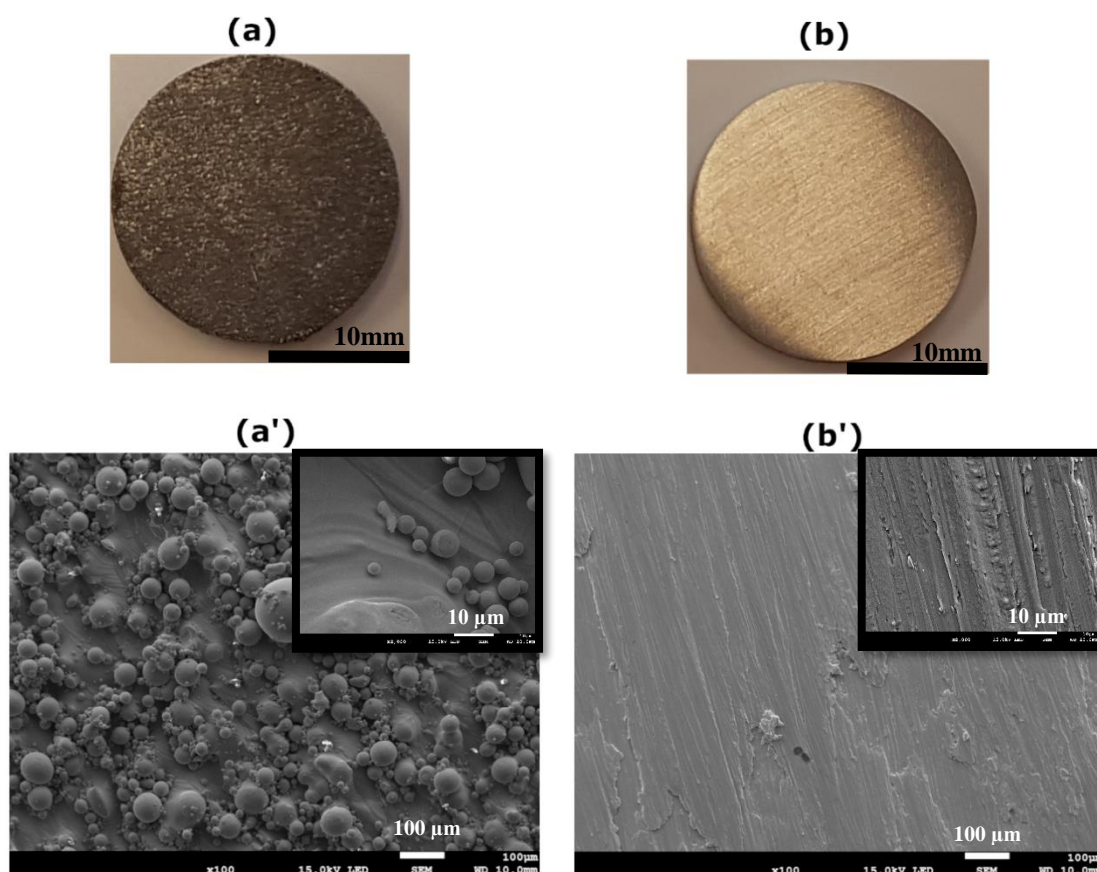
Ewentualny brak oznaczeń zależności statystycznych wśród niektórych wyników, oznacza brak stwierdzonego rozkładu normalnego tych danych.



## 9. WYNIKI

### 9.1. Charakterystyka stopu Ti-13Zr-13Nb wytworzonego metodą SLM

Na rysunku 10 przedstawiono obrazy makroskopowe (a, b) oraz obrazy mikroskopowe SEM (a', b') stopu tytanu wytworzonego metodą selektywnego topienia laserowego.



Rysunek 10 Obraz makroskopowy (a, b) i mikroskopowy SEM (a', b'): próbek SLM (a, a') oraz próbek SLM po szlifowaniu (b, b')

Można zauważyć, że na próbkach przed szlifowaniem (a, a') występują liczne niestopione cząstki proszku o różnej morfologii i różnych rozmiarach, które na skutek szlifowania całkowicie zostały usunięte (b, b').

Wśród większych cząsteczek proszku można zauważyć połączenie z powierzchnią przy pomocy „podpory” z nadtopionego materiału, podczas gdy mniejsze cząstki proszku grupowały się i luźno pokrywały powierzchnię próbki lub inne niestopione cząstki proszku.

Na powierzchni próbek po szlifowaniu (b') zauważono wyraźnie widoczne rowki charakterystyczne dla drobnoziarnistego papieru ściernego. Morfologia próbek po szlifowaniu charakteryzowała się warstwowością, specyficzną dla materiałów wytwarzanych metodą SLM oraz ujawniła mikroporowatość.

## **9.2. Ocena wpływu parametrów procesu MAO na charakterystykę powstałych warstw**

### **9.2.1. Charakterystyka procesu MAO**

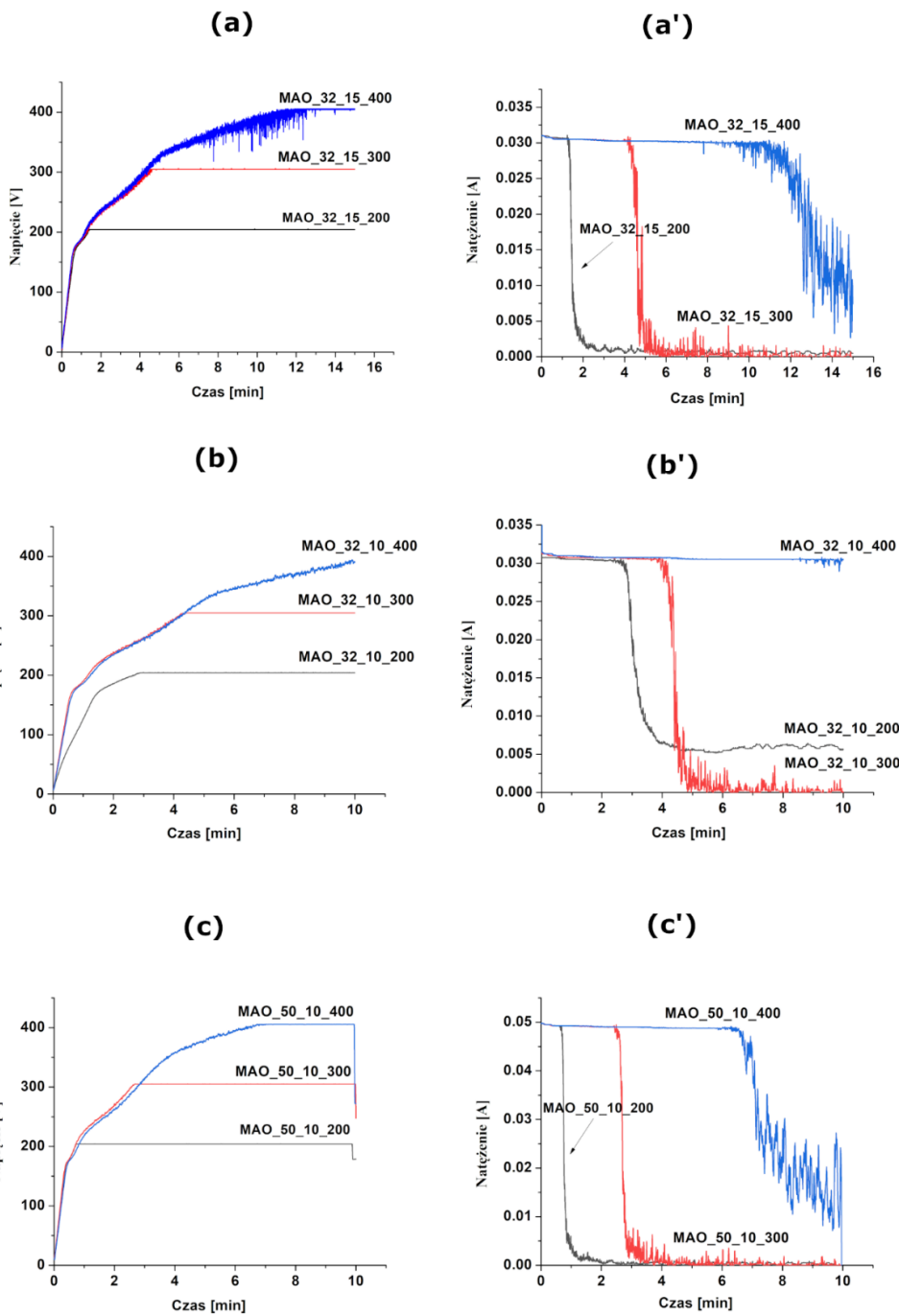
Charakterystykę przebiegu procesu MAO analizowano na podstawie krzywych zależności napięcia od czasu i natężenia prądu od czasu, jak pokazano na rysunku 11.

Charakterystyka krzywej jest typowa dla procesu MAO, w którym zmiany napięcia można podzielić na trzy etapy [170]. W pierwszy etapie widoczny jest liniowy wzrost napięcia skorelowany z tworzeniem się początkowej warstwy tlenkowej. W drugim etapie następuje powolny wzrost napięcia, co odpowiada początkowi procesu utleniania mikrołukowego, w którym warstwa tlenku ulega rozbiciu tworząc kanał wyładowania. W miarę postępu reakcji, wraz ze wzrostem grubości warstwy, napięcie stale rośnie. Podczas ostatniego etapu procesu MAO napięcie oscyluje w pobliżu plateau z widocznymi licznymi odchyleniami wartości napięcia, związanymi z pojawianiem się iskier wyładowczych.

Podobnie, analizując krzywą zależności natężenia prądu od czasu, można zauważyć, że natężenie prądu maleje wraz ze wzrostem czasu trwania procesu. W pierwszym etapie prąd jest stały i utrzymuje najwyższą wartość dzięki tworzeniu się zwartej i cienkiej warstwy tlenku (co skutkuje lepszą przewodnością powierzchniową). Gdy układ osiągnie ustalony potencjał, zaczyna dochodzić do przebicia dielektrycznego tych warstw i wyładowania mikrołukowego. Wraz ze wzrostem warstwy przewodnictwo maleje, rezystancja elektryczna próbki wzrasta, a gęstość prądu maleje [171]. Wreszcie, grubość warstwy zapobiega przebiciu dielektryka, a prąd przyjmuje minimalne wartości w pobliżu odcinka plateau natężenia prądu.

Analiza krzywych została skorelowana z obserwacjami optycznymi. W pierwszym etapie na powierzchni materiałów widoczne były pęcherzyki gazu. Podczas drugiego etapu pojawiały się białe i drobne iskry elektryczne, które wraz

z upływem czasu stawały się większe i bardziej intensywne. W trzecim etapie proces MAO zmieniał się w zależności od parametrów procesu. Gdy obróbkę MAO prowadzono przy napięciu 400 V, wyładowania plazmy stawały się silniejsze, a ich liczba malała. W przeciwieństwie do tego, gdy utlenianie przeprowadzono przy 200 V, po osiągnięciu maksymalnego napięcia iskry wyładowcze stały się słabe i było ich mniej. Można zauważyć, że intensywność utleniania mikrołukowego wzrasta wraz ze wzrostem wartości maksymalnego napięcia. Obecność impulsów na krzywych wskazuje na okresowy charakter wyładowań elektrycznych. Największe przebicie dielektryczne zaobserwowano przy przyłożonym maksymalnym napięciu 400 V.



Rysunek 11 Krzywe zależności napięcia od czasu (a–c) i natężenia prądu od czasu (a'–c') procesu MAO dla: MAO\_32\_15 (a, a'), MAO\_32\_10 (b, b') i MAO\_50\_10 (c, c')

Porównując krzywe można zauważyć, że przy natężeniu prądu 32 mA i czasie trwania procesu 15 min maksymalne napięcie 200, 300 i 400 V osiągnięto odpowiednio po 80, 261 i 641 s (dokładność wyznaczenia czasu oszacowano na 2 s, a wartość natężenia prądu na 0,001 A). Gdy czas procesu MAO został skrócony z 15 do 10 min, przebieg procesu dla próbek MAO\_200 i MAO\_300 był podobny do przebiegu procesu obserwowanego przy czasie 15 min (rysunek 11 a, a' i b, b'), natomiast dla MAO\_400,

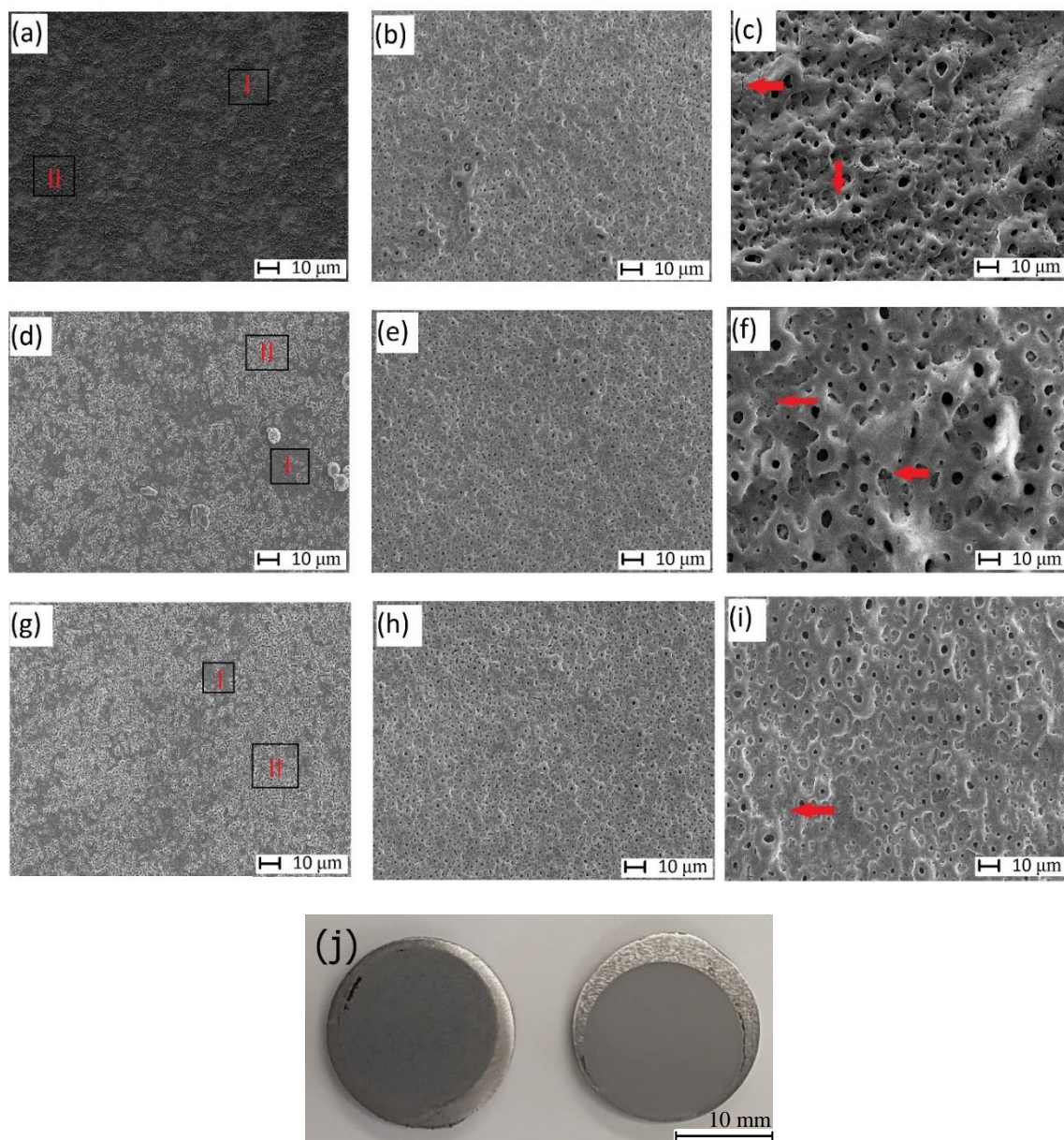
czas ograniczony do 10 min okazał się zbyt krótki do uzyskania maksymalnego napięcia 400 V (maksymalna zarejestrowana wartość to 391 V). Niedokończony proces MAO znacząco wpłynął na charakterystykę wytworzonych warstw. Czas potrzebny do uzyskania napięcia końcowego 200, 300 i 400 V był około dwukrotnie krótszy (odpowiednio 42, 153 i 381 s), gdy natężenie prądu zmieniono z 32 do 50 mA (rysunek 11 b, b' i c, c'). Średnia wartość natężenia prądu uzyskana w trzecim etapie procesu była podobna pod napięciami 200 i 300 V, ale gdy napięcie wynosiło 400 V, średnie minimalne wartości w pobliżu odcinka plateau były wyższe w porównaniu z tymi przy 200 i 300 V.

### **9.2.2. Charakterystyka powierzchni warstw MAO**

Topografię powierzchni próbek stopu Ti-13Zr-13Nb poddanych obróbce MAO w różnych warunkach procesowych obserwowano za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej, jak pokazano na rysunku 12. Wymiary porów obliczono za pomocą oprogramowania ImageJ, natomiast grubość warstw zmierzono za pomocą miernika grubości.

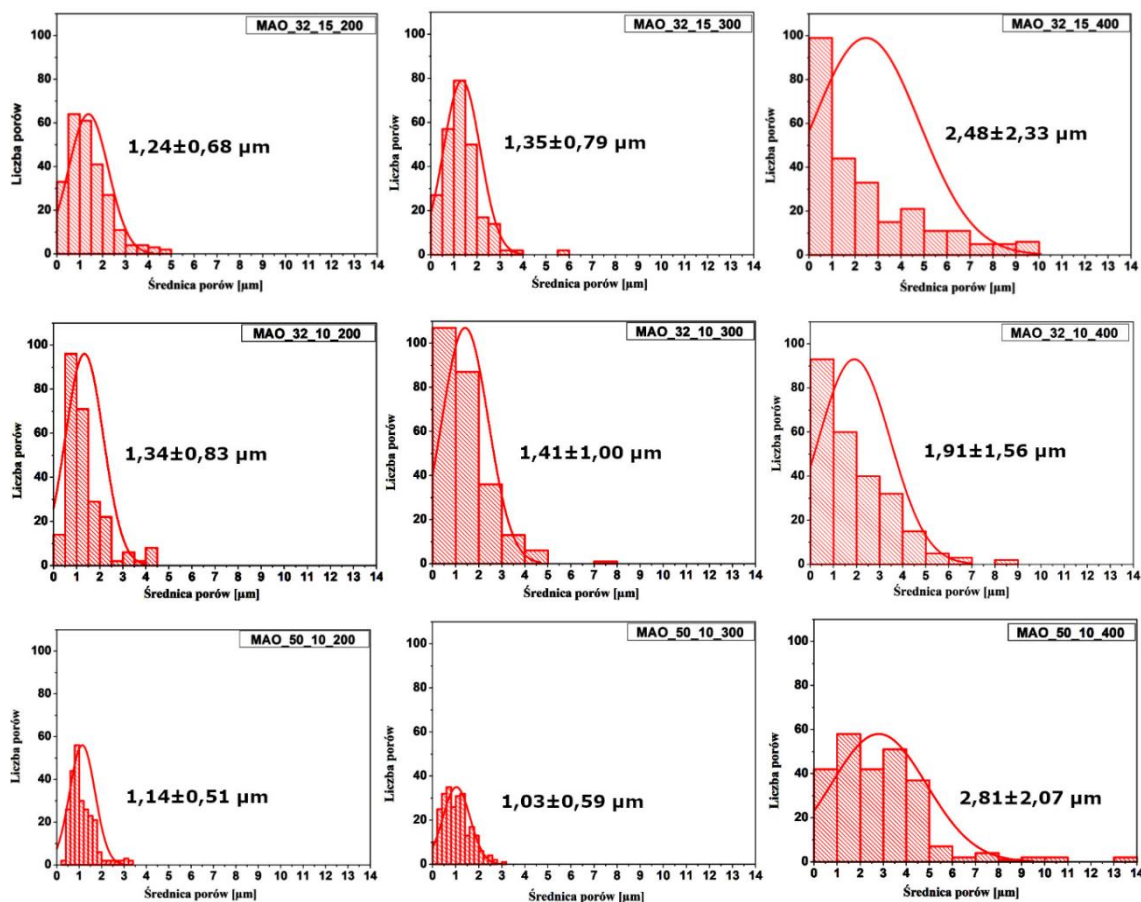
Można zauważyć, że w zależności od zastosowanego napięcia uzyskano trzy grupy próbek o odmiennej topografii. Warstwy wytworzone przy napięciu 200 V składały się z 2 charakterystycznych obszarów: z mikroporami (obszar II) i bez mikroporów (obszar I), na których pory przyjmowały bardziej wydłużony kształt, w porównaniu do cylindrycznych porów otrzymanych przy napięciu 300 V. Warstwy wytworzone przy napięciu 300 V były bardziej regularne i równomierne. Natomiast przy najwyższym napięciu 400 V, topografia była już bardzo nieregularna z wulkanopodobnymi strukturami. Co więcej, w tych warunkach procesu zaobserwowano obecność drobnych pęknięć (rysunek 12 c, f, i).

Średnia średnica porów wahała się od ok 0,4 do 5  $\mu\text{m}$  (rysunek 12), w zależności od zastosowanych parametrów procesu. Próbki poddane działaniu niższych napięć maksymalnych, 200 i 300 V, charakteryzowały się zbliżonymi średnicami porów, jednak ich kształt i rozmieszczenie znacznie się od siebie różniły.



Rysunek 12 Topografia powierzchni SEM warstw MAO utworzonych przy różnych parametrach procesu: MAO\_32\_15\_200 (a), MAO\_32\_15\_300 (b), MAO\_32\_15\_400 (c), MAO\_32\_10\_200 (d), MAO\_32\_10\_300 (e), MAO\_32\_10\_400 (f), MAO\_51\_10\_200 (g), MAO\_5 (h), MAO\_50\_10\_400 (i), z zaznaczonymi dwoma różnymi obszarami (I, II) uzyskanymi w MAO\_200 (a) i mikropęknięciami uzyskanymi w MAO\_400 (c) oraz obrazy makroskopowe warstw MAO dla wybranych próbek, od lewej: MAO\_32\_15\_400 i 32\_15\_300 (j) (przedstawione wyniki są reprezentatywne dla trzech analiz każdej grupy próbek)

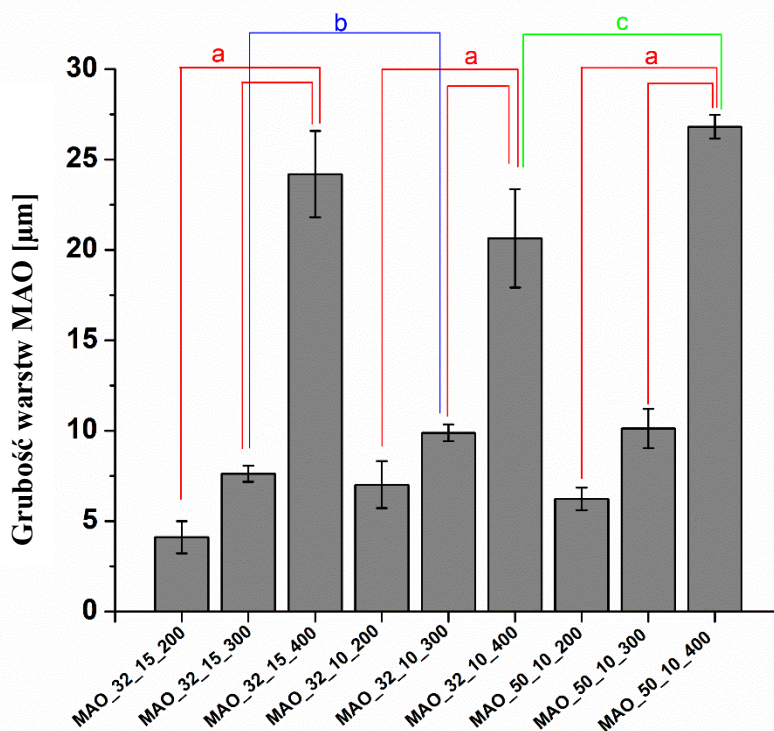
Analizując histogramy (rys. 13) można zauważyć, że wraz ze wzrostem napięcia, krzywa rozkładu rozmiarów porów przyjmuje bardziej łagodny przebieg, co oznacza, że przy wyższych napięciach oprócz występowania mikroporów pojawiają się także większe pory. Zastosowanie najwyższego natężenia przy najwyższym napięciu skutkowało powstaniem porów o największych rozmiarach (średnica nawet 14  $\mu\text{m}$ ).



Rysunek 13 Średnica porów w zależności od zastosowanych parametrów wytwarzania warstw MAO: histogramy wraz z rozkładem normalnym i średnią średnicą porów ( $n=250$ )

Można zauważyć, że w przypadku warstw MAO wytworzonych pod napięciem 400 V, skrócenie czasu trwania procesu z 15 do 10 min w tych samych warunkach prądowych, spowodowało powstanie porów o mniejszych średnicach.

Wzrost natężenia prądu przy napięciu 200 i 300 V zmniejszył średnicę powstałych porów, podczas gdy zwiększenie prądu z 32 do 50 mA w tym samym czasie procesu, skutkowało ponownym powstaniem większych porów (rysunek 13). Biorąc pod uwagę wartość odchylenia standardowego średnicy porów, najbardziej niejednorodną strukturę uzyskano przy najwyższym napięciu maksymalnym (400 V).



Rysunek 14 Grubość warstw MAO wytworzonych przy różnych parametrach procesu ( $n = 25$ ; dane to średnie  $\pm$  SD; a istotnie różne w grupach ( $p < 0,05$ ), b istotnie różne między grupami czasowymi ( $p < 0,05$ ), c istotnie różne między grupami natężenia prądu ( $p < 0,05$ ))

Grubość warstw MAO (rys. 14) również wzrastała wraz ze wzrostem napięcia i wahała się od 4,1 do 26,8  $\mu\text{m}$ , odpowiednio dla MAO\_200 i MAO\_400. Również przy maksymalnym napięciu, odnotowano wzrost grubości warstwy wraz ze wzrostem natężenia prądu. Analiza morfologii powierzchni jest spójna z analizą średniej chropowatości powierzchni, gdzie wraz ze wzrostem napięcia wzrasta również wartość Ra (tabela 12), dla próbek wytworzonych przy wyższym napięciu 400 V. Warstwy MAO wytworzone przy napięciu 200 i 300 V były o ok. 4-5 razy mniej chropowate od warstw wytworzonych przy 400 V. MAO\_32\_10\_400 uzyskało istotnie niższy parametr Ra w porównaniu z innymi próbkami poddany obróbce w 400 V, ze względu na „niedokończony” proces utleniania mikrołukowego (tabela 12). Gdy proces MAO prowadzono w tym samym czasie utleniania, ale przy wyższym natężeniu prądu, parametr Ra wzrastał i zbliżał się do wartości MAO\_32\_15\_400. Uzyskane wyniki były zgodne z obrazami SEM, na których obserwowano większe rozwinięcie powierzchni przy rosnącym napięciu. Rosnące wartości parametrów chropowatości dla MAO\_400 związane były z występowaniem dodatkowych kraterów i pagórkowatej struktury spowodowanej agresywnym wyładowaniem plazmowym.

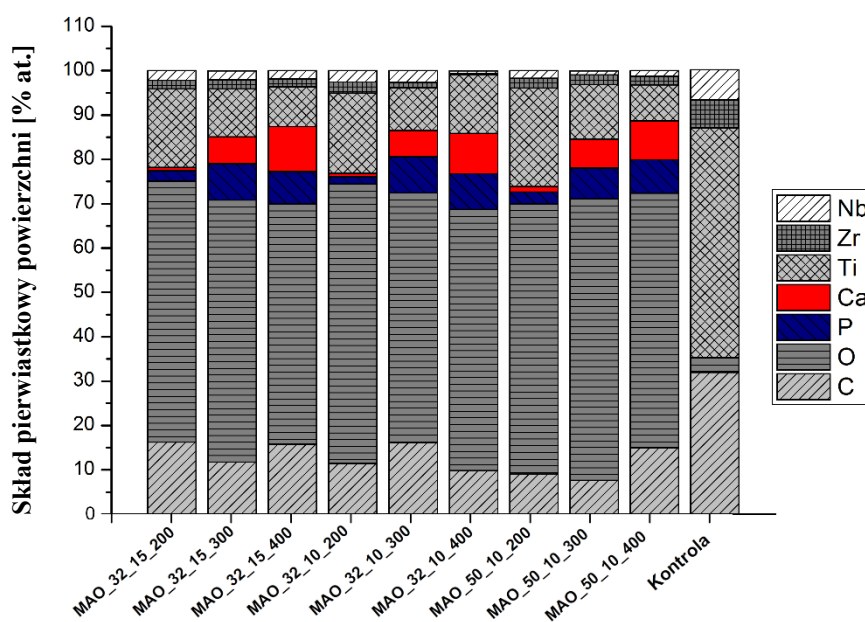


Tabela 12 Średnia chropowatość powierzchni Ra [ $\mu\text{m}$ ] próbki referencyjnej i warstw MAO wytworzonych przy różnych parametrach procesu ( $n = 6$ ; dane to średnie  $\pm$ SD; \* istotnie różne od kontroli; a istotnie różne od MAO\_200 i MAO\_300; <sup>b</sup> istotnie różne od MAO\_400, ( $p < 0,05$ ))

| Średnia chropowatość powierzchni Ra [ $\mu\text{m}$ ] |                 |                 |                 |                                  |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------------------|
| Parametry procesu                                     | 0 V             | 200 V           | 300 V           | 400 V                            |
| MAO_32_15   | -               | 0,41 $\pm$ 0,05 | 0,52,0,01       | 2,67 $\pm$ 0,25 <sup>*,a</sup>   |
| MAO_32_10   | -               | 0,37 $\pm$ 0,03 | 0,54,0,26       | 1,84 $\pm$ 0,17 <sup>*,a,b</sup> |
| MAO_50_10   | -               | 0,36 $\pm$ 0,02 | 0,51 $\pm$ 0,03 | 2,67 $\pm$ 0,18 <sup>*,a,b</sup> |
| Kontrola  | 0,19 $\pm$ 0,04 | -               | -               | -                                |

### 9.2.3. Charakterystyka składu chemicznego i fazowego

Rysunek 15 przedstawia analizę składu pierwiastkowego powierzchni wykonaną przy użyciu spektroskopii dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (EDS).



Rysunek 15 Analiza składu pierwiastkowego powierzchni EDS [% at.] kontroli i warstw MAO wytworzonych przy różnych parametrach procesu (przedstawione wyniki są reprezentatywne dla trzech analiz każdej próbki poddanej obróbce powierzchniowej)

Szacunkowe wyniki badań spektroskopii dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (EDS) wykazały, że warstwy MAO składają się głównie z tytanu i tlenu. Ponadto, na każdej z próbek MAO stwierdzono obecność wapnia, fosforu, cyrkonu oraz niobu. Można zauważyć, że wraz ze wzrostem przyłożonego napięcia

stężenie wapnia wzrosło, tytanu zmalało, natomiast zawartość fosforu najpierw znacząco wzrosła wraz ze wzrostem napięcia w zakresie od 200 do 300 V, a następnie nieznacznie zmalała przy 400 V.

Tabela 13 Stosunek Ca/P warstw MAO wytworzonych przy różnych parametrach procesu

| Parametry procesu | Ca/P [% at.] |       |       |
|-------------------|--------------|-------|-------|
|                   | 200 V        | 300 V | 400 V |
| MAO_32_15         | 0,31         | 0,74  | 1,38  |
| MAO_32_10         | 0,47         | 0,71  | 1,14  |
| MAO_50_10         | 0,45         | 0,94  | 1,15  |

Wraz ze wzrostem napięcia wzrósł również stosunek atomowy wapnia do fosforu, co zostało przedstawione w tabeli 13, jednak wartość ta była niższa niż w przypadku stechiometrycznej wartości apatytu kostnego (~1,67). Najwyższą wartość stosunku Ca/P zaobserwowano dla próbek MAO\_32\_15\_400, a najniższą dla próbek MAO\_32\_15\_200 (odpowiednio: 1,38 i 0,31). Obserwacje te potwierdzają, że proces MAO wpływa nie tylko na morfologię powierzchni, ale także na skład chemiczny warstw. Zmiana natężenia lub czasu trwania procesu nie zmieniała istotnie zawartości pierwiastków w warstwie, napięcie stanowiło tu kluczową determinantę.

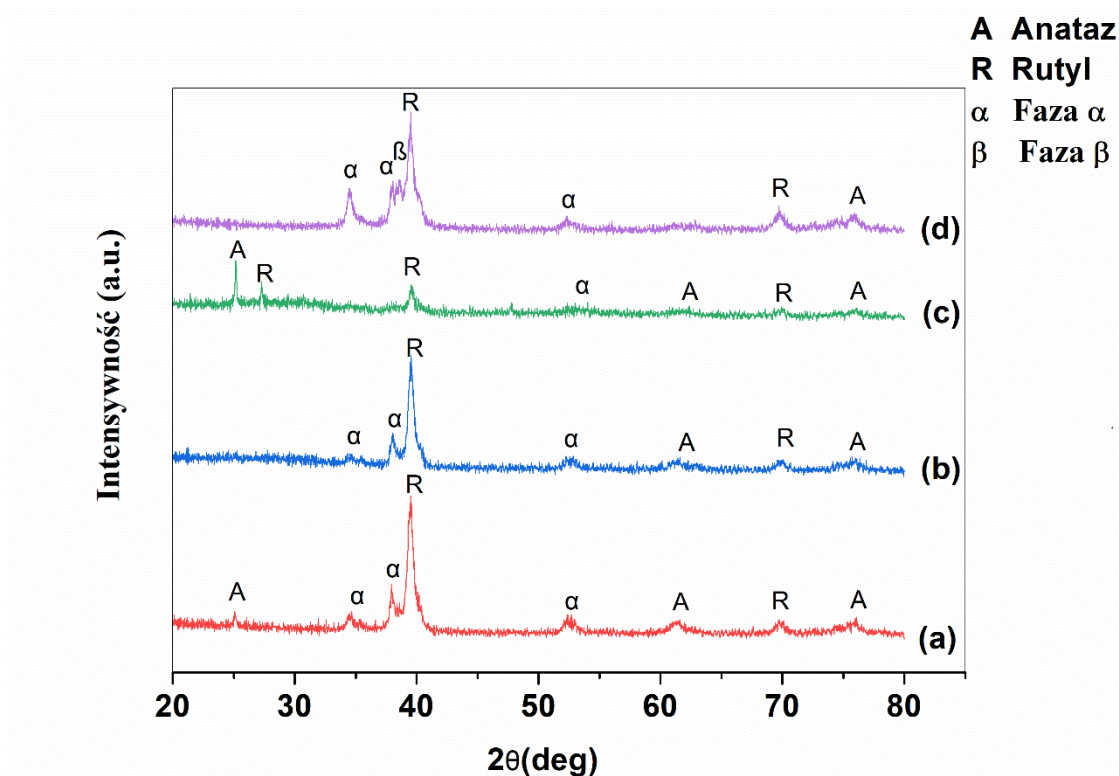
Napięcie procesu MAO jest głównym parametrem wpływającym na krystaliczność warstw. Wyniki analizy składu fazowego wykonane przy pomocy pomiarów intensywności promieniowania ugiętego w funkcji kąta ugięcia próbek otrzymanych przy różnych przyłożonych napięciach i stałym prądzie 32 mA w czasie 15 min przedstawiono na rys. 16.

Dyfraktogramy ukazują, że w przypadku grupy kontrolnej (rys. 16 d), oprócz pików tytanu (faza  $\alpha$ ,  $\beta$ ) pochodzących z podłoża ze stopu tytanu, wykryto również tlenki tytanu w formie rutyłu i anatazu. na powierzchni próbek po modyfikacji MAO, intensywność pików rutyłu i anatazu wzrosła (rys. 16 a, b, c i d). Dodatkowo, przy niższych wartościach napięcia (200 i 300 V) obserwowano również piki tytanu (faza  $\alpha$ ) (rys. 16 a i b).

Intensywność pików nieznacznie malała wraz ze wzrostem napięcia maksymalnego. W warstwie wytworzonej przy 400 V (rysunek 16 c) piki pochodzące od podłoża były mniej wykrywalne, natomiast pojawił się dodatkowy pik rutyłu

wskazujący na występowanie większej jego ilości w warstwach utlenionych przy wyższych napięciach.

Mimo, iż analiza EDS wykazała włączenie jonów Ca i P do warstwy, analiza XRD nie wykryła żadnych dodatkowych faz, w tym pochodzących od związków wapniowo-fosforanowych.



Rysunek 16 Dyfraktogramy rentgenowskie wybranych próbek: warstwy MAO otrzymane przy różnych przyłożonych napięciach przy stałym natężeniu prądu 32 mA i czasie procesu równym 15 min: MAO\_32\_15\_200 (a), MAO\_32\_15\_300 (b), MAO\_32\_15\_400 (c), kontrola (d), (przedstawione wyniki są reprezentatywne dla trzech analiz każdej próbki obróbki powierzchniowej)

#### 9.2.4. Ocena kąta zwilżania

W celu scharakteryzowania zwilżalności powierzchni w zależności od zastosowanych parametrów procesu MAO, przeprowadzono pomiary kąta zwilżania metodą spadającej kropli, których wyniki przedstawiono w tabeli 14.

Można zauważyć, że wszystkie próbki charakteryzowały się hydrofilową powierzchnią ( $CA < 90^\circ$ ). Jedynie próbki MAO\_32\_10\_400, MAO\_50\_10\_400, MAO\_32\_10\_200 i MAO\_32\_15\_300 istotnie ( $p < 0,05$ ) poprawiły zwilżalność powierzchni w porównaniu z grupą kontrolną. Obniżenie czasu procesu

MAO z 15 do 10 minut spowodowało obniżenie kąta zwilżania przy 400 V, natomiast zmiana natężenia była istotna w przypadku próbek wytwarzanych przy 200 V. Oprócz MAO\_32\_15 wzrost napięcia do 400 V spowodował poprawę hydrofilowości w stosunku do próbek wytworzonych w 200 i 300 V.

*Tabela 14 Zwilżalność powierzchni kontroli i warstw MAO wytworzonych przy różnych parametrach procesu (n = 5; dane to średnie ±SD; \* istotnie różne od kontroli; a istotnie różne od MAO\_32\_10\_200 i \_300, MAO\_32\_15\_400; b istotnie różne od MAO\_32\_15\_200 i \_400; MAO\_32\_10\_300; c istotnie różne od MAO\_50\_10\_200 i \_300; d istotnie różne od MAO\_32\_10\_200, (p < 0,05))*

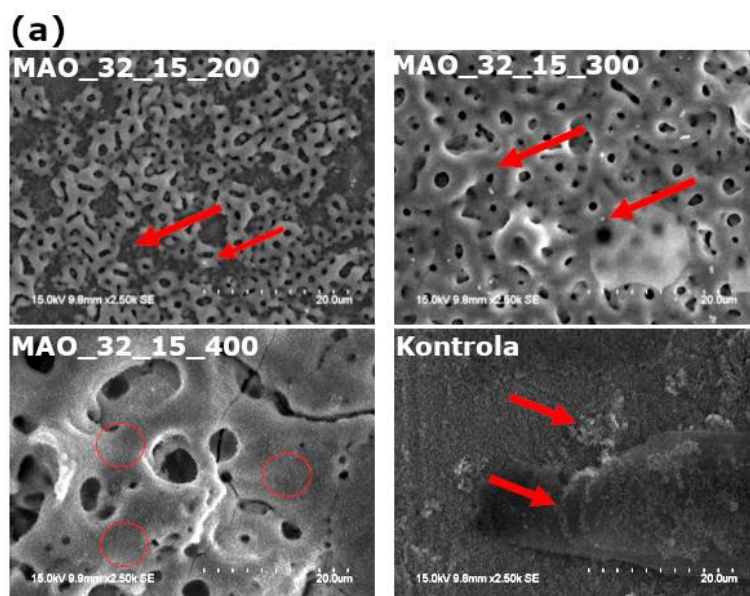
**Kąt zwilżania [°]**

| Parametry procesu | 0V          | 200 V                   | 300 V                      | 400 V                      |
|-------------------|-------------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|
| MAO_32_15         | -           | 56,65±6,98              | 35,63±4,35 <sup>*, b</sup> | 64,31±7,94                 |
| MAO_32_10         | -           | 53,99±2,56 <sup>*</sup> | 57,40±1,8                  | 39,16±5,18 <sup>*, a</sup> |
| MAO_50_10         | -           | 64,82±4,95 <sup>d</sup> | 62,13±2,58                 | 46,55±3,57 <sup>*, c</sup> |
| Kontrola          | 60,83 ±3,34 | -                       | -                          | -                          |

### 9.2.5. Ocena bioaktywności warstw MAO

Na podstawie dotychczasowych badań wykazano, że napięcie jest kluczowym parametrem wpływającym na właściwości warstw MAO. Parametry MAO\_32\_10 są niewystarczające do wytworzenia warstw przy napięciu 400 V. Natomiast parametry morfologiczne warstw MAO\_50\_10 i MAO\_32\_15 są do siebie zbliżone. Dodatkowo, warstwy MAO\_32\_15\_400 uzyskały najwyższy stosunek Ca/P, a MAO\_32\_15\_300 najniższy kąt zwilżania spośród wszystkich próbek. W związku z powyższym do badań nad bioaktywnością warstw wybrano próbki wytworzone przy trzech parametrach napięcia przy stałym natężeniu prądu 32 mA w czasie 15 min.

W celu zbadania wczesnej fazy aktywności biologicznej podłoża i warstw MAO wytworzonych przy różnych maksymalnych napięciach procesu, próbki zanurzone w roztworze Hanksa na 72 godziny. Morfologie powierzchni przykładowych próbek po zanurzeniu pokazano na rysunku 17.



(b)

|                 | Ca/P [% at.]  |               |               |          |
|-----------------|---------------|---------------|---------------|----------|
| Ca/P            | MAO_32_15_200 | MAO_32_15_300 | MAO_32_15_400 | Kontrola |
| Przed inkubacją | 0,31          | 0,74          | 1,14          | 0        |
| Po inkubacji    | 0,86          | 1,52          | 1,39          | 1,02     |

Rysunek 17 Morfologie próbek po inkubacji w roztworze Hanksa przez 72 h (a): warstwy MAO otrzymane przy różnych przyłożonych napięciach w stałym natężeniu prądu 32 mA i czasie obróbki równym 15 min. Stosunek Ca/P próbek przed i po inkubacji (b) (przedstawione wyniki są reprezentatywne dla trzech analiz każdej próbki poddanej obróbce powierzchniowej)

Można zauważyć, że na powierzchni próbki jest kilka przypadkowo rozrzuconych białych cząstek (rys. 17 a) bogatych w wapń i fosfor (rys. 17 b). Natomiast przy napięciu 400 V cała warstwa pokryta została białym nalotem o krzaczkowatej morfologii.

Stosunek Ca/P pokazano na rysunku 17 b. Można zaobserwować, że wszystkie próbki MAO po zanurzeniu charakteryzują się wyższym stosunkiem Ca/P w porównaniu z próbką referencyjną. Stosunek Ca/P po zanurzeniu próbek poddanych działaniu napięcia 200 i 300 V jest około dwukrotnie wyższy niż przed zanurzeniem. Natomiast w przypadku próbek poddanych działaniu napięcia 400 V, stosunek Ca/P spada i jest zbliżony do wartości Ca/P przed zanurzeniem.

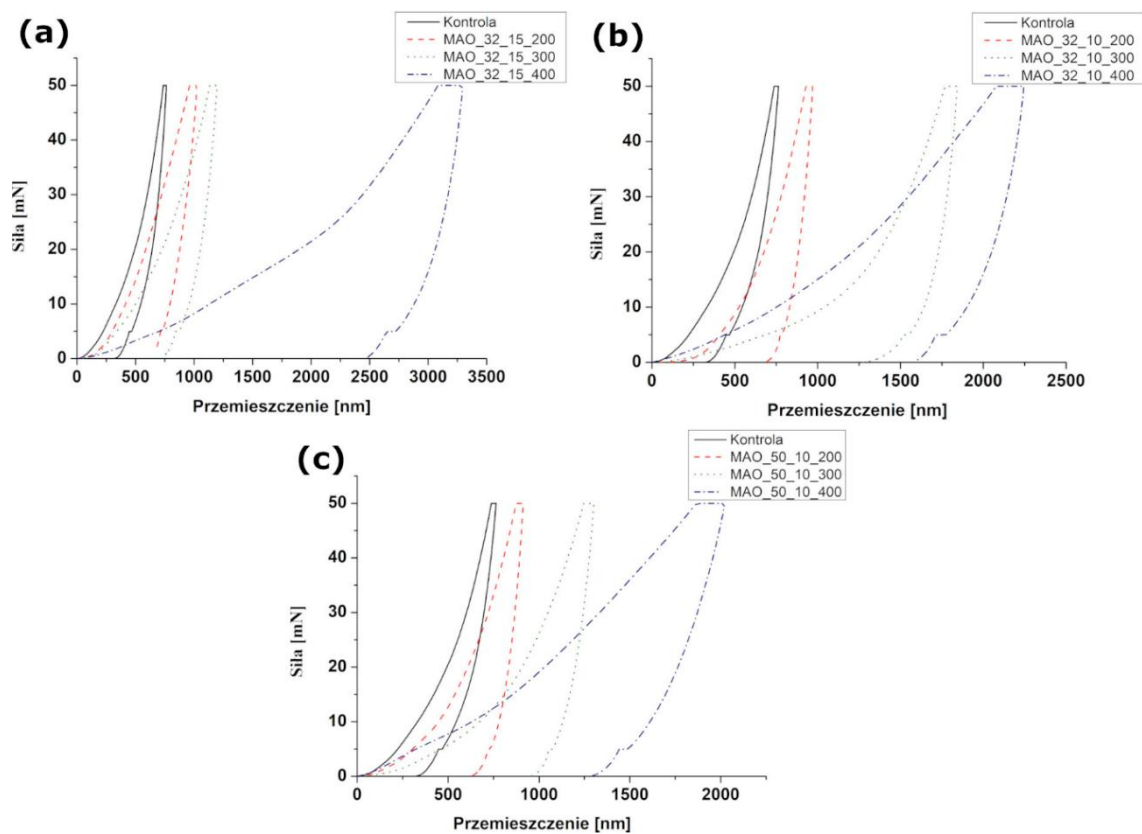
Wartość stosunku Ca/P po 72 h zanurzenia w roztworze Hanksa najbliższą stechiometrycznemu hydroksyapatytowi (1,67) uzyskano dla próbek poddanych działaniu napięcia 300 V (1,52).

### **9.2.6. Ocena właściwości nanomechanicznych**

Krzywą histerezy obciążenie-przemieszczenie jako przykład wyników testów nanoindentacji przedstawiono na rysunku 18.

Obserwuje się trzy główne etapy testu nanoindentacji: obciążenie do wartości maksymalnej zadanej siły, utrzymanie wgłębnika na stałej głębokości z maksymalną siłą (pełzanie) i odciążenie. Pod koniec fazy obciążania można zaobserwować maksymalne przemieszczenie wgłębnika związane z odkształceniem sprężystym i plastycznym, natomiast pod koniec fazy odciążenia miarą właściwości nanomechanicznych może być ostateczna głębokość (związana z powrotem sprężystym) odcisku stykowego [166]. Nieregularność występująca na etapie odciążania jest skorelowana z dryfem temperatury.

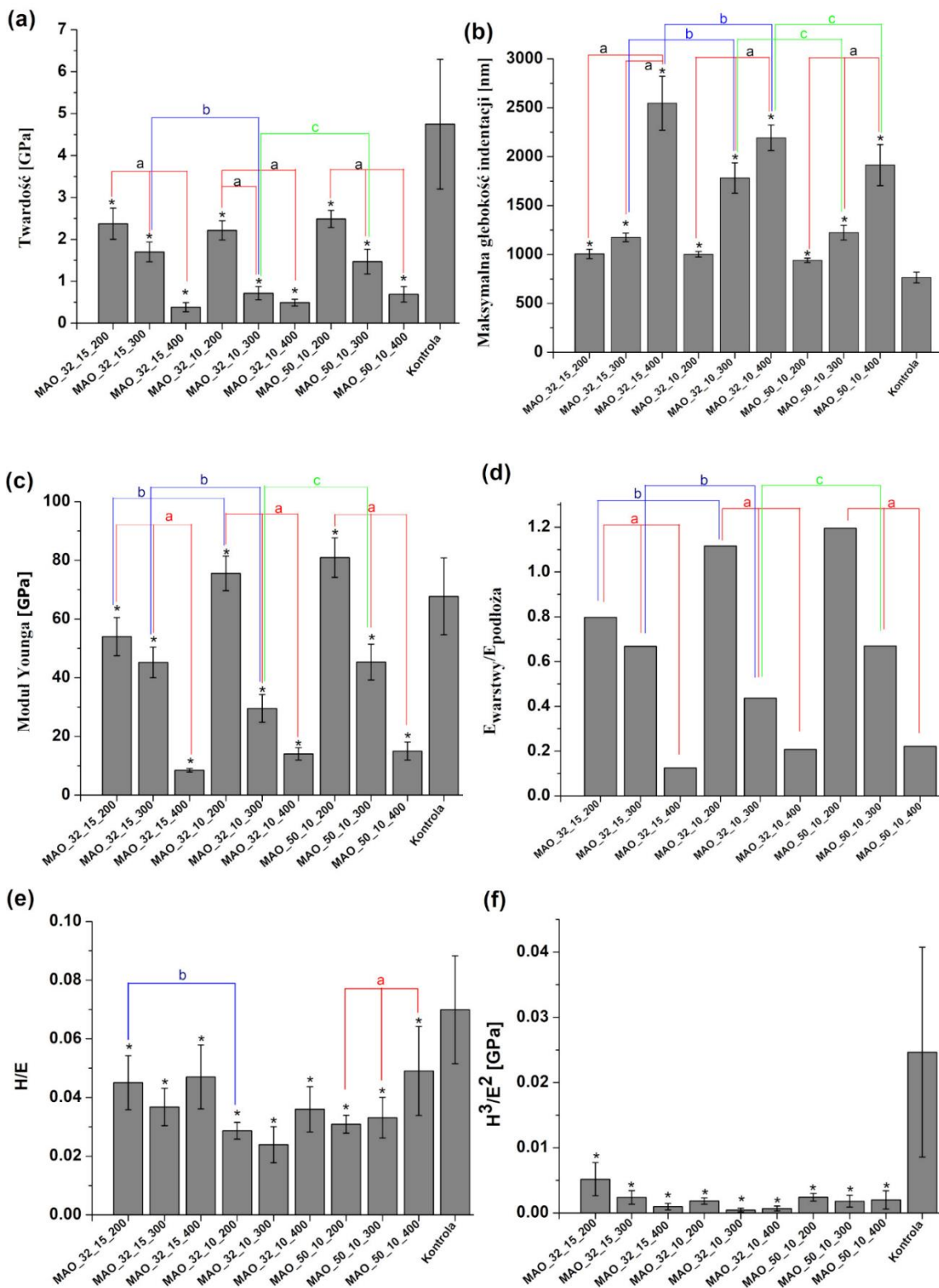
Obserwowany powrót sprężysty warstw MAO jest znacząco mniejszy w porównaniu z próbkami kontrolnymi i maleje wraz ze wzrostem napięcia procesu MAO. Zwiększanie wartości prądu z 32 do 50 mA spowodowało zmniejszenie maksymalnego przemieszczenia, natomiast zmniejszenie czasu procesu MAO z 15 do 10 min prowadziło do zwiększenia maksymalnego przemieszczenia wgłębnika. Co więcej, przy wyższym napięciu procesu MAO, przy utrzymaniu wgłębnika na stałej głębokości z maksymalną siłą, można zaobserwować większe pełzanie materiału.



Rysunek 18 Krzywa obciążenia i przemieszczenia nanoindentacji uzyskana dla badanych warstw MAO otrzymanych przy różnych parametrach procesu oraz próbek kontrolnych (a–c): MAO\_32\_15 (a), MAO\_32\_10 (b) i MAO\_50\_10 (c) (n=25)

Na podstawie krzywych obciążenia i przemieszczenia wyznaczone zostały podstawowe właściwości nanomechaniczne badanych próbek.

Rysunek 19 przedstawia twardość powierzchni, moduł Younga, maksymalną głębokość wgniecenia,  $E_{\text{warstwy}}/E_{\text{podłoża}}$ , stosunek  $H/E$  i  $H^3/E^2$  warstw MAO i próbki referencyjnej.



Rysunek 19 Właściwości nanomechaniczne: nanotwardość (a), maksymalna głębokość indentacji (b), moduł Younga (c),  $E_{warstwy}/E_{podloza}$  (d),  $H/E$  (e),  $H^3/E^2$  (f), grup kontrolnych i badanych warstw MAO utworzonych przy różnych parametrach procesu ( $n = 10$ ; \* istotnie różne od kontroli, a istotnie różne w grupach, b istotnie różne między grupami z różnymi czasami wytwarzania, c istotnie różne między grupami z różnym natężeniem prądu, ( $p < 0,05$ ))



Na podstawie analizy wyników właściwości nanomechanicznych można zauważyć, że modyfikacja MAO istotnie obniżyła wartości twardości i modułu Younga badanych materiałów. Najwyższą wartość twardości ( $4,75 \pm 1,55$  GPa) i modułu Younga ( $67,71 \pm 13,09$  GPa) uzyskano dla grupy kontrolnej. Oprócz próbek MAO\_32\_10\_300 i MAO\_32\_10\_400, wraz ze wzrostem napięcia przeprowadzanego procesu MAO, twardość spadła dwukrotnie dla MAO\_200 i aż dwunastokrotnie dla MAO\_400. W próbkach MAO\_300, gdy czas skrócił się z 15 do 10 min, twardość warstwy zmalała prawie o 60% w porównaniu z dłuższym procesem, natomiast przyrost zastosowanego natężenia prądu z 32 do 50 mA spowodował prawie dwukrotnie większą twardość badanej warstwy w porównaniu z próbkami poddanymi obróbce przy 32 mA. Podobne zachowanie zaobserwowano dla modułu Younga, gdzie MAO\_50\_10\_300 charakteryzowało się wyższą wartością modułu Younga w porównaniu z MAO\_32\_10\_300. Natomiast zmiana czasu z 15 na 10 min najpierw zmniejszyła (dla MAO\_200), a następnie zwiększyła (dla MAO\_300) wartość modułu Younga. Moduł Younga był wyższy dla wszystkich próbek poddanych działaniu napięcia 200 V, osiągając najwyższą wartość równą  $80,94 \pm 6,71$  GPa uzyskaną podczas procesu MAO w warunkach 50 mA, podczas gdy próbki poddane działaniu napięcia 300 i 400 V wykazywały istotnie obniżony moduł Younga.

Jak pokazano na rysunku 19 b, wraz ze wzrostem napięcia zwiększa się również maksymalna głębokość indentacji. Największą głębokość ( $2,55 \mu\text{m}$ ) osiągnięto przy próbce MAO\_32\_15\_400, około 60% większą od najniższej wartości uzyskanej przez MAO\_50\_10\_200 ( $0,94 \mu\text{m}$ ).

Zgodnie z literaturą, im niższe są stosunki  $H/E$  i  $H^3/E^2$ , odniesione odpowiednio do zniszczenia materiału w wyniku odkształcenia sprężystego i odporności materiałów na odkształcenia plastyczne, tym gorsza jest odporność materiałów na zużycie [172]. Można zauważyć, że oba wskaźniki są znacznie niższe dla warstw MAO w porównaniu z grupą kontrolną i niższe od deklarowanej optymalnej wartości parametru  $H/E$  ok. 0,1 [173] (rys. 19 e, f).

Niektórzy autorzy wykazali, że ściśle dopasowanie modułu sprężystości warstw i podłoża, zmniejsza naprężenia międzyfazowe i zapewnia lepszą przyczepność [174]. Korzystne jest uzyskanie wartości stosunku  $E_{\text{warstwy}}/E_{\text{podłoża}}$  bliskiej jedności [175]. Można zauważyć, że  $E_{\text{warstwy}}/E_{\text{podłoża}}$  maleje wraz ze wzrostem przyłożonego napięcia,

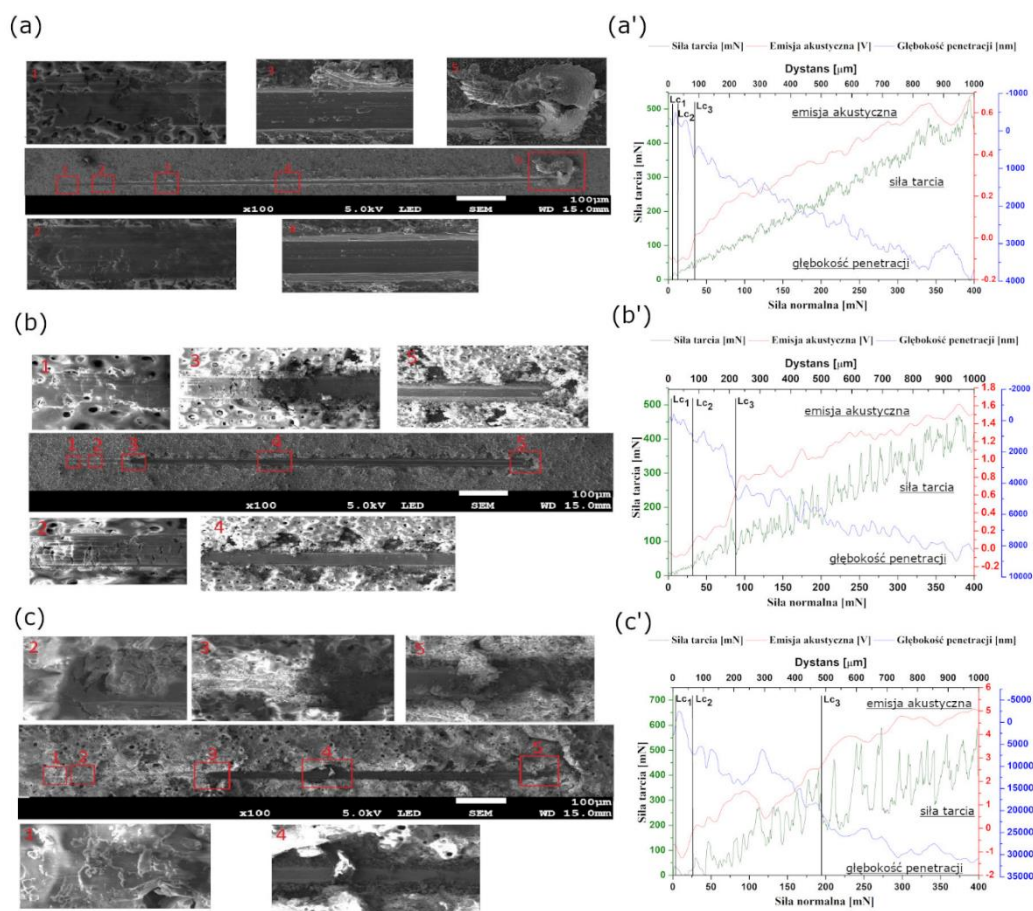
a wartość najbliższą optimum uzyskują wszystkie próbki poddane działaniu niższego napięcia (MAO\_200), natomiast największe niedopasowanie modułu Younga warstwy i podłoża występuje w przypadku próbek poddanych obróbce pod wysokim napięciem (MAO\_400).

### **9.2.7. Adhezja warstw MAO do podłoża**

W teście zarysowania można zaobserwować trzy główne uszkodzenia: pęknięcie kohezyjne, adhezyjne i mieszane [174]. Minimalne obciążenie, przy którym następuje pierwsze uszkodzenie, charakteryzuje się obciążeniem krytycznym ( $L_c$ ). W literaturze zwykle przedstawia się jedno [176], dwa [177] lub trzy [178] obciążenia krytyczne ( $L_{c1}$ ,  $L_{c2}$ ,  $L_{c3}$ ). W niniejszym opracowaniu  $L_{c1}$  jest skorelowane z pierwszym pęknięciem (początkowa deformacja kohezyjna),  $L_{c2}$  oznacza obciążenie, pod jakim na krawędzi rysy nastąpiło pierwsze rozwarstwienie (początkowe odkształcenie adhezyjne),  $L_{c3}$  przedstawia całkowitą perforację warstwy, gdzie podłoże zaczyna być widoczne w sposób ciągły. Według literatury [179]  $L_{c1}$  można identyfikować na podstawie pierwszego pików emisji akustycznej skorelowanego ze spontaniczną falą uderzeniową powstającą w wyniku mikropęknięć, natomiast  $L_{c2}$  i  $L_{c3}$  można mierzyć w następujących po sobie kolejnych wysokich pikach, które wskazują na duże uszkodzenia. Aby zwiększyć dokładność analizy uszkodzeń, wszystkie wyniki zostały również przeanalizowane przy użyciu innych danych z testu zarysowania, tj. siły tarcia i głębokości penetracji. W celu lepszego zrozumienia, w którym miejscu nastąpił początek uszkodzenia, wyniki porównano z obrazami uzyskanymi z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej.

Porównanie obrazów SEM (rys. 21 a-c) pokazuje, że zachowanie się materiału w obszarze zarysowań jest zależne od parametrów procesu MAO. W przypadku próbek poddanych obróbce pod napięciem 200 V w warstwie wystąpiło tylko niewielkie złuszczenie (poza miejscem zakończenia obciążenia, gdzie wystąpiło większe złuszczenie), zaobserwowano jedynie nieliczne mikropęknięcia okrężne, niektóre boczne i łukowe pęknięcia rozciągające. Im wyższe napięcie, tym więcej pojawiło się poprzecznych półkolistych pęknięć i odprysków. Dla 300 i 400 V pęknięcia wyboczeniowe typu konforemnego wskazują na wysoce kohezyjne zniszczenie. Deformacje odpryskowe występują jednak znacznie później (dalej od początku ścieżki rysy) w porównaniu z MAO\_200, co może sugerować lepszą przyczepność warstwy

do podłoża. W przypadku próbek poddanych działaniu napięcia 300 V całkowita perforacja staje się ciągła, natomiast uszkodzenie warstwy próbek poddanych działaniu napięcia 400 V ma bardziej cykliczny charakter rozwarstwienia. Chociaż we wszystkich próbkach dochodzi do przebicia warstw, miejsce, w którym podłoże zaczyna pojawiać się wzdłuż śladu zarysowania, jest różne; im niższe było napięcie, tym wcześniej (bliżej początku ścieżki zarysowania) pojawiały się perforacje całkowite, co może świadczyć o poprawie właściwości adhezyjnych wraz ze wzrostem zastosowanego napięcia.



Rysunek 20 Ścieżka zarysowania z zaznaczonymi uszkodzeniami kohezyjnymi i adhezyjnymi powstałymi w teście zarysowania (a-c), oraz zależność siły tarcia (F), emisji akustycznej i głębokości penetracji pod obciążeniem (L) ze wskazanymi obciążeniami krytycznymi ( $L_{c1}$ ,  $L_{c2}$ ,  $L_{c3}$ ) (a'-c') wybranych grup próbek o zmiennych parametrach napięcia: MAO\_32\_15\_200 (a,a'); MAO\_32\_15\_300 (b,b'); MAO\_32\_15\_400 (c,c') (przedstawione wyniki są reprezentatywne dla dziesięciu analizy każdej próbki obróbki powierzchniowej)

Przykładowe zależności siły tarcia (F), emisji akustycznej, głębokości penetracji i obciążenia (L) przy wskazanych obciążeniach krytycznych ( $L_{c1}$ ,  $L_{c2}$ ,  $L_{c3}$ ) dla warstw MAO przedstawiono na rysunku 20 (a'-c'), natomiast średnie wartości obciążen krytycznych i krytycznej siły tarcia, przy których nastąpiło całkowite rozwarstwienie ( $F_c(L_{c2})$ ), przedstawiono w tabeli 15.

Tabela 15 Obciążenia krytyczne i krytyczna siła tarcia, przy których nastąpiło całkowite rozwarstwienie ( $F_c$  ( $Lc_2$ )) zmierzone podczas testu zarysowania dla wszystkich warstw MAO (przedstawione wyniki są reprezentatywne dla pięciu analiz każdej próbki poddanej obróbce powierzchniowej)

**Siła krytyczna [mN]**

| Próbka        | $Lc_1$     | $Lc_2$      | $Lc_3$       | $F_c$ ( $Lc_2$ ) |
|---------------|------------|-------------|--------------|------------------|
| MAO_32_15_200 | 4,97±1,47  | 12,34±4,9   | 43,27±8,16   | 220,68±16,95     |
| MAO_32_15_300 | 7,19±4,17  | 27,41±12,78 | 80,62±11,39  | 134,48±25,53     |
| MAO_32_15_400 | 10,51±1,68 | 63,49±28,01 | 163,35±42,13 | 368,33±40,85     |
| MAO_32_10_200 | 5,07±1,94  | 29,70±10,49 | 59,39±9,56   | 39,06±14,56      |
| MAO_32_10_300 | 10,27±3,63 | 31,28±13,46 | 83,50±8,06   | 45,14±21,56      |
| MAO_32_10_400 | 8,52±2,26  | 46,63±16,88 | 157,76±36,69 | 138,42±43,69     |
| MAO_50_10_200 | 8,12±1,89  | 17,63±7,14  | 44,73±4,26   | 131,80±16,91     |
| MAO_50_10_300 | 13,42±3,93 | 25,56±5,67  | 76,38±6,98   | 477,37±19,93     |
| MAO_50_10_400 | 12,02±3,99 | 43,13±15,39 | 178,23±43,81 | 520,08±48,00     |

Można zauważyć, że dla próbek MAO 200, 300 i 400 V obciążenie krytyczne mikropęknięć ( $Lc_1$ ) wystąpiło przy małej sile od 4,97±1,47 do 13,42±3,93 mN (odpowiednio dla MAO\_32\_15\_200 i MAO\_50\_10\_300). Zgodnie z rysunkiem 20 i tabelą 15, odporność warstw na zarysowanie uległa poprawie wraz z najwyższym napięciem procesu MAO.  $Lc_3$  warstw MAO\_400 (~157-178 mN) były o około 50% wyższe niż  $Lc_3$  MAO\_300 i o 70% wyższe niż dla MAO\_200. Dodatkowo, MAO\_400 najdłużej pozostawała bez całkowitego uszkodzenia (całkowite rozwarstwienia występujące dalej od początku ścieżki zarysowania) spośród wszystkich analizowanych warstw (~370  $\mu\text{m}$  dla MAO\_32\_10\_400 i MAO\_32\_15\_400 oraz ~480  $\mu\text{m}$  dla MAO\_50\_10\_400). Natomiast najszybsze (całkowite rozwarstwienia występujące bliżej początku ścieżki zarysowania) całkowite rozwarstwienie wystąpiło w MAO\_200 (~173, 85 i 101  $\mu\text{m}$  odpowiednio dla MAO\_32\_10\_200, MAO\_32\_15\_200 i MAO\_50\_10\_200). W próbkach utlenionych przy średnim napięciu (MAO\_300), średnie odległości od początku ścieżki zarysowania, gdzie wystąpiło pierwsze rozwarstwienie, wynosiły odpowiednio ~205, 223 i 187  $\mu\text{m}$  dla MAO\_32\_10\_300, MAO\_32\_15\_300 i MAO\_50\_10\_300. Największą wartość siły tarcia podczas pierwszego uszkodzenia adhezyjnego  $F_c$  ( $Lc_2$ ) uzyskały najbardziej chropowate próbki MAO\_50\_10\_400 i MAO\_32\_15\_400. Bardzo wysoka wartość  $F_c$  ( $Lc_2$ ) MAO\_50\_10\_300 odzwierciedla najwyższy efekt pill-up w porównaniu z innymi próbkami (rys. 20 b).

### 9.2.8. Podsumowanie rozdziału

Stop tytanu Ti-13Zr-13Nb wytworzony metodą SLM poddano modyfikacji powierzchniowej wykorzystując do tego celu utlenianie mikrołukowe w elektrolicie zawierającym fosfor i wapń. W celu sprawdzenia wpływu parametrów procesu MAO na charakterystykę warstw MAO przebadano 3 zmienne parametry procesu, dobrane na podstawie danych literaturowych: napięcie (200, 300, 400 V), czas (15, 10 min) i natężenie prądu (32, 50 mA).

Badania wykazały, że charakterystyka warstw bardzo się różniła w zależności od zastosowanego napięcia. Napięcie 200 V było niewystarczające do wytworzenia warstwy MAO na całej powierzchni próbki, dodatkowo warstwy wykazywały się niskim stosunkiem Ca/P i słabą adhezją do podłoża. Warstwy wytworzone pod napięciem 300 V były najbardziej regularne i powtarzalne, wpłynęły na wzrost stosunku Ca/P, spadek kąta zwilżania oraz spadek twardości i modułu Younga, przy jednoczesnej poprawie siły przyczepności do materiału macierzystego, w stosunku do warstw wytworzonych przy napięciu 200 V. Jednak dopiero wzrost napięcia do 400 V miał największy wpływ na charakterystykę warstw i spowodował, że w warstwie MAO nastąpił istotny statystycznie wzrost rozmiaru porów, grubości i chropowatości warstwy, stosunku Ca/P i adhezji warstwy do podłoża, przy jednoczesnym spadku twardości i modułu Younga w porównaniu do warstw wytwarzanych przy niższych napięciach. Dopiero przy napięciu 400 V wpływ pozostałych parametrów procesu (natężenia i czasu) był istotnie widoczny. Badania wykazały, że napięcie ma kluczowy wpływ na właściwości warstw.

Dodatkowo stwierdzono, że parametry procesu MAO\_32\_10 były niewystarczające do wytworzenia warstw MAO\_400. Z kolei wyższe natężenie prądu przy tym samym czasie procesu (MAO\_50\_10) przyspieszało zachodzenie reakcji elektrochemicznych, a tym samym „rekompensowało” krótki czas procesu powodując, że morfologia powierzchni (rozmiar porów, grubość, chropowatość) była porównywalna dla próbek MAO\_32\_15 i MAO\_50\_10. Przewagą warstw MAO\_32\_15 w stosunku do MAO\_50\_10 była najwyższa wartość Ca/P i najniższy kąt zwilżania, dlatego do badań nad bioaktywnością dobrano próbki wykonywane przy natężeniu prądu 32 mA w czasie 15 min. Na podstawie powyższych badań nie dokonano konsensusu odnośnie preferowanego napięcia 300, czy 400 V, dlatego

dalsze badania przeprowadzane po kątem wpływu dodatków bioaktywnych na charakterystykę warstw wytwarzano eliminując jedynie napięcie procesu równe 200 V. Dodatkowo, obserwowany wzrost siły przyczepności warstw do podłoża przy zastosowanym wyższym natężeniu prądu był przyczyną zmiany stosowanego natężenia prądu w kolejnych badaniach.

## 9.3. Charakterystyka warstw MAO z dodatkami bioaktywnymi i antybakteryjnymi

### 9.3.1. Wpływ dodatków na charakterystykę powierzchni i mikrostruktury warstw

Do elektrolitu bazowego (CA, GP) wprowadzono azotan srebra i/lub azotan galu, jako źródło dodatków bioaktywnych, w trzech różnych stężeniach: 0,3; 3 i 6 mM i przeprowadzono utlenianie mikrołukowe pod dwoma napięciami: 300 i 400 V, z zastosowanym natężeniem prądu 83 mA, w czasie 15 minut. Na podstawie obserwacji przebiegu procesu, a następnie makroskopowej oceny próbek stwierdzono brak możliwości wykonania warstw MAO w elektrolicie zawierającym 6 mM azotanu galu, zarówno pod napięciem 300, jak i 400 V. Napięcie w trakcie trwania procesu nie osiągało maksymalnych ustalonych wartości i utrzymywało się na poziomie poniżej 100 V, a próbki po wyjęciu z elektrolitu były pokryte czarnym nalotem przypominającym nadpalenie. Taka sama sytuacja wystąpiła podczas próby włączenia do warstw jednocześnie galu i srebra w trakcie procesu MAO przeprowadzanym w elektrolicie zawierającym mieszaninę azotanu galu (3mM) i azotanu srebra (3mM). Na tej podstawie do dalszych badań odrzucono próbki MAO\_300\_6Ga i MAO\_400\_6Ga, MAO\_300\_3Ag\_3Ga, MAO\_400\_3Ag\_3Ga. Natomiast pozostałe próbki poddano dalszym badaniom.

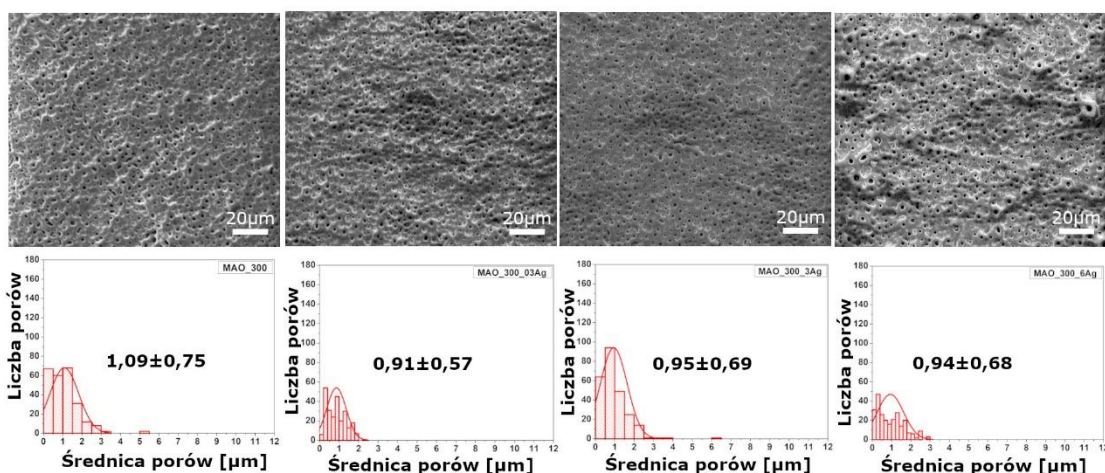
Z uzyskanych obrazów SEM można zauważyć, że wszystkie przedstawione próbki charakteryzowały się porowatą powierzchnią, specyficzną dla warstw MAO (rys. 21). Przy zastosowanym niższym napięciu, powierzchnie były bardziej regularne, natomiast wzrost napięcia spowodował powstanie nieregularności z licznymi wulkanopodobnym strukturami. Analiza histogramów ujawniła istotne różnice w rozmiarach porów w zależności od zastosowanego napięcia i składu warstw. Można zauważyć, że wszystkie warstwy posiadają zarówno nano- jak i mikropory. Przy wyższych napięciach amplituda rozmiaru porów jest znacznie większa i waha się pomiędzy 0,1 a 12  $\mu\text{m}$  w porównaniu do warstw wytworzonych przy niższym napięciu, gdzie rozmiar porów mieści się średnio w granicach od 0,1 do 5  $\mu\text{m}$ . Dodatek srebra i galu spowodował obniżenie średnicy porów (z wyjątkiem MAO\_300\_03Ga) w stosunku do warstw wytworzonych w elektrolicie bazowym. Najbardziej nieregularna warstwa wystąpiła przy zastosowaniu napięcia utleniania równemu 400 V,

w elektrolicie zawierającym 3 mM azotanu srebra, gdzie na 250 porów aż 160 było rozmiarów nanometrycznych, a pozostałe wahały się od 1 do 12  $\mu\text{m}$ . Przy niższym napięciu, średnia wielkość porów w warstwach z dodatkiem galu była wyższa niż w warstwach zawierających takie samo stężenie srebra.

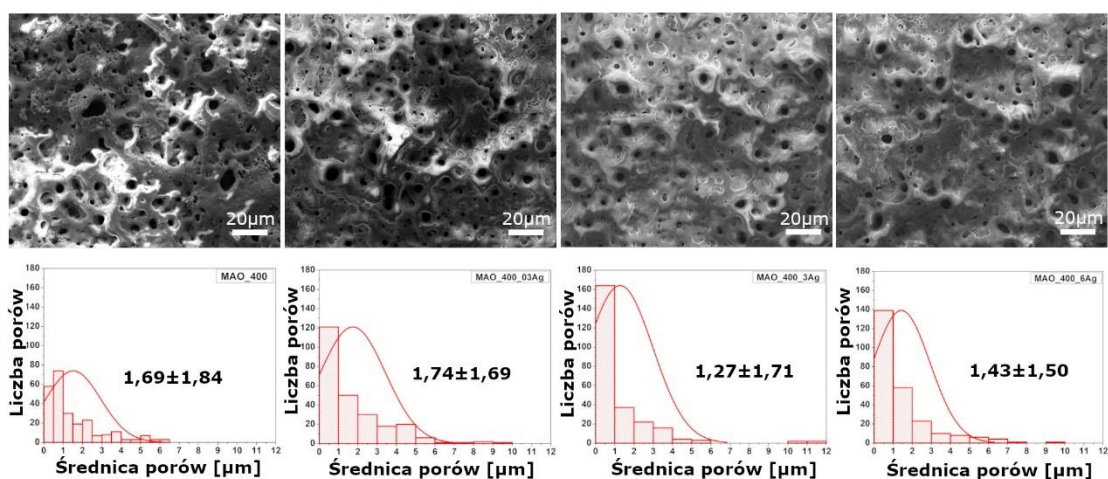
Rysunek 21 przedstawia obrazy SEM uzyskanych warstw MAO oraz średnią średnicę porów wraz z histogramami. Duże odchylenia standardowe występujące we wszystkich warstwach uzyskanych przy napięciu 400 V potwierdzają istotną nieregularność tych warstw.



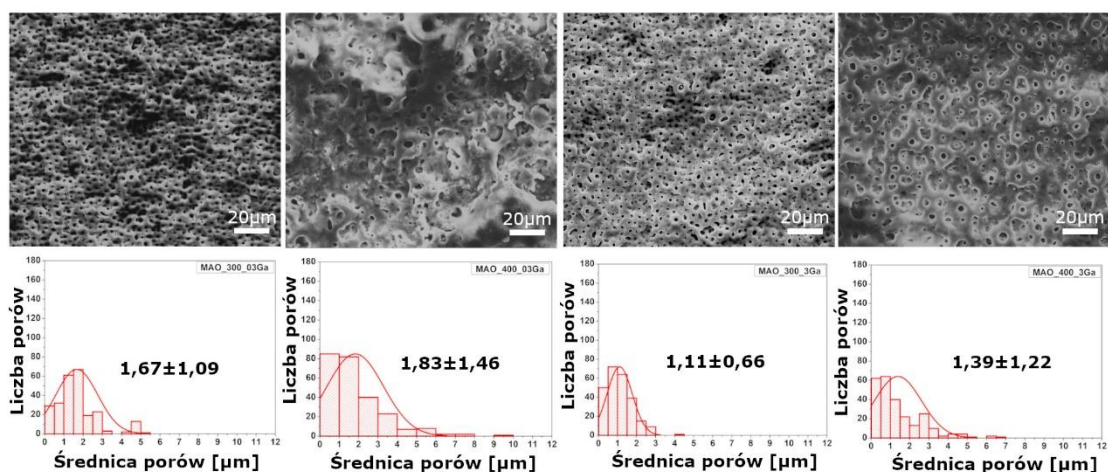
**MAO\_300 MAO\_300\_03Ag MAO\_300\_3Ag MAO\_300\_6Ag**



**MAO\_400 MAO\_400\_03Ag MAO\_400\_3Ag MAO\_400\_6Ag**



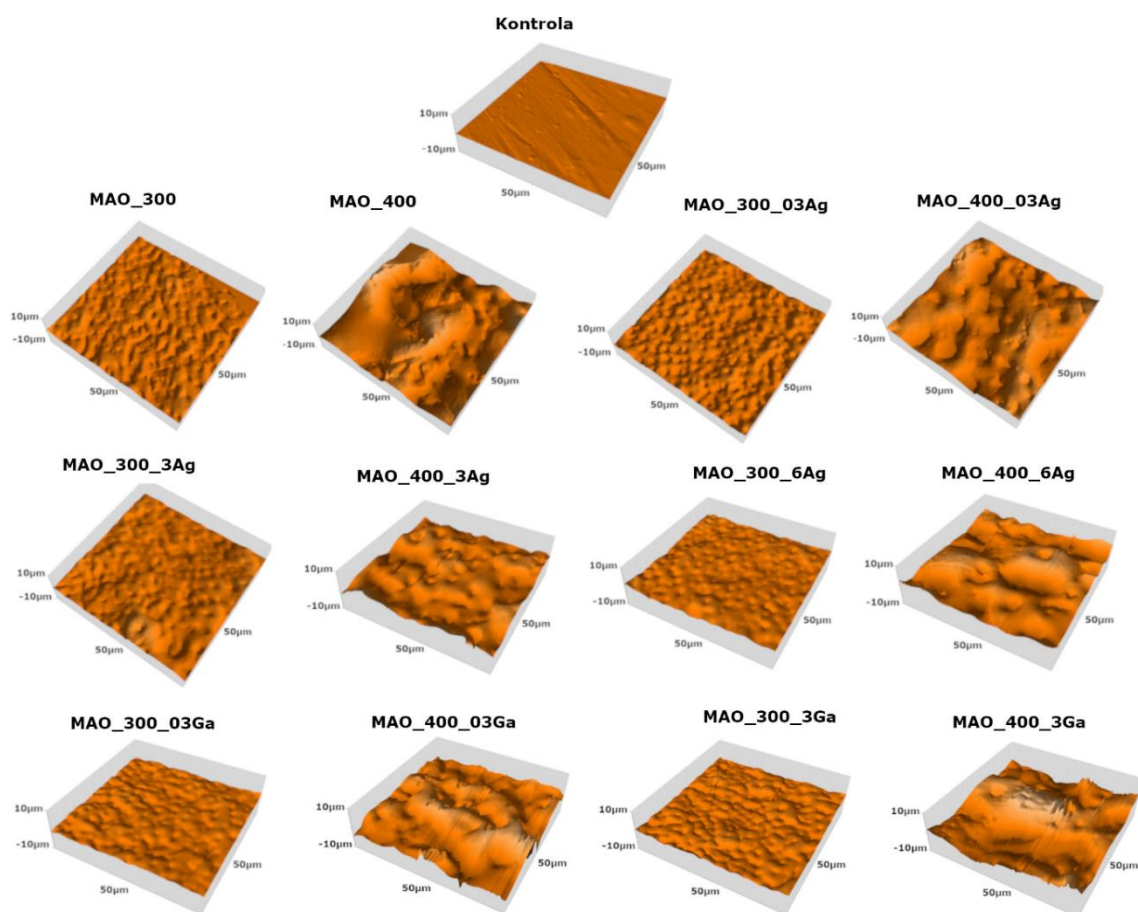
**MAO\_300\_03Ga MAO\_400\_03Ga MAO\_300\_3Ga MAO\_400\_3Ga**



Rysunek 21 Topografia powierzchni SEM warstw MAO wytworzonych przy dwóch różnych napięciach w elektrolicie bazowym z i bez dodatków srebra/galu wraz z histogramami przedstawiającymi średnicę porów (n=250)

Rysunek 22 i tabela 16 przedstawiają topografię powierzchni 3D wraz z chropowatością powierzchni ( $S_a$ ) uzyskaną z analizy AFM, oraz średnie arytmetyczne odchylenie profilu chropowatości od linii średniej ( $R_a$ ) uzyskane z pomiarów z wykorzystaniem profilometru.

Można zauważyć, że napięcie było głównym czynnikiem wpływającym na parametr chropowatość, gdzie wraz ze wzrostem napięcia wartości chropowatości wzrosły nawet sześciokrotnie. Wpływ dodatków nie był statystycznie istotny z wyjątkiem warstw wytworzonych w wyższym stężeniu azotanu galu w połączeniu z wyższym napięciem. MAO\_400\_3Ga charakteryzowały się największą wartością chropowatości powierzchniowej  $S_a$  ( $1,90 \pm 0,04 \mu\text{m}$ ) spośród wszystkich próbek.



Rysunek 22 Topografie powierzchni AFM kontroli i warstw MAO wytworzonych przy dwóch różnych napięciach w elektrolicie bazowym z i bez dodatków srebra/galu

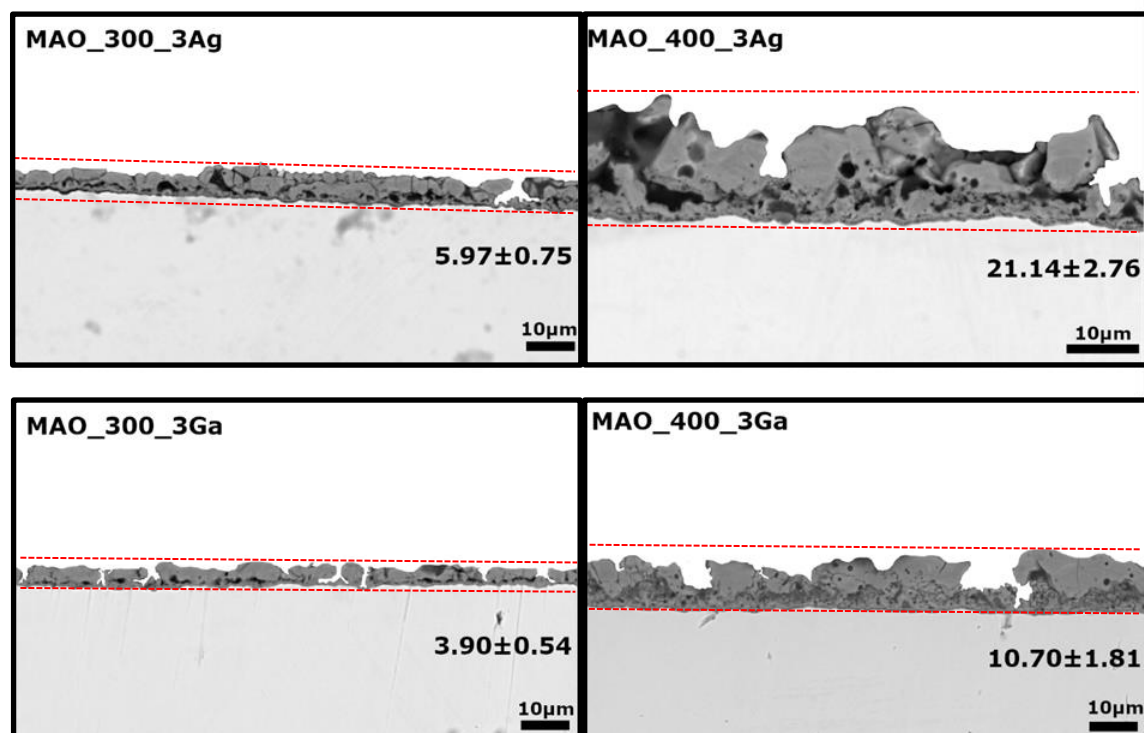
Tabela 16 Chropowatość powierzchniowa Sa oraz chropowatość profilu Ra dla kontroli i warstw MAO wytworzonych w dwóch różnych napięciach w elektrolicie bazowym z i bez dodatków srebra/galu (n = 3; dane to średnie ±SD; \* istotnie różne między grupami napięcia; # istotnie różne od kontroli, a istotny wpływ dodatku galu lub srebra, b istotnie różne od próbek wytwarzanych w tym samym warunkach napięciowych, ale z inną zawartością dodatku srebra/galu, c istotnie różne od próbek wytwarzanych w tych samych warunkach napięciowych, ale z innym dodatkiem: srebra/galu)

| Chropowatość warstw MAO [μm] |                                    |                           |
|------------------------------|------------------------------------|---------------------------|
| Próbka                       | Sa [μm]                            | Ra [μm]                   |
| Kontrola                     | 0,05±0,03                          | 0,21±0,01                 |
| MAO_300                      | 0,30±0,01                          | 0,44±0,04                 |
| MAO_400                      | 1,05±0,35 <sup>*, #</sup>          | 2,74±0,11 <sup>*, #</sup> |
| MAO_300_03Ag                 | 0,37±0,02 <sup>#</sup>             | 0,51±0,01                 |
| MAO_400_03Ag                 | 1,06±0,01 <sup>*, #</sup>          | 2,73±0,19 <sup>*, #</sup> |
| MAO_300_3Ag                  | 0,41±0,05 <sup>#</sup>             | 0,44±0,08                 |
| MAO_400_3Ag                  | 1,07±0,33 <sup>*, #</sup>          | 2,74±0,12 <sup>*, #</sup> |
| MAO_300_6Ag                  | 0,38±0,03 <sup>#</sup>             | 0,46±0,04                 |
| MAO_400_6Ag                  | 1,18±0,07 <sup>*, #</sup>          | 2,58±0,40 <sup>*, #</sup> |
| MAO_300_03Ga                 | 0,30±0,01                          | 0,36±0,03                 |
| MAO_400_03Ga                 | 1,19±0,07 <sup>*, #</sup>          | 2,82±0,11 <sup>*, #</sup> |
| MAO_300_3Ga                  | 0,33±0,01                          | 0,46±0,08                 |
| MAO_400_3Ga                  | 1,90±0,04 <sup>*, #, a, b, c</sup> | 2,40±0,38 <sup>*, #</sup> |

Na rysunku 23 przedstawione zostały przykładowe przekroje wybranych próbek wytworzonych przy dwóch parametrach napięcia z dodatkiem 3 mM azotanu galu lub azotanu srebra.

We wszystkich przypadkach przekrój wykazuje strefowość typową dla warstw MAO, tuż przy materiale macierzystym powstaje cienka zbita warstwa, która następnie przechodzi w grubszą i bardziej porowatą. Doskonale widoczne są nieregularne kanały wyladowcze oraz pęknięcia w formie drobnych rys, szczególnie zauważalne w przypadku próbek MAO\_400\_3Ga i MAO\_300\_3Ag, które mogły powstać na skutek preparatyki przekroju. Można zauważyć, że wzrost napięcia spowodował istotny wzrost zarówno grubości, jak i porowatości przekroju warstwy. Zastosowanie wyższego stężenia azotanu galu w połączeniu z napięciem 400 V prowadziło do istotnego obniżenia grubości warstwy w porównaniu do pozostałych grup próbek wytwarzanych pod tym samym napięciem.

Tak jak w przypadku rozmiaru porów, można zauważyć, że przy wyższym napięciu odchylenia standardowe grubości warstw są znacznie większe, zarówno w obrębie warstwy na tej samej próbce (odchylenie widoczne na przekroju), jak i między próbkami z tej samej grupy (odchylenia widoczne w tabeli 17), co również świadczy o większej nieregularności w stosunku do warstw wytworzonych przy napięciu równym 300 V.



Rysunek 23 Przekrój wybranych warstw MAO (wraz z zaznaczoną grubością) wytworzonych przy zastosowanym napięciu 300 i 400 V w elektrolicie zawierającym 3 mM azotanu srebra lub 3 mM azotanu galu

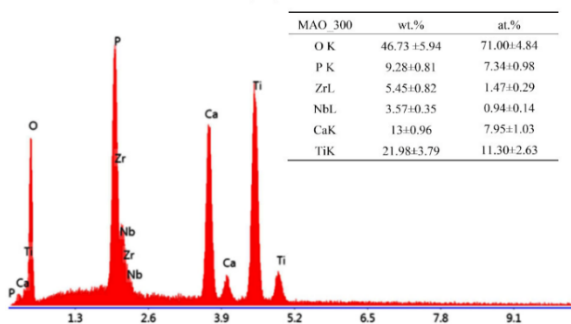
Tabela 17 Grubość warstw MAO wytworzonych w dwóch różnych napięciach w elektrolicie bazowym z i bez dodatków srebra/galu ( $n=30$ ; dane to średnie  $\pm SD^*$  istotnie różne między grupami napięcia,  $a$  istotny wpływ dodatku galu lub srebra,  $b$  istotnie różne od próbek wytwarzanych w tym samych warunkach napięciowych, ale z inną zawartością dodatku srebra/galu,  $c$  istotnie różne od próbek wytwarzanych w tych samych warunkach napięciowych, ale z innym dodatkiem: srebra/galu)

| Grubość warstw MAO [ $\mu\text{m}$ ] |                            |
|--------------------------------------|----------------------------|
| Próbka                               | Grubość [ $\mu\text{m}$ ]  |
| MAO_300                              | 4,89 $\pm$ 0,71            |
| MAO_400                              | 20,87 $\pm$ 2,27*          |
| MAO_300_03Ag                         | 4,44 $\pm$ 0,53            |
| MAO_400_03Ag                         | 22,22 $\pm$ 1,97*          |
| MAO_300_3Ag                          | 4,99 $\pm$ 1,03            |
| MAO_400_3Ag                          | 22,41 $\pm$ 2,54*          |
| MAO_300_6Ag                          | 4,35 $\pm$ 0,64            |
| MAO_400_6Ag                          | 21,85 $\pm$ 2,38*          |
| MAO_300_03Ga                         | 2,63 $\pm$ 0,34            |
| MAO_400_03Ga                         | 22,13 $\pm$ 1,96*          |
| MAO_300_3Ga                          | 3,64 $\pm$ 0,57            |
| MAO_400_3Ga                          | 11,50 $\pm$ 2,63*, a, b, c |

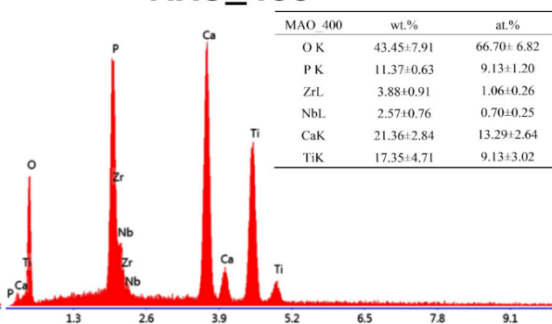
### 9.3.2. Wpływ dodatków na charakterystykę składu chemicznego i fazowego warstw

Na rysunkach 24 i 25 przedstawiono wyniki badań składu chemicznego warstw MAO w postaci widm EDS i tabel zawierających atomowy i masowy procent wykrytych pierwiastków. Srebro i gal z powodzeniem zostały włączone do warstwy, zarówno w trakcie procesu przeprowadzanego przy napięciu 300 V, jak i 400 V. Nie zaobserwowano bezpośredniej zależności zawartości pierwiastka aktywnego od zastosowanego napięcia, natomiast istniała zależność od stężenia azotanu. Przy zastosowaniu niższych stężeń azotanu srebra, EDS wykazała zbliżone wartości srebra na powierzchni, 0,04-0,15 % at. Ag dla 0,3 mM i 0,05-0,21% at. Ag dla 3 mM, dopiero wzrost stężenia azotanu srebra do 6 mM spowodował włączenie większej zawartości srebra w zakresie 0,13-0,45% at. Ag. Z kolei, wzrost stężenia azotanu galu z 0,3 do 3 mM doprowadził do podwojenia zawartości galu w warstwie. Porównując te same warunki napięciowe procesu MAO, można zauważyć, że galu zostało włączone do warstwy więcej niż srebra, 0,11-0,25% at. Ga przy 0,3 mM  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  i 0,30-0,56% at. Ga przy 3 mM  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ .

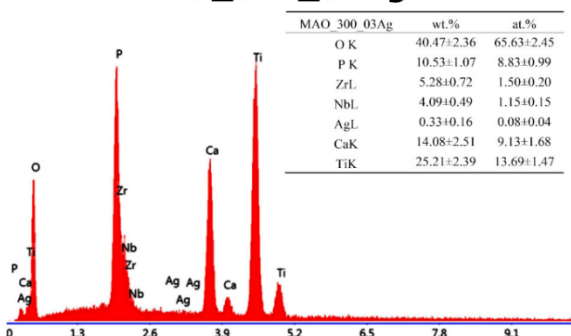
### MAO\_300



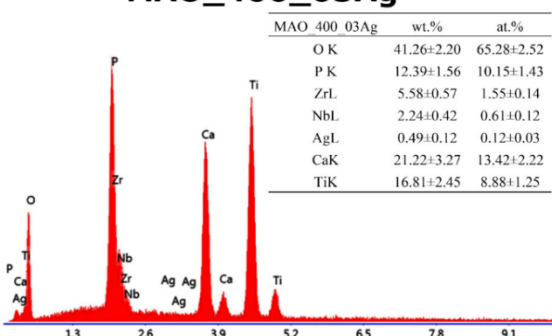
### MAO\_400



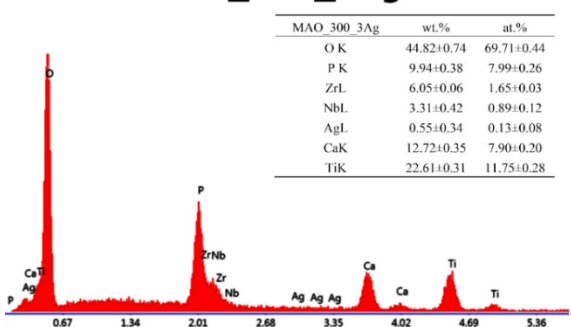
### MAO\_300\_03Ag



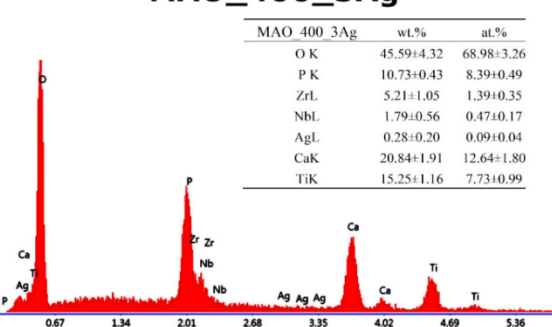
### MAO\_400\_03Ag



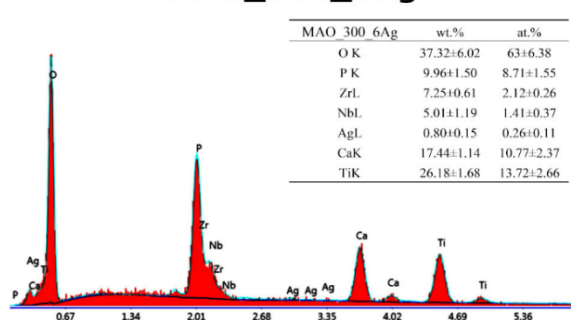
### MAO\_300\_3Ag



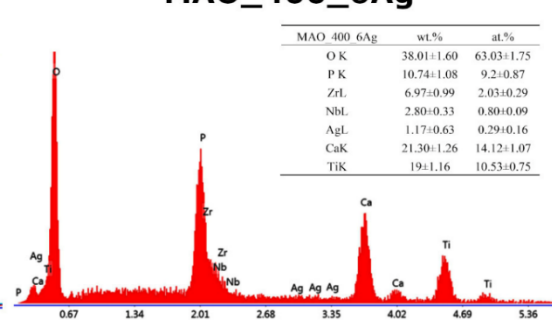
### MAO\_400\_3Ag



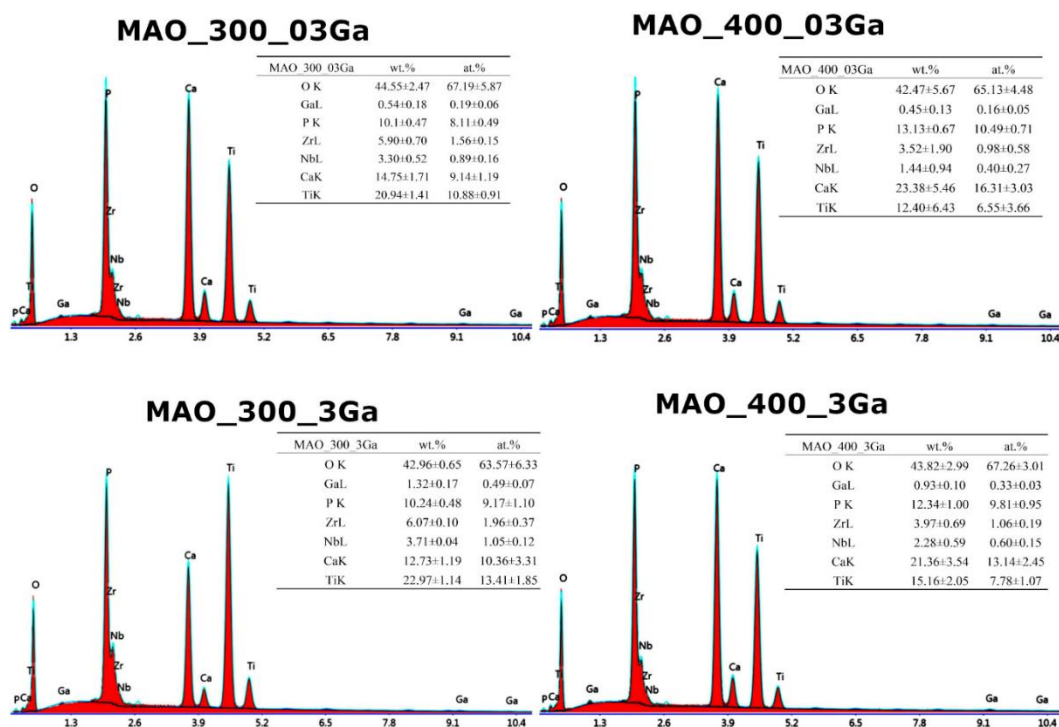
### MAO\_300\_6Ag



### MAO\_400\_6Ag

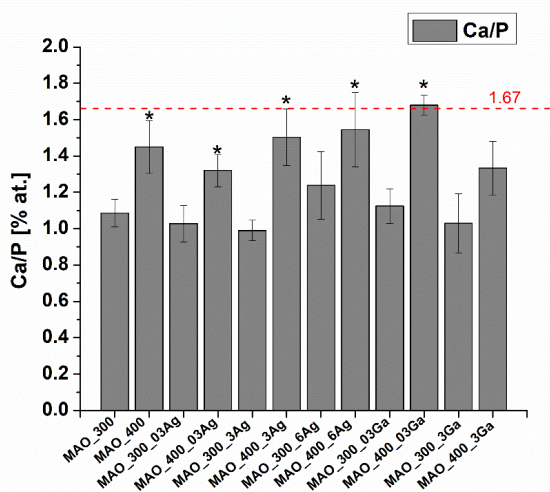


Rysunek 24 Widma EDS wraz z atomowym i wagowym udziałem danych pierwiastków w warstwach bazowych i warstwach wytworzonych w elektrolicie zawierającym różne stężenia azotanu srebra ( $n = 3$ ; dane to średnie  $\pm SD$ )



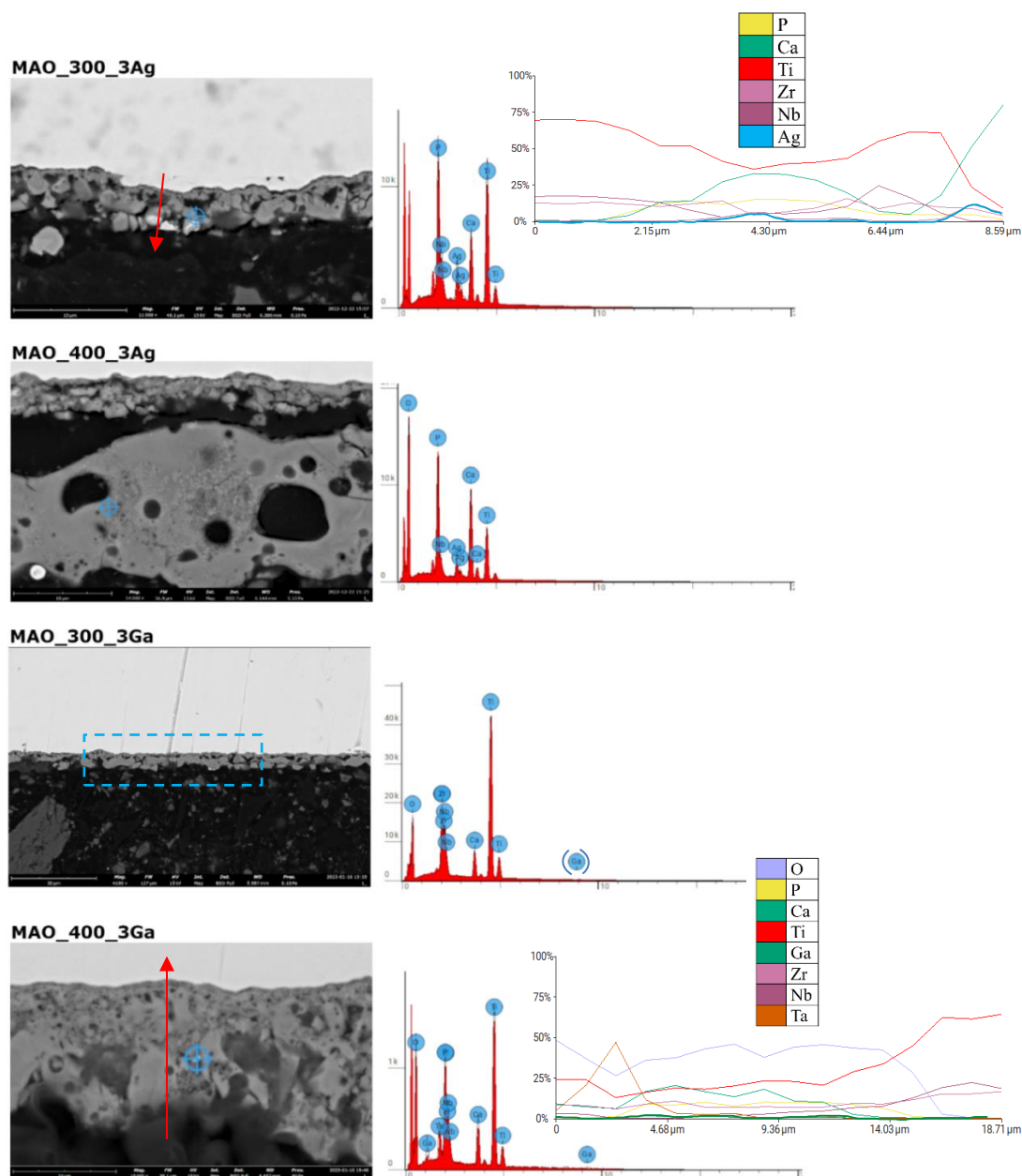
Rysunek 25 Widma EDS wraz z atomowym i wagowym udziałem danych pierwiastków w warstwach bazowych i warstwach wytworzonych w elektrolicie zawierającym różne stężenia azotanu galu ( $n = 3$ ; dane to średnie  $\pm$ SD)

Kluczowym parametrem wpływającym na stosunek Ca/P również było napięcie. Próbkę wytworzone w elektrolicie zawierającym 0,3 mM galu wykazały się najlepszym (najbliższym wartości naturalnego apatytu) stosunkiem Ca/P równym  $1,68 \pm 0,05$  (rys. 26).



Rysunek 26 Stosunek wapnia do fosforu dla różnych parametrów wytwarzania warstw MAO wraz z zaznaczeniem wartości stechiometrycznego hydroksyapatytu ( $n = 3$ ; dane to średnie  $\pm$ SD; \* istotnie różne między grupami napięcia,  $p < 0.05$ )

W celu lepszego zaobserwowania rozkładu pierwiastków w warstwach, przeprowadzono analizę EDS na przekrojach próbek, której wyniki przedstawia rysunek 27. Można zauważyć, że zarówno przy napięciu 300, jak i 400 V srebro, widoczne w postaci białych kulistych cząstek o rozmiarze ok. 160-200 nm, z powodzeniem zostało włączone do wnętrza warstwy. Przy napięciu 400 V gal również był widoczny, ale jego morfologia znacznie różniła się od srebra, przyjmował on postać nieregularnych, „pierzastych” struktur o rozmiarze ok. 200-850 nm.



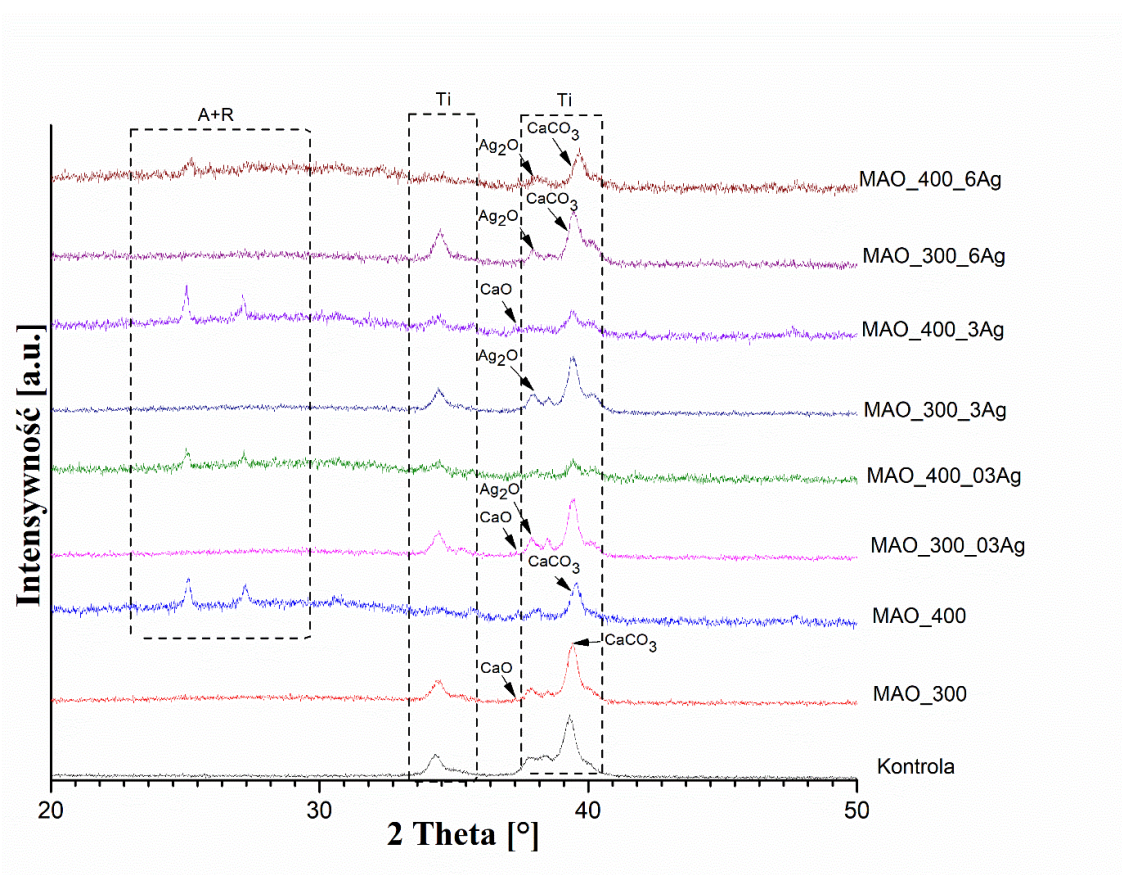
Rysunek 27 Przekroje wraz z widmami EDS wybranych warstw MAO wytworzonych przy zastosowanym napięciu 300 i 400 V w elektrolicie zawierającym 3 mM azotanu srebra lub 3 mM azotanu galu oraz przykładowy rozkład pierwiastków na przekroju

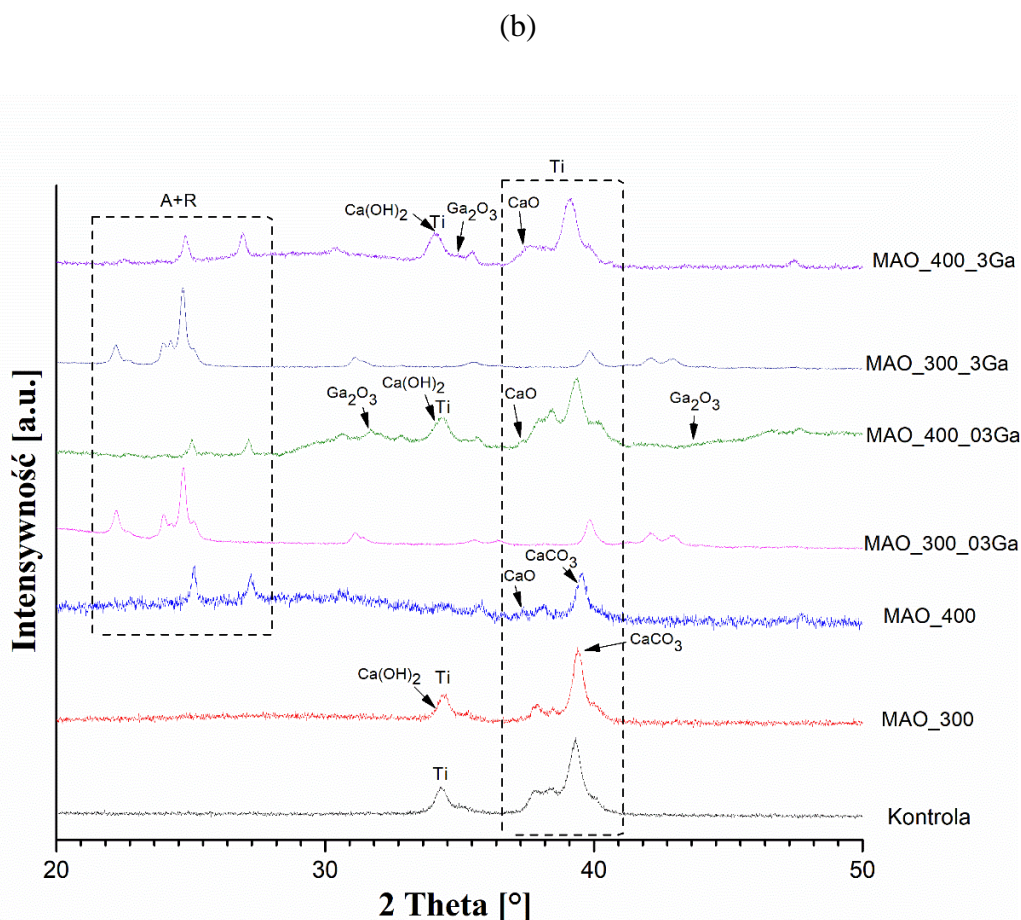


Rysunek 27 przedstawia również przykładowy rozkład pierwiastków w warstwie. Można było zaobserwować, że przy niższych napięciach rozkład pierwiastków był bardziej równomierny na całej grubości, podczas gdy zastosowanie większego napięcia prowadzące do większej grubości otrzymanej warstwy skutkowało w bardziej warstwowym rozłożeniu pierwiastków. Cyrkon i niob znajdował się bliżej materiału bazowego. Fosfor był rozłożony niemal równomiernie na całej grubości warstw. Wapń, srebro i gal występowały głównie na powierzchni i w środkowej części warstwy. Tantal wskazany w próbce MAO\_400\_3Ga stanowił błąd odczytu EDS, który w dalszych badaniach został wyeliminowany.

Rysunek 28 przedstawia dyfratogramy rentgenowskie warstw MAO wytworzonych w elektrolicie bazowym oraz w elektrolicie bazowym z dodatkiem srebra (29 a) lub galu (29 b).

(a)

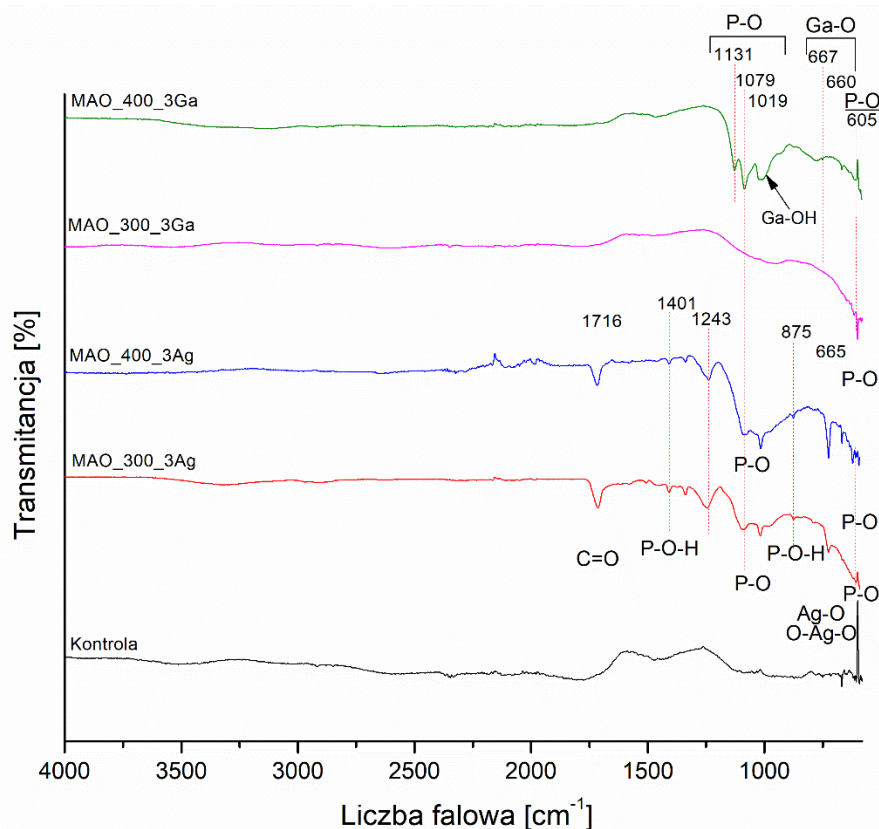




Rysunek 28 Dyfraktogramy rentgenowskie warstw MAO wytworzonych w elektrolicie bazowanym oraz z dodatkiem: srebra (a), galu (b), (przedstawione wyniki są reprezentatywne dla trzech analiz każdej próbki obróbki powierzchniowej)

Wyniki XRD wskazują, że warstwa MAO otrzymywana z elektrolitu bazowego z dodatkiem srebra lub galu składa się przede wszystkim z  $\text{TiO}_2$  oraz z faz pochodzących od wapnia występującego w roztworze:  $\text{Ca(OH)}_2$ ,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{CaO}$ . Ze względu na porowatą strukturę promieniowanie rentgenowskie może przenikać przez warstwę do podłoża, a więc intensywność dyfrakcji piku odpowiadającego fazie Ti we wzorach XRD jest nadal bardzo mocna. W elektrolicie z dodatkiem srebra widoczna jest dodatkowa faza  $\text{Ag}_2\text{O}$ . Natomiast w elektrolicie z dodatkiem galu odnotowano niewielkie piki wskazujące występowanie  $\text{Ga}_2\text{O}_3$ . Dodatkowe fazy były widoczne głównie przy wyższym napięciu procesu MAO (400 V).

Widma w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) rejestrowane za pomocą spektrofotometru zostały przedstawione na rysunku 29.



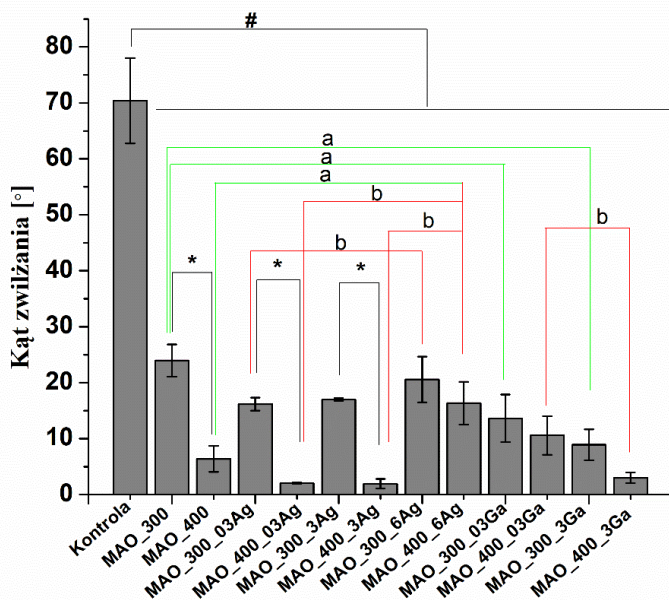
Rysunek 29 Widma w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) przykładowych próbek z dodatkiem srebra lub galu, rejestrowane za pomocą spektrofotometru

Piki występujące przy  $605\text{ cm}^{-1}$ ,  $1079\text{ cm}^{-1}$ ,  $1131\text{ cm}^{-1}$  przypisuje się charakterystycznym pasmom absorpcji  $\text{PO}_4^{3-}$ ; gdzie  $1079\text{ cm}^{-1}$ ,  $1131\text{ cm}^{-1}$  wynikają z rozciągania wiązania P-O, natomiast  $605\text{ cm}^{-1}$  wynika z drgań zginających grup  $\text{PO}_4^{3-}$  [180]. Niewielkie pasma przy  $667\text{ cm}^{-1}$  przypisuje się drganiom zginającym Ga-O i drganiom rozciągającym Ga-O od  $\text{Ga}_2\text{O}_3$  [181], natomiast pik około  $660\text{ cm}^{-1}$  odpowiada drganiom skurczowym Ga-O [182]. Silne wibracje zginające w próbce MAO\_400\_3GA przy  $1019\text{ cm}^{-1}$  przypisuje się pasmom Ga – OH [181] pochodzącym od  $\text{Ga}(\text{OH})_3$ . Piki absorpcji przy  $875\text{ cm}^{-1}$  i  $1401\text{ cm}^{-1}$  występujące w próbkach ze srebrem pochodzą od wiązań P-O-H, znajdujących się w  $\text{HPO}_4^-$  (np.  $\text{CaHPO}_4$ ) [183]. Piki przy  $665\text{ cm}^{-1}$  przypisane są do drgań Ag-O i O-Ag-O [184], pochodzących od  $\text{Ag}_2\text{O}$  i  $\text{AgO}$ .

### 9.3.3. Wpływ dodatków na zwilżalność warstw

Na rysunku 30 przedstawiono wartości kąta zwilżania. We wszystkich przypadkach zastosowanie utleniania plazmowego istotnie obniżyło zwilżalność

powierzchni. W warstwach wytworzonych w elektrolicie bazowym lub elektrolicie zawierającym niższe stężenia azotanu srebra napięcie procesu odgrywało istotne znaczenie dla zwilżalności powierzchni. Dla MAO\_300, MAO\_300\_03Ag i MAO\_300\_3Ag zmiana napięcia procesu z 300 do 400 V istotnie obniżała kąt zwilżania nadając tym warstwom superhydrofilowy charakter ( $<10^\circ$ ).



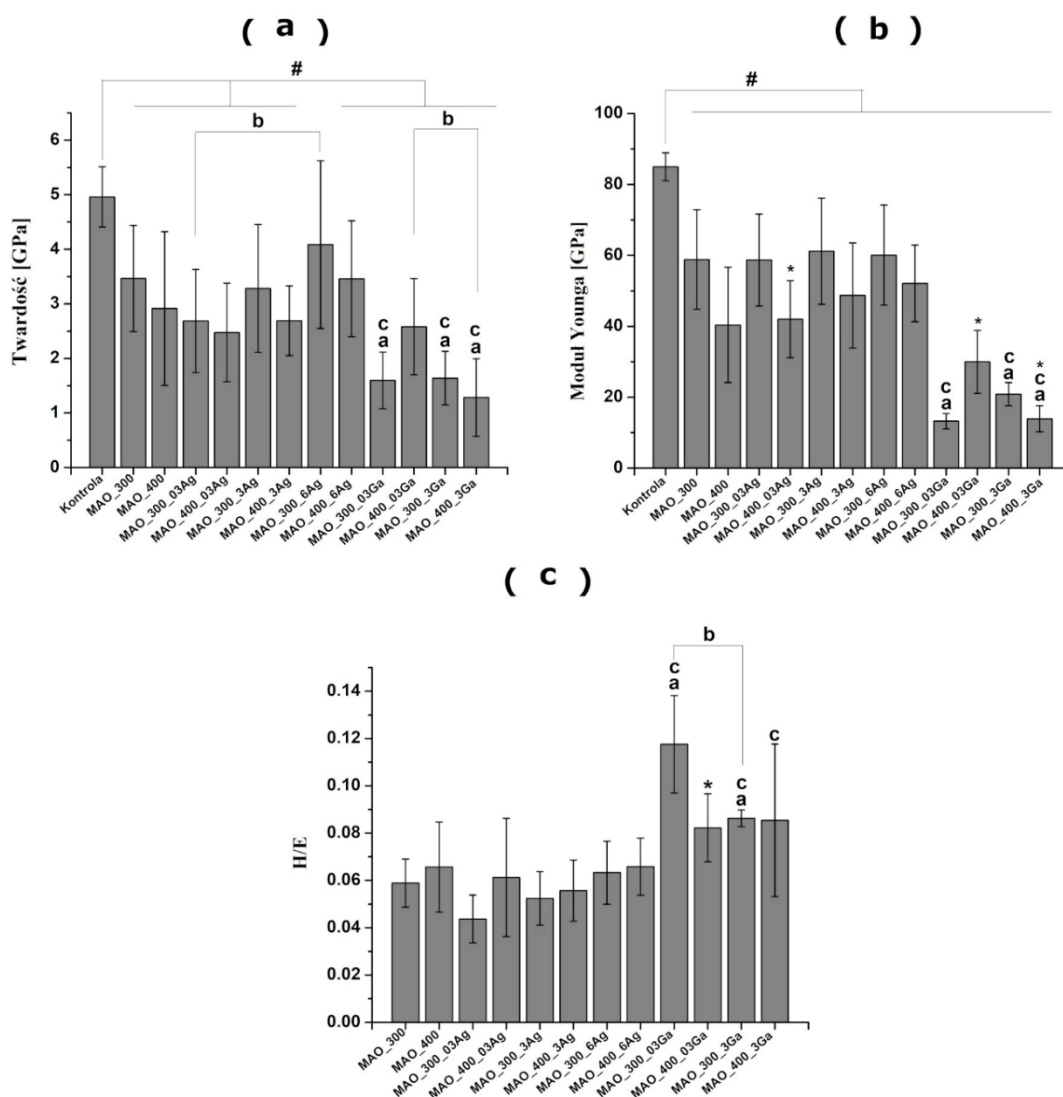
Rysunek 30 Zwilżalność powierzchni kontroli i warstw MAO wytworzonych przy różnych parametrach procesu ( $n = 5$ ; dane to średnie  $\pm$ SD; # istotnie różne od kontroli, \* istotnie różne między grupami napięcia, a istotnie różne od próbek wytwarzanych w tych samych warunkach napięciowych, ale w elektrolicie bez dodatku srebra/galu, b istotnie różne od próbek wytwarzanych w tym samym warunkach napięciowych, ale z inną zawartością dodatku srebra/galu, ( $p < 0.05$ ))

Przy wzroście stężenia azotanu srebra odnotowano wzrost kąta zwilżania do  $16,33^\circ \pm 3,82^\circ$  dla próbek MAO\_400\_6Ag, w porównaniu do warstw wykonanych przy tym samym napięciu, ale różnych zawartościach azotanu srebra w elektrolicie ( $6,36^\circ \pm 2,31^\circ$  dla MAO\_400,  $2,0^\circ \pm 0,15^\circ$  dla MAO\_400\_03Ag,  $1,92^\circ \pm 0,86^\circ$  dla MAO\_400\_3Ag). Dodatek galu (z wyjątkiem MAO\_400\_03Ga) również prowadził do zwiększenia hydrofilowości powierzchni w warstwach wytworzonych pod napięciem 300 V w stosunku do warstw wykonanych w elektrolicie bazowym, a wzrost jego stężenia dodatkowo poprawiał hydrofilowy charakter warstw.

#### 9.3.4. Wpływ dodatków na właściwości nanomechaniczne

Badania nanoindentacji wykazały, że twardość i moduł Younga warstw MAO uległy obniżeniu w stosunku do próbki referencyjnej. Dodatek azotanu srebra

w najwyższym stężeniu spowodował wzrost twardości warstw przy napięciu procesu 300 V. Z wyjątkiem próbek MAO\_400\_03Ga, dodatek galu spowodował istotne obniżenie twardości i modułu Younga w stosunku do Kontroli, warstw wytworzonych w elektrolicie bazowym, jak i warstw wytwarzanych w tych samych warunkach napięciowych, ale z dodatkiem azotanu srebra. Ta grupa próbek uzyskała także najwyższy stosunek H/E. Rysunek 31 przedstawia właściwości nanomechaniczne warstw MAO wraz z dodatkami bioaktywnymi.



Rysunek 31 Właściwości nanomechaniczne warstw MAO wraz z dodatkami bioaktywnymi: nanotwardość (a), moduł Younga (b), H/E (c) ( $n = 10$ ; dane to średnie  $\pm$ SD; # istotnie różne od kontroli, \* istotnie różne między grupami napięcia, a istotnie różne od próbek wytwarzanych w tych samych warunkach napięciowych, ale w elektrolicie bez dodatku srebra/galu, b istotnie różne od próbek wytwarzanych w tym samym warunkach napięciowych, ale z inną zawartością dodatku srebra/galu, c istotnie różne od próbek wytwarzanych w tych samych warunkach napięciowych ale z innym dodatkiem: srebra/galu; ( $p < 0.05$ ))

### **9.3.5. Wpływ dodatków na siłę adhezji warstwy do podłoża**

Oceny siły krytycznej potrzebnej do powstawania delaminacji dokonano na podstawie zmian topografii zarejestrowanych przed i po zarysowaniu, oraz siły tarcia (rys. 33), a także obserwacji mikroskopowych (rys. 32) z wykorzystaniem skaningowego mikroskopu elektronowego. Analizę przeprowadzono przede wszystkim w kierunku wpływu dodatków na ewentualną delaminację warstwy, pomijając siły wywołujące kohezyjne i adhezyjne uszkodzenia.

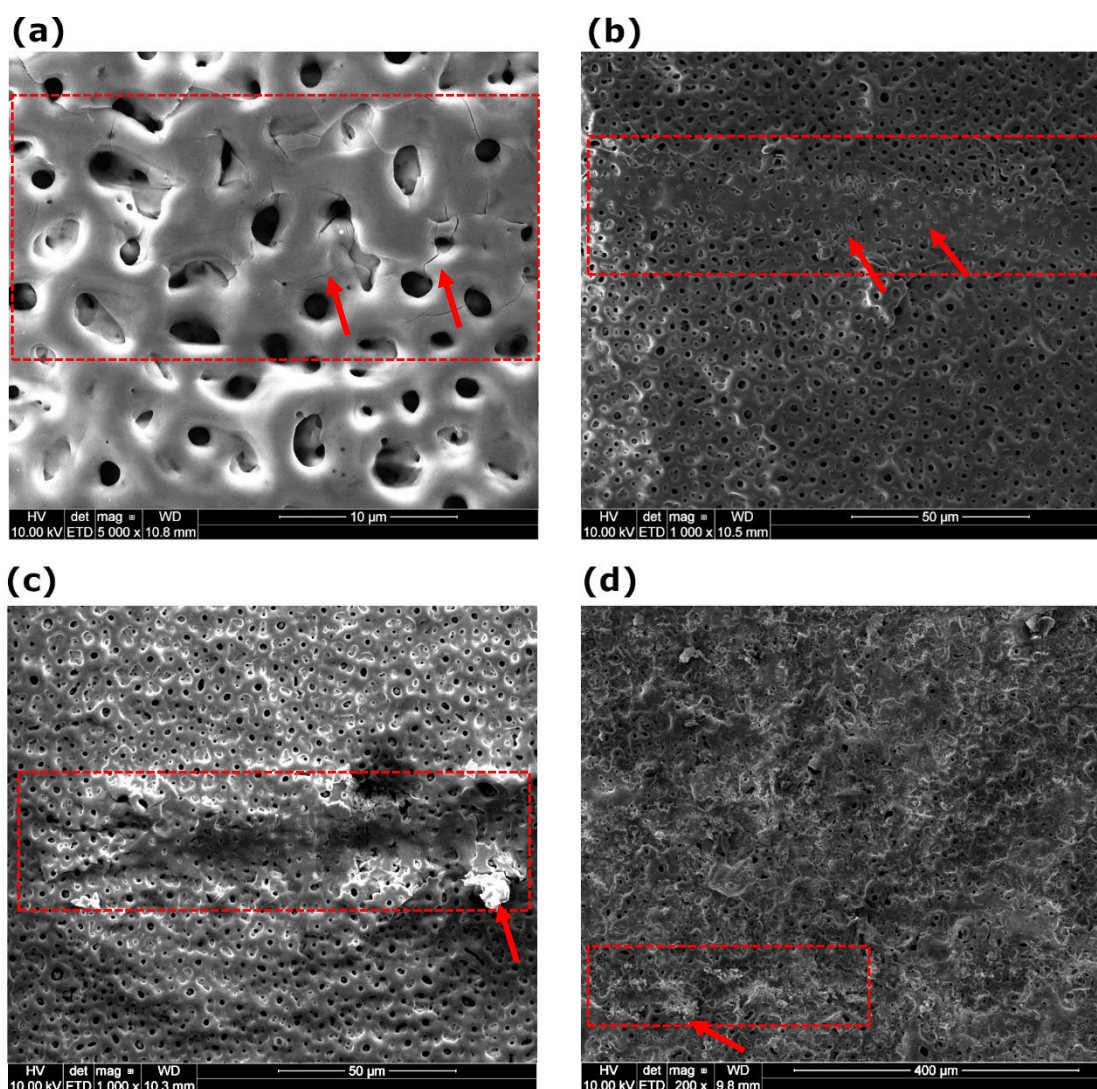
Można zauważyć, że we wszystkich przypadkach występuje podobny trend, gdzie w początkowej fazie linie topografii przed i po teście zarysowania pokrywają się ze sobą, po czym następuje ich lekkie przesunięcie względem siebie. Przesunięcie to wynika jedynie z usunięcia części warstwy pod wpływem wzrastającej siły, a nie z dotarcia wgłębnika do podłoża.

Na wykresach można zauważyć istotny wzrost siły tarcia między wgłębnikiem a warstwą, jednak tarcie to ma charakter ciągły, a nie gwałtowny, związany ze wzrostem siły docisku wgłębnika do porowatego podłoża, a nie świadczący o adhezyjnym uszkodzeniu warstwy.

W połączeniu z obserwacją mikroskopową, która potwierdziła brak oznak występowania delaminacji, można wnioskować, że wszystkie analizowane warstwy charakteryzują się dobrą przyczepnością wytrzymałą co najmniej siłą 400 mN.

Analiza wykresów i obrazów SEM wskazuje jednak różnice w zachowaniu się warstw MAO pod wpływem testu zarysowania. Przy wyższych napięciach rysa jest ledwo widoczna, a charakterystyka siły trącej wynika z wysoce chropowatej i porowatej powierzchni, a nie z tarcia związanego z dotarciem wgłębnika do podłoża. W próbkach wykonanych przy niższym napięciu 300 V można zaobserwować liczne pęknięcia, związane z deformacją kohezyjną. w żadnym przypadku nie zaobserwowano odwarstwienia na krawędzi (rys. 32).

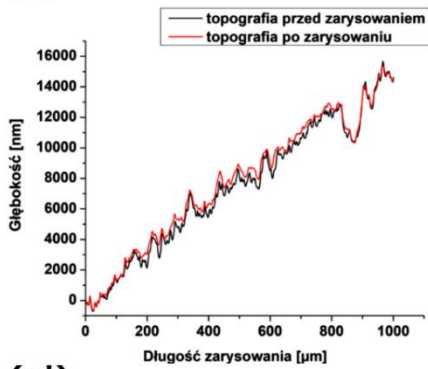
Kierunek zarysowania →



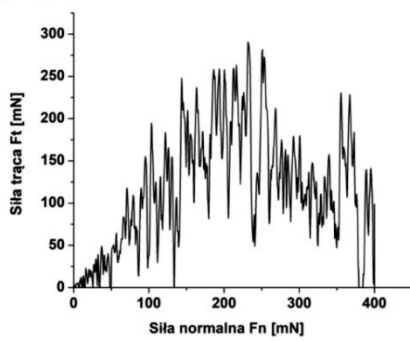
Rysunek 32 Zdjęcie SEM przedstawiające przykładowe uszkodzenia (pęknięcia poprzeczne i spiętrzenia zaznaczone odpowiednio strzałkami) powstałe w trakcie testu zarysowania (rysa zaznaczona ramką) dla przykładowych próbek: MAO\_300 (a), MAO\_300\_03Ag (b), MAO\_300\_3Ga (c), MAO\_400\_3Ga (d)

Można zauważyć istotną poprawę adhezji warstwy do podłoża w porównaniu z warstwami przedstawionymi w rozdziale 9.2.6. Według uzyskanych wyników, wzrost zastosowanego prądu o większej gęstości doprowadził do istotnego wzrostu przyczepności warstwy do podłoża we wszystkich przypadkach. Gwałtowna zmiana topografii występująca na niektórych wykresach (np. MAO\_400\_3 Ga) (rys. 33), związana była z efektem złuszczenia części warstwy lub wpadnięciem wgłębienia w por i zerwaniem tego fragmentu, a nie z delaminacją warstwy, co potwierdza przykładowe zdjęcie (rys. 32 d).

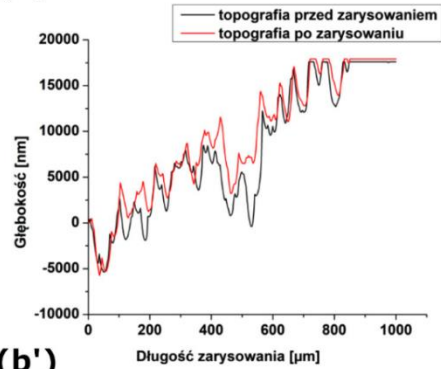
(a) MAO\_300



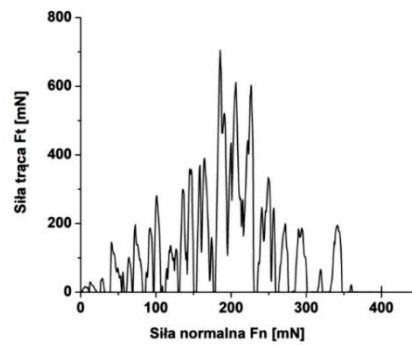
(a')



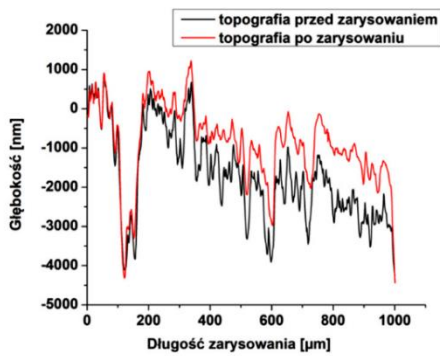
(b) MAO\_400



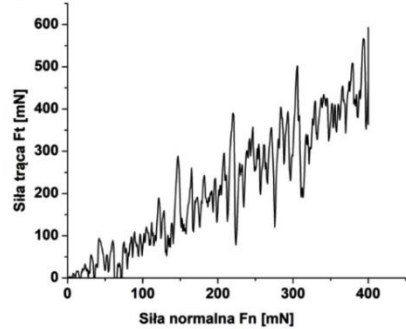
(b')



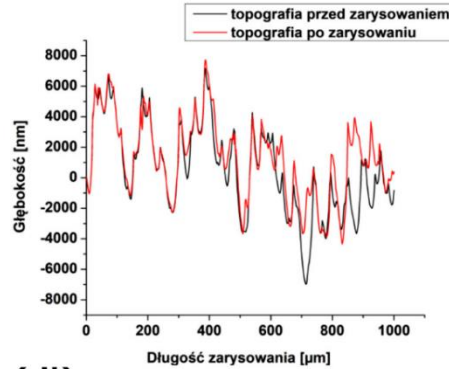
(c) MAO\_300\_03Ag



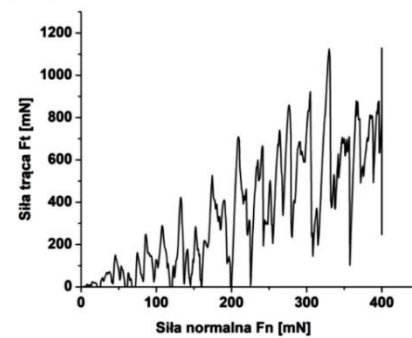
(c')



(d) MAO\_400\_03Ag

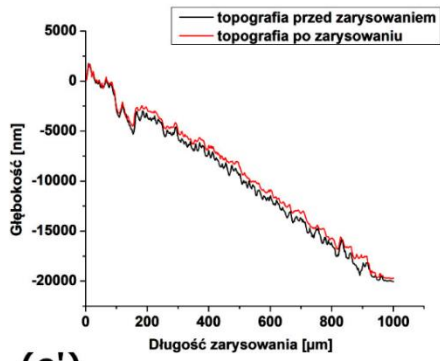


(d')

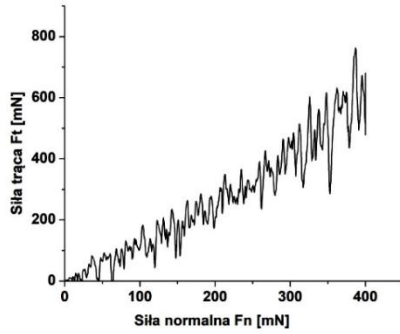




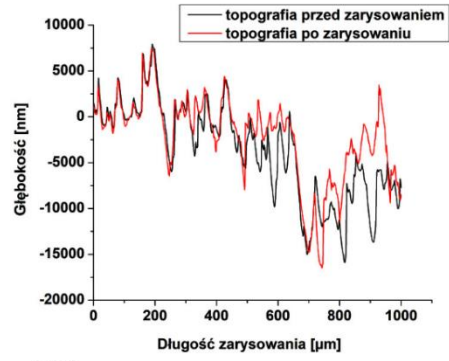
(e) MAO\_300\_3Ag



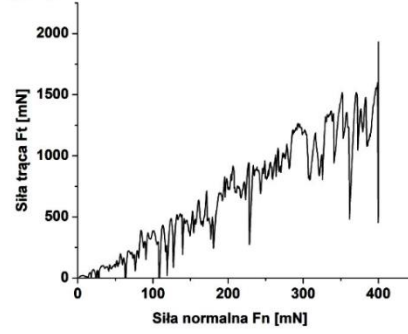
(e')



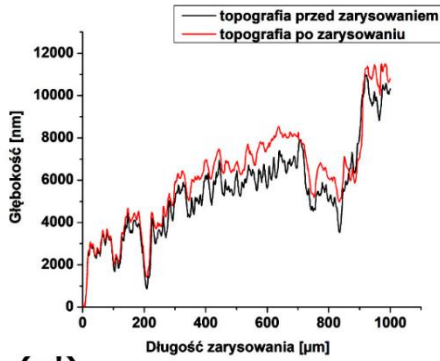
(f) MAO\_400\_3Ag



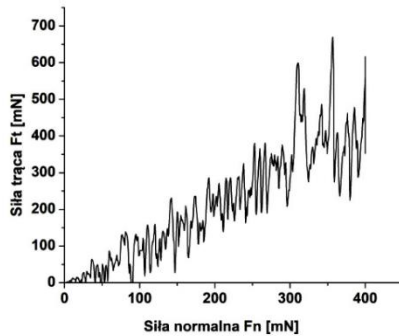
(f')



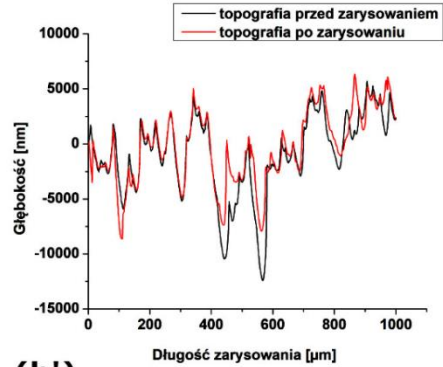
(g) MAO\_300\_6Ag



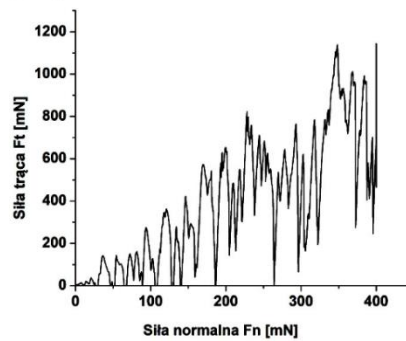
(g')



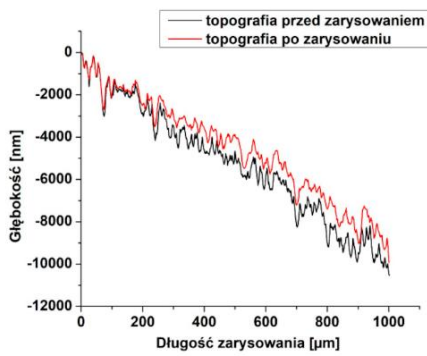
(h) MAO\_400\_6Ag



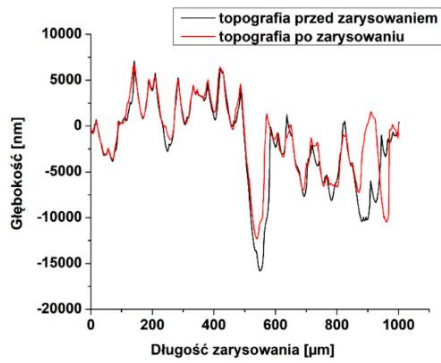
(h')



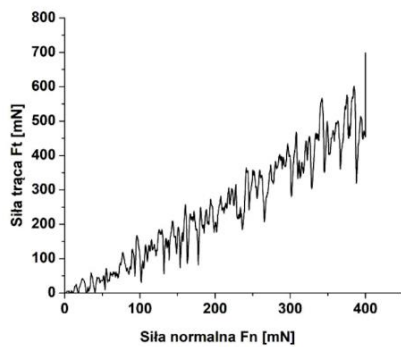
(i) MAO\_300\_03Ga



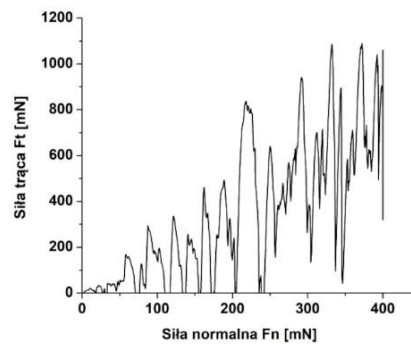
(j) MAO\_400\_03Ga



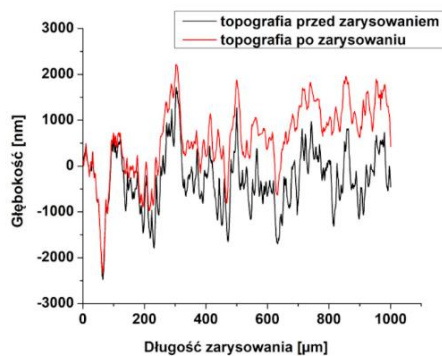
(i')



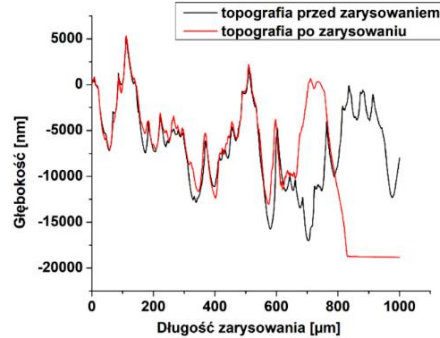
(j')



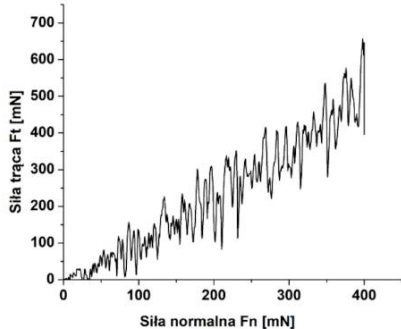
(k) MAO\_300\_3Ga



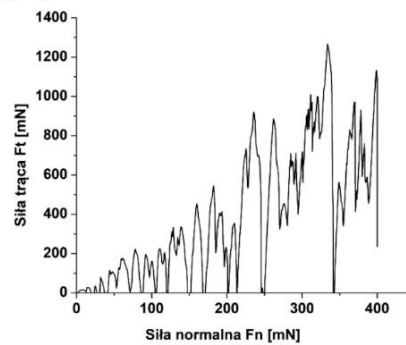
(l) MAO\_400\_3Ga



(k')



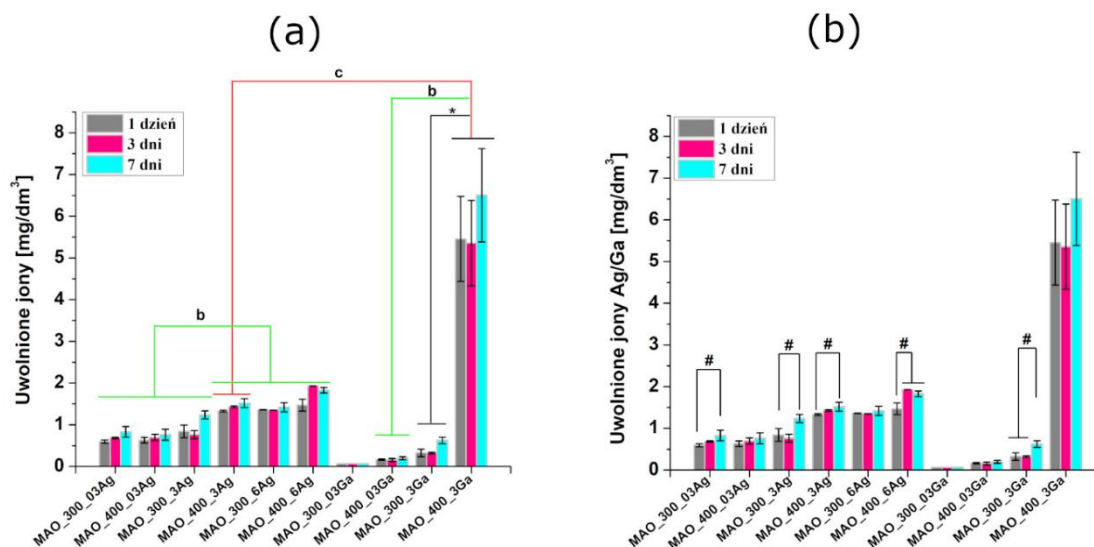
(l')



Rysunek 33 Zmiana topografii zarejestrowana przed i po zarysowaniu (a-k) oraz zależność siły tarcia ( $F_t$ ) od siły normalnej  $F_n$  warstw MAO (a'-k') (przedstawione wyniki są reprezentatywne dla dziesięciu analiz każdej próbki po obróbce powierzchniowej)

### 9.3.6. Badanie szybkości uwalniania bioaktywnych i antybakteryjnych jonów

Na rysunku 34 przedstawiono szybkość uwalniania bioaktywnych i antybakteryjnych dodatków do roztworu PBS po inkubacji przez 1, 3 i 7 dni.



Rysunek 34 Szybkość uwalniania jonów srebra/galu do roztworu PBS z warstw MAO wytworzonych przy zmiennych parametrach ( $n = 6$ ; dane to średnie  $\pm$ SD; Wykres (a): \* istotnie różne między grupami napięcia, <sup>b</sup> istotnie różne od próbek wytwarzanych w tym samym warunkach napięciowych, ale z inną zawartością dodatku srebra/galu, <sup>c</sup> istotnie różne od próbek wytwarzanych w tych samych warunkach napięciowych, ale z innym dodatkiem: srebra/galu; Wykres (b): # istotnie różnie między dniami inkubacji ( $p < 0.05$ )

Wstępna analiza uwalniania jonów pozwoliła zaobserwować ogólny trend, w którym wraz ze wzrostem zawartości srebra i galu w elektrolicie stosowanym do wytwarzania warstwy MAO obserwowano większą szybkość uwalniania danych jonów do PBS po zadanym okresie inkubacji. Parametrami granicznymi, przy których zachodziła opisana zależność, były zawartość  $\text{AgNO}_3$  i  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  równa 3 mM i napięcie wytwarzania warstw równe 400 V. Przykładowo, w warstwie wytworzonej z 6 mM  $\text{AgNO}_3$  przy 400 V zarejestrowano niemal trzykrotny wzrost szybkości uwalniania jonów srebra po 3 dniach w stosunku do próbek wytwarzanych w elektrolicie zawierającym 0,3 mM azotanu srebra.

Zarówno wzrost stężenia galu w elektrolicie, jak i wzrost napięcia spowodował istotny wzrost szybkości uwalniania jonów galu do PBS, po 1, 3 i 7 dniach. Po 7 dniach inkubacji grupy MAO\_400\_3Ga, wykryto  $6,50 \pm 1,12$  mg/dm<sup>3</sup> jonów galu, podczas gdy po takim samym czasie inkubacji, w próbce zawierającej 10 razy mniej galu uwolniło się

jedynie  $0,20 \pm 0,04$  mg/dm<sup>3</sup> jonów. Zestawiając to z uwalnianiem się jonów srebra, wartość ta oscylowała w okolicach  $1,52$  mg/dm<sup>3</sup> jonów srebra.

Porównując charakterystykę uwalniania się jonów srebra i jonów galu przy tych samych parametrach wytwarzania MAO, można zauważyć, że przy stężeniu  $3$  mM i natężeniu  $400$  V uwolniło się ponad cztery razy więcej jonów galu niż jonów srebra.

Analizując szybkość uwalniania obserwowano, że niemal we wszystkich przypadkach stężenie jonów po  $24$  h inkubacji było zbliżone do zawartości jonów po  $3$  dniach inkubacji. Wśród niektórych grup próbek odnotowano wzrost zawartości jonów srebra/galu po  $7$  dniach inkubacji, w szczególności wśród próbek wytwarzanych pod napięciem  $300$  V, gdzie zawartość jonów w PBS wzrosła o ok.  $38\%$  dla MAO\_300\_03Ag, o ok.  $48\%$  dla MAO\_300\_3Ag i ok.  $87\%$  dla MAO\_300\_3Ga w porównaniu do zawartości jonów po  $24$  h. Dla próbek, które były wytwarzane pod napięciem  $400$  V, wzrost przy MAO\_400\_3Ag wyniósł ok.  $14\%$ , a przy MAO\_400\_6Ag, ok.  $24\%$ , co pokazuje, że bez względu na zastosowane napięcie wzrost ilości AgNO<sub>3</sub> i Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> prowadzi do zwiększenia uwalniania danego jonu.

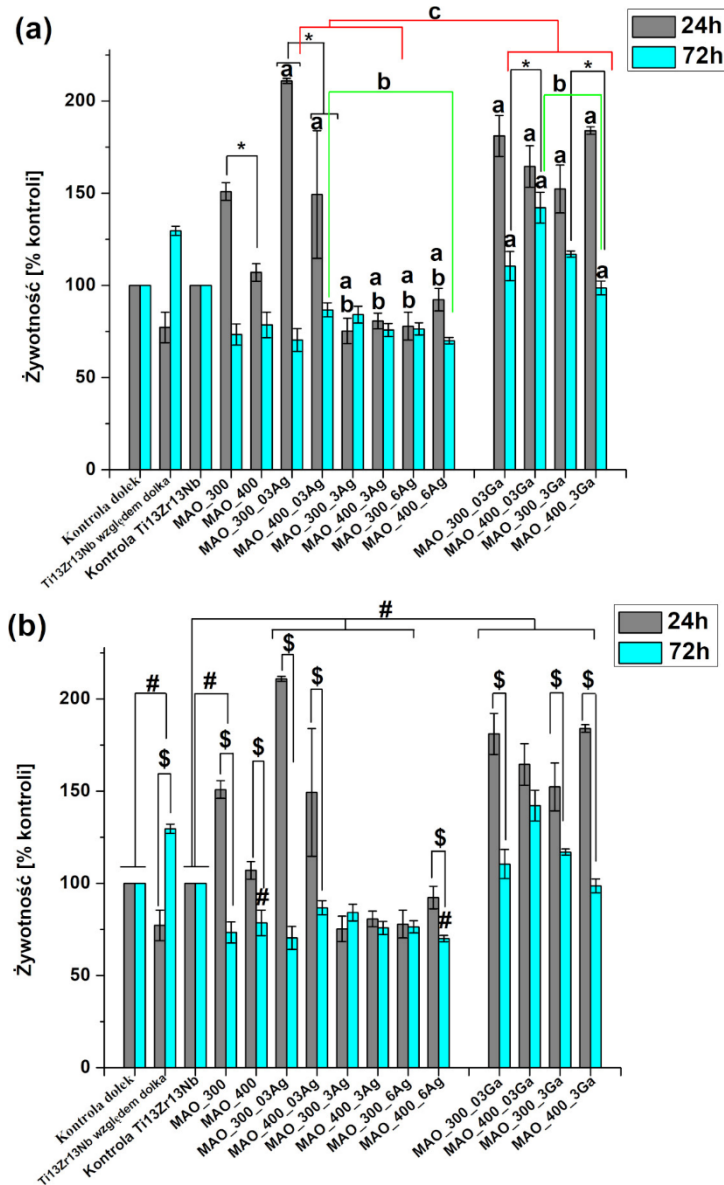
### **9.3.7. Wpływ dodatków na odpowiedź komórkową**

Żywotność komórek hFOB 1,19 hodowanych na powierzchni próbek różniła się istotnie od komórek hodowanych na dołkach w płytkach przeznaczonych do hodowli komórkowej, dlatego dla niemodyfikowanego Ti-13Zr-13Nb kontrolę stanowił pomiar żywotności komórek na dołku ( $100\%$ ). Natomiast niemodyfikowany Ti-13Zr-13Nb uznano za kontrolę ( $100\%$ ) dla pomiarów żywotności komórek na warstwach MAO.

Rysunek 35 przedstawia wpływ powierzchni kontroli i warstw MAO wytwarzanych przy różnych parametrach procesu na żywotność komórek wyrażoną testem MTT.

Można zauważyć, że na stopie Ti-13Zr-13Nb bez modyfikacji, po  $24$  h żywotność komórek spadła o ok.  $20\%$ , po czym po  $72$  h nastąpił wzrost do  $130\%$  w stosunku do komórek hodowanych na dołkach. Dla próbek wytworzonych w elektrolicie bazowym, jak i zawierającym do  $0,3$  mM azotanu srebra zaobserwowano istotny wzrost proliferacji komórek po  $24$  h, który następnie został wstrzymany i spadł średnio o ok.  $25\%$  w stosunku do żywotności komórek odnotowanej na niemodyfikowanym stopie

tytanu. Wśród tych próbek najwyższy stopień proliferacji po 24 h wykazują próbki MAO\_300\_03Ag (210,96%±1,34%). Wraz ze wzrostem zawartości srebra proliferacja komórek zmalała utrzymując się na poziomie 70-80%, zarówno po 24, jak i 72 h. Przy najwyższej zawartości srebra i przy wyższym napięciu proliferacja komórek spadła z upływem czasu z 92 do 70%.



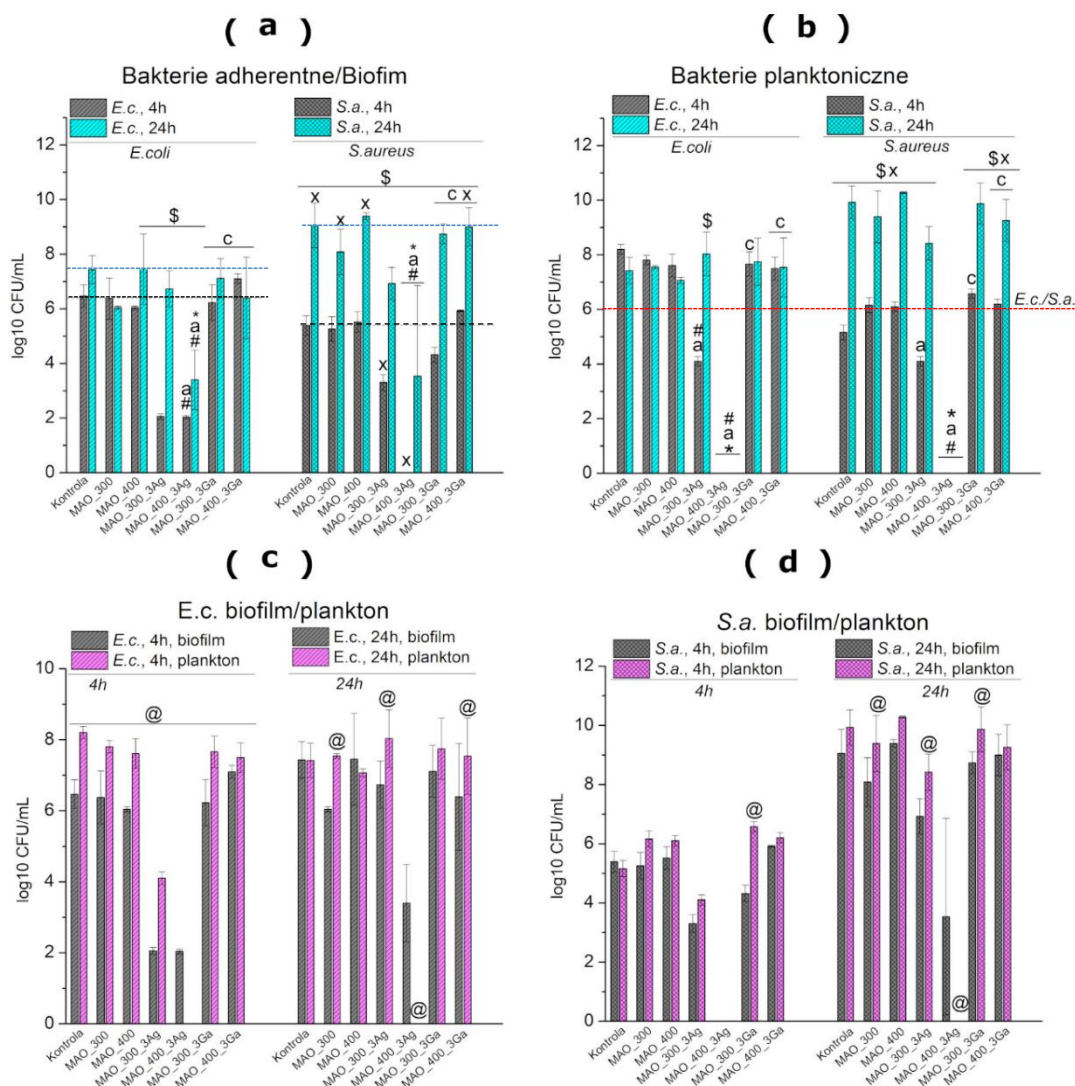
Rysunek 35 Wpływ powierzchni kontroli i warstw MAO wytwarzanych przy różnych parametrach procesu na żywotność komórek wyrażoną testem MTT ( $n = 6$ ; dane to średnie  $\pm$ SD; Wykres (a): <sup>a</sup> istotny wpływ dodatku galu lub srebra, <sup>b</sup> istotnie różne od próbek wytwarzanych w tym samym warunkach napięciowych, ale z inną zawartością dodatku srebra/galu, <sup>c</sup> istotnie różne od próbek wytwarzanych w tych samych warunkach napięciowych, ale z innym dodatkiem: srebra/galu, \* istotnie różne między grupami napięcia; Wykres (b): # istotnie różne od kontroli, \$ istotnie różnie między dniami inkubacji ( $p < 0.05$ ))

Analizując żywotność komórek na warstwach zawierających gal można zauważyć, że pierwiastek ten istotnie poprawił proliferację komórek, która w zależności od parametrów wytwarzania po 24 h wynosiła między 150 a 180%. Również po 72 h żywotność utrzymywała się powyżej 100%, co stanowiło najwyższy wynik dla wszystkich grup modyfikowanych próbek.

Analiza zależności parametrów wytwarzania warstw MAO na żywotność komórek pokazuje, że zmiana napięcia niejednoznacznie wpływała na odpowiedź komórkową warstw. W przypadku próbek wytwarzanych w elektrolicie bazowym i elektrolicie zawierającym najniższe stężenie azotanu srebra, żywotność komórek była wyższa na próbkach utlenianych przy niższym napięciu (300 V). Dla galu natomiast zaobserwowano, że po 72 h inkubacji przy niższej zawartości galu (0,3 mM) proliferacja była wyższa dla MAO\_400, a przy wyższej zawartości galu (3 mM), wyższe napięcie z kolei obniżyło żywotność komórek.

### 9.3.8. Wpływ dodatków na właściwości bakteriobójcze

Ocenę aktywności przeciwdrobnoustrojowej przeprowadzono za pomocą seryjnych rozcieńczeń i zliczeń liczby kolonii bakteryjnych na agarze Muellera-Hintona (Rysunek 36).



Rysunek 36 Logarytm 10 z liczby kolonii bakteryjnych (CFU/mL) dwóch szczepów bakterii: *E. coli* i *S. aureus* po 4 i 24 h inkubacji, dla kontroli i warstw MAO wytworzonych przy zmiennych parametrach: (a) Bakterie adherentne, (b) bakterie planktoniczne, (c) szczep *E. coli*, (d) szczep *S. aureus* ( $n = 3$ ; dane to średnie  $\pm$ SD; Wykresy (a), (b): # istotnie różne od kontroli, a istotny wpływ dodatku galu lub srebra, ° istotnie różne od próbek wytwarzanych w tych samych warunkach napięciowych ale z innym dodatkiem: srebra/galu, \* istotnie różne między grupami napięcia ; \$ istotnie różnie między czasem inkubacji, x istotnie różnie między szczepem bakterii; czerwona pozioma przerywana linia na wykresie (b) zaznacza początkowe inokulum zawiesiny bakteryjnej; Wykresy (c), (d): @ istotnie różnie między formą bakterii: planktoniczna/biofilm, ( $p < 0.05$ ))

Czynniki przeciwbakteryjne mogą mieć działanie biobójcze lub biostatyczne. Podczas gdy biocydy (bakteriobójcze i grzybobójcze) powodują śmierć mikroorganizmów, biostatyki (bakteriostatyczne i fungistatyczne) prowadzą do zahamowania ich wzrostu.

Tabela 18 przedstawia klasyfikację aktywności przeciwbakteryjnej wobec dwóch szczepów bakterii po czasie inkubacji 4 i 24 h wyznaczoną na podstawie współczynnika redukcji dla kontroli i warstw MAO utworzonych przy zmiennych parametrach.

Tabela 18 Klasyfikacja aktywności przeciwbakteryjnej wobec dwóch szczepów bakterii po czasie inkubacji 4 i 24 h wyznaczona na podstawie współczynnika redukcji dla kontroli i warstw MAO utworzonych przy zmiennych parametrach, gdzie x: brak aktywności przeciwdrobnoustrojowej ( $\leq 0.5$  log redukcji wzrostu drobnoustrojów), +: niewielka aktywność przeciwdrobnoustrojowa (0.5-1 log redukcji wzrostu drobnoustrojów), ++: średnia aktywność przeciwdrobnoustrojowa ( $>1$  do  $\leq 2$  log redukcji wzrostu drobnoustrojów), +++: dobra aktywność przeciwdrobnoustrojowa ( $>2$  do  $<3$  log), ++++: bardzo dobra aktywność przeciwdrobnoustrojowa ( $>3$  log); zielona ramka: aktywność bakteriobójczej ( $>99,9\%$  redukcji inokulum), niebieska ramka: aktywność bakteriostatyczna (90 do 99,9% redukcji inokulum)

|             | 4h   |              |              |              | 24h          |              |              |              |
|-------------|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|             | E.C.   |              | S.A.         |              | E.C.         |              | S.A.         |              |
|             | Plankton   | Biofilm      | Plankton     | Biofilm      | Plankton     | Biofilm      | Plankton     | Biofilm      |
|             | <b>Redukcja (R)</b><br><b>/ Klasyfikacja aktywności przeciwbakteryjnej</b> |              |              |              |              |              |              |              |
| Kontrola    | $\leq 0,5$ x   | - -          | 0,84         | - -          | $\leq 0,5$ x | - -          | $\leq 0,5$ x | - -          |
| MAO_300     | $\leq 0,5$ x   | $\leq 0,5$ x | $\leq 0,5$ x | $\leq 0,5$ x | $\leq 0,5$ x | 1,39 ++      | $\leq 0,5$ x | 0,97 +       |
| MAO_400     | $\leq 0,5$ x   | $\leq 0,5$ x | $\leq 0,5$ x | $\leq 0,5$ x | $\leq 0,5$ x | $\leq 0,5$ x | $\leq 0,5$ x | $\leq 0,5$ x |
| MAO_300_3Ag | 1,90 ++  | 4,40 ++++    | 1,90 ++      | 2,09 +++     | $\leq 0,5$ x | 0,73 +       | $\leq 0,5$ x | 2,13 +++     |
| MAO_400_3Ag | 6 ++++   | 4,43 ++++    | 6 ++++       | 5,40 ++++    | 6 ++++       | 4,03 ++++    | 6 ++++       | 5,52 ++++    |
| MAO_300_3Ga | $\leq 0,5$ x   | $\leq 0,5$ x | $\leq 0,5$ x | 1,07 ++      | $\leq 0,5$ x | $\leq 0,5$ x | $\leq 0,5$ x | $\leq 0,5$ x |
| MAO_400_3Ga | $\leq 0,5$ x   | $\leq 0,5$ x | $\leq 0,5$ x | $\leq 0,5$ x | $\leq 0,5$ x | 1,04 ++      | $\leq 0,5$ x | $\leq 0,5$ x |

W większości przypadków można było zauważyć znaczny wzrost ( $R \leq 0,5$ ) liczby drobnoustrojów planktonowych *E. coli* po 4 h inkubacji w porównaniu z nietraktowanym inokulum. Co oznacza, że powierzchnie te nie wykazywały działania przeciwbakteryjnego, a nawet sprzyjały rozwojowi bakterii.

Jednak dodatek srebra do warstw MAO pozytywnie wpłynął na właściwości antybakteryjne. Przy zastosowaniu niższego przyłożonego napięcia próbki charakteryzowały się działaniem bakteriostatycznym wobec bakterii *S. aureus* i *E. coli*



po 4 h inkubacji, natomiast zwiększenie przyłożonego napięcia do 400 V spowodowało 99,9% redukcję wzrostu drobnoustrojów, która została utrzymana również po 24 h inkubacji, wobec obu szczepów bakterii. Świadczy to o działaniu bakteriobójczym próbek MAO\_400\_3Ag.

Po wydłużeniu czasu inkubacji do 24 h, w próbkach kontrolnych i bez dodatku srebra/galu można było zauważyć słabą tendencję do zmniejszania się liczby bakterii *E. coli*. Odwrotny efekt zaobserwowano w MAO\_300\_3Ag, gdzie właściwości bakteriostatyczne odnotowane po 4 h inkubacji uległy zmianie, a po 24 h inkubacji *S. aureus* i *E. coli* rozmnożyły się istotnie (~50%) w porównaniu do 4 h inkubacji. Zaobserwowano, że po 24 h bakterii *S. aureus* było o ok. 20% więcej w stosunku do liczby bakterii *E. coli*.

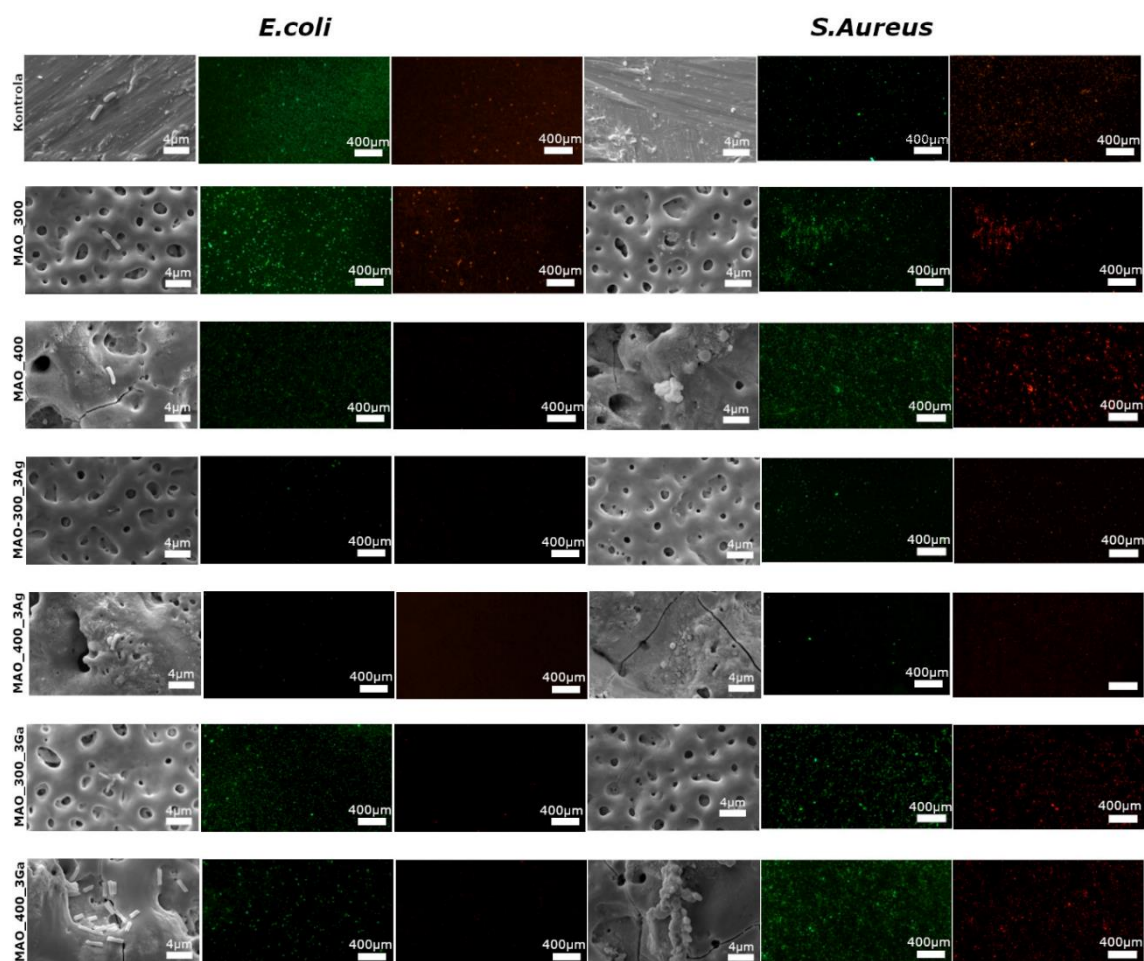
Podobny trend zaobserwowano w przypadku bakterii adherentnych (biofilmu), gdzie warstwa MAO\_400\_3Ag spowodowała >99.9% redukcji wzrostu mikroorganizmów zarówno w stosunku do bakterii Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich. Natomiast próbki MAO\_300\_3Ag były bakteriobójcze wobec *E. coli* po 4 h i bakteriostatyczne wobec *S. aureus* po 4 i 24 godzinach. Aktywność bakteriostatyczna MAO\_300\_3Ag wskazuje, że mniejsza liczba jonów srebra włączonych do warstwy prowadzi raczej do zmniejszenia adhezji bakterii i ich reprodukcji, niż do ich całkowitej biobójczości.

Ponadto, podczas oceny liczby bakterii adherentnych można było zauważyć dodatkowe działania MAO\_300\_3Ga i MAO\_400\_3Ga wobec bakterii. Charakterystyka bakteriostatyczna odpowiednio dla *S. aureus* po 4 h inkubacji i *E. coli* po 24 h może sugerować, że gal również wpływa na wzrost liczby bakterii.

Wyniki aktywności bakteryjnej po 4 h inkubacji są zgodne z obserwacją LIVE/DEAD, w której zarówno intensywność zielonej fluorescencji *E. coli*, jak i *S. aureus* zmniejszyła się wraz z dodatkiem srebra.

Na obrazach SEM po 4 h inkubacji można było zaobserwować wydłużone formy bakterii *E. coli* oraz kuliste *S. aureus*. Wyniki LIVE/DEAD i obserwacji SEM potwierdziły wyniki widniejące na wykresach liczby kolonii bakterii i wykazały, że na próbkach MAO\_400\_3Ga nastąpił istotny rozwój kolonii bakterii, w przypadku bakterii *S. aureus* można nawet zauważyć rozwiniętą formę biofilmu.

Rysunek 37 przedstawia obrazy bakterii bakterii *E. coli* i *S. aureus* uzyskane z wykorzystaniem mikroskopu SEM i fluorescencyjnego.



Rysunek 37 Bakterie *E. coli* i *S. aureus* występujące na próbkach referencyjnych i warstwach MAO wytworzonych przy zmiennych parametrach, uzyskane w obrazowaniu SEM (pierwsza i czwarta kolumna) oraz mikroskopu fluorescencyjnego przedstawiające obraz żywych bakterii (druga i piąta kolumna) oraz obraz martwych bakterii (trzecia i szesta kolumna)

### 9.3.9. Podsumowanie rozdziału

Do elektrolitu bazowego wprowadzono azotan srebra i/lub azotan galu jako źródło dodatków bioaktywnych, w trzech różnych stężeniach: 0,3, 3 i 6 mM i przeprowadzono utlenianie mikrołukowe pod 2 napięciami: 300 i 400 V, z zastosowanym natężeniem 83 mA, w czasie 15 minut. Nie udało się wytworzyć warstw w elektrolicie zawierającym 6 mM azotanu galu ani mieszaniny azotanu srebra i galu (3mM), dlatego do dalszych badań zrezygnowano z tych grup próbek.

Włączenie srebra do warstw spowodowało obniżenie średniej średnicy porów, wzrost zawartości srebra w warstwie i wzrost kąta zwilżania (przy 6 mM  $\text{AgNO}_3$ ), wzrost uwalniania ( przy 3 mM  $\text{AgNO}_3$  i 400 V), wzrost odpowiedzi komórkowej (przy 0,3 mM), a następnie wraz ze wzrostem stężenia azotanu srebra zahamowanie proliferacji przy jednoczesnym wzroście odporności bakteryjnej, gdzie przy MAO\_400\_3Ag warstwy uzyskały 100% skuteczności antybakteryjnej. Dodatek srebra nie wpłynął istotnie na chropowatość, grubość, ani stosunek Ca/P.

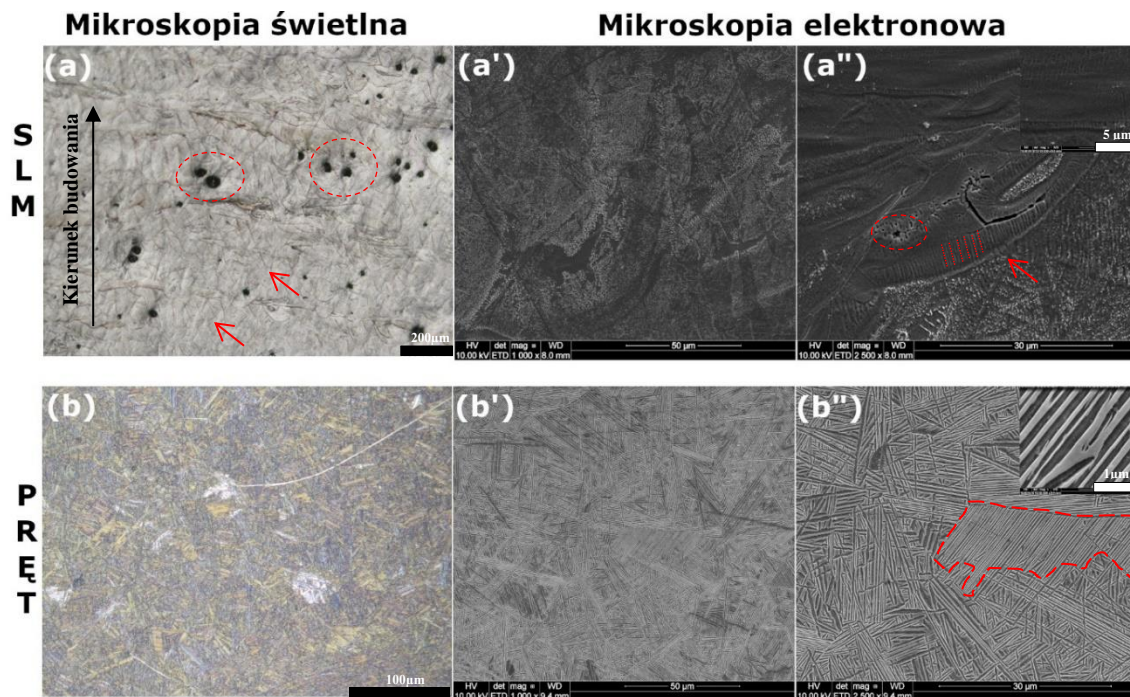
Włączenie galu natomiast wpłynęło na obniżenie wielkości porów, a przy 3 mM  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  i 400 V obserwowano obniżenie grubości warstwy, wzrost chropowatości, wzrost szybkości uwalniania galu, istotne obniżenie kąta zwilżania, a także fenomenalny wzrost proliferacji komórek. Gal nie wykazywał właściwości bakteriobójczych.

Dodatkowo, można stwierdzić, że dodatki nie miały istotnego wpływu na wartość stosunku Ca/P oraz nie spowodowały obniżenia adhezji warstwy do podłoża przy zadanej sile.

## 9.4. Wpływ metody wytwarzania implantów na charakterystykę warstw MAO

### 9.4.1. Porównanie mikrostruktury, morfologii, składu chemicznego i fazowego materiałów referencyjnych i wytworzonych na nich warstw MAO

Rysunek 38 przedstawia obrazy uzyskane przy użyciu mikroskopu świetlnego i elektronowego wytrawionych próbek wytworzonych metodą SLM oraz próbek pozyskanych z komercyjnego pręta.



Rysunek 38 Obrazy mikroskopii świetlnej (a, b) i elektronowej (a', a'', b', b'') wytrawionej próbki wytworzonej metodą SLM (a) oraz wytrawionej próbki w formie komercyjnego pręta (b), gdzie strzałki wskazują granice jeziorka topliwego, okrąg: porowatość)

Widoczne obrazy wyraźnie wskazują różnice w mikrostrukturze stopu w zależności od metody wytworzenia próbki referencyjnej.

Obserwacja SEM mikrostruktury stopu Ti-13Zr-13Nb pręta ujawniła występowanie mieszaniny drobnoziarnistej iglastej morfologii martenzytycznej (płytki o zróżnicowanych rozmiarach, mające kształt soczewek, ułożone pod kątem 60 lub 120°), jak również listwowego martenzytu (kształt masywnych listew równolegle ułożonych względem siebie) w obrębie ziaren fazy  $\beta$ , oraz charakterystycznie przeplatającą się lamelą (blaszką) fazy  $\alpha$  powstałą na granicach byłej fazy  $\beta$  (kolonia  $\alpha + \beta$ ). na obrazie b' i b'' jasne pola przedstawiają fazę  $\beta$ , ciemne pola zaś fazę  $\alpha$  [185], [186].

Średnica ziaren fazy  $\beta$ , oszacowana na podstawie obrazów SEM, wynosiła od 10  $\mu\text{m}$  do 80  $\mu\text{m}$ , natomiast szerokość listew fazowych  $\alpha'$  oszacowano na ok. 100-300 nm. Analiza widm XRD potwierdziła strukturę stopu Ti-13Zr-13Nb pręta składającą się głównie z faz  $\alpha$ ,  $\alpha'$  i  $\beta$ .

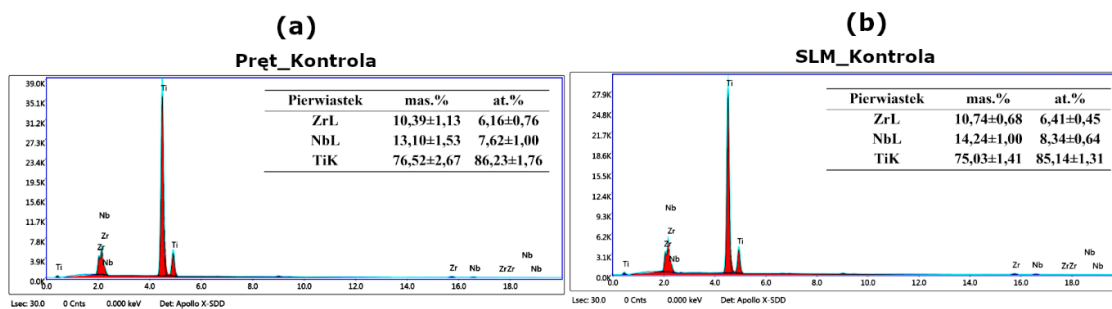
Stop Ti-13Nb-13Zr wytworzony metodą SLM wykazywał odmienną strukturę, w której ścieżki skanowania laserowego i ślady stopionego jeziora o kształcie półelipsy są wyraźnie widoczne. Oprócz kształtu półelipsy śladów stopionego jeziora, obserwuje się również morfologie przypominające pasma.

Obrazy z mikroskopu optycznego i elektronowego wykonane były równolegle do kierunku budowania elementu i ujawniły kolumnowe ziarna  $\beta$  rosnące wzdłuż osi z (kierunku budowy), a ich długość wynosiła nawet 200  $\mu\text{m}$ . Analiza XRD przedstawiona na rysunku 40, oprócz fazy  $\beta$ , wykazała także występowanie fazy  $\alpha'$ , co jest zgodne z danymi literaturowymi [187]–[189].

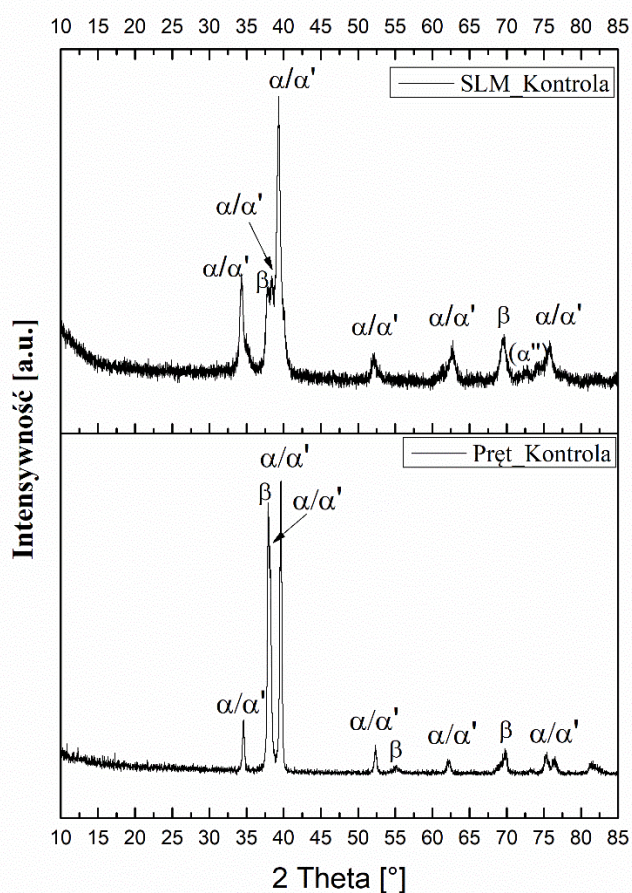
Szerokość poszczególnych torów skanu była w przybliżeniu równa długości rozstawu łuków od jeziora topliwego (na rys. 38 a” zaznaczone strzałką) powstałego na skutek topienia materiału wiązką lasera (około 120  $\mu\text{m}$ ).

Ponadto wewnątrz basenów topliwych zaobserwowano mikropory. Zauważono również obszary zawierające niestopione proszki, a od krawędzi stopionego jeziora widoczna jest mikrosegregacja w postaci krótkich linii prostopadłych do granic ścieżek skanowania.

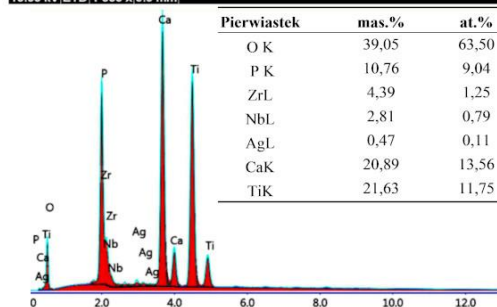
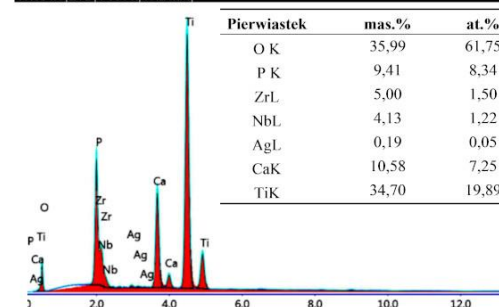
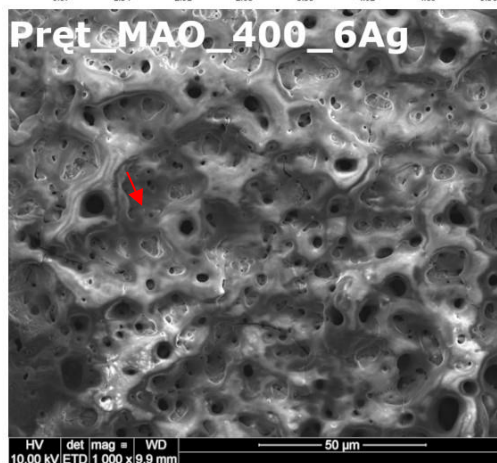
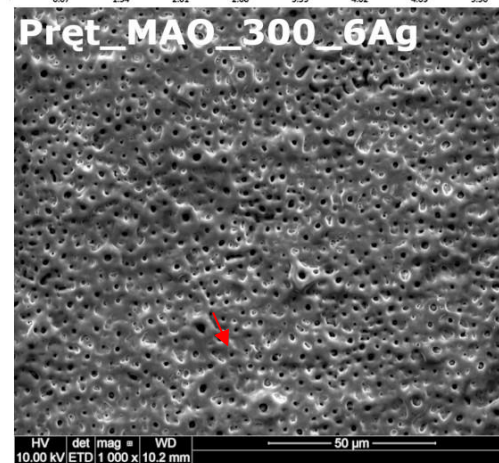
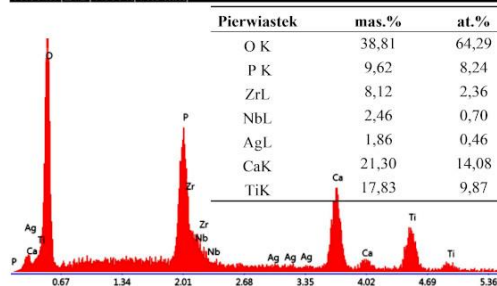
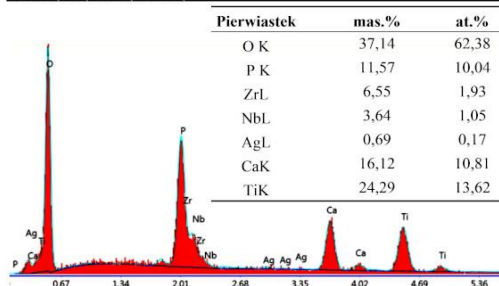
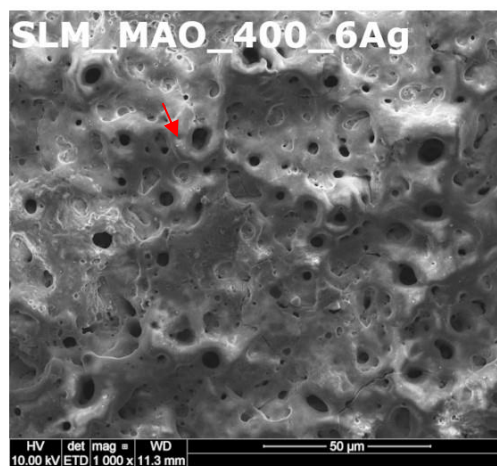
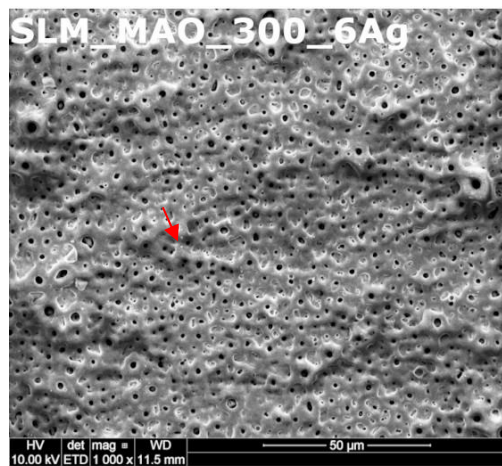
Analiza widm EDS (rys. 39) pokazuje zbliżony procentowy udział pierwiastków stopowych, jednak na uwagę zasługuje obniżona zawartość cyrkonu (% mas.) w stosunku do deklarowanej przez producenta (Zr: 13% mas.).



Rysunek 39 Widma EDS wraz z atomowym i masowym udziałem danych pierwiastków: wytrawionej próbki wytworzonej metodą SLM (b) oraz wytrawionej próbki w formie komercyjnego pręta (a)



Rysunek 40 Dyfraktogramy rentgenowskie referencji wytworzonej: metodą SLM oraz z komercyjnego pręta (przedstawione wyniki są reprezentatywne dla trzech analiz każdej grupy)



Rysunek 41 Topografia powierzchni SEM wraz z widmami EDS i składem chemicznym powierzchni warstw MAO wytworzonych na materiale kontrolnym SLM i materiale kontrolnym w postaci preła

Tabela 19 Stosunek Ca/P [at.%] warstw MAO wytworzonych na materiale kontrolnym SLM i materiale kontrolnym w postaci pręta

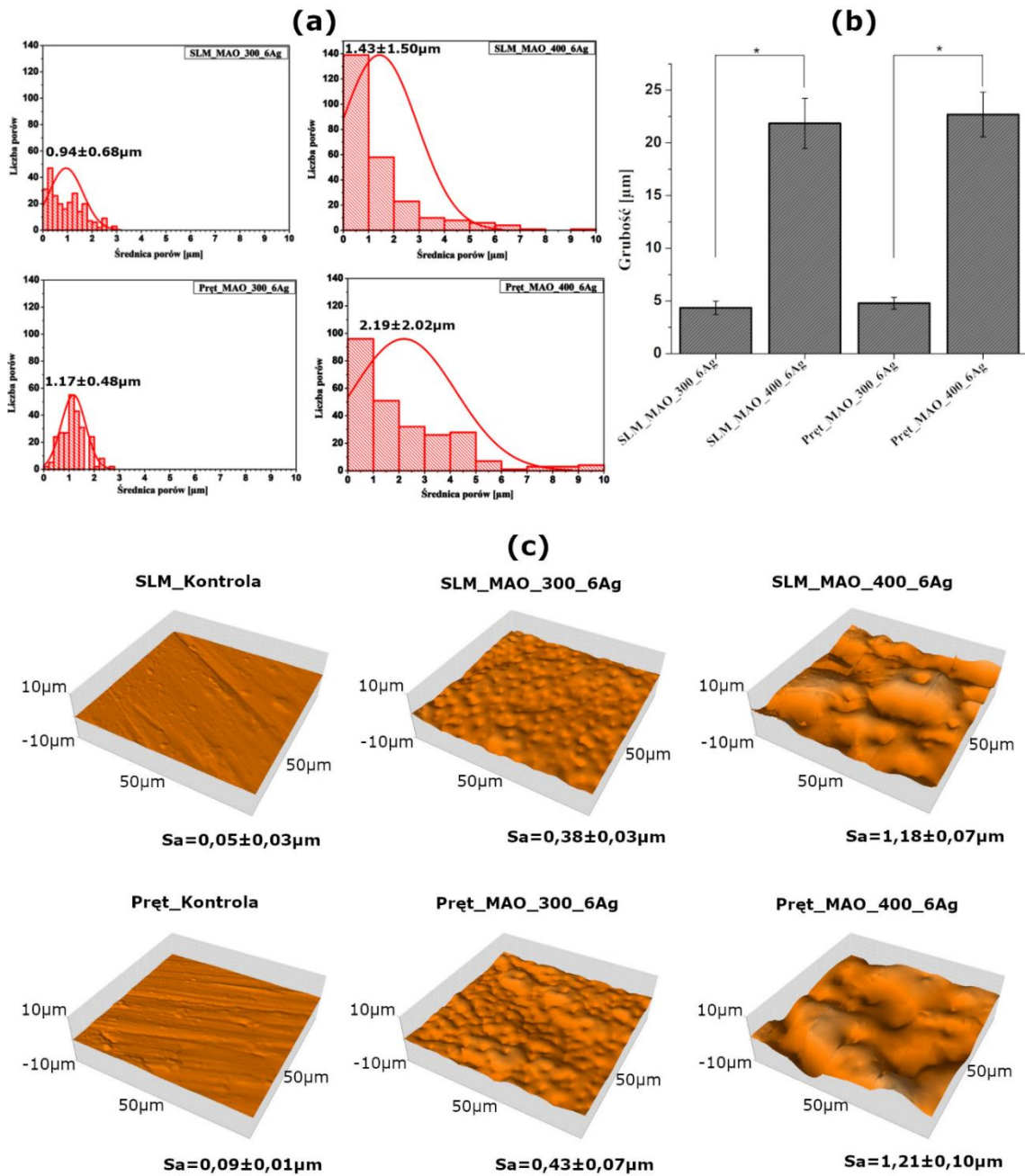
| Ca/P [ % at.] |                 |                 |                  |                  |
|---------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
|               | SLM_MAO_300_6Ag | SLM_MAO_400_6Ag | Pręt_MAO_300_6Ag | Pręt_MAO_400_6Ag |
| Ca/P [% at.]  | 1,83            | 1,71            | 0,87             | 1,50             |

Analizując morfologię warstw MAO (rys. 41) i histogramy średnicy porów (rys. 42) można zauważyć, że warstwa MAO wytworzona na stopie SLM posiada więcej nanometrycznych porów, o średnicy poniżej 1  $\mu\text{m}$ , w porównaniu do warstw MAO wytworzonych na komercyjnym pręcie. Metoda wytwarzania materiału kontrolnego nie miała istotnego wpływu zarówno na grubość, jak i chropowatość warstw MAO, a cechy te zależały głównie od napięcia procesu, co jest zgodne z wcześniejszymi analizami.

We wszystkich przypadkach na powierzchni warstw widoczne były nierównomiernie rozsiiane białe cząstki, w szczególności ich liczba przeważała na warstwach wytworzonych na materiale SLM. Analiza chemiczna EDS (rys. 41)

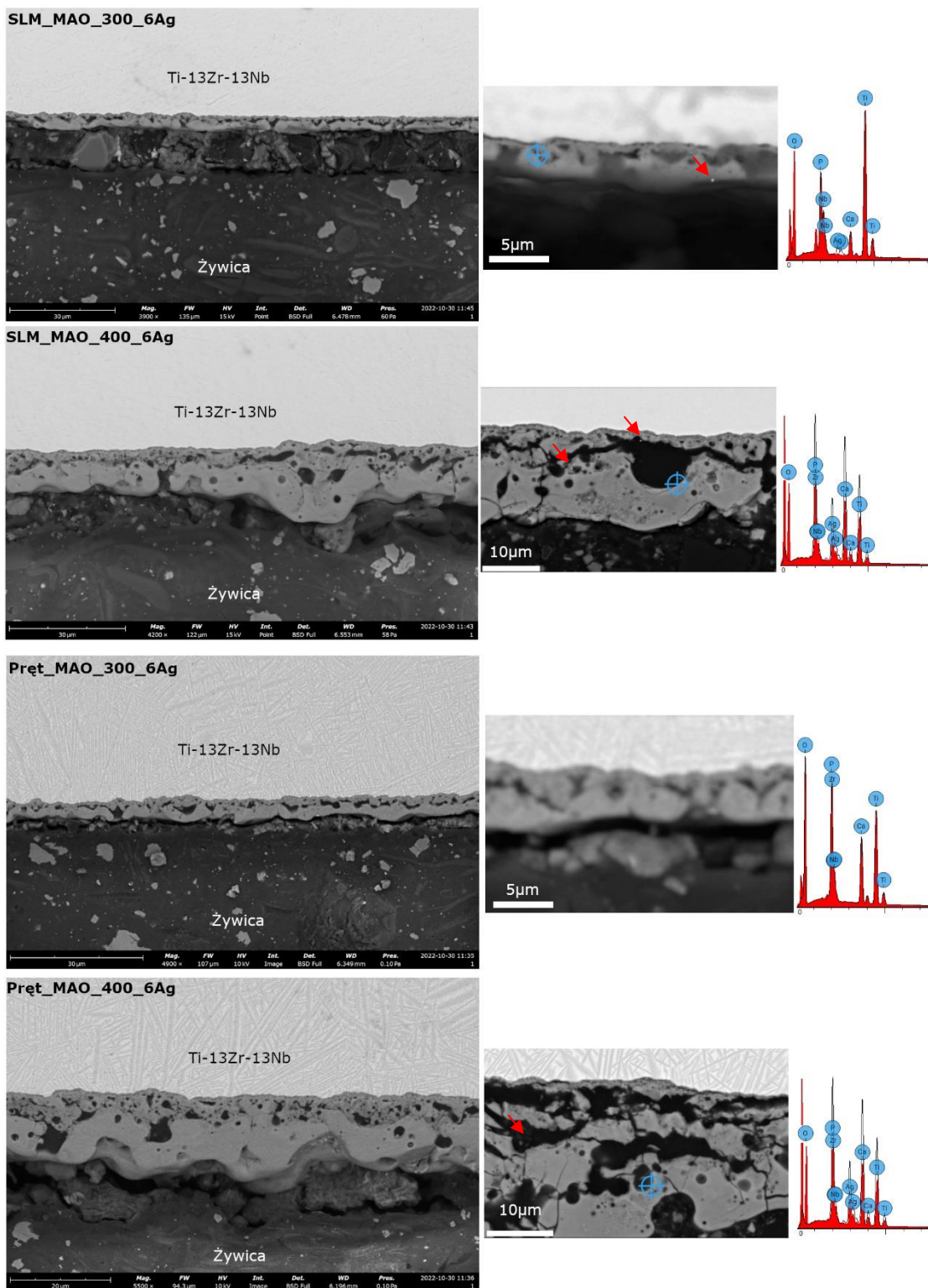


potwierdziła występowanie srebra, wykazując jego większą zawartość w warstwach wytworzonych na materiale SLM oraz wyższy stosunek Ca/P (tabela 19).



Rysunek 42 Histogramy przedstawiające średnicę porów (a) ( $n=250$ ), grubość (b), topografie powierzchni AFM wraz ze średnią chropowatością  $S_a$  (c) warstw MAO wytworzonych na materiale kontrolnym SLM i materiale kontrolnym w postaci pręta ( $n=20$ ) (dane to średnie  $\pm SD$ , \*istotnie różne między grupami napięci ( $p < 0.05$ ))

Na rysunku 43 przedstawiono przekroje warstw MAO oraz widma EDS przedstawiające skład chemiczny warstw wytworzonych na materiale kontrolnym SLM i materiale kontrolnym w postaci pręta.



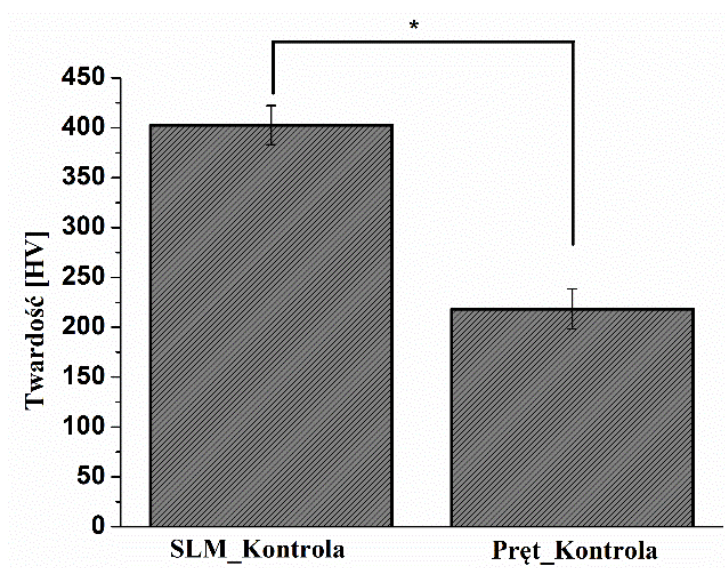
Rysunek 43 Przekroje warstw MAO oraz widma EDS przedstawiające skład chemiczny warstw MAO wytworzonych na materiale kontrolnym SLM i materiale kontrolnym w postaci pręta (czerwone strzałki wskazują cząsteczki srebra)

Przekroje ukazują dobre przyleganie warstwy do podłoża stopu tytanu. Analiza składu chemicznego potwierdziła występowanie srebra, które było widoczne w postaci białych jasnych cząstek, najczęściej umiejscowionych na krawędzi powstałych porów.

W przekroju próbki Pręt\_MAO\_300\_6Ag analiza EDS nie wskazała występowania srebra, co może oznaczać, że jego ilość była poniżej progu wykrywalności.

#### 9.4.2. Porównanie właściwości mechanicznych materiałów referencyjnych

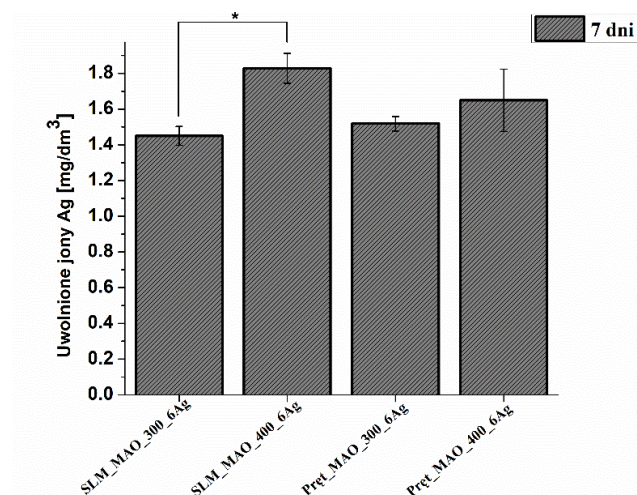
Na rysunku 44 przedstawiono wyniki badania twardości wykonanych na nanotwardościomierzu Vickersa. Uzyskane wyniki wskazują, że twardość próbki referencyjnej wytworzonej metodą SLM jest niemal dwukrotnie wyższa od referencji wykonanej z komercyjnego pręta.



Rysunek 44 Twardość kontroli wytworzonej metodą SLM oraz kontroli w postaci komercyjnego pręta walcowanego na gorąco ( $n = 6$ ; dane to średnie  $\pm$ SD; \* istotnie różne między grupami, ( $p < 0.05$ ))

#### 9.4.3. Porównanie szybkości uwalniania czynnika aktywnego

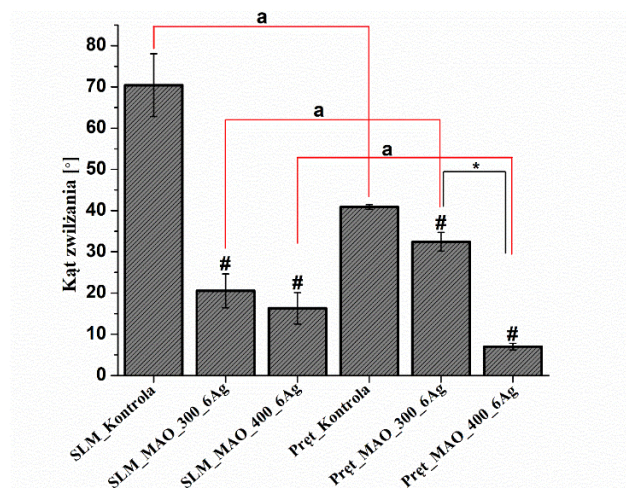
Na rysunku 45 przedstawiono szybkość uwalniania jonów srebra do roztworu PBS po 7-dniowej inkubacji. Wyniki wskazują zbliżone wartości ilości jonów uwolnionych do roztworu, przy czym zmiana napięcia procesu MAO z 300 na 400 V na materiale referencyjnym wytworzonym metodą SLM spowodowała istotny wzrost ilości srebra uwolnionego do roztworu, w przypadku warstw MAO wytworzonych na pręcie nie odnotowano istotnej zmiany.



Rysunek 45 Uwalnianie jonów srebra do PBS po 7 dniach inkubacji z warstw MAO wytworzonych przy różnych parametrach procesu na materiale macierzystym wytworzonym metodą SLM oraz na materiale macierzystym w postaci komercyjnego pręta walcowanego na gorąco ( $n = 6$ ; dane to średnie  $\pm$ SD; \* istotnie różne między grupami napięcia, ( $p < 0,05$ ))

#### 9.4.4. Porównanie zwilżalności powierzchni materiałów kontrolnych i warstw MAO

Na rysunku 46 przedstawiono uśrednione kąty zwilżania powierzchni kontroli wytworzonej metodą SLM oraz kontroli w postaci komercyjnego pręta walcowanego na gorąco, a także kąty zwilżania warstw MAO wytworzonych przy dwóch napięciach na danym materiale macierzystym.



Rysunek 46 Zwilżalność powierzchni kontroli wytworzonej metodą SLM oraz kontroli w postaci komercyjnego pręta walcowanego na gorąco, a także warstw MAO wytworzonych przy różnych parametrach procesu na danym materiale macierzystym ( $n = 6$ ; dane to średnie  $\pm$ SD; # istotnie różne od kontroli w danej grupie \* istotnie różne między napięciami w ramach grupy, a istotnie różne między grupami, ( $p < 0,05$ ))

Wyniki wskazują, że metoda wytwarzania materiału referencyjnego istotnie wpływa na zwilżalność powierzchni, gdzie kąt zwilżania materiału kontrolnego uzyskanego metodą SLM jest niemal dwukrotnie wyższy od kąta zwilżania materiału kontrolnego w postaci komercyjnego pręta.

We wszystkich przypadkach zastosowanie modyfikacji MAO istotnie poprawiło zwilżalność powierzchni wśród warstw MAO wytworzonych na próbce referencyjnej metodą SLM, zwilżalność poprawiła się o ok. 70% dla próbek utlenianych w 300 V oraz o ok. 75% dla próbek utlenianych w 400 V. W przypadku warstw wytwarzanych na komercyjnym pręcie, modyfikacja MAO w niższych warunkach napięciowych nieznacznie obniżyła kąt zwilżania o ok. 24%, ale z kolei zastosowanie wyższego napięcia doprowadziło do powstania warstwy o superhydrofilowej charakterystyce ( $7,03 \pm 0,80^\circ$ ).

#### **9.4.5. Podsumowanie rozdziału**

Przeprowadzono badania w kierunku wpływu metody wytwarzania materiału referencyjnego – metodą addytywną w porównaniu do metody konwencjonalnej, na charakterystykę wytworzonych warstw MAO. Wykazano różnice zarówno w charakterystyce materiałów referencyjnych, jak i warstw MAO. Próbki Ti-13Zr-13Nb wytworzone metodą SLM posiadały nierównowagową mikrostrukturę, większą porowatość, wyższą twardość oraz wyższy kąt zwilżania w porównaniu do próbek wytworzonych w sposób konwencjonalny. Utlenienie materiału SLM prowadziło do powstania warstw MAO o mniejszej średnicy porów z większą liczbą porów rozmiarów nanometrycznych, wyższym udziałem srebra w warstwie i wyższym stosunkiem Ca/P, a także obniżenia kąta zwilżania (przy 300 V) w porównaniu do warstw MAO uzyskanych na pręcie.

Wyniki stanowią istotną bazę do planowania procesu utleniania mikrołukowego na materiałach utworzonych metodami addytywnymi.



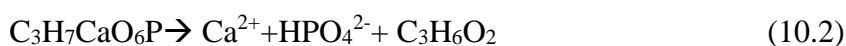
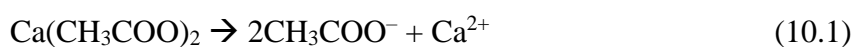
## 10. DYSKUSJA

### 10.1. Determinanty mechanizmu tworzenia, budowy i właściwości warstw MAO

#### 10.1.1. Formowanie warstw MAO

Podczas procesu MAO powstające pole elektryczne między anodą a katodą sprawia, że jony występujące w elektrolicie mogą poruszać się zarówno na drodze dyfuzji, jak i elektromigracji. Aniony przemieszczają się z elektrolitu do granicy faz metal/warstwa, podczas gdy kationy przesuwać się do granicy faz warstwa/elektrolit. Gdy aniony i kationy się spotkają, łączą się, tworząc ceramikę tlenkową (MAO) powłoki. Dyfuzja i elektromigracja jonów są blokowane przez zwiększenie grubości powłoki. Literatura podaje, że w elektrolicie fosforanowym wzrost warstw jest spowodowany głównie utlenianiem podłoża i jest bardziej charakterystyczny dla wzrostu do wewnątrz niż na zewnątrz. Jony  $\text{PO}_4^{3-}$  mogą dostać się na granicę faz metal/warstwa na drodze transportu zwarcowego.

Proces MAO można podzielić na kilka etapów. Na początku zachodzi proces dysocjacji związków zawartych w elektrolicie. Na podstawie uzyskanych wyników i danych literaturowych [190]–[192] przedstawiono możliwy mechanizm wnikania jonów wapnia i fosforu do warstw MAO w obecności glicerofosforanu (V) wapnia  $\text{C}_3\text{H}_7\text{CaO}_6\text{P}$ , który rozkłada się na wodorofosforan (V) wapnia  $\text{CaHPO}_4$  i aldehyd propionowy  $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$  (10.1-10.3):



Kiedy napięcie oddziałuje na anodę i katodę, jony ujemne docierają do anody w polu elektrycznym, podczas gdy jon  $\text{Ca}^{2+}$  może docierać do anody na drodze dyfuzji [191]. Równocześnie następuje anodowe utlenianie podłoża i uwalnianie jonów  $\text{Ti}^{4+}$  przy jednoczesnym uwalnianiu elektronów, które powodują utlenianie  $\text{H}_2\text{O}$  (10.4-10.7):





W ten sposób powstaje faza rutyli i anatazu wykazana w badaniach XRD.

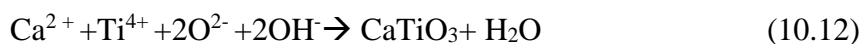
Wraz z postępem procesu MAO jony  $\text{Ca}^{2+}$  mogą reagować z  $\text{OH}^-$  tworząc  $\text{Ca(OH)}_2$  w elektrolicie (10.8):



Gdy temperatura powierzchni jest wystarczająco wysoka przy wyładowaniu iskrowym na anodzie, następuje rozkład  $\text{Ca(OH)}_2$  do  $\text{CaO}$  i wody oraz zwiększenie ilości dwutlenku tytanu (10.9-10.11):



Również, przy wysokiej temperaturze procesu, jony wapniowe, tytanowe, tlenowe i wodorotlenkowe mogą reagować ze sobą tworząc tytanian wapnia  $\text{CaTiO}_3$  [191] (10.12):



Dodatki do elektrolitu w postaci azotanów wprowadzają nowe warunki zachodzenia reakcji w elektrolicie.

Literatura przedmiotu podaje, że w zależności od pH roztworu gal występuje pod różnymi postaciami, tym samym jego zawartość w warstwach ściśle zależy od pH roztworu. w roztworach kwaśnych gal występuję w postaci jonów  $\text{Ga}^{3+}$ , w roztworach obojętnych w postaci wysoce nierozpuszczalnego amorficznego związku  $\text{Ga(OH)}_3$ , natomiast w roztworach zasadowych gal przyjmuje postać krystalicznego  $\text{Ga(OH)}_4$  [161].

W niniejszym badaniu, przygotowanie roztworu rozpoczynano od rozpuszczenia  $\text{Ga(NO}_3)_3$  w wodzie destylowanej, następnie wartość pH roztworu doprowadzano do 9,0 za pomocą  $\text{NaOH}$ , a na końcu dodawano elektrolit bazowy (Ca, GP), aby mieć pewność, że gal był w stanie jonowym  $\text{Ga(OH)}_4$ , a nie w stanie koloidalnym lub osadzonym.



Na podstawie uzyskanych wyników poniżej przedstawiono możliwy mechanizm wnikania jonów galu do warstw MAO [161] (10.13-10.14):



W fazie MAO aniony takie jak  $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  najpierw elektromigrują do anody pod wpływem pola elektrycznego, gromadzą się na granicy faz anoda/elektrolit, a następnie są włączone do powłoki MAO przez wyładowanie iskrowe. Na skutek występowania lokalnych wysokich temperatur aniony  $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$  na powierzchni anody przekształcają się w tlenek galu ( $\text{Ga}_2\text{O}_3$ ).

Jednocześnie dochodzi do jonizacji tytanu i powstały  $\text{Ti}^{4+}$  reaguje z  $\text{OH}^-$  tworząc anataz i rutil  $\text{TiO}_2$  (jak zostało omówione wcześniej). Ponieważ reakcja między  $\text{Ga}^{3+}$  i  $\text{OH}^-$  prowadząca do powstania  $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$  jest odwracalna, w roztworze wciąż znajduje się niewielka ilość  $\text{Ga}^{3+}$ . Kiedy jony  $\text{Ga}^{3+}$  docierają do granicy faz anoda/elektrolit, mogą reagować z jonami  $\text{PO}_4^{3-}$  tworząc  $\text{GaPO}_4$ , który jest nierozpuszczalny w wodzie. Wyniki EDS wykazały, że w warstwach zawartość fosforu jest większa niż zawartość galu, co wskazuje, że oprócz  $\text{GaPO}_4$ , jony P w warstwach MAO występują w innych związkach, jak na przykład amorficzny fosforan tytanu. W związku z powyższym, w warstwie MAO mogą występować przede wszystkim związki:  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Ga}_2\text{O}_3$ ,  $\text{GaPO}_4$ , których tworzenie podsumowano w równaniach 10.15-10.18:



Wzrastające stężenie  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  zwiększało przewodnictwo roztworu i tym samym sprzyjało elektromigracji ujemnie naładowanego  $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$  w kierunku anody.

Wprowadzenie do elektrolitu azotanu srebra z kolei, mogło spowodować następujące mechanizmy włączania srebra (10.19-10.21):





Dysocjacja azotanu srebra i powstanie tlenku srebra (I) są istotnie prawdopodobne i potwierdzone przez zabarwienie elektrolitu w trakcie trwania procesu MAO na lekko brunatną barwę (10.22).



Również powstały tlenek srebra AgO przy wyższych temperaturach rozkłada się do tlenku srebra(I) ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ) i tlenu (10.23).



Powyższe reakcje są jedną z możliwości włączenia związków aktywnych do warstwy, w celu potwierdzenia przebiegu tych reakcji należałoby wykonać dokładniejsze badania potwierdzające rodzaj powstałych wiązań chemicznych przy pomocy rentgenowskiej spektrometrii fotoelektronów (XPS, z ang. X-ray photoelectron spectroscopy).

### ***10.1.2. Wpływ stosowanych parametrów procesu na charakterystykę warstw MAO***

Przeprowadzone badania potwierdziły, że parametry procesu istotnie wpływały na charakterystykę warstw. Poniżej omówione zostały najważniejsze determinanty i ich wpływ na warstwę.

#### ***Napięcie***

Badania przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej potwierdziły dane literaturowe, według których stosowane napięcie jest jednym z najważniejszych czynników procesowych, o dominującym wpływie na charakterystykę warstw [106].

Analiza topografii próbek wykazała duży wpływ parametru napięcia na charakterystykę uzyskanych warstw w elektrolicie bazowym składającym się z glicerofosforanu wapnia i octanu wapnia. Każdorazowa zmiana napięcia o 100 V prowadziła do istotnych różnic uzyskanych topografii. Przy napięciu 200 V niecała powierzchnia uzyskiwała typową dla warstw MAO porowatość, przy napięciu 300 V występowała najbardziej jednolita warstwa, natomiast zastosowanie napięcia 400 V

spowodowało powstanie warstwy najbardziej nieregularnej z wulkanopodobnymi strukturami. W elektrolicie bazowym średnia średnica porów wzrastała wraz ze wzrostem napięcia i wynosiła od ok. 0,4 do 5  $\mu\text{m}$ . Uważa się, że średnice porów są określane przez różne procesy zachodzące podczas wzrostu warstwy tlenku przez MAO: zwiększenie gęstości prądu przy lokalnym przegrzaniu; jonizację z tworzeniem plazmy; mikrowyładowania elektryczne z ciągłym przetapianiem tlenku i łączeniem się z innymi związkami z elektrolitu [193]. Powstanie porowatych i wulkanicznych struktur warstw MAO było spowodowane intensywnym wyladowaniem iskrowym. Iskry najczęściej pojawiały się w najsłabszych obszarach granicy wyladowań, gdzie wytwarzany był tlen i inne gazy. Gaz wydostawał się z kanału wyladowczego, a następnie wokół niego szybko zestalały się stopione związki przenoszone przez elektrolity. Można przypuszczać, że przy napięciu 200 V przebite warstw dielektrycznych i wyladowanie mikrołukowe nie było skuteczne w tworzeniu w pełni porowatej warstwy MAO. Gdy maksymalne napięcie wynosiło 300 V, trwałe i stabilne wyladowanie plazmy elektrolitycznej spowodowało regularne rozmieszczenie porów na powierzchni o stosunkowo jednolitej średnicy porów. Gdy proces MAO przeprowadzono przy wyższym napięciu 400 V, intensyfikacja zachodzących procesów doprowadziła do zwiększenia ilości gazu, który uwalniając się pozostawił po sobie wulkanokształtne struktury. Dodatkowo rozmiar mikroporów zwiększył się, gdy niektóre kanały wyladowcze połączyły się ze sobą, uzyskując średnicę nawet 14  $\mu\text{m}$ . Wraz ze wzrostem napięcia zaobserwowano mikropęknięcia, które mogły być spowodowane naprężeniami termicznymi [194], bądź wynikiem rozpadu pęcherzyków plazmy elektrolitycznej na powierzchni stopu, które stale uwalniają dużą ilość energii, albo były efektem szybkiej kondensacji stopionego związku podczas wystawienia na działanie zimnego elektrolitu [195], lub wreszcie szybkiej transformacji tlenków z postaci amorficznej do krystalicznej [196].

W celu biofunkcjonalizacji warstw MAO, do bazowego elektrolitu (Ca, GP) dodano azotan srebra lub azotan galu w trzech stężeniach (0,3 mM, 3 mM i 6 mM). Na podstawie przeprowadzonej analizy parametrów procesu MAO, do dalszych badań nad wprowadzeniem czynników bioaktywnych zrezygnowano z przeprowadzania procesu pod napięciem 200 V i z czasem 10 min. Natomiast wstępna charakterystyka warstw nie dała jednoznacznego wykazania przewagi stosowanego napięcia 300 V w stosunku do 400 V, dlatego dalsze badania przeprowadzono przy stałym natężeniu prądu, w stałym czasie, pod dwoma zmiennymi wartościami napięcia 300 i 400 V.

Badania wykazały, że przy dobranych parametrach procesu nie było możliwe uzyskanie warstwy MAO w elektrolicie z dodatkiem 6 mM azotanu galu, ponieważ napięcie podczas obróbki nie wzrosło wystarczająco. Podjęto również próbę wytworzenia elektrolitu z jednoczesnym dodatkiem azoanu srebra (3 mM) i azotanu galu (3 mM), ale również otrzymanie oczekiwanych warstw MAO okazało się niemożliwe. Można uznać, że gdy stężenie azotanu galu lub azotanu galu z azotanem srebra było zbyt wysokie, rezystancja elektryczna powstałej warstwy tlenkowej stawała się niska. W związku z tym wzrost warstwy tlenku został zahamowany. Podobne zjawisko zaobserwowała inna grupa badawcza, ale w przypadku próby wytworzenia warstw w elektrolicie zawierającym 5 mM  $\text{AgNO}_3$  [143]. Podczas gdy w badaniach w ramach rozprawy doktorskiej z powodzeniem uzyskano warstwę MAO w elektrolicie zawierającym 6 mM  $\text{AgNO}_3$ , Tsutsumi i in. wykorzystywali ten sam elektrolit bazowy składający się z 1 M GP i 1,5 M CA, a proces MAO przeprowadzano w czasie 10 min. Zmienną, która mogła wpłynąć na powodzenie wytworzenia warstwy w roztworze zawierającym 6 mM  $\text{AgNO}_3$ , mogła być różnica w materiale bazowym (TNTZ w porównaniu z Ti-13Zr-13Nb), metodzie wytwarzania materiału bazowego (kuty na gorąco i walcowany na zimno TNTZ w porównaniu z Ti-13Zr-13Nb wytworzonym metodą SLM) i/lub wynikać z gęstości zastosowanego prądu ( $251 \text{ A/m}^2$  w przypadku TNZT i  $500 \text{ A/m}^2$  dla Ti-1Zr-13Nb). Niektórzy autorzy sugerują dodanie KOH lub NaOH do elektrolitu w celu zmniejszenia napięcia przebicia poprzez zmniejszenie oporności roztworu i ustabilizowania wyładowania. Jednak w badaniach prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej dodanie NaOH i ustabilizowanie roztworu do pH 9 nie było wystarczające do uzyskania warstwy w elektrolicie zawierającym 6 mM  $\text{Ga(NO)}_3$ . W przyszłości należałoby rozważyć dodanie związków chelatujących (np. EDTA, cysteinę), które mogą poprawić migrację galu w stronę anody.

Wpływ danego dodatku na charakterystykę warstw można było obserwować przede wszystkim przy niższym napięciu wytwarzania MAO. Efekty wysokiego napięcia zdominowały ewentualny wpływ dodatków na morfologię i były trudne w ocenie. Dodatek srebra do elektrolitu bazowego spowodował powstanie bardziej nieregularnych warstw o zwiększonej nanoporowatości (średnica porów  $<1 \mu\text{m}$ ) przy jednoczesnym pojawianiu się większych rozmiarów porów oraz nieznacznie zwiększonej chropowatości (przy 300 V) w stosunku do warstw wytworzonych w elektrolicie bazowym i w elektrolicie z dodatkiem galu. Przy niższym napięciu średnia wielkość porów

w warstwach z dodatkiem galu była wyższa niż w warstwach zawierających takie samo stężenie srebra. Brak istotnego wpływu dodatku srebra na chropowatość, która wynosiła ok 3,2  $\mu\text{m}$ , odnotowano również w badaniach innej grupy [162].

Grubość warstw MAO w elektrolicie bazowym również wzrastała wraz ze wzrostem napięcia i wahała się od 4,1 do 26,8  $\mu\text{m}$ , odpowiednio dla MAO\_200 i MAO\_400, co było związane z intensyfikującymi się procesami elektrochemicznymi przy zwiększonym napięciu procesu. Podobne wyniki otrzymał Chen i in., w których warstwa wytworzona na stopie Ti-39Nb-6Zr miała grubość ok. 15  $\mu\text{m}$  po 10-minutowym procesie MAO prowadzonym przy napięciu 400 V [197]. Inni autorzy uzyskiwali wyższe grubości osiągające 60  $\mu\text{m}$  [198] lub nawet 110  $\mu\text{m}$  [199]. W pierwszym przypadku duża grubość uzyskanych warstw spowodowana była zmianą dynamiki procesu związaną z większą zawartością w elektrolicie fosforu niż wapnia. Z kolei w badaniach Sedelnikovej i in. [199] proces MAO był przeprowadzany z wykorzystaniem prądu zmiennego, co utrudnia porównanie i interpretację wyników. Dodatek azotanu galu (3 mM) przy wyższym napięciu procesu MAO spowodował istotny, niemal dwukrotny, spadek grubości (11,50 $\pm$ 2,63  $\mu\text{m}$ ) wytworzonej warstwy w stosunku do warstw bazowych (20,87 $\pm$ 2,27  $\mu\text{m}$ ) i warstw zawierających srebro (22,41 $\pm$ 2,54  $\mu\text{m}$ ). Przyczyną mógł być wspomniany powyżej problem z obniżoną rezystancją elektryczną powstałej warstwy tlenkowej i zahamowaniem procesu wzrostu. Z kolei grubość warstwy wytworzonej w elektrolicie o niższym stężeniu galu (MAO\_400\_03Ga) była zbliżona do grubości warstw wytworzonych w tym samych warunkach napięciowych, ale w elektrolicie bazowym (MAO\_400), co oznaczało, że stężenie 0,3 mM było zbyt niskie, by istotnie wpływało na formowanie się warstwy. Otrzymane wyniki były spójne z wynikami uzyskanymi w innych pracach. Np. Zhong i in. wykazali, że wyższe stężenie Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> spowolniło proces powstawania warstw MAO, a otrzymane grubości wahały się od 2,7 do 6,9  $\mu\text{m}$ . Dodanie mieszaniny związków Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> i Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> istotnie poprawiło przebieg procesu anodowania mikrołukowego [159]. Dodatek srebra natomiast nie miał istotnego wpływu na grubość warstw, co również przedstawiono w badaniach [143]. Chociaż niektórzy autorzy odnotowali wzrost grubości warstwy wraz z zawartością srebra w elektrolicie od 11,4  $\pm$ 1,4 do 19,4 $\pm$ 2,3  $\mu\text{m}$  [162], to dodatek srebra był tu pośrednim czynnikiem wpływającym na grubość, ponieważ wraz ze wzrostem stężenia rosła gęstość prądu, a to powodowało wzrost grubości warstw. W badaniach

w ramach rozprawy doktorskiej nie zachodził taki proces, gdyż wartość natężenia była stałą zadaną.

Proces MAO wykonywany pod napięciem 200 i 300 V skutkował powstaniem warstwy o zbliżonej chropowatości ( $R_a=0,34-0,46 \mu\text{m}$  przy 200 V i  $R_a=0,28-0,53 \mu\text{m}$  przy 300 V), dopiero wzrost wartości do 400 V spowodował istotny, pięciokrotny wzrost chropowatości ( $R_a=1,67-2,92 \mu\text{m}$ ), związany z występowaniem struktur wulkanicznych. Wyniki chropowatości były skorelowane z grubością warstw, bowiem wraz ze wzrostem grubości warstwy do rozbicia warstwy dielektrycznej potrzebna była wyższa energia, co prowadziło do wzrostu chropowatości. Uzyskane wyniki są zbliżone, choć nieco wyższe od wartości przedstawianych w danych literaturowych. Karbowniczek i in. [198] przy użyciu tego samego elektrolitu, pod impulsem prądu stałego o napięciu 400 V w czasie 5 min, uzyskali  $R_a = 1,6 \mu\text{m}$ . Lin i in. [197] podali  $R_a = 1,86 \mu\text{m}$  dla stopu Ti-39Nb-6Zr poddanego obróbce MAO po 10 minutach pod napięciem 400 V. Sedelnikova i in. [199] wykazali, że stopy zawierające Zr i Nb charakteryzowały się niższymi wartościami chropowatości w porównaniu do warstw wytworzonych na czystym Ti. Dodatki wprowadzone do elektrolitu bazowego nie miały istotnego wpływu na chropowatość warstw i również w tym przypadku głównym czynnikiem wpływającym na parametr chropowatość było napięcie, gdzie wraz ze wzrostem napięcia wartości chropowatości wzrosły nawet sześciokrotnie. Wyjątek stanowiły próbki wytworzone przy wyższym stężeniu azotanu galu i wyższym napięciu MAO\_400\_3Ga, które charakteryzowały się największą wartością chropowatości powierzchniowej  $S_a (1,90\pm 0,04 \mu\text{m})$  spośród wszystkich próbek. Mogło być to związane z wyższą przewodnością elektrolitu i wyższą uwolnioną energią w procesie, powodującą wzrost chropowatości [200].

Analiza wyników EDS potwierdza, że proces MAO wpływa nie tylko na morfologię powierzchni, ale także na skład chemiczny warstw tlenków. Obecność wapnia i fosforu w badaniach EDS potwierdza skuteczność procesu włączania składników elektrolitu do warstwy na drodze wyładowania mikrołukowego, natomiast obecność tytanu, cyrkonu i niobu dowodzi migracji pierwiastków z metalicznego podłoża. Wysokie stężenie tlenu w warstwach MAO świadczy o intensywnym anodowaniu [201]. Natomiast wysoka wartość węgla wykryta podczas badania EDS może być związana z zanieczyszczeniami pochodzącymi z atmosfery  $\text{CO}_2$  podczas obróbki MAO, z wewnętrznych ścianek komory próżniowej w SEM, a także z przypadkowo niewłaściwego przechowywania próbek [202]. Zgodnie z literaturą

bardzo trudno jest uzyskać i przeanalizować wiarygodną wartość zawartości węgla za pomocą spektrometrii rentgenowskiej z dyspersją energii, dlatego w kolejnych rozdziałach wyeliminowano węgiel z analizy EDS.

Stosunek Ca/P, ważny ze względu na zdolność danego materiału do indukowania apatytu i promowania osteointegracji [118], wzrastał wraz ze wzrostem stosowanego napięcia, jednak nawet najwyższa wartość uzyskana w próbce MAO\_32\_15\_400 (Ca/P=1,38) była istotnie niższa od preferowanej wartości występującej w apatycie kostnym (Ca/P=1,67). Literatura donosi, że elektrolity, w których skład wchodził glicerofosforan wapnia i octan wapnia, były odpowiednie do tworzenia warstw o stosunku Ca/P równym wartości występującej w hydroksyapatycie [123]. Z drugiej strony Han i in. [203] przedstawili badanie wykazujące, że próbki o stosunku atomowym Ca/P równym 1,73 nie wykazywały zdolności indukcji apatytu, podczas gdy próbki o wyższej zawartości Ca i P, ale niższym stosunku atomowym Ca/P wykazywały występowanie apatytu na powierzchni. Dodatek srebra w wyższych stężeniach (przy procesie prowadzonym przy wyższym napięciu) spowodował powstanie warstw ze stosunkiem Ca/P bliższym oczekiwanej wartości 1,67. Jednak to próbki wytworzone w elektrolicie zawierającym 0,3 mM galu wykazały się najlepszym (najbliższym wartości dla naturalnego apatytu) stosunkiem Ca/P równym  $1,68 \pm 0,05$ . Możliwe przyczyny to różny wpływ jonów w elektrolicie na ich względne szybkości migracji do metalu i potencjały elektroosadzania.

Udział dodatków w warstwie zależał przede wszystkim od stężenia azotanu srebra/galu w elektrolicie i w mniejszym stopniu od zastosowanego napięcia. Godny uwagi jest fakt, że niektóre warstwy wykazały niższą zawartość powierzchniową pierwiastka aktywnego (Ga lub Ag) w warstwach wytworzonych pod napięciem 400 V niż 300 V, np. zawartość Ga w warstwie MAO\_300\_3Ga wynosiła  $0,49 \pm 0,07\%$  at. Ga, podczas gdy w warstwie MAO\_400\_3Ga wynosiła  $0,33 \pm 0,03\%$  at. Ga. Podobną sytuację zaobserwowano w próbce wytworzonej w 0,3 mM roztworze azotanu srebra. Jedną z prawdopodobnych przyczyn mogło być wprowadzenie większej ilości pierwiastków do wnętrza warstwy, spowodowane intensyfikacją procesów elektrochemicznych zachodzących przy wyższych napięciach. Podstawą tego stwierdzenia może być fakt, że analiza zawartości pierwiastków w przekroju wykazała istnienie galu wewnątrz warstwy wytworzonej w 400 V, natomiast przy niższym napięciu procesu MAO, gal był poniżej wartości wykrywalności przez EDS świadcząc, że większość tego pierwiastka została

osadzona na powierzchni. W porównaniu do badań innych autorów, implementacja pierwiastków do powierzchni była niższa, biorąc pod uwagę takie samo stężenie zastosowanego źródła tych pierwiastków. W badaniach, w których zastosowano dodatek 0,06 i 0,03 mM  $\text{AgNO}_3$ , zawartość Ag była poniżej wykrywalności EDS ( $<0,1\%$  mas.) [141]. Przy 2 mM azotanu srebra zawartość Ag wynosiła  $2,1 \pm 0,6\%$  mas. [144]. W innych badaniach dodatek 2,5 mM azotanu srebra skutkowało włączeniem ok. 3,2% at. Ag [137]. Z kolei Song i in. przy dodaniu 4 mM azotanu srebra uzyskali jedynie 0,21–0,45% mas. Ag w warstwie [141]. Natomiast przy 1,7 i 5 mM  $\text{AgNO}_3$  zawartość srebra wahała się od 0,2 do 0,8% at. [162], a z kolei dodatek 8 mM  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  pozwalał uzyskać warstwy z zawartością galu ok. 1,03% at. Można zauważyć bardzo duże rozbieżności w otrzymywanych wynikach, wynikające min. z parametrów procesu MAO lub zastosowanej metody pomiarowej (EDS/EDX). Niektórzy autorzy podawali zawartość pierwiastka wagowo, inni atomowo. w większości przypadków autorzy zastosowali dodatki do elektrolitów, które poprawiały migrację jonów do warstwy.

Zwilżalność powierzchni ma kluczowe znaczenie dla adsorpcji białek i adhezji komórek [167]. Próbki wytworzone w elektrolicie bazowym z i bez bioaktywnych dodatków wykazały się hydrofilowym charakterem z kątem zwilżania  $< 90^\circ$ . Z literatury [126] wynika, że kąt zwilżania warstw MAO wzrasta wraz ze wzrostem przyłożonych napięć. z próbek wytworzonych w elektrolicie bazowym, tylko MAO\_32\_15\_400 jest zgodny z tą zależnością. Jednak na zwilżalność powierzchni mogą silnie wpływać inne parametry, takie jak morfologia, krystaliczność i skład chemiczny [204]. Inne badania wykazały, że wraz ze wzrostem zawartości rutyłu spada kąt zwilżania [200], co jest spójne z otrzymanymi wynikami. Dodatek srebra lub galu spowodował istotną poprawę zwilżalności powierzchni w stosunku do próbek referencyjnych. Przy niższych zawartościach srebra w elektrolicie (0,3 i 3 mM) otrzymane warstwy poprawiły zwilżalność również w stosunku do warstw wytworzonych w elektrolicie bazowym. Co więcej, warstwy te, wytworzone przy wyższym napięciu, uzyskały superhydrofilowy charakter  $< 10^\circ$ . Odnotowano tu także spadek kąta zwilżania wraz ze wzrostem napięcia procesu MAO, związany ze zwiększoną średnicą porów i zwiększoną chropowatością powierzchni. Podobny trend zaobserwowali Sedelnikova i in., u których w roztworze zawierającym azotan srebra, kąt zwilżania próbek wytworzonych pod napięciem 400 V wynosił ok.  $28^\circ$ , natomiast przy 450 V ok.  $10^\circ$  [139], z tą różnicą, że w badaniach w ramach rozprawy doktorskiej wystarczyło niższe napięcie, by uzyskać zwilżalność



$<10^\circ$ . Inna grupa badawcza uzyskała warstwę o kącie zwilżania ok.  $20^\circ$  przy napięciu 295-325 V [160], [161]. Biorąc pod uwagę stężenie danego dodatku, warstwy wytworzone w azotanie galu charakteryzowały się istotnie wyższym (z wyjątkiem MAO\_400\_3Ga), choć wciąż wysoko hydrofilowym, kątem zwilżania w porównaniu do warstw wytworzonych w tych samych warunkach napięciowych, ale w roztworze srebra. Zależność ta mogła wynikać z mniejszej nanoporowatości warstw, wyższej chropowatości, ale także z udziału galu, każdy bowiem pierwiastek metaliczny charakteryzuje się innym kątem zwilżania.

Według literatury, warstwy krystaliczne mają większe zdolności promowania zarodkowania apatytu, a tym samym wykazują wyższą bioaktywność niż warstwy amorficzne [91]. Na powierzchni po obróbce MAO, wśród tlenków tytanu, przy wszystkich przyłożonych napięciach pojawiły się piki rutylu i anatazu, których intensywność malała wraz ze wzrostem zastosowanego napięcia, co mogło być związane ze wzrostem grubości warstwy tlenkowej. Pik Ti widoczny na dyfraktogramie XRD w warstwach MAO może być skorelowany z przenikaniem promieniowania rentgenowskiego do podłoża przez mocno porowatą warstwę. Natomiast wykazane tlenki w formie rutylu i anatazu na materiałach kontrolnych potwierdzają dobrą zdolność stopu Ti-13Zr-13Nb do samopasywacji [205]. W warstwach wytworzonych przy wyższym napięciu procesu pojawiły się dodatkowe piki odpowiadające fazie rutylu. Literatura wskazuje, że głównie anataz powstaje przy niższych napięciach formowania, podczas gdy połączenie faz anatazu i rutylu pojawia się przy wyższych napięciach, ponieważ anataz jako faza metastabilna stopniowo przekształca się w rutil w wyższych temperaturach wraz ze wzrostem zjawiska przebiecia dielektrycznego [206]. z kolei Wang i in. wykazali, że stopy zawierające pierwiastki Nb i Zr mogą tworzyć większą liczbę ziaren fazy anatazu niż fazy rutylu podczas utleniania wysokim napięciem (400 V) w porównaniu z czystym Ti i Ti-6Al-4V [207], co jest zgodne z otrzymanymi wynikami. Brak widocznych faz pochodzących od związków wapniowo-fosforanowych może być związany z ich zawartością poniżej granicy wykrywalności XRD. Zjawiska te są zgodne z literaturą. Zhang i in. nie stwierdzili żadnych pików z hydroksyapatytu w próbce Ti-MAO wytwarzanej w roztworze CA i GP [208], podczas gdy Han i in. obserwowali fazę zawierającą Ca i P, stosując roztwór CA- i  $\beta$ -GP przy napięciach powyżej 450 V [203].

Test zanurzeniowy w roztworze Hanksa przeprowadzono w celu zbadania bioaktywności warstw MAO wytworzonych w elektrolicie wapniowo-fosforanowym

przy różnych napięciach. Oprócz widocznych w obrazie SEM białych cząstek na próbkach wytworzonych przy niższych napięciach i białego nalotu równomiernie rozłożonego na powierzchni próbek MAO\_400, stosunek Ca/P wzrósł niemal dwukrotnie dla MAO 200 i 300 V i nieznacznie dla MAO\_400. Co ciekawe, również Kontrola wykazywała cechy bioaktywności. Trudno jest obecnie zaproponować jakikolwiek model wyjaśniający względny spadek zawartości P wraz ze wzrostem napięcia, ale można to w znaczącym stopniu przypisać różnym potencjałom chemicznym osadzania (potencjałom elektroosadzania) obu jonów i różnym relacjom potencjałów chemicznych do napięcia elektrochemicznego. Wyniki są zgodne z raportem Du i in. [209], z którego wynika, że warstwa MAO utworzona przy napięciu 350 V wykazuje lepszą zdolność indukowania apatyty w porównaniu z procesem MAO prowadzonym przy wyższych napięciach (400, 450 i 500 V). Wartość stosunku Ca/P najbliższą stechiometrycznemu hydroksyapatytowi (1,67) uzyskano dla próbek poddanych działaniu napięcia 300 V (1,51). Oznacza to, że MAO\_32\_15\_300 charakteryzowały się najwyższą zdolnością powierzchni do indukowania wytrącania fosforanu wapnia z próbek wytwarzanych w elektrolicie bazowym. Według danych literaturowych, w wyniku zarodkowania apatyty i dyfuzji jonów Ca i P z warstw MAO do roztworu Hanksa, wzrasta stopień lokalnego przesylenia, a zarodki apatyty spontanicznie rosną. Ponadto wzrost chropowatości powierzchni również przyspiesza zarodkowanie apatyty [163]. Tym samym bioaktywność MAO wzrasta wraz ze zmianą napięcia z 200 na 300 V. Jej dalszy spadek może być, jak wspomniano powyżej, spowodowany wieloma czynnikami, w tym zależnością potencjału chemicznego od napięcia. W podobnym badaniu Tsutsumi i in. [123] zaobserwowali na warstwie MAO wytworzonej na stopie Ti-29Nb-13Ta-4,6Zr nowo utworzone warstwy bogate w Ca i P po 7 dniach ekspozycji w roztworze Hanksa. Z kolei w innych badaniach tej samej grupy badawczej wykazano, że na stopie Ti-15Zr-7,5Mo poddanym obróbce MAO nie zaobserwowano fosforanów wapnia po zanurzeniu przez 7 dni. Wynikało to prawdopodobnie z dużej zawartości cyrkonu w warstwie otrzymanej po procesie MAO, który zmniejszał zdolność do tworzenia fosforanu wapnia [124]. Z kolei Song i in., na podstawie badań w elektrolicie zawierającym 0,04 mol/dm<sup>3</sup> β-glicerofosforanu wapnia i 0,4 mol/dm<sup>3</sup> octanu wapnia, wykazali, że napięcie procesu mieszczące się w granicach od 350 do 500 V sprzyjało powstawaniu warstwy krystalicznej z jonami wapnia i fosforu po 28 dniach w płynie SBF [125].

Do jednej z przyczyn powikłań nieinfekcyjnych występujących po implantacji należy niedopasowanie właściwości mechanicznych do otaczających tkanek, prowadzących do aseptycznego obluzowania implantu [28]. Twardość ( $H$ ), wartość modułu Younga ( $E$ ) oraz mechanizm deformacji warstwy pod obciążeniem są uważane za najważniejsze czynniki decydujące o właściwościach przeciwzużyciowych powłok ceramicznych [210]. Zastosowanie modyfikacji MAO spowodowało obniżenie wartości twardości i modułu Younga w stosunku do referencji, a im wyższe zastosowano napięcie, tym właściwości te były niższe, co mogło być spowodowane m.in. wzrostem grubości warstw, a tym samym zmniejszeniem wpływu podłoża. W przypadku biomateriałów na implanty kostne, niższe wartości modułu Younga są preferowane. Niedopasowanie modułu sprężystości i twardości implantu do kości może prowadzić do ekranowania naprężeń i w ślad za tym do obluzowania implantu. Uzyskane wyniki wskazują, że wartości modułu sprężystości dla wszystkich warstw MAO wytworzonych w elektrolicie bazowym są bliższe wartościom charakterystycznym dla kości (11,4–21,2 GPa), niż materiał referencyjny, a najlepsze dopasowanie obserwuje się dla próbek poddanych działaniu napięcia 400 V. Zgodnie z literaturą, im niższe są stosunki  $H/E$  i  $H^3/E^2$ , odniesione odpowiednio do zniszczenia materiału w wyniku odkształcenia sprężystego i odporności materiałów na odkształcenia plastyczne, tym gorsza jest odporność materiałów na zużycie [172]. Niższe stosunki  $H/E$  i  $H^3/E^2$  warstw MAO w stosunku do Kontroli, oznaczają duże skłonności warstw do odkształcania plastycznego, a w konsekwencji małej odporności na zużycie [173]. Niektórzy autorzy wykazali, że ściśle dopasowanie modułu sprężystości warstw i podłoża zmniejsza naprężenia międzyfazowe i zapewnia lepszą przyczepność [174]. Korzystne jest uzyskanie wartości stosunku  $E_{\text{warstwy}}/E_{\text{podłoża}}$  bliskiej jedności, gdyż im większe niedopasowanie, tym możliwe większe odkształcenie plastyczne lub kruche pękanie [175]. W niniejszym badaniu stosunek  $E_{\text{warstwy}}/E_{\text{podłoża}}$  zmalał wraz ze wzrostem przyłożonego napięcia, a największe niedopasowanie modułu Younga warstwy i podłoża występowało w przypadku próbek poddanych procesowi MAO pod wysokim napięciem (MAO\_400). Zgodnie z literaturą właściwości mechaniczne zależą od wielu determinant, tj. porowatości, składu fazowego warstwy tlenku oraz parametrów procesu MAO. Sugeruje się, że miękkie aglomeraty fosforanu wapnia mają istotny wpływ na obniżenie właściwości mechanicznych. Na przykład Karbowniczek i in. [198] uzyskali twardości w zakresie od 5,74 do 21,88 GPa i moduł Younga o wartościach od  $29,3 \pm 4,3$  do  $54,7 \pm 11,8$  GPa, w zależności od różnych stosunków Ca/P. Warstwy wytworzone w elektrolicie

zawierającym azotan srebra lub azotan galu charakteryzowały się obniżoną twardością i modułem Younga w stosunku do próbek referencyjnych. Dodatek srebra nie wpłynął istotnie na właściwości nanomechaniczne otrzymanych warstw w stosunku do warstw wytworzonych w elektrolicie bazowym, natomiast próbki wytworzone z dodatkiem galu wykazały się dodatkowo obniżoną twardością i modułem Younga. w tych próbkach odnotowano także najwyższy stosunek H/E. Warto zauważyć, że obserwowane przez wielu autorów różnice właściwości mechanicznych i ich znaczne odchylenia standardowe są charakterystyczne dla pomiarów nanoindentacji [176]. Zwłaszcza nanoindentacja makroporowatych warstw jest trudna do badania ze względu na błędy eksperymentalne związane z wpływem podłoża, zapadaniem się porów podczas indentacji, a także z chropowatością powierzchni [211]–[213]. Ponadto metodyka wiarygodnego określania właściwości mechanicznych powłok porowatych nie została jeszcze dobrze zdefiniowana. Zgodnie z literaturą, aby zminimalizować wpływ podłoża, wgniecenia powinny dochodzić na maksymalną głębokość ( $h_{max}$ ) mniejszą niż 10% grubości powłoki ( $t_f$ ) ( $h_{max}/t_f < 0,1$ ) [37], a niektórzy autorzy wskazują 20% grubości warstwy dla porowatych cienkich warstw ceramicznych ( $h_{max}/t_f < 0,2$ ) [214], podczas gdy inni twierdzą, że dla pomiarów twardości efekt podłoża byłby stosunkowo mały, o ile głębokość wcięcia byłaby mniejsza niż 50% grubości warstwy [215]. Z drugiej strony, biorąc pod uwagę efekt chropowatości, wyniki szacowania modułu sprężystości są bardziej spójne i powtarzalne, gdy głębokość wcięcia jest większa, w zakresie 10–20% grubości warstwy [216], [217]. Można zauważyć, że w przedstawionych badaniach spełniony został warunek zależności  $h_{max}/t_f < 0,5$ , natomiast MAO\_300 i 400 spełniają zależności  $0,1 < h_{max}/t_f < 0,2$ , co według literatury powinno zminimalizować potencjalny błąd wyników wynikający z wpływu podłoża. Ponadto w celu wyeliminowania błędów eksperymentalnych przeprowadzono serię testów wgłębnych, statystycznie odrzucono wartości krytyczne i uwzględniono medianę. Dodatkowo w celu zminimalizowania efektu zagęszczenia wypełnienia porów, eksperyment przeprowadzono z odległością indentów równą 20  $\mu\text{m}$  przesuniętą w osi z i Y. W przyszłości, aby udoskonalić badanie nanoindentacji, należy rozważyć zastosowanie kulistej końcówki wgłębnika (o większej powierzchni), preferowanej w przypadku badań wysokoporowatych warstw.

Kolejną przyczyną nieinfekcyjną powikłań poimplantacyjnych jest niewystarczająca adhezja warstw do podłoża, która pod wpływem działających sił może doprowadzić do rozwarstwienia i być przyczyną aseptycznego obłuzowania implantu.

w teście zarysowań można zaobserwować trzy główne uszkodzenia: pękanie kohezyjne, adhezyjne i mieszane. Obciążenie krytyczne jest to minimalne obciążenie, przy którym następuje uszkodzenie. Wyniki scratch testu (testu nanozarysowania) są spójne z uzyskanymi wynikami nanomechanicznymi. Warstwy wytworzone w elektrolicie bazowym pod napięciem 300 i 400 V wykazywały większy stopień uszkodzeń kohezyjnych objawiających się licznymi mikropęknięciami okrężnymi, poprzecznymi i łukowymi w porównaniu do MAO\_200. Jednak to w MAO\_200 najszybciej doszło do delaminacji warstwy. Na podstawie wyników można stwierdzić, że wraz ze wzrostem napięcia rosła siła adhezji warstwy do powierzchni. Ta zależność jest zgodna z literaturą, gdzie siła wiązania między podłożem a warstwą tlenku jest korzystniejsza wraz ze wzrostem grubości powłoki [218]. W przypadku próbek poddanych działaniu napięcia 300 V całkowita perforacja staje się ciągła, natomiast uszkodzenie warstw próbek poddanych działaniu napięcia 400 V ma bardziej cykliczny charakter rozwarstwiania [219]. Siły krytyczne ( $L_{c3}$ ), przy których nastąpiła całkowita perforacja warstwy MAO\_400, były o około 50% wyższe niż  $L_{c3}$  dla MAO\_300 i o 70% wyższe niż dla MAO\_200. Mimo, że MAO\_400 charakteryzuje się niższą twardością i większą porowatością w porównaniu z MAO\_200, to lepsza przyczepność może być związana m.in. z większym udziałem pierwiastków P i Ca w związku z intensywniejszym procesem utleniania. Wartości siły tarcia były tym wyższe, im bardziej chropowata była próbka. Chociaż MAO zostało uznane za skuteczną metodę poprawy przyczepności powłok do podłoża w porównaniu z innymi szeroko znanymi metodami modyfikacji powierzchni, takimi jak zol-żel [219] lub alkaliczna obróbka cieplna [220], typowe kruche zachowanie jest nadal widoczne. Na podstawie badań Zhu i in. [221], wydajność tribologiczną warstw MAO można poprawić poprzez optymalną kombinację parametrów procesu MAO, takich jak napięcie, prąd, czas utleniania lub stężenie elektrolitu. Warto również zauważyć, że wyniki uzyskiwane w testach zarysowania zależą od różnych niezależnych czynników (warunków badania, parametrów materiału, losowości pomiarów), a ich bezpośrednia porównywalność pomiędzy różnymi grupami badawczymi jest prawie niemożliwa. W związku z tym uzyskane wyniki są jedynie przybliżone i powinny być wykorzystywane głównie do celów porównań jakościowych.

Na podstawie analizy wpływu parametrów wytwarzania warstw MAO na otrzymane struktury stwierdzono, że napięcie 200 V było niewystarczające do wytworzenia ciągłej warstwy MAO na całej powierzchni, dodatkowo czas 10 min był

niewystarczający do ukończenia procesu wytwarzania warstw pod napięciem 400 V i natężeniem 32 mA. W tej sytuacji można by zastosować wyższe natężenie, 50 mA, które skutecznie przyspieszyłoby przebieg reakcji i pozwoliło ukończyć proces w czasie 10 min i uzyskać kompletną warstwę MAO.

### ***Czas procesu MAO***

W ramach badania wpływu parametrów procesu MAO na charakterystykę warstw, oprócz zmiany napięcia badano także zmienną czasu procesu, wykonując proces przez 10 i 15 min.

Analiza krzywych zależności napięcia od czasu wykazała, że skrócenie czasu z 15 do 10 min miało wpływ jedynie na przebieg procesu przy najwyższym napięciu i skutkowało przerwaniem procesu wyładowań mikrołukowych bez osiągnięcia założonego maksymalnego napięcia 400 V, co odniosło istotny skutek na charakterystykę wytworzonych warstw.

Warstwy MAO wytworzone pod napięciem 400 V w czasie 10 min posiadały pory o średnicy istotnie mniejszej niż warstwy wytworzone w dłuższym czasie. Wynika to z faktu, że wraz z upływem czasu w ukształtowanych wcześniej porach powstają mikrowyładowania spowodowane przebiciem dielektryka, które powodują zwiększanie średnicy porów. Wielu badaczy potwierdza, że wraz ze skróceniem czasu MAO zmniejsza się wielkość mikroporów, a ich liczba maleje, np. w jednym z badań [222] wykazano, że przy napięciu 290 V wydłużenie czasu z 6 do 10 min spowodowało powstanie znacznie większych porów przy zmniejszonej jednocześnie ich liczbie. Wraz ze zmianą morfologii porów, w przypadku zastosowanego najwyższego napięcia skrócenie czasu spowodowało także spadek chropowatości. Skrócenie czasu mikrowyładowań doprowadziło do powstania cieńszej warstwy przy maksymalnym napięciu 400 V. W badaniach prowadzonych przez jedną z grup badawczych przy napięciu ok. 300 V grubość warstwy przy procesie trwającym 15 min wynosiła  $3,14 \pm 0,64 \mu\text{m}$ , natomiast przy 10 min tylko  $2,12 \pm 0,25 \mu\text{m}$  [163]. Skrócenie czasu trwania procesu spowodowało także spadek wartości stosunku Ca/P. W innych badaniach [163] przy zmianie czasu z 15 na 10 min stosunek Ca/P spadł z ok 3,3 do 2,5. Skrócenie czasu spowodowało obniżenie kąta zwilżania przy napięciu 400 V, co mogło być związane ze spadkiem chropowatości. Podobne wyniki uzyskała inna grupa badawcza [162], gdzie kąt zwilżania spadał wraz z czasem trwania MAO. Warstwy wytworzone w czasie 10 min

pod napięciem 300 V charakteryzowały się niższą twardością, modułem Younga i stosunkiem H/E. Natomiast przy 200 V moduł Younga wzrósł, co mogło być spowodowane większym wpływem podłoża przy zmniejszonej grubości warstwy. Niektórzy autorzy [163] sugerowali, że czas utleniania wpływa na adhezję; jednak w tym badaniu nie zaobserwowano znaczącej różnicy.

Można zauważyć, że skrócenie procesu skutkuje zmniejszoną intensywnością wyładowania iskrowego i prowadzi do powstania warstw o mniejszej grubości i porowatości.

### ***Natężenie procesu MAO***

Analiza krzywej zależności napięcia od czasu wykazała, że przy zwiększeniu natężenia prądu z 32 do 50 mA, czas potrzebny do uzyskania napięcia końcowego 200, 300 i 400 V był około dwukrotnie krótszy przy wyższym natężeniu wskazując, że warstwa była formowana szybciej przy tych parametrach procesu. Wzrost natężenia prądu prowadził do wzrostu intensyfikacji przebiegu procesu, w szczególności można było to zauważyć w przypadku warstw wytwarzanych przy wyższym napięciu.

Zastosowanie wyższego natężenia prądu przy czasie procesu 10 min pozwoliło na ukończenie procesu i możliwość uzyskania maksymalnego napięcia 400 V, co spowodowało zwiększenie rozmiarów porów w stosunku do MAO\_32\_10\_400, poprzez wpływ większej liczby wyładowań.

Wzrost natężenia prądu skutkował także uzyskaniem warstwy o większej grubości w porównaniu do warstw wytwarzanych w tym samym czasie, ale niższym natężeniu, gdyż zwiększenie energii zwiększa szybkość tworzenia filmu, co ostatecznie przekłada się na większą grubość. Inna grupa badawcza także wykazała, że wraz ze wzrostem stężenia z 0,2 do 0,4 A/cm<sup>2</sup> grubość wzrosła od 11,4±1,4 do 19,4±2,3 μm [162]. Wzrost natężenia spowodował również wzrost chropowatości przy 400 V, do wartości niemal tej samej, jak w przypadku zastosowania niższego natężenia przy wydłużonym czasie, co ponownie wskazuje na to, że zwiększając natężenie prądu można skrócić czas procesu. Zmiana natężenia przy niższych napięciach spowodowała wzrost stosunku Ca/P, natomiast przy 400 V jego spadek, co było spowodowane zmniejszeniem ilości fosforu implementowanego w warstwach wytwarzanych przy wyższym napięciu. Wzrost natężenia spowodował wzrost kąta zwilżania jedynie przy 200 V w stosunku do warstw wykonywanych w tym samym czasie, ale przy niższym natężeniu, co mogło

być związane z powstawaniem większej liczby mniejszych porów niż w przypadku warstw wytwarzanych przy natężeniu 32 mA. Ponadto zwiększanie wartości natężenia prądu z 32 do 50 mA doprowadziło do prawie dwukrotnego wzrostu twardości warstwy wytworzonej przy napięciu 300 V w porównaniu z próbkami poddanyymi obróbce przy 32 mA, jak też do wzrostu modułu Younga.

Do kolejnych badań dotyczących biofunkcjonalizacji warstw zastosowano natężenie prądu równe 83 mA, co doprowadziło do znacznego wzrostu właściwości nanomechanicznych w stosunku do próbek wytwarzanych w elektrolicie bazowym z natężeniem prądu 32 i 50 mA. O ile zmiana natężenia prądu z 32 do 50 mA nie miała istotnego wpływu na siłę adhezji warstwy do podłoża, to próbki wytworzone przy natężeniu 83 mA charakteryzowały się znaczną poprawą adhezji. Nie zaobserwowano odwarstwienia przy maksymalnie zadanej sile 400 mN. Choć w badaniach dotyczących wpływu zmiany parametrów na właściwości warstw wytworzonych w elektrolicie bazowym wyłoniła się zależność poprawy siły adhezji wraz ze spadkiem twardości, to porównując to do warstw wytworzonych z zastosowaniem wyższego natężenia prądu 83 mA można zauważyć, że warstwy te charakteryzowały się wyższymi wartościami twardości, uzyskując przy tym większą odporność na zarysowanie. Mogło to być związane z uzyskanym wyższym stosunkiem H/E, co przez niektórych badaczy uważane jest za bardziej odpowiedni parametr do przewidywania odporności powłoki na zużycie, ponieważ ten parametr jest miarą odkształcenia sprężystego do zerwania i sprężystości powłok, jest silnie skorelowany z rozpraszaniem energii w kontakcie mechanicznym [223].

Choć próbki wytworzone w warunkach wyższego natężenia prądu wykazały wyższy moduł Younga w porównaniu z tymi wytworzonymi przy natężeniach 32 i 50 mA, co z implantacyjnego punktu widzenia może być niekorzystne, to znaczna poprawa siły adhezji warstwy do podłoża, a tym samym zwiększenie prawdopodobieństwa nieuszkodzenia tej warstwy w trakcie samej implantacji lub na skutek mikroruchów tuż po implantacji, może okazać się priorytetowe w celach poprawy skuteczności implantacyjnej.



## 10.2. Biofunkcjonalizacja warstw MAO

### 10.2.1. Wpływ bioaktywnych dodatków na odpowiedź komórkową warstw MAO

Do elektrolitu bazowego dodano azotan srebra lub azotan galu w celu określenia wpływu poszczególnych dodatków, srebra lub galu na biokompatybilność i właściwości antybakteryjne warstw.

Uzyskane wyniki wykazały, że niemodyfikowany stop Ti-13Zr-13Nb, dzięki swojej zdolności do samoposycacji korzystnie wpłynął na żywotność komórek i po 72 h istotnie poprawił proliferację w stosunku do kontroli na dołku. Wraz ze wzrostem zawartości srebra w warstwie, proliferacja komórek malała, jednak nawet przy najwyższym stężeniu 6 mM wartość ta wynosiła ponad 70%, co zgodnie z literaturą kwalifikuje się do materiałów niecytotoksycznych. w przypadku zastosowania galu, uzyskane wyniki potwierdziły wybitną zdolność galu do promowania osteointegracji. w pierwszej dobie proliferacja komórek wynosiła nawet 180%, a po 3 dobach utrzymywała się na poziomie ponad 100%.

W wynikach nie wykazano jednoznacznego wpływu napięcia na odpowiedź komórkową.

Próbki wytworzone w elektrolicie bazowym i w elektrolicie zawierającym najniższe stężenie srebra 0,3 mM wykazywały się wzmożoną proliferacją komórek po 24 h inkubacji, zaś ich żywotność wynosiła ponad 100% w stosunku do niemodyfikowanej kontroli. Oznacza to, że warstwa zawierająca wapń i fosfor promuje osteointegrację. Porównując te dwie grupy próbek i zastosowane napięcie MAO można zauważyć, że próbki wytworzone przy 400 V wykazywały się inhibicją proliferacji w stosunku do 300 V. Zgodnie z literaturą, osteoblasty hamują swój rozwój, jeśli powierzchnia jest zbyt chropowata, na tej podstawie można przypuszczać, że kluczową rolę do przyłączenia komórek odgrywał tu parametr chropowatości (chropowatość  $S_a$  warstw ponad trzykrotnie niższa przy napięciu 300 V niż przy 400 V).

Dodatek 0,3 mM srebra spowodował istotną poprawę żywotności komórek (210%) w porównaniu do Kontroli, ale również w porównaniu do warstw wytworzonych w elektrolicie bazowym. Biorąc pod uwagę brak istotnych różnic w rozmiarze porów i składzie chemicznym pierwiastków innych niż srebro można przypuszczać, że dodatek srebra w niskim stężeniu może korzystnie wpływać na promowanie osteointegracji.

Próbki MAO\_300\_03Ag charakteryzowały się niższym kątem zwilżania od MAO\_300, co mogło również wpływać na poprawę odpowiedzi komórkowej.

Po 72 h inkubacji we wszystkich przypadkach nastąpiła istotna redukcja proliferacji, a żywotność komórek była zbliżona, bez względu na zastosowane napięcie wytworzenia i bez względu na obecność w warstwie srebra lub jego brak, co może oznaczać, że przy wzmożonym (ponad 100%) namnażaniu się komórek w pierwszej dobie, dochodziło do ich nadmiernego stłoczenia, apoptozy ze względu na wystąpienie stresu oksydacyjnego związanego z niewystarczającą ilością miejsca oraz braku dostępu do substancji pozwalających na dalszy rozwój (tlenu, pożywki). Tym bardziej, że im większa żywotność wystąpiła po 24 h, tym większy spadek proliferacji zaobserwowano po 3 dniach.

W badaniach prowadzonych przez inną grupę badawczą w tym samym elektrolicie bazowym z dodatkiem azotanu srebra [137] nie występował problem spadku liczebności komórek po 3 dniach hodowli w stosunku do 1 dnia, ale w tych badaniach wysiano komórki w przybliżonej początkowej gęstości 10 000 komórek/cm<sup>2</sup>, natomiast w niniejszej pracy, gęstość początkowa wynosiła 400 000 komórek/cm<sup>2</sup>. Może to oznaczać, że za wstrzymanie proliferacji odpowiedzialny był bardziej wpływ czynników zewnętrznych na etapie projektowania eksperymentu, np. wyjściowej liczby komórek, niż samej modyfikacji powierzchni.

Wraz ze wzrostem zawartości srebra w elektrolicie istotnie zmieniła się odpowiedź komórkowa. W warstwach wytworzonych w 0,3 mM azotanie srebra po 24 h uwalniało się 0,56-0,70 mg/dm<sup>3</sup> jonów srebra, w zależności od przyłożonego napięcia, a żywotność wynosiła ok. 210% dla MAO\_300\_03Ag i ok. 150% dla MAO\_400\_03Ag. Natomiast wzrost stężenia azotanu srebra do 3 mM spowodował spadek żywotności komórek o ok. 135% i 75% odpowiednio dla MAO\_300\_3Ag i MAO\_400\_3Ag w porównaniu do warstw wytworzonych w 0,3 mM, co wiązało się z uwalnianiem jonów Ag w granicach 0,69-0,99 mg/dm<sup>3</sup> z próbek wytworzonych przy napięciu 300 V i 1,30-1,34 mg/dm<sup>3</sup> z próbek wytworzonych przy 400 V. Wzrost stężenia elektrolitu do 6 mM azotanu srebra i uwalniania jonów srebra 1,36 - 1,61 mg/dm<sup>3</sup> nie spowodował istotnych zmian w żywotności komórek w stosunku do warstw wytworzonych w 3 mM azotanu srebra.

Nie stwierdzono bezpośredniej korelacji pomiędzy atomową zawartością srebra w warstwie a stężeniem uwolnionych jonów, które wahały się pomiędzy 0,04 a 0,15% at. dla warstw wytworzonych w 0,3 mM azotanu srebra, 0,05 a 0,21% at. przy dodatku 3 mM azotanu srebra i 0,13 a 0,45% at. przy 6 mM azotanu srebra. Można przypuszczać, że zawartość srebra w warstwie od 0,15% at. i uwalnianie od 0,69 mg/dm<sup>3</sup> powoduje spadek żywotności komórek. Natomiast nawet najwyższa uzyskana w tym badaniu zawartość srebra 0,45% at. i uwalnianie na poziomie 1,93 mg/dm<sup>3</sup> jonów Ag nie powoduje cytotoksyczności.

Dla próbek wytworzonych w 3 i 6 mM roztworze azotanu srebra czas inkubacji 24 i 72 h nie miał istotnego wpływu na żywotność komórek. Zestawiając wyniki szybkości uwalniania jonów srebra z odpowiedzią komórkową można zauważyć, że istotny wzrost ilości uwalnianych jonów nastąpił w próbkach MAO\_400\_3Ag (po 24h: 1,33±0,02 mg/dm<sup>3</sup> w stosunku do 0,84±0,15 mg/dm<sup>3</sup> dla MAO\_300\_3Ag), podczas gdy uwalnianie srebra z próbek MAO\_300\_3Ag w pierwszych 3 dniach było na poziomie zbliżonym do dynamiki uwalniania z próbek powstałych w elektrolicie o mniejszej zawartości srebra (0,3 mM). Mimo tego żywotność komórek spadła niemal dwukrotnie na próbkach MAO\_300\_3Ag w stosunku do MAO\_400\_03Ag, choć wyjaśnienie tego efektu nie jest dziś możliwe.

Przy braku srebra lub jego niższej zawartości istniała dodatnia korelacja między proliferacją komórek a kątem zwilżania, a mianowicie powierzchnie o kącie zwilżania w granicach 15°-25° były bardziej preferencyjne, niż te, u których kąt zwilżania był niższy od 10°.

Można zauważyć, że po 72 h inkubacji wszystkie grupy próbek wytworzonych w elektrolicie bazowym i w elektrolicie z dodatkiem srebra miały zbliżony stopień proliferacji.

Warto zaznaczyć, że we wszystkich przypadkach próbek zawierających srebro, żywotność komórek nie spadła poniżej 70%, co zgodnie z danymi literaturowymi oznacza brak cytotoksyczności wytworzonych warstw i jest zgodne z minimum wymaganym przez ISO 10993-5:2009.

Analiza żywotności komórek w warstwach zawierających gal ukazała, że nawet przy niskiej zawartości galu w warstwie i niskim stężeniu uwolnionych jonów: 0,19±0,06% at. i 0,06 mg/dm<sup>3</sup> dla MAO\_300\_03Ga oraz 0,16±0,05% at. i 0,16±0,01

mg/dm<sup>3</sup> dla MAO\_400\_03Ga, wpływ galu na odpowiedź komórkową jest spektakularny, a proliferacja po 24 h inkubacji wynosi nawet 180% w stosunku do Kontroli.

Pomimo spadku żywotności komórek po 72 h inkubacji, wciąż oscyluje ona w granicach 100%. po 3 dobach inkubacji, średnia żywotność na warstwach zawierających gal była istotnie wyższa od tej reprezentowanej przez próbki zawierające srebro.

Brak istotnych różnic pomiędzy grupami próbek w żywotności komórek po 24 h może oznaczać szeroki zakres stężenia jonów galu znacznie poprawiających proliferację komórek, który mieści się co najmniej w granicach 0,06-7,62 mg/dm<sup>3</sup> uwolnionych jonów galu i zawartości w warstwie 0,11-0,56% at.

Badania uwalniania substancji aktywnej do roztworu po 1, 3 i 7 dniach inkubacji, wykazały, że szybkość uwalniania była dodatnio skorelowana ze stężeniem azotanu srebra lub galu i z zastosowanym napięciem. W większości przypadków po 1 i 3 dniach uwalniała się podobna ilość danych jonów, a po 7 dniach obserwowano istotny wzrost stężenia uwolnionej substancji. Zawartość uwolnionego srebra w roztworze po inkubacji wahała się między 0,55 a 1,93 mg/dm<sup>3</sup>, natomiast galu pomiędzy 0,064 a 7,62 mg/dm<sup>3</sup>.

W przyszłości należałoby rozważyć przeprowadzenie badań komórkowych również po 7 dniach, gdyż po tym czasie zaobserwowano istotny wzrost uwalniania jonów aktywnych. Jednak należałoby najprawdopodobniej zmienić metodologię badań, aby ograniczyć efekt stłoczenia komórek, np. poprzez obniżenie początkowej liczby inkubowanych komórek na powierzchni.

Porównując otrzymane wyniki z innymi grupami badawczymi można zauważyć znaczne różnice w ilościach włączonych bioaktywnych dodatków do warstw, ilości uwolnionych jonów i wpływu na zachowanie odpowiedzi komórkowej i bakteryjnej.

Jedna z grup badawczych [142] do elektrolitu bazowego składającego się z 0,15 M CA i 0,05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dodała 0,25 mM AgNO<sub>3</sub>, proces MAO przeprowadzono pod napięciem 280 -320 V w czasie 6 min, otrzymując pory o średnim rozmiarze 1,5 μm, zawartości srebra 0,13% at., występowaniu samej fazy Ti i anatazu bez rutylu, kąt zwilżania wynosił 46,2°. W badaniu autorzy uzyskali wyrzutowe uwalnianie jonów srebra w pierwszych dwóch dniach, którego stężenie wynosiło 0,013 mg/dm<sup>3</sup>, a kolejno spadało i ustabilizowało się 8 dnia uwalniając jony srebra do dnia 18 w ilości ok. 0,003-

0,004 mg/dm<sup>3</sup>. W tych badaniach autorzy nie stwierdzili cytotoksyczności warstw. Porównując badania można zauważyć, że mimo zastosowanej zbliżonej zawartości azotanu srebra w elektrolicie, w badaniach opracowywanych w ramach rozprawy doktorskiej, ilość uwolnionych jonów srebra po 3 dniach wynosiła ok 0,69 mg/dm<sup>3</sup>, natomiast w badaniach przedstawionych przez Zhang ponad rząd wielkości mniej: 0,011 mg/dm<sup>3</sup>, chociaż zawartość srebra w warstwie była zbliżona (0,15% at.) do tej przedstawionej w badaniach (0,13% at.). Tak duża różnica w ilości uwalnianych jonów mogła być związana z innym rozłożeniem cząstek srebra w warstwie. Autorzy nie przedstawili rozkładu pierwiastków w przekroju warstw MAO, dlatego niemożliwe było porównanie wpływu pierwiastków uwalnianych z głębszych części warstw.

W innych badaniach, Shimabukro i in. [137] przedstawili optymalne stężenie srebra do realizacji sprzecznych biofunkcji: jego właściwości antybakteryjnych i kompatybilności z komórkami osteogennymi. Elektrolit bazowy był taki sam jak w przypadku niniejszej pracy, natomiast badania prowadzono w zakresie dodatku azotanu srebra w stężeniach 0-10 mM. Gęstość prądu wynosiła 251 A/m<sup>2</sup>, a proces MAO trwał 10 min. Morfologia nieznacznie zmieniała się w zakresie 0-5 mM AgNO<sub>3</sub>, natomiast stężenie azotanu srebra równe 10 mM okazało się za duże do wytworzenia warstwy MAO. Autorzy przedstawili, że ilość uwalnianych jonów srebra rosła w czasie zanurzenia. Ponadto, ilość włączonych jonów Ag do warstwy wzrastała wraz ze wzrostem stężenia jonów Ag w elektrolicie. Potwierdzono, że uwalnianie jonów Ag trwało co najmniej 28 dni, co było maksymalnym okresem eksperymentalnym zastosowanym w tym badaniu. Szybkości uwalniania w początkowej fazie były istotnie niższe niż w późniejszych okresach. Warto zwrócić uwagę, że po 7 dniach inkubacji jedynie jony uwolnione z warstw wytworzonych w 2,5 mM Ag były możliwe do wykrycia (ich zawartość była ponad limit detekcji), natomiast jony uwalniające się z warstw 0,05 mM Ag nie były wykrywane nawet po 28 dniach inkubacji. Autorzy jednak użyli innej techniki do wykrywania jonów w roztworze (ICP-MS), co również może mieć znaczenie w porównaniu zawartości uwolnionych jonów. Shimabukro i in. zauważyli, że żywotność komórek warstw MAO wytwarzanych w elektrolicie bazowym bez dodatku srebra, jak i z dodatkiem najniższej zawartości srebra (0,05 mM) była taka sama, jak obserwowana na próbce kontrolnej, podczas gdy w badaniach przedstawionych w ramach rozprawy doktorskiej, sam elektrolit bazowy wykazywał się podwyższonym stopniem proliferacji komórek w stosunku do Kontroli. Istotny spadek liczebności

komórek był obserwowany przy 2,5mM Ag (przy zawartości srebra w warstwie ok 3,2% at.), co jest spójne z wynikami badań przedstawionymi w rozprawie doktorskiej. Liczba komórek na pozostałych próbkach traktowanych MAO z azotanem srebra w stężeniach 0,05-0,5 mM (przy zawartości ok 0,4 - 1,4% at. i uwalnianiu w granicach  $\leq 0,04$  mg/dm<sup>3</sup>) była prawie taka sama jak na nietraktowanym Ti bez żadnej różnicy istotnej statystycznie.

Sedelnikova i in. otrzymali zbliżone wyniki badań, w których porównywano dodatek 1,7 i 5 mM AgNO<sub>3</sub> do elektrolitu wapniowo fosforanowego. Wykryta zawartość srebra w warstwach była znacznie niższa niż w badaniach przedstawionych przez Shimabukuro i bardziej zbliżona do wartości uzyskanych w badaniach w ramach rozprawy doktorskiej i wynosiła od 0,2 do 0,8% at. W tych badaniach wykazano przeżywalność komórek na poziomie 95,4-96,8% oraz istotne działanie bakteriostatyczne na obu typach podłoża [162].

Z kolei w innych badaniach, Song i wsp. wykazali cytotoksyczność warstw wytworzonych przy napięciu 250-450 V w elektrolicie zawierającym 4 mM AgNO<sub>3</sub>, mimo że zawartość Ag wynosiła jedynie 0,21–0,45% mas. Podczas gdy w badaniach przedstawionych w ramach rozprawy doktorskiej nawet maksymalna zawartość srebra (1,80% mas. dla MAO\_400\_6Ag), nie wykazywała cytotoksyczności, a wręcz proliferacja komórek była bliska 100%. Ponadto w badaniach Song i wsp. nie wykryto Ag w warstwach utlenionych w roztworach elektrolitów zawierających 0,06 i 0,03 mM AgNO<sub>3</sub>, co było spowodowane najprawdopodobniej zawartością poniżej limitu wykrywalności EDS (0,1% mas). Badania komórkowe przeprowadzone na próbkach wytworzonych w elektrolicie zawierającym 0,06 mM azotanu srebra wykazały brak cytotoksyczności z liczbą komórek zbliżoną do liczby otrzymanej na warstwach nie zawierających dodatku srebra [141].

W literaturze przedmiotu nie ma wielu badań przedstawiających próbę włączenia galu do warstw MAO przy wykorzystaniu azotanu galu.

Zhong i inni wykazali, że dodatek azotanu galu w stężeniu 8-20 mM do elektrolitu krzemianowo fosforanowego pozwala uzyskać warstwy z zawartością galu między 1,03 a 4,90 % at. W porównaniu do badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej zawartości galu w elektrolicie zawierającym 0,3 i 3 mM azotanu srebra wynosiły odpowiednio 0,13-0,21% at. i 0,30-0,56% at. Jednak badania przedstawione przez

Zhong'a i innych skupiały się wokół wpływu galu na mechanizm budowania warstw MAO, nie obejmując badań wpływu na właściwości biologiczne [159].

Z kolei w badaniach innej grupy [160], [161] przeprowadzono próbę oceny wpływu azotanu galu na właściwości biologiczne warstw MAO, porównując przy tym skuteczność zastosowania galu i srebra w postaci azotanów. Do elektrolitu wapniowo-fosforanowo-krzemianowego dodano azotan galu/srebra w stężeniu 4 mM, wraz ze związkami chelatującymi, cysteiną (Cis) lub kwasem szczawiowym (Oss). Nie ma możliwości porównania wpływu zastosowanego stężenia na zawartość danych jonów w warstwie, gdyż autorzy nie przedstawili takich wyników, ale porównując ilość uwolnionych jonów można było zauważyć, że z warstw wytworzonych w roztworze zawierającym 4 mM azotanu srebra z cysteiną, srebro uwalniało się tylko przez 24 h, a jego stężenie wynosiło  $0,023 \text{ mg/dm}^3/\text{cm}^2$ , natomiast z warstw wytworzonych z azotanu galu z dodatkiem cysteiny, galu uwalniało się jeszcze mniej niż srebra, bo ok.  $0,001 \text{ mg/dm}^3/\text{cm}^2$ . Dopiero dodatek kwasu szczawiowego spowodował istotny wzrost uwalniania galu, który po 24 h wynosił ok.  $0,062 \text{ mg/dm}^3/\text{cm}^2$ . Badania komórkowe wykazały żywotność komórek dla wszystkich próbek na poziomie ok. 70% po 24 h, po czym po 72 h ta liczba wzrosła do ok. 97%. Porównując badania z wynikami uzyskanymi w ramach rozprawy doktorskiej można zauważyć, że podobną ilość uwolnionego galu uzyskano stosując 10-krotnie mniej stężony roztwór azotanu galu (0,3 mM), natomiast przy 3 mM azotanu galu po 24 h uwalniało się między 0,23 a  $6,48 \text{ mg/dm}^3$  jonów galu z warstw wytworzonych odpowiednio przy 300 i 400 V. Wyniki wykazały ok. 180% żywotność w stosunku do Kontroli, co może wskazywać na to, że wyższe wartości uwolnionych jonów poprawiają proliferację komórek.

#### ***10.2.2. Wpływ bioaktywnych dodatków na odpowiedź bakteryjną wytworzonych warstw MAO***

Badania bakteryjne zostały przeprowadzone wieloaspektowo w celu lepszego zrozumienia aktywności i mechanizmu bakterii w kontakcie z wytworzonymi warstwami. Po pierwsze, do badań użyto dwa szczepy bakterii, *S. aureus* i *E. coli* w celu sprawdzenia wpływu modyfikacji powierzchni na bakterie z grupy gram-ujemnych i gram-dodatnich. Po drugie, badania zostały przeprowadzone pod kątem sprawdzenia wpływu powierzchni na bakterie, które mogą funkcjonować w dwóch stadiach, w postaci przylegającej (adherentnej) tworzącej biofilm i co równie ważne, w postaci planktonicznej, wolno pływającej, która może stanowić zagrożenie pojawienia się

reinfekcji. Po trzecie, sprawdzono zachowanie się bakterii w dwóch odcinkach czasowych, po 4 i 24 h inkubacji. Aż w końcu wyniki zostały rozpatrzone pod kątem rodzaju aktywności danych bakterii w kontakcie z powierzchniami i sklasyfikowane pod kątem aktywności biobójczej powodującej śmierć mikroorganizmów i aktywności bakteriostatycznej prowadzącej do zahamowania wzrostu mikroorganizmów.

W tym celu porównano ze sobą próbki wytworzone przy tym samym stężeniu dwóch różnych elektrolitów (azotanu galu i azotanu srebra) pod dwoma różnymi napięciami: 300 i 400 V. Wybrano najwyższe z badanych stężeń, przy których udało się wytworzyć warstwę wykazującą brak cytotoksyczności (3 mM). W większości badań przedstawionych w literaturze ocenę skuteczności antybakteryjnej prowadzi się po 24 h inkubacji, co jest dyktowane wymogami norm, jednak z uwagi na istotność walki z bakteriami w początkowym etapie adhezji ze względu na brak w tym czasie wytworzonego biofilmu, który sprzyja dalszemu rozwojowi infekcji, ocenę odpowiedzi bakteryjnej przeprowadzono także w początkowym okresie adhezji bakterii - po 4 h inkubacji.

Zauważono, że próbki wytworzone w elektrolicie bazowym początkowo sprzyjają adhezji bakterii *S. aureus*, nawet w większym stopniu niż próbki referencyjne. Podobne efekty zauważyła inna grupa badawcza wykonująca MAO w tym samym elektrolicie bazowym złożonym z CA i GP [137]. Najwyższą aktywność bakteriobójczą wykazały powierzchnie MAO\_400\_3Ag, które uzyskały >99,9% redukcji inokulum względem dwóch typów bakterii, zarówno w postaci planktonicznej, jak i adherentnej, w czasie inkubacji 4 i 24 h. Można zauważyć, że w tym przypadku działanie na bakterie planktoniczne było nieco wyższe niż na działanie bakterii adherentnych, co można łączyć z wysokim stężeniem uwalnianych jonów, po 24 h równym  $1,33 \pm 0,02 \text{ mg/dm}^3$ . Dodatkowo w literaturze przedmiotu podaje się, że superhydrofilowe powierzchnie znacząco poprawiają antybakteryjne właściwości powłok, a w niniejszym badaniu próbki MAO\_400\_3Ag charakteryzowały się najniższym kątem zwilżania  $1,92 \pm 0,86^\circ$ . Natomiast nie potwierdzono wpływu chropowatości na zachowanie bakterii.

Podobne wyniki uzyskała inna grupa badawcza, która stwierdziła, że antybakteryjność próbek MAO wytworzonych w elektrolicie zawierającym 4 mM azotanu srebra (0,21–0,45% mas. Ag) wynosiła >99,9% wobec planktonicznej formy *S. aureus* [141]. Muhaffel i wsp. wykazali, że przy dodatku 2 mM azotanu srebra



do roztworu GP i CA przy zawartości srebra w warstwie  $2,1\pm 0,6\%$  mas. i szybkości uwalniania jonów  $3,83 \text{ mg/dm}^3/\text{dzień}$  (czyli ok. trzykrotnie więcej niż w badaniach prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej), aktywność antybakteryjna wynosiła 99,2% wobec bakterii *E. coli* [144].

Warstwy wytworzone w elektrolicie zawierającym takie samo stężenie azotanu srebra, ale przy zastosowanym niższym napięciu procesu (MAO\_300\_3Ag) wykazały bakteriobójczość jedynie wobec adherentnych bakterii *E. coli* po 4 h inkubacji, mimo stwierdzonej zbliżonej zawartości srebra w badaniu EDS w stosunku do MAO\_400\_3Ag (0,05-0,21% at.). W pozostałych przypadkach warstw MAO\_300\_3Ag zaobserwowano jedynie aktywność bakteriostatyczną po 4 h inkubacji. Co ciekawe, po 24 h warstwy te wstrzymały rozwój jedynie biofilmu *S. aureus*, a w pozostałych przypadkach stwierdzono brak aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Wyniki pokazują, że brak bakteriobójczości wobec bakterii planktonicznych nawet przy wykazanej bakteriobójczości bakterii adherentnych prowadzi w dłuższym czasie do osadzenia się bakterii i ponownego powstania biofilmu. Gdy stwierdzono dobrą lub bardzo dobrą aktywność przeciwdrobnoustrojową (99-99,9%) w pierwszych godzinach inkubacji, wydłużenie czasu do 24 h inkubacji nie spowodowało istotnego wzrostu kolonii bakterii. Natomiast, gdy redukcja wzrostu drobnoustrojów po 4 h wynosiła 90-99%, dalsze wydłużenie czasu inkubacji prowadziło do ponownego namnożenia drobnoustrojów i powstania biofilmu.

Z powyższych wyników można stwierdzić, że stężenie jonów Ag uwolnionych z warstw MAO\_400\_3Ag po 24 h równe  $1,33\pm 0,02 \text{ mg/dm}^3$  było wystarczające, by uzyskać wysoką antybakteryjną skuteczność. Obniżenie napięcia do 300 V spowodowało spadek zawartości uwolnionych jonów do elektrolitu po 24 h do  $0,84\pm 0,15 \text{ mg/dm}^3$  i spadek aktywności przeciwbakteryjnej do minimum, mimo że niektóre źródła literaturowe wskazywały, że zaledwie  $0,83 \text{ mg/dm}^3$  Ag może skutecznie hamować wzrost bakterii [141].

Uzyskane wyniki skuteczności warstw MAO ze srebrem przeciw bakteriom adherentnym i planktonicznym potwierdzają mechanizm bakteriobójczy srebra oparty na uwalnianiu substancji aktywnej połączony z mechanizmem kontaktowym. Działanie bakteriobójcze srebra przypisuje się kontaktowi Ag z błoną bakteryjną, co prowadzi do destabilizacji potencjału błony plazmatycznej i obniżenia poziomu



wewnątrzkomórkowego trójfosforanu adenozy (ATP), a w efekcie do śmierci komórki bakterii [142].

Badania wykazały, że dodatek galu nie wykazał właściwości bakteriobójczych. Choć potwierdzono ok. trzykrotnie większą zawartość galu niż srebra w warstwach wytworzonych przy tych samych parametrach, można zauważyć, że aktywność galu jest dużo niższa od srebra w kontakcie z bakteriami. Próbkę MAO\_300\_3Ga i MAO\_400\_3Ga wykazały się minimalną aktywnością biostatyczną, odpowiednio wobec biofilmu bakterii *S. aureus* po 4 h inkubacji i wobec biofilmu bakterii *E. coli* po 24 h inkubacji, co świadczy o prawdopodobnych właściwościach antybakteryjnych galu, jednak ilość uwolnionych jonów była niewystarczająca do ich istotnej redukcji. Można wręcz zauważyć, że w towarzystwie galu wzrost bakterii planktonicznych *S. aureus* był promowany w pierwszych 4 h inkubacji.

Cochis i in. przeprowadzili próbę oceny wpływu azotanu galu na właściwości biologiczne warstw MAO, porównując przy tym skuteczność zastosowania galu i srebra. Do elektrolitu wapniowo-fosforanowo-krzemianowego dodano azotan galu/srebra w stężeniu 4 mM, wraz ze związkami chelatującymi - cysteiną (Ciss) lub kwasem szczawiowym (Oss). Wyniki bakteryjne wykazały redukcję o ok. 45% (AgCiss), 53% (GaCiss) i 72% (GaOss), wobec wysoce opornych bakterii (*a. baumannii*). Autorzy nie przeprowadzali badań zawartości pierwiastków w warstwie, ale obserwacje zdjęć SEM ujawniły więcej widocznych cząstek galu i srebra niż na obrazach otrzymanych w ramach rozprawy doktorskiej. Najprawdopodobniej użycie związku chelatującego zapobiegło wytrącaniu się soli srebra i galu w roztworze elektrolitycznym, poprawiając w ten sposób ich migrację i włączanie do anody [160], [161].

Warto zaznaczyć, że aktywność galu może wynikać z zastosowanych parametrów MAO, stężenia i/lub postaci źródła galu, jak również z metodologii wykonywania badań. W przyszłości można także rozważyć przeprowadzenie badań bakteryjnych w pożywce bakteryjnej zawierającej chelat żelaza, co potencjalnie mogłoby wpłynąć na wyższą inhibicję w porównaniu z testami prowadzonymi w standardowej pożywce.

Z wykresów liczby kolonii bakterii widać, że początkowy wzrost bakterii *S. aureus* był wolniejszy przez pierwsze 4 h w stosunku do bakterii *E. coli*, po czym dynamika znacząco wrosła, aż ostatecznie po 24 h przewyższyła liczebność bakterii *E. coli*, zarówno wśród bakterii adherentnych, jak i planktonicznych. Shimabukuro i in.

również przedstawili większy hamujący wpływ warstw ze srebrem na szczep bakteryjny *E. coli* niż *S. aureus* po 24h inkubacji. W przypadku *E. coli* 100% antybakteryjności wykazywały próbki wytworzone w elektrolicie zawierającym 0,05 mM  $\text{AgNO}_3$ , natomiast w przypadku *S. aureus* przy stężeniu 0,5 mM antybakteryjność spadła do 90%, a dopiero przy 2,5 mM osiągnięto 100% skuteczności [137].

Wyniki EDS pokazują zbliżone zawartości srebra w warstwach otrzymanych w elektrolicie zawierającym 3 mM azotanu srebra bez względu na zastosowane napięcie, jednak ilość uwolnionych z warstw z dodatkiem jonów srebra po 24 h różni się istotnie, dlatego można wnioskować, że działanie bakterii nie jest w tym przypadku zależne od powierzchniowej zawartości Ag wykazanej w ramach badania EDS. Tym bardziej, że część bakterii prawdopodobnie wniknęła do wnętrza powierzchni warstwy tlenku przez pory i były one w rzeczywistości narażone na znacznie wyższe stężenie jonów Ag, niż zmierzone za pomocą analizy EDS. Uzyskane wyniki są spójne z wynikami odpowiedzi komórkowej i potwierdzają, że odpowiedź biologiczna nie jest skorelowana z otrzymanymi wynikami składu chemicznego EDS.

Podobną tendencję zauważono w [143], gdzie w elektrolicie CA z GP z dodatkiem 0,5 i 2,5 mM azotanu srebra, uzyskano bardzo niską zawartość srebra w warstwie (ok. 0,01 % mas.), a mimo to warstwy wykazały 100% właściwości antybakteryjnych po 24 h, podczas gdy warstwy MAO wytworzone w elektrolicie zawierającym 0; 0,005 i 0,05 mM Ag wykazywały wzrost liczby bakterii w stosunku do stopu tytanu bez warstwy MAO. Również w badaniach prowadzonych przez inną grupę badawczą wykazano, że próbki wytworzone w 0,06 mM  $\text{AgNO}_3$  wykazywały aktywność przeciwbakteryjną na poziomie >99,8%, mimo że Ag w warstwie było poniżej wykrywalności techniką EDS [141].

Można zauważyć, że w większości przypadków po 24 h nastąpił istotny wzrost liczby bakterii w stosunku do czterogodzinnej inkubacji. Może to wynikać z krzywej wzrostu bakterii, opisującej dynamikę wzrostu bakterii w systemie zamkniętym [224], [225]. Początkowa faza opóźnienia replikacji wynikająca z przystosowania się do nowego środowiska przechodzi w fazę logarytmiczną, w której bakterie osiągają maksymalne tempo wzrostu. Następnie zachodzi faza stacjonarna, w której liczba komórek podlegających podziałowi wydaje się równa liczbie komórek martwych z powodu wyczerpania składników odżywczych, prowadząca do ostatniej fazy: martwej,

w której bakterie tracą zdolność do podziału, a liczba martwych komórek przewyższa liczbę żywych komórek. W celu sprawdzenia, czy badane próbki po 24 h znalazły się w fazie logarytmicznej i czy nastąpiłby późniejszy spadek, należałoby wydłużyć czas inkubacji o kolejny punkt czasowy.

### 10.3. Wpływ addytywnego wytwarzania próbek referencyjnych na charakterystykę otrzymanych warstw MAO

W związku z rozwojem implantologii skierowanej wokół personalizacji rozwiązań polegających na drukowaniu implantów metodami addytywnymi, powstało pytanie, czy metody modyfikacji tych elementów w celu poprawy ich biokompatybilności będą się sprawdzały tak samo, jak w przypadku implantów wykonywanych metodami tradycyjnymi, czy jeśli zastosowane zostaną te same metody modyfikacji, to czy materiał zachowa się podobnie? Czy można zastosować te same parametry danej modyfikacji, czy może należy je dostosować do nowych rozwiązań? W literaturze przedmiotu nie ma wielu badań poruszających te zagadnienia, w szczególności nie ma badań, które omawiają wpływ wytwarzania materiału bazowego metodą SLM na właściwości warstwy po procesie MAO.

Podczas procesu SLM proszek metalowy jest topiony szybko poruszając się wiązką lasera o wysokiej energii. Wysoka temperatura procesu, a następnie wysoka szybkość chłodzenia powodują pojawienie się nierównowagowych procesów metalurgicznych, które prowadzą do znacznych różnic we właściwościach materiałów wytworzonych metodą SLM.

W celu odpowiedzi na powyższe pytania porównano komercyjnie dostępny pręt, w formie, która najczęściej wykorzystywana jest na implanty, z materiałem wytworzonym metodą SLM. W obu przypadkach przeprowadzono utlenianie mikrołukowe włączając do elektrolitu bazowego najwyższe stężenie azotanu srebra licząc, że przy zintensyfikowanym procesie elektrochemicznym, ewentualne różnice będą lepiej zauważalne.

Do badania wpływu metody wytwarzania próbek kontrolnych na charakterystykę zmodyfikowanej warstwy wierzchniej zastosowano walcowany na gorąco pręt ze stopu Ti-13Zr-13Nb dostarczony przez dostawcę komercyjnego. Zgodnie z literaturą, temperatura przemiany  $\beta$  tego stopu wynosi  $735^{\circ}\text{C}$  [226].

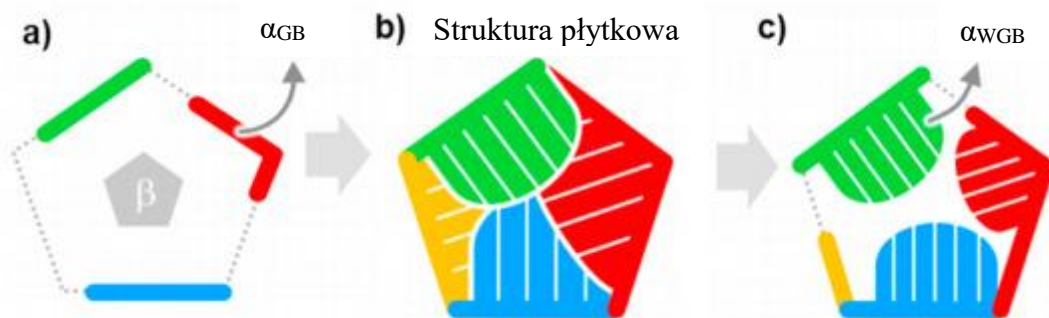
Już wstępne obserwacje makroskopowe wykazały różnice między otrzymanymi próbkami po szlifowaniu. Próbki uzyskane z pręta były względnie gładkie, podczas gdy te wytworzone metodą SLM posiadały mikroporowatości i wykazywały się warstwowością wynikającą z charakterystyki spiekania proszków i budowania elementu warstwa po warstwie. Trawienie próbek ujawniło dalsze różnice występujące

w mikrostrukturze. Przemiany fazowe i mikrostruktura zależą od takich czynników, jak skład chemiczny materiału, odkształcenie, czas i temperatura obróbki cieplnej [68].

Mikrostruktura stopu Ti-13Zr-13Nb próbki referencyjnej w postaci pręta charakteryzowała się drobną iglastą morfologią martenzytyczną składającą się z mieszaniny faz  $\alpha$ ,  $\alpha'$  i  $\beta$ . Obserwacje były zgodne z tymi przeprowadzonymi przez inną grupę badawczą, która analizowała mikrostrukturę stopu Ti-13Zr-13Nb, pochodzącego od tego samego producenta. Wykazano tu także istnienie dodatkowej fazy  $\alpha''$ , ale jej identyfikacja wymagała wykonania dodatkowych badań TEM, do których w czasie przygotowywania rozprawy doktorskiej nie miano dostępu [227]. Również podobną mikrostrukturę stopu Ti-13Nb-13Zr walcowanego na gorąco z występowaniem faz  $\alpha$ ,  $\alpha'$  i  $\beta$  zaobserwowali Geetha i in [228]. W tych badaniach faza  $\alpha''$  pojawiła się tylko w stopach o wyższej zawartości Nb jako pierwiastka  $\beta$  stabilizującego. W literaturze przedstawiono, że za pomocą XRD nie można było wykryć fazy  $\alpha$  w stopie zawierającym 6% Zr. Dalszy wzrost zawartości Zr doprowadził również do zahamowania fazy martenzytu  $\alpha''$ . Żadna faza  $\alpha''$  nie mogła zostać wykryta przez XRD w stopie zawierającym 12% Zr.

Przemiana krystalograficzna między fazą  $\beta$  a fazą  $\alpha$  może zachodzić martenzytycznie lub wydzieleniowo w zależności od składu chemicznego stopu i szybkości stygnięcia [229]. Fazy martenzytyczne  $\alpha$  ( $\alpha'$  i  $\alpha''$ ) powstają w metastabilnym stopie tytanu  $\beta$  schłodzonym poniżej temperatury przemiany martenzytycznej. Różnica między fazami  $\alpha'$  i  $\alpha''$  wynika z ilości pierwiastków warunkujących powstanie fazy  $\beta$  w stopie. Wraz ze wzrostem ilości pierwiastka będącego promotorem fazy  $\beta$  temperatura przemiany martenzytycznej spada do niższych temperatur, a powstające fazy martenzytyczne zaczynają się przekształcać ze struktury krystalicznej  $\alpha'$  HCP do ortorombicznej struktury krystalicznej  $\alpha''$  [230]. Przy wolniejszym chłodzeniu z fazy  $\beta$  powstaje faza  $\alpha$ .

Obróbka na gorąco prowadzona w temperaturze stabilności fazy  $\beta$  prowadzi do kształtowania ziaren pierwotnej fazy  $\beta$ , a następnie płytek fazy  $\alpha$  wewnątrz fazy  $\beta$ . Otrzymana struktura składa się z trzech mikroskładników: granicy ziaren  $\alpha$  wokół ziarna wcześniejszego  $\beta$  ( $\alpha_{GB}$ ), cienkich warstw  $\beta$  oddzielających lamele  $\alpha$ , oraz kolonii  $\alpha$  o splocie blaszkowym ( $\alpha_{WGB}$ ) w ziarnie wcześniejszego  $\beta$  [189], co zostało przedstawione na rysunku 47.



Rysunek 47 Wytrącanie faz  $\alpha$ : a)  $\alpha_{GB}$ , b) Struktura płytkowa, c)  $\alpha_{WGB}$ , na podstawie: [189]

Morfologia próbek referencyjnych wykonanych metodą SLM istotnie różniła się od referencji komercyjnego pręta. Widoczne tu były przede wszystkim cechy charakterystyczne dla procesów AM, powstałe na skutek działania plamki lasera i wysokich temperatur (jeziorko topliwe, mikropory, ścieżki skanowania). Według literatury, w stopie Ti-Nb-Zr, rozwój martenzytu jest znacznie zróżnicowany w zależności od szybkości chłodzenia, na którą wpływają strategie skanowania. W niniejszej pracy elementy wytworzono z wykorzystaniem płaszczyzny xy. Gdy wiązka lasera przesuwa się do sąsiedniej ścieżki, materiał w oryginalnej ścieżce jest ponownie topiony, ponieważ wielkość jeziorka stopu jest większa niż odległość między ścieżkami, co wskazuje, że mikrostruktura odtwarza częściowe ponowne stopienie między sąsiednimi ścieżkami skanowania. W kierunku budowania elementu ponowne stopienie następuje nie tylko w warstwie powierzchniowej, ale także w warstwach uprzednio osadzonych pod nią.

Obrazy uzyskane z mikroskopu świetlnego i elektronowego są zgodne z obrazami uzyskanymi przez innych autorów [76], [188]. Widoczne ziarna kolumnowe występujące w basenach topliwych to faza  $\beta$ , która powstała wzdłuż kierunku budowania próbki. Zgodnie z literaturą przedmiotu, w przypadku metod wytwarzanych addytywnie, skanowanie wiązką lasera warstwy proszków i ponowne stopienie wierzchołka ziaren kolumnowych działa jak jądro epitaksjalnego wzrostu kolejnych ziaren [76]. Rozmiary  $\beta$  ziaren są duże. Niektóre źródła literaturowe podają, że ich długość może wynosić nawet 100  $\mu\text{m}$  [75]. Ponadto pokazuje to, że prędkości chłodzenia są wystarczająco wysokie, aby zachować fazę beta-metastabilną w temperaturze pokojowej [231].

Oprócz półeliptycznych śladów stopionego jeziorka obserwuje się również morfologie przypominające pasma, jest to widok jeziorek topliwych wytworzonych przez ścieżkę lasera wzdłuż kierunku x. Nakładanie się ścieżek lasera wynikające z większej

średnicy plamki lasera (120  $\mu\text{m}$ ) w stosunku do ustawionej odległości między punktami (20  $\mu\text{m}$ ), spowodowało, że każda stopiona ścieżka związała się z sąsiednimi ścieżkami. Kilka zestalonych stref charakteryzowało się zakrzywionymi krawędziami i zawierało typowe defekty wywołane metodą SLM i spowodowane obecnością niestopionych cząstek, porowatością i zjawiskami kulistymi (*ang. balling*) wynikającymi z niestopienia się dużych kulistych cząstek proszku, co wpływało na zmniejszenie gęstości próbki SLM [187]. Występowanie mikroporów związane jest przede wszystkim z występowaniem wysokich temperatur lokalnych i parowaniem materiału podczas topienia laserowego [75]. Niestopione proszki związane są z różną temperaturą topnienia pierwiastków stopowych Zr i Nb. Również rozmiar proszków ma znaczenie. Jeśli energia lasera jest niewystarczająca do stopienia dużych cząstek w warstwie proszku, powstają niestopione pory o nieregularnym kształcie, co określa się mianem zjawiska kulistego [232]. Podczas skanowania kierunek prowadzenia lasera został obrócony o  $90^\circ$ , co powoduje zmiany w rozpraszaniu ciepła dla tej warstwy oraz w kierunku całkowitego gradientu temperatury. Opisane zjawisko zwiększa gęstość wytworzonej próbki oraz siłę wiązania między osadzonymi warstwami.

Analiza XRD ujawnia występowanie fazy  $\alpha'$ . Niektórzy autorzy identyfikują ziarna rosnące prostopadle do granicy jeziorek topliwych właśnie jako fazę martenzytyczną [75]. Z kolei inni autorzy identyfikowali te ziarna jako niejednorodność chemiczną prawdopodobnie spowodowaną przetopieniem i ponownym krzepnięciem wcześniej osadzonej warstwy. Mikrosegregacja nie wpływa jednak na strukturę ziarna [231]. Natomiast większość badań była zgodna co do wykrycia fazy  $\alpha'$  nierównomiernie osadzonej w ziarnie  $\beta$  [188], [189], [233]. W większości przypadków faza  $\alpha'$  była bardzo niewielka (3-5 nm) i wykryta dopiero przy pomocy obrazowania TEM.

Zgodnie z diagramem fazowym Ti-Nb można założyć, że podczas procesu SLM fazy najprawdopodobniej są generowane w następujących przemianach:  $L \rightarrow L + \beta \rightarrow \beta + \alpha'$  [76]. Analiza mikrostruktury stopów Ti-13Zr-13Nb wytworzonych metodami AM jest bardziej złożona i dużo trudniejsza w analizie, zależy od historii termicznej, na którą wpływają takie parametry jak: źródło energii, moc wejściowa, prędkość skanowania, czystość stopu, a także geometria i rozmiar wytwarzanego elementu. Ta złożoność historii termicznej utrudnia scharakteryzowanie wcześniejszych ziaren fazy  $\beta$ .



Obserwacje istniejących faz są wstępne i należy je potraktować jak zaproszenie do bardziej dogłębnej analizy. W celu lepszego zdefiniowania mikrostruktury należałoby przeprowadzić dodatkowe, bardziej precyzyjne badania. Transmisyjny mikroskop elektronowy (TEM) jest zwykle używany do scharakteryzowania morfologii fazy martenzytycznej. Natomiast analizę dyfrakcji elektronów (SAED), przeprowadza się w celu zbadania zależności orientacji i mechanizmu transformacji poszczególnych faz. XPS może być wykorzystywane do identyfikacji składu fazowego lub EBSD do określenia tekstury.

Różnice w mikrostrukturze znalazły swoje odzwierciedlenie we właściwościach badanych próbek referencyjnych. Wykazano, że twardości HV próbki referencyjnej w postaci pręta były niemal dwukrotnie niższe od twardości próbek referencyjnych wytworzonych metodą SLM. Prawdopodobną przyczyną był efekt walcowania pręta na gorąco, w której podczas rekrytalizacji uzyskano zmniejszenie naprężeń wewnętrznych i defektów struktury oraz obniżenie twardości. Również struktury, które posiadają więcej fazy  $\beta$ , charakteryzują się wyższą twardością [230].

Kąt zwilżania próbek referencyjnych w postaci pręta był niemal dwukrotnie niższy od próbki referencyjnej SLM, co mogło być związane z większą chropowatością próbek SLM wynikającą z warstwowej struktury powstałej na skutek procesu SLM.

Chociaż metoda wytwarzania materiału kontrolnego nie miała istotnego wpływu na grubość i chropowatość warstw MAO, to warstwy wytworzone na materiale SLM posiadały pory o niższej średniej średnicy z większą liczbą nanometrycznych porów ( $<1 \mu\text{m}$ ), w porównaniu do warstw MAO wytworzonych na komercyjnym pręcie. Obserwacja ta jest zgodna z innymi badaniami [163]. Powstanie nanometrycznych porów może być związane z mniejszym rozmiarem ziaren w materiale wytworzonym metodą SLM, co może zapewnić znacznie więcej mniejszych kanałów wyladowczych dla procesu MAO. Wydaje się, że jest to istotna kwestia wpływająca na dalszą charakterystykę warstw.

Badanie mikrostrukturalne wykazało, że we wszystkich próbkach występowały znaczne ilości fazy  $\beta$ , a odkrycie to było zgodne z identyfikacją faz metodą XRD.

Analiza składu chemicznego stopów ujawniła, że zawartość Zr w obydwu przypadkach jest niższa od wartości deklarowanych przez producentów i wynosi ok. 11% mas. zamiast 13% mas., co może być spowodowane obniżoną czystością zakupionego

pręta i proszku i/lub zmian w składzie powstałych na skutek procesu obróbki stopu. Właściwości chemiczne proszków mogą się również różnić ze względu na stosowanie odzyskiwania proszku po procesie i ponowne jego wykorzystywanie lub ze względu na warstwowy charakter procesu SLM, a więc efekty termiczne oddziałujące na wytworzone warstwy mogą skutkować ubytkami pierwiastków.

Analizując skład otrzymanych warstw można zauważyć, że do warstwy wytworzonej na materiale SLM zostało włączone więcej srebra, jak również odnotowano wyższy stosunek Ca/P w porównaniu do warstw wytworzonych na pręcie, co potwierdza, że metoda wytwarzania materiału kontrolnego istotnie wpływa na chemię warstw wytworzonych na danym materiale. Mimo nieco wyższej zawartości srebra w warstwach wytworzonych na próbkach referencyjnych SLM, ilość uwolnionych jonów po 7 dniach inkubacji była zbliżona bez względu na użyty materiał referencyjny (1,4-1,85 mg/dm<sup>3</sup> Ag). Większa zawartość jonów Ag w warstwach MAO na próbkach SLM przy mniejszej średnicy porów mogła wyrównać ilość uwalnianych jonów z warstw o mniejszej zawartości srebra, ale większych porach.

Przeprowadzona analiza potwierdza, że mikrostruktura bezpośrednio decyduje o właściwościach wyrobów metalowych, które z kolei są określane przez historię termiczną stopów.

## 11. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W ramach rozprawy doktorskiej badano charakterystykę warstw MAO na powierzchni stopu Ti-13Zr-13Nb uzyskanego metodą selektywnego topienia laserowego. Badania zostały podzielone na trzy części. w pierwszym etapie zbadano wpływ parametrów procesu MAO: napięcia, natężenia i czasu na charakterystykę warstw wytwarzanych w elektrolicie zawierającym glicerofosforan wapnia i octan wapnia, jako źródła wapnia i fosforu. na podstawie tych badań wyeliminowano parametry procesu, które nie spełniały projektowych oczekiwań. Drugi etap badań dotyczył próby wprowadzenia do warstw bioaktywnych dodatków w postaci srebra i galu, przy różnych stężeniach, pod dwoma napięciami (300 i 400 V), z natężeniem prądu wyższym w stosunku do badań prowadzonych w pierwszym etapie. Trzeci etap badań dotyczył porównania wpływu metody wytwarzania stopu tytanu za pomocą metody SLM na charakterystykę warstw MAO w stosunku do warstw MAO uzyskanych na stopie wytwarzanym w konwencjonalny sposób w formie pręta.

Poniżej znajdują się główne wnioski wysunięte na podstawie przeprowadzonych badań:

### **Wpływ parametrów procesu na charakterystykę otrzymanych warstw**

- Dobór odpowiednich parametrów procesu MAO, w tym napięcia, natężenia, czasu oraz składu elektrolitu pozwolił z powodzeniem wytworzyć warstwy MAO zawierające wapń, fosfor, gal lub srebro na stopie Ti-13Zr-13Nb uzyskanym metodą SLM, a wybrane parametry istotnie poprawiły właściwości tego stopu w odniesieniu do zastosowania implantacyjnego.
- Parametry procesu MAO istotnie wpłynęły na charakterystykę powstałych warstw, wraz ze wzrostem napięcia, natężenia lub czasu rosła intensywność przeprowadzanego procesu, która skutkowałą uzyskaniem warstw o większej porowatości, grubości i chropowatości. Kluczowym parametrem procesu MAO, przy którym obserwowano największe zmiany w charakterystyce warstw, było napięcie, gdyż wraz z jego wzrostem odnotowano dodatkowo wzrost stosunku Ca/P, ilości fazy rutyłu, obniżenie właściwości nanomechanicznych i wzrost siły adhezji warstwy do powierzchni. Wydłużenie czasu również poprawiło stosunek Ca/P i obniżyło kąt zwilżania. Natomiast wzrost natężenia prądu przede

wszystkim poprawił siłę adhezji warstwy do podłoża i zapewnił brak delaminacji przy maksymalnej zadanej sile.

- W zadanych warunkach procesowych napięcie 200 V było niewystarczające do wytworzenia całkowitej warstwy MAO, z kolei krótszy czas (10 min) i niższe natężeniu prądu (32 mA) były zbyt niskie do uzyskania maksymalnego zadanego napięcia 400 V. Podwyższenie natężenia do 50 mA pozwoliło ukończyć proces w czasie 10 min i uzyskać kompletną warstwę MAO, co może oznaczać, że zastosowanie krótszego czasu i wyższego natężenia prądu pozwala wytworzyć warstwę, która właściwościami będzie tożsama z warstwą otrzymaną przy niższym natężeniu, ale dłuższym czasie, przy zachowaniu stałego parametru napięcia.
- Wpływ bioaktywnych dodatków na charakterystykę powierzchni był słabszy niż zmiany napięcia, dlatego wpływ danego dodatku na charakterystykę warstw można było zaobserwować przede wszystkim przy niższym napięciu (300 V) wytwarzania MAO.
- Dodatek azotanu srebra lub galu skutkowało powstaniem warstw o mniejszej średnicy porów, dodatkowo gal powodował większą chropowatość i mniejszą grubość warstw w porównaniu do warstw wytworzonych w elektrolicie bazowym bez bioaktywnych dodatków, wykazywał się lepszą migracją i włączaniem do powierzchni niż srebro, a jego wyższa zawartość w warstwie powodowała istotnie wyższe wyrzutowe uwolnienie aktywnych jonów do roztworu PBS w ciągu 24 h, a następnie powolne uwalnianie przez co najmniej 7 dni, co było maksymalnym badanym okresem. Dodatkowo gal istotnie wpłynął na obniżenie twardości i modułu Younga otrzymanych warstw.
- Odnotowano negatywny wpływ galu na proces formowania się warstw MAO przejawiający się istotnym spadkiem grubości warstwy wytworzonej w 3 mM roztworze azotanu galu pod napięciem 400 V w stosunku do pozostałych grup próbek oraz całkowitym zahamowaniem powstawania warstwy MAO przy wyższym stężeniu azotanu galu (6 mM) i/lub w mieszaninie azotanu galu (3 mM) i azotanu srebra (3 mM), co przypisuje się spadkowi rezystancji elektrycznej powstałej warstwy i zahamowaniu procesu wzrostu.

## Wpływ bioaktywnych dodatków na biofunkcjonalizację

- Warstwy MAO wytworzone w elektrolicie zawierającym wapń i fosfor wykazują wczesną bioaktywność wyrażoną w istotnym wzroście stosunku Ca/P odnotowanym po zanurzeniu w roztworze Hanksa;
- Wykazano wybitną zdolność galu do promowania osteointegracji o szerokim zakresie stężenia jonów istotnie poprawiających proliferację komórek, które mieści się co najmniej w granicach 0,06-7,62 mg/dm<sup>3</sup> uwolnionych jonów galu i 0,11-0,56% at. zawartości galu w warstwie;
- Wykazano, że warstwy zawierające wapń i fosfor oraz warstwy z dodatkiem najniższego stężenia azotanu srebra skutecznie promują osteointegrację, a zawartość srebra w warstwie od 0,15% at. i uwalnianie jonów Ag 0,70 mg/dm<sup>3</sup> jest przybliżoną wartością, przy której następował spadek proliferacji komórek, a maksymalna zbadana zawartość srebra w warstwie równa 0,45% at. i uwalnianie na poziomie 1,93 mg/dm<sup>3</sup> jonów Ag nie powoduje cytotoksyczności;
- Zastosowanie roztworu zawierającego 3 mM azotanu srebra i przeprowadzenie procesu MAO przy napięciu 400 V pozwoli uzyskać 100% skuteczność antybakteryjną wobec bakterii szczepu *S.aureus* i *E.coli* zarówno w formie planktonicznej, jak i biofilmu. Natomiast zastosowanie niższego napięcia (300V) prowadzi do powstania warstw o charakterze bakteriostatycznym;
- Aktywność przeciwdrobnoustrojowa srebra wobec bakterii występujących w postaci planktonicznej, jak i biofilmu może świadczyć o bakteriobójczym mechanizmie srebra opartym na modelu kontaktowym połączonym z modelem uwalniania;
- Przy zadanych parametrach procesu dodatek galu nie wykazał właściwości bakteriobójczych, a jedynie minimalną i wybiórczą aktywność bakteriostatyczną wobec biofilmu bakterii *S. aureus* po 4 h i bakterii *E. coli* po 24 h inkubacji, co może sugerować, że zwiększenie jego stężenia może poprawić właściwości bójcze.

## Wpływ metody wytwarzania materiałów na charakterystykę warstw MAO

- Mikrostruktura i właściwości stopu Ti-13Zr-13Nb były istotnie zależne od metody jego wytwarzania. Próbki referencyjne uzyskane z komercyjnego pręta posiadały przede wszystkim fazy  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\alpha'$  ( $\alpha''$ ) i były wolne od defektów. Próbki wytworzone metodą SLM posiadały przede wszystkim fazy  $\beta$ ,  $\alpha'$  ( $\alpha''$ ), oraz liczne cechy charakterystyczne wynikające z metody addytywnego tworzenia elementów wykorzystującej wysoki gradient termiczny, wykazywały liczne defekty w postaci porów, a ich twardość i kąt zwilżania były niemal dwukrotnie wyższe od tych reprezentowanych przez próbki referencyjne wytworzone z pręta.
- Metoda wytwarzania materiałów referencyjnych istotnie wpłynęła na charakterystykę powstałych warstw MAO. Warstwy MAO wytworzona na stopie SLM charakteryzowały się występującą nanoporowatością, wyższą zawartością włączonych jonów srebra do warstwy i wyższym stosunkiem Ca/P w stosunku do warstw MAO wytworzonych na materiale macierzystym w postaci komercyjnego pręta walcowanego na gorąco. Dodatkowo, uwalnianie bioaktywnych jonów srebra było wolniejsze w przypadku warstw wytworzonych na materiale uzyskanym techniką SLM, co może oznaczać możliwość stosowania niższych stężeń bioaktywnych dodatków.

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że charakterystyka materiałów wytworzonych SLM, w tym ich mikrostruktura, istotnie wpływa na proces wzrostu i właściwości warstw MAO wymagając opracowania dedykowanej strategii parametrów procesu modyfikacji w stosunku do materiałów wytwarzanych w konwencjonalny sposób.

Zastosowanie techniki MAO z wykorzystaniem parametrów: napięcia 400 V, czasu 15 min i natężenia prądu 83 mA może poprawić skuteczność implantacyjną biomateriałów wytworzonych metodą SLM dzięki uzyskaniu poprawionej adhezji warstw do podłoża, poprawionej bioaktywności mierzonej wzrostem stosunku Ca/P do wartości bliskiej oczekiwanej i spadkiem zwilżalności powierzchni, a w konsekwencji wzrostem żywotności komórek, w stosunku do pozostałych badanych parametrów procesu. w tych warunkach, dodatek 3 mM azotanu srebra zapewnia 100% skuteczność antybakteryjną przy jednoczesnym braku cytotoksyczności. Natomiast taka sama

zawartość galu zapewnia ponadprzeciętny wzrost komórek osteoblastycznych wykazując jedynie minimalną i wybiórczą aktywność bakteriostatyczną.

Przyszłe badania powinny koncentrować się wokół opracowania optymalnych parametrów procesu MAO, przy których możliwe będzie jednoczesne włączenie srebra i galu do warstwy i wzmocnienie ich funkcji na drodze synergii.

Uzyskane wyniki pozwoliły częściowo wypełnić zaobserwowaną lukę badawczą i określić wpływ poszczególnych parametrów na mechanizm powstawania i budowania warstwy MAO na medycznym stopie tytanu wytwarzanym metodą addytywną, a także pozwoliły porównać działanie dwóch różnych pierwiastków, srebra i galu pełniących bioaktywną rolę. Według najlepszej wiedzy autorki, nie przeprowadzono wcześniej tego typu badań.

Wyniki wskazują na potencjał modyfikacji drukowanych implantów za pomocą utleniania mikrołukowego.

Konkludując, badania omówione w ramach rozprawy doktorskiej wykazały słuszność obu sformułowanych wcześniej tez pracy. W szczególności stwierdzono, jak to wykazano wyżej, iż modyfikacja powierzchniowa stopu tytanu za pomocą utleniania mikrołukowego o odpowiedniej kombinacji parametrów procesu i wytworzenie warstw zawierających wapń i fosfor z dodatkiem srebra lub galu, zwiększa biogodność oraz aktywność biologiczną implantu tytanowego, nie wpływając niekorzystnie na właściwości mechaniczne i adhezję warstw. Jak również wykazano, że nierównowagowa mikrostruktura materiałów wytworzonych metodą SLM istotnie wpływa na proces wzrostu i właściwości warstw MAO. Osiągnięto także postawiony główny cel badawczy i cele dodatkowe.





## PODZIĘKOWANIA

Z ogromną wdzięcznością pragnę skierować podziękowania do wszystkich ośrodków naukowych, w których miałam możliwość odbycia staży badawczych.

Dzięki Państwa życzliwości, gościnności i profesjonalizmowi, mogłam przeprowadzić istotną część badań niezbędnych do realizacji niniejszej rozprawy. Dziękuję za otwartość na przyjęcie mnie do Waszych zespołów i udostępnienie wszelkich zasobów, a także za całą atmosferę współpracy, co było nieocenione dla mojego rozwoju.

Szczególne podziękowania kieruję do:

**Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, w szczególności do dr. Masaya Shimabukuro i Prof. Takao Hanawa,**  
za pomoc w zgłębianiu tajników utleniania mikrołukowego;

**Zakładu Medycyny Laboratoryjnej, Gdański Uniwersytet Medyczny,**  
w szczególności do dr. hab. n. med. Anny Ronowskiej,  
za wprowadzenie w fascynujący świat badań komórkowych;

**Zakładu Molekularnej Mikrobiologii Medycznej, Uniwersytet Jagielloński,**  
w szczególności do prof. dr. hab. Moniki Brzychczy-Włoch i mgr. Doroty Ochańskiej,  
za zarażenie pasją do mikrobiologii.

Dziękuję również:

**promotorowi pomocniczemu, dr. inż. Tomaszowi Seramakowi,**  
za wdrożenie w niezwykle trzeci wymiar.

Oraz:

**całemu Zakładowi Technologii Biomateriałów i wszystkim kolegom i koleżankom z Politechniki Gdańskiej,**  
którzy merytorycznie i duchowo przyczynili się do powstania niniejszej rozprawy.



## LITERATURA

- [1] J. Quinn, R. McFadden, C. W. Chan, i L. Carson, „Titanium for Orthopedic Applications: An Overview of Surface Modification to Improve Biocompatibility and Prevent Bacterial Biofilm Formation”, *iScience*, t. 23, nr 11, s. 101745, lis. 2020, doi: 10.1016/J.ISCI.2020.101745.
- [2] M. R. Siti Nur Hazwani, L. X. Lim, Z. Lockman, I H. Zuhailawati, „Fabrication of titanium-based alloys with bioactive surface oxide layer as biomedical implants: Opportunity and challenges”, *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, t. 32, nr 1, s. 1–44, sty. 2022, doi: 10.1016/S1003-6326(21)65776-X.
- [3] C. Stewart, B. Akhavan, S. G. Wise, i M. M. M. Bilek, „A review of biomimetic surface functionalization for bone-integrating orthopedic implants: Mechanisms, current approaches, and future directions”, *Prog Mater Sci*, t. 106, s. 100588, grudz. 2019, doi: 10.1016/J.PMATSCI.2019.100588.
- [4] Y. Li, C. Yang, H. Zhao, S. Qu, X. Li, i Y. Li, „New Developments of Ti-Based Alloys for Biomedical Applications”, *Materials*, t. 7, s. 1709–1800, 2014, doi: 10.3390/ma7031709.
- [5] R. Shi, Y. Gao, D. Li, W. Zhao, i Y. Zheng, „Recent Advances in the Design of Novel  $\beta$ -Titanium Alloys Using Integrated Theory, Computer Simulation, and Advanced Characterization”, *Adv Eng Mater*, t. 23, nr 8, s. 2100152, sie. 2021, doi: 10.1002/ADEM.202100152.
- [6] M. Kaur i K. Singh, „Review on titanium and titanium based alloys as biomaterials for orthopaedic applications”, *Materials Science and Engineering: C*, t. 102, s. 844–862, wrz. 2019, doi: 10.1016/J.MSEC.2019.04.064.
- [7] M. Kawahara i M. Kato-Negishi, „Access to”, *Research International Journal of Alzheimer's Disease*, t. 2011, 2011, doi: 10.4061/2011/276393.
- [8] S. S. Sidhu, H. Singh, i M. A. H. Gepreel, „A review on alloy design, biological response, and strengthening of  $\beta$ -titanium alloys as biomaterials”, *Materials Science and Engineering: C*, t. 121, s. 111661, luty 2021, doi: 10.1016/J.MSEC.2020.111661.
- [9] L. Y. Chen, Y. W. Cui, i L. C. Zhang, „Recent development in beta titanium alloys for biomedical applications”, *Metals (Basel)*, t. 10, nr 9, s. 1–29, wrz. 2020, doi: 10.3390/met10091139.
- [10] D. W. Wang i in., „Selective Laser Melting Under the Reactive Atmosphere: a Convenient and Efficient Approach to Fabricate Ultrahigh Strength Commercially Pure Titanium Without Sacrificing Ductility”, *SSRN Electronic Journal*, sty. 2019, doi: 10.2139/SSRN.3310270.

- [11] F. Bartolomeu i in., „Wear behavior of Ti6Al4V biomedical alloys processed by selective laser melting, hot pressing and conventional casting”, *Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition)*, t. 27, nr 4, s. 829–838, kwi. 2017, doi: 10.1016/S1003-6326(17)60060-8.
- [12] Y. L. Zhou i M. Niinomi, „Microstructures and mechanical properties of Ti–50 mass% Ta alloy for biomedical applications”, *J Alloys Compd*, t. 466, nr 1–2, s. 535–542, paź. 2008, doi: 10.1016/J.JALLCOM.2007.11.090.
- [13] S. L. Sing, F. E. Wiria, i W. Y. Yeong, „Selective laser melting of titanium alloy with 50 wt% tantalum: Effect of laser process parameters on part quality”, *Int J Refract Metals Hard Mater*, t. 77, s. 120–127, grudz. 2018, doi: 10.1016/J.IJRMHM.2018.08.006.
- [14] M. K. Han, J. Y. Kim, M. J. Hwang, H. J. Song, i Y. J. Park, „Effect of Nb on the Microstructure, Mechanical Properties, Corrosion Behavior, and Cytotoxicity of Ti-Nb Alloys”, *Materials 2015, Vol. 8, Pages 5986-6003*, t. 8, nr 9, s. 5986–6003, wrz. 2015, doi: 10.3390/MA8095287.
- [15] S. E. Kim i in., „Elastic modulus and in vitro biocompatibility of Ti-xNb and Ti-xTa alloys”, *Metals and Materials International*, t. 13, nr 2, s. 145–149, 2007, doi: 10.1007/BF03027565.
- [16] Y. Chen i in., „Sintering and biocompatibility of blended elemental Ti-xNb alloys”, *J Mech Behav Biomed Mater*, t. 104, s. 103691, kwi. 2020, doi: 10.1016/J.JMBBM.2020.103691.
- [17] X. Zhao, M. Niinomi, M. Nakai, i J. Hieda, „Beta type Ti-Mo alloys with changeable Young’s modulus for spinal fixation applications”, *Acta Biomater*, t. 8, nr 5, s. 1990–1997, 2012, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2012.02.004.
- [18] X. Zhao, M. Niinomi, M. Nakai, J. Hieda, T. Ishimoto, i T. Nakano, „Optimization of Cr content of metastable  $\beta$ -type Ti-Cr alloys with changeable Young’s modulus for spinal fixation applications.”, *Acta Biomater*, t. 8, nr 6, s. 2392–2400, 2012, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2012.02.010.
- [19] X. Zhao, M. Niinomi, M. Nakai, J. Hieda, T. Ishimoto, i T. Nakano, „Optimization of Cr content of metastable  $\beta$ -type Ti-Cr alloys with changeable Young’s modulus for spinal fixation applications”, *Acta Biomater*, t. 8, nr 6, s. 2392–2400, 2012, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2012.02.010.
- [20] W. Weng, A. Biesiekierski, J. Lin, S. Ozan, Y. Li, i C. Wen, „Development of beta-type Ti-Nb-Zr-Mo alloys for orthopedic applications”, *Appl Mater Today*, t. 22, s. 100968, mar. 2021, doi: 10.1016/J.APMT.2021.100968.
- [21] C. Cai i in., „Selective laser melting of near- $\alpha$  titanium alloy Ti-6Al-2Zr-1Mo-1V: Parameter optimization, heat treatment and mechanical performance”, *J Mater Sci Technol*, t. 57, s. 51–64, lis. 2020, doi: 10.1016/J.JMST.2020.05.004.

- [22] S. J. Dai, Y. Wang, F. Chen, X. Q. Yu, i Y. F. Zhang, „Influence of Zr content on microstructure and mechanical properties of implant Ti–35Nb–4Sn–6Mo–xZr alloys”, *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, t. 23, nr 5, s. 1299–1303, maj 2013, doi: 10.1016/S1003-6326(13)62597-2.
- [23] A. Macpherson, X. Li, P. McCormick, L. Ren, K. Yang, i T. B. Sercombe, „Antibacterial Titanium Produced Using Selective Laser Melting”, *JOM*, t. 69, nr 12, s. 2719–2724, grudz. 2017, doi: 10.1007/S11837-017-2589-Y.
- [24] V. A. R. Henriques, E. T. Galvani, S. L. G. Petroni, M. S. M. Paula, i T. G. Lemos, „Production of Ti-13Nb-13Zr alloy for surgical implants by powder metallurgy”, *J Mater Sci*, t. 45, nr 21, s. 5844–5850, lis. 2010, doi: 10.1007/S10853-010-4660-8/TABLES/4.
- [25] M. Dziaduszevska i in., „The Effect of Surface Modification of Ti13Zr13Nb Alloy on Adhesion of Antibiotic and Nanosilver-Loaded Bone Cement Coatings Dedicated for Application as Spacers”, *Materials*, t. 12, nr 18, s. 2964, wrz. 2019, doi: 10.3390/ma12182964.
- [26] M. Dziaduszevska i A. Zieliński, „Structural and material determinants influencing the behavior of porous Ti and its alloys made by additive manufacturing techniques for biomedical applications”, *Materials*, t. 14, nr 4, s. 1–48, 2021, doi: 10.3390/ma14040712.
- [27] „Standard Specification for Wrought Titanium-13Niobium-13Zirconium Alloy for Surgical Implant Applications (UNS R58130)”. <https://www.astm.org/f1713-08r21e01.html> (dostęp 24 marzec 2023).
- [28] J. Quinn, R. McFadden, C. W. Chan, i L. Carson, „Titanium for Orthopedic Applications: An Overview of Surface Modification to Improve Biocompatibility and Prevent Bacterial Biofilm Formation”, *iScience*, t. 23, nr 11, s. 101745, lis. 2020, doi: 10.1016/J.ISCI.2020.101745.
- [29] Z. Yuan, Y. He, C. Lin, P. Liu, i K. Cai, „Antibacterial surface design of biomedical titanium materials for orthopedic applications”, *J Mater Sci Technol*, t. 78, s. 51–67, lip. 2021, doi: 10.1016/J.JMST.2020.10.066.
- [30] E. Nikoomezari i in., „Impressive strides in antibacterial performance amelioration of Ti-based implants via plasma electrolytic oxidation (PEO): a review of the recent advancements”, *Chemical Engineering Journal*, t. 441, s. 136003, sie. 2022, doi: 10.1016/J.CEJ.2022.136003.
- [31] P. Izakovicova, O. Borens, i A. Trampuz, „Periprosthetic joint infection: current concepts and outlook”, *EFORT Open Rev*, t. 4, nr 7, s. 482–494, lip. 2019, doi: 10.1302/2058-5241.4.180092.
- [32] Z. Khatoon, C. D. McTiernan, E. J. Suuronen, T. F. Mah, i E. I. Alarcon, „Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention”, *Helijon*, t. 4, nr 12, s. e01067, grudz. 2018, doi: 10.1016/J.HELIVON.2018.E01067.

- [33] L. K. Jensen i in., „Early implant-associated osteomyelitis results in a peri-implanted bacterial reservoir”, *APMIS*, t. 125, nr 1, s. 38–45, sty. 2017, doi: 10.1111/APM.12597.
- [34] P. Gupta, S. Sarkar, B. Das, S. Bhattacharjee, i P. Tribedi, „Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review”, *Archives of Microbiology 2015 198:1*, t. 198, nr 1, s. 1–15, wrz. 2015, doi: 10.1007/S00203-015-1148-6.
- [35] E. M. Hetrick i M. H. Schoenfisch, „Reducing implant-related infections: active release strategies”, *Chem Soc Rev*, t. 35, nr 9, s. 780–789, sie. 2006, doi: 10.1039/B515219B.
- [36] M. Sundfeldt, L. V. Carlsson, C. B. Johansson, P. Thomsen, i C. Gretzer, „Aseptic loosening, not only a question of wear: a review of different theories”, *Acta Orthopaedica*. 2006. doi: 10.1080/17453670610045902.
- [37] W. H. Harris, „Osteolysis and particle disease in hip replacement: a review”, <https://doi.org/10.3109/17453679408993734>, t. 65, nr 1, s. 113–123, 2009, doi: 10.3109/17453679408993734.
- [38] S. Arabnejad, B. Johnston, M. Tanzer, i D. Pasini, „Fully porous 3D printed titanium femoral stem to reduce stress-shielding following total hip arthroplasty”, *Journal of Orthopaedic Research*, t. 35, nr 8, s. 1774–1783, sie. 2017, doi: 10.1002/jor.23445.
- [39] C. Öhman i in., „Compressive behaviour of child and adult cortical bone”, *Bone*, t. 49, nr 4, s. 769–776, 2011, doi: 10.1016/j.bone.2011.06.035.
- [40] P. K. Zysset, X. Edward Guo, C. Edward Hoffler, K. E. Moore, i S. A. Goldstein, „Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bone lamellae measured by nanoindentation in the human femur”, *J Biomech*, t. 32, nr 10, s. 1005–1012, paź. 1999, doi: 10.1016/S0021-9290(99)00111-6.
- [41] Y. Sharkeev i in., „Development of Ultrafine&ndash;Grained and Nanostructured Bioinert Alloys Based on Titanium, Zirconium and Niobium and Their Microstructure, Mechanical and Biological Properties”, *Metals 2022, Vol. 12, Page 1136*, t. 12, nr 7, s. 1136, lip. 2022, doi: 10.3390/MET12071136.
- [42] M. Martínez-Pérez i in., „The “Race for the Surface” experimentally studied: In vitro assessment of Staphylococcus spp. adhesion and preosteoblastic cells integration to doped Ti-6Al-4V alloys”, *Colloids Surf B Biointerfaces*, t. 173, s. 876–883, sty. 2019, doi: 10.1016/J.COLSURFB.2018.10.076.
- [43] M. Takemoto i in., „Osteoinductive porous titanium implants: Effect of sodium removal by dilute HCl treatment”, *Biomaterials*, t. 27, nr 13, s. 2682–2691, maj 2006, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2005.12.014.

- [44] Z. Yuan, Y. He, C. Lin, P. Liu, i K. Cai, „Antibacterial surface design of biomedical titanium materials for orthopedic applications”, *J Mater Sci Technol*, t. 78, s. 51–67, lip. 2021, doi: 10.1016/J.JMST.2020.10.066.
- [45] A. Bagno i C. Di Bello, „Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials”, *J Mater Sci Mater Med*, t. 15, nr 9, s. 935–949, wrz. 2004, doi: 10.1023/B:JMSM.0000042679.28493.7f.
- [46] F. Grizon, E. Aguado, G. Huré, M. F. Baslé, i D. Chappard, „Enhanced bone integration of implants with increased surface roughness: a long term study in the sheep”, *J Dent*, t. 30, nr 5–6, s. 195–203, 2002, doi: 10.1016/S0300-5712(02)00018-0.
- [47] B. E. Li i in., „Synergistic effects of hierarchical hybrid micro/nanostructures on the biological properties of titanium orthopaedic implants”, *RSC Adv*, t. 5, nr 61, s. 49552–49558, cze. 2015, doi: 10.1039/C5RA05821J.
- [48] R. Kane i P. X. Ma, „Mimicking the nanostructure of bone matrix to regenerate bone”, *Materials Today*, t. 16, nr 11, s. 418–423, lis. 2013, doi: 10.1016/J.MATTOD.2013.11.001.
- [49] M. Lorenzetti i in., „The influence of surface modification on bacterial adhesion to titanium-based substrates”, *ACS Appl Mater Interfaces*, t. 7, nr 3, s. 1644–1651, sty. 2015, doi: 10.1021/AM507148N/ASSET/IMAGES/LARGE/AM-2014-07148N\_0006.JPEG.
- [50] H. Te Chen, H. I. Lin, C. J. Chung, C. H. Tang, i J. L. He, „Osseointegrating and phase-oriented micro-arc-oxidized titanium dioxide bone implants”, *J Appl Biomater Funct Mater*, t. 19, kwi. 2021, doi: 10.1177/22808000211006878/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177\_22808000211006878-FIG2.JPEG.
- [51] Q. Wang i in., „Multi-Scale Surface Treatments of Titanium Implants for Rapid Osseointegration: a Review”, *Nanomaterials (Basel)*, t. 10, nr 6, s. 1–27, cze. 2020, doi: 10.3390/NANO10061244.
- [52] T. Ma, X. Ge, Y. Zhang, i Y. Lin, „Effect of Titanium Surface Modifications of Dental Implants on Rapid Osseointegration”, w *Interface Oral Health Science 2016*, Springer Singapore, 2016, s. 247–256. doi: 10.1007/978-981-10-1560-1\_20.
- [53] C. W. Chan, L. Carson, G. C. Smith, A. Morelli, i S. Lee, „Enhancing the antibacterial performance of orthopaedic implant materials by fibre laser surface engineering”, *Appl Surf Sci*, t. 404, s. 67–81, maj 2017, doi: 10.1016/J.APSUSC.2017.01.233.
- [54] S. Arabnejad, B. Johnston, M. Tanzer, i D. Pasini, „Fully porous 3D printed titanium femoral stem to reduce stress-shielding following total hip arthroplasty”, *Journal of Orthopaedic Research*, t. 35, nr 8, s. 1774–1783, sie. 2017, doi: 10.1002/JOR.23445.

- [55] F. H. Froes, „Powder metallurgy of titanium alloys”, *Advances in Powder Metallurgy: Properties, Processing and Applications*, s. 202–240, sty. 2013, doi: 10.1533/9780857098900.2.202.
- [56] A. Alfaify, M. Saleh, F. M. Abdullah, i A. M. Al-Ahmari, „Design for additive manufacturing: a systematic review”, *Sustainability (Switzerland)*, t. 12, nr 19. MDPI AG, 1 październik 2020. doi: 10.3390/SU12197936.
- [57] L. Y. Chen, Y. W. Cui, i L. C. Zhang, „Recent Development in Beta Titanium Alloys for Biomedical Applications”, *Metals 2020, Vol. 10, Page 1139*, t. 10, nr 9, s. 1139, sie. 2020, doi: 10.3390/MET10091139.
- [58] M. W. D. Mendes, C. G. Ágreda, A. H. A. Bressiani, i J. C. Bressiani, „A new titanium based alloy Ti–27Nb–13Zr produced by powder metallurgy with biomimetic coating for use as a biomaterial”, *Materials Science and Engineering: C*, t. 63, s. 671–677, cze. 2016, doi: 10.1016/J.MSEC.2016.03.052.
- [59] E. Colombini, R. Rosa, L. Trombi, M. Zadra, A. Casagrande, i P. Veronesi, „High entropy alloys obtained by field assisted powder metallurgy route: SPS and microwave heating”, *Mater Chem Phys*, t. 210, s. 78–86, maj 2018, doi: 10.1016/J.MATCHEMPHYS.2017.06.065.
- [60] J. Sarma, R. Kumar, A. K. Sahoo, i A. Panda, „Enhancement of material properties of titanium alloys through heat treatment process: a brief review”, *Mater Today Proc*, t. 23, s. 561–564, sty. 2020, doi: 10.1016/J.MATPR.2019.05.409.
- [61] T. S. Tshephe, S. O. Akinwamide, E. Olevsky, i P. A. Olubambi, „Additive manufacturing of titanium-based alloys- a review of methods, properties, challenges, and prospects”, *Heliyon*, t. 8, nr 3, mar. 2022, doi: 10.1016/J.HELIYON.2022.E09041.
- [62] E. Davoodi i in., „Additively manufactured metallic biomaterials”, *Bioact Mater*, t. 15, s. 214–249, wrz. 2022, doi: 10.1016/J.BIOACTMAT.2021.12.027.
- [63] T. Grover i in., „Role of titanium in bio implants and additive manufacturing: An overview”, *Mater Today Proc*, t. 26, s. 3071–3080, sty. 2020, doi: 10.1016/J.MATPR.2020.02.636.
- [64] S. Biamino i in., „Electron beam melting of Ti–48Al–2Cr–2Nb alloy: Microstructure and mechanical properties investigation”, *Intermetallics (Barking)*, t. 19, nr 6, s. 776–781, cze. 2011, doi: 10.1016/J.INTERMET.2010.11.017.
- [65] D. Herzog, V. Seyda, E. Wycisk, i C. Emmelmann, „Additive manufacturing of metals”, *Acta Mater*, t. 117, s. 371–392, wrz. 2016, doi: 10.1016/J.ACTAMAT.2016.07.019.
- [66] D. Svetlizky i in., „Directed energy deposition (DED) additive manufacturing: Physical characteristics, defects, challenges and



applications”, *Materials Today*, t. 49, s. 271–295, paź. 2021, doi: 10.1016/J.MATTOD.2021.03.020.

- [67] H. Fayazfar i in., „A critical review of powder-based additive manufacturing of ferrous alloys: Process parameters, microstructure and mechanical properties”, *Mater Des*, t. 144, s. 98–128, kwi. 2018, doi: 10.1016/J.MATDES.2018.02.018.
- [68] H. D. Nguyen i in., „A critical review on additive manufacturing of Ti-6Al-4V alloy: microstructure and mechanical properties”, *Journal of Materials Research and Technology*, t. 18, s. 4641–4661, maj 2022, doi: 10.1016/J.JMRT.2022.04.055.
- [69] L. C. Zhang, H. Attar, M. Calin, i J. Eckert, „Review on manufacture by selective laser melting and properties of titanium based materials for biomedical applications”, <https://doi.org/10.1179/1753555715Y.0000000076>, t. 31, nr 2, s. 66–76, 2016, doi: 10.1179/1753555715Y.0000000076.
- [70] L. Zhou, T. Yuan, R. Li, J. Tang, M. Wang, i F. Mei, „Anisotropic mechanical behavior of biomedical Ti-13Nb-13Zr alloy manufactured by selective laser melting”, *J Alloys Compd*, t. 762, s. 289–300, wrz. 2018, doi: 10.1016/J.JALLCOM.2018.05.179.
- [71] T. S. Tshephe, S. O. Akinwamide, E. Olevsky, i P. A. Olubambi, „Additive manufacturing of titanium-based alloys- a review of methods, properties, challenges, and prospects”, *Heliyon*, t. 8, nr 3, s. e09041, mar. 2022, doi: 10.1016/J.HELIYON.2022.E09041.
- [72] D. Pede i in., „Microstructure and corrosion resistance of novel  $\beta$ -type titanium alloys manufactured by selective laser melting”, *Journal of Materials Research and Technology*, t. 19, s. 4598–4612, lip. 2022, doi: 10.1016/J.JMRT.2022.07.021.
- [73] T. Nagase, T. Hori, M. Todai, S. H. Sun, i T. Nakano, „Additive manufacturing of dense components in beta-titanium alloys with crystallographic texture from a mixture of pure metallic element powders”, *Mater Des*, t. 173, s. 107771, lip. 2019, doi: 10.1016/J.MATDES.2019.107771.
- [74] L. Zhou, T. Yuan, J. Tang, J. He, i R. Li, „Mechanical and corrosion behavior of titanium alloys additively manufactured by selective laser melting – a comparison between nearly  $\beta$  titanium,  $\alpha$  titanium and  $\alpha + \beta$  titanium”, *Opt Laser Technol*, t. 119, s. 105625, lis. 2019, doi: 10.1016/J.OPTLASTEC.2019.105625.
- [75] L. Zhou i in., „Densification, microstructure evolution and fatigue behavior of Ti-13Nb-13Zr alloy processed by selective laser melting”, *Powder Technol*, t. 342, s. 11–23, sty. 2019, doi: 10.1016/J.POWTEC.2018.09.073.
- [76] L. Zhou, T. Yuan, J. Tang, L. Li, F. Mei, i R. Li, „Texture evolution, phase transformation and mechanical properties of selective laser melted Ti-

- 13Nb-13Zr”, *Mater Charact*, t. 145, s. 185–195, lis. 2018, doi: 10.1016/J.MATCHAR.2018.08.053.
- [77] A. Hariharan i in., „Designing the microstructural constituents of an additively manufactured near  $\beta$  Ti alloy for an enhanced mechanical and corrosion response”, *Mater Des*, t. 217, s. 110618, maj 2022, doi: 10.1016/J.MATDES.2022.110618.
- [78] L. Zhou, T. Yuan, R. Li, J. Tang, M. Wang, i F. Mei, „Microstructure and mechanical properties of selective laser melted biomaterial Ti-13Nb-13Zr compared to hot-forging”, *Materials Science and Engineering: A*, t. 725, s. 329–340, maj 2018, doi: 10.1016/J.MSEA.2018.04.001.
- [79] K. A. Kravanja i M. Finšgar, „A review of techniques for the application of bioactive coatings on metal-based implants to achieve controlled release of active ingredients”, *Mater Des*, t. 217, s. 110653, maj 2022, doi: 10.1016/J.MATDES.2022.110653.
- [80] A. Zielinski, „Special Issue: Recent Developments of Electrodeposition Coating”, *Coatings 2021, Vol. 11, Page 142*, t. 11, nr 2, s. 142, sty. 2021, doi: 10.3390/COATINGS11020142.
- [81] M. Bartmanski i in., „Electrophoretic deposition (EPD) of nanohydroxyapatite - nanosilver coatings on Ti13Zr13Nb alloy”, *Ceram Int*, t. 43, nr 15, s. 11820–11829, paź. 2017, doi: 10.1016/J.CERAMINT.2017.06.026.
- [82] A. Kazek-Kęsik i in., „Physico-chemical and biological evaluation of doxycycline loaded into hybrid oxide-polymer layer on Ti–Mo alloy”, *Bioact Mater*, t. 5, nr 3, s. 553–563, wrz. 2020, doi: 10.1016/J.BIOACTMAT.2020.04.009.
- [83] R. Gupta i A. Kumar, „Bioactive materials for biomedical applications using sol–gel technology”, *Biomedical Materials*, t. 3, nr 3, s. 034005, sie. 2008, doi: 10.1088/1748-6041/3/3/034005.
- [84] N. Koju, P. Sikder, Y. Ren, H. Zhou, i S. B. Bhaduri, „Biomimetic coating technology for orthopedic implants”, *Curr Opin Chem Eng*, t. 15, s. 49–55, luty 2017, doi: 10.1016/J.COCHE.2016.11.005.
- [85] K. A. Kravanja i M. Finšgar, „A review of techniques for the application of bioactive coatings on metal-based implants to achieve controlled release of active ingredients”, *Mater Des*, t. 217, s. 110653, maj 2022, doi: 10.1016/J.MATDES.2022.110653.
- [86] L. Cao i in., „Plasma spray of biofunctional (Mg, Sr)-substituted hydroxyapatite coatings for titanium alloy implants”, *J Mater Sci Technol*, t. 35, nr 5, s. 719–726, maj 2019, doi: 10.1016/J.JMST.2018.10.020.
- [87] M. Qadir, Y. Li, i C. Wen, „Ion-substituted calcium phosphate coatings by physical vapor deposition magnetron sputtering for biomedical applications:

a review”, *Acta Biomater*, t. 89, s. 14–32, kwi. 2019, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2019.03.006.

- [88] M. Benelmekki i A. Erbe, „Nanostructured thin films—background, preparation and relation to the technological revolution of the 21st century”, *Frontiers of Nanoscience*, t. 14, s. 1–34, sty. 2019, doi: 10.1016/B978-0-08-102572-7.00001-5.
- [89] B. Majkowska-Marzec, P. Teczar, M. Bartmański, B. Bartosewicz, i B. J. Jankiewicz, „Mechanical and Corrosion Properties of Laser Surface-Treated Ti13Nb13Zr Alloy with MWCNTs Coatings”, *Materials*, t. 13, nr 18, s. 3991, wrz. 2020, doi: 10.3390/MA13183991.
- [90] B. D. Jensen, G. M. Odegard, J. W. Kim, G. Sauti, E. J. Siochi, i K. E. Wise, „Simulating the effects of carbon nanotube continuity and interfacial bonding on composite strength and stiffness”, *Compos Sci Technol*, t. 166, s. 10–19, 2018, doi: 10.1016/j.compscitech.2018.02.008.
- [91] Y. Wang, H. Yu, C. Chen, i Z. Zhao, „Review of the biocompatibility of micro-arc oxidation coated titanium alloys”, *Mater Des*, t. 85, s. 640–652, lis. 2015, doi: 10.1016/J.MATDES.2015.07.086.
- [92] L. O. Snizhko i in., „Anodic processes in plasma electrolytic oxidation of aluminium in alkaline solutions”, *Electrochim Acta*, t. 49, nr 13, s. 2085–2095, maj 2004, doi: 10.1016/J.ELECTACTA.2003.11.027.
- [93] P. A. Pesode i S. B. Barve, „Recent advances on the antibacterial coating on titanium implant by micro-Arc oxidation process”, *Mater Today Proc*, t. 47, s. 5652–5662, sty. 2021, doi: 10.1016/J.MATPR.2021.03.702.
- [94] E. Nikoomanzari i in., „Impressive strides in antibacterial performance amelioration of Ti-based implants via plasma electrolytic oxidation (PEO): a review of the recent advancements”, *Chemical Engineering Journal*, t. 441, s. 136003, sie. 2022, doi: 10.1016/J.CEJ.2022.136003.
- [95] X. Zhang, Z. Yao, Z. Jiang, Y. Zhang, i X. Liu, „Investigation of the plasma electrolytic oxidation of Ti6Al4V under single-pulse power supply”, *Corros Sci*, t. 53, nr 6, s. 2253–2262, cze. 2011, doi: 10.1016/J.CORSCI.2011.03.005.
- [96] A. Fattah-alhosseini, M. Molaei, N. Attarzadeh, K. Babaei, i F. Attarzadeh, „On the enhanced antibacterial activity of plasma electrolytic oxidation (PEO) coatings that incorporate particles: a review”, *Ceram Int*, t. 46, nr 13, s. 20587–20607, wrz. 2020, doi: 10.1016/J.CERAMINT.2020.05.206.
- [97] K. Venkateswarlu i in., „Role of electrolyte chemistry on electronic and in vitro electrochemical properties of micro-arc oxidized titania films on Cp Ti”, *Electrochim Acta*, t. 105, s. 468–480, sie. 2013, doi: 10.1016/J.ELECTACTA.2013.05.032.
- [98] H. Habazaki, M. Uozumi, H. Konno, K. Shimizu, P. Skeldon, i G. E. Thompson, „Crystallization of anodic titania on titanium and its alloys”,

*Corros Sci*, t. 45, nr 9, s. 2063–2073, wrz. 2003, doi: 10.1016/S0010-938X(03)00040-4.

- [99] A. L. Yerokhin, X. Nie, A. Leyland, A. Matthews, i S. J. Dowey, „Plasma electrolysis for surface engineering”, *Surf Coat Technol*, t. 122, nr 2–3, s. 73–93, grudz. 1999, doi: 10.1016/S0257-8972(99)00441-7.
- [100] Y. liang Cheng, X. Q. Wu, Z. gang Xue, E. Matykina, P. Skeldon, i G. E. Thompson, „Microstructure, corrosion and wear performance of plasma electrolytic oxidation coatings formed on Ti–6Al–4V alloy in silicate-hexametaphosphate electrolyte”, *Surf Coat Technol*, t. 217, s. 129–139, luty 2013, doi: 10.1016/J.SURFCOAT.2012.12.003.
- [101] P. Gupta, G. Tenhundfeld, E. O. Daigle, i D. Ryabkov, „Electrolytic plasma technology: Science and engineering—An overview”, *Surf Coat Technol*, t. 201, nr 21 SPEC. ISS., s. 8746–8760, sie. 2007, doi: 10.1016/J.SURFCOAT.2006.11.023.
- [102] B. L. Jiang i Y. F. Ge, „Micro-arc oxidation (MAO) to improve the corrosion resistance of magnesium (Mg) alloys”, *Corrosion Prevention of Magnesium Alloys: a volume in Woodhead Publishing Series in Metals and Surface Engineering*, s. 163–196, sty. 2013, doi: 10.1533/9780857098962.2.163.
- [103] M. Aliofkhaezai i in., „Review of plasma electrolytic oxidation of titanium substrates: Mechanism, properties, applications and limitations”, *Applied Surface Science Advances*, t. 5, s. 2666–5239, 2021, doi: 10.1016/j.apsadv.2021.100121.
- [104] M. Molaei, A. Fattah-Alhosseini, i S. O. Gashti, „Sodium Aluminate Concentration Effects on Microstructure and Corrosion Behavior of the Plasma Electrolytic Oxidation Coatings on Pure Titanium”, *Metall Mater Trans a Phys Metall Mater Sci*, t. 49, nr 1, s. 368–375, sty. 2018, doi: 10.1007/S11661-017-4405-2/FIGURES/11.
- [105] W. Simka, R. P. Socha, G. Dercz, J. Michalska, A. Maciej, i A. Krzakała, „Anodic oxidation of Ti–13Nb–13Zr alloy in silicate solutions”, *Appl Surf Sci*, t. 279, s. 317–323, sie. 2013, doi: 10.1016/J.APSUSC.2013.04.091.
- [106] B. Makurat-Kasprolewicz i A. Ossowska, „Recent advances in electrochemically surface treated titanium and its alloys for biomedical applications: a review of anodic and plasma electrolytic oxidation methods”, *Mater Today Commun*, t. 34, s. 105425, mar. 2023, doi: 10.1016/J.MTCOMM.2023.105425.
- [107] L. Mohan, C. Dennis, N. Padmapriya, C. Anandan, i N. Rajendran, „Effect of Electrolyte Temperature and Anodization Time on Formation of TiO<sub>2</sub> Nanotubes for Biomedical Applications”, *Mater Today Commun*, t. 23, s. 101103, cze. 2020, doi: 10.1016/J.MTCOMM.2020.101103.
- [108] M. Fazel, M. Shamanian, i H. R. Salimijazi, „Enhanced corrosion and tribocorrosion behavior of Ti6Al4V alloy by auto-sealed micro-arc



oxidation layers”, *Biotribology*, t. 23, s. 100131, wrz. 2020, doi: 10.1016/J.BIOTRI.2020.100131.

- [109] J. Alipal, T. C. Lee, P. Koshy, H. Z. Abdullah, i M. I. Idris, „Evolution of anodised titanium for implant applications”, *Helijon*, t. 7, nr 7, s. e07408, lip. 2021, doi: 10.1016/J.HELİYON.2021.E07408.
- [110] T. C. Lee, M. H. H. Mazlan, M. I. Abbas, H. Z. Abdullah, i M. I. Idris, „Preparation of Bioactive Titanium Film via Anodic Oxidation in Agitation Condition”, *Materials Science Forum*, t. 840, s. 220–224, 2016, doi: 10.4028/WWW.SCIENTIFIC.NET/MSF.840.220.
- [111] M. P. Neupane, I. S. Park, T. S. Bae, i M. H. Lee, „Sonochemical assisted synthesis of nano-structured titanium oxide by anodic oxidation”, *J Alloys Compd*, t. 581, s. 418–422, grudz. 2013, doi: 10.1016/J.JALLCOM.2013.07.110.
- [112] K. Syrek, J. Kapusta-Kołodziej, M. Jarosz, i G. D. Sulka, „Effect of electrolyte agitation on anodic titanium dioxide (ATO) growth and its photoelectrochemical properties”, *Electrochim Acta*, t. 180, s. 801–810, paź. 2015, doi: 10.1016/J.ELECTACTA.2015.09.011.
- [113] S. F. Ou, C. S. Lin, i Y. N. Pan, „Microstructure and surface characteristics of hydroxyapatite coating on titanium and Ti-30Nb-1Fe-1Hf alloy by anodic oxidation and hydrothermal treatment”, *Surf Coat Technol*, t. 205, nr 8–9, s. 2899–2906, sty. 2011, doi: 10.1016/J.SURFCOAT.2010.10.063.
- [114] M. Dziaduszevska, M. Shimabukuro, T. Seramak, A. Zielinski, i T. Hanawa, „Effects of Micro-Arc Oxidation Process Parameters on Characteristics of Calcium-Phosphate Containing Oxide Layers on the Selective Laser Melted Ti13Zr13Nb Alloy”, *Coatings*, t. 10, nr 8, s. 745, lip. 2020, doi: 10.3390/coatings10080745.
- [115] M. Kaseem, S. Fatimah, N. Nashrah, i Y. G. Ko, „Recent progress in surface modification of metals coated by plasma electrolytic oxidation: Principle, structure, and performance”, *Prog Mater Sci*, t. 117, s. 100735, kwi. 2021, doi: 10.1016/J.PMATSCI.2020.100735.
- [116] X. Zhang i in., „Characterization and property of dual-functional Zn-incorporated TiO<sub>2</sub> micro-arc oxidation coatings: The influence of current density”, *J Alloys Compd*, t. 810, s. 151893, lis. 2019, doi: 10.1016/J.JALLCOM.2019.151893.
- [117] L. Zhang, Q. Gao, i Y. Han, „Zn and Ag Co-doped Anti-microbial TiO<sub>2</sub> Coatings on Ti by Micro-arc Oxidation”, *J Mater Sci Technol*, t. 32, nr 9, s. 919–924, wrz. 2016, doi: 10.1016/J.JMST.2016.01.008.
- [118] C. A. R. Maestro i in., „Corrosion behavior and biological responses of a double coating formed on the Ti-6Al-4V alloy surface by using thermal oxidation and biomimetic deposition of bismuth-doped CaP”, *Surf Coat Technol*, t. 425, s. 127717, lis. 2021, doi: 10.1016/J.SURFCOAT.2021.127717.

- [119] A. Zakaria, H. Shukor, M. Todoh, i K. Jusoff, „Bio-Functional Coating on Ti6Al4V Surface Produced by Using Plasma Electrolytic Oxidation”, *Metals* 2020, Vol. 10, Page 1124, t. 10, nr 9, s. 1124, sie. 2020, doi: 10.3390/MET10091124.
- [120] A. Krzakała i in., „Formation of bioactive coatings on a Ti–6Al–7Nb alloy by plasma electrolytic oxidation”, *Electrochim Acta*, t. 104, s. 407–424, sie. 2013, doi: 10.1016/J.ELECTACTA.2012.07.075.
- [121] A. Kazek-Kesik, M. Krok-Borkowicz, A. Jakóbi-Kolon, E. Pamuła, i W. Simka, „Biofunctionalization of Ti–13Nb–13Zr alloy surface by plasma electrolytic oxidation. Part II”, *Surf Coat Technol*, t. 276, s. 23–30, sie. 2015, doi: 10.1016/J.SURFCOAT.2015.06.035.
- [122] A. Kazek-Kesik, G. Dercz, K. Suchanek, I. Kalemba-Rec, J. Piotrowski, i W. Simka, „Biofunctionalization of Ti–13Nb–13Zr alloy surface by plasma electrolytic oxidation. Part I”, *Surf Coat Technol*, t. 276, s. 59–69, sie. 2015, doi: 10.1016/J.SURFCOAT.2015.06.034.
- [123] Y. Tsutsumi i in., „Micro-arc oxidation treatment to improve the hard-tissue compatibility of Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr alloy”, *Appl Surf Sci*, t. 262, s. 34–38, grudz. 2012, doi: 10.1016/j.apsusc.2012.01.024.
- [124] Y. Tsutsumi i in., „Micro arc oxidation of Ti-15Zr-7.5Mo alloy”, w *Materials Transactions*, Japan Institute of Metals (JIM), 2016, s. 2015–2019. doi: 10.2320/matertrans.MI201513.
- [125] W. H. Song, Y. K. Jun, Y. Han, i S. H. Hong, „Biomimetic apatite coatings on micro-arc oxidized titania”, *Biomaterials*, t. 25, nr 17, s. 3341–3349, sie. 2004, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2003.09.103.
- [126] D. R. N. Correa i in., „Growth mechanisms of Ca- and P-rich MAO films in Ti-15Zr-xMo alloys for osseointegrative implants”, *Surf Coat Technol*, t. 344, s. 373–382, cze. 2018, doi: 10.1016/J.SURFCOAT.2018.02.099.
- [127] M. Godoy-Gallardo i in., „Antibacterial approaches in tissue engineering using metal ions and nanoparticles: From mechanisms to applications”, *Bioact Mater*, t. 6, nr 12, s. 4470–4490, grudz. 2021, doi: 10.1016/J.BIOACTMAT.2021.04.033.
- [128] I. A. J. van Hengel, M. W. A. M. Tierolf, L. E. Fratila-apachitei, I. Apachitei, i A. A. Zadpoor, „Antibacterial Titanium Implants Biofunctionalized by Plasma Electrolytic Oxidation with Silver, Zinc, and Copper: a Systematic Review”, *Int J Mol Sci*, t. 22, nr 7, kwi. 2021, doi: 10.3390/IJMS22073800.
- [129] M. Shimabukuro, „Antibacterial Property and Biocompatibility of Silver, Copper, and Zinc in Titanium Dioxide Layers Incorporated by One-Step Micro-Arc Oxidation: a Review”, *Antibiotics (Basel)*, t. 9, nr 10, s. 1–13, paź. 2020, doi: 10.3390/ANTIBIOTICS9100716.

- [130] X. Zhang i in., „Effects of copper nanoparticles in porous TiO<sub>2</sub> coatings on bacterial resistance and cytocompatibility of osteoblasts and endothelial cells”, *Materials Science and Engineering: C*, t. 82, s. 110–120, sty. 2018, doi: 10.1016/J.MSEC.2017.08.061.
- [131] M. Thukkaram i in., „Antibacterial activity of a porous silver doped TiO<sub>2</sub> coating on titanium substrates synthesized by plasma electrolytic oxidation”, *Appl Surf Sci*, t. 500, s. 144235, sty. 2020, doi: 10.1016/J.APSUSC.2019.144235.
- [132] I. A. J. van Hengel i in., „Biofunctionalization of selective laser melted porous titanium using silver and zinc nanoparticles to prevent infections by antibiotic-resistant bacteria”, *Acta Biomater*, t. 107, s. 325–337, kwi. 2020, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2020.02.044.
- [133] L. Zhang, J. Guo, X. Huang, Y. Zhang, i Y. Han, „The dual function of Cu-doped TiO<sub>2</sub> coatings on titanium for application in percutaneous implants”, *J Mater Chem B*, t. 4, nr 21, s. 3788–3800, maj 2016, doi: 10.1039/C6TB00563B.
- [134] X. Zhang i in., „Characterization and property of bifunctional Zn-incorporated TiO<sub>2</sub> micro-arc oxidation coatings: The influence of different Zn sources”, *Ceram Int*, t. 45, nr 16, s. 19747–19756, lis. 2019, doi: 10.1016/J.CERAMINT.2019.06.228.
- [135] M. Shimabukuro i in., „Chemical and biological roles of zinc in a porous titanium dioxide layer formed by micro-arc oxidation”, *Coatings*, t. 9, nr 11, s. 705, paź. 2019, doi: 10.3390/coatings9110705.
- [136] W. R. Li i in., „A comparative analysis of antibacterial activity, dynamics, and effects of silver ions and silver nanoparticles against four bacterial strains”, *Int Biodeterior Biodegradation*, t. 123, s. 304–310, wrz. 2017, doi: 10.1016/J.IBIOD.2017.07.015.
- [137] M. Shimabukuro i in., „Investigation of Realizing Both Antibacterial Property and Osteogenic Cell Compatibility on Titanium Surface by Simple Electrochemical Treatment”, *ACS Biomater Sci Eng*, t. 5, nr 11, s. 5623–5630, lis. 2019, doi: 10.1021/ACSBIOMATERIALS.8B01058/ASSET/IMAGES/LARGE/AB-2018-01058V\_0009.JPEG.
- [138] W. Chen i in., „In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating”, *Biomaterials*, t. 27, nr 32, s. 5512–5517, lis. 2006, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2006.07.003.
- [139] M. B. Sedelnikova i in., „Modification of titanium surface via Ag-, Sr- and Si-containing micro-arc calcium phosphate coating”, *Bioact Mater*, t. 4, s. 224–235, grudz. 2019, doi: 10.1016/J.BIOACTMAT.2019.07.001.

- [140] R. Kumar i H. M. Unstedt, „Silver ion release from antimicrobial polyamide/silver composites”, *Biomaterials*, t. 26, s. 2081–2088, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.05.030.
- [141] W. H. Song, S. R. Hyun, i S. H. Hong, „Antibacterial properties of Ag (or Pt)-containing calcium phosphate coatings formed by micro-arc oxidation”, *J Biomed Mater Res A*, t. 88A, nr 1, s. 246–254, sty. 2009, doi: 10.1002/JBM.A.31877.
- [142] L. Zhang i in., „Biological and antibacterial properties of TiO<sub>2</sub> coatings containing Ca/P/Ag by one-step and two-step methods”, *Biomed Microdevices*, t. 22, nr 2, s. 1–8, cze. 2020, doi: 10.1007/S10544-020-00482-8/FIGURES/7.
- [143] Y. Tsutsumi i in., „Electrochemical Surface Treatment of a  $\beta$ -titanium Alloy to Realize an Antibacterial Property and Bioactivity”, *Metals 2016, Vol. 6, Page 76*, t. 6, nr 4, s. 76, mar. 2016, doi: 10.3390/MET6040076.
- [144] F. Muhaffel, G. Cempura, M. Menekse, A. Czyska-Filemonowicz, N. Karaguler, i H. Cimenoglu, „Characteristics of multi-layer coatings synthesized on Ti6Al4V alloy by micro-arc oxidation in silver nitrate added electrolytes”, *Surf Coat Technol*, t. 307, s. 308–315, grudz. 2016, doi: 10.1016/J.SURFCOAT.2016.09.002.
- [145] W. Sun, M. Qi, S. Cheng, C. Li, B. Dong, i L. Wang, „Gallium and gallium compounds: New insights into the “Trojan horse” strategy in medical applications”, *Mater Des*, t. 227, s. 111704, mar. 2023, doi: 10.1016/J.MATDES.2023.111704.
- [146] F. Kurtuldu i in., „Cerium and gallium containing mesoporous bioactive glass nanoparticles for bone regeneration: Bioactivity, biocompatibility and antibacterial activity”, *Materials Science and Engineering: C*, t. 124, s. 112050, maj 2021, doi: 10.1016/J.MSEC.2021.112050.
- [147] W. Sun, M. Qi, S. Cheng, C. Li, B. Dong, i L. Wang, „Gallium and gallium compounds: New insights into the “Trojan horse” strategy in medical applications”, *Mater Des*, t. 227, s. 111704, mar. 2023, doi: 10.1016/J.MATDES.2023.111704.
- [148] F. Minandri, C. Bonchi, E. Frangipani, F. Imperi, i P. Visca, „Promises and failures of gallium as an antibacterial agent”, <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.14.3>, t. 9, nr 3, s. 379–397, kwi. 2014, doi: 10.2217/FMB.14.3.
- [149] A. Rodríguez-Contreras i in., „Development of novel dual-action coatings with osteoinductive and antibacterial properties for 3D-printed titanium implants”, *Surf Coat Technol*, t. 403, s. 126381, grudz. 2020, doi: 10.1016/J.SURFCOAT.2020.126381.
- [150] A. Cochis, B. Azzimonti, R. Chiesa, L. Rimondini, i M. Gasik, „Metallurgical Gallium Additions to Titanium Alloys Demonstrate a Strong Time-Increasing Antibacterial Activity without any Cellular Toxicity”, *ACS*



*Biomater Sci Eng*, 2019, doi:  
10.1021/ACSBIOMATERIALS.9B00147/ASSET/IMAGES/LARGE/AB-  
2019-001477\_0003.JPEG.

- [151] M. Kurtjak, M. Vukomanović, i D. Suvorov, „Antibacterial nanocomposite of functionalized nanogold and gallium-doped hydroxyapatite”, *Mater Lett*, t. 193, s. 126–129, kwi. 2017, doi: 10.1016/J.MATLET.2017.01.092.
- [152] C. Qiu i in., „Influences of gallium substitution on the phase stability, mechanical strength and cellular response of  $\beta$ -tricalcium phosphate bioceramics”, *Ceram Int*, t. 46, nr 10, s. 16364–16371, lip. 2020, doi: 10.1016/J.CERAMINT.2020.03.195.
- [153] I. Strazic Geljic i in., „Gallium enhances reconstructive properties of a calcium phosphate bone biomaterial”, *J Tissue Eng Regen Med*, t. 12, nr 2, s. e854–e866, luty 2018, doi: 10.1002/TERM.2396.
- [154] M. Mosina, I. Kovrija, L. Stipnicec, i J. Locs, „Gallium containing calcium phosphates: Potential antibacterial agents or fictitious truth”, *Acta Biomater*, t. 150, s. 48–57, wrz. 2022, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2022.07.063.
- [155] S. Shruti, F. Andreatta, E. Furlani, E. Marin, S. Maschio, i L. Fedrizzi, „Cerium, gallium and zinc containing mesoporous bioactive glass coating deposited on titanium alloy”, *Appl Surf Sci*, t. 378, s. 216–223, sie. 2016, doi: 10.1016/J.APSUSC.2016.03.209.
- [156] S. Yamaguchi i in., „Two-in-One Biointerfaces—Antimicrobial and Bioactive Nanoporous Gallium Titanate Layers for Titanium Implants”, *Nanomaterials 2017, Vol. 7, Page 229*, t. 7, nr 8, s. 229, sie. 2017, doi: 10.3390/NANO7080229.
- [157] G. E. Stan i in., „The Beneficial Mechanical and Biological Outcomes of Thin Copper-Gallium Doped Silica-Rich Bio-Active Glass Implant-Type Coatings”, *Coatings 2020, Vol. 10, Page 1119*, t. 10, nr 11, s. 1119, lis. 2020, doi: 10.3390/COATINGS10111119.
- [158] M. A. Akhtar, Z. Hadzhieva, I. Dlouhý, i A. R. Boccaccini, „Electrophoretic Deposition and Characterization of Functional Coatings Based on an Antibacterial Gallium (III)-Chitosan Complex”, *Coatings 2020, Vol. 10, Page 483*, t. 10, nr 5, s. 483, maj 2020, doi: 10.3390/COATINGS10050483.
- [159] S. Zhong, G. Li, S. Zhang, R. Zhao, X. Jiang, i R. Zhang, „Preparation and formation mechanism of anodic coatings co-doped with Ga, Si, and P ions on Ti–6Al–4V alloys”, *Mater Chem Phys*, t. 282, s. 125923, kwi. 2022, doi: 10.1016/J.MATCHEMPHYS.2022.125923.
- [160] A. Cochis, B. Azzimonti, C. Della Valle, R. Chiesa, C. R. Arciola, i L. Rimondini, „Biofilm formation on titanium implants counteracted by grafting gallium and silver ions”, *J Biomed Mater Res A*, t. 103, nr 3, s. 1176–1187, mar. 2015, doi: 10.1002/JBM.A.35270.

- [161] A. Cochis i in., „The effect of silver or gallium doped titanium against the multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*”, *Biomaterials*, t. 80, s. 80–95, luty 2016, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2015.11.042.
- [162] M. B. Sedelnikova i in., „Zn-, Cu- or Ag-incorporated micro-arc coatings on titanium alloys: Properties and behavior in synthetic biological media”, *Surf Coat Technol*, t. 369, s. 52–68, lip. 2019, doi: 10.1016/J.SURFCOAT.2019.04.021.
- [163] J. Yao, Y. Wang, G. Wu, M. Sun, M. Wang, i Q. Zhang, „Growth characteristics and properties of micro-arc oxidation coating on SLM-produced TC4 alloy for biomedical applications”, *Appl Surf Sci*, t. 479, s. 727–737, cze. 2019, doi: 10.1016/J.APSUSC.2019.02.142.
- [164] T. Seramak, K. Zasińska, A. Zieliński, J. Andrykowski, A. Andrykowska-Ignaczak, i M. Motyl, „Prosthetic Elements Made of the Ti-13Zr-13Nb Alloy by Selective Laser Melting”, *Advances in Materials Science*, t. 17, nr 3, s. 54–61, wrz. 2017, doi: 10.1515/ADMS-2017-0016.
- [165] M. Nyan i in., „Synthesis of novel oxide layers on titanium by combination of sputter deposition and micro-arc oxidation techniques”, *Dent Mater J*, t. 30, nr 5, s. 754–761, 2011, doi: 10.4012/dmj.2011-067.
- [166] W. C. Oliver i G. M. Pharr, „An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments”, *J Mater Res*, t. 7, nr 6, s. 1564–1583, cze. 1992, doi: 10.1557/jmr.1992.1564.
- [167] M. Ehlert, A. Radtke, T. Jedrzejewski, K. Roszek, M. Bartmanski, i P. Piszczek, „In vitro studies on nanoporous, nanotubular and nanosponge-like titania coatings, with the use of adipose-derived stem cells”, *Materials*, t. 13, nr 7, s. 1574, kwi. 2020, doi: 10.3390/ma13071574.
- [168] T. Mosmann, „Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays”, *J Immunol Methods*, t. 65, nr 1–2, s. 55–63, grudz. 1983, doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- [169] A. Radtke, M. Grodzicka, M. Ehlert, T. Jedrzejewski, M. Wypij, i P. Golińska, „«To Be Microbiocidal and Not to Be Cytotoxic at the Same Time...»-Silver Nanoparticles and Their Main Role on the Surface of Titanium Alloy Implants”, *J Clin Med*, t. 8, nr 3, mar. 2019, doi: 10.3390/JCM8030334.
- [170] J. Li, H. Cai, i B. Jiang, „Growth mechanism of black ceramic layers formed by microarc oxidation”, *Surf Coat Technol*, t. 201, nr 21 SPEC. ISS., s. 8702–8708, sie. 2007, doi: 10.1016/j.surfcoat.2007.06.010.
- [171] B. Y. Qian i in., „Influence of Voltage on the Corrosion and Wear Resistance of Micro-Arc Oxidation Coating on Mg–8Li–2Ca Alloy”, *Acta Metallurgica Sinica (English Letters)*, t. 32, nr 2, s. 194–204, luty 2019, doi: 10.1007/s40195-018-0845-y.

- [172] J. Solis, H. Zhao, C. Wang, J. A. Verduzco, A. S. Bueno, i A. Neville, „Tribological performance of an H-DLC coating prepared by PECVD”, *Appl Surf Sci*, t. 383, s. 222–232, paź. 2016, doi: 10.1016/j.apsusc.2016.04.184.
- [173] S. Zimowski, „Wpływ twardości i modułu sprężystości powłok kompozytowych na ich odporność na zużycie effect of the hardness and elastic modulus on the wear resistance of the composite coatings”. Dostęp: 17 czerwiec 2020. [Online]. Dostępne na: [http://yadda.icm.edu.pl/baztech/element/bwmeta1.element/baztech-1f38a572-af88-4afa-a04c-75facee31e4c/c/Tribologia\\_4\\_2014\\_Zimowski.pdf](http://yadda.icm.edu.pl/baztech/element/bwmeta1.element/baztech-1f38a572-af88-4afa-a04c-75facee31e4c/c/Tribologia_4_2014_Zimowski.pdf)
- [174] M. Lępicka i M. Grldzka-Dahlke, „The initial evaluation of performance of hard anti-wear coatings deposited on metallic substrates: Thickness, mechanical properties and adhesion measurements - a brief review”, *Reviews on Advanced Materials Science*, t. 58, nr 1. Walter de Gruyter GmbH, s. 50–65, 1 kwiecień 2019. doi: 10.1515/rams-2019-0003.
- [175] X. Huang, I. Etsion, i T. Shao, „Effects of elastic modulus mismatch between coating and substrate on the friction and wear properties of TiN and TiAlN coating systems”, *Wear*, t. 338–339, s. 54–61, wrz. 2015, doi: 10.1016/j.wear.2015.05.016.
- [176] M. Bartmański, Ł. Pawłowski, G. Strugała, A. Mielewczyk-Gryń, i A. Zieliński, „Properties of nanohydroxyapatite coatings doped with nanocopper, obtained by electrophoretic deposition on Ti13Zr13Nb alloy”, *Materials*, t. 12, nr 22, s. 3741, lis. 2019, doi: 10.3390/ma12223741.
- [177] H. Krawiec, V. Vignal, A. Krystianiak, Y. Gaillard, i S. Zimowski, „Mechanical properties and corrosion behaviour after scratch and tribological tests of electrodeposited Co-Mo/TiO<sub>2</sub> nano-composite coatings”, *Appl Surf Sci*, t. 475, s. 162–174, maj 2019, doi: 10.1016/j.apsusc.2018.12.099.
- [178] B. Lenz, H. Hasselbruch, H. Großmann, i A. Mehner, „Application of CNN networks for an automatic determination of critical loads in scratch tests on a-C:H:W coatings”, *Surf Coat Technol*, t. 393, s. 125764, lip. 2020, doi: 10.1016/j.surfcoat.2020.125764.
- [179] N. X. Randall, „The current state-of-the-art in scratch testing of coated systems”, *Surface and Coatings Technology*, t. 380. Elsevier B.V., s. 125092, 25 grudzień 2019. doi: 10.1016/j.surfcoat.2019.125092.
- [180] „(2) (PDF) Post-hydrothermal treatment of hydrothermal electrodeposited CaHPO<sub>4</sub> on C/C composites in sodium silicate-containing solution at various temperatures”. [https://www.researchgate.net/publication/336208768\\_Post-hydrothermal\\_treatment\\_of\\_hydrothermal\\_electrodeposited\\_CaHPO\\_4\\_on\\_CC\\_composites\\_in\\_sodium\\_silicate-](https://www.researchgate.net/publication/336208768_Post-hydrothermal_treatment_of_hydrothermal_electrodeposited_CaHPO_4_on_CC_composites_in_sodium_silicate-)

containing\_solution\_at\_various\_temperatures#fullTextFileContent (dostęp 4 czerwiec 2023).

- [181] H. J. Bae i in., „High-Aspect Ratio  $\beta$ -Ga<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanorods via Hydrothermal Synthesis”, *Nanomaterials* 2018, Vol. 8, Page 594, t. 8, nr 8, s. 594, sie. 2018, doi: 10.3390/NANO8080594.
- [182] F. Shi i H. Qiao, „Influence of hydrothermal reaction time on crystal qualities and photoluminescence properties of  $\beta$ -Ga<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanorods”, *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, t. 31, nr 22, s. 20223–20231, lis. 2020, doi: 10.1007/S10854-020-04542-W.
- [183] L. Berzina-Cimdina i N. Borodajenko, „6 Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy”, Dostęp: 4 czerwiec 2023. [Online]. Dostępne na: [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com)
- [184] S. Haq i in., „Green Synthesis of Silver Oxide Nanostructures and Investigation of Their Synergistic Effect with Moxifloxacin Against Selected Microorganisms”, *J Inorg Organomet Polym Mater*, t. 31, nr 3, s. 1134–1142, mar. 2021, doi: 10.1007/S10904-020-01763-8/TABLES/2.
- [185] A. Łukaszczyk, S. Zimowski, W. Pawlak, B. Dubiel, i T. Moskalewicz, „Microstructure, Micro-Mechanical and Tribocorrosion Behavior of Oxygen Hardened Ti–13Nb–13Zr Alloy”, *Materials* 2021, Vol. 14, Page 2088, t. 14, nr 8, s. 2088, kwi. 2021, doi: 10.3390/MA14082088.
- [186] A. Łukaszczyk, S. Zimowski, W. Pawlak, B. Dubiel, i T. Moskalewicz, „Microstructure, Micro-Mechanical and Tribocorrosion Behavior of Oxygen Hardened Ti–13Nb–13Zr Alloy”, *Materials* 2021, Vol. 14, Page 2088, t. 14, nr 8, s. 2088, kwi. 2021, doi: 10.3390/MA14082088.
- [187] B. AlMangour, D. Grzesiak, i J. M. Yang, „Scanning strategies for texture and anisotropy tailoring during selective laser melting of TiC/316L stainless steel nanocomposites”, *J Alloys Compd*, t. 728, s. 424–435, grudz. 2017, doi: 10.1016/J.JALLCOM.2017.08.022.
- [188] T. Ishimoto, K. Hagihara, K. Hisamoto, S. H. Sun, i T. Nakano, „Crystallographic texture control of beta-type Ti–15Mo–5Zr–3Al alloy by selective laser melting for the development of novel implants with a biocompatible low Young’s modulus”, *Scr Mater*, t. 132, s. 34–38, kwi. 2017, doi: 10.1016/J.SCRIPTAMAT.2016.12.038.
- [189] P. Gao, M. Fu, M. Zhan, Z. Lei, i Y. Li, „Deformation behavior and microstructure evolution of titanium alloys with lamellar microstructure in hot working process: a review”, *J Mater Sci Technol*, t. 39, s. 56–73, luty 2020, doi: 10.1016/J.JMST.2019.07.052.
- [190] D. Wei, Y. Zhou, Y. Wang, i D. Jia, „Characteristic of microarc oxidized coatings on titanium alloy formed in electrolytes containing chelate complex and nano-HA”, *Appl Surf Sci*, t. 253, nr 11, s. 5045–5050, mar. 2007, doi: 10.1016/J.APSUSC.2006.11.012.

- [191] L. P. Qiao, J. Lou, S. F. Zhang, B. Qu, W. H. Chang, i R. F. Zhang, „The entrance mechanism of calcium and phosphorus elements into micro arc oxidation coatings developed on Ti6Al4V alloy”, *Surf Coat Technol*, t. 285, s. 187–196, sty. 2016, doi: 10.1016/J.SURFCOAT.2015.11.041.
- [192] X. Fan i in., „Preparation of bioactive TiO film on porous titanium by micro-arc oxidation”, *Appl Surf Sci*, t. 258, nr 19, s. 7584–7588, lip. 2012, doi: 10.1016/J.APSUSC.2012.04.093.
- [193] A. L. Yerokhin, X. Nie, A. Leyland, A. Matthews, i S. J. Dowey, „Plasma electrolysis for surface engineering”, *Surf Coat Technol*, t. 122, nr 2–3, s. 73–93, grudz. 1999, doi: 10.1016/S0257-8972(99)00441-7.
- [194] J. H. Wang, J. Wang, Y. Lu, M. H. Du, i F. Z. Han, „Effects of single pulse energy on the properties of ceramic coating prepared by micro-arc oxidation on Ti alloy”, *Appl Surf Sci*, t. 324, s. 405–413, sty. 2015, doi: 10.1016/j.apsusc.2014.10.145.
- [195] R. B. Heimann, „Structure, properties, and biomedical performance of osteoconductive bioceramic coatings”, *Surf Coat Technol*, t. 233, s. 27–38, paź. 2013, doi: 10.1016/j.surfcoat.2012.11.013.
- [196] S. Kashyap, K. Griep, i J. A. Nychka, „Crystallization kinetics, mineralization and crack propagation in partially crystallized bioactive glass 45S5”, *Materials Science and Engineering C*, t. 31, nr 4, s. 762–769, maj 2011, doi: 10.1016/j.msec.2010.06.019.
- [197] L. Chen i in., „High temperature tribological behavior of microarc oxidation film on Ti-39Nb-6Zr alloy”, *Surf Coat Technol*, t. 347, s. 29–37, sie. 2018, doi: 10.1016/j.surfcoat.2018.04.062.
- [198] J. Karbowniczek, F. Muhaffel, G. Cempura, H. Cimenoglu, i A. Czyrska-Filemonowicz, „Influence of electrolyte composition on microstructure, adhesion and bioactivity of micro-arc oxidation coatings produced on biomedical Ti6Al7Nb alloy”, *Surf Coat Technol*, t. 321, s. 97–107, lip. 2017, doi: 10.1016/j.surfcoat.2017.04.031.
- [199] M. B. Sedelnikova i in., „Comparative investigations of structure and properties of micro-arc wollastonite-calcium phosphate coatings on titanium and zirconium-niobium alloy”, *Bioact Mater*, t. 2, nr 3, s. 177–184, wrz. 2017, doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.01.002.
- [200] J. Wang i in., „Effect of electrolyte composition on the microstructure and bio-corrosion behavior of micro-arc oxidized coatings on biomedical Ti6Al4V alloy”, *Journal of Materials Research and Technology*, t. 9, nr 2, s. 1477–1490, mar. 2020, doi: 10.1016/J.JMRT.2019.11.073.
- [201] C. S. Chien i in., „Preparation and characterization of porous bioceramic layers on pure titanium surfaces obtained by micro-arc oxidation process”, *Appl Phys a Mater Sci Process*, t. 123, nr 3, s. 1–10, mar. 2017, doi: 10.1007/s00339-017-0765-0.

- [202] G. Love, V. D. Scott, N. M. T. Dennis, i L. Laurenson, „Sources of contamination in electron optical equipment”, *Scanning*, t. 4, nr 1, s. 32–39, sty. 1981, doi: 10.1002/sca.4950040105.
- [203] Y. Han, S. H. Hong, i K. Xu, „Structure and in vitro bioactivity of titania-based films by micro-arc oxidation”, *Surf Coat Technol*, t. 168, nr 2–3, s. 249–258, maj 2003, doi: 10.1016/S0257-8972(03)00016-1.
- [204] L. Wang i in., „Metal material surface wettability increase induced by electron beam irradiation”, *Appl Surf Sci*, t. 511, s. 145555, maj 2020, doi: 10.1016/j.apsusc.2020.145555.
- [205] S. Acharya, A. G. Panicker, D. V. Laxmi, S. Suwas, i K. Chatterjee, „Study of the influence of Zr on the mechanical properties and functional response of Ti-Nb-Ta-Zr-O alloy for orthopedic applications”, *Mater Des*, t. 164, s. 107555, luty 2019, doi: 10.1016/j.matdes.2018.107555.
- [206] D. A. H. Hanaor i C. C. Sorrell, „Review of the anatase to rutile phase transformation”, *Journal of Materials Science*, t. 46, nr 4. Springer, s. 855–874, 8 luty 2011. doi: 10.1007/s10853-010-5113-0.
- [207] C. Wang i in., „The influence of alloy elements in Ti–6Al–4V and Ti–35Nb–2Ta–3Zr on the structure, morphology and properties of MAO coatings”, *Vacuum*, t. 157, s. 229–236, lis. 2018, doi: 10.1016/j.vacuum.2018.08.054.
- [208] P. Zhang, Z. Zhang, W. Li, i M. Zhu, „Effect of Ti-OH groups on microstructure and bioactivity of TiO<sub>2</sub> coating prepared by micro-arc oxidation”, *Appl Surf Sci*, t. 268, s. 381–386, mar. 2013, doi: 10.1016/j.apsusc.2012.12.105.
- [209] Q. Du i in., „The effect of applied voltages on the structure, apatite-inducing ability and antibacterial ability of micro arc oxidation coating formed on titanium surface”, *Bioact Mater*, t. 3, nr 4, s. 426–433, grudz. 2018, doi: 10.1016/J.BIOACTMAT.2018.06.001.
- [210] B. Bhushan, B. K. Gupta, i M. H. Azarian, „Nanoindentation, microscratch, friction and wear studies of coatings for contact recording applications”, *Wear*, t. 181–183, nr PART 2, s. 743–758, mar. 1995, doi: 10.1016/0043-1648(95)90191-4.
- [211] W. G. Jiang, J. J. Su, i X. Q. Feng, „Effect of surface roughness on nanoindentation test of thin films”, *Eng Fract Mech*, t. 75, nr 17, s. 4965–4972, lis. 2008, doi: 10.1016/j.engfracmech.2008.06.016.
- [212] X. Chen i J. J. Vlassak, „Numerical study on the measurement of thin film mechanical properties by means of nanoindentation”, *J Mater Res*, t. 16, nr 10, s. 2974–2982, 2001, doi: 10.1557/JMR.2001.0408.
- [213] R. Saha i W. D. Nix, „Effects of the substrate on the determination of thin film mechanical properties by nanoindentation”, *Acta Mater*, t. 50, nr 1, s. 23–38, sty. 2002, doi: 10.1016/S1359-6454(01)00328-7.

- [214] Y. Xiang, X. Chen, T. Y. Tsui, J. I. Jang, i J. J. Vlassak, „Mechanical properties of porous and fully dense low- $\kappa$  dielectric thin films measured by means of nanoindentation and the plane-strain bulge test technique”, *J Mater Res*, t. 21, nr 2, s. 386–395, luty 2006, doi: 10.1557/jmr.2006.0045.
- [215] X. Chen, Y. Xiang, i J. J. Vlassak, „Novel technique for measuring the mechanical properties of porous materials by nanoindentation”, 2020, doi: 10.1557/JMR.2006.0088.
- [216] Z. Chen, „Nanoindentation of Macro-porous Materials for Elastic Modulus and Hardness Determination”, w *Applied Nanoindentation in Advanced Materials*, John Wiley & Sons, Ltd, 2017, s. 135–156. doi: 10.1002/9781119084501.ch6.
- [217] K. D. Bouzakis, N. Michailidis, S. Hadjiyiannis, G. Skordaris, i G. Erkens, „The effect of specimen roughness and indenter tip geometry on the determination accuracy of thin hard coatings stress-strain laws by nanoindentation”, *Mater Charact*, t. 49, nr 2, s. 149–156, wrz. 2002, doi: 10.1016/S1044-5803(02)00361-3.
- [218] S. Durdu, Ö. F. Deniz, I. Kutbay, i M. Usta, „Characterization and formation of hydroxyapatite on Ti6Al4V coated by plasma electrolytic oxidation”, *J Alloys Compd*, t. 551, s. 422–429, luty 2013, doi: 10.1016/J.JALLCOM.2012.11.024.
- [219] S. Cheng, D. Wei, Y. Zhou, i H. Guo, „Characterization and properties of microarc oxidized coatings containing Si, Ca and na on titanium”, *Ceram Int*, t. 37, nr 6, s. 1761–1768, sie. 2011, doi: 10.1016/j.ceramint.2011.03.006.
- [220] Y. Su, S. Komasa, T. Sekino, H. Nishizaki, i J. Okazaki, „Nanostructured Ti6Al4V alloy fabricated using modified alkali-heat treatment: Characterization and cell adhesion”, *Materials Science and Engineering C*, t. 59, s. 617–623, luty 2016, doi: 10.1016/j.msec.2015.10.077.
- [221] X. Zhu, K. H. Kim, i Y. Jeong, „Anodic oxide films containing Ca and P of titanium biomaterial”, *Biomaterials*, t. 22, nr 16, s. 2199–2206, sie. 2001, doi: 10.1016/S0142-9612(00)00394-X.
- [222] L. T. Duarte, C. Bolfarini, S. R. Biaggio, R. C. Rocha-Filho, i P. A. P. Nascente, „Growth of aluminum-free porous oxide layers on titanium and its alloys Ti-6Al-4V and Ti-6Al-7Nb by micro-arc oxidation”, *Materials Science and Engineering: C*, t. 41, s. 343–348, sie. 2014, doi: 10.1016/J.MSEC.2014.04.068.
- [223] B. D. Beake, „The influence of the H/E ratio on wear resistance of coating systems – Insights from small-scale testing”, *Surf Coat Technol*, t. 442, s. 128272, lip. 2022, doi: 10.1016/J.SURFCOAT.2022.128272.
- [224] Y. Ram i in., „Predicting microbial growth in a mixed culture from growth curve data”, *Proc Natl Acad Sci u S A*, t. 116, nr 29, s. 14698–14707, lip. 2019, doi:



- [225] H. Salman, „Bacterial Growth: Cell-Cycle Dependent Growth-Rate Homeostasis”, *Current Biology*, t. 30, nr 12, s. R703–R704, cze. 2020, doi: 10.1016/J.CUB.2020.05.001.
- [226] J. A. Davidson, A. K. Mishra, P. Kovacs, i R. A. Poggie, „New Surface-Hardened, Low-Modulus, Corrosion-Resistant Ti-13Nb-13Zr Alloy for Total HIP Arthroplasty”, *Biomed Mater Eng*, t. 4, nr 3, s. 231–243, sty. 1994, doi: 10.3233/BME-1994-4310.
- [227] A. Sak i in., „Influence of polyetheretherketone coatings on the Ti–13Nb–13Zr titanium alloy’s bio-tribological properties and corrosion resistance”, *Materials Science and Engineering: C*, t. 63, s. 52–61, cze. 2016, doi: 10.1016/J.MSEC.2016.02.043.
- [228] M. Geetha, A. K. Singh, A. K. Gogia, i R. Asokamani, „Effect of thermomechanical processing on evolution of various phases in Ti–Nb–Zr alloys”, *J Alloys Compd*, t. 384, nr 1–2, s. 131–144, grudz. 2004, doi: 10.1016/J.JALLCOM.2004.04.113.
- [229] G. J. London, „TITANIUM MATRIX COMPOSITES.”, t. 3, s. 2389–2410, 1982, doi: 10.1007/978-3-540-73036-1\_9/COVER.
- [230] N. Yumak i K. Aslantas, „A review on heat treatment efficiency in metastable  $\beta$  titanium alloys: the role of treatment process and parameters”, *Journal of Materials Research and Technology*, t. 9, nr 6, s. 15360–15380, lis. 2020, doi: 10.1016/J.JMRT.2020.10.088.
- [231] M. Fischer, D. Joguet, G. Robin, L. Peltier, i P. Laheurte, „In situ elaboration of a binary Ti–26Nb alloy by selective laser melting of elemental titanium and niobium mixed powders”, *Materials Science and Engineering: C*, t. 62, s. 852–859, maj 2016, doi: 10.1016/J.MSEC.2016.02.033.
- [232] G. Yang, Y. Xie, S. Zhao, L. Qin, X. Wang, i B. Wu, „Quality Control: Internal Defects Formation Mechanism of Selective Laser Melting Based on Laser-powder-melt Pool Interaction: a Review”, *Chinese Journal of Mechanical Engineering: Additive Manufacturing Frontiers*, t. 1, nr 3, s. 100037, wrz. 2022, doi: 10.1016/J.CJMEAM.2022.100037.
- [233] L. Zhou, T. Yuan, R. Li, J. Tang, M. Wang, i F. Mei, „Microstructure and mechanical properties of selective laser melted biomaterial Ti-13Nb-13Zr compared to hot-forging”, *Materials Science and Engineering: A*, t. 725, s. 329–340, maj 2018, doi: 10.1016/J.MSEA.2018.04.001.



## SPIS RYSUNKÓW

|   |     |
|---|-----|
| <b>Rysunek 1</b> Schemat przemiany fazowej $\alpha \rightarrow \beta$ stopów stopów na osnowie Ti, na bazie pierwiastków stopowych (a) i odpowiadających im struktur krystalograficznych hcp- $\alpha$ i bcc- $\beta$ (b) (Parametry sieci odpowiadają wartościom czystego tytanu w temperaturze pokojowej i 900°C), na podstawie [2] .....   | 25  |
| <b>Rysunek 2</b> Klasyfikacja stopów tytanu, na podstawie [5] .....   | 26  |
| <b>Rysunek 3</b> Klasyfikacja technologii addytywnej AM, na podstawie [61].....   | 40  |
| <b>Rysunek 4</b> Podział modyfikacji powierzchni, na podstawie [28].....  | 46  |
| <b>Rysunek 5</b> Schematy powiązanych zjawisk podczas procesu MAO [94] .....  | 52  |
| <b>Rysunek 6</b> Schematyczny przebieg pojedynczego wyładowania plazmowego w elektrolicie, na podstawie [92] .....  | 54  |
| <b>Rysunek 7</b> Uproszczony schemat badań własnych.....  | 80  |
| <b>Rysunek 8</b> Schemat procesu SLM: początek procesu budowania próbki, spiekanie proszku wiązką lasera według przedstawionej ścieżki skanowania (a), końcowy etap budowania próbek ukazujący próbki umieszczone na podporach, kierunek budowania elementu i orientację względem platformy roboczej pod kątem 90°(b) .....   | 82  |
| <b>Rysunek 9</b> Schemat stanowiska MAO.....  | 86  |
| <b>Rysunek 10</b> Obraz makroskopowy (a, b) i mikroskopowy SEM (a', b'): próbek SLM (a, a') oraz próbek SLM po szlifowaniu (b, b') .....  | 97  |
| <b>Rysunek 11</b> Krzywe zależności napięcia od czasu (a–c) i natężenia prądu od czasu (a'–c') procesu MAO dla: MAO_32_15 (a, a'), MAO_32_10 (b, b') i MAO_50_10 (c, c').....   | 100 |
| <b>Rysunek 12</b> Topografia powierzchni SEM warstw MAO wytworzonych przy różnych parametrach procesu: MAO_32_15_200 (a), MAO_32_15_300 (b), MAO_32_15_400 (c), MAO_32_10_200 (d), MAO_32_10_300 (e), MAO_32_10_400 (f), MAO_51_10_200 (g), MAO_5 h), MAO_50_10_400 (i), z zaznaczonymi dwoma różnymi obszarami (I, II) uzyskanymi w MAO_200 (a) i mikropęknięciami uzyskanymi w MAO_400 (c) oraz obrazy makroskopowe warstw MAO dla wybranych próbek, od lewej: MAO_32_15_400 i 32_15_300 (j) (przedstawione wyniki są reprezentatywne dla trzech analiz każdej grupy próbek)..... | 102 |
| <b>Rysunek 13</b> Średnica porów w zależności od zastosowanych parametrów wytwarzania warstw MAO: histogramy wraz z rozkładem normalnym i średnią średnicą porów (n=250) .....  | 103 |

- Rysunek 14** Grubość warstw MAO wytworzonych przy różnych parametrach procesu ( $n = 25$ ; dane to średnie  $\pm$  SD; <sup>a</sup> istotnie różne w grupach ( $p < 0,05$ ), <sup>b</sup> istotnie różne między grupami czasowymi ( $p < 0,05$ ), <sup>c</sup> istotnie różne między grupami natężenia prądu ( $p < 0,05$ ))..... 104
- Rysunek 15** Analiza składu pierwiastkowego powierzchni EDS [% at.] kontroli i warstw MAO wytworzonych przy różnych parametrach procesu (przedstawione wyniki są reprezentatywne dla trzech analiz każdej próbki poddanej obróbce powierzchniowej) ..... 105
- Rysunek 16** Dyfraktogramy rentgenowskie wybranych próbek: warstwy MAO otrzymane przy różnych przyłożonych napięciach przy stałym natężeniu prądu 32 mA i czasie procesu równym 15 min: MAO\_32\_15\_200 (a), MAO\_32\_15\_300 (b), MAO\_32\_15\_400 (c), kontrola (d), (przedstawione wyniki są reprezentatywne dla trzech analiz każdej próbki obróbki powierzchniowej) ..... 107
- Rysunek 17** Morfologie próbek po inkubacji w roztworze Hanksa przez 72 h (a): warstwy MAO otrzymane przy różnych przyłożonych napięciach w stałym natężeniu prądu 32 mA i czasie obróbki równym 15 min. Stosunek Ca/P próbek przed i po inkubacji (b) (przedstawione wyniki są reprezentatywne dla trzech analiz każdej próbki poddanej obróbce powierzchniowej) ..... 109
- Rysunek 18** Krzywa obciążenia i przemieszczenia nanoindentacji uzyskana dla badanych warstw MAO otrzymanych przy różnych parametrach procesu oraz próbek kontrolnych (a–c): MAO\_32\_15 (a), MAO\_32\_10 (b) i MAO\_50\_10 (c) ( $n=25$ )..... 111
- Rysunek 19** Właściwości nanomechaniczne: nanotwardość (a), maksymalna głębokość indentacji (b), moduł Younga (c),  $E_{\text{warstwy}}/E_{\text{podłoża}}$  (d),  $H/E$  (e),  $H^3/E^2$  (f), grup kontrolnych i badanych warstw MAO wytworzonych przy różnych parametrach procesu ( $n = 10$ ; \* istotnie różne od kontroli, <sup>a</sup> istotnie różne w grupach, <sup>b</sup> istotnie różne między grupami z różnymi czasami wytwarzania, <sup>c</sup> istotnie różne między grupami z różnym natężeniem prądu, ( $p < 0,05$ )) 112
- Rysunek 20** Ścieżka zarysowania z zaznaczonymi uszkodzeniami kohezyjnymi i adhezyjnymi powstałymi w teście zarysowania (a-c), oraz zależność siły tarcia ( $F$ ), emisji akustycznej i głębokości penetracji pod obciążeniem ( $L$ ) ze wskazanymi obciążeniami krytycznymi ( $L_{c1}$ ,  $L_{c2}$ ,  $L_{c3}$ ) (a'–c') wybranych grup próbek o zmiennych parametrach napięcia: MAO\_32\_15\_200 (a,a'); MAO\_32\_15\_300 (b,b'); MAO\_32\_15\_400 (c,c') (przedstawione wyniki są reprezentatywne dla dziesięciu analizy każdej próbki obróbki powierzchniowej) ..... 115
- Rysunek 21** Topografia powierzchni SEM warstw MAO wytworzonych przy dwóch różnych napięciach w elektrolicie bazowym z i bez dodatków srebra/galu wraz z histogramami przedstawiającymi średnicę porów ( $n=250$ )..... 121
- Rysunek 22** Topografie powierzchni AFM kontroli i warstw MAO wytworzonych przy dwóch różnych napięciach w elektrolicie bazowym z i bez dodatków srebra/galu ..... 122

- Rysunek 23** Przekrój wybranych warstw MAO (wraz z zaznaczoną grubością) wytworzonych przy zastosowanym napięciu 300 i 400 V w elektrolicie zawierającym 3 mM azotanu srebra lub 3 mM azotanu galu ..... 124
- Rysunek 24** Widma EDS wraz z atomowym i wagowym udziałem danych pierwiastków w warstwach bazowych i warstwach wytworzonych w elektrolicie zawierającym różne stężenia azotanu srebra ( $n = 3$ ; dane to średnie  $\pm$ SD)126
- Rysunek 25** Widma EDS wraz z atomowym i wagowym udziałem danych pierwiastków w warstwach bazowych i warstwach wytworzonych w elektrolicie zawierającym różne stężenia azotanu galu ( $n = 3$ ; dane to średnie  $\pm$ SD).. 127
- Rysunek 26** Stosunek wapnia do fosforu dla różnych parametrów wytwarzania warstw MAO wraz z zaznaczeniem wartości stechiometrycznego hydroksyapatytu ( $n = 3$ ; dane to średnie  $\pm$ SD; \* istotnie różne między grupami napięcia,  $p < 0.05$ ) ..... 127
- Rysunek 27** Przekroje wraz z widmami EDS wybranych warstw MAO wytworzonych przy zastosowanym napięciu 300 i 400 V w elektrolicie zawierającym 3 mM azotanu srebra lub 3 mM azotanu galu oraz przykładowy rozkład pierwiastków na przekroju ..... 128
- Rysunek 28** Dyfraktogramy rentgenowskie warstw MAO wytworzonych w elektrolicie bazowanym oraz z dodatkiem: srebra (a), galu (b), (przedstawione wyniki są reprezentatywne dla trzech analiz każdej próbki obróbki powierzchniowej) ..... 130
- Rysunek 29** Widma w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) przykładowych próbek z dodatkiem srebra lub galu, rejestrowane za pomocą spektrofotometru ..... 131
- Rysunek 30** Zwilżalność powierzchni kontroli i warstw MAO wytworzonych przy różnych parametrach procesu ..... 132
- Rysunek 31** Właściwości nanomechaniczne warstw MAO wraz z dodatkami bioaktywnymi: nanotwardość (a), moduł Younga (b), H/E (c) ( $n = 10$ ; dane to średnie  $\pm$ SD; # istotnie różne od kontroli, \* istotnie różne między grupami napięcia, a istotnie różne od próbek wytwarzanych w tych samych warunkach napięciowych, ale w elektrolicie bez dodatku srebra/galu, <sup>b</sup> istotnie różne od próbek wytwarzanych w tym samym warunkach napięciowych, ale z inną zawartością dodatku srebra/galu, <sup>c</sup> istotnie różne od próbek wytwarzanych w tych samych warunkach napięciowych ale z innym dodatkiem: srebra/galu; ( $p < 0.05$ )) ..... 133
- Rysunek 32** Zdjęcie SEM przedstawiające przykładowe uszkodzenia (pęknięcia poprzeczne i spiętrzenia zaznaczone odpowiednio strzałkami) powstałe w trakcie testu zarysowania (rysa zaznaczona ramką) dla przykładowych próbek: MAO\_300 (a), MAO\_300\_03Ag (b), MAO\_300\_3Ga (c), MAO\_400\_3Ga (d) ..... 135
- Rysunek 33** Zmiana topografii zarejestrowana przed i po zarysowaniu (a-k) oraz zależność siły tarcia ( $F_t$ ) od siły normalnej  $F_n$  warstw MAO (a'-k')

(przedstawione wyniki są reprezentatywne dla dziesięciu analiz każdej próbki po obróbce powierzchniowej) ..... 138

**Rysunek 34** Szybkość uwalniania jonów srebra/galu do roztworu PBS z warstw MAO wytworzonych przy zmiennych parametrach ( $n = 6$ ; dane to średnie  $\pm$ SD; Wykres (a): \* istotnie różne między grupami napięcia, <sup>b</sup> istotnie różne od próbek wytwarzanych w tym samym warunkach napięciowych, ale z inną zawartością dodatku srebra/galu, <sup>c</sup> istotnie różne od próbek wytwarzanych w tych samych warunkach napięciowych, ale z innym dodatkiem: srebra/galu,; Wykres (b): <sup>#</sup> istotnie różne między dniami inkubacji ( $p < 0.05$ ) ..... 139

**Rysunek 35** Wpływ powierzchni kontroli i warstw MAO wytworzonych przy różnych parametrach procesu na żywotność komórek wyrażoną testem MTT ( $n = 6$ ; dane to średnie  $\pm$ SD; Wykres (a): a istotny wpływ dodatku galu lub srebra, <sup>b</sup> istotnie różne od próbek wytwarzanych w tym samym warunkach napięciowych, ale z inną zawartością dodatku srebra/galu, <sup>c</sup> istotnie różne od próbek wytwarzanych w tych samych warunkach napięciowych, ale z innym dodatkiem: srebra/galu, \* istotnie różne między grupami napięcia; Wykres (b): <sup>#</sup> istotnie różne od kontroli, <sup>\$</sup> istotnie różne między dniami inkubacji ( $p < 0.05$ )) ..... 141

**Rysunek 36** Logarytm 10 z liczby kolonii bakteryjnych (CFU/mL) dwóch szczepów bakterii: E. coli i S. aureus po 4 i 24 h inkubacji, dla kontroli i warstw MAO wytworzonych przy zmiennych parametrach: (a) Bakterie adherentne, (b) bakterie planktoniczne, (c) szczep E. coli, (d) szczep S. aureus ( $n = 3$ ; dane to średnie  $\pm$ SD; Wykresy (a), (b): <sup>#</sup> istotnie różne od kontroli, a istotny wpływ dodatku galu lub srebra, <sup>c</sup> istotnie różne od próbek wytwarzanych w tych samych warunkach napięciowych ale z innym dodatkiem: srebra/galu, \* istotnie różne między grupami napięcia ; <sup>\$</sup> istotnie różne między czasem inkubacji, <sup>x</sup> istotnie różne między szczepem bakterii; czerwona pozioma przerywana linia na wykresie (b) zaznacza początkowe inokulum zawiesiny bakteryjnej; Wykresy (c), (d): <sup>@</sup> istotnie różne między formą bakterii: planktoniczna/biofilm, ( $p < 0.05$ )) ..... 143

**Rysunek 37** Bakterie E. coli i S. aureus występujące na próbkach referencyjnych i warstwach MAO wytworzonych przy zmiennych parametrach, uzyskane w obrazowaniu SEM (pierwsza i czwarta kolumna) oraz mikroskopu fluorescencyjnego przedstawiające obraz żywych bakterii (druga i piąta kolumna) oraz obraz martwych bakterii (trzecia i szоста kolumna) ..... 146

**Rysunek 38** Obrazy mikroskopii świetlnej (a, b) i elektronowej (a', a'', b', b'') wytrawionej próbki wytworzonej metodą SLM (a) oraz wytrawionej próbki w formie komercyjnego pręta (b), gdzie strzałki wskazują granice jeziorka topliwego, okrąg: porowatość) ..... 148

**Rysunek 39** Widma EDS wraz z atomowym i masowym udziałem danych pierwiastków: wytrawionej próbki wytworzonej metodą SLM (b) oraz wytrawionej próbki w formie komercyjnego pręta (a) ..... 150

- Rysunek 40** Dyfraktogramy rentgenowskie referencji wytworzonej: metodą SLM oraz z komercyjnego pręta (przedstawione wyniki są reprezentatywne dla trzech analiz każdej grupy) ..... 150
- Rysunek 41** Topografia powierzchni SEM wraz z widmami EDS i składem chemicznym powierzchni warstw MAO wytworzonych na materiale kontrolnym SLM i materiale kontrolnym w postaci pręta..... 151
- Rysunek 42** Histogramy przedstawiające średnicę porów (a) (n=250), grubość (b), topografie powierzchni AFM wraz ze średnią chropowatością Sa (c) warstw MAO wytworzonych na materiale kontrolnym SLM i materiale kontrolnym w postaci pręta (n=20) (dane to średnie  $\pm$ SD, \*istotnie różne między grupami napięcia(p<0.05))..... 153
- Rysunek 43** Przekroje warstw MAO oraz widma EDS przedstawiające skład chemiczny warstw MAO wytworzonych na materiale kontrolnym SLM i materiale kontrolnym w postaci pręta (czerwone strzałki wskazują cząsteczki srebra) ..... 154
- Rysunek 44** Twardość kontroli wytworzonej metodą SLM oraz kontroli w postaci komercyjnego pręta walcowanego na gorąco (n = 6; dane to średnie  $\pm$ SD; \* istotnie różne między grupami, (p<0.05))..... 155
- Rysunek 45** Uwalnianie jonów srebra do PBS po 7 dniach inkubacji z warstw MAO wytworzonych przy różnych parametrach procesu na materiale macierzystym wytworzonym metodą SLM oraz na materiale macierzystym w postaci komercyjnego pręta walcowanego na gorąco (n = 6; dane to średnie  $\pm$ SD; \* istotnie różne między grupami napięcia, (p<0,05)) ..... 156
- Rysunek 46** Zwilżalność powierzchni kontroli wytworzonej metodą SLM oraz kontroli w postaci komercyjnego pręta walcowanego na gorąco, a także warstw MAO wytworzonych przy różnych parametrach procesu na danym materiale macierzystym (n = 6; dane to średnie  $\pm$ SD; # istotnie różne od kontroli w danej grupie \* istotnie różne między napięciami w ramach grupy, a istotnie różne między grupami, (p<0,05)) ..... 156
- Rysunek 47** Wytrącanie faz  $\alpha$ : a)  $\alpha_{GB}$ , b) Struktura płytkowa, c)  $\alpha_{WGB}$ , na podstawie: [189]..... 191



## SPIS TABEL

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabela 1</b> Klasyfikacja stopów tytanu uwzględniająca przemiany fazowe.....  | 27  |
| <b>Tabela 2</b> Wybrane stopy tytanu wraz z różnymi metodami wytworzenia, charakterystyką fazową, właściwościami biologicznymi i modułem Younga.....   | 29  |
| <b>Tabela 3</b> Właściwości mechaniczne kości gąbczastej i korowej.....  | 33  |
| <b>Tabela 4</b> Przykłady literaturowe wykorzystujące elektrolity zawierające wapń i fosfor z dodatkiem azotanu srebra i/lub galu do wytwarzania warstw MAO, wraz z parametrami procesu MAO i wybraną charakterystyką otrzymanych warstw.....  | 70  |
| <b>Tabela 5</b> Skład chemiczny proszku stopu Ti-13Zr-13Nb.....  | 81  |
| <b>Tabela 6</b> Skład chemiczny stopu Ti-13Zr-13Nb.....  | 82  |
| <b>Tabela 7</b> Oznaczenia warstw MAO wytwarzanych przy zmiennych parametrach procesu: napięcia, natężenia i czasu.....  | 84  |
| <b>Tabela 8</b> Oznaczenia warstw MAO wytwarzanych w zmiennych parametrach procesu: napięcia i składu elektrolitu.....   | 85  |
| <b>Tabela 9</b> Oznaczenia warstw MAO w zależności od metody wytwarzania materiału kontrolnego i napięcia procesu MAO.....   | 86  |
| <b>Tabela 10</b> Skład chemiczny roztworu Hanksa.....  | 91  |
| <b>Tabela 11</b> Skład chemiczny roztworu PBS.....   | 91  |
| <b>Tabela 12</b> Średnia chropowatość powierzchni Ra [ $\mu\text{m}$ ] próbki referencyjnej i warstw MAO wytworzonych przy różnych parametrach procesu (n = 6; dane to średnie $\pm\text{SD}$ ; * istotnie różne od kontroli; a istotnie różne od MAO_200 i MAO_300; <sup>b</sup> istotnie różne od MAO_400, (p < 0,05)).....                  | 105 |
| <b>Tabela 13</b> Stosunek Ca/P warstw MAO wytworzonych przy różnych parametrach procesu.....   | 106 |
| <b>Tabela 14</b> Zwilżalność powierzchni kontroli i warstw MAO wytworzonych przy różnych parametrach procesu.....  | 108 |
| <b>Tabela 15</b> Obciążenia krytyczne i krytyczna siła tarcia, przy których nastąpiło całkowite rozwarstwienie (Fc (Lc <sub>2</sub> )) zmierzone podczas testu zarysowania dla wszystkich warstw MAO (przedstawione wyniki są reprezentatywne dla pięciu analiz każdej próbki poddanej obróbce powierzchniowej).....                           | 116 |
| <b>Tabela 16</b> Chropowatość powierzchniowa Sa oraz chropowatość profilu Ra dla kontroli i warstw MAO wytworzonych w dwóch różnych napięciach w elektrolicie bazowym z i bez dodatków srebra/galu (n = 3; dane to średnie $\pm\text{SD}$ ; * istotnie różne między grupami napięcia; <sup>#</sup> istotnie różne od kontroli, a istotny wpływ |     |

dotatku galu lub srebra, <sup>b</sup> istotnie różne od próbek wytwarzanych w tym samych warunkach napięciowych, ale z inną zawartością dodatku srebra/galu, <sup>c</sup> istotnie różne od próbek wytwarzanych w tych samych warunkach napięciowych, ale z innym dodatkiem: srebra/galu) ..... 123

**Tabela 17** Grubość warstw MAO wytworzonych w dwóch różnych napięciach w elektrolicie bazowym z i bez dodatków srebra/galu (n=30; dane to średnie  $\pm$ SD\* istotnie różne między grupami napięcia, a istotny wpływ dodatku galu lub srebra, <sup>b</sup> istotnie różne od próbek wytwarzanych w tym samych warunkach napięciowych, ale z inną zawartością dodatku srebra/galu, <sup>c</sup> istotnie różne od próbek wytwarzanych w tych samych warunkach napięciowych, ale z innym dodatkiem: srebra/galu) ..... 125

**Tabela 18** Klasyfikacja aktywności przeciwbakteryjnej wobec dwóch szczepów bakterii po czasie inkubacji 4 i 24 h wyznaczona na podstawie współczynnika redukcji dla kontroli i warstw MAO wytworzonych przy zmiennych parametrach, gdzie x: brak aktywności przeciwdrobnoustrojowej ( $\leq 0.5$  log redukcji wzrostu drobnoustrojów), +: niewielka aktywność przeciwdrobnoustrojowa (0.5-1 log redukcji wzrostu drobnoustrojów), ++: średnia aktywność przeciwdrobnoustrojowa ( $>1$  do  $\leq 2$  log redukcji wzrostu drobnoustrojów), +++: dobra aktywność przeciwdrobnoustrojowa ( $>2$  do  $<3$  log), ++++: bardzo dobra aktywność przeciwdrobnoustrojowa ( $>3$  log); zielona ramka: aktywność bakteriobójczej ( $>99,9\%$  redukcji inokulum), niebieska ramka: aktywność bakteriostatyczna (90 do 99,9% redukcji inokulum) ..... 144

**Tabela 19** Stosunek Ca/P [at.%] warstw MAO wytworzonych na materiale kontrolnym SLM i materiale kontrolnym w postaci pręta. .... 152