

POLITECHNIKA ŚLĄSKA

WYDZIAŁ INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ

ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr inż. Żaneta Garczyk

*Trójwymiarowy model jako narzędzie do wyznaczenia
objętości porów biomateriału przeznaczonego do implantacji*

Promotor: dr hab. Sebastian Stach, profesor UŚ
dr hab. Andrzej Swinarew, profesor UŚ

Zabrze, 2022

Spis treści

1. WPROWADZENIE	4
2. STRESZCZENIE	6
3. ANALIZA STANU ZAGADNIENIA	8
3.1. Biomateriały – klasyfikacja	8
3.1.1. Biomateriały metaliczne	9
3.1.2. Biomateriały ceramiczne	12
3.1.3. Biomateriały polimerowe.....	15
3.1.4. Biomateriały węglowe	17
3.1.5. Biomateriały kompozytowe	19
3.2. Porowatość biomateriałów	22
3.2.1. Porowatość biomateriału a integracja z tkanką.....	24
3.2.2. Parametry materiałów porowatych	25
3.3. Porowata bioceramika	29
3.3.1. Metody otrzymywania porowatej bioceramiki	29
3.3.2. Porowata bioceramika jako materiał kośćcozastępczy.....	32
3.3.3. Porowate bioceramiczne powłoki implantów	35
3.3.4. Porowate bioceramiczne nośniki leków.....	44
3.4. Metody pomiaru porowatości biomateriału	48
3.4.1. Metody eksperymentalne	49
3.4.2. Metody mikroskopowe	52
3.4.3. Metody rentgenowskiej mikrotomografii komputerowej	55
4. CELE ORAZ ZAKRES ROZPRAWY	56
4.1. Cele rozprawy	56
4.2. Zakres i plan rozprawy	56
5. BADANIA WŁASNE	58
5.1. Materiał badawczy	58
5.2. Narzędzia badawcze	59
5.3. Mikroskopowe badania biomateriału	61
5.3.1. Analiza obrazów mikroskopowych.....	61
5.4. Trójwymiarowy model porów biomateriału	67
5.4.1. Założenia modelu.....	67
5.4.2. Implementacja modelu	67
5.4.3. Graficzny interfejs użytkownika programu	72
5.5. Symulacja komputerowa	78

5.6. Mikrotomograficzne badania biomateriału	83
5.6.1. Analiza obrazów mikrotomograficznych.....	85
5.7. Weryfikacja poprawności modelu.....	88
6. WNIOSKI KOŃCOWE I PODSUMOWANIE.....	89
7. LITERATURA	91
8. SPIS RYSUNKÓW	101
9. SPIS TABEL	103
10. STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	104
11. ABSTRACT OF THE DOCTORAL DISSERTATION	106

1. WPROWADZENIE

Materiały porowate cechują się występowaniem w stałym materiale pustych przestrzeni o różnych rozmiarach i kształtach, połączonych ze sobą i tworzących rozległą, nieregularną sieć. Porowatość materiału to właściwość ciał stałych określająca wielkość i ilość porów występujących wewnątrz materiału oraz opis ich rozmieszczenia w badanej przestrzeni. Porowatość definiuje się jako stosunek objętości zajmowanej przez pory do całkowitej objętości materiału i podaje w procentach. W materiałach występują pory otwarte oraz pory zamknięte. Pory otwarte to pory połączone między sobą i połączone z powierzchnią materiału. Pory zamknięte natomiast to pory izolowane, nie połączone między sobą.

Porowate materiały mają duże znaczenie w medycynie, ponieważ porowata powierzchnia determinuje połączenie implantu z tkanką poprzez wrastanie jej w pory biomateriału. Ponadto biomateriały porowate doskonale nadają się na nośniki leków, gdyż umożliwiają umieszczenie w porach materiału substancji leczniczej o działaniu antybakteryjnym i antyseptycznym, a następnie wprowadzenie leku bezpośrednio do organizmu człowieka podczas implantacji. Taki implant pozwala uniknąć powikłań pooperacyjnych, zapobiega tworzeniu się stanów zapalnych, jednocześnie niwelując wady leczenia ogólnoustrojowego, co powoduje obniżenie czasu i kosztów leczenia, a tym samym poprawia także komfort odczuwalny dla pacjenta.

Zastosowana metoda wytworzenia porowatego biomateriału decyduje o jego porowatości oraz wielkości i kształcie porów. Materiały stosowane w medycynie muszą spełniać określone wymagania. Dlatego też porowate materiały na implanty poddawane są różnorodnym badaniom, podczas których oprócz wyznaczenia porowatości, istotne jest także scharakteryzowanie wymiarów geometrycznych porów. Wymiary porów oraz połączenia między nimi wpływają bowiem na proces osteointegracji. Ponadto kontrola parametrów, takich jak objętość porów otwartych, pozwala bezpośrednio kontrolować objętość leku, który można umieścić w porach biomateriału i dostarczyć do organizmu wraz z implantem.

W charakterystyce porowatości biomateriałów stosuje się różne metody pomiaru. Jedną z eksperymentalnych metod jest porozymetria gazowa polegająca na pomiarze, a następnie analizie izoterm adsorpcji i desorpcji danego gazu przez próbkę. Istotną wadą metody jest jednak brak możliwości pomiaru makroporów (badane są przede wszystkim mezo- i mikropory). Ponadto problemem badań z wykorzystaniem porozymetrii gazowych jest ograniczenie wielkości próbek, gdyż standardowe urządzenia umożliwiają badanie próbek do 25 mm średnicy.

Kolejną, często stosowaną metodą pomiaru porowatości jest porozymetria rtęciowa polegająca na eksperymentalnym wyznaczeniu krzywej potencjału kapilarnego wiążącej objętość

rtęci wciśniętej w próbkę materiału porowatego z ciśnieniem wciskania, a następnie na jej interpretacji w oparciu o model przebiegu tego procesu w materiale porowatym. Metoda niesie ze sobą niestety wiele ograniczeń i przyczyn ewentualnych błędów. Wadą metody jest przede wszystkim zniszczenie próbki po pomiarach, ponieważ część rtęci pozostaje w porach (co związane jest z produkcją niebezpiecznych odpadów). Ponadto przy zastosowaniu wysokiego ciśnienia wtłaczania rtęci, istnieje możliwość deformacji próbki, zniszczenia jej struktury porowatej, a także otwierania porów zamkniętych. Dokładność metody spada zatem wraz ze wzrostem ciśnienia. Penetracja rtęci jest często ograniczona przez przewężenia porów, przez co szerokie pory w głębi materiału pozostają bez dostępu. W takim przypadku wyniki są obarczone dużym błędem, gdyż objętość szerokich porów ograniczana jest do wielkości pora o średnicy przewężenia. Wadą metody jest także brak możliwości badania mikroporów, a przy badaniu próbek z dużą ilością zamkniętych porów następuje zawyżanie powierzchni i objętości porów małych oraz średnich. Możliwość pomiaru porowatości z wykorzystaniem porozymetrów rtęciowych, podobnie jak przy porozymetrii gazowej, dotyczy wyłącznie próbek o małych wymiarach – do 15 mm średnicy.

Jedną z nieinwazyjnych technik pomiaru porowatości jest metoda mikroskopowa. Mikroskopia umożliwia analizę wymiarów geometrycznych porów poprzez obserwacje powierzchni przekrojów biomateriału. Jednak istotną wadą metody jest brak możliwości scharakteryzowania porów znajdujących się wewnątrz materiału.

Wady poszczególnych metod pomiaru porowatości biomateriałów, a także trudny dostęp do aparatury badawczej, koszty związane z prowadzeniem badań oraz czas trwania eksperymentów często ograniczają, a nawet uniemożliwiają prowadzenie badań. Na przeciw temu wychodzą metody oparte na modelowaniu oraz symulacji komputerowej. Metodyka modelowania polega na znajdowaniu opisu formalnego analizowanego systemu w postaci matematycznego modelu. Technika symulacji polega natomiast na wykorzystaniu komputera do obliczania wartości występujących w modelach matematycznych oraz na wizualizacji wyników w postaci dogodnej do analizy. Modele stanowią bazę współczesnych badań prawie we wszystkich dziedzinach nauki. Ich podstawową zaletą jest duża dokładność uzyskiwanych wyników oraz możliwość dynamicznej zmiany parametrów modelu lub warunków jego pracy.

W rozprawie podjęto próbę opracowania trójwymiarowego modelu porów biomateriału stanowiącego narzędzie do wyznaczania wymiarów geometrycznych porów zarówno wewnątrz materiału jak i na jego powierzchni, a w konsekwencji umożliwiającego wyznaczenie objętości porów otwartych oraz szacowania średniej objętości porów na jednostkę powierzchni biomateriału.

2. STRESZCZENIE

Tematem rozprawy doktorskiej jest trójwymiarowy model jako narzędzie do wyznaczania objętości porów biomateriału przeznaczonego do implantacji.

Rozprawa doktorska składa się z dwóch głównych części – przeglądu literatury obejmującego cztery pierwsze rozdziały oraz części doświadczalnej złożonej z siedmiu rozdziałów.

Pierwszy rozdział pracy opisuje podstawowe zagadnienia dotyczące materiałów wykorzystywanych w medycynie. Omówiono w nim klasyfikację biomateriałów z uwzględnieniem właściwości oraz zastosowania poszczególnych grup. Drugi rozdział dotyczy pojęcia porowatości oraz parametrów materiałów porowatych. W trzecim rozdziale opisano porowate materiały bioceramiczne wykorzystywane jako materiały kośćozastępcze, powłoki implantów oraz nośniki leków. Ponadto scharakteryzowano w nim metody otrzymywania porowatej bioceramiki. Czwarty rozdział poświęcony jest metodom pomiaru porowatości, takim jak metody eksperymentalne, metody mikroskopowe oraz metody rentgenowskiej mikrotomografii komputerowej.

W kolejnym rozdziale wyszczególniono cele, a także zakres oraz plan rozprawy.

Badania własne opisano w drugiej części rozprawy, która obejmuje rozdziały charakteryzujące materiał badawczy oraz narzędzia badawcze. Materiał badawczy stanowiły próbki porowatego biomateriału korundowego wytworzone metodą spieniania chemicznego. Natomiast narzędziami badawczymi były skaningowy laserowy mikroskop konfokalny LEXT OLS4000 oraz wysokorozdzielczy skaner rentgenowski GE Phoenix.

Kolejne rozdziały opisują proces tworzenia modelu składający się z trzech zasadniczych etapów. Pierwszy z nich to ustalenie założeń, które model powinien spełniać. W ramach tego etapu, przeprowadzono pomiary za pomocą mikroskopu konfokalnego. Obrazy pozyskane z wykorzystaniem mikroskopu poddano analizie w oprogramowaniu SPIP firmy Image Metrology, która pozwoliła wysegmentować z obrazu powierzchni pory i dokonać ich pomiarów. Na podstawie otrzymanych parametrów przyjęte zostały założenia modelu.

Kolejnym etapem była implementacja modelu. Model wraz z graficznym interfejsem użytkownika został zaimplementowany w środowisku programistycznym pakietu Matlab. Użytkownik ma możliwość określenia rozmiaru modelu, liczby porów oraz minimalnej i maksymalnej średnicy pora. Na podstawie tych parametrów generowany jest trójwymiarowy model. Kolejnym elementem jest możliwość wyboru płaszczyzny oraz pozycji przekroju. Generując przekrój użytkownik uzyskuje obraz powierzchni przedstawiający pory znajdujące się

w wybranej płaszczyźnie i pozycji przekroju oraz parametry je charakteryzujące. Model umożliwia określenie wymiarów geometrycznych porów zarówno wewnątrz materiału jak i na jego powierzchni, co daje możliwość wyznaczenia objętości porów otwartych oraz szacowania średniej objętości porów na jednostkę powierzchni materiału.

Ostatnia część badań obejmowała weryfikację opracowanego modelu. Metodę modelowania przetestowano poprzez porównanie wyników otrzymanych z wykorzystaniem modelu z danymi eksperymentalnymi uzyskanymi w wyniku mikrotomograficznych badań biomateriału.

W pierwszym kroku przeprowadzono symulację komputerową, w wyniku której wygenerowano trójwymiarową reprezentację porów biomateriału. Parametry wejściowe modelu dobrano w taki sposób, aby przekrój materiału otrzymany w wyniku przecięcia trójwymiarowego modelu płaszczyzną, charakteryzował się geometrią porów analogiczną do tej uzyskanej podczas wcześniejszej analizy obrazów mikroskopowych rzeczywistej powierzchni biomateriału.

Następnie próbki porowatego biomateriału korundowego poddano pomiarom za pomocą wysokorozdzielczego skanera rentgenowskiego. Serię projekcji będących bezpośrednim wynikiem badania, poddano rekonstrukcji, a następnie wygenerowano trójwymiarowe obrazy próbek. W kolejnym etapie przeprowadzono analizę danych z wykorzystaniem oprogramowania Thermo Scientific Avizo. Analiza umożliwiła wysegmentowanie porów i wykonanie ich precyzyjnych pomiarów, w wyniku których wyznaczono parametry charakteryzujące pory.

Porównując ze sobą wyniki uzyskane w obu etapach eksperymentu stwierdzono, że program generuje model o strukturze i geometrii porów zbliżonej do rzeczywistego biomateriału ceramicznego, co potwierdziło poprawność opracowanego modelu.

Ostatni rozdział rozprawy stanowi podsumowanie otrzymanych wyników badań w odniesieniu do celów rozprawy.

3. ANALIZA STANU ZAGADNIENIA

3.1. Biomateriały – klasyfikacja

Biomateriały stanowią specyficzną grupę materiałów charakteryzujących się różnym składem, budową i właściwościami. Cechą, która je łączy jest biotolerancja (biokompatybilność), która warunkuje ich zastosowanie w medycynie. Wynika ona z podobieństwa zarówno pod względem chemicznym, biologicznym jak i mechanicznym poszczególnych materiałów do tkanek, których funkcje mają zastąpić lub wspomóc [1].

Zgodnie z ustaleniami Konferencji Biomateriałów z roku 1982 (Biomaterials Consensus Conference at the National Institute of Health) przyjęto, że biomateriał to *każda substancja (inna niż lek) albo kombinacja substancji pochodzenia syntetycznego lub naturalnego, która może być użyta w dowolnym czasie, w całości lub części, celem leczenia, powiększenia lub zastąpienia tkanek narządu, organu lub funkcji ustroju* [2]. Z biomateriałów wytwarzane są różne postacie użytkowe implantów definiowanych jako przyrządy medyczne wykonywane z jednego lub większej liczby biomateriałów, które mogą być umieszczone wewnątrz organizmu, jak również częściowo lub całkowicie pod powierzchnią nabłonka, mogące pozostać przez dłuższy okres w organizmie. Na przestrzeni wielu lat doświadczeń i prowadzonych badań funkcje biomateriałów i implantów zmieniły swoje zastosowanie. Aktualnie nie służą już jedynie do zespolenia bądź zastępowania tkanki, ale również pomagają w procesie jej regeneracji [1,3,4].

Biomateriały posiadają szereg specyficznych właściwości, które je charakteryzują [5]. Bardzo ważny jest brak toksyczności i immunogenności, czyli ich obojętność chemiczna oraz farmakologiczna, aby nie wywoływały reakcji alergicznych, kancerogennych ani cytotoksycznych. Biomateriały powinny posiadać także odpowiednie właściwości mechaniczne (m.in. wysoką wytrzymałość zmęczeniową) oraz zdolność tłumienia drgań i bioaktywność. Materiały te powinny być również odporne na korozję, ścieranie oraz pękanie [6]. Uogólniając poszczególne właściwości, Marciniak wyróżnił następujące cechy biomateriałów [7]:

- zgodność bioelektromechaniczna biomateriału (odpowiednie własności półprzewodnikowe, piezoelektryczne i magnetyczne), która powinna minimalizować niekorzystną inicjację oraz rozwój procesów korozyjnych i biodegradacji, a w konsekwencji toksykologicznych, alergicznych, pirogennych i kancerogennych reakcji organizmu;
- zespół odpowiednich własności zapewniających bezpieczną i niezawodną współpracę układu implant-tkanka-płyn ustrojowy, w którym realizowany będzie biofizyczny mechanizm przenoszenia obciążeń.

W określaniu cech biomateriału uwzględniono zatem czynniki biochemiczne, bioelektroniczne oraz biomechaniczne, które bezpośrednio wpływają na procesy zachodzące w organizmie [7].

Ze względu na różnorodność biomateriałów pod względem charakteru chemicznego oraz struktury, klasyfikacji materiałów wszczepowych można dokonać stosując różne kryteria. W inżynierii biomateriałów wyróżnia się następujące grupy tworzyw o odmiennych właściwościach [1,7]:

- biomateriały metalowe;
- biomateriały ceramiczne;
- biomateriały polimerowe;
- biomateriały węglowe;
- biomateriały kompozytowe.

Klasyfikacja biomateriałów ze względu na ich zachowanie w organizmie wyróżnia natomiast materiały obojętne (prawie obojętne), które nie wywołują żadnej lub prawie żadnej reakcji otaczającej je tkanki, a także materiały aktywne, które dobrze wiążą się z otaczającą tkanką i stymulują rozwój nowego, zregenerowanego organu oraz materiały ulegające rozkładowi w środowisku organizmu ludzkiego, które po określonym czasie rozpuszczają się w otaczającej tkance i zostają przez nią wchłonięte, nie powodując jej uszkodzenia lub zmian patologicznych [1,5].

Nie istnieje i nie może istnieć jeden idealny biomateriał spełniający wszystkie wymagania stawiane materiałom implantacyjnym. Dlatego przydatność każdego materiału powinna być rozpatrywana indywidualnie pod kątem jego przyszłych zastosowań.

3.1.1. Biomateriały metaliczne

Metale i ich stopy należą do materiałów znanych i stosowanych w medycynie od wielu lat [3,8]. Biomateriały metaliczne charakteryzują się bardzo korzystnym zespołem właściwości mechanicznych. Za szczególnie istotne należy uznać wysoką odporność na korozję zmęczeniową, odporność na kruche pękanie oraz wytrzymałość na rozciąganie i zginanie. Przegląd historyczny rozwoju tworzyw metalicznych stosowanych w zabiegach chirurgicznych wskazuje, iż próbowano stosować praktycznie większość metali i stopów, które charakteryzowały się zadawalającą biotolerancją, odpornością na korozję oraz odpowiednimi własnościami fizykochemicznymi (głównie mechanicznymi). Rozwój konstrukcji implantów oraz gromadzenie doświadczeń klinicznych z ich użytkowaniem, a także przeprowadzane badania z zakresu biomechaniki i nad

biotolerancją wszczepionych tworzyw metalicznych, umożliwiły ocenę przydatności użytkowej poszczególnych metali i ich stopów, a tym samym wytypowanie określonych materiałów, które mogą być bezpiecznie stosowane w medycynie [1,7,9].

Opracowane zostały normy determinujące precyzyjne wymagania stawiane metalom i ich stopom przeznaczonym do implantacji. Wymagania, które tworzywa metaliczne powinny spełniać to wysoka odporność na korozję, dobra biotolerancja, odpowiedni skład chemiczny i fazowy, odpowiednie właściwości mechaniczne, elektryczne i magnetyczne, mały udział dyspersyjnych wtrąceń niemetalicznych, drobnoziarnistość struktury oraz określona jakość powierzchni implantów. Biomateriały metaliczne powinny również wykazywać zgodność tkankową, aby uniknąć wywoływania odczynów alergicznych, a także wykazywać dużą odporność na ścierne zużycie oraz nie powodować zakrzepów. Dodatkowo powinny cechować się możliwym do przyjęcia kosztem wytwarzania [7,9].

Można wyróżnić cztery podstawowe grupy biomateriałów metalicznych [1]:

- stale austenityczne;
- stopy na osnowie kobaltu;
- tytan i jego stopy;
- stopy z pamięcią kształtu.

Stale austenityczne to stale kwasoodporne, stanowiące grupę tworzyw, które najwcześniej zostały przystosowane do implantowania. Własności mechaniczne stali są uzależnione i dobierane pod względem rodzaju wyrobu, a tym samym uwarunkowań biomechanicznych oraz stosowanej techniki operacyjnej. Stale austenityczne stosowane w medycynie należą do biomateriałów metalicznych szczególnie narażonych na niszczenie wskutek przebiegu procesów korozji naprężeniowej. Jest to związane z ich najniższą spośród wszystkich stosowanych w medycynie biomateriałów metalicznych, odpornością na korozję elektrochemiczną w środowisku płynów ustrojowych oraz niższą niż m.in. dla stopów tytanu, skłonnością do samopasywacji. Jednoczesne oddziaływanie środowiska korozyjnego oraz naprężeń ściskających oraz rozciągających powoduje, że wytrzymałość implantu stalowego zmniejsza się. Najbardziej popularną stalą jest stal chromowo-niklowo-molibdenowa typu 316L. Jest to materiał, w którego skład wchodzi przede wszystkim chrom (16–25%), nikiel (powyżej 8%), molibden (ok. 3%) oraz mangan i azot w mniejszych ilościach. Zawartość węgla w stalach austenitycznych jest minimalna (poniżej 0,003%) [10]. Stale austenityczne służą głównie do wytwarzania igieł śródspikowych, narzędzi chirurgicznych, płytek kostnych, śrub i nakrętek, grotów i drutów kostnych, rzadziej endoprotez lub niektórych ich elementów [7].

Niewystarczająca dla wielu zastosowań bioinertność i odporność korozyjna stali stosowanych

na implanty była przyczyną opracowania nowych stopów na osnowie kobaltu. Stopy te charakteryzują się większą od austenitycznej stali chromowo-niklowo-molibdenowej biotolerancją, większą odpornością na korozję wżerową i szczelinową, a także lepszą zdolnością do repasywacji w roztworach fizjologicznych. Dzięki temu, mimo zawartości pierwiastków mogących niekorzystnie oddziaływać na organizm pacjenta, stopy te mogą być stosowane na implanty długotrwałe. Stopy na osnowie kobaltu to materiały cięższe niż stale austenityczne, ze względu na wyższą gęstość kobaltu niż żelaza, używanego jako osnowa w stalach austenitycznych. W stopach tych zawartość chromu wynosi 18–30%, molibdenu 2,5–9%, niklu 15–37%. Wśród innych pierwiastków stopowych występujących w małych ilościach można wymienić wanad, siarkę, mangan, tytan, węgiel oraz żelazo. Obszar zastosowania stopów na osnowie kobaltu obejmuje głównie endoprotezy stawowe, ale również płytki, wkręty kostne, groty, druty i elementy kształtowe do zespołów dociskowych kości [1,7,9].

Kolejnym materiałem metalicznym stosowanym w medycynie jest tytan. W porównaniu z innymi biomateriałami, stopy tytanu charakteryzują się dobrą odpornością na korozję szczelinową, korozję naprężeniową i korozję ogólną w środowisku chlorków, a także najwyższą biotolerancją spośród wszystkich stosowanych obecnie biomateriałów metalicznych, korzystnym stosunkiem wytrzymałości na rozciąganie do granicy plastyczności, małą gęstością, najniższym spośród biomateriałów metalicznych modułem Younga, wysoką skłonnością do samopasywacji, właściwościami paramagnetycznymi oraz wysoką wytrzymałością zmęczeniową, co jest bardzo ważne w aspekcie trwałości elementów przeznaczonych do długotrwałego przebywania w organizmie człowieka. Tytan i jego stopy nie wykazują jednak dobrej odporności na ścieranie [1,9]. Niskie właściwości tribologiczne i obecność wanadu w stopach tytanu negatywnie wpływa na ich biotolerancję, dąży się zatem do opracowywania stopów bez udziału wanadu. W medycynie stosowany jest głównie tytan techniczny o strukturze dwufazowej, zawierający 98,8–99,8% tego pierwiastka, przede wszystkim stop Ti-6Al-4V [11]. Tytan i jego stopy stosowany jest przede wszystkim w protetyce stomatologicznej, kardiochirurgii i kardiologii zabiegowej. Ze stopów tytanu produkowane są także endoprotezy stawowe i elementy do zespalania odłamów kostnych. Wytwarza się również porowate powłoki tytanowe [7].

Ostatnia grupa biomateriałów metalicznych to stopy z pamięcią kształtu. Zjawisko pamięci kształtu związane jest z odwracalną i termosprężystą przemianą martenzytyczną, której towarzyszy zmiana struktury zachodząca w wyniku chłodzenia lub nagrzewania materiału w określonej temperaturze i przyłożenia lub zdjęcia zewnętrznej siły wywołującej naprężenia. W stopach tych występuje również zjawisko zwane nadspężystością i jest związane z przebiegiem odwracalnej przemiany martenzytycznej wywołanej wzrostem naprężeń i jej zanikiem podczas

zmniejszania naprężeń [1]. Najbardziej popularnym stopem z pamięcią kształtu jest stop Ni-Ti – o nazwie handlowej Nitinol, zawierający 53–57% niklu. Efekt pamięci kształtu w stopie Ni-Ti występuje, gdy odkształcony implant posiadający strukturę martenzytu zostanie podgrzany powyżej temperatury odwracalnej przemiany martenzytycznej, wówczas implant odzyskuje swój pierwotny kształt. Badania *in vitro* oraz *in vivo* stopu Ni-Ti wykazały, że jego odporność korozyjna i biotolerancja odpowiada stali austenicyznej 316L. Stopy z pamięcią kształtu wykorzystywane są głównie do wytwarzania stentów, filtrów krwi, łuków ortodontycznych, prętów Harringtona do leczenia skoliozy, igieł śródszpikowych, klamer do osteosyntezy, urządzeń do wydłużania kończyn, płytek do zespożeń dociskowych, a także tulejek dystansowych do kręgosłupa [7].

Stale austenicyczne oraz materiały z pamięcią kształtu należą do materiałów stosowanych na implanty krótkotrwałe, których okres przebywania w organizmie nie powinien przekraczać dwóch lat. Stopy na osnowie kobaltu oraz tytan i jego stopy to materiały stosowane do produkcji implantów długotrwałych. Okres przebywania w organizmie stopów kobaltu nie powinien przekraczać piętnastu lat, stopów tytanu zawierających wanad dwadzieścia do dwudziestu pięciu lat, natomiast stopów bezwanadowych – ponad dwadzieścia pięć lat [1,7].

Biomateriały metalowe oprócz wielu zalet — wysoka wytrzymałość mechaniczna, odporność na zużycie cieerne, jednorodność, akceptowalne koszty wytwarzania — posiadają niestety również liczne wady, wśród których wymienić należy podatność na korozję, ryzyko wystąpienia zakrzepów oraz odczynów alergicznych, brak pełnej akceptowalności przez ludzki organizm [1,7].

3.1.2. Biomateriały ceramiczne

Wieloletnie doświadczenia kliniczne biomateriałów metalicznych wykazują, że przez modyfikację składu chemicznego oraz fazowego osiągnięty został górny pułap możliwości poprawy ich biokompatybilności. Można uogólnić, że nawet stopy na bazie pierwiastków o największej biotolerancji nie mogą zostać wykorzystywane jako implanty długookresowe. Dlatego też w ośrodkach badawczych i klinicznych na świecie prowadzone są intensywne badania nad materiałami ceramicznymi [8,12].

Ceramika wykorzystywana w medycynie, podobnie jak biomateriały metalowe, musi posiadać określone własności użytkowe, które jednak nie są identyczne z właściwościami tworzyw metalicznych. Niektóre z nich są wręcz odmienne i nieosiągalne przez metale. Biomateriały ceramiczne powinny charakteryzować się wysoką bioinertnością i odpornością na korozję w środowisku tkankowym, dużą wytrzymałością na ściskanie oraz odpornością na ścieranie, porowatością umożliwiającą wrastanie tkanek i zapewniającą trwałe połączenie pomiędzy tkankami a implantem, a także możliwością sterylizacji bez zmiany właściwości materiału [1,13].

Produkty zużycia tych materiałów nie wywołują znacznych odczynów toksycznych i alergicznych, co decyduje o dobrej biotolerancji bioceramiki w organizmie [7].

Klasyfikacja biomateriałów ceramicznych wyróżnia [13,14]:

- biomateriały ceramiczne resorbowane w organizmie;
- biomateriały ceramiczne z kontrolowaną reaktywnością w organizmie;
- biomateriały ceramiczne obojętne.

Biomateriały ceramiczne resorbowalne w organizmie zawierają pierwiastki i związki, które biorą udział w metabolizmie i wnikają do tkanek. W wyniku resorpcji, której ulegają, służą jako rusztowanie lub wypełnienie rekonstruujących się tkanek. W grupie tych materiałów znajdują się ortofosforany wapnia, spośród których szczególne miejsce zajmuje hydroksyapatyt. Jest to materiał biologicznie aktywny, którego skład chemiczny i fazowy jest podobny do składu ludzkiej kości, dzięki czemu odznacza się najwyższą wśród wszystkich biomateriałów biotolerancją oraz zdolnością do ścisłego łączenia się z kością. Cechą charakterystyczną tego materiału jest wysoka czystość chemiczna, niezmiennosc w czasie sterylizacji, dobra adaptacja w organizmie, jak również możliwość uzyskania implantów o różnym stopniu porowatości. Podstawowymi ograniczeniami w szerokim zastosowaniu klinicznym bioceramiki opartej na fosforanach wapnia są jej zbyt niskie parametry wytrzymałościowe i wynikający stąd ograniczony czas użytkowania implantów. Czynniki te sprawiają, iż zastosowanie tego tworzywa ogranicza się jedynie do implantów nieprzenoszących dużych obciążeń mechanicznych [1, 9,12,15,16].

Biomateriały ceramiczne z kontrolowaną reaktywnością w organizmie są to materiały o składzie chemicznym i fazowym dobranym w taki sposób, aby powierzchnia implantu, reagując ze środowiskiem tkankowym oraz płynami ustrojowymi, wytworzyła określone reakcje, w wyniku których powstają połączenia z tkanką żywą. Reaktywne powierzchnie powinny zawierać jony Ca^{2+} oraz PO_4^{3-} i cechować się pH zasadowym. Dodatkowo stężenie poszczególnych pierwiastków i związków powinno mieścić się w określonych granicach, ustalonych na podstawie badań bioinertności i reaktywności. W grupie tej występują bioszklą oraz szkło ceramiczne [7,9,17]. Korzystną cechą bioszkieł jest możliwość zmiany składu chemicznego w szerokim zakresie, modelując w ten sposób ich właściwości fizyczne i chemiczne, w tym również ich bioaktywność. Jednak materiał ten charakteryzuje duża kruchość, która znacznie ogranicza jego zastosowanie. Bioszklą wykorzystywane są do uzupełniania ubytków miazgi zębowej i szkliwa, ubytków kostnych w szczęce i żuchwie lub dnie oczodołu, a w postaci warstw powierzchniowych na endoprotezy stawowe i wszczepy stomatologiczne [1,7].

Bioceramika obojętna (inertna) to materiały, które w kontakcie ze środowiskiem biologicznym nie ulegają zmianom, nie działają toksycznie na organizm i nie uwalniają do

otaczającej tkanki żadnych jonów. Reakcja tkanek na bioceramikę obojętną wyraża się przez wytworzenie w bezpośrednim sąsiedztwie cienkiej, włóknistej tkanki otaczającej wszczep. Proces ten zapobiega odrzuceniu implantu przez organizm i uznaniu go za ciało obce. Tkanki włókniste nie łączą się chemicznie z bioceramiką obojętną. Ich umiejscowienie w środowisku tkankowym odbywa się zatem za pomocą perforacji w implancie, w które wrasta tkanka. Do ceramiki obojętnej zalicza się węgle pirolityczne, azotek lub oksyazotek krzemu, węglík krzemu oraz tlenki glinu, cyrkonu, azotu, tytanu [1,12,18]. Szerokie zastosowanie w medycynie znalazł tlenek glinu (biokorund). Ceramika korundowa zawiera powyżej 99,5% Al_2O_3 , posiada dobre właściwości mechaniczne (wysoka wytrzymałość na ściskanie, zginanie, ścieranie) i jest także materiałem biogodnym. Biomateriał ten nie wywołuje bowiem w organizmie żadnych niebezpiecznych dla niego reakcji. Tworzywa korundowe mają jednak słabą odporność na zginanie i posiadają strukturę drobnokrystaliczną. Właściwości ceramiki korundowej w dużym stopniu zależne są od wielkości ziaren i porowatości. W medycynie stosowane są zarówno materiały w formie prawie bezporowatego spieku, jak również materiały o różnym stopniu porowatości. Bezporowaty biokorund stosuje się głównie w endoprotezoplastyce stawów, szczególnie biodrowego i kolanowego [19]. Wykonywane z niego elementy endoprotez, tzw. główki są osadzone na trzpieniu, który wytwarzany jest ze stopów na bazie tytanu. Konstrukcja tej endoprotezy uważana jest obecnie za najlepszą. Badania udowodniły, że protezy te zużywają się pięć razy wolniej niż te same wykonane z metalu i polietylenu. Porowata ceramika korundowa wykorzystywana jest w medycynie do uzupełniania ubytków kostnych powstałych w wyniku różnego rodzaju urazów i schorzeń. Największą zaletą ceramiki porowatej jest możliwość stworzenia z tkanką naturalnego połączenia. Jednak wytrzymałość tych implantów jest zmniejszana przez porowatość, przez co mogą być używane tylko w miejscach gdzie występują niewielkie naprężenia ściskające. Otrzymanie porowatej struktury implantu wymaga zastosowania odpowiedniej metody obróbki, dzięki której można wytworzyć materiał ceramiczny odpowiadający danym wymaganiom porowatości. Porównując ceramikę cyrkonową do korundowej można zauważyć szybsze zużywanie ceramiki cyrkonowej. Ceramika korundowa cechuje się bowiem większą twardością. Ponadto wadą ceramiki cyrkonowej jest niska odporność na ścieranie. Tlenek cyrkonu posiada jednak wyższą odporność na kruche pękanie, wyższą wytrzymałość mechaniczną na zginanie oraz niższy moduł Younga [1,14,20,21].

Oprócz szeregu zalet, bioceramika posiada także istotne wady, takie jak niska wytrzymałość na zginanie, nieodporność na obciążenia dynamiczne, nieodkształcalność, a także kruchość oraz podatność na pękanie [1,14].

3.1.3. Biomateriały polimerowe

Polimery to substancje złożone z makrocząsteczek, charakteryzujące się regularnym lub nieregularnym powtarzaniem w nich jednostek podstawowych (merów) jednego lub kilku rodzajów. W miarę pojawiania się nowych polimerów o unikalnych właściwościach fizykochemicznych i biologicznych, znaczenie polimerów w medycynie ciągle wzrasta [7,14,22].

Polimery to tworzywa cechujące się lekkością, odpornością na korozję oraz w większości przewodzeniem prądu elektrycznego. Zwykle jednak polimery nie są materiałami przeznaczonymi do pracy w wysokiej temperaturze. W aplikacjach medycznych jest to problem ze względu na konieczność sterylizacji [23]. Biomateriałom polimerowym stawiane są następujące wymagania [7]:

- bioinertność;
- nieinicjowanie odczynów alergicznych lub toksycznych;
- odpowiednia jakość fizykochemiczna biomateriału;
- łatwość formowania pozwalająca na nadanie odpowiedniej postaci użytkowej bez degradacji tworzywa;
- łatwość sterylizacji bez zmian własności lub kształtu;
- łatwość uzyskania powtarzalnej jakości materiału dla różnych partii wyrobów;
- odpowiednia trwałość funkcjonalna i niezawodność.

Materiały polimerowe mogą być pochodzenia naturalnego (biopolimery) oraz syntetycznego. Polimery naturalne wytwarzane są w organizmach żywych jako składniki strukturalne tkanek. Zaliczyć do nich można białka (kolagen, fibrynogen, jedwab) i wielocukry (celuloza, chityna). W chirurgii rekonstrukcyjnej kolagen może być stosowany m.in. w ortopedii w celu odtworzenia powierzchni stawowych, w okulistyce, w stomatologii (wypełniacz miejsc po miazdze lub do wypełniania kanałów po usuniętym zębie), w kardiochirurgii do pokrywania sztucznego lewego przedsionka serca, w chirurgii naczyniowej do uszczelniania protez z polimerów syntetycznych, a także w celu korekcy tkanek miękkich. Wszczepy fibrynowe stosowane są głównie w urologii oraz jako składnik kleju fibrynowego wykorzystywanego do zespalania tkanek. Włókna jedwabne wykorzystywane są jako materiał do zespalania tkanek. Chityna ma zastosowanie do ran oparzeniowych lub uszczelniania syntetycznych protez naczyniowych [7,20,22].

Polimery syntetyczne, które znalazły zastosowanie w medycynie, należą do polimerów niedegradowalnych, polimerów bioresorbowalnych oraz polimerów biodegradowalnych. Przydatność do implantacji określonego polimeru syntetycznego jest uwarunkowana głównie

budową związku wielocząsteczkowego, jednak zależy także od udziału i rozmieszczenia w nim związków pomocniczych (napełniaczy, pigmentów, stabilizatorów) [7].

Polimery niedegradowalne wykazują dużą odporność na działanie środowiska biologicznie czynnego. Wśród tej grupy największe zastosowanie znalazły silikony, politetrafluoroetylen (PTFE), poliuretany (PU), polietylen (PE), polipropylen (PP), politereftalan etylenu (PET), polimetakrylan metylu (PMMA) oraz poliamidy (PA) [12]. Do zalet polietylenu jako materiału implantacyjnego należy zaliczyć dobrą bioinertność, wysoką wytrzymałość mechaniczną, niski współczynnik tarcia, elastyczność, dobre właściwości dielektryczne oraz niską cenę. Polietylen znalazł szerokie zastosowanie w alloplastyce stawów, głównie w alloplastyce stawu biodrowego. Stosowany jest na panewki współpracujące z głową endoprotezy wykonaną z metalu bądź ceramiki tlenkowej. Polimery niedegradowalne są stosowane również w chirurgii plastycznej i rekonstrukcyjnej, a także jako protezy naczyniowe, elementy sztucznego serca, cewniki, nici i siatki chirurgiczne oraz soczewki wewnątrzgałkowe [7,22,23,24,25].

Polimery bioresorbowalne są materiałami, które powinny degradować się w środowisku czynnym biologicznie do nieszkodliwych produktów ubocznych. Produkty takie występują naturalnie w organizmie jako produkty przemiany materii i następnie są z organizmu wydalane lub stają się składnikami tkanek. Cechą charakterystyczną tych biomateriałów są zmieniające się z biegiem czasu właściwości, co czyni je nieprzydatnymi do zastosowania jako implanty długotrwałe. Do polimerów bioresorbowalnych w organizmie zalicza się m.in. polikwasy glikolowe (PGA), polikwasy mlekowe (PLA), polilaktydo-co-glikolidy (PLGA). Polimery resorbowalne mają do spełnienia w organizmie dwie podstawowe funkcje. Pierwsza z nich to zapewnienie stabilizacji uszkodzonej tkanki kostnej umożliwiając jej wzrost. Biodegradacja implantu wykonanego z takiego tworzywa eliminuje konieczność wykonania powtórnego zabiegu operacyjnego (usunięcia implantu), co jest szczególnie istotne w przypadku chirurgii twarzowo-szczękowej. Druga funkcja polega na zapewnieniu stabilizacji uszkodzonej tkanki oraz dostarczeniu bezpośrednio do miejsca złamania substancji leczniczych [1,22,26,27].

Obok polimerów bioresorbowalnych stosuje się także polimery biodegradowalne. W tym przypadku tworzące się produkty degradacji niekoniecznie występują naturalnie w organizmie, jednak tak jak w przypadku polimerów bioresorbowalnych, powinny być dla organizmu nieszkodliwe. Degradacja implantów musi przebiegać w sposób kontrolowany. Zbyt szybka degradacja może powodować nie tylko przedwczesną utratę własności mechanicznych, ale również uwalnianie w krótkim czasie znacznej ilości produktu degradacji, przekraczającej zdolność organizmu do jego wydalania. Bezpośrednim skutkiem jest wówczas przedłużający się stan zapalny. Ma to szczególne znaczenie w przypadku polimerów, których przejściowe produkty

degradacji mają odczyn kwasowy. Z drugiej jednak strony degradacja materiału nie powinna być zbyt powolna. W warunkach optymalnych, implant polimerowy powinien ulegać stopniowej resorpcji, przebiegającej zgodnie z postępującym procesem gojenia tkanek [1,22,26].

Początkowo polimery bioresorbowalne i biodegradowalne stosowany był wyłącznie do produkcji nici chirurgicznych. Aktualnie obszar zastosowania polimerów resorbowalnych obejmuje dermatologię, ortopedię, chirurgię naczyniową, chirurgię twarzowo-szczękową, a także sztuczne więzadła, włókniny wykorzystywane w chirurgii tkanek miękkich, membrany wykorzystywane do regeneracji ubytków kostnych oraz nośniki do kontrolowanego uwalniania leków [1,22,27].

3.1.4. Biomateriały węglowe

Biomateriałami o najmniejszym zastosowaniu w medycynie są materiały węglowe, których głównym lub wyłącznym składnikiem jest węgiel pierwiastkowy. Właściwości węgla istotne z punktu widzenia medycyny związane są z budową fizyczną i chemiczną jego powierzchni, z porowatością w objętości oraz wielkością i kształtem porów [28]. Biomateriały węglowe osiągają własności mechaniczne porównywalne ze stopami metali przy znacznie obniżonym ciężarze właściwym i większej odporności na korozję. Ponadto charakteryzują się dużą odpornością termiczną, odpornością na erozję, korozję i działanie substancji o pH kwasowym i zasadowym. Uogólniając stwierdzić można, że wszystkie biomateriały węglowe cechuje [7]:

- dobra biotolerancja w środowisku tkanek ustrojowych;
- obojętność elektryczna warunkująca dobrą hemozgodność (biozgodność z krwią);
- atrombogenność (właśność eliminująca powstawanie skrzepów);
- dobre własności fizykochemiczne;
- odporność na działanie promieniowania jonizującego i niejonizującego.

Biomateriały węglowe jako materiały funkcjonalne można podzielić na warstwy węglowe, oraz materiały kompozytowe, czyli włókna węglowe i kompozyty węgiel-węgiel. Poszczególne materiały węglowe cechują się zróżnicowaną strukturą chemiczną i fazową, od których zależą własności użytkowe [7].

Węgiel w postaci powłok, warstw i cienkich filmów wytwarzany jest metodami fizycznymi i chemicznymi w różnych postaciach krystalicznych. Spośród węgla stosowanych w medycynie można wymienić niskotemperaturowy pirolityczny węgiel izotropowy (LTIC), ultraniskotemperaturowy węgiel izotropowy (ULTIC), węgiel otrzymywany metodą fizycznego odparowania (PVDC) oraz węgiel diamentopodobny (DLC). Sposób wytwarzania węgla w postaci

powłoki ma zasadniczy wpływ na jego właściwości użytkowe. Węglem pokrywa się praktycznie wszystkie grupy materiałowe (metale, stopy, ceramikę, materiały organiczne). W odniesieniu do zastosowań medycznych szczególne znaczenie mają różne formy implantów do zastosowań kardiochirurgicznych (sztuczne zastawki), których powierzchnia pokryta węglem pirolitycznym charakteryzuje się atrombogennością. Warstwy węglowe są również nanoszone na implanty metaliczne w chirurgii urazowo-ortopedycznej [28].

Pod pojęciem włókna węglowe kryją się materiały o bardzo zróżnicowanych właściwościach chemicznych i fizycznych. Jedynie niektóre z nich mogą być przydatne w medycynie. W zależności od rodzaju prekursora i temperatury karbonizacji, włókna węglowe różnić się mogą stopniem uporządkowania struktury, ilością i charakterem heteroatomów obecnych w węglu oraz budową powierzchni [1,28]. Ocena biogodności włókien węglowych jest zagadnieniem skomplikowanym i wymagającym szczególnych badań, zwłaszcza w zakresie procesów degradacji. Wynika to, zarówno z natury samego węgla, jak i właściwości włókien węglowych i ich formy. Włókna w postaci plecionek stosowane są w niewielkim zakresie jako protezy więzadeł lub ścięgien [28]. Do wszczepionych włókien węglowych wzrasta wzdłużnie tkanka łączna. Obciążenie mechaniczne włókien wynikające z funkcji fizjologicznych kończyn decyduje o odkładaniu się włókien kolagenowych wzdłuż wspólnej osi zrekonstruowanego ścięgna lub więzadła, które indukowane jest obecnością węgla. Powolny proces utraty własności mechanicznych implantu węglowego jest istotnym czynnikiem stopniowego wzrostu przenoszonych obciążeń przez nowo powstałą na bazie węgla tkankę łączną [7]. Zasadniczym przeznaczeniem włókien węglowych jest jednak wzmacnianie osnowy wykonanej z innego materiału [28].

Kolejną z postaci węgla szczególnie przydatną dla celów medycznych jest węgiel aktywny, który stosowany jest w medycynie ze względu na właściwości sorpcyjne. Kolumny sorpcyjne zawierające węgiel aktywny, stosowane przy silnych zatruciach i przedawkowaniach leków, wprowadzane są w obieg krwi w krążeniu pozaustrojowym. Materiał jest także wykorzystywany jako nośnik leku ze względu na zdolność do sorpcji, a następnie desorpcji w warunkach określonego pH substancji organicznych, przy jednocześnie zminimalizowanym wpływie na organizm. Węgiel aktywny znalazł zastosowanie również w produkcji opatrunków [28].

W medycynie stosowany jest także węgiel szkłopodobny, który posiada typowe cechy substancji szklanych takie jak kruchość, brak porowatości otwartej, występowanie mikroporów zamkniętych oraz nieprzepuszczalność dla gazów. Biomateriał charakteryzuje się doskonałą biogodnością, jest odporny chemicznie, odporny na ścieranie oraz obojętny, ponieważ nie wywołuje odpowiedzi zapalnej w tkance przylegającej do implantu, ani reakcji ciała obcego.

Jednak struktura materiału różni się od typowej struktury substancji bezpostaciowych. Biomateriał ten stosowany jest w ortopedii, kardiochirurgii, stomatologii oraz okulistyce [28].

3.1.5. Biomateriały kompozytowe

Biorąc pod uwagę wady i zalety poszczególnych grup biomateriałów, interesującym rozwiązaniem wydaje się być połączenie różnych grup materiałów w taki sposób, aby wykorzystać jak najwięcej ich zalet oraz wyeliminować wady. Dlatego właśnie w medycynie coraz większe znaczenie odgrywają materiały kompozytowe.

Kompozyty to materiały o strukturze niejednorodnej, złożone z dwóch lub więcej komponentów (faz) o różnych właściwościach. Najczęściej jeden z komponentów stanowi osnowę, która gwarantuje spójność, twardość i elastyczność materiału, a drugi (komponent konstrukcyjny) zapewnia dobre właściwości mechaniczne. Celem takiego połączenia jest uzyskanie materiału o nowych, lepszych właściwościach w stosunku do właściwości osobnych składników. Kompozyty charakteryzuje wytrzymałość, elastyczność projektowania oraz zwiększona niezawodność mechaniczna w porównaniu do materiałów monolitycznych. Jednym z ważnych czynników decydujących o zastosowaniu medycznym kompozytów jest ich trwałość w środowisku biologicznym. Największy wpływ na wydajność techniczną kompozytu mają materiały tworzące poszczególne składniki, ilość, forma i układ elementów oraz interakcja między komponentami. Istotną zaletą tych materiałów jest możliwość projektowania ich właściwości w szerokich granicach [14,29,30,31].

Biomateriał kompozytowy wymaga odpowiedniego doboru materiałów na osnowę i na fazę modyfikującą. Wybór materiału oraz sposób jego wzmocnienia uzależniony jest od funkcji, którą materiał spełnia w organizmie. Podstawowym i decydującym kryterium jest spełnienie przez kompozyt jednocześnie warunku biogodności i biofunkcjonalności. Funkcja biologiczna jest istotna gdy materiał spełnia rolę podłoża dla narastającej tkanki łącznej. Wówczas wyłącznie minimalne wymagania mechaniczne powinny zostać spełnione. Natomiast jeśli materiał pełni rolę implantu konstrukcyjnego, który przenosi duże naprężenia, konieczne jest uzyskanie materiału o dużej wytrzymałości. Kompozyty przy odpowiednim zaprojektowaniu ich mikrostruktury, mogą wykazywać równocześnie wysoką wytrzymałość oraz niską sprężystość. Cecha ta, przy dobrej wytrzymałości zmęczeniowej, stanowi podstawę wykorzystania tego typu materiałów w chirurgii kości [28].

Biorąc pod uwagę wielką różnorodność materiałów kompozytowych dzieli się je ze względu na właściwości, rodzaj zbrojenia oraz rodzaj osnowy [14].

Głównymi materiałami wzmacniającymi używanymi w kompozytach biomedycznych są ceramika, szkła, włókna polimerowe oraz włókna węglowe. W zależności od zastosowania, wzmocnienia mogą być obojętne lub absorbowalne. Właściwości komponentu wzmacniającego silnie zależą od geometrii zbrojenia. Podstawowe kategorie kształtu fazy rozproszonej w materiale kompozytowym to cząstki, włókna i płytki lub blaszki. Dodatkowo mogą się one różnić wielkością i kształtem. Włókna są znacznie bardziej skuteczne mechanicznie niż cząstki. Orientacja włókien w kompozycie jest jednym z głównych czynników decydujących o właściwościach sprężystych materiału. Kompozyty z włókien polimerowych mogą osiągnąć sztywność i wytrzymałość porównywalną z metalami, a nawet wyższą [14,29,32]. Kompozyty wzmacniane włóknami węglowymi ze względu na podobieństwo budowy i właściwości do niektórych żywych tkanek mogą spełniać rolę implantów zdolnych do ich zespalania, wypełniania lub zastępowania. Szczególnie istotna jest przydatność tych materiałów w chirurgii kostnej dla spełniania funkcji biomechanicznych. Włókna węglowe szczególnie dobrze mogą współpracować z osnowami polimerowymi i węglowymi. Kompozyty te są przezroczyste dla promieni rentgenowskich, co ma istotne znaczenie w obserwacji procesu zrostu kostnego [28,31].

Klasyfikacja kompozytów ze względu na rodzaj osnowy wyróżnia kompozyty z osnową metalową, kompozyty z osnową ceramiczną, kompozyty z osnową polimerową oraz kompozyty węgiel-węgiel [14].

Poprawa własności fizykochemicznych materiałów metalicznych wykorzystywanych w medycynie jest możliwa przez wytworzenie kompozytów z udziałem bioceramiki. Najczęściej stosowane są kompozyty typu metal – hydroksyapatyt, które można wytwarzać technologią metalurgii proszków poprzez wprowadzenie HAp do mieszanki proszków metalicznych, a następnie w odpowiednich warunkach sprasowanie i spieczenie. Warstwa HAp może być również nanoszona na powierzchnię implantów wykonanych z biomateriałów metalicznych [33].

Literatura naukowa zawiera bardzo dużo informacji na temat kompozytów, w których fazę ciągłą stanowi polimer, zaś ceramika w postaci włókien lub wypełniaczy jest zbrojeniem. Niewiele jest jednak doniesień dotyczących kompozytów, w których stosuje się ceramikę jako osnowę. Kompozyty te mogą powstawać m.in. na drodze mieszania bioceramiki z poroforem, który w wyniku wypalania ulega rozkładowi i pozostawia pory. Właściwości takich materiałów w dużej mierze zależą od stopnia porowatości. Dużą dogodnością w tego typu układach jest możliwość manipulacji stopniem porowatości, jak i rozkładem wielkości porów. Dzięki temu można uzyskać kompozyty o unikatowych właściwościach. Jednym z wielu obszarów zastosowań kompozytów polimerowo-ceramicznych jest branża stomatologiczna. Są one szeroko stosowane jako wypełnienia ubytków ze względu na bardzo dobre właściwości estetyczne oraz mechaniczne [34].

Jedną z najbardziej perspektywicznych grup materiałów mogących znaleźć szerokie zastosowanie w medycynie są kompozyty polimerowe. Wykazują one zróżnicowaną budowę i właściwości, co sprawia, że niektóre z nich są biostabilne w środowisku biologicznym, a inne ulegają resorpcji. Zasadniczy problem w przypadku tych materiałów sprowadza się do poprawy ich właściwości mechanicznych. Osiągnięcie celu może zapewnić stosowanie włóknistych kompozytów o osnowach polimerowych wzmocnionych włóknami węglowymi. Materiały te charakteryzuje elastyczność konstrukcji, wytrzymałość i lekkość. Obecność włókien węglowych zasadniczo zmienia właściwości mechaniczne polimerów, a co bardzo istotne, w zależności od orientacji włókien pozwala sterować tymi właściwościami. Umożliwia to otrzymanie implantów o dobrej wytrzymałości statycznej i zmęczeniowej i niskim module Younga. W przypadku resorbowalnych polimerów umożliwia także zmianę zachowania biologicznego, szczególnie czas resorpcji oraz sposób oddziaływania. Główne zastosowanie kompozytów polimerowych wzmocnianych włóknami węglowymi to implanty zespalające w chirurgii kostnej (śruby zespalające, elementy endoprotez stawu biodrowego), elementy konstrukcyjne stabilizatorów zewnętrznych i sprzętu ortopedycznego oraz podłoża dla regeneracji tkanek [28]. Kompozyty polimerowe, wzmocniane włóknami polietylenowymi lub ceramiką, wykorzystywane są w protezach biodrowych, sztucznych powierzchniach stawów, sztucznych korzeniach zębów, cementach kostnych oraz urządzeniach do unieruchamiania pęknięć [29].

Kompozyty węgiel-węgiel są to materiały o osnowie węglowej wzmocniane włóknami węglowymi, które mogą posiadać różne struktury i cechują się specyficznymi właściwościami fizykochemicznymi [7]. Kompozyty węgiel-węgiel w porównaniu do materiałów węglowych charakteryzują się wyższą wytrzymałością, odpornością na pękanie i wstrząs cieplny, a także lepszymi właściwościami mechanicznymi w podwyższonych temperaturach. Zaliczyć je można do materiałów biozgodnych, które znajdują zastosowanie w stomatologii, urologii, laryngologii (uzupełnianie ubytków tchawicy), ortopedii, chirurgii szczękowo-twarzowej (śruby i gwoździe zespalające) oraz jako nici chirurgiczne do szycia powięzi, ścięgien i mięśni [9, 28].

Spośród kompozytów stosowanych w medycynie, wyróżnić należy również nanokompozyty. Materiały te zdefiniować można jako heterogeniczną kombinację dwóch lub więcej faz, z których co najmniej jedna powinna mieć rozmiar nanometryczny. Odpowiednie zaprojektowanie nanokompozytu pozwala na otrzymanie biomateriału wielofunkcyjnego, który obok korzystnych właściwości mechanicznych może zmieniać zachowanie biologiczne wszczepu poprzez wprowadzenie modyfikatora o właściwościach osteokonduktywnych, osteoinduktywnych lub komórek osteogenicznych. Dzięki temu nanokompozyty mogą odgrywać znaczącą rolę jako implanty przeznaczone dla chirurgii kostnej. Największe zmiany parametrów

fizykomechanicznych można uzyskać poprzez modyfikację nanocząstkami osnów polimerowych. Modyfikacja osnów ceramicznych i metalicznych nie powoduje już aż tak efektywnych zmian wyjściowych właściwości tych materiałów. Faza modyfikująca może występować w postaci nanowłókien, nanorurek (nanorurki węglowe) i nanocząstek (hydroksyapatyt, TCP). Nanokompozyty stwarzają nowe możliwości w zakresie modyfikacji właściwości fizykochemicznych oraz specyficznych oddziaływań biologicznych [14,30].

Przykładem wykorzystania materiałów kompozytowych w medycynie są implanty długotrwałe, w których trzon nośny wykonany jest z materiału metalicznego lub polimerowego i odpowiada za przenoszenie obciążeń mechanicznych. Natomiast osnowa lub sama powierzchnia wykonana jest z bioceramiki, która charakteryzuje się bardzo dobrą biotorencją oraz zadawalającą odpornością korozyjną, a w niektórych przypadkach chroni również tkanki okołowszczepowe przed jonami metali, z których wykonany jest trzon. Implanty tego typu stosowane są w protetyce stomatologicznej, kardiologii oraz chirurgii kostnej. Innym przykładem wykorzystania kompozytu w medycynie są protezy stosowane do leczenia ubytków zębowych. Trzon protezy wykonywany jest z części metalowej, natomiast siodła, w których osadzane są zęby, wykonuje się z ceramiki lub tworzywa sztucznego [9].

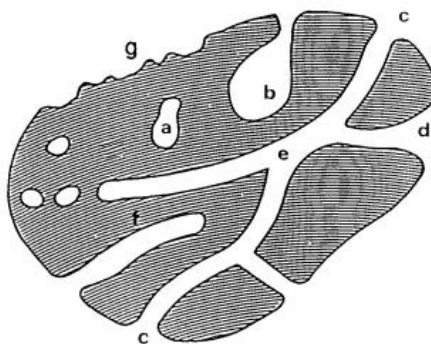
Materiały kompozytowe stanowią grupę materiałów implantacyjnych, które poprzez swoją wielofazową budowę mogą stanowić podstawę do opracowania implantów o korzystnych właściwościach mechanicznych i aktywności biologicznej. Kompozyty wykorzystywane w medycynie są systematycznie doskonalone. Szeroka możliwość łączenia różnych faz, zmiany ich geometrii ułożenia oraz udziałów objętościowych pozwalają na dopasowanie budowy i właściwości implantów do naturalnych tkanek [30,31].

3.2. Porowatość biomateriałów

Materiały porowate to tworzywa posiadające w swym wnętrzu dużą liczbę pustych przestrzeni, które nazywane są porami. Ciało stałe stanowiące matrycę ciała porowatego nazywane jest natomiast szkieletem lub nośnikiem [35]. Porowatość materiału to właściwość ciał stałych określająca wielkość i ilość porów występujących wewnątrz materiału oraz opis ich rozmieszczenia w badanej przestrzeni [9].

W biomateriałach występują pory otwarte oraz pory zamknięte. Pory otwarte to pory połączone między sobą i połączone z powierzchnią materiału. Materiały zawierające pory otwarte są przepuszczalne dla cieczy i gazów. Jeśli tylko jeden koniec pora jest otwarty i ma bezpośredni kontakt z powierzchnią mowa wtedy o porach ślepych. Natomiast gdy por zaczyna się i kończy na

powierzchni, ale w innych miejscach, mowa wtedy o porach przelotowych. Drugi rodzaj porów to pory zamknięte. Pory zamknięte to pory izolowane, nie połączone między sobą. Pory te wpływają na właściwości makroskopowe materiału, takie jak gęstość, elastyczność, wytrzymałość mechaniczna, pojemność lub przewodność cieplna i są nieaktywne dla adsorpcji gazów czy w procesie przepływu płynów (Rysunek 1) [36,37,38].



Rysunek 1. Schemat przekroju materiału porowatego – pory zamknięte: a; pory otwarte: b, c, d, e, f; pory ślepe: b, f; pory przelotowe: c-e-d oraz c-e-c [37]

Ze względu na rozmiar porów wyróżnić można mikropory, których średnica nie przekracza 2 nm, mezopory o średnicy od 2 do 50 nm oraz makropory, w przypadku których średnica jest większa od 50 nm [39].

Struktura porowata może być naturalną cechą biomateriału lub wytworzoną w wyniku obróbki chemicznej bądź termicznej. Obecność porów w materiałach wpływa na właściwości fizykochemiczne, a w konsekwencji na właściwości użytkowe biomateriałów. Występujące w materiale pory w znacznym stopniu wpływają na jego właściwości mechaniczne, które ulegają obniżeniu wraz ze wzrostem porowatości. Różnice pomiędzy biomateriałami gęstymi a porowatymi dotyczą również ich odmiennego zachowania się po zanurzeniu w płynie fizjologicznym. Zauważono mianowicie, że porowata bioceramika w takich warunkach ulega starzeniu w wyższym stopniu, niż gęsta. Stwierdzono, że porowate tworzywo korundowe obniża swoją wytrzymałość mechaniczną o 35–40% po czterech tygodniach przebywania w roztworze soli fizjologicznej. Jednocześnie udowodniono jednak, że implanty porowate po przerośnięciu tkanką kostną wyraźnie polepszają swoje właściwości mechaniczne. Materiały porowate posiadają ponadto lepiej rozwiniętą powierzchnię styku implant–tkanka. Stopień, w jakim właściwości ulegną zmianie zależy od ilości, rozmiaru, kształtu i sposobu rozmieszczenia porów w tworzywie [40,41].

W medycynie wykorzystywane są porowate biomateriały metalowe [42,43,44,45], porowate biomateriały polimerowe [46,47,48,49], ale przede wszystkim szerokie zastosowanie znajdują porowate materiały bioceramiczne.

3.2.1. Porowatość biomateriału a integracja z tkanką

Doświadczenia kilku dziesięcioleci implantacji wskazują, że jedną z najważniejszych przyczyn ograniczonej trwałości implantów jest możliwość obluzowania. Ważnym problemem jest zatem uzyskanie trwałego połączenia wszczepionego implantu z kością. Rodzaj połączenia uzależniony jest od reakcji zachodzących na granicy implant–tkanka. Każdy materiał może wywołać określoną reakcję okołowszczepową. Reakcje te można ogólnie sklasyfikować w następujący sposób [1,7]:

- obumarcie tkanki w przypadku toksycznego materiału;
- utworzenie wokół implantu otoczki z tkanki włóknistej o zmiennej grubości, w przypadku materiału inertnego (nietoksycznego i nieaktywnego biologicznie);
- utworzenie wiązania chemicznego pomiędzy biomateriałem a tkanką żywą, w przypadku materiału nietoksycznego i biologicznie aktywnego;
- wchłonięcie materiału do otaczających go tkanek, w przypadku materiału nietoksycznego oraz resorbowalnego.

Biomateriały inertne łączą się z tkanką w tzw. sposób morfologiczny. Wówczas złącze powstaje poprzez przyrastanie kości do nierówności powierzchniowych nieporowatego materiału, a także poprzez zamocowanie wszczepu cementem kostnym do kości lub przez jego ściśle umieszczenie w łożu kostnej. Połączenie tego typu należy do najsłabszych połączeń wszczepów z kością. Opracowano wiele sposobów modyfikacji kształtu implantów, które miały na celu polepszenie ich stabilności i trwałości zamocowania. Jak dotąd nie osiągnięto jednak w pełni zadowalających wyników. Alternatywą jest zastosowanie implantów o porowatej powierzchni, które charakteryzują się rozwiniętą powierzchnią w miejscach kontaktu, co sprzyja rozwojowi tkanki kostnej wokół implantu. Przerośnięcie tkanką kostną porów biomateriału powoduje mechaniczne zakotwiczenie implantu w kości. Jest to bardzo trwałe połączenie, którego nie sposób zniszczyć bez uszkodzenia wszczepu lub tkanki kostnej. Połączenie tego typu nazywane jest złączem biologicznym. Oprócz pozytywnego wpływu na współpracę wszczepu z kością, implanty mocowane metodą osteointegracji osiągają dobrą stabilizację wtórną, przez co zmniejsza się ryzyko poluzowania implantu. Rozwiązanie to umożliwia również łatwiejsze przeprowadzenie operacji rewizyjnej [7,50].

Do pozytywnych efektów wykorzystania struktur porowatych zaliczyć można [50]:

- utworzenie trwałego połączenia implant–kość;
- zbliżony sposób przenoszenia obciążeń przez tkankę kostną;
- wytworzenie struktur umożliwiających sprawny transport płynów wewnątrzustrojowych;
- sprawna przebudowa struktury tkanki kostnej – remodelling;

- zmniejszenie zjawiska zaniku stymulacji wzrostu kości powstającego przez dużą różnicę sztywności pomiędzy implantem a kością;
- zmniejszenie masy wszczepu.

Głównym zamierzeniem licznych badań mających na celu rozwój porowatych materiałów jest określenie wpływu rozmiaru i ułożenia porów na osadzanie się komórek i ich wzrost [51]. Jak wynika z badań, wrastanie tkanek w pory implantów zależy w dużym stopniu od ich rozmiarów. Jeżeli pory mają średnicę poniżej 5 μm , nie zachodzi wrastanie tkanek. Dla porów o wielkości powyżej 25 μm obserwuje się wrastanie tkanki włóknistej, a następnie naczyń. Minimalna wielkość porów wymagana do umożliwienia wrastania zmineralizowanej tkanki wynosi 50 μm . Przy średnicy 75 μm mineralizacja dochodzi do głębokości 500 μm wrośniętych tkanek, przy porach większych od 100 μm mineralizacja przekracza głębokość 1000 μm , a wrośnięta kość jest prawidłowo zbudowana [1]. Optymalna architektura porów powinna naśladować system kanałów Haversa, a zatem średnice porów powinny mieścić się w przedziale 50–250 μm . Większe rozmiary porów wydają się poprawiać szybkość i głębokość wnikania zmineralizowanych tkanek do biomateriału, ale z drugiej strony pogarszają właściwości mechaniczne [36,52].

Żywotność wrośniętej tkanki zależy od jej unaczynienia i ukrwienia w miejscu implantacji. Porowate materiały ze wzajemnie połączonymi porami zapewniają przestrzeń dla wrastania naczyń krwionośnych, a tym samym umożliwiają lepsze tworzenie kości w implantach. Ponadto połączenia pomiędzy porami stanowią drogę do dystrybucji i migracji komórek [52,53].

Podsumowując, odpowiedni rozmiar porów i połączeń między porami decydują o przenikaniu i mineralizacji tkanki, dając dobre i trwałe połączenie implantu z kością. Jednak optymalne parametry porów mogą być różne dla różnych zastosowań biomedycznych [41].

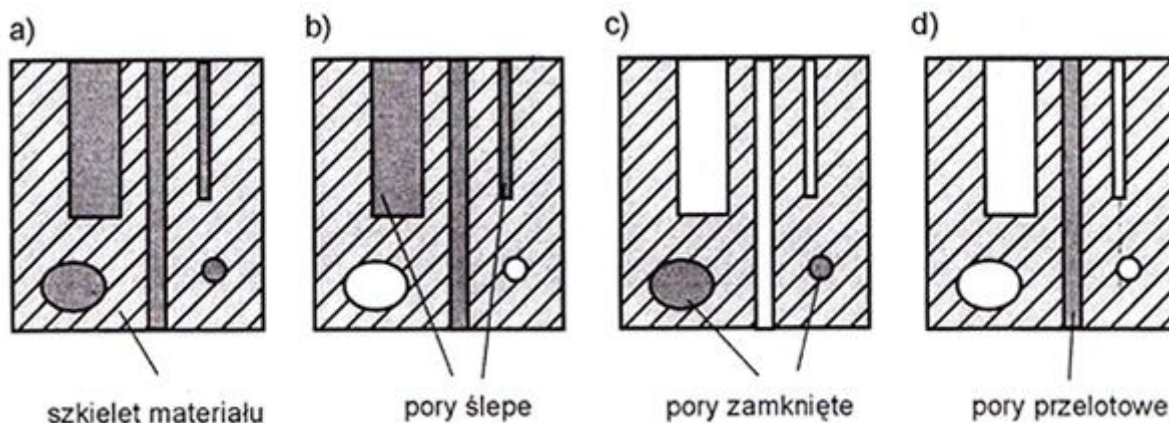
3.2.2. Parametry materiałów porowatych

Istnieje wiele parametrów charakteryzujących materiały porowate. Jednak żaden z nich nie jest w stanie samodzielnie określić geometrycznych własności omawianego ośrodka. Do opisu używa się więc kilku parametrów jednocześnie, w zależności od analizowanych zjawisk czy wymaganego stopnia dokładności. Do najważniejszych parametrów charakteryzujących strukturę materiałów porowatych należą [9,35]:

- porowatość;
- powierzchnia właściwa porów;
- gęstość masowa;
- przepuszczalność dla gazów i cieczy;

- kształt, wielkość i rozkład wielkości porów.

Podstawowym parametrem charakteryzującym strukturę materiałów porowatych jest porowatość. Porowatość objętościowa definiowana jest jako objętościowa zawartość porów w materiale porowatym. Jest to parametr bezwymiarowy, podawany w procentach. W zależności od rodzaju rozpatrywanych porów w materiale porowatym, porowatość objętościową podzielić można na porowatość całkowitą, porowatość otwartą, porowatość zamkniętą i porowatość aktywną (Rysunek 2) [54].



Rysunek 2. Schematyczna ilustracja rodzajów porów uwzględnianych w opisie porowatości objętościowej: a) całkowitej, b) otwartej, c) zamkniętej, d) aktywnej [54]

Na całkowitą objętość próbki materiału składa się objętość szkieletu oraz całkowita objętość porów (1) [54].

$$V = V_s + V_p \quad 1$$

gdzie:

V – całkowita objętość próbki;

V_s – objętość szkieletu próbki;

V_p – objętość porów próbki.

W całkowitej objętości porów próbki można wyróżnić objętość porów zamkniętych oraz objętość porów otwartych (2). Natomiast objętość porów otwartych jest sumą objętości porów przelotowych i objętości porów ślepych (3) [54].

$$V_p = V_z + V_o \quad 2$$

$$V_o = V_a + V_n \quad 3$$

gdzie:

V_p – objętość porów próbki;

V_z – objętość zamkniętych porów próbki;

V_o – objętość otwartych porów próbki.

V_o – objętość otwartych porów próbki;

V_a – objętość przelotowych porów próbki;

V_n – objętość ślepych porów próbki.

Porowatość całkowita (ε_c) to stosunek objętości porów próbki (otwartych i zamkniętych) do całkowitej objętości próbki (4) [9,54].

$$\varepsilon_c = \frac{V_P}{V} = \frac{V-V_S}{V} = 1 - \frac{V_S}{V} \quad 4$$

gdzie:

ε_c - porowatość całkowita;
 V_p - objętość porów próbki;
 V - całkowita objętość próbki;
 V_s - objętość szkieletu próbki.

Porowatość otwarta (ε_o), nazywana także porowatością efektywną lub porowatością rzeczywistą, to stosunek objętości otwartych porów próbki do całkowitej objętości próbki (5) [9,54].

$$\varepsilon_o = \frac{V_o}{V} \quad 5$$

gdzie:

ε_o - porowatość otwarta;
 V_o - objętość otwartych porów próbki;
 V - całkowita objętość próbki.

Porowatość zamknięta (ε_z) nazywana nieefektywną, definiowana jest jako stosunek objętości zamkniętych porów próbki do całkowitej objętości próbki lub różnica pomiędzy porowatością całkowitą i otwartą (6) [9,38,54].

$$\varepsilon_z = \frac{V_z}{V} = \varepsilon_c - \varepsilon_o \quad 6$$

gdzie:

ε_z - porowatość zamknięta;
 V_z - objętość zamkniętych porów próbki;
 V - całkowita objętość próbki;
 ε_c - porowatość całkowita;
 ε_o - porowatość otwarta.

Porowatość aktywna (ε_a) jest określana jako stosunek objętości porów przelotowych do całkowitej objętości próbki materiału porowatego (7) [54].

$$\varepsilon_a = \frac{V_a}{V} \quad 7$$

gdzie:

ε_a - porowatość aktywna;
 V_a - objętość przelotowych porów próbki;
 V - całkowita objętość próbki.

Powierzchnia właściwa porów jest to stosunek całkowitej wewnętrznej powierzchni porów do objętości materiału porowatego i wyrażany jest w $\left[\frac{m^2}{m^3}\right]$. Powierzchnia właściwa może być także wyznaczana jako całkowita wewnętrzna powierzchnia porów w jednostce masy materiału

porowatego, wyrażona wówczas w $\left[\frac{m^2}{kg}\right]$. Powierzchnię właściwą porów wyznacza się stosując metodę sorpcji BET lub metodę wciskania cieczy. W metodzie sorpcji BET materiał porowaty zamknięty jest w szczelnej komorze i odgazowany. Komora jest następnie napełniana gazem o określonym ciśnieniu. Pory absorbują gaz, co powoduje wzrost masy porowatego materiału przy jednoczesnym zmniejszaniu ciśnienia gazu w komorze. Gdy proces zmian masy i ciśnienia dobiega końca, pomiar jest zakończony i możliwe jest precyzyjne określenie ilości zaabsorbowanego gazu. Technika wciskania cieczy w badany materiał polega natomiast na wtłoczeniu cieczy o właściwościach hydrofobowych. Ciecz taka nie zwilża porów w sposób samoczynny, ale możliwe jest jej celowe wtłoczenie w pory pod ciśnieniem. Na podstawie ilości cieczy wciśniętej pod ciśnieniem można określić powierzchnię właściwą porów. Powierzchnia właściwa jest ważną cechą przepuszczalnych materiałów porowatych, decyduje bowiem o przebiegu tych procesów, dla których wielkość rozwinięcia powierzchni porów ma podstawowe znaczenie [9,37,38].

Gęstość jest to masa jednostkowej substancji w danej temperaturze wyrażona w $\left[\frac{kg}{m^3}\right]$ lub $\left[\frac{g}{cm^3}\right]$. Gęstość rzeczywista (ρ) jest to gęstość materiału litego nie zawierającego porów. Gęstość pozorna (ρ_p) to stosunek masy próbki suchej do objętości próbki łącznie z porami (otwartymi i zamkniętymi). Natomiast gęstość względna jest to stosunek gęstości pozornej do gęstości rzeczywistej, wyrażony w procentach [37].

W opisie struktury materiału porowatego należy wymienić także współczynnik przepuszczalności, występujący w empirycznym prawie filtracji Darcy'ego. Przepuszczalność jest zdolnością porowatego materiału do przepuszczania cieczy i gazów przez przestrzeń porową pod wpływem przyłożonego ciśnienia. Przepuszczalność wyrażana jest w $[m^2]$. Znajomość cieczo- i gazoprzepuszczalności określa możliwości filtracyjne materiału. Przepuszczalność silnie zależy od powierzchni właściwej, wzajemnego połączenia porów, a także od ilości porów przelotowych. Przepuszczalność wyznacza się na podstawie przepływu cieczy (lub gazów) przez materiały porowate. Parametr ten jest szczególnie ważny przy stosowaniu porowatych membran dostarczających lekarstwa [9].

Przebieg porów w materiale porowatym może być scharakteryzowana wartością maksymalną oraz średnią ich wymiarów, a także rozkładem ich wielkości. Wartość maksymalna stosowana jest do opisu porowatych filtrów i określa maksymalne rozmiary cząsteczek, które teoretycznie mogą przejść przez filtr. Wartości średnie rozmiarów porów są istotne przy badaniach hydrodynamicznych. Rozkład wielkości porów daje wyobrażenie o ilości lub objętości porów z każdego rozmiaru oraz o rozrzucie rozmiarów porów w materiale. Przydatną wielkością

określającą wymiar porów jest całkowita długość porów, liczona wzdłuż pomiarowego odcinka prostej płaskiego przekroju. Inną liniową miarą wielkości porów jest średnia długość cięciwy, określona jako średnia arytmetyczna z pomiarów cięciw pojedynczych porów [37].

Bardzo istotną cechą porowatych biomateriałów jest wielkość porów otwartych oraz charakter połączeń pomiędzy nimi. Tak jak wartość porowatości całkowitej wpływa znacząco na parametry wytrzymałościowe, tak wielkość porów otwartych decyduje o możliwości przerastania biomateriału tkanką kostną, a także jest istotna w przypadku nośników leków.

W wielu przypadkach wymagana jest znajomość wszystkich wymienionych parametrów charakteryzujących pory biomateriału. Pozwala to wytworzyć biomateriał o żądanych właściwościach.

3.3. Porowata bioceramika

3.3.1. Metody otrzymywania porowatej bioceramiki

Porowatą strukturę materiałów ceramicznych można otrzymać różnymi metodami. W wyniku zastosowania każdej z metod otrzymuje się ceramiczne tworzywo składające się z materiału ziarnistego, spoiwa i porów znajdujących się w całej objętości. Generalnie techniki można podzielić na następujące grupy [55,56]:

- spiekanie frakcjonowanych proszków ceramicznych z dodatkiem (lub bez) spoiwa;
- spiekanie materiału ziarnistego z dodatkiem substancji porotwórczej;
- spienianie;
- metoda pianowa;
- osadzanie ceramicznej masy leejnej na podłożu polimerowym;
- zamrażanie masy leejnej i sublimacja rozpuszczalnika;
- technologie specjalne z wykorzystaniem energii ciężkich jonów, biomimetyczne i in.

Pierwsza z metod polega na łączeniu przez spiekanie proszków o ściśle określonym rozmiarze ziaren. W pierwszej fazie procesu wytwarzania przygotowana jest mieszanina ziarna ceramicznego z dodatkiem spoiwa oraz dodatków ułatwiających formowanie i nadających wytrzymałość w stanie surowym. Następnie z przygotowanej mieszaniny formowane są wypraski poprzez prasowanie jednoosiowe w formie stalowej. Podczas procesu wypalania spoiwo topliwe lub spiekające się tworzy więźbę między ziarnami dzięki mostkom powstałym na stykach ziaren, co decyduje o wytrzymałości mechanicznej wyrobu. Wyboru odpowiedniego materiału ziarnistego dokonuje się w oparciu o znajomość zależności pomiędzy wielkością porów

a wielkością i kształtem ziarna. Wybór rodzaju spoiwa ceramicznego zależy od typu materiału ziarnistego. W zależności od składu ziarnowego, metody zagęszczania i warunków spiekania, można otrzymać tworzywa o różnej porowatości i wielkości porów. Z geometrycznego punktu widzenia w układzie ziaren kulistych o jednakowej średnicy, wielkość porowatości nie zależy od wielkości ziaren, która wpływa jedynie na wielkość utworzonych porów. Metodą tą otrzymuje się materiały o porowatości zazwyczaj nie przekraczającej 40% [55,57].

Druga metoda polega na zmieszaniu ceramicznego materiału ziarnistego i spoiwa z dodatkiem substancji porotwórczej. Następnie uformowaną kształtkę poddaje się wypaleniu w określonej temperaturze. Substancja porotwórcza ulega wypaleniu, a w jej miejscu powstają puste przestrzenie, czyli pory. Przyjmuje się, że jeżeli objętość porów nie przekracza 68%, powstają pory izolowane, nie łączące się ze sobą. W przypadku przekroczenia tej wartości pory zaczynają się łączyć, przerywając tym samym spoiwość fazy stałej. Istotne jest, aby dodatki po spalaniu dawały jak najmniejsze ilości popiołu. Z wykorzystaniem metody można uzyskać tworzywo o wysokiej porowatości, dochodzącej do 50–60% i rozmiarze porów 20–380 μm [15,55].

Metoda spieniania polega na wprowadzeniu dodatków do gęstwy ceramicznej, które w czasie formowania lub obróbki termicznej wywołują reakcję z wydzielaniem produktów gazowych spęczniających masę, co powoduje powstawanie porów. Mogą to być reakcje utleniania, rozkładu, a także reakcje pomiędzy związkami organicznymi wprowadzonymi jako dodatki porotwórcze do gęstw. Podstawową wadą powyższego sposobu formowania jest nie zawsze zadowalająca powtarzalność parametrów otrzymanego materiału [1,58].

Metoda pianowa polega na mieszaniu gęstwy ceramicznej z wytworzoną wcześniej pianą. Stosowanymi środkami pianotwórczymi są mydła sodowe i kalafonia. Przygotowaną mieszaninę gęstwy oraz piany wylewa się do metalowych form i suszy, a następnie kształtki po wyjęciu z form, obrabia mechanicznie i wypala. Powstały w ten sposób materiał ceramiczny charakteryzuje się dużą wytrzymałością mechaniczną, jednak z przewagą porów zamkniętych i o różnym kształcie [1,15].

Powyżej opisane metody nie pozwalają na odpowiednie kontrolowanie procesu tworzenia porów. Jedynym ze sposobów na uzyskanie określonego kształtu porów i żądanej porowatości biomateriału jest wykorzystanie metody polegającej na skopiowaniu materiałem ceramicznym budowy innych materiałów porowatych (ang. *polymeric sponge method*). Najczęściej stosuje się odwzorowanie porowatych matryc organicznych. Ceramiczna masa lejna osadzana jest na uprzednio przygotowanej matrycy w postaci spienionego materiału polimerowego, tzw. gąbki polimerowej. Całość jest następnie wypalana. W procesie wypalania gąbka ulega rozkładowi

termicznemu, a ceramiczny szkielet powstały w obszarach odpowiadających ścianom gąbki – spieka się. W charakterze matrycy najczęściej stosuje się miękką piankę poliuretanową z uwagi na dobrą pamięć kształtu tego materiału, dobrą zwilżalność przez ceramiczną masę lejną i wypalanie się w stosunkowo niskiej temperaturze (do 550°C) bez toksycznych produktów rozkładu i stałych pozostałości. Metoda pozwala otrzymać tworzywa porowate o większym niż przy użyciu innych metod stopniu porowatości (nawet do 95%) i znacznych rozmiarach porów. Ponadto jej zaletą jest możliwość kontroli wielkości porów poprzez użycie odpowiednich rodzajów matryc o ściśle określonej porowatości i wielkości porów, a także z możliwym gradientem porowatości. Technika umożliwia zatem zaprojektowanie tworzywa porowatego o dokładnie określonej strukturze będącej wiernym odwzorowaniem struktury użytego wzorca. Porowate tworzywa ceramiczne otrzymywane metodą osadzania ceramicznej masy lejnnej na podłożu polimerowym od lat wykorzystywane są jako biomateriały i znajdują wciąż rosnące zastosowanie w medycynie. Ceramika porowata zaprojektowana na wzór struktury kości służy do wykonywania implantów ortopedycznych w chirurgii kostnej. Pory porowatego tworzywa ceramicznego wypełnione biodegradowalnym polimerem, na przykład laktydem, po wszczepieniu do żywego organizmu, w miarę stopniowej degradacji polimeru w organizmie, mogą przerastać tkanką biologiczną, doskonale zastępując naturalną kość [1,15,35,59,60,61,62].

Porowatą strukturę ceramicznego tworzywa można również otrzymać z wykorzystaniem metody zamrażania masy lejnnej i sublimacji rozpuszczalnika (najczęściej wody). Porowaty materiał uzyskuje się poprzez usunięcie rozpuszczalnika regulowane szybkością zamrażania, a następnie sublimacji lodu pod zmniejszonym ciśnieniem [55].

Wykorzystywane są także technologie specjalne z udziałem ciężkich jonów otrzymywanych w energetyce jądrowej, pozwalające na otrzymanie materiałów o ściśle określonej wielkości i kształcie porów [55], a także metody biomimetyczne wykorzystujące materiały naturalne, np. aragonit koralu, który w trakcie procesu hydrotermalnego przekształca się w hydroksyapatyt, całkowicie zachowując przy tym charakterystyczną mikrostrukturę porów [55,63].

Jedną z nowszych metod wytwarzania ceramiki porowatej jest żelowanie spienionej zawiesiny (ang. *gelcasting of foams*). Masa lejna oprócz podstawowych składników, którymi są proszek ceramiczny, woda i upłynniacz, zawiera środki spieniające i środki żelujące. Środki spieniające obniżają napięcie powierzchniowe na granicy faz gaz-zawiesina, co podczas wprowadzania gazu sposobem mechanicznego mieszania umożliwia wytworzenie piany. Środki żelujące utralają pianę poprzez wytworzenia hydrożelu w spienionej zawieszynie. Kolejne etapy technologiczne to suszenie, kalcynacja i spiekanie. Metoda ta pozwala na wytwarzanie ceramiki o porowatości całkowitej w zakresie 60–95%, charakteryzującej się występowaniem sferycznych

porów o średnicy 100–900 μm połączonych ze sobą tzw. okienkami o średnicy 30–150 μm . Obecność okienek na ściankach porów sprawia, że tworzywo jest przepuszczalne dla cieczy i gazów [59,64].

Poszczególne metody różnią się złożonością przygotowania, a także porowatością materiału, który wytwarzają. Niektóre procesy mają tendencję do większej kontroli nad wielkością porów, rozkładem porów i ich wzajemnymi połączeniami. Inne procesy dają niższe porowatości i mniej przewidywalny rozkład porów [36].

3.3.2. Porowata bioceramika jako materiał kośćcozastępczy

Porowate materiały ceramiczne znajdują wciąż rosnące zastosowanie w medycynie. Ceramika porowata zaprojektowana na wzór struktury kości służy do wytwarzania implantów w formie porowatych kształtek służących najczęściej do wypełniania ubytków kostnych, ale także jest wykorzystywana jako wypełnienie zębodołów powstałych w wyniku ekstrakcji zęba [65,66].

Materiały stosowane do augmentacji kości powinny [40,66]:

- cechować się biokompatybilnością, osteogennością, osteoindukcyjnością i osteokondukcyjnością;
- być strukturalnie podobne do kości;
- posiadać powierzchnię sprzyjającą migracji osteoblastów i osteoklastów;
- nie zmniejszać normalnej aktywności komórek kostnych na ich powierzchni i nie zakłócać naturalnego procesu przebudowy kości;
- pozwalać osteoblastom kolonizować przestrzeń i indukować formowanie kości;
- utrzymywać przestrzeń, aby zapobiegać wrastaniu tkanki włóknistej do ubytku;
- posiadać zdolność resorpcyjną i substytucyjną kości w określonym czasie – tempo resorpcji powinno być dostosowane do tempa formowania nowej kości;
- stabilizować skrzep, a w związku z tym zapobiegać redukcji objętości i powierzchniowego zakłębienia, które dzieje się, gdy rana się kurczy;
- poddawać się sterylizacji;
- ich użycie kliniczne powinno być jak najprostsze, a wytwarzanie nie może być zbyt kosztowne.

Wrastanie kości do implantu jest bardzo złożonym zjawiskiem obejmującym kaskadę biologicznych zdarzeń komórkowych i pozakomórkowych. Wśród nich są te, które są zależne od wszczepionego biomateriału. Zatem funkcja i ogólny sukces porowatego biomateriału zależą od starannego doboru szeregu parametrów morfologicznych (m.in. porowatości, kształtu i wielkości

porów), z których każdy wpływa na szybkość wrastania kości i siłę oddziaływania. Porowatość powierzchni zewnętrznej jest istotna dla wrastania naczyń krwionośnych i komórek kostnych [67]. Udział porów w całej objętości w przypadku materiałów kośćcozastępczych wynosi z reguły 30–60%. W osteointegracji materiału kośćcozastępczego istotne znaczenie ma również przestrzeń pomiędzy cząsteczkami i zależy ona od morfologii, kształtu oraz wielkości cząsteczek. Badania kliniczne wykazują, że cząsteczki powyżej 100 μm tworzą wystarczającą przestrzeń dla wrastających naczyń krwionośnych i komórek kostnych [40,66,68].

Bioceramika oparta o fosforany wapnia jest obecnie jednym z podstawowych materiałów przeznaczonych do uzupełniania ubytków kości. Głównym powodem stosowania fosforanów wapnia jest ich chemiczne i fazowe podobieństwo do składników mineralnych kości i zębów ssaków. Materiały te odznaczają się wysoką biogodnością oraz bioaktywnością i bardzo dobrze adaptują się w żywym organizmie. Spośród fosforanów wapnia stosowanych w medycynie jako materiał kośćcozastępczy na szczególną uwagę zasługuje hydroksyapatyt (HAp), tzw. uwodniony fosforan wapnia. Hydroksyapatyt ma trójwymiarową strukturę z wzajemnie połączonymi sferycznymi porami o jednolitym rozmiarze. Materiały hydroksyapatytowe, w przeciwieństwie do innych fosforanów wapnia, są stabilne w warunkach fizjologicznego pH. Wysoka powierzchnia materiału powoduje doskonałą osteokondukcję oraz resorbowalność, co sprzyja wytwarzaniu wiązań z otaczającą tkanką kostną, stymuluje tworzenie się nowej kości w miejscach ubytku i umożliwia osiągnięcie dobrej integracji oraz stabilnego zamocowania materiału z kością, chroniąc tym samym implant przed obluzowaniem [1,15,16,69]. Badania wykazują, iż porowate implanty hydroksyapatytowe wypełniają się kością w 80% w ciągu 24 tygodni. Natomiast pomiędzy 24 a 48 tygodniem dochodzi do zakończenia procesu gojenia i nie jest możliwe oddzielenie materiału implantacyjnego od kości. W tym okresie następuje przerastanie hydroksyapatytu tkanką kostną i wytworzenia z nim bezpośrednich połączeń na wszystkich powierzchniach. Aby doszło do takiego ścisłego połączenia, hydroksyapatyt musi bardzo ściśle przylegać do kości. Wymiary i morfologia porów są kluczowymi czynnikami doskonałej osteointegracji. Wyniki badań wskazują, iż porowatość materiału powinna przekraczać 55%. Minimalny wymiar porów powinien wynosić co najmniej 100 μm . Przyjmuje się, że optymalne przerastanie tkanki kostnej wykazują materiały o wielkości porów 100–500 μm i rozmiarze połączeń między nimi powyżej 50 μm . Zawartość makroporów o średnicy przekraczającej 250 μm powinna wynosić około 97% w stosunku do całkowitej porowatości. Natomiast zawartość mikroporów o średnicy około 1,3 μm nie może być większa niż 3%. Różnorodność metod wytwarzania umożliwia zaprojektowanie i produkcję porowatego hydroksyapatytu o kontrolowanej porowatości i wzajemnych połączeniach międzykomórkowych. Z uwagi na

nienajlepsze właściwości mechaniczne biomateriału, nie stosuje się go na całe implanty, lecz znalazł zastosowanie do stymulowania rozwoju kości w niewielkich ubytkach kostnych [15,59,69,70,71].

Drugim biomateriałem opartym o fosforany wapnia stosowanym często w medycynie jest β -fosforan trójwapniowy (β -TCP), zwany ceramiką whitlockitową. β -fosforan trójwapniowy jest wysoce porowaty i składa się w 90% z połączonych porów. Ten ceramiczny biomateriał charakteryzuje się porami o optymalnej wielkości dla osteokondukcyjności (150–500 μm). Materiał został opracowany w celu naśladowania struktury beczkowej kości gąbczastej. Podstawową różnicą pomiędzy β -TCP a hydroksyapatytem jest brak wody w składzie β -TCP. Ponadto β -TCP ze względu na wyższą rozpuszczalność, charakteryzuje się również większą resorbowalnością w organizmie żywym. W warunkach korzystnych następuje progresywne zastępowanie go przez nowo tworzącą się kość [20,72,73,74,75,76].

Inną porowatą bioceramiką kościozastępczą jest ceramika węglanowa. Węglany wapnia licznie występują w przyrodzie (koralowce), ale mogą też być otrzymywane sztucznie. Materiał ten charakteryzują pory o średnicy zbliżonej do 200 μm , które tworzą zespoły połączonych ze sobą rurek. Cechy te powodują, że przerastają pełnowartościową fizjologicznie tkanką kostną. Bardzo istotną ich właściwością jest to, że pod wpływem enzymu – anhidrazy węglanowej, aktywnej w naturalnym procesie przebudowy kości – ulegają resorpcji i są zastępowane tkanką kostną. Szybkość resorpcji dobrze dopasowuje się do dynamiki przebudowy kości, co powoduje całkowitą przemianę implantu w nową tkankę zastępującą ubytek [1].

W celu zastąpienia ubytków kostnych zastosowanie znalazł również porowaty tlenek glinu, nazywany ceramiką korundową. Badania fizykochemiczne i biologiczne wykazały, że porowate implanty korundowe są całkowicie biozgodne oraz przerastają pełnowartościową tkanką kostną. Po przerośnięciu kością moduł sprężystości (ok. 30 GPa) zrównuje się z modułem części zbitej kości, zapewniając właściwą współzależność biomechaniczną pomiędzy kością a wszczepem. Biomateriał posiada wytrzymałość mechaniczną wystarczającą do wielu rodzajów zabiegów oraz zapewniającą swobodę manipulacyjną w trakcie operacji, a po przerośnięciu kością utworzony kompozyt podwyższa znacznie swoją wytrzymałość mechaniczną (o ok. 70%). Badania biologiczne *in vivo* wykazały, że niezmineralizowane substancje organiczne pojawiają się już po 3 dniach przebywania implantu korundowego w organizmie w jego zewnętrznych, kontaktujących się z tkanką kostną porach. Po 6 tygodniach stopień wypełnienia porów przekracza 80%, po 16 tygodniach przerośnięcie porów i mineralizacja kości są zakończone – w tkance kostnej wypełniającej pory widoczne są kanały Haversa i jamki kostne. Wykazano również, że w pory materiału wrasta ten typ kości, z którym wszczep się kontaktuje, co daje możliwości kontroli typu

kości wrastającej w pory biomateriału. Porowata ceramika korundowa pozwala na sterylizację implantu dowolną metodą. Ponadto materiał ten można łatwo obrabiać dla uzyskaniażądanego kształtu. Wskazania do wszczepienia porowatej ceramiki korundowej są następujące [1,20,41,77]:

- torbiele kostne, pourazowe i pooperacyjne ubytki kości;
- niedorozwój, pozapalny lub pourazowy ubytek stropu panewki stawu biodrowego oraz ubytek dna panewki stawu biodrowego;
- pourazowe lub nowotworowe zniszczenie trzonów kręgosłupa;
- przednie usztywnienie kręgosłupa;
- ogniska nowotworowe w obrębie całego kośćca.

3.3.3. Porowate bioceramiczne powłoki implantów

Implanty metalowe mają wiele korzystnych własności, dzięki którym znajdują zastosowanie w medycynie. Jednak materiały te nie tworzą mechanicznie stabilnego połączenia pomiędzy implantem a tkanką kostną, ponieważ nie zapewniają dostatecznego związania implantu z tkanką. Głównie z tego powodu pokrywane są często bioceramiką (Tabela 1). Zastosowanie powłoki ceramicznej na implantach metalowych prowadzi do powstania kompozytów, które łączą biokompatybilność i bioaktywność porowatej bioceramiki z wytrzymałością biomateriału metalowego. Porowata powłoka bioceramiczna zapewnia lepsze umocowanie implantu wewnątrz organizmu poprzez wrastanie kości w strukturę porową. Konsekwencją tego jest wydłużenie czasu użytkowania, co jest istotne szczególnie w przypadku implantów długotrwałych. Ponadto powłoki bioceramiczne zmniejszają uwalnianie potencjalnie niebezpiecznych pierwiastków chemicznych z implantu metalicznego, chroniąc tkanki okołowszczepowe przed przedostaniem się do nich jonów metali. Ceramika idealnie nadaje się także na pokrywanie tworzyw metalicznych, z którymi związane jest ryzyko korodowania. Implanty z ceramiczną powłoką na powierzchni stosowane są w protetyce stomatologicznej, kardiologii oraz chirurgii kostnej. W protezoplastyce stawu biodrowego stosuje się porowate powłoki nakładane na metalowy trzpień protezy. Tytanowe trzpienie endoprotez pokrywane są najczęściej hydroksyapatytem [78]. Podobny efekt wrastania kości w strukturę porów wykorzystuje się przy implantach dentystycznych. Można wówczas pokrywać implanty korzeni w części, która przylega do kości. Porowata powierzchnia przyczynia się do mocnego zakotwiczenia sztucznych korzeni zęba w szczęce, przez co niezwykle wzrasta trwałość takich korzeni [9,15,72,79].

Tabela 1. Powłoki ceramiczne na podłożach implantów metalicznych [7]

Podłoże	Stal 316L	Stopy Co – Cr – Mo	Stopy Ti – 6Al – 4V
Powłoka	Węgiel pirolityczny 45S5 Bioszkło α Al ₂ O ₃ – HA – TiN HA	45S5 Bioszkło 52S4.6 Bioszkło HA	45S5 Bioszkło HA/szkła borowo–krzemianowe HA TCP Al ₂ O ₃ TiO ₂ – HA HA – TRP, TCP

Istnieje wiele technik wytwarzania powłok ceramicznych na implantach wykonanych z innych biomateriałów. Ogólnie metody wytwarzania można podzielić na chemiczne (lub elektrochemiczne) i fizyczne [80].

Do metod chemicznych stosowanych w technice medycznej należą [80]:

- trawienie chemiczne w roztworach kwasów;
- obróbka w roztworach alkalicznych;
- utlenianie nadtlenkiem wodoru;
- metoda zol – żel;
- metody chemicznego osadzania z fazy gazowej (CVD).

Metody elektrochemiczne to [80]:

- utlenianie anodowe;
- metoda osadzania elektroforetycznego (EPD).

Metody fizyczne to [80]:

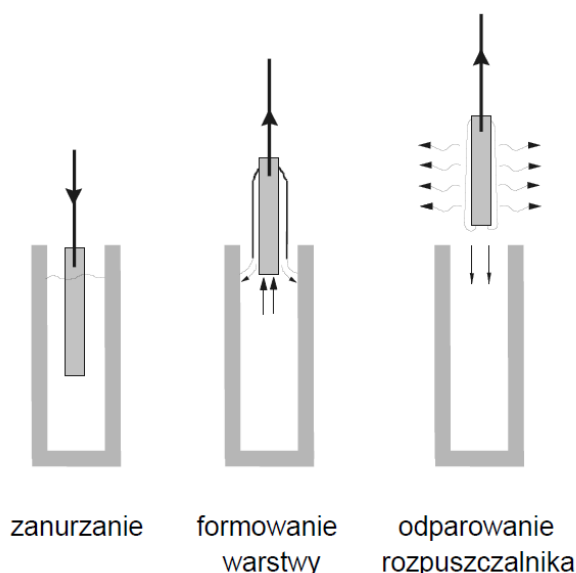
- natryskiwanie cieplne, w tym głównie natryskiwanie plazmowe (PS);
- obróbki jarzeniowe;
- implantacja jonowa;
- metody fizycznego osadzania z fazy gazowej (PVD).

Jedną z chemicznych metod wytwarzania porowatych powłok bioceramicznych na powierzchni implantu jest metoda trawienia elektrochemicznego, która polega na umieszczeniu obrabianego materiału w elektrolicie i przepuszczeniu przez układ materiał–elektrolit prądu o zadanych parametrach. Materiał ulegający trawieniu znajduje się na dodatnim potencjale. Procesem steruje potencjostat, a elektrolit przedmuchiwany jest gazem obojętnym usuwającym tlen z roztworu oraz powstające podczas trawienia pęcherze wodoru. W wyniku przekazywania ładunku na granicy materiał–elektrolit dochodzi do rozpuszczania podłoża i powstania porowatej

powierzchni. W ten sposób obrabia się zarówno materiały metalowe (Al, Nb, Ti, Zr, Hf), jak i półprzewodniki (Si). W materiałach porowatych wytworzonych metodą trawienia elektrochemicznego osiągnięta porowatość mieści się pomiędzy 5 a 85%, a rozmiar porów wynosi od 1 nm do 10 μm . Można wytworzyć warstwy o większej porowatości, dochodzącej do 95%, ale ulegają one uszkodzeniu w czasie suszenia na skutek działania sił napięcia powierzchniowego podczas odparowywania cieczy. Proces wzrostu porów można kontrolować, sterując gęstością prądu lub potencjałem. W praktyce operowanie stałą gęstością prądu pozwala łatwiej kontrolować porowatość i powtarzalność porowatej warstwy. Zmiana temperatury elektrolitu może także wpłynąć na powstającą warstwę porowatą [9].

Kolejną chemiczną metodą wytwarzania porowatej powłoki bioceramicznej jest metoda zol-żel. Technika polega na powolnym odwadnianiu wcześniej przygotowanego zolu wodorotlenku danego metalu, co prowadzi do zamiany zolu w żel. Proces tworzenia żelu przebiega w pięciu etapach – hydroliza i polikondensacja, żelowanie, starzenie, suszenie, zagęszczanie i krystalizacja. Pierwszy etap polega na sporządzeniu roztworu koloidalnego (zolu) w wyniku hydrolizy i kondensacji użytego prekursora. Materiał jest nakładany poprzez zanurzenie w roztworze, a następnie wynurzony ze ściśle określoną prędkością. Po usunięciu nadmiaru zolu, przeprowadza się żelowanie poprzez odparowanie rozpuszczalnika (Rysunek 3). Gotowa powłoka zostaje następnie wypalona w piecu [81]. Podczas doboru parametrów procesu istotna jest temperatura roztworu, z którego warstwa jest otrzymywana. Proces odbywa się przy ciśnieniu atmosferycznym. Grubość powłoki regulowana jest poprzez szybkość wynurzania powierzchni oraz lepkość cieczy. Metoda zol-żel znajduje obecnie zastosowanie przede wszystkim w ceramice tlenkowej. W zakresie ceramiki tlenkowej można otrzymywać powłoki wykorzystujące tlenki kilkunastu metali i niemetali. Na powłoki jednoskładnikowe najczęściej używane są zole SiO_2 , Al_2O_3 , TiO_2 i ZrO_2 . Ponadto w zastosowaniach biomedycznych często wytwarza się powłoki zawierające fosforek wapnia (CaP) [82,83] oraz hydroksyapatyt (HAp). Dominującymi podłożami do wytwarzania warstw zol-żel są tytan i stop Ti6Al4VELI . Zalety metody zol-żel to [9,80,84,85]:

- możliwość wytwarzania warstw jedno- lub wieloskładnikowych;
- kontrolowana grubość warstwy;
- w pełni kontrolowana mikrostruktura;
- ściśle kontrolowany skład chemiczny warstw;
- niska temperatura procesu;
- proste oprzyrządowanie i niski koszt wytwarzania.



Rysunek 3. Nakładanie warstwy metodą zol-żel [80]

Chemiczne osadzanie z fazy gazowej (ang. *chemical vapour deposition* – CVD) jest to metoda, w której stały materiał jest osadzany z fazy gazowej (pary) w wyniku reakcji chemicznej zachodzącej w pobliżu, lub na podgrzewanej powierzchni podłoża. Do otrzymania produktów reakcji używa się różnych substratów gazowych i ciekłych, zwanych prekursorami. Prekursory doprowadza się do komory reaktora najczęściej za pomocą gazów nośnych obojętnych lub takich, które mogą brać udział w reakcjach chemicznych prowadzących do powstania warstw lub mieszaniny tych gazów. Następnie na gorącym podłożu zachodzą odpowiednie reakcje chemiczne. Postać osadzanego materiału jest uzależniona od warunków prowadzenia procesu, takich jak rodzaj i temperatura podłoża, skład mieszaniny reakcyjnej oraz ciśnienie gazu. Tradycyjne metody chemicznego osadzania z fazy gazowej wymagają wysokich temperatur koniecznych do zajścia pożądanego reakcji (rzędu 900–1100°C lub nawet większych). Proces CVD przebiega w siedmiu kolejnych etapach (Rysunek 4) [80,84]:

1. Przemieszczanie drogą konwekcji i dyfuzji składników reaktywnych do strefy reakcji.
2. Reakcje chemiczne w fazie gazowej wytwarzające nowe składniki i produkty uboczne.
3. Transport składników do powierzchni podłoża.
4. Adsorpcja fizyczna i chemiczna oraz dyfuzja składników na powierzchni podłoża.
5. Heterogeniczne reakcje katalizowane przez powierzchnię prowadzące do tworzenia warstwy.
6. Desorpcja lotnych produktów ubocznych po reakcji na powierzchni.
7. Konwekcyjny i dyfuzyjny transport produktów ubocznych reakcji z powrotem do strefy reakcji.

Proces chemicznego osadzania z fazy gazowej realizowany jest w kilku odmianach,

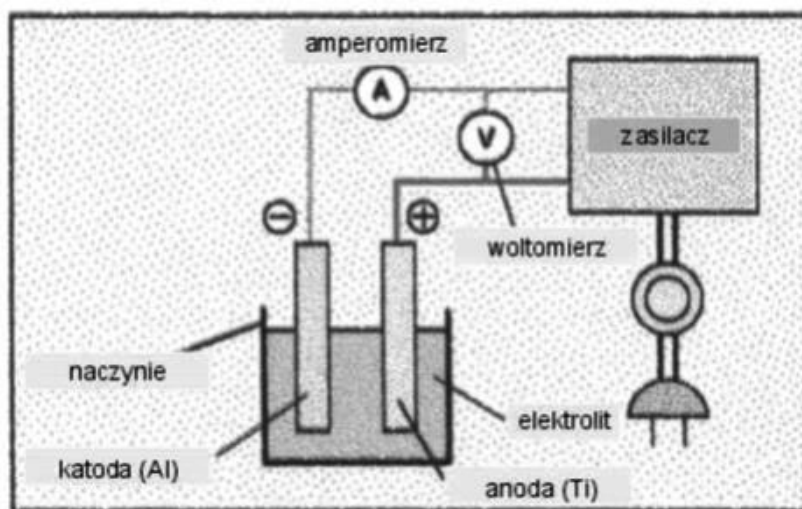
związanych ze sposobem wspomagania – przy ciśnieniu atmosferycznym (APCVD), przy obniżonym ciśnieniu (LPCVD), ze wspomaganiami plazmowym (PECVD, PACVD), ze wspomaganiami laserowym (LECVD), z zastosowaniem częstotliwości mikrofalowych (MWCVD) lub częstotliwości radiowych (RFCVD). W zastosowaniach medycznych metodą CVD nakłada się najczęściej warstwy węglowe diamentopodobne (DLC) oraz amorficzny węgiel krzemu i węgiel tytanu. Zalety metody to [80]:

- możliwość osadzania warstw o równomiernej grubości nawet na podłożach o skomplikowanych kształtach;
- możliwość zlokalizowanego bądź selektywnego nakładania pokryć;
- podłoże nie musi znajdować się w „polu widzenia” źródła par reagentów.



Rysunek 4. Schemat wzrostu warstwy w metodzie CVD [80]

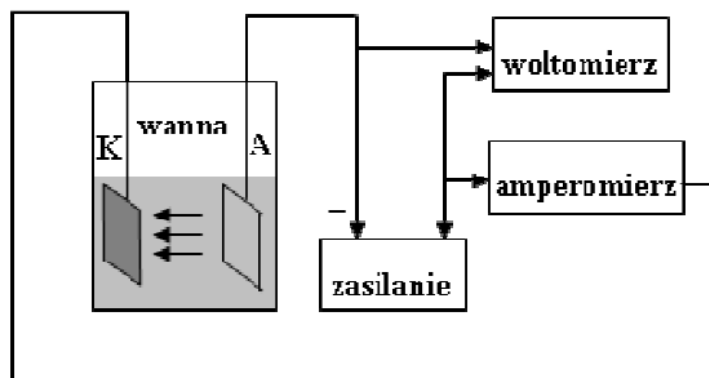
Utlenianie anodowe jest metodą wytwarzania głównie warstw tlenkowych na powierzchni metali lub ich stopów, zachodzącą w roztworach wodnych elektrolitów oraz przy oddziaływaniu pola elektrycznego (Rysunek 5). Jako elektrolity stosuje się najczęściej wodne roztwory kwasu siarkowego i kwasu ortofosforowego oraz wodne roztwory związków organicznych. Głównym czynnikiem wpływającym na szybkość formowania warstwy anodowej stanowi pole elektryczne o natężeniu odpowiednio wysokim do pokonania barier dyfuzji i migracji jonów w warstwie tlenkowej. Pod wpływem pola elektrycznego, jony metalu przekraczają granicę fazową metal-warstwa i transportowane są poprzez warstwę ku granicy z elektrolitem. Towarzyszy temu przeciwnie skierowany ruch jonów tlenkowych i składników elektrolitu w kierunku anodowanego metalu. Proces anodowania prowadzi się w określonych warunkach prądowych oraz w stałej temperaturze [9,80]. Metoda wykorzystywana jest najczęściej do wytwarzania porowatych warstw tlenku glinu [86,87,88,89,90,91,92,93] oraz tytanu [94,95,96].



Rysunek 5. Schemat procesu anodowania aluminium

Metoda osadzania elektroforetycznego (ang. *electrophoretic deposition* – EPD) jest procesem elektrochemicznym polegającym na wykorzystaniu zjawiska ruchu naładowanych cząstek fazy rozproszonej układu koloidalnego, znajdującego się w polu elektrycznym, względem fazy rozpraszającej. Innymi słowy, naładowane cząstki proszku rozproszone lub stanowiące zawiesinę w fazie ciekłej są przyciągane i osadzone na przewodzącym podłożu o przeciwnym znaku w wyniku przyłożonego napięcia prądu stałego (Rysunek 6). W zależności od znaku ładunku cząstek i podłoża można wyróżnić kataforezę (podłoże jest katodą) oraz anaforezę (podłoże jest anodą). Do wytwarzania powłok ceramicznych stosowana jest kataforeza. Każdy ze składników zawiesin wieloskładnikowych charakteryzuje się inną ruchliwością, dlatego też w czasie procesu stężenie cząstek bardziej ruchliwych spada, natomiast stężenie pozostałych komponentów w zawiesinie wzrasta. Przy otrzymywaniu warstw na biomateriałach jako fazy ciekłej do sporządzania zawiesiny nie stosuje się wody, ponieważ wydzielające się przy elektrolizie wody gazy (wodór i tlen) mogą wpływać niekorzystnie na jakość osadzającej się warstwy. W inżynierii biomedycznej metoda EPD stosowana jest do otrzymywania warstw SiO_2 . Jest to również jedna z częściej stosowanych metod otrzymywania warstw hydroksyapatytowych. W porównaniu do innych technik osadzanie elektroforetyczne jest metodą uniwersalną, łatwo przystosowywaną do specyficznych zastosowań. Zaletami procesu EPD są [9,80]:

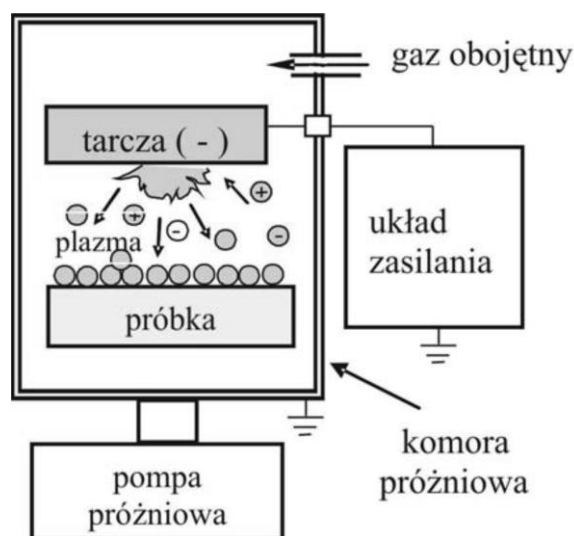
- prostota urządzenia do elektroforezy;
- szybkość otrzymywania warstwy;
- łatwość kontrolowania grubości i morfologii powstającej warstwy poprzez dobór czasu i potencjału procesu;
- niewielkie ograniczenia co do kształtu podłoża.



Rysunek 6. Schemat metody osadzania elektroforetycznego [80]

Metodą zaliczaną do fizycznych technik wytwarzania porowatych powłok bioceramicznych na powierzchni implantu jest natryskiwanie cieplne (ang. *thermal spraying*). Jest to metoda, w której stopiony materiał, w postaci kropeł z dużą energią kinetyczną, styka się z powierzchnią podłoża, na której ulega przyklejeniu i kondensacji. Powłoka tworzy się w sposób ciągły poprzez dostarczanie kropeł cieczy zestalających się na powierzchni. Proces wymaga dużego nakładu energetycznego, uzyskiwanego wysokotemperaturowym płomieniem lub strumieniem plazmy. W celu natryskiwania powłok ceramicznych stosuje się najczęściej natryskiwanie plazmowe (ang. *plasma spraying*). Wówczas proszek materiału powłokowego wprowadzany jest przez gaz transportujący go aż do strumienia plazmy wewnątrz lub na zewnątrz dyszy plazmotronu. Plazma powstaje w luku elektrycznym, palącym się między elektrodą (katoda) i dyszą (anoda). Duża prędkość strumienia plazmy jest wywołana przez rozprężanie cieplne wypływającego z dyszy gazu. Podstawowymi parametrami natryskiwania plazmowego są rodzaj i ciśnienie gazów plazmowych, wydajność podawania proszku, odległość palnika, prędkość przesuwu palnika. Jako gazy w palniku plazmowym stosowane są argon, hel, wodór i azot. Natryskiwanie plazmowe może przebiegać w specjalnej komorze i może być prowadzone w warunkach ciśnienia atmosferycznego, w osłonie gazu obojętnego, przy obniżonym ciśnieniu lub w warunkach próżni. W metodzie próżniowego natryskiwania plazmowego (Rysunek 7) cały proces przeprowadza się automatycznie w komorach o ciśnieniu obniżonym do kilku hektopaskali. Pozwala to na zmniejszenie strat cieplnych cząstek ceramiki roztopionych w strumieniu plazmy. Metoda natryskiwania plazmowego zastosowana do natryskiwania tlenkowych powłok ceramicznych jest procesem bardzo wydajnym, stwarzającym duże możliwości. Otrzymywane powłoki charakteryzują się jednak niską wytrzymałością na zginanie. Ponadto połączenie pomiędzy podłożem a powłoką jest połączeniem mechanicznym adhezyjnym, co skutkuje małą wytrzymałością mechaniczną na granicy powłoka–podłoże, w szczególności, gdy podłoże różni się znacznie właściwościami fizykochemicznymi od powłoki natryskiwanej. W medycynie metoda natryskiwania plazmowego stosowana jest do wytwarzania porowatych warstw tytanu na

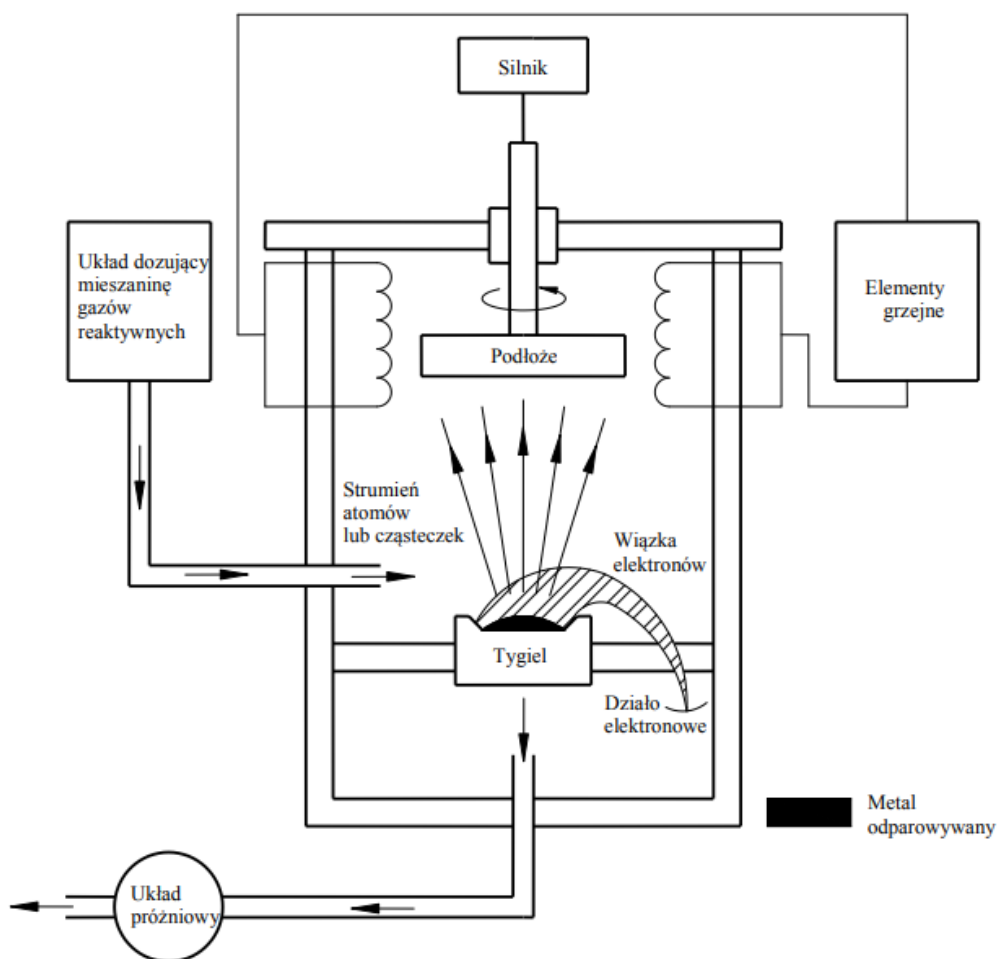
implantach bezcementowych, warstw ceramicznych tlenkowych (Al_2O_3 , ZrO_2 , TiO_2), warstw szkieł bioaktywnych (CaOSiO_2) oraz warstw hydroksyapatytowych [9,79,80,97].



Rysunek 7. Schemat próżniowego natryskiwania plazmowego [80]

Metody fizycznego osadzania z fazy gazowej (ang. *physical vapour deposition* – PVD) polegają na krystalizacji par osadzanego materiału ze zjonizowanej plazmy na podłożu zimnym lub podgrzanym do temperatury nie wyższej niż 600°C . W celu uzyskania prawidłowego przebiegu procesu temperatura podłoża powinna być niższa od temperatury źródła par, a suma ciśnień cząstkowych reagentów gazowych w komorze na tyle niska, aby parowanie spełniało warunki parowania swobodnego. Metoda PVD pozwala na otrzymywanie warstw o grubości nanometrycznej, które są słabo związane (adhezyjnie) z podłożem. Powstało wiele odmian techniki PVD. Jednak każda z nich składa się z trzech etapów: otrzymywanie par nanoszonego materiału, transport par na podłożę oraz wzrost warstwy na podłożu. Techniki różnią się sposobem otrzymywania par, miejscem otrzymywania i jonizowania par materiału, sposobem nanoszenia par, a także istnieniem lub brakiem czynników intensyfikujących proces nanoszenia. Głównymi sposobami otrzymywania i nanoszenia par materiału są rozpylanie jonowe oraz magnetronowe rozpylanie jonowe. Rozpylanie jonowe, inaczej nazywane rozpylaniem katodowym, polega na wybijaniu cząstek z katody wykonanej z rozpylanego materiału (tzw. tarcza) w wyniku bombardowania jej jonami o energii $100\text{--}1000\text{ eV}$. Jony rozpylające otrzymuje się podczas wyładowania jarzeniowego prądu stałego lub prądu wysokiej częstotliwości (Rysunek 8). Rozpylanie magnetronowe zachodzi w polu magnetycznym, które powoduje wydłużenie drogi elektronów. Dzięki temu gęstość prądu jonowego, a zarazem szybkość procesu rozpylania jest od 10 do 1000 razy większa niż w metodzie rozpylania jonowego. Warstwy powstałe w procesie PVD są bardzo twarde, dość kruche, trudno topliwe, odporne na korozję i ścieranie. Badania wykazały, iż powłoki tego samego materiału, uzyskane różnymi metodami PVD mogą znacznie różnić się

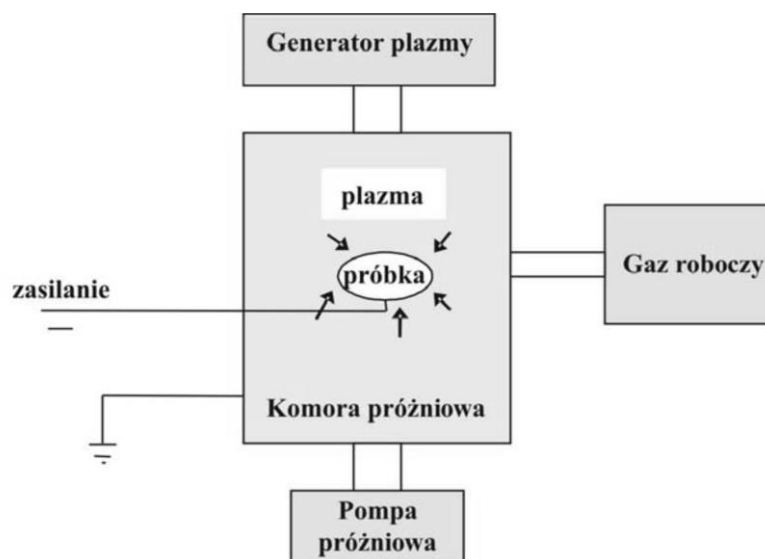
porowatością [98]. Metoda PVD służy do wytwarzania powłok prostych (TiN, TiC) lub złożonych (stopowych, wielofazowych, kompozytowych, wielowarstwowych, gradientowych) [80,85].



Rysunek 8. Schemat ideowy stanowiska do realizacji metody PVD [99]

Metoda implantacji jonowej polega na wbijaniu jonów o bardzo dużej energii w powierzchnię materiału. W metodzie konwencjonalnej strumień jonów ze źródła jest przyspieszany i kolimowany w wiązkę liniową. Uformowana wiązka jonów kierowana jest następnie na powierzchnię dowolnego materiału. Jony zostają wprowadzone do bombardowanego materiału na głębokość do około jednego mikrometra. Kinetyczny charakter procesu powoduje, że dowolny materiał może być domieszkowany praktycznie dowolnym pierwiastkiem. Jednak ze względów technicznych metoda stosowana jest do niewielkich powierzchni o niezbyt złożonym profilu geometrycznym. Do implantacji powierzchni elementów o skomplikowanym kształcie stosuje się metodę implantacji jonów ze wspomaganie plazmą (Rysunek 9). Podstawowym celem stosowania tej metody jest wytwarzanie warstwy wierzchniej o zdecydowanie podwyższonej odporności na ścieranie i na korozję. W zastosowaniach medycznych istotne znaczenie ma ponadto wzrost biogodności w stosunku do krwi oraz tkanki kostnej. Na tytanie i stopach tytanu wytwarza się tą metodą warstwy zawierające TiO_2 w wyniku implantacji tlenem,

TiN w wyniku implantacji azotem, CaTiO_3 w wyniku implantacji wapniem, implantuje się również jony wapnia i fosforu celem zwiększenia aktywności biologicznej [100] oraz węgiel uzyskując TiC lub warstwę podobną do diamentu [80].



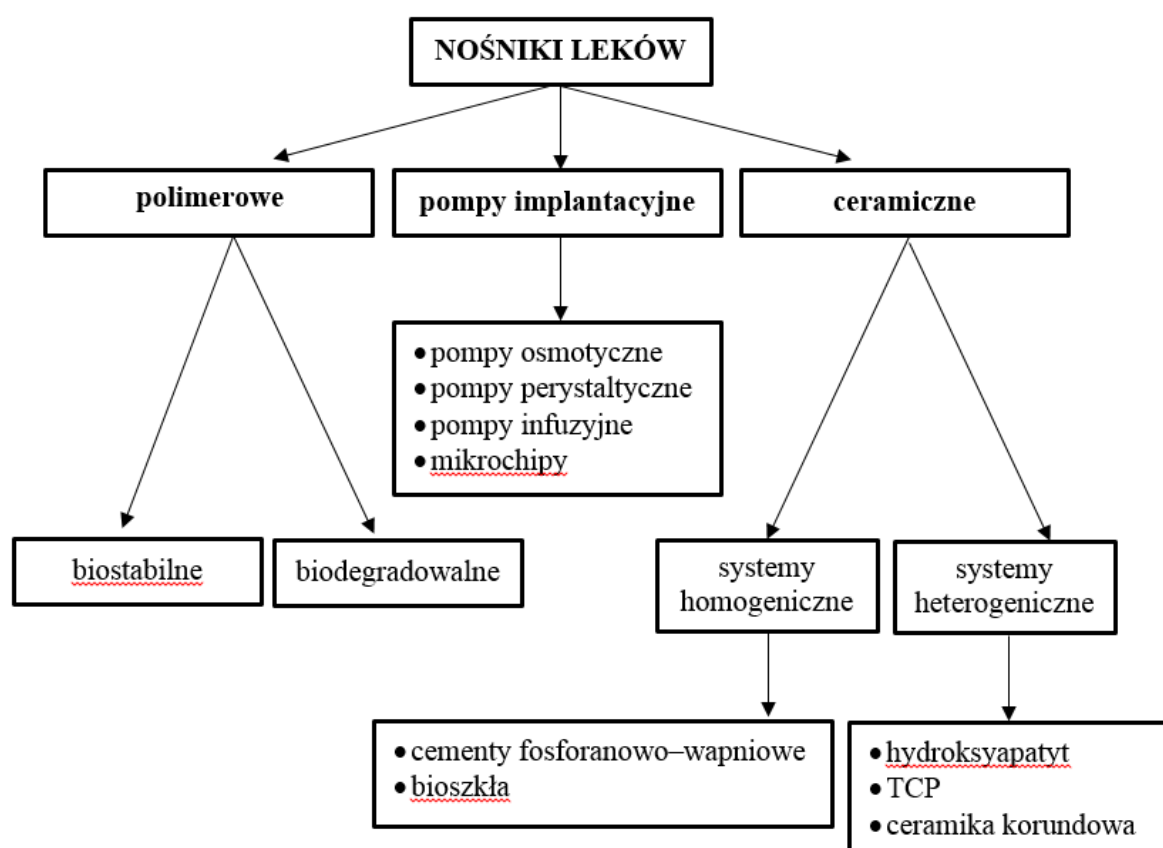
Rysunek 9. Schemat metody implantacji jonowej wspomaganą plazmą

3.3.4. Porowate bioceramiczne nośniki leków

Terapia implantacyjna związana jest z wieloma powikłaniami pooperacyjnymi. Zabiegi chirurgiczne o niskim stopniu sterylności oraz osłabienia immunologiczne operowanego miejsca są przyczyną zakażeń i trudno gojących się stanów zapalnych. Bardzo często dochodzi do kolonizacji implantu przez mikroorganizmy. Konsekwencją tego jest choroba pacjenta i częsta konieczność usuwania protezy. W skrajnych przypadkach może dojść nawet do śmierci pacjenta [101]. Postawą w profilaktyce i leczeniu infekcji bakteryjnych jest antybiotykoterapia. Konwencjonalne leczenie, poprzez dożylną czy doustną podanie leku, nie zawsze zapewnia pożądany efekt terapeutyczny. Dzieje się tak z powodu dystrybucji leku w organizmie, która rozpoczyna się już w chwili podania leku. Zmniejsza to szansę na dotarcie dużej ilości dawki do miejsca przeznaczenia, co wymusza zwiększenie jej w aplikowanym preparacie. Związane jest to ze stosowaniem dużych dawek leków, nawet toksycznych, przez dłuższy czas. Przewlekłe przyjmowanie leków może skutkować nieodwracalnymi zmianami w organizmie, osłabiając układ immunologiczny oraz uszkadzając organy wewnętrzne, przede wszystkim wątrobę. Ponadto właściwości farmakokinetyczne wielu leków, takie jak nieznaczne jego przenikanie do danej tkanki i szybka eliminacja z organizmu powodują, że wiele substancji leczniczych, w tkankach słabiej ukrwionych, nie osiągają poziomu terapeutycznego [102]. Alternatywą dla tradycyjnego dostarczania są systemy dostarczania leków, dzięki którym możliwe jest wprowadzenie leku bezpośrednio do miejsca działania, tak aby ograniczyć pokonywanie przez niego barier

biologicznych występujących w organizmie [103]. W celu zmniejszenia powikłań poimplantacyjnych oraz zapobiegania rozwojowi zakażeń możliwe jest dostarczanie leków o działaniu antybakteryjnym i antyseptycznym *in situ* wraz z implantem. Implant z inkorporowanym lekiem zapobiega tworzeniu się stanów zapalnych, jednocześnie niwelując wady leczenia ogólnoustrojowego, co powoduje obniżenie czasu i kosztów leczenia, a tym samym poprawia także komfort odczuwalny dla pacjenta. Taki rodzaj terapii nosi nazwę terapii celowanej (ang. *target therapy*, TT). Dużą nadzieję wiąże się również z wprowadzaniem bezpośrednio z implantami kostnymi tzw. czynników wzrostu, które mogą poprawiać właściwości osteokondukcyjne wszczepów [104,102]. Opracowanie nowych materiałów implantacyjnych umożliwiających kontrolowane dostarczanie i uwalnianie substancji leczniczej w zmienionym chorobowo miejscu w organizmie człowieka stanowi od wielu lat interesujący temat badawczy. Jak dotąd nie opracowano biomateriału, który byłby uniwersalnym nośnikiem leku. Mimo to coraz większa liczba materiałów kwalifikuje się do bycia nośnikiem, a ich wybór zależy od ich przeznaczenia oraz miejsca wszczepienia [105,106,107,108,109].

Systemy dostarczające leki można podzielić na polimerowe nośniki leków, pompy dostarczające leki oraz ceramiczne nośniki leków (Rysunek 10).



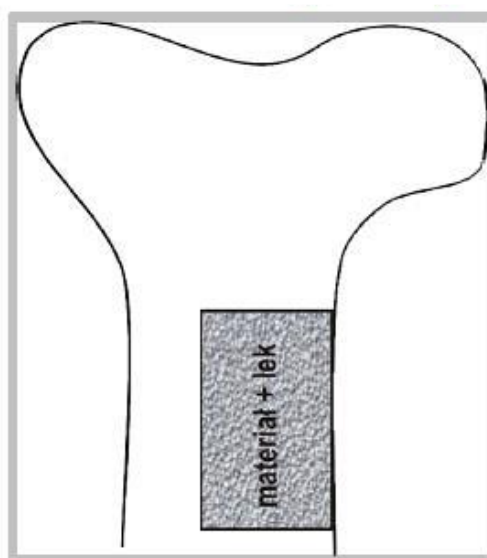
Rysunek 10. Podział systemów dostarczających leki

Spośród materiałów wykorzystywanych jako nośniki leków na szczególną uwagę zasługuje bioceramika [110]. Najczęściej spotykana bioceramika oparta na fosforanach wapnia ma postać porowatych bloczków bądź stosowana jest jako cementy kostne. Hydroksyapatytowe nośniki z uwagi na chemiczne i mineralogiczne podobieństwo do naturalnej kości, po uwolnieniu leku nie wymagają usuwania z organizmu, a więc nie zachodzi konieczność ponownego zabiegu operacyjnego. Rozwiązanie takie ma na celu stworzenie implantów wielofunkcyjnych pełniących rolę substytutu ubytku kostnego, stanowiącego rusztowanie dla nowo tworzącej się kości, ale także dostarczających w miejsce ubytku substancję leczniczą. Prowadzone są intensywne prace dotyczące nośników leków na bazie ceramiki hydroksyapatytowej [111,112,113,114,115]. Badania potwierdzają wysoką wydajność adsorpcji i pożądane, przedłużone uwalnianie leku z matrycy otrzymanych na bazie hydroksyapatytu. Istnieje możliwość zaprojektowania systemu, w którym substancja lecznicza jest uwalniania z ceramicznego nośnika w sposób kontrolowany, tzn. w odpowiedniej dawce i przy określonej szybkości. Pojemność adsorpcyjna i kinetyka uwalniania determinowane są głównie przez architekturę struktury porowatej materiału – im mniejsza porowatość tym szybkość uwalniania substancji aktywnej jest mniejsza. Sterowanie procesem uwalniania aktywnej substancji leczniczej z materiałów hydroksyapatytowych odbywa się także poprzez impregnację polimerami hydrofobowymi, powodującymi zmniejszenie szybkości uwalniania leku [111].

Materiałem bioceramicznym, który może spełniać funkcje nośnika antybiotyków w chirurgii kości, jest również porowata ceramika korundowa. Badania laboratoryjne wykazały, że ceramikę korundową można nasycić różnymi antybiotykami nowej generacji [1]. Jednak wciąż trwają badania nad wytworzeniem z porowatego tlenku gliny nośników leków [116,117].

Oprócz posiadania biokompatybilności, stabilności mechanicznej i chemicznej, powierzchnia biomateriału wykorzystywanego jako nośnik leku, musi mieć zdolność włączania leku, zachowania go i długotrwałego uwalniania do określonego miejsca docelowego [118]. Umieszczenie leku w porach biomateriału może odbywać się na kilka sposobów. Bardzo popularnym sposobem jest moczenie porowatego biomateriału w roztworze substancji leczniczej, które bazuje na zjawisku sorpcji. Oczywiście adsorpcja zależy od wielu czynników, między innymi od struktury związku adsorbowanego, powierzchni właściwej biomateriału, porowatości, pH i obecności innych jonów substancji adsorbowanych. Innym sposobem wprowadzania substancji leczniczej do porowatego materiału jest impregnacja substancją leczniczą bądź mechaniczne wprowadzanie do wnętrza porów roztworu z lekiem. Wykorzystanie próżni lub zmniejszonego ciśnienia podczas impregnacji daje możliwość kontroli ilości wprowadzonego leku [111,119,120].

Terapeutyczne działanie leków uwolnionych z nośników w dużym stopniu zależy od mikrostruktury biomateriału, która powinna być zaprojektowana w taki sposób, aby lek uwalniał się z określoną szybkością i przez odpowiednio długi czas. W układzie homogenicznym, w którym lek jest równomiernie rozproszony w całej objętości materiału (Rysunek 11), profil uwalniania leku opisuje równanie Higuchiego (8). Z równania wynika, że ilość uwolnionej substancji jest funkcją pierwiastka kwadratowego z czasu. Zatem początkowo jest wysoka, następnie maleje i pozostaje stała przez pewien okres czasu. Ten wzór uwalniania jest szczególnie użyteczny w terapiach implantologicznych kości, które wymagają dużej dawki początkowej, a następnie przedłużonej dawki przez kilka tygodni. Czynnikiem kontrolującym uwalnianie leku jest w tym przypadku proces dyfuzji leku przez pory implantu. Uwalnianie leku zależy zatem głównie od wymiarów porów [102].



Rysunek 11. Sposób umieszczania leku w układzie homogenicznym [1]

$$M_t = Kt^{\frac{1}{2}}$$

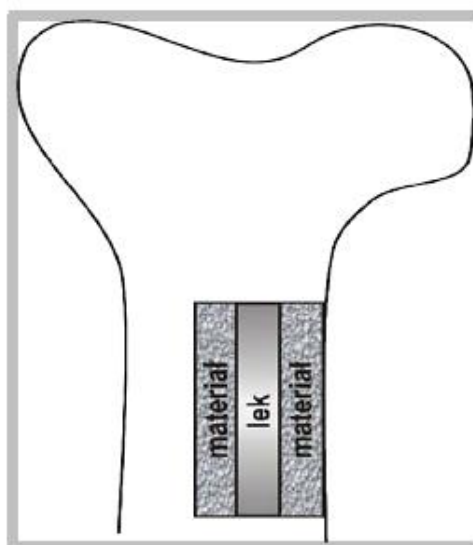
8

gdzie:

M_t - ilość uwolnionego leku po czasie t ,
 K - stała szybkości uwalniania Higuchiego,
 t - czas.

W układzie heterogenicznym, w którym lek stanowi osobną fazę umieszczoną wewnątrz implantu (Rysunek 12), kinetykę uwalniania leku może określać model dyfuzyjny opisany zmodyfikowanym równaniem Ficka (9). Profil uwalniania leków w układach heterogenicznych, zależy więc od grubości warstwy zastosowanego biomateriału oraz od jego mikrostruktury (porowatości i krętości porów). Im grubsza matryca implantu, w którym umieszczony jest lek, tym mniejsza szybkość jego uwalniania do otoczenia. Profil uwalniania w takich układach wykazuje zazwyczaj opóźnienie uwalniania leku, tzw. *lag time*. Jest to czas, po którym pojawia się lek

w medium otaczającym implant. Zależy on od rodzaju materiału oraz właściwości fizykochemicznych badanego leku [102].



Rysunek 12. Sposób umieszczania leku w układzie heterogenicznym [1]

$$J = \frac{DK\varepsilon\Delta C}{\tau l}$$

9

gdzie:

J – szybkość przenikania leku (zmiana ilości leku w czasie),

D – współczynnik dyfuzji,

K – współczynnik dystrybucji leku między płynem otaczającym i znajdującym się w porach implantu,

ε – porowatość,

ΔC – różnica stężenia (gradient stężenia),

τ – krętość porów,

l – grubość warstwy materiału.

Duży wpływ na inkorporację leku i kinetykę jego uwalniania ma porowatość biomateriału, a także kształt i wielkość porów [121,122,123]. Modyfikacja morfologii i dystrybucji porów odgrywa kluczową rolę w sterowaniu biodostępnością substancji leczniczej. Badania jednoznacznie potwierdzają znacznie większą pojemność adsorpcyjną mikroporowatego hydroksyapatytu w porównaniu z jego odpowiednikiem o litej strukturze [124]. Ponadto udowodniono, iż na kinetykę uwalniania leku większy wpływ ma rozmiar porów i ich dystrybucja niż oddziaływanie ilości zaadsorbowanego leku [121]. Wykazano również bezpośredni związek wydłużenia czasu uwalniania leku wraz ze wzrostem stopnia porowatości materiału [124]. Silniejszy i dłuższy efekt antybakteryjny także wiąże się ze wzrostem porowatości [111].

3.4. Metody pomiaru porowatości biomateriału

Porowatość objętościowa materiału mierzona jest różnymi metodami. W przypadku materiałów porowatych złożonych z regularnie rozmieszczonych cząstek, porowatość może być

obliczona na podstawie wymiarów i rozmieszczenia cząstek tworzących ośrodek. Nie zależy ona od wymiarów cząstek, które tworzą ośrodek, zależy natomiast od kształtu tych cząstek i ich rozmieszczenia w materiale porowatym. Jednak dla rzeczywistych materiałów porowatych, których geometria porów jest bardzo złożona, bezpośrednie obliczenie porowatości jest trudne do wykonania. W takim przypadku porowatość objętościową wyznacza się eksperymentalnie [54].

3.4.1. Metody eksperymentalne

Z definicji porowatości objętościowej (4) wynika, że w celu określenia porowatości należy wyznaczyć dwie z trzech następujących wielkości [54]:

- objętość porów próbki (V_p);
- objętość całkowita próbki materiału porowatego (V);
- objętość materiału szkieletu w próbce (V_s).

Z tego właśnie powodu przy ekstremalnym wyznaczaniu porowatości wykorzystywane są metody, które umożliwiają określenie wartości tych objętości. Objętość zamkniętych porów próbki materiału (V_z) wyznacza się stosując metodę grawimetryczną (różnica pomiędzy objętością cieczy wypartej przez próbkę rozdrobnioną i nierozdrobnioną) lub metodami mikroskopowymi, rentgenograficznymi. Objętość otwartych porów próbki (V_o) określa się wykorzystując metodę grawimetryczną, porozymetry rtęciowe lub porozymetry gazowe (mierząc objętość cieczy lub gazu, które wniknęły do wnętrza próbki). Jeśli próbka ma kształt regularny, całkowitą objętość próbki materiału (V) wyznacza się geometrycznie, mierząc jej wymiary. Dla próbek o nieregularnych kształtach, całkowitą objętość wyznacza się metodą grawimetryczną (pory ciała należy odizolować od otoczenia) lub wykorzystuje się porozymetr rtęciowy (rtęć zwilża próbkę, ale nie wnika do porów). Jeśli znany jest materiał próbki, objętość materiału szkieletu (V_s) można wyznaczyć poprzez wyznaczenie masy próbki, a następnie odczytanie z tablic gęstości szkieletu. Objętość można także określić metodą grawimetryczną (nasycając pory płynem), wykorzystując porozymetry rtęciowe (rtęć wnika do porów pod odpowiednio dużym ciśnieniem) lub piknometry helowe. Jednak z powodu istnienia porowatości zamkniętej w materiale, prawidłowe określenie objętości szkieletu może wymagać rozdrobnienia próbki [54].

Jedną z metod wyznaczania porowatości objętościowej jest metoda wagowa (grawimetryczna), która polega na wykorzystaniu wagi jako głównego przyrządu pomiarowego. Metodą tą można wyznaczyć porowatość próbki materiału o regularnych kształtach, którego gęstość właściwa jest znana lub porowatych materiałów sypkich [54].

W przypadku materiału o znanej gęstości właściwej (10), ważąc próbkę wyznaczana jest jej

masa (m_s), a dokonując pomiarów geometrii próbki wyznacza się jej objętość (V). Te dwie wielkości umożliwiają wyznaczenie gęstości pozornej (11) [54,125].

$$\rho_s = \frac{m_s}{V_s} \quad 10$$

$$\rho_p = \frac{m_s}{V} \quad 11$$

gdzie:

ρ_s – gęstość właściwa próbki;

m_s – masa suchej próbki;

V_s – objętość szkieletu próbki;

ρ_p – gęstość pozorna próbki;

V – całkowita objętość próbki.

Wartość porowatości całkowitej (12) oblicza się na podstawie definicji (4) oraz w oparciu o gęstość właściwą (10) i gęstość pozorną (11) materiału porowatego [54,125].

$$\varepsilon_c = 1 - \frac{V_s}{V} = 1 - \frac{\rho_p}{\rho_s} \quad 12$$

gdzie:

ε_c - porowatość całkowita;

V_s – objętość szkieletu próbki;

V – całkowita objętość próbki;

ρ_p – gęstość pozorna próbki;

ρ_s – gęstość właściwa próbki.

Dla materiałów o nieznannej gęstości właściwej należy przeprowadzić dodatkowy pomiar ciężaru próbki zanurzonej w cieczy. Pory materiału izoluje się od otoczenia warstewką parafiny. Na tej podstawie oblicza się objętość jaką zajmuje materiał szkieletu w próbce (13). Wówczas znając objętość całkowitą próbki (V) wyznacza się porowatość objętościową (4) [54]:

$$V_s = \frac{Q_p - Q_c}{g \rho_c} \quad 13$$

gdzie:

V_s – objętość szkieletu próbki;

Q_p - ciężar próbki w powietrzu;

Q_c – ciężar próbki w cieczy;

g – przyspieszenie ziemskie;

ρ_c – gęstość cieczy.

Przy wyznaczaniu porowatości materiałów sypkich metodą wagową, znajomość gęstości pozornej nie jest konieczna. Niezbędna jest natomiast ciecz o znanej gęstości (np. woda) oraz naczynie pomiarowe o określonej objętości. Porowatość wyznacza się przez zalanie naczynia cieczą i całkowite zasypanie badanym materiałem sypkim, lekko ubijając go. W trakcie zasypywania nadmiar cieczy wylewa się z naczynia. Taka kolejność postępowania ma na celu zapewnienie by płyn pozostający w naczyniu całkowicie wypełnił pory materiału porowatego. Następnie naczynie waży się, uzyskując całkowitą jego masę (14) [54].

$$m = m_n + m_c + m_s \quad 14$$

gdzie:

m – całkowita masa naczynia pomiarowego;

m_n – masa pustego naczynia pomiarowego;

m_c – masa cieczy wypełniającej pory;

m_s – masa suchego materiału sypkiego.

Po wysuszeniu próbki mierzy się masę materiału suchego i masę naczynia, ważąc każdy z tych składników oddzielnie. Masa cieczy (o znanej gęstości) wypełniającej pory materiału wyznaczana jest korzystając z powyższego wzoru (14) i umożliwia określenie objętości porów materiału (15) [54].

$$V_p = \frac{m_c}{\rho_c} \quad 15$$

gdzie:

V_p – objętość porów materiału;

m_c – masa cieczy wypełniającej pory;

ρ_c – gęstość cieczy wypełniającej pory materiału.

Wykorzystując definicję (4) oraz zależności (14) i (15), porowatość objętościowa wyznaczona tą metodą dana będzie wzorem (16) [54]:

$$\varepsilon_c = \frac{m - m_n - m_s}{V \rho_c} \quad 16$$

gdzie:

ε_c - porowatość całkowita;

m – całkowita masa naczynia pomiarowego;

m_n – masa pustego naczynia pomiarowego;

m_s – masa suchego materiału sypkiego;

V – całkowita objętość próbki materiału;

ρ_c – gęstość cieczy wypełniającej pory materiału.

Metoda wciskania rtęci wykorzystuje właściwości rtęci, jako cieczy niezwilżającej większość materiałów. Pomiarów dokonuje się w urządzeniach nazywanych porozymetrami rtęciowymi. Próbka umieszczana jest w komorze, z której za pomocą pompy próżniowej usuwane jest powietrze. Następnie do komory wprowadzana jest rtęć, która ze względu na napięcie powierzchniowe nie przenika do wnętrza próbki. Pozwala to na wyznaczenie całkowitej objętości badanej próbki. Wzrost ciśnienia powoduje, że rtęć wnika do porów materiału (im większe ciśnienie, tym większa ilość wnika w próbkę – wypełniane są coraz mniejsze pory). Rejestrując przyrost objętości rtęci i wzrost ciśnienia, można określić zarówno porowatość materiału, jak i rozkład wymiarów porów. Metoda niesie ze sobą jednak wiele ograniczeń i przyczyn ewentualnych błędów. Wadą metody jest zniszczenie próbki po pomiarach, ponieważ część rtęci pozostaje w porach (wymaga to odpowiedniej utylizacji materiału). Ponadto przy zastosowaniu wysokiego ciśnienia włączania rtęci istnieje możliwość deformacji próbki, zniszczenia struktury porowatej i otwierania porów zamkniętych. Zatem dokładność metody spada wraz ze wzrostem

ciśnienia. Penetracja rtęci jest często ograniczona przez przewężenia porów (szerokie pory w głębi pozostają bez dostępu). W takim przypadku wyniki są obarczone dużym błędem, gdyż objętość szerokich porów ograniczana jest do wielkości pora o średnicy przewężenia. Możliwość pomiaru dotyczy wyłącznie próbek o małych wymiarach – do 15 mm średnicy. Wadą metody jest także brak możliwości badania mikroporów. Ponadto przy badaniu próbek z dużą ilością zamkniętych porów, następuje zawyżanie powierzchni i objętości porów małych oraz średnich [68,54,125,126].

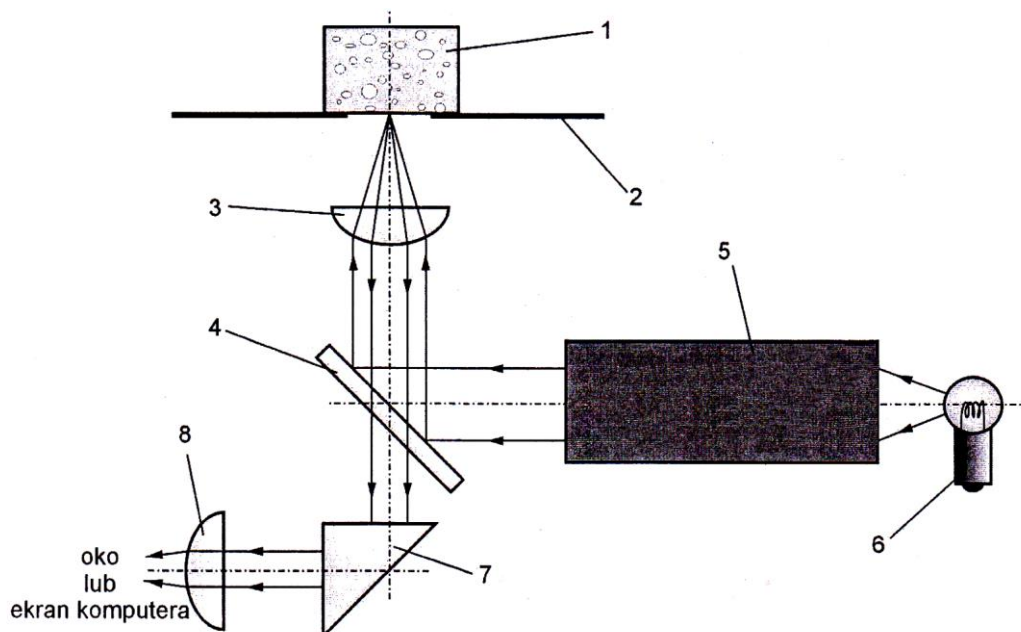
Kolejną metodą badania porowatości materiałów jest metoda sprężania lub rozprężania gazu. Urządzenia wykorzystywane w tej metodzie to porozymetry gazowe. W metodzie wykorzystuje się gaz mający zdolność do równomiernej penetracji otwartych porów materiału. Najczęściej jest to powietrze, dwutlenek węgla, azot, krypton lub argon. Próbkę umieszcza się w hermetycznym naczyniu w atmosferze gazu, a następnie stopniowo, do określonej wartości, zwiększane jest jego ciśnienie. Czynność powtarzana jest dla pustego naczynia i naczynia z próbką, dzięki czemu poprzez wyznaczenie objętości próbki i objętości zajmowanej przez jej szkielet, można określić porowatość próbki. Podobną metodą jest metoda rozprężania gazu, która polega na sprężaniu gazu (w zbiorniku o określonej objętości) do zadanego ciśnienia. Następnie po otwarciu zaworu oddzielającego zbiornik od komory z próbką, gaz wnika w pory próbki i jego ciśnienie w całym układzie pomiarowym maleje. Pomiar różnicy ciśnień pozwala na wyznaczenie parametru porowatości próbki. Istotną wadą metody jest brak możliwości pomiaru makroporów (badane są przede wszystkim mezo- i mikropory). Ponadto problemem badań z wykorzystaniem porozymetrów gazowych jest ograniczenie wielkości próbek. Standardowe urządzenia umożliwiają badanie próbek do 25 mm średnicy [54].

3.4.2. Metody mikroskopowe

Mikroskopia umożliwia analizę geometrii i rozmiarów porów poprzez obserwacje przekrojów materiałów. W analizie porowatości wykorzystuje się najczęściej mikroskopię optyczną lub mikroskopię elektronową [126].

Metoda z wykorzystaniem mikroskopu optycznego pozwala zbadać porowatość próbki materiału, rozróżnić elementy strukturalne oraz określić ich ilość, morfologię, wymiary i rozmieszczenie. Podstawowymi elementami mikroskopu optycznego są okular, obiektyw oraz układ oświetleniowy (Rysunek 13). Mikroskopy świetlne wykorzystują zjawisko odbicia i rozproszenia światła przez badane powierzchnie. Obiektyw mikroskopu daje obraz rzeczywisty, odwrócony i powiększony. Natomiast okular pozwala na obserwowanie obrazu generowanego przez obiektyw. Mikroskopy optyczne stanowią źródło informacji na temat obiektów dwuwymiarowych, nie pozwalają natomiast na obserwację trójwymiarową. Przed badaniem

próbkę materiału porowatego należy przygotować. Mikroskopy optyczne charakteryzują się ograniczoną głębią ostrości. Dlatego też powierzchnia będąca przedmiotem analizy musi być dokładnie wypolerowana. Jeśli badana powierzchnia nie jest dostatecznie gładka nie będzie wystarczająco ostry. Materiały ceramiczne cechują się dużą porowatością, zatem ich obserwacja z wykorzystaniem mikroskopów optycznych jest utrudniona [9,54,127].

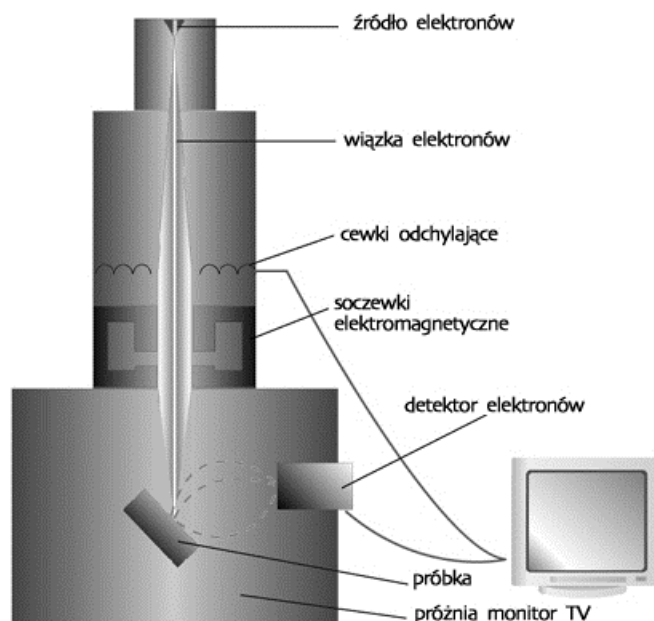


Rysunek 13. Zasada działania mikroskopu optycznego: 1-próbka, 2-stół mikroskopu, 3-objektyw, 4-płytkę oświetlającą, 5-kondensator, 6-żarówka, 7-pryzmat optyczny, 8-okular [54]

Porowatość materiału może być również wyznacza z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego. Spośród mikroskopów elektronowych wyróżnić można skaningowy mikroskop elektronowy (Scanning Electron Microscope – SEM) oraz transmisyjny mikroskop elektronowy (Transmission Electron Microscope – TEM). Mikroskopy te pozwalają ujawniać obszary nieosiągalne dla mikroskopów optycznych. Ich rozdzielczość jest ograniczona długością promieniowania elektromagnetycznego. Pozwala to jednak na rozróżnianie detali o wymiarach około 2 nm w mikroskopach typu SEM oraz 0,2 nm w przypadku TEM. Powstający obraz, podobnie jak w mikroskopach optycznych, jest dwuwymiarowy [9].

Elektronowy mikroskop skaningowy umożliwia badanie bardzo rozwiniętych powierzchni. Mikroskop składa się z działu elektronowego emitującego elektrony, które są przyśpieszane w polu elektrycznym. Wiązka o średnicy kilku nanometrów jest formowana przez układ soczewek elektromagnetycznych i pada na powierzchnię materiału, a trafiając na jej nierówności wynikające z porowatości, odbija się pod różnymi kątami. Elektrony, które odbiły się pod odpowiednim kątem trafiają do detektora (Rysunek 14). Miejsca te widoczne są na wynikowym obrazie jako białe

obszary, natomiast miejsca, z których elektrony nie wróciły bezpośrednio do detektora, są widoczne jako ciemne obszary (wnętrza porów). Niewątpliwą zaletą mikroskopów SEM jest ich duża głębia ostrości [9,127,128,129].



Rysunek 14. Schemat budowy skaningowego mikroskopu elektronowego [130]

Do badania struktury materiałów posłużyć może również transmisyjny mikroskop skaningowy. Podobnie jak w przypadku mikroskopu skaningowego, w mikroskopie transmisyjnym elektrony są emitowane przez działko elektronowe i przyspieszane w polu elektrycznym, między katodą a anodą. W kolumnie mikroskopu umieszczone są soczewki elektromagnetyczne. Powiększenie sięga do kilku milionów razy. W przypadku mikroskopów TEM trudność polega natomiast na przygotowaniu próbki, która powinna być dostatecznie cienka, aby mogły ją prześwietlić elektrony [9].

Na podstawie obrazu powierzchni uzyskanego z wykorzystaniem mikroskopu, stosując metodę punktową można wyznaczyć porowatość całkowitą. Należy w tym celu stworzyć na powierzchni obrazu siatkę punktów. Analizując obraz określa się, które punkty siatki leżą na szkielecie (punkty zostają oznaczone na biało), a które leżą wewnątrz porów (punkty zostają oznaczone na czarno). Na podstawie ilości pikseli czarnych i białych, oceniana jest wartość porowatości (17) [129].

$$\varepsilon_c = 1 - \frac{N_s}{N} \quad 17$$

gdzie:

ε_c - porowatość całkowita;

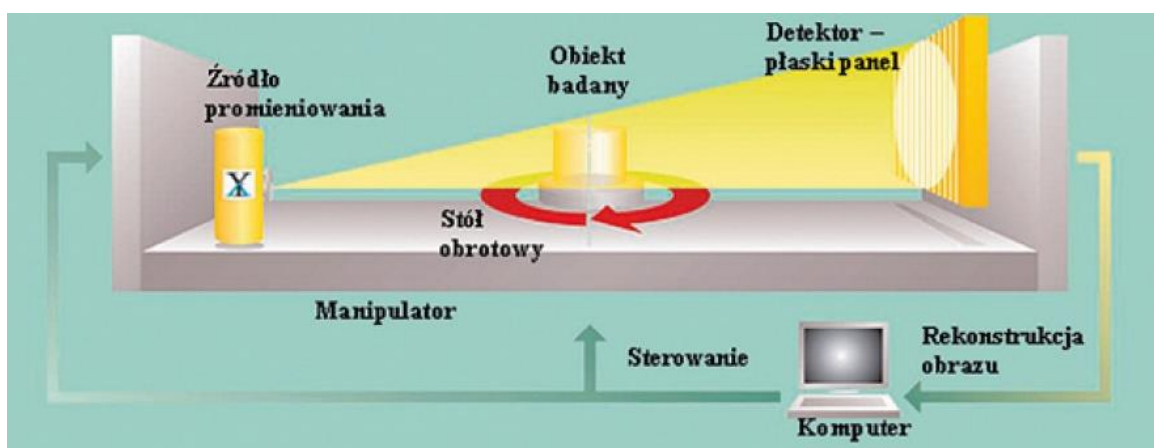
N_s - liczba węzłów siatki wewnątrz fazy stałej;

N - liczba wszystkich punktów siatki.

3.4.3. Metody rentgenowskiej mikrotomografii komputerowej

Porowatość materiałów wyznaczana jest także z wykorzystaniem mikrotomografii komputerowej. Tomografia komputerowa jest rodzajem spektroskopii rentgenowskiej i pozwala na uzyskanie obrazów warstwowych badanego obiektu. Wykorzystuje ona złożenie projekcji wykonanych z różnych kierunków do utworzenia obrazów przekrojowych (2D) i przestrzennych (3D) [131,132].

Podstawowe elementy typowego tomografu komputerowego to lampa rentgenowska i układ detektorów promieniowania. Zasadnicza różnica konstrukcyjna między tomografem stosowanym w diagnostyce medycznej a mikrotomografem stosowanym w charakteryzacji materiałów polega na tym, że w tym pierwszym obiekt badań (pacjent) pozostaje w trakcie skanowania nieruchomy (obraca się układ lampa-detektor), natomiast w mikrotomografach obrotowi podlega wyłącznie obiekt badań, co znacznie upraszcza konstrukcję urządzenia. Tworzenie obrazu tomograficznego polega na pomiarze pochłaniania promieniowania przechodzącego przez obiekt. Podstawowym sposobem badania jest skierowanie na badany obiekt wiązki promieniowania X i rejestracja jego natężenia po drugiej stronie na panelu detektorów (Rysunek 15). Promieniowanie X, przechodząc przez badany obiekt, doznaje osłabienia, które jest funkcją energii promieniowania, rodzaju i grubości badanego materiału. Podczas skanowania badana próbka obraca się z założonym krokiem kątowym. W każdej z osiągniętych pozycji kątowych wykonywany jest obraz transmisyjny (projekcja) obiektu. Następnie na podstawie serii obrazów transmisyjnych (projekcji) dokonywana jest komputerowa rekonstrukcja wewnętrznej struktury badanego obiektu. Im liczniejsza jest seria obrazów transmisyjnych (mniejszy kątowy krok obrotu próbki), tym dokładniejsze jest odwzorowanie wewnętrznej struktury badanego obiektu. W odróżnieniu od klasycznej tomografii, mikrotomografia pozwala na uzyskiwanie obrazów w bardzo wysokich rozdzielczościach sięgających nawet 100 nm. Późniejsza analiza trójwymiarowych obrazów wynikowych umożliwia wyznaczenie porowatości próbki [125,132,133,134].



Rysunek 15. Schemat mikrotomografu [132]

4. CELE ORAZ ZAKRES ROZPRAWY

4.1. Cele rozprawy

Głównym celem niniejszej rozprawy jest opracowanie trójwymiarowego modelu porów w biomateriale i weryfikacja modelu na materiale rzeczywistym. Model powinien umożliwić wyznaczenie wymiarów geometrycznych porów zarówno wewnątrz materiału jak i na jego powierzchni, a tym samym dać możliwość wyznaczenia objętości porów otwartych oraz szacowania średniej objętości porów na jednostkę powierzchni biomateriału.

Cele pośrednie:

- przeprowadzenie symulacji komputerowej z wykorzystaniem opracowanego modelu;
- obserwacje mikroskopowe powierzchni porowatego biomateriału korundowego z wykorzystaniem skaningowego laserowego mikroskopu konfokalnego LEXT OLS4000 oraz dwóch typów obiektywów – MPLFLN2.5X i MPLFLN5X;
- opracowanie metody przetwarzania i analizy obrazów mikroskopowych przedstawiających powierzchnię biomateriału korundowego w celu wysegmentowania porów powierzchni;
- pomiary próbek porowatego biomateriału korundowego za pomocą skanera rentgenowskiego GE Phoenix v|tome|x oraz rekonstrukcja trójwymiarowych obrazów próbek na podstawie serii radiogramów;
- opracowanie metody analizy danych mikrotomograficznych w celu wyodrębnienia porów biomateriału korundowego;
- wyznaczenie wymiarów geometrycznych porów biomateriału korundowego wysegmentowanych na obrazach mikroskopowych oraz mikrotomograficznych.

4.2. Zakres i plan rozprawy

Zakres i plan rozprawy doktorskiej wynikał bezpośrednio z założonych przez autora celów badawczych i obejmował:

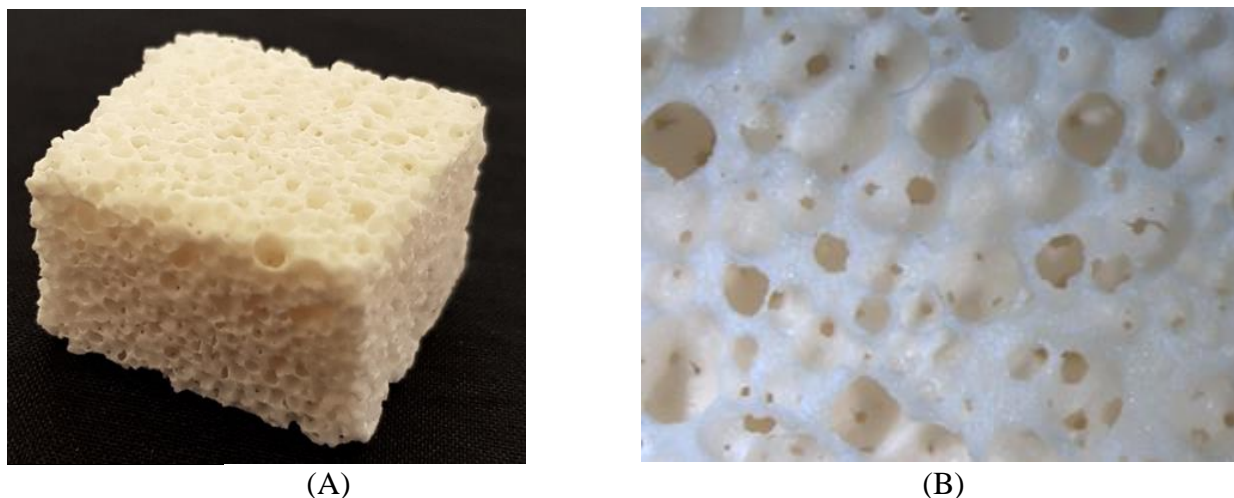
1. Pozyskanie materiału badawczego, który stanowiły próbki porowatego biomateriału korundowego wytworzone metodą spieniania chemicznego.
2. Akwizycja obrazów powierzchni próbek biomateriału z wykorzystaniem skaningowego laserowego mikroskopu konfokalnego LEXT OLS4000 oraz dwóch typów obiektywów – MPLFLN2.5X i MPLFLN5X.
3. Opracowanie i zastosowanie metody przetwarzania i analizy obrazów mikroskopowych w oprogramowaniu SPIP firmy Image Metrology w celu wysegmentowania porów

- powierzchni biomateriału.
4. Pomiary geometrii porów skutkujące wygenerowaniem parametrów charakteryzujących pory.
 5. Określenie założeń i zależności dla trójwymiarowego modelu porów biomateriału.
 6. Implementacja modelu wraz z graficznym interfejsem użytkownika w środowisku programistycznym pakietu Matlab.
 7. Przeprowadzenie symulacji komputerowej z wykorzystaniem opracowanego modelu.
 8. Porównanie wyników symulacji z wynikami uzyskanymi podczas analizy obrazów mikroskopowych.
 9. Pomiary próbek biomateriału za pomocą skanera rentgenowskiego GE Phoenix v|tome|x.
 10. Rekonstrukcja w programie Phoenix Datos Reconstruction trójwymiarowych obrazów próbek na podstawie serii radiogramów będących wynikiem badań mikrotomograficznych.
 11. Opracowanie i zastosowanie metody analizy danych mikrotomograficznych z wykorzystaniem oprogramowania Thermo Scientific Avizo w celu wyodrębnienia porów biomateriału.
 12. Pomiary geometrii porów skutkujące wygenerowaniem parametrów charakteryzujących pory.
 13. Weryfikacja opracowanego modelu poprzez porównanie wyników otrzymanych z wykorzystaniem modelu z danymi uzyskanymi w wyniku mikrotomograficznych badań biomateriału.
 14. Analiza otrzymanych wyników badań w odniesieniu do celów rozprawy.

5. BADANIA WŁASNE

5.1. Materiał badawczy

Materiał badawczy stanowiły próbki porowatego biomateriału korundowego wytworzone metodą spieniania chemicznego (Rysunek 16), którego porowatość otwarta oraz wielkość i połączenia pomiędzy porami umożliwiają właściwą osteointegrację biomateriału z tkanką kostną gąbczastą. Sposób formowania próbek polegał na odlewaniu kształtek z gęstwy zawierającej drobnziarnisty tlenek glinu (61,7% wag.), tlenek magnezu (1,3% wag.), węglan wapnia (1,2% wag.) i roztwór wodny polimeru opartego na tlenochlorku glinu (35,9% wag.) [135]. Po zmieszaniu składników wyjściowych, pod wpływem kwaśnego odczynu roztworu polimeru węglan wapnia się rozkłada, a wydzielający się CO₂ spienia gęstwę. Jednocześnie proces zobojętniania odczynu gęstwy tlenkiem magnezu i tlenkiem wapnia powoduje żelowanie polimeru co pozwala utrwalić porowatą strukturę materiału. Formowanie przeprowadzono w formach silikonowych o wymiarach 80 mm × 30 mm × 25 mm. Powstałe półfabrykaty suszono i wypalono w temperaturze 1730°C. Próbki badawcze o wymiarach około 20 mm × 20 mm × 12 mm wycięto z trzech różnych półfabrykatów.



Rysunek 16. Porowaty biomateriał korundowy: (A) próbka, (B) obraz powierzchni próbki pozyskany z wykorzystaniem mikroskopu stereoskopowego

Ceramika korundowa ma szerokie zastosowanie w medycynie. Biomateriał ten jest w pełni biozgodny, ponieważ nie wywołuje w organizmie żadnych niebezpiecznych dla niego reakcji. Posiada także dobre właściwości mechaniczne (wysoka wytrzymałość na ścislenie, zginanie, ścieranie). Właściwości ceramiki korundowej w dużym stopniu zależne są od wielkości ziaren i porowatości. W medycynie stosowane są zarówno materiały w formie prawie bezporowatego spieku, jak również materiały o różnym stopniu porowatości. Bezporowaty biokorund stosuje się

głównie w endoprotezoplastyce stawów, szczególnie biodrowego i kolanowego [19]. Porowata ceramika korundowa wykorzystywana jest w medycynie do uzupełniania ubytków kostnych powstałych w wyniku różnego rodzaju urazów i schorzeń. Największą zaletą ceramiki porowatej jest możliwość stworzenia z tkanką naturalnego połączenia [1,14,20,21].

5.2. Narzędzia badawcze

Narzędzie badawcze stanowił skaningowy laserowy mikroskop konfokalny LEXT OLS4000, znajdujący się w Laboratorium Ilościowej Analizy i Modelowania Powierzchni Biomateriałów Uniwersytetu Śląskiego (Rysunek 17).



Rysunek 17. Skaningowy laserowy mikroskop konfokalny Olympus LEXT OLS4000

Mikroskop wykorzystuje technologię skanowania konfokalnego, która zapewnia bardzo wysoką rozdzielczość i służy do trójwymiarowego obrazowania topografii powierzchni niepełskiej. Narzędzie umożliwia wykonanie pomiarów z dokładnością od 1 nm w osi Z i 120 nm w płaszczyźnie XY. Źródłem światła w mikroskopie jest wiązka promieniowania laserowego o długości wynoszącej 405 nm. Wiązka po odbiciu od powierzchni próbki zostaje przez pryzmat rozdzielający skierowana do detektora. Detektor rejestruje tylko promienie odbite od elementów próbki znajdujące się w płaszczyźnie ogniskowej obiektywu. Promienie odbite od elementów położonych poniżej lub powyżej płaszczyzny ogniskowej są wygaszane na przesłonie. Dlatego też nie obserwuje się nieostrego obrazu szczegółów. Rejestracja współrzędnych wysokości powierzchni jest realizowana poprzez krokową zmianę położenia płaszczyzny ogniskowej w kierunku osi Z. Po zeskanowaniu jednej płaszczyzny ogniskowej badanej powierzchni w kierunku X i Y oraz zapisaniu obrazu skanowania w pamięci operacyjnej układu mikroskopu

jako cięcia konfokalnego, zmieniane jest położenie płaszczyzny ogniskowej i powtarzana jest procedura skanowania oraz zapisu obrazu. Zmiana wysokości położenia płaszczyzny ogniskowej następuje w wyniku przesunięcia stolika mikroskopu z zamocowaną próbką w stosunku do wiązki promieniowania laserowego. Z określonej serii konfokalnych cięć, przy użyciu stacji roboczej mikroskopu, wyznaczana jest kolonia pikseli wzdłuż współrzędnej Z, która osiąga maksymalną intensywność odbitego światła lasera. Na tej podstawie każdemu pikselowi o współrzędnych (x, y) przyporządkowany jest określony poziom szarości. Skanowanie obrazu powierzchni próbki na różnych wysokościach umożliwia uzyskanie efektu optycznego cięcia poszczególnych warstw. Wytworzona w ten sposób numeryczna mapa topograficzna zawiera informację o trzech współrzędnych przestrzennych (x, y, z) każdego punktu badanej powierzchni, z czego wartość współrzędnej z (wysokości punktu powierzchni) jest stopniem szarości odpowiedniego piksela mapy topograficznej. Zbiór poszczególnych warstw umożliwia rekonstrukcję trójwymiarowego, przestrzennego obrazu powierzchni próbki [136].

Narzędzie badawcze stanowił również wysokorozdzielczy skaner rentgenowski GE Phoenix v|tome|x (Rysunek 18), znajdujący się w Wydziałowym Laboratorium Mikrotomografii Komputerowej Uniwersytetu Śląskiego. Mikrotomograf umożliwia badanie obiektów o maksymalnych rozmiarach $260\text{ mm} \times 260\text{ mm} \times 400\text{ mm}$ oraz dopuszczalnej masie 10 kg i wyposażony jest w system pozwalający na zamontowanie dwóch otwartych lamp w komorze tomografu - lampy mikrofokus (240 kV/320 W) oraz lampy nanofokus (180 kV/15 W), co pozwala uzyskać rozdzielczość od $2\text{ }\mu\text{m}$ (dla lampy nanofokus) oraz od $4\text{ }\mu\text{m}$ (dla lampy mikrofokus).



Rysunek 18. Skaner rentgenowski GE Phoenix v|tome|x

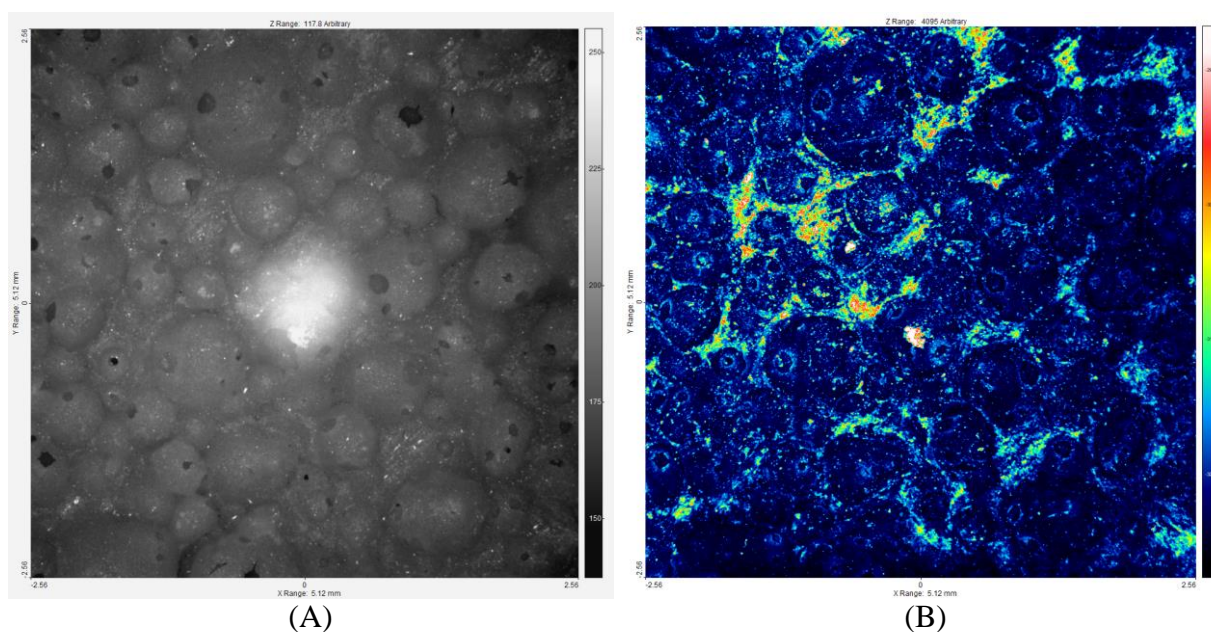
5.3. Mikroskopowe badania biomateriału

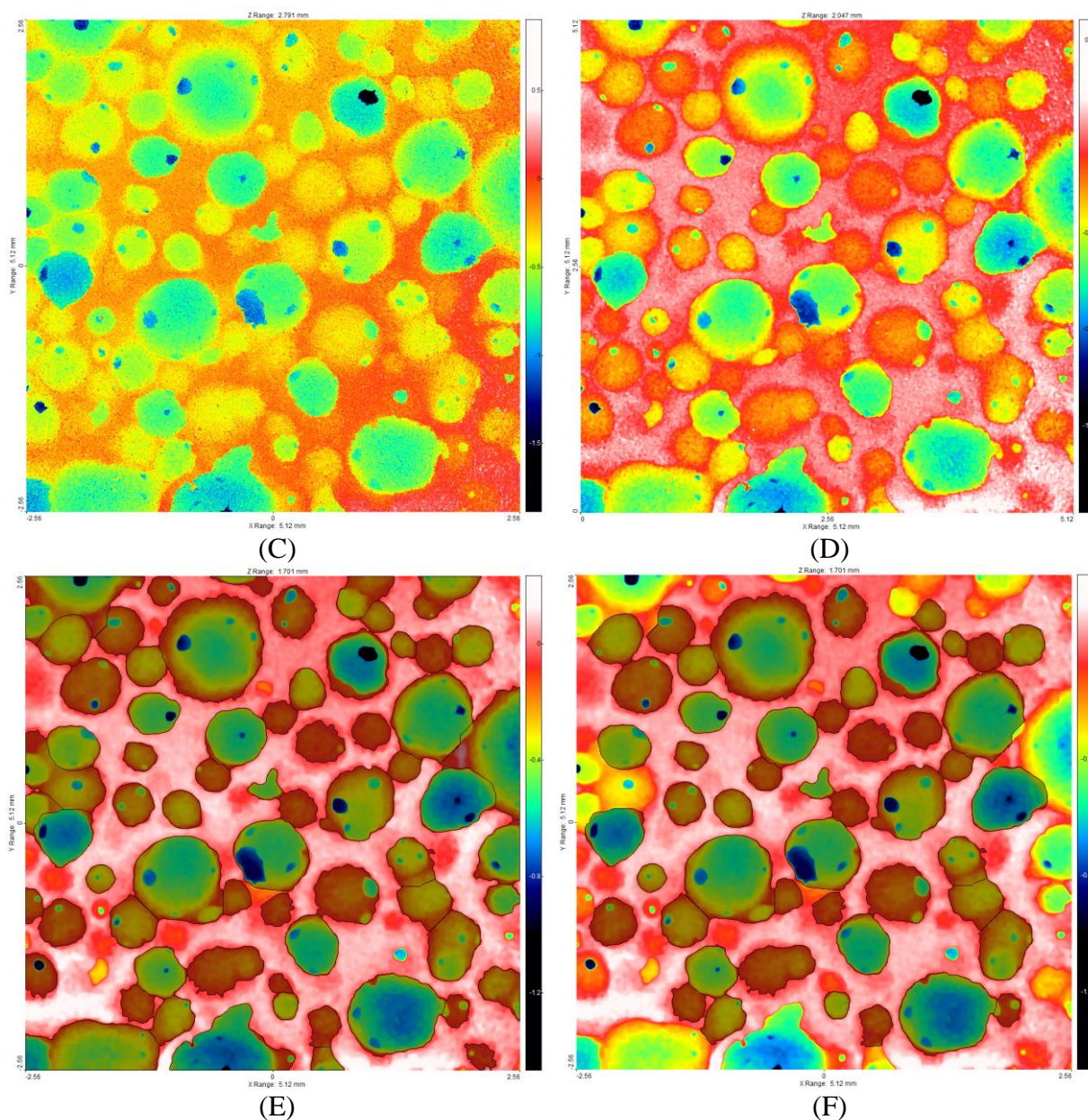
W celu otrzymania mikrofotografii konfokalnych, wybrano 10 obszarów powierzchni badanych próbek, dla których wykonano akwizycję obrazów z wykorzystaniem dwóch typów obiektywów – MPLFLN2.5X o powiększeniu od 54– do 432–krotnym oraz MPLFLN5X o powiększeniu od 108– do 864–krotnym. Rozmiary analizowanych powierzchni wynosiły $5120 \mu\text{m} \times 5120 \mu\text{m} \times 5120 \mu\text{m}$ (dla obiektywu MPLFLN2.5X) oraz $2572 \mu\text{m} \times 2572 \mu\text{m} \times 2572 \mu\text{m}$ (dla obiektywu MPLFLN5X).

5.3.1. Analiza obrazów mikroskopowych

Obrazy powierzchni biomateriału pozyskane za pomocą mikroskopu konfokalnego stanowiły podstawę do opracowania modelu porów biomateriału, ponieważ umożliwiły określenie jego założeń. W tym celu obrazy poddano analizie w programie SPIP firmy Image Metrology. Opracowano metodę przetwarzania i analizy obrazu, która pozwoliła wyodrębnić pory powierzchni. Następnie wyznaczono parametry charakteryzujące ich geometrię [137,138].

Pierwszym krokiem analizy było wyodrębnienie warstwy obrazu (Rysunek 19A), warstwy natężenia (Rysunek 19B) oraz warstwy topografii (Rysunek 19C). Warstwę topografii wypoziomowano, a następnie w celu usunięcia szumu występującego na obrazie, zastosowano operację filtrowania wykorzystując do tego celu filtr medianowy (Rysunek 19D). Kolejnym krokiem była detekcja porów powierzchni. Zastosowaną metodą detekcji było progowanie. Następnie wygładzono kontury wyznaczonych obiektów i rozdzielono połączone ze sobą pory (Rysunek 19E). Wykluczono również obiekty o powierzchni mniejszej niż 0.05mm^2 oraz te przecięte ramką obrazu (Rysunek 19F).





Rysunek 19. Analiza obrazu w programie SPIP na przykładzie obrazu uzyskanego z wykorzystaniem obiektywu MPLFLN2.5X: (A) warstwa obrazu, (B) warstwa napięcia, (C) warstwa topografii, (D) operacja filtrowania, (E) detekcja porów, (F) obraz wynikowy

Analogiczną metodykę analizy zastosowano dla pozostałych obrazów powierzchni biomateriału pozyskanych zarówno z wykorzystaniem obiektywu MPLFLN2.5X oraz MPLFLN5X.

Obrazy wynikowe posłużyły do wygenerowania parametrów charakteryzujących pory (Tabela 2, Tabela 3). Została wyznaczona liczba porów (N_{2D}), średnia średnica (D_{mean2D}), średnia powierzchnia (A_{mean2D}), sumaryczna powierzchnia porów (A_{sum2D}), a także średni obwód (P_{mean2D}).

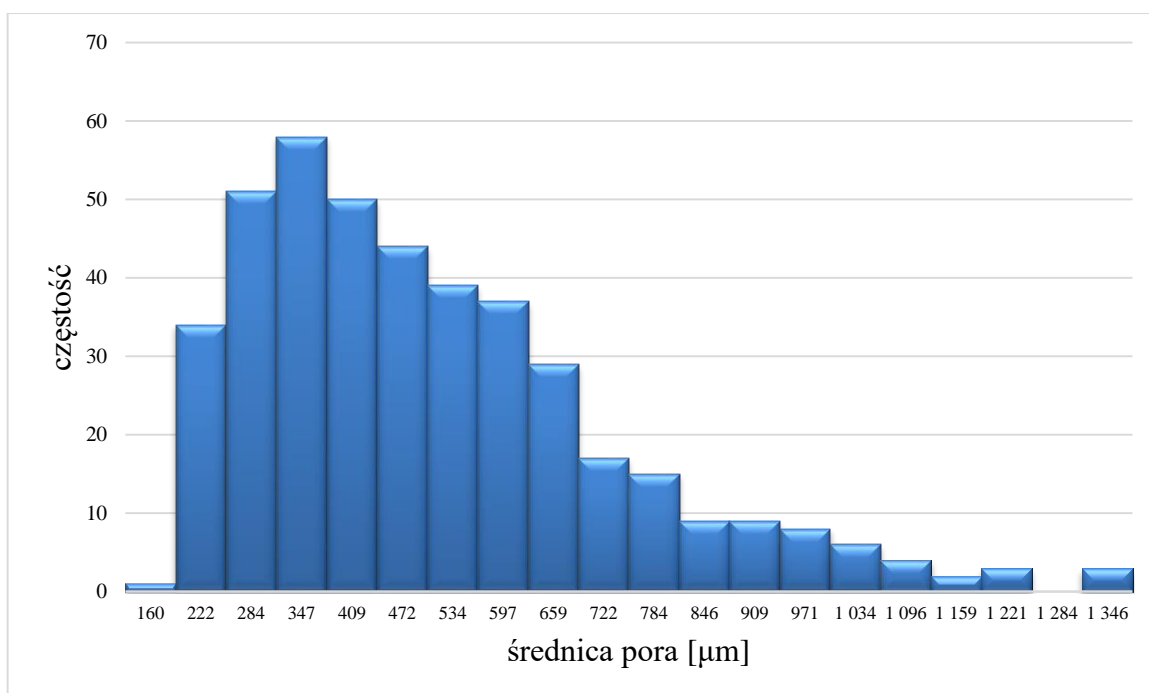
Tabela 2. Parametry porów wyznaczone dla poszczególnych obrazów otrzymanych z wykorzystaniem obiektywu MPLFLN2.5X

	N_{2D}	D_{mean2D} [μm]	A_{mean2D} [μm^2]	A_{sum2D} [mm^2]	P_{mean2D} [μm]
M2.5-R1	38	543	282547	10,73	1997
M2.5-R2	47	465	206903	9,72	1683
M2.5-R3	44	494	238373	10,49	1747
M2.5-R4	43	472	219741	9,45	1706
M2.5-R5	56	441	194142	10,87	1592
M2.5-R6	58	410	163680	9,49	1472
M2.5-R7	48	496	219696	10,55	1718
M2.5-R8	21	740	501395	10,53	2685
M2.5-R9	37	493	244712	9,05	1876
M2.5-R10	30	515	248597	7,46	1901
Wartość minimalna	21	410	163680	7,46	1472
Wartość średnia	42	506	251978	9,83	1837
Wartość maksymalna	58	740	501395	10,87	2685
Odchylenie standardowe	11	85	88683	0,99	317

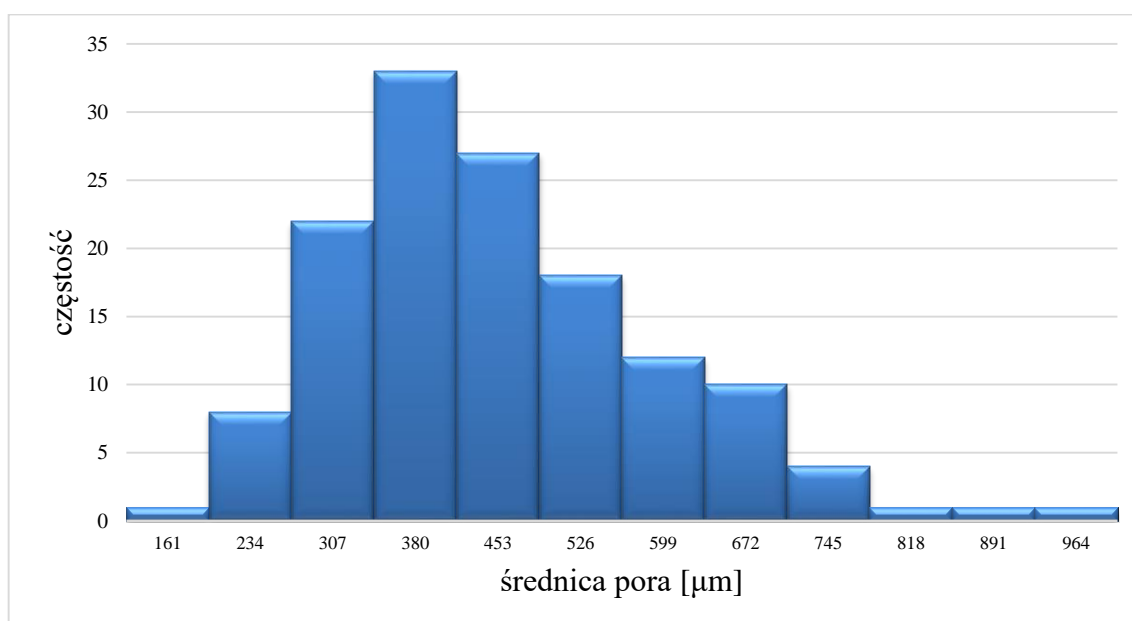
Tabela 3. Parametry porów wyznaczone dla poszczególnych obrazów otrzymanych z wykorzystaniem obiektywu MPLFLN5X

	N_{2D}	D_{mean2D} [μm]	A_{mean2D} [μm^2]	A_{sum2D} [mm^2]	P_{mean2D} [μm]
M5.0-R1	11	489	211630	2,33	1686
M5.0-R2	17	367	116891	1,99	1339
M5.0-R3	18	395	136054	2,45	1414
M5.0-R4	12	452	176368	2,12	1608
M5.0-R5	14	492	202786	2,84	1786
M5.0-R6	18	393	129344	2,33	1420
M5.0-R7	17	376	122644	2,08	1307
M5.0-R8	12	432	197431	2,37	1599
M5.0-R9	9	492	236097	2,12	1764
M5.0-R10	13	440	172610	2,24	1560
Wartość minimalna	9	367	116891	1,99	1307
Wartość średnia	14	432	170185	2,29	1548
Wartość maksymalna	18	492	236097	2,84	1786
Odchylenie standardowe	3	45	39805	0,23	162

W celu ustalenia rozkładu prawdopodobieństwa dla średnic porów, wygenerowano histogram przedstawiający rozkład wartości średnic porów wyznaczonych na wszystkich obrazach otrzymanych z wykorzystaniem obiektywu MPLFLN2.5X (Rysunek 20), a także wyodrębnionych na obrazach otrzymanych z wykorzystaniem obiektywu MPLFLN5X (Rysunek 21).



Rysunek 20. Histogram przedstawiający rozkład średnic porów wyznaczonych na obrazach otrzymanych z wykorzystaniem obiektywu MPLFLN2.5X

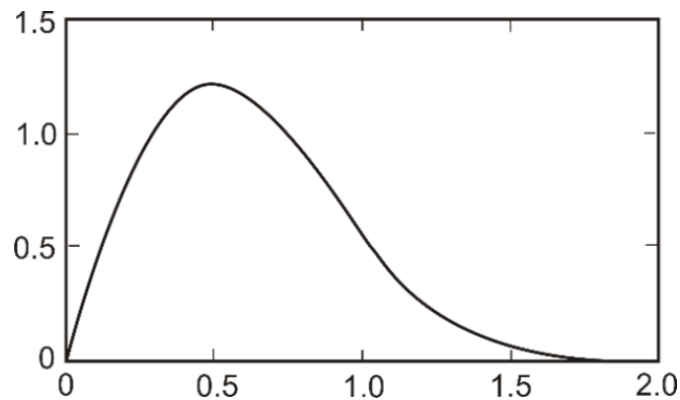


Rysunek 21. Histogram przedstawiający rozkład średnic porów wyznaczonych na obrazach otrzymanych z wykorzystaniem obiektywu MPLFLN5X

Można zaobserwować, iż histogramy stanowią odpowiednik wykresu funkcji gęstości prawdopodobieństwa w rozkładzie Rayleigha. Rozkład Rayleigha jest ciągłym rozkładem prawdopodobieństwa, którego składowe są niezależnymi, dodatnimi zmiennymi losowymi o rozkładzie normalnym. Zmienna losowa ma rozkład Rayleigha, jeżeli gęstość jej rozkładu prawdopodobieństwa (Rysunek 22) wyraża się wzorem (18) [139,140]:

$$f(x; D) = \frac{x}{\sigma^2} e^{-x^2/(2D^2)}, \quad x \geq 0 \quad 18$$

gdzie:
 x - nośnik miary (zbiór wszystkich wartości, które może przyjąć zmienna losowa);
 σ - współczynnik skali.



Rysunek 22. Wykres funkcji gęstości prawdopodobieństwa dla rozkładu Rayleigha

Dla każdego obrazu wyznaczono również średnie wartości parametrów morfologicznych porów, takich jak okrągłość, współczynnik kształtu, zwartość oraz wydłużenie, które mają na celu scharakteryzowanie porów traktowanych jako płaski kształt na płaszczyźnie poziomej.

Okrągłość definiowana jest jako stosunek pola powierzchni obiektu do pola powierzchni koła, którego średnica jest równa maksymalnej średnicy obiektu (19) [141].

$$M_{RN} = \frac{4A}{\pi D_{max}^2} \quad 19$$

gdzie:
 M_{RN} - okrągłość;
 A - pole powierzchni;
 D_{max} - średnica maksymalna.

Współczynnik kształtu definiowany jest jako stosunek pola powierzchni obiektu do kwadratu jego obwodu (20) [141].

$$M_{FF} = \frac{4\pi A}{P^2} \quad 20$$

gdzie:
 M_{FF} - współczynnik kształtu;
 A - pole powierzchni;
 P - obwód.

Zwartość jest stosunkiem średnicy równoważnej do średnicy maksymalnej. Przy czym średnica równoważna definiowana jest jako średnica koła, którego powierzchnia jest równa powierzchni danego obiektu [141].

Natomiast stosunek średnicy maksymalnej do minimalnej to wydłużenie motywu (21) [141].

$$M_{AR} = \frac{D_{max}}{D_{min}}$$

gdzie:

M_{AR} – wydłużenie;

D_{max} – średnica maksymalna;

D_{min} – średnica minimalna.

Obiekty, których wartości okrągłości, współczynnika kształtu oraz zwartości są bliskie jedności mają okrągły kształt. Natomiast wartości wymienionych parametrów dla obiektów o podłużnym kształcie są zbliżone do 0. W przypadku wydłużenia wysoka wartość parametru wskazuje na podłużny kształt.

Średnie wartości parametrów morfologicznych porów takich jak okrągłość, współczynnik kształtu oraz zwartość (Tabela 4, Tabela 5) są bliskie jedności. Można zatem stwierdzić, iż pory mają kształt zbliżony do koła. Potwierdzają to również średnie wartości wydłużenia, które są bliskie zera. Zatem wartości parametru nie wskazują na podłużny kształt motywu.

Tabela 4. Średnie wartości parametrów morfologicznych porów wyznaczonych na obrazach otrzymanych z wykorzystaniem obiektywu MPLFLN2.5X

	Okrągłość	Współczynnik kształtu	Zwartość	Wydłużenie
M2.5-R1	0,75	0,77	0,86	0,16
M2.5-R2	0,73	0,79	0,85	0,16
M2.5-R3	0,71	0,80	0,84	0,16
M2.5-R4	0,71	0,77	0,84	0,17
M2.5-R5	0,69	0,77	0,83	0,17
M2.5-R6	0,69	0,78	0,83	0,18
M2.5-R7	0,75	0,83	0,87	0,14
M2.5-R8	0,69	0,75	0,83	0,16
M2.5-R9	0,68	0,72	0,82	0,19
M2.5-R10	0,70	0,75	0,83	0,18
Średnia	0,71	0,77	0,84	0,17

Tabela 5. Średnie wartości parametrów morfologicznych porów wyznaczonych na obrazach otrzymanych z wykorzystaniem obiektywu MPLFLN2.5X

	Okrągłość	Współczynnik kształtu	Zwartość	Wydłużenie
M5.0-R1	0,81	0,84	0,9	0,1
M5.0-R2	0,77	0,77	0,88	0,11
M5.0-R3	0,76	0,79	0,87	0,12

M5.0-R4	0,77	0,79	0,87	0,14
M5.0-R5	0,75	0,78	0,87	0,15
M5.0-R6	0,76	0,78	0,87	0,14
M5.0-R7	0,75	0,83	0,87	0,13
M5.0-R8	0,75	0,78	0,86	0,13
M5.0-R9	0,67	0,79	0,82	0,23
M5.0-R10	0,75	0,79	0,87	0,14
Średnia	0,75	0,79	0,87	0,14

W oparciu o wyniki uzyskane podczas analizy obrazów określono następnie założenia dla modelu porów biomateriału.

5.4. Trójwymiarowy model porów biomateriału

Proces tworzenia modelu składał się z trzech zasadniczych etapów. Pierwszy etap polegał na określeniu założeń, które model powinien spełniać. Kolejnym etapem była implementacja modelu. Po zaprogramowaniu modelu należało zaplanować i zrealizować eksperyment symulacyjny, a następnie dokonać analizy i interpretacji wyników symulacji komputerowej. Ostatnim etapem była weryfikacja opracowanego modelu.

5.4.1. Założenia modelu

Dla modelu przyjęto następujące założenia:

1. Rozmiary generowanego modelu są skorelowane z rozmiarami obrazów uzyskiwanych z użyciem mikroskopu konfokalnego.
2. Pory przyjmują kształt kuli, a zatem przekroje porów płaskiego obrazu powierzchni są kołami.
3. Rozmieszczenie środków porów w przestrzeni jest losowe, co jest równoznaczne z tym, że środki porów są zmiennymi losowymi o rozkładzie jednostajnym.
4. Rozkład średnic porów jest rozkładem Rayleigha.
5. Parametry wejściowe modelu to liczba porów oraz zakres długości średnic porów.
6. Przecięcie trójwymiarowego modelu może nastąpić w dowolnej płaszczyźnie.
7. Płaszczyzna przekroju może być w dowolnej pozycji.

5.4.2. Implementacja modelu

W oparciu o przyjęte założenia, zaimplementowano program w języku odpowiednim dla

środowiska programistycznego pakietu Matlab. Implementacja trójwymiarowego modelu porów biomateriału obejmowała następujące etapy:

1. Przyjęcie określonego rozmiaru trójwymiarowego modelu.
2. Przyjęcie określonej liczby zmiennych losowych, co w praktyce oznacza określenie liczby porów w generowanym modelu.
3. Przyjęcie wartości minimalnej oraz maksymalnej średnicy porów.
4. Wygenerowanie określonej liczby zmiennych losowych o rozkładzie Rayleigha, a tym samym wyznaczenie zbioru wartości średnic porów. Do generowania zmiennych losowych o rozkładzie Rayleigha wykorzystano metodę odwracania dystrybuanty, która umożliwiła transformację rozkładu normalnego w rozkład Rayleigha [142]. Etap składał się z następujących kroków:
 - a. Wygenerowanie wektora o długości odpowiadającej przyjętej liczbie zmiennych losowych (liczbie porów), zawierającego wartości o rozkładzie ciągłym. Skorzystanie z funkcji $rand(m, n)$, która losuje m liczb o wartości z przedziału od 0 do 1 i zapisuje je na jednej z n pozycji wektora.
 - b. Przekształcenie wygenerowanego zbioru liczb o rozkładzie równomiernym w rozkład Rayleigha korzystając z zależności (22) [142]:

$$X = \sigma \sqrt{-2 \ln R} \quad 22$$

gdzie:

X – zmienna o rozkładzie Rayleigha;

σ – wariancja;

R – losowa zmienna o rozkładzie równomiernym na przedziale $(0, 1)$.

- c. Przeskalowanie wartości (normalizacja danych) do przedziału pomiędzy określoną uprzednio minimalną i maksymalną średnicą porów. Zastosowano metodę min-max, która umożliwia liniową transformację pierwotnych danych do nowego przedziału (23) [143].

$$V' = \frac{V - \min}{\max - \min} (new_{\max} - new_{\min}) + new_{\min} \quad 23$$

gdzie:

V – wartość przed normalizacją;

V' – wartość po normalizacji;

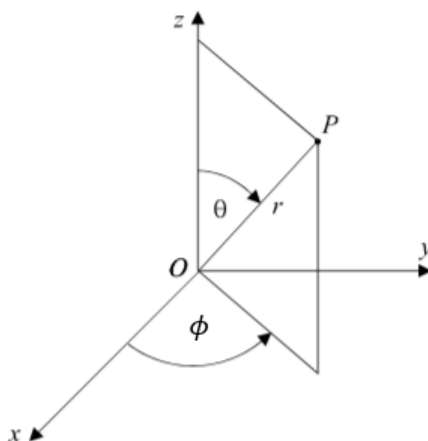
$[\min, \max]$ – oryginalny przedział, w którym mieszczą się dane wejściowe;

$[new_{\min}, new_{\max}]$ – nowy przedział danych.

5. Wyznaczenie współrzędnych X, Y, Z punktów w przestrzeni reprezentujących środki porów i zapisanie ich do osobnych wektorów. Losowo wybrane liczby z zakresu $(0, 1)$, przeskalowano do rozmiaru modelu.
6. Wykreślenie wykresu stanowiącego trójwymiarowy model porów biomateriału. W tym

celu wykorzystano układ współrzędnych sferycznych (Rysunek 23). W układzie tym dowolnemu punktowi w przestrzeni przypisuje się następujące współrzędne sferyczne [144]:

- promień wodzący ($r \geq 0$), czyli odległość punktu P od początku układu współrzędnych O ;
- długość azymutalna ($0 \leq \phi < 2\pi$), czyli miara kąta między rzutem prostokątnym wektora \overrightarrow{OP} na płaszczyznę OXY a dodatnią półosią OX ;
- odległość zenitalna ($0 \leq \theta \leq \pi$), czyli miara kąta między wektorem \overrightarrow{OP} a dodatnią półosią OZ .



Rysunek 23. Współrzędne punktu w układzie współrzędnych sferycznych [145]

Transformację współrzędnych z układu sferycznego na współrzędne kartezjańskie określają wzory (24) [144]:

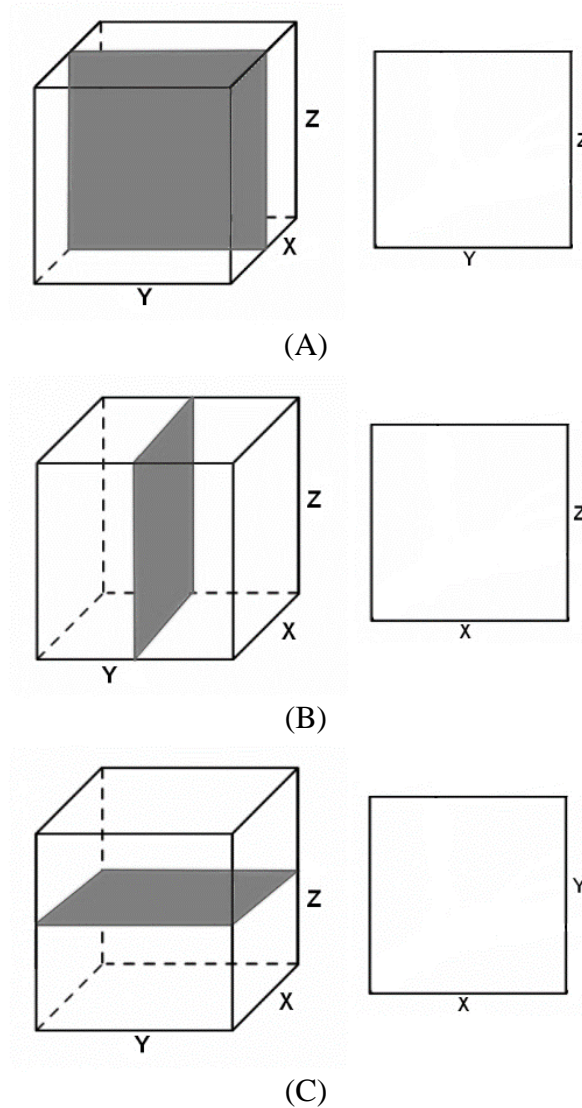
$$\begin{aligned}x &= x(r, \theta, \phi) = r \sin \theta \cos \phi \\y &= y(r, \theta, \phi) = r \sin \theta \sin \phi \\z &= z(r, \theta, \phi) = r \cos \theta\end{aligned} \quad 24$$

W celu wykreślenia trójwymiarowego wykresu skorzystano z funkcji $surf(X, Y, Z)$.

- Wyznaczenie parametrów charakteryzujących pory modelu, takich jak liczba porów, średnia średnica pora, objętość porów oraz porowatość.

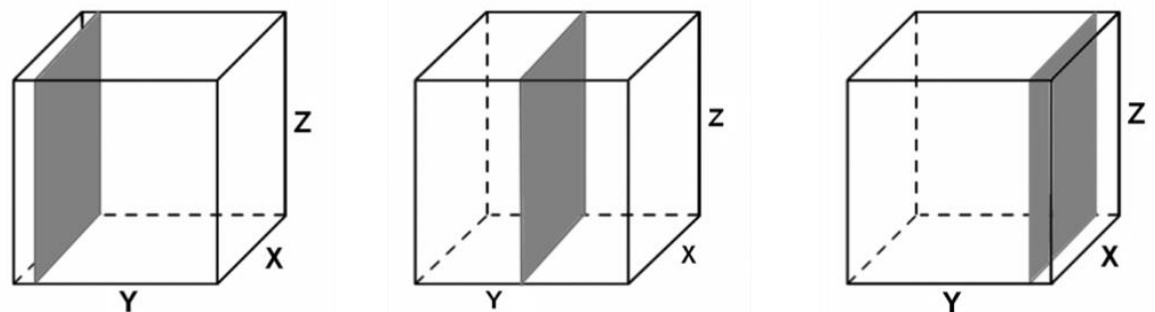
Następnie zaimplementowano dwuwymiarowy model, który stanowił płaski obraz powierzchni przedstawiający pory znajdujące się w określonej przez użytkownika płaszczyźnie i pozycji przekroju. Implementacja obejmowała następujące etapy:

- Ustawienie określonej płaszczyzny przekroju (Rysunek 24).



Rysunek 24. Możliwe do wyboru płaszczyzny przekroju: A) płaszczyzna X, B) płaszczyzna Y, C) płaszczyzna Z

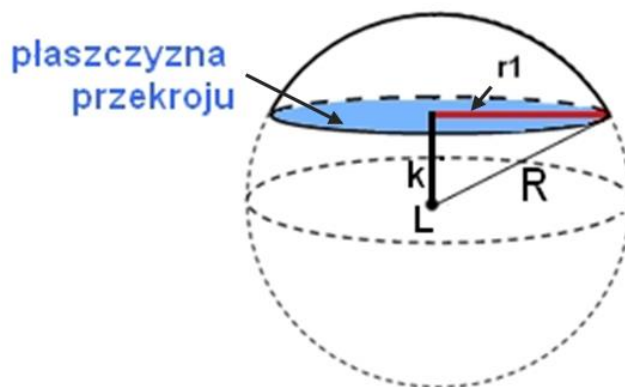
2. Określenie pozycji płaszczyzny przekroju (Rysunek 25).



Rysunek 25. Przykład różnych pozycji w płaszczyźnie Y

3. Wykreślenie wykresu stanowiącego przekrój materiału przedstawiający pory znajdujące się w określonej płaszczyźnie i pozycji przekroju. Etap składał się z następujących kroków:

- a. Wyznaczenie promienia r_1 dla porów (promień koła będącego przekrojem kuli uzyskany w wyniku przecięcia pora płaszczyzną przekroju), w przypadku których różnica k pomiędzy pozycją płaszczyzny przekroju i współrzędną środka pora L w danej płaszczyźnie jest mniejsza niż promień pora R (Rysunek 26). W celu wyznaczenia promienia r_1 wykorzystano twierdzenie Pitagorasa (25).



Rysunek 26. Schematyczne przecięcie pora płaszczyzną przekroju

$$r_1 = \sqrt{R^2 - k^2} \quad 25$$

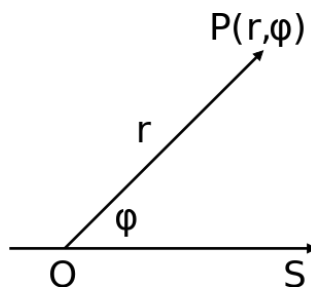
gdzie:

r_1 – promień koła będącego przekrojem kuli uzyskany w wyniku przecięcia pora płaszczyzną przekroju;

R – promień kuli (pora w trójwymiarowym modelu);

k – różnica pozycji płaszczyzny przekroju i współrzędnej środka koła (pora) w danej płaszczyźnie.

- b. Wykorzystanie układu współrzędnych biegunowych (Rysunek 27) w celu wykreślenia wykresu stanowiącego dwuwymiarowy model powierzchni biomateriału porowatego. W układzie współrzędnych biegunowych dowolnemu punktowi na płaszczyźnie przypisuje się następujące współrzędne biegunowe [144]:
- i. promień wodzący ($r \geq 0$), czyli odległość punktu P od bieguna O ;
 - ii. amplituda ($0 \leq \varphi < 2\pi$), czyli miara kąta skierowanego pomiędzy półprostą OS a wektorem \overrightarrow{OP} .



Rysunek 27. Współrzędne punktu w układzie współrzędnych biegunowych [145]

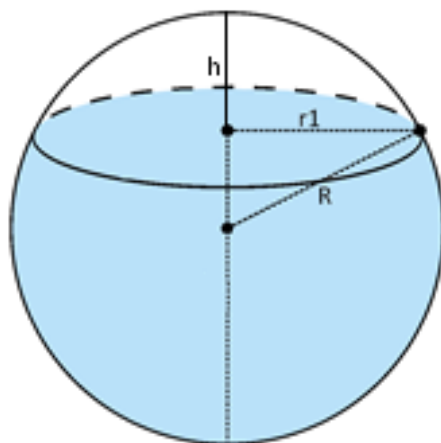
Transformację współrzędnych z układu biegunowego na współrzędne kartezjańskie określają wzory (26) [144]:

$$x = r \cos \varphi$$

$$y = r \sin \varphi \quad 26$$

W celu wykreślenia dwuwymiarowego wykresu skorzystano z funkcji *plot* (X, Y).

4. Wyznaczenie parametrów charakteryzujących pory, takich jak liczba porów, średnia średnica, średni obwód, średnie pole powierzchni, całkowite pole powierzchni zajmowane przez pory, a także objętość otwartych porów oraz objętość otwartych porów przypadająca na jednostkę powierzchni biomateriału. W celu wyznaczenia objętości otwartych porów wykorzystano wzór na objętość czaszy kulistej (Rysunek 28) (27) [146].



Rysunek 28. Czasza kulista powstała w wyniku przecięcia kuli płaszczyzną [146]

$$V = \frac{4}{3}\pi R^3 - \frac{1}{3}\pi h^2(3R - h) \quad 27$$

gdzie:

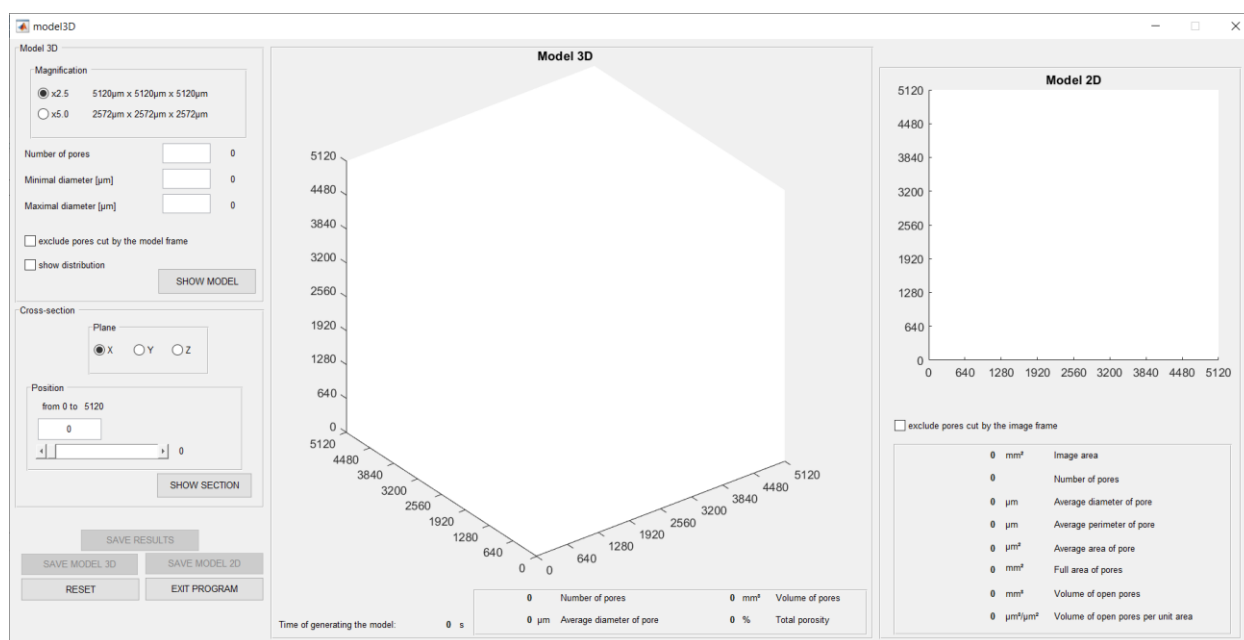
V – objętość czaszy kuli;

h – wysokość czaszy kuli;

R – promień kuli.

5.4.3. Graficzny interfejs użytkownika programu

Równoległe z programowaniem modelu, zaprojektowano i zaimplementowano graficzny interfejs użytkownika (GUI). Interfejs graficzny był konieczny ze względu na zmieniające się parametry wejściowe modelu (liczbę porów, minimalną i maksymalną średnicę porów) oraz potrzebę kontrolowania rozmiarów modelu w kontekście wykonywania pomiarów geometrii porów. Okno graficzne programu składa się z kilku podstawowych elementów (Rysunek 29).



Rysunek 29. Okno graficzne interfejsu użytkownika zaimplementowanego programu

Użytkownik programu ma możliwość określenia rozmiaru generowanego trójwymiarowego modelu w panelu powiększania (ang. *magnification*). Dla dostępnych wariantów (Rysunek 30) zastosowano przyciski opcji, obok których sprecyzowano rozmiar modelu. Zastosowany element graficzny umożliwia wybranie tylko jednej z dostępnych opcji. Użytkownik ma ponadto możliwość określenia liczby porów (ang. *number of pores*) oraz minimalnej i maksymalnej średnicy porów (ang. *minimal/maximal diameter*). Wykorzystano tutaj pola tekstowe, w które należy wpisać dowolną liczbę większą od zera. Ponadto minimalna średnica pora powinna być mniejsza niż wartość maksymalnej średnicy (w przeciwnym razie zostanie wyświetlony odpowiedni komunikat). Wprowadzone wartości zostają automatycznie wyświetlone obok pól tekstowych. Na podstawie wprowadzonych parametrów generowany jest trójwymiarowy model porowatego biomateriału, który zostaje wyświetlony po kliknięciu na przycisk *SHOW MODEL*. Generując model użytkownik uzyskuje trójwymiarowy obraz przedstawiający pory biomateriału oraz parametry je charakteryzujące, takie jak liczba porów, średnia średnica porów, objętość porów oraz porowatość (Rysunek 31). Podczas generowania modelu istnieje także możliwość wykluczenia porów przeciętych przez krawędzie modelu. Program umożliwia także wygenerowanie histogramu przedstawiającego rozkład średnic wygenerowanych porów (Rysunek 32).

Model 3D

Magnification

x2.5 5120 μm x 5120 μm x 5120 μm

x5.0 2572 μm x 2572 μm x 2572 μm

Number of pores 0

Minimal diameter [μm] 0

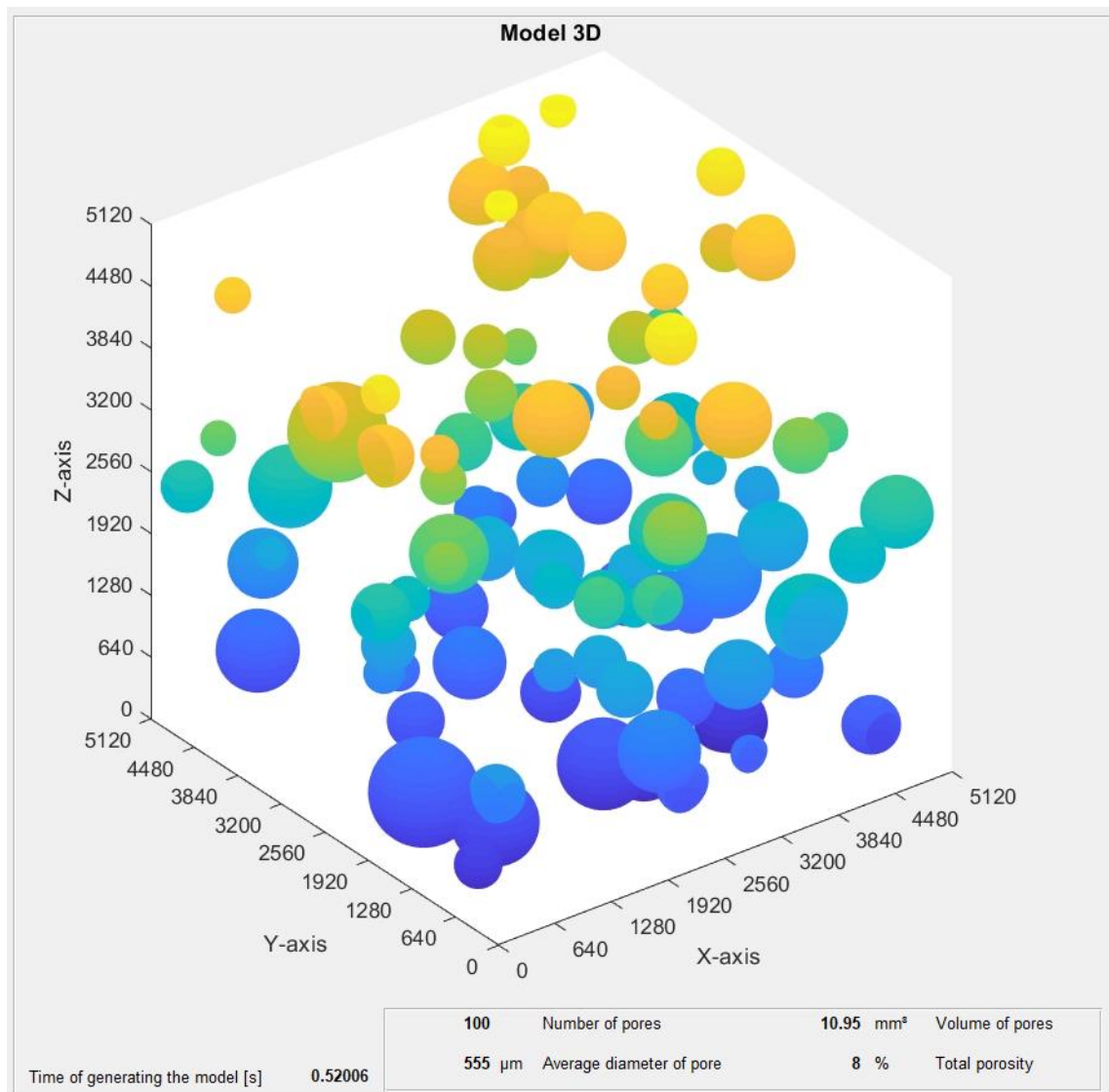
Maximal diameter [μm] 0

exclude pores cut by the model frame

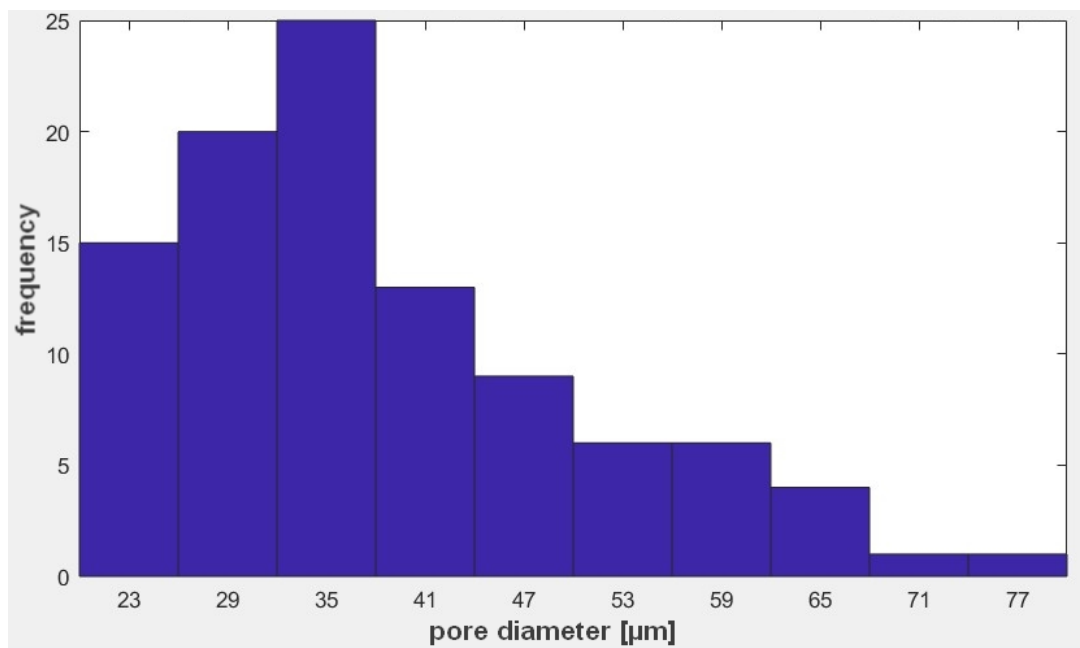
show distribution

SHOW MODEL

Rysunek 30. Panel parametrów wejściowych modelu 3D w zaimplementowanym programie

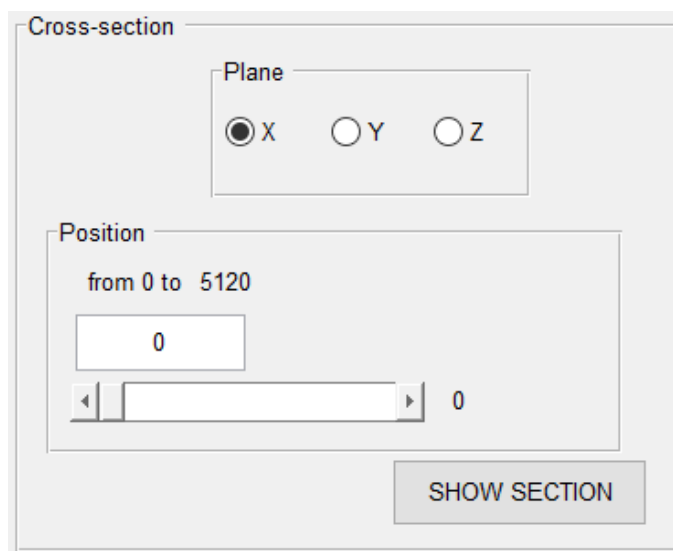


Rysunek 31. Przykład generowania trójwymiarowego modelu porów biomateriału

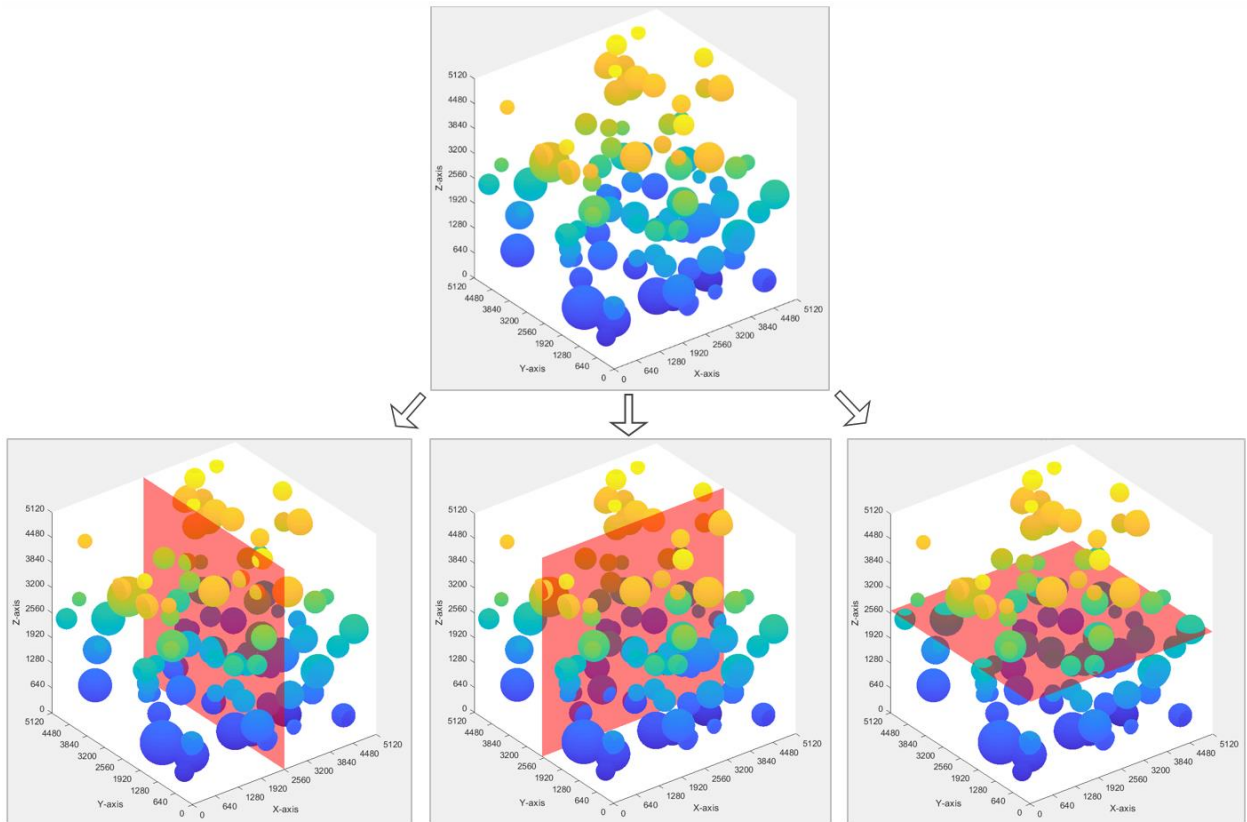


Rysunek 32. Przykład histogramu przedstawiającego rozkład średnic wygenerowanych porów modelu

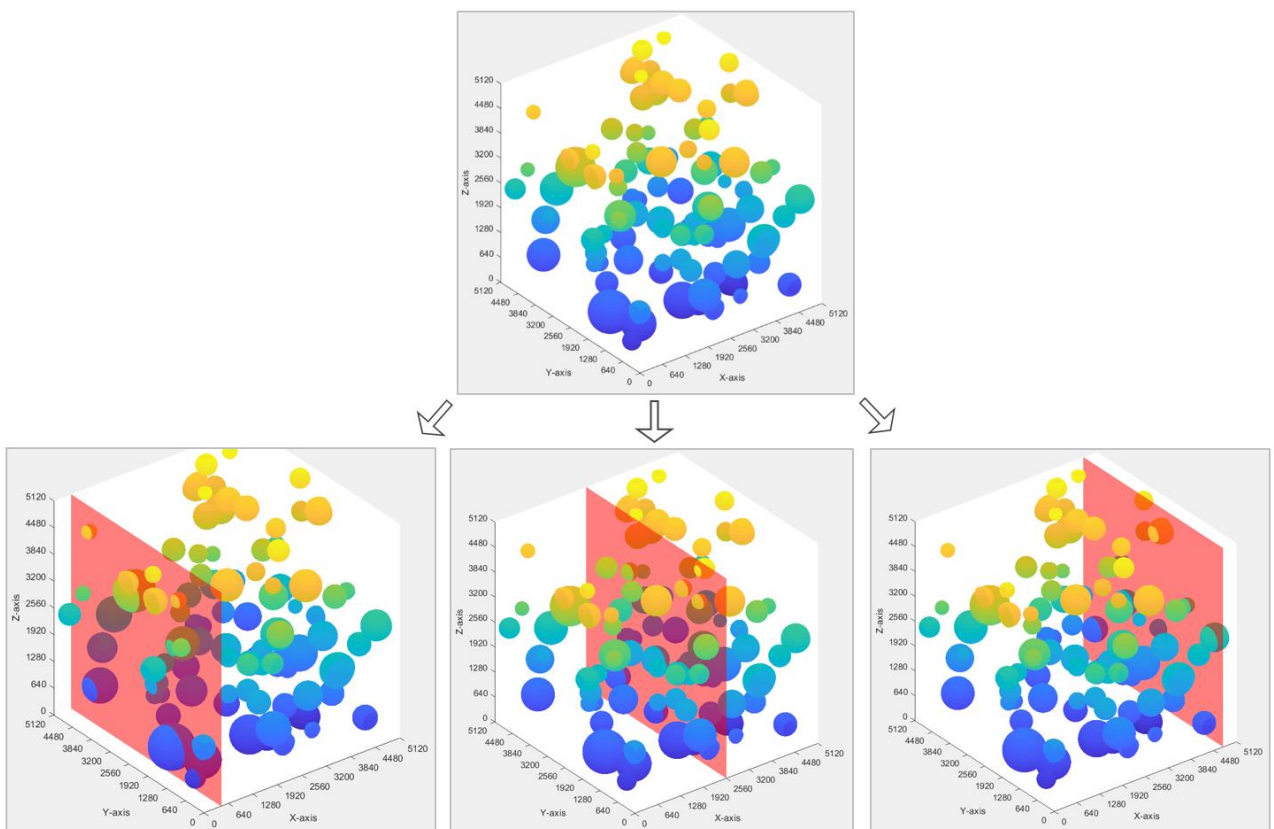
Kolejnym elementem programu jest możliwość wyboru płaszczyzny oraz pozycji przekroju (Rysunek 33). Dla dostępnych płaszczyzn zastosowano przyciski opcji, które umożliwiają wybranie tylko jednej z nich. W celu umożliwienia użytkownikowi wprowadzenia pozycji przekroju, zastosowano połączenie pola tekstowego i suwaka. Wprowadzona pozycja pojawia się obok suwaka. Dla każdego powiększenia (x2,0, x5,0) automatycznie ustawiana jest maksymalna pozycja płaszczyzny przekroju, która zostaje wyświetlona nad polem tekstowym. Jednocześnie ustawiona zostaje maksymalna wartość, którą można wybrać na suwaku. Przekrój materiału generowany jest po kliknięciu na przycisk *SHOW SECTION*. Wybrana płaszczyzna (Rysunek 34) i pozycja (Rysunek 35) cięcia widoczna jest na trójwymiarowym modelu.



Rysunek 33. Panel parametrów wejściowych modelu 2D w zaimplementowanym programie

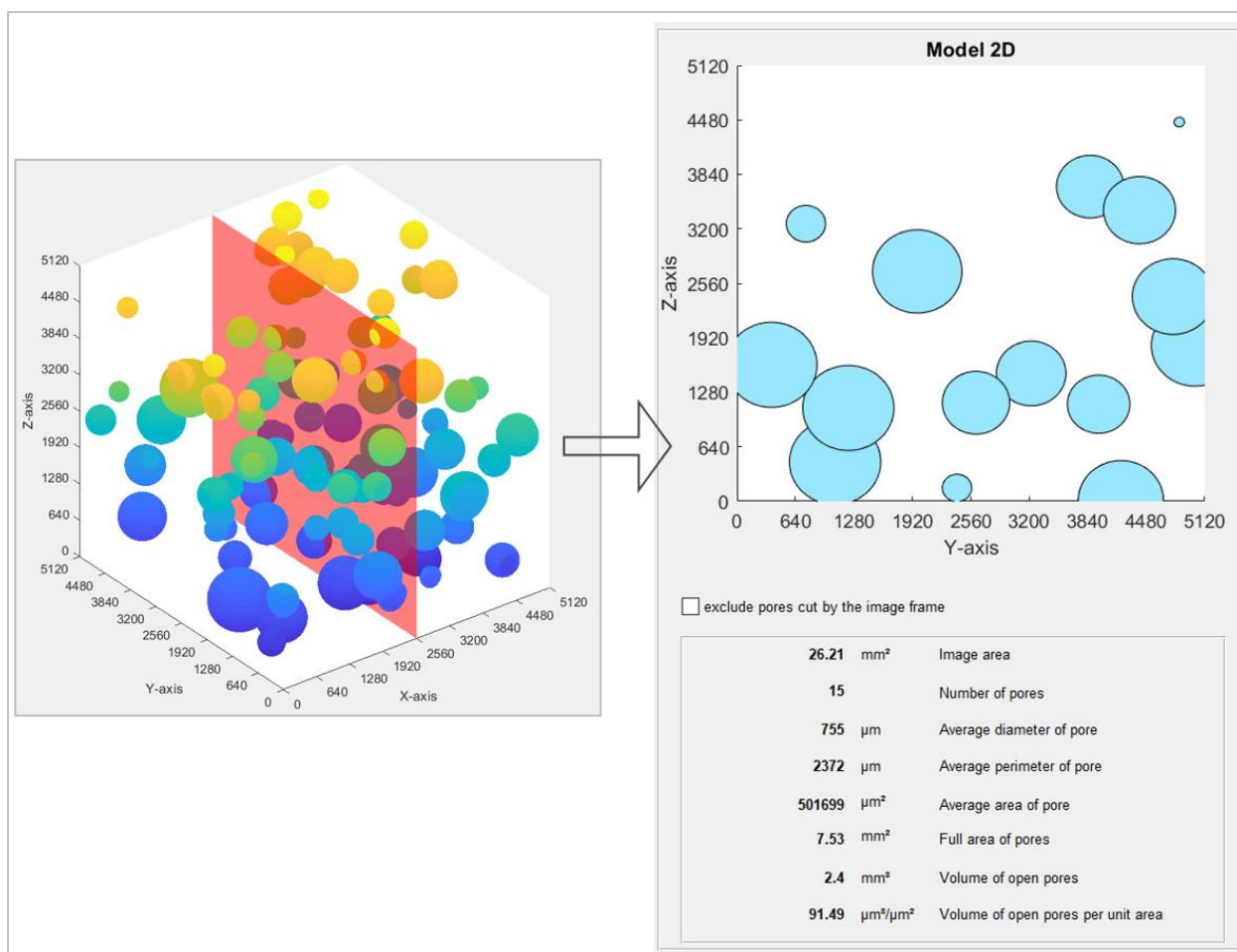


Rysunek 34. Przykład wygenerowanego modelu wraz z wybraną płaszczyzną cięcia

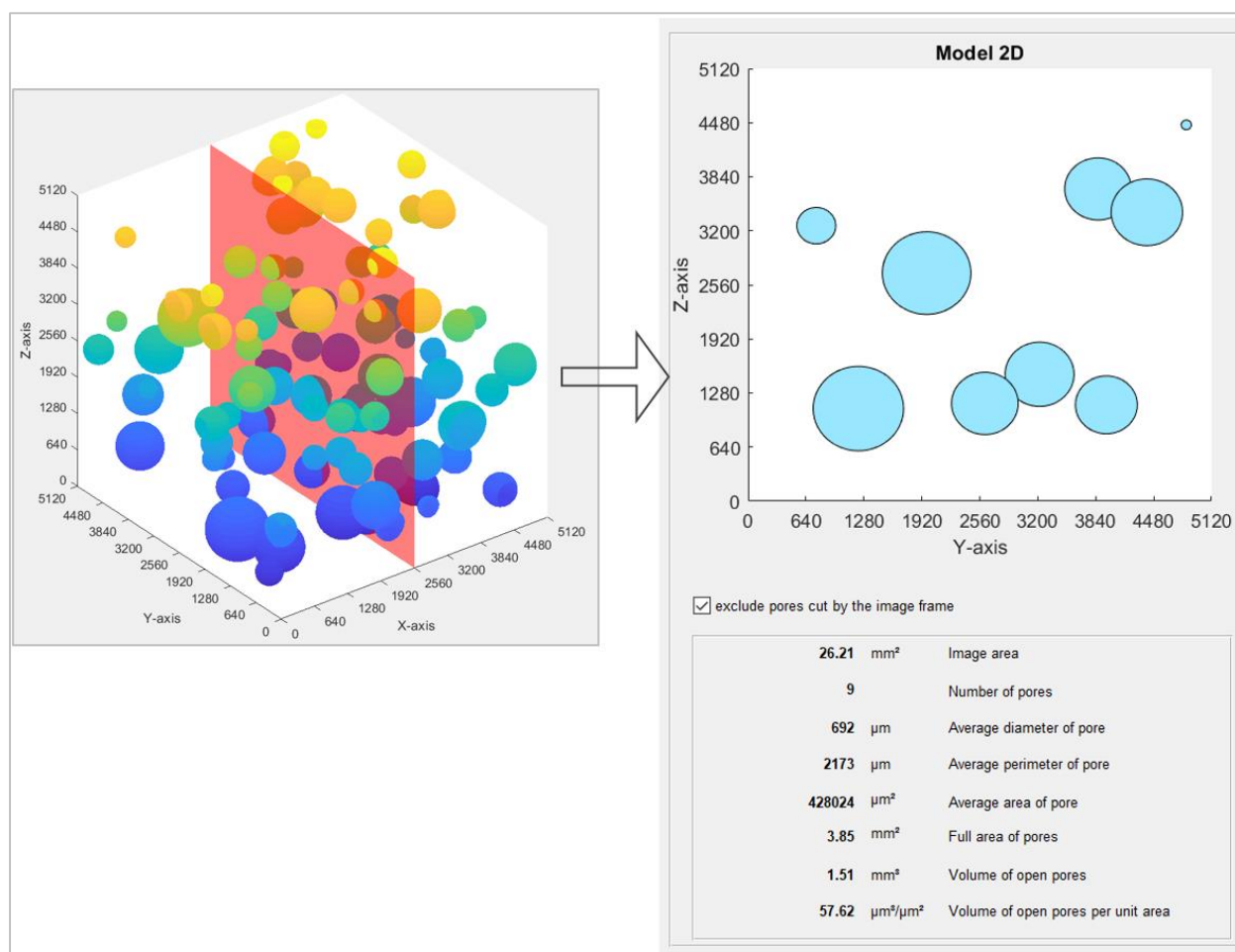


Rysunek 35. Przykład wygenerowanego modelu wraz z wybraną pozycją w płaszczyźnie X

Generując przekrój biomateriału użytkownik uzyskuje płaski obraz powierzchni przedstawiający pory znajdujące się w danej płaszczyźnie i pozycji przekroju oraz parametry je charakteryzujące (Rysunek 36A), takie jak powierzchnia obrazu, liczba porów, średnia średnica, średni obwód, średnie pole powierzchni, całkowite pole powierzchni zajmowane przez pory, a także objętość otwartych porów oraz objętość otwartych porów przypadająca na jednostkę powierzchni biomateriału. Panel obliczonych parametrów znajduje się pod dwuwymiarowym obrazem powierzchni. Ponadto istnieje możliwość wykluczenia porów znajdujących się na ramce obrazu. Wówczas pory przecięte przez ramkę nie są brane pod uwagę podczas wyznaczania parametrów charakteryzujących ich geometrię (Rysunek 36B).



(A)



(B)

Rysunek 36. Przykład generowania przekroju biomateriału: (A) analiza wszystkich porów powierzchni, (B) analiza po wykluczeniu porów przeciętych przez ramkę obrazu

Program umożliwia również zapisanie wartości wyznaczonych parametrów w postaci pliku arkusza kalkulacyjnego Microsoft Excel pakietu Microsoft Office, a także zapisanie obrazów przedstawiających wygenerowany trójwymiarowy model porów biomateriału oraz jego przekrój.

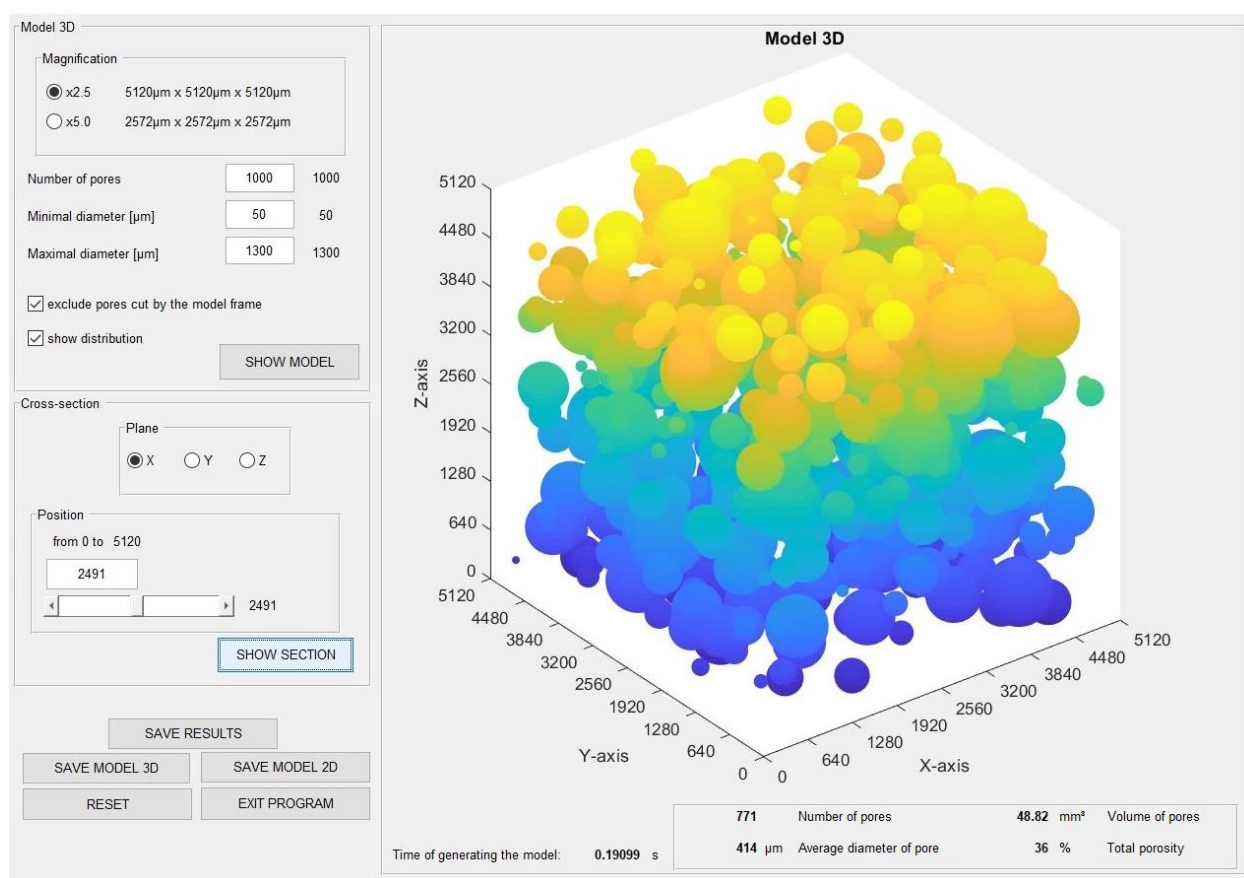
5.5. Symulacja komputerowa

Wykorzystując opracowany model przeprowadzono symulację komputerową, w wyniku której wygenerowano trójwymiarową reprezentację porów biomateriału, jej przekroje oraz parametry charakteryzujące geometrię porów.

W tym celu po uruchomieniu programu wprowadzano parametry wejściowe modelu - ustalono rozmiar modelu, liczbę porów oraz zakres wartości średnic poszczególnych porów. Parametry wejściowe dobrano metodą prób i błędów w taki sposób, aby przekrój materiału, otrzymany w wyniku przecięcia trójwymiarowego modelu płaszczyzną, charakteryzował się geometrią porów analogiczną do tej uzyskanej podczas wcześniejszej analizy obrazów

rzeczywistej powierzchni biomateriału, pozyskanych z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego (Tabela 2, Tabela 3).

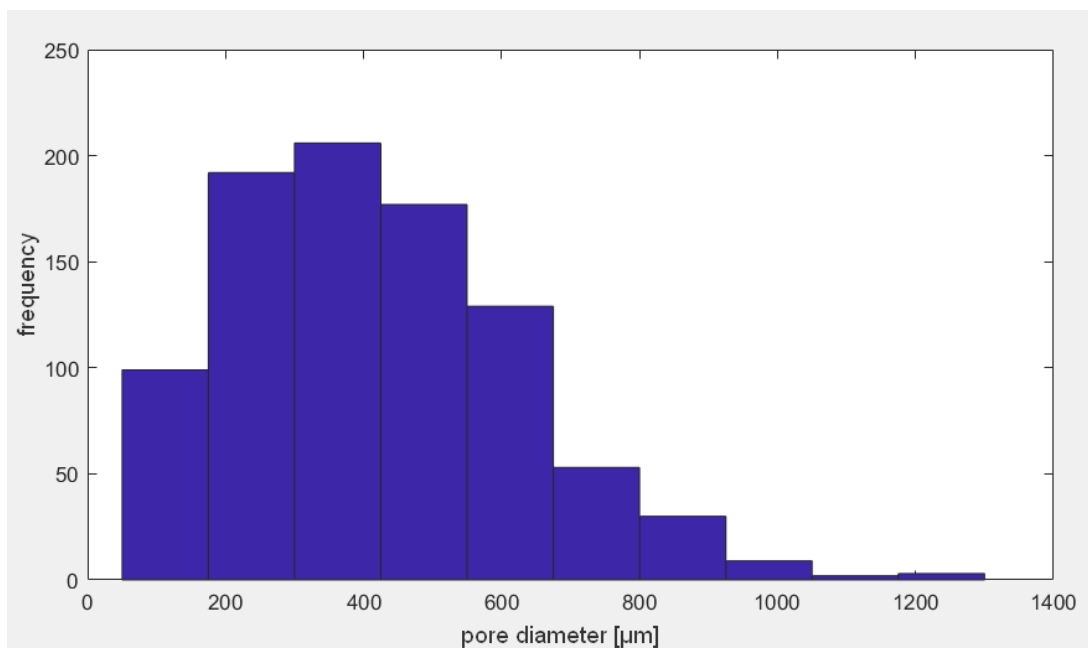
W pierwszym etapie wygenerowano model o wymiarach $5120 \mu\text{m} \times 5120 \mu\text{m} \times 5120 \mu\text{m}$ dla liczby porów wynoszącej 1000. Średnica generowanych porów mieściła się w zakresie od $50 \mu\text{m}$ do $1300 \mu\text{m}$. Uzyskano trójwymiarową reprezentację porów biomateriału (Rysunek 37) oraz parametry je charakteryzujące. Została wyznaczona liczba porów (N_{3D}), średnica minimalna ($D_{\min 3D}$), średnica średnia ($D_{\text{mean}3D}$), średnica maksymalna ($D_{\max 3D}$), a także sumaryczna objętość wszystkich porów ($V_{\text{sum}3D}$) oraz porowatość (ϵ_{c3D}) (Tabela 6). Generując model wykluczono pory przecięte przez krawędzi modelu. Wygenerowano także histogram przedstawiający rozkład średnic porów. Pozwoliło to zaobserwować jak zmienia się średnica porów modelu (Rysunek 38).



Rysunek 37. Model porów biomateriału uzyskany w wyniku symulacji komputerowej

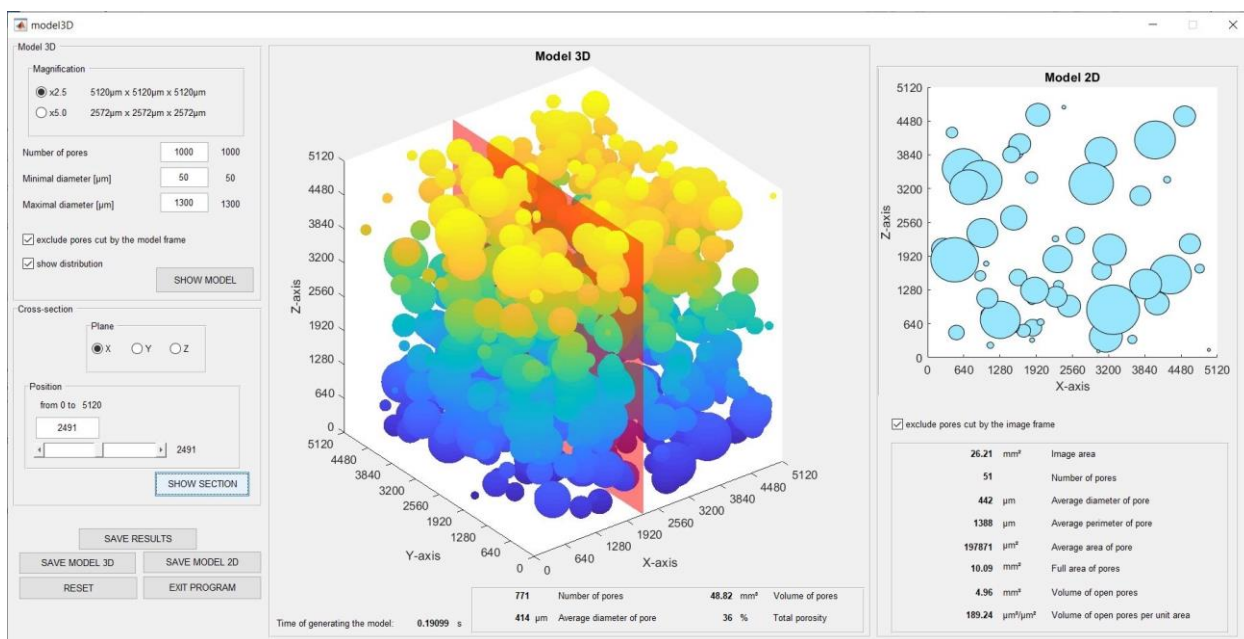
Tabela 6. Parametry charakteryzujące pory modelu o wymiarach $5120 \mu\text{m} \times 5120 \mu\text{m} \times 5120 \mu\text{m}$

N_{3D}	$D_{\min 3D}$ [μm]	$D_{\text{mean}3D}$ [μm]	$D_{\max 3D}$ [μm]	$V_{\text{sum}3D}$ [mm^3]	ϵ_{c3D} [%]
771	50	414	1300	48,82	36



Rysunek 38. Histogram przedstawiający rozkład średnic porów dla wygenerowanego modelu

Następnie określano dowolne płaszczyzny oraz pozycje przekroju i generowano przekroje modelu, uzyskując płaskie obrazy powierzchni przedstawiające pory znajdujące się w wybranej płaszczyźnie i pozycji przekroju oraz parametry je charakteryzujące. Podczas analizy wykluczono pory przecięte przez ramką obrazu (Rysunek 39). Została wyznaczona liczba porów (N_{2D}), średnia średnica (D_{mean2D}), średnia powierzchnia (A_{mean2D}), sumaryczna powierzchnia porów (A_{sum2D}), średni obwód (P_{mean2D}), a także objętość otwartych porów (V_{sum2D}) oraz objętość otwartych porów przypadająca na jednostkę powierzchni biomateriału (V_p). Wykonano 10 symulacji. Wyniki pomiarów dla każdej symulacji zebrano w tabeli (Tabela 7).



Rysunek 39. Przykład symulacji - przekrój modelu o wymiarach $5120 \mu\text{m} \times 5120 \mu\text{m} \times 5120 \mu\text{m}$

Tabela 7. Wartości parametrów charakteryzujących pory przekroju modelu o wymiarach
 $5120 \mu\text{m} \times 5120 \mu\text{m} \times 5120 \mu\text{m}$

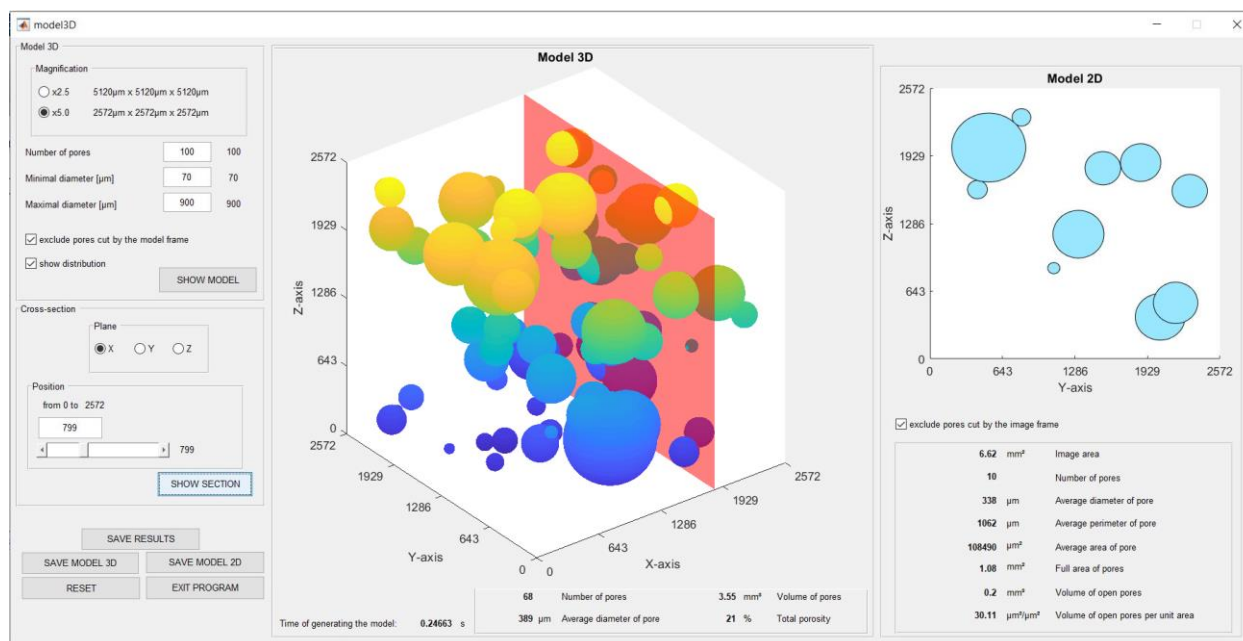
	N_{2D}	$D_{\text{mean}2D}$ [μm]	$A_{\text{mean}2D}$ [μm^2]	$A_{\text{sum}2D}$ [mm^2]	$P_{\text{mean}2D}$ [μm]	$V_{\text{sum}2D}$ [mm^3]	V_p [$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$]
S1-X-1868	59	427	176232	10,4	1341	3,52	134,32
S2-X-865	62	433	172875	10,72	1361	4,07	155,32
S3-X-2283	58	419	183790	10,66	1316	4,65	177,4
S4-X-2802	58	403	172107	9,98	1266	3,2	121,91
S5-Y-3425	50	456	191153	9,56	1433	4,07	155,22
S6-Y-4428	60	381	153781	9,23	1198	3,56	108,11
S7-Y-3492	57	392	155269	8,85	1231	2,26	86,11
S8-Z-1730	51	442	197871	10,09	1388	4,96	189,24
S9-Z-1142	61	407	171877	10,48	1279	2,54	96,79
S10-Z-346	50	393	153173	8,16	1235	2,61	81,37
Średnia	57	415	172813	9,81	1305	3,54	131

Średnia liczba porów modelowanej powierzchni (57) mieści się w przedziale pomiędzy minimalną oraz maksymalną wartością parametru wyznaczoną podczas analizy obrazów mikroskopowych rzeczywistej powierzchni biomateriału (Tabela 2) wynoszącą od 21 do 58 porów. Podobnie jest w przypadku średniej średnicy wynoszącej dla modelowanej powierzchni 415 μm , a dla powierzchni rzeczywistej od 410 μm do 740 μm , a także średniej powierzchni pora równej 172813 μm^2 dla modelu i od 163680 μm^2 do 501395 μm^2 dla powierzchni rzeczywistej oraz sumarycznej powierzchni zajętej przez pory wynoszącej 9,81 mm^2 dla modelu i od 7,46 mm^2 do 10,87 mm^2 dla powierzchni rzeczywistej. W przypadku obwodu pora, model charakteryzuje się mniejszą średnią wartością parametru (1305 μm) niż struktura rzeczywista (1472 μm –2685 μm), co wynika z przyjętego założenia, że generowane pory mają kształt kuli, a nie dowolny kształt zbliżony do niej, jak to ma miejsce w przypadku struktury rzeczywistej.

W kolejnym kroku wygenerowano model o wymiarach 2572 $\mu\text{m} \times 2572 \mu\text{m} \times 2572 \mu\text{m}$ dla liczby porów wynoszącej 100 i zakresu średnic porów od 70 μm do 900 μm (Tabela 8). Również wykonano 10 symulacji dla dowolnych płaszczyzn i pozycji przekroju i wykluczono pory przecięte przez krawędzi obrazu (Rysunek 40). Wyniki pomiarów dla każdej symulacji zebrano w tabeli (Tabela 9).

Tabela 8. Parametry charakteryzujące pory modelu o wymiarach $2572 \mu\text{m} \times 2572 \mu\text{m} \times 2572 \mu\text{m}$

N_{3D}	$D_{\min 3D}$ [μm]	$D_{\text{mean} 3D}$ [μm]	$D_{\max 3D}$ [μm]	$V_{\text{sum} 3D}$ [mm^3]	$\epsilon_{c 3D}$ [%]
68	70	389	900	3,55	21



Rysunek 40. Przykład symulacji - przekrój modelu o wymiarach $2572 \mu\text{m} \times 2572 \mu\text{m} \times 2572 \mu\text{m}$

Tabela 9. Wartości parametrów charakteryzujących pory przekroju modelu o wymiarach $2572 \mu\text{m} \times 2572 \mu\text{m} \times 2572 \mu\text{m}$

	N_{2D}	$D_{\text{mean} 2D}$ [μm]	$A_{\text{mean} 2D}$ [μm^2]	$A_{\text{sum} 2D}$ [mm^2]	$P_{\text{mean} 2D}$ [μm]	$V_{\text{sum} 2D}$ [mm^3]	V_p [$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$]
S1-X-1790	14	410	155748	2,28	1289	0,59	88,98
S2-X-139	11	385	146995	1,82	1209	0,41	62,32
S3-X-382	16	317	91255	1,76	997	0,69	104,2
S4-Y-799	10	338	108490	1,68	1062	0,2	30,11
S5-Y-1043	11	386	149538	1,74	1213	0,31	47,29
S6-Y-1599	9	420	189596	1,81	1319	0,63	95,02
S7-Y-1894	11	370	128525	1,81	1164	0,32	48,65
S8-Z-1073	13	404	146007	1,9	1270	0,53	79,72
S9-Z-1338	18	425	165820	2,98	1335	0,85	128,85
S10-Z-330	11	400	146123	2,11	1257	0,38	57,78
Średnia	12	386	142810	1,99	1212	0,49	74

Również w tym przypadku, średnia liczba porów (12) na modelowanej powierzchni mieści się w przedziale pomiędzy minimalną oraz maksymalną wartością parametru wyznaczoną podczas analizy mikroskopowych obrazów rzeczywistej powierzchni biomateriału (Tabela 3) wynoszącą od 9 do 18 porów. Podobnie jest w przypadku średniej średnicy wynoszącej 386 μm dla modelu i od 368 μm do 492 μm dla powierzchni rzeczywistej, a także średniej powierzchni pora wynoszącej dla modelowanej powierzchni 142810 μm^2 i od 116891 μm^2 do 236097 μm^2 dla rzeczywistej powierzchni oraz sumarycznej powierzchni zajętej przez pory równej 1,99 mm^2 dla modelu, a dla powierzchni rzeczywistej od 1,99 mm^2 do 2,84 mm^2 . W przypadku obwodu pora, model charakteryzuje się mniejszą średnią wartością parametru (1212 μm) niż struktura rzeczywista (14307 μm –1786 μm), co wynika z przyjętego założenia, że generowane pory mają kształt kuli, a nie dowolny kształt zbliżony do niej, jak to ma miejsce w przypadku struktury rzeczywistej.

Analiza i porównanie parametrów wykazały, że wygenerowane modele charakteryzują się przekrojami o geometrii porów analogicznej do tej uzyskanej podczas wcześniejszej analizy mikroskopowych obrazów rzeczywistej powierzchni biomateriału.

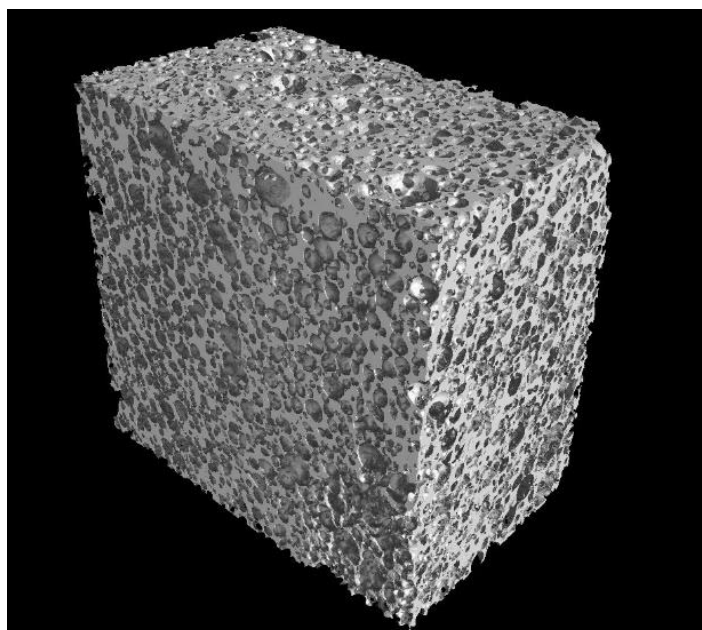
5.6. Mikrotomograficzne badania biomateriału

Badania mikrotomograficzne przeprowadzone zostały dla 3 próbek porowatego biomateriału korundowego o wymiarach 20 mm \times 20 mm \times 12 mm (Rysunek 41). Każda próbka była skanowana w tej samej odległości od źródła promieniowania rentgenowskiego i przy tych samych parametrach lampy (160 kV, 80 μA), co zapewniło tą samą rozdzielczość obrazów (rozmiar woksela wynosił 13 μm). Na każdą pojedynczą projekcję składały się 3 ekspozycje, a czas pojedynczej projekcji wynosił 150 ms. Sumaryczny czas skanowania próbki wyniósł 26 minut [148].



Rysunek 41. *Próbka biomateriału podczas badania mikrotomografem*

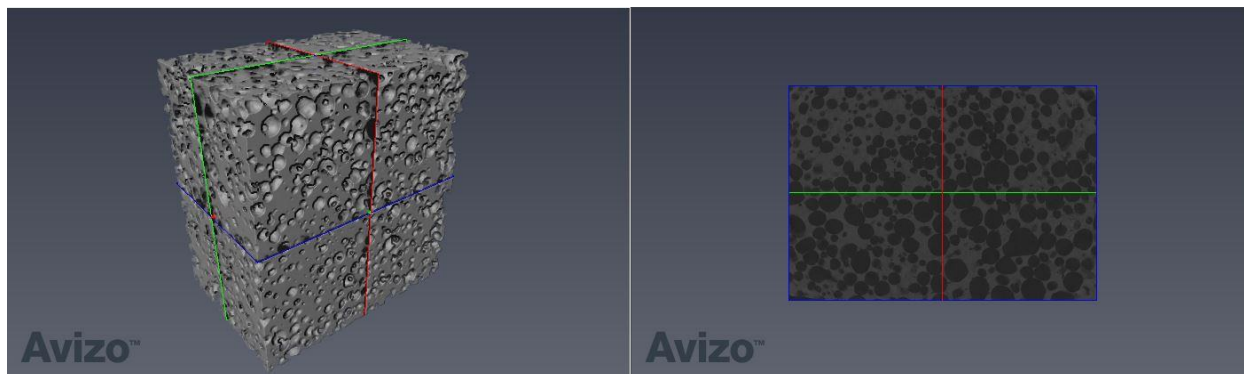
Serię 2300 zdjęć rentgenowskich – radiogramów, będących bezpośrednim wynikiem badania, poddano rekonstrukcji w celu uzyskania zestawu wysokorozdzielczych obrazów w formacie TIF. Na podstawie tego zestawu, wykorzystując program *Phoenix Datos Reconstruction*, stworzono obraz trójwymiarowy próbki (Rysunek 42).



Rysunek 42. *Wynik badania mikrotomografem - trójwymiarowy obraz próbki*

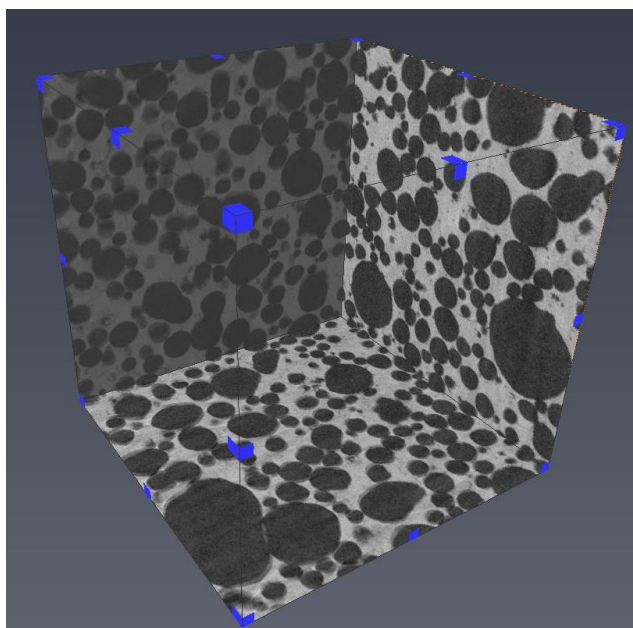
5.6.1. Analiza obrazów mikrotomograficznych

Pozyskane za pomocą mikrotomografu dane pomiarowe próbek analizowano w programie Thermo Scientific Avizo. Pierwszym krokiem analizy było wczytanie i wyświetlenie danych (Rysunek 43).

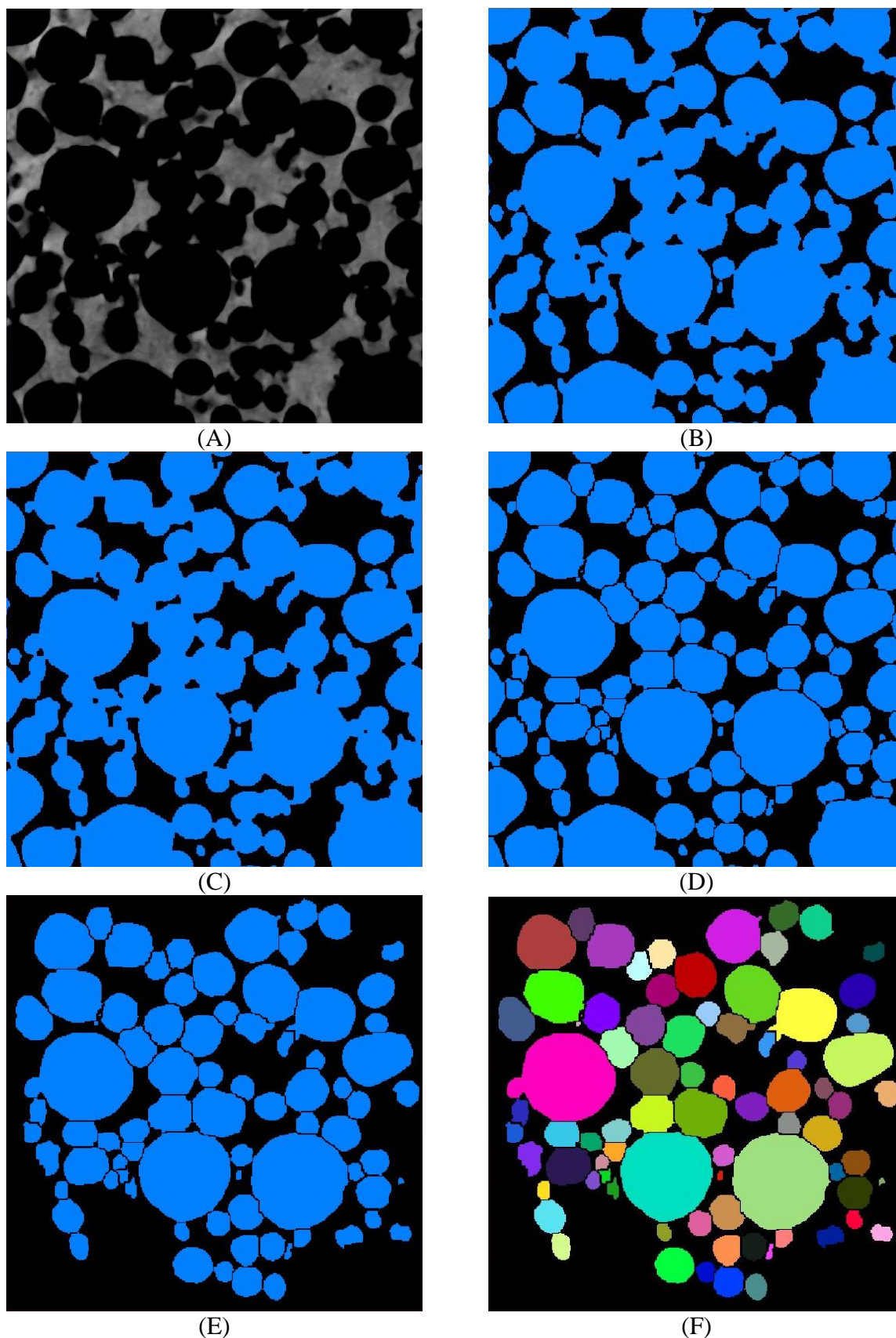


Rysunek 43. Wyświetlenie danych pomiarowych pierwszej analizowanej próbki

Następnie wydzielono fragment przeznaczony do analizy (Rysunek 44) o wymiarach skorelowanych z wymiarami generowanych modeli. W kolejnym kroku zastosowano filtr medianowy (Rysunek 45A) i wykonano binaryzację (Rysunek 45B). Próg binaryzacji ustawiono jako lokalne minimum dla histogramu, które pogram wyznacza automatycznie. Kolejną operacją było morfologiczne otwarcie (Rysunek 45C), które umożliwia wygładzenie krawędzi oraz usunięcie małych obiektów. Następnie rozdzielono połączone ze sobą pory (Rysunek 45D), a także usunięto pory przecięte ramką obrazu (Rysunek 45E). Analiza wynikowych obrazów (Rysunek 45F) polegała na wyznaczeniu parametrów charakteryzujących pory.



Rysunek 44. Przykład analizy danych mikrotomograficznych - wydzielenie obszaru do analizy



Rysunek 45. Przykład analizy danych mikrotomograficznych przedstawiony dla jednej z warstw: (A) filtr medianowy, (B) binaryzacja, (C) morfologiczne otwarcie, (D) rozdzielanie połączonych porów, (E) usunięcie porów przeciętych ramką obrazu, (F) wynik analizy

Analogiczną metodykę analizy zastosowano dla 10 fragmentów badanych próbek biomateriału o wymiarach wynoszących $5120 \mu\text{m} \times 5120 \mu\text{m} \times 5120 \mu\text{m}$, a następnie dla fragmentów o wymiarach $2572 \mu\text{m} \times 2572 \mu\text{m} \times 2572 \mu\text{m}$.

Wynikowe obrazy umożliwiły wyznaczenie parametrów charakteryzujących pory (Tabela 10, Tabela 11). Dla każdego z analizowanych fragmentów próbek została wyznaczona liczba porów (N_{3D}), średnica minimalna ($D_{\min 3D}$), średnica średnia ($D_{\text{mean}3D}$), średnica maksymalna ($D_{\max 3D}$), a także sumaryczna objętość wszystkich porów ($V_{\text{sum}3D}$).

Tabela 10. Wartości parametrów charakteryzujących pory dla fragmentów próbek o wymiarach $5120 \mu\text{m} \times 5120 \mu\text{m} \times 5120 \mu\text{m}$

	N_{3D}	$D_{\min 3D}$ [μm]	$D_{\text{mean}3D}$ [μm]	$D_{\max 3D}$ [μm]	$V_{\text{sum}3D}$ [mm^3]
M1-R1	820	48	414	1238	47,89
M1-R2	830	48	401	1157	43,13
M1-R3	764	48	421	1409	46,61
M1-R4	763	48	405	1523	44,53
M1-R5	836	48	394	1325	49,56
M1-R6	808	48	415	1447	47,91
M1-R7	695	48	432	1556	47,93
M1-R8	872	48	399	1374	48,09
M1-R9	783	48	388	1846	45,19
M1-R10	717	48	430	1182	49,11
Wartość minimalna	695	48	388	1157	43,13
Wartość średnia	789	48	410	1406	47,00
Wartość maksymalna	872	48	432	1846	49,56

Tabela 11. Wartości parametrów charakteryzujących pory dla fragmentów próbek o wymiarach $2572 \mu\text{m} \times 2572 \mu\text{m} \times 2572 \mu\text{m}$

	N_{3D}	$D_{\min 3D}$ [μm]	$D_{\text{mean}3D}$ [μm]	$D_{\max 3D}$ [μm]	$V_{\text{sum}3D}$ [mm^3]
M2-R1	69	212	408	1107	3,64
M2-R2	68	48	408	1084	3,7
M2-R3	74	48	371	1004	3,14
M2-R4	61	53	406	866	3,61
M2-R5	63	57	375	1232	3,11
M2-R6	90	67	357	776	3,27
M2-R7	97	67	363	787	3,41
M2-R8	73	48	358	1088	2,99
M2-R9	66	48	374	758	2,97
M2-R10	66	48	398	859	3,07
Wartość minimalna	61	48	357	758	2,97
Wartość średnia	73	70	382	956	3,29
Wartość maksymalna	97	212	408	1232	3,7

5.7. Weryfikacja poprawności modelu

Opracowany model porów biomateriału należało przetestować pod względem jego zgodności z rzeczywistą strukturą. Weryfikując poprawność modelu, wzięto pod uwagę parametry wygenerowane podczas analizy obrazów mikrotomograficznych (Tabela 10, Tabela 11) oraz parametry wyznaczone za pomocą programu zaimplementowanego w środowisku Matlab (Tabela 6, Tabela 8).

Średnia liczba porów modelu o wymiarach $5120 \mu\text{m} \times 5120 \mu\text{m} \times 5120 \mu\text{m}$ wynosząca 771 mieści się w przedziale pomiędzy minimalną oraz maksymalną wartością parametru wyznaczoną podczas badań mikrotomograficznych rzeczywistego biomateriału (695–872). Podobnie jest w przypadku średniej średnicy ($414 \mu\text{m}$), która mieści się w zakresie od $388 \mu\text{m}$ do $432 \mu\text{m}$ oraz sumarycznej objętości porów wynoszącej $48,82 \text{ mm}^3$ dla modelu i od $43,13 \text{ mm}^3$ do $49,56 \text{ mm}^3$ dla rzeczywistego materiału.

Analogicznie, w przypadku modelu o wymiarach $2572 \mu\text{m} \times 2572 \mu\text{m} \times 2572 \mu\text{m}$, średnie wartości parametrów mieszczą się w przedziale pomiędzy minimalną oraz maksymalną wartością parametru wyznaczoną podczas badań mikrotomograficznych rzeczywistego biomateriału. Średnia liczba porów wyniosła 68 dla modelu i od 61 do 97 porów dla rzeczywistego materiału. Średnia średnica wynosiła dla modelu $389 \mu\text{m}$ i od $357 \mu\text{m}$ do $408 \mu\text{m}$ dla biomateriału rzeczywistego, a sumaryczna objętość porów modelu wynosiła $3,55 \text{ mm}^3$ i od $2,97 \text{ mm}^3$ do $3,7 \text{ mm}^3$ dla rzeczywistego materiału.

Można zatem uznać, iż obserwuje się podobieństwo wyników uzyskanych w obu etapach eksperymentu. Stwierdzono zatem, że program generuje model o strukturze i geometrii porów zbliżonych do rzeczywistego biomateriału ceramicznego, co potwierdziło poprawność opracowanego modelu [147].

6. WNIOSKI KOŃCOWE I PODSUMOWANIE

Na podstawie otrzymanych wyników badań należy stwierdzić, iż udało się zrealizować zakładany zakres oraz plan rozprawy, a także osiągnąć główny cel badawczy, który polegał na opracowaniu i zaimplementowaniu trójwymiarowego modelu porów biomateriału stanowiącego narzędzie do wyznaczania wymiarów geometrycznych porów zarówno wewnątrz materiału jak i na jego powierzchni, a tym samym umożliwiające wyznaczenie objętości porów otwartych oraz szacowania średniej objętości porów na jednostkę powierzchni biomateriału.

Proces tworzenia modelu składał się z trzech zasadniczych etapów. Pierwszy z nich to ustalenie założeń, które model powinien spełniać. W ramach tego etapu, przeprowadzono pomiary za pomocą skaningowego laserowego mikroskopu konfokalnego LEXT OLS4000. Materiał badawczy stanowiły próbki porowatego biomateriału korundowego wytworzone metodą spieniania chemicznego. Obrazy pozyskane z wykorzystaniem mikroskopu poddano analizie w oprogramowaniu SPIP firmy Image Metrology, która pozwoliła wysegmentować z obrazu powierzchni pory i dokonać ich pomiarów. Na podstawie otrzymanych parametrów przyjęto założenia modelu.

Kolejnym etapem była implementacja. Model został zaimplementowany w środowisku programistycznym pakietu Matlab. Aby umożliwić użytkownikowi wprowadzenie parametrów wejściowych modelu zaprojektowano i zaimplementowano graficzny interfejs użytkownika. Użytkownik ma możliwość określenia rozmiaru modelu, liczby porów oraz minimalnej i maksymalnej średnicy pora. Na podstawie tych parametrów generowany jest trójwymiarowy model. Kolejnym elementem jest możliwość wyboru płaszczyzny oraz pozycji przekroju. Generując przekrój, użytkownik uzyskuje obraz powierzchni przedstawiający pory znajdujące się w wybranej płaszczyźnie i pozycji przekroju oraz parametry je charakteryzujące. Model umożliwia określenie wymiarów geometrycznych porów zarówno wewnątrz materiału jak i na jego powierzchni, co daje możliwość wyznaczenia objętości porów otwartych oraz szacowania średniej objętości porów na jednostkę powierzchni materiału.

Ostatnia część badań polegała na weryfikacji opracowanego modelu. Metoda modelowania została przetestowana poprzez porównanie wyników otrzymanych z wykorzystaniem modelu z danymi eksperymentalnymi uzyskanymi w wyniku mikrotomograficznych badań biomateriału. W pierwszym kroku przeprowadzona została symulacja komputerowa, w wyniku której wygenerowano trójwymiarową reprezentację porów biomateriału. Parametry wejściowe modelu dobrano w taki sposób, aby przekrój materiału, otrzymany w wyniku przecięcia trójwymiarowego modelu płaszczyzną, charakteryzował się geometrią porów analogiczną do tej uzyskanej podczas wcześniejszej analizy obrazów mikroskopowych rzeczywistej powierzchni biomateriału.

Następnie próbki porowatego biomateriału korundowego poddano pomiarom za pomocą wysokorozdzielczego skanera rentgenowskiego GE Phoenix v|tome|x. Serię projekcji, będących bezpośrednim wynikiem badania, poddano rekonstrukcji w programie Phoenix Datas Reconstruction, a następnie wygenerowano trójwymiarowe obrazy próbek. W kolejnym etapie przeprowadzono analizę danych z wykorzystaniem oprogramowania Thermo Scientific Avizo. Analiza umożliwiła wysegmentowanie porów i wykonanie ich precyzyjnych pomiarów, w wyniku których wyznaczono parametry charakteryzujące pory.

Porównując ze sobą wyniki uzyskane w obu etapach eksperymentu, stwierdzono, że program generuje model o strukturze i geometrii porów zbliżonych do rzeczywistego biomateriału ceramicznego, co potwierdziło poprawność opracowanego modelu.

Model może zatem znaleźć praktyczne zastosowanie w charakterystyce stopnia porowatości biomateriałów oraz w celu wyznaczenia wymiarów geometrycznych porów, a także być wykorzystywany podczas projektowania biomateriału o określonej strukturze porów, która charakteryzować się będzie określoną objętością porów otwartych. W konsekwencji wyznaczona objętość umożliwił będzie obliczenie, a następnie umieszczenie konkretnej objętości leku w porach otwartych biomateriału i dostarczenie do organizmu pacjenta podczas implantacji.

Realizacja poszczególnych etapów tworzenia modelu skutkowałą osiągnięciem wszystkich pośrednich celów pracy:

- przeprowadzono symulację komputerową z wykorzystaniem opracowanego modelu, w wyniku której wygenerowano trójwymiarową reprezentację porów biomateriału;
- dokonano obserwacji mikroskopowych powierzchni porowatego biomateriału korundowego z wykorzystaniem skaningowego laserowego mikroskopu konfokalnego LEXT OLS4000 oraz dwóch typów obiektywów (MPLFLN2.5X i MPLFLN5X), w wyniku których dokonano akwizycji obrazów powierzchni biomateriału;
- opracowano metodę przetwarzania i analizy obrazów mikroskopowych przedstawiających powierzchnię biomateriału korundowego, z wykorzystaniem której wysegmentowano pory powierzchni;
- przeprowadzono pomiary próbek porowatego biomateriału korundowego za pomocą skanera rentgenowskiego GE Phoenix v|tome|x, wynikiem których były trójwymiarowe obrazy próbek zrekonstruowane na podstawie serii radiogramów;
- opracowano metodę analizy danych mikrotomograficznych, z wykorzystaniem której wyodrębniono pory biomateriału korundowego;
- wyznaczono wymiary geometryczne porów biomateriału korundowego wysegmentowanych na obrazach mikroskopowych oraz mikrotomograficznych.

7. LITERATURA

- [1] Świczko-Żurek B. *Biomateriały*. Gdańsk: Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej 2009.
- [2] Biomaterials Consensus Conference at the National Institute of Health, Clinical Applications of Biomaterials. NIH Consens Statement Online, 4(5):1–19, 1982.
- [3] Navarro M., Michiardi A., Castan˜o O., Planell J. A. *Biomaterials in orthopaedics*. Journal of The Royal Society Interface 5(27): 1137–1158, 2008.
- [4] Jones J. R., Hench L. L. *Regeneration of trabecular bone using porous ceramics*. Current Opinion in Solid State and Materials Science 7(4): 301–307, 2003.
- [5] dos Santos V., Brandalise R. N., Savaris M., *Engineering of Biomaterials*. Springer International Publishing 2017.
- [6] Ozwoniarek J., Wiśniewska-Weinert H., Leshchynsky V., Kędzia Ł., Gierzyńska-Dolna M. *New solutions in the field of biotribology and biomaterials. Part I. Requirements imposed on the materials used for articulation prostheses*, Obróbka Plastyczna Metali 17(3): 29–36, 2006.
- [7] Marciniak J. *Biomateriały*, Gliwice: Wydawnictwo Politechniki Śląskiej 2013.
- [8] Bose S., Banerjee D., Bandyopadhyay A. *Introduction to Biomaterials and Devices for Bone Disorders*. W: Bode S., Bandyopadhyay A. (red.) *Materials and Devices for Bone Disorders*. Elsevier Academic Press 2017, 1–28.
- [9] Jurczyk M., Jakubowicz J. *Bionanomateriały*. Poznań: Wydawnictwo Politechniki Poznańskiej 2008.
- [10] Brunski J. *Metals*. W: Ratner B., Hoffman A., Schoen F., Lemons J. (red.) *Biomaterials science - An Introduction to Materials in Medicine*. San Diego: Elsevier Academic Press 2004, 137–153.
- [11] Park J., Kim Y.K. *Metallic Biomaterials*. W: Wong J, Bronzino J. (red.) *Biomaterials*. Boca Raton: CRC Press 2007.
- [12] Marciniak J., Kaczmarek M., Ziębowicz A. *Biomateriały w stomatologii*. Gliwice: Wydawnictwo Politechniki Śląskiej 2008.
- [13] Vallet-Regí M. *Ceramics for medical applications*. Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions 2(2): 97–108, 2001.
- [14] Binnaz Hazar Yoruç A., Cem Şener B. *Biomaterials*. W: Kara S. (red.) *A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones*. InTech 2012.
- [15] Sobczak A., Kowalski Z. *Materiały hydroksyapatytowe stosowane w implantologii*. Czasopismo Techniczne. Chemia 104 (1): 149–158, 2007.
- [16] Best S. M., Porter A.E., Thian E.S., Huang J. *Bioceramics: Past, present and for the future*. Journal of the European Ceramic Society 28: 1319–1327, 2008.
- [17] Hench L., Best S. *Ceramics, Glasses, and Glass-Ceramics*. W: Ratner B., Hoffman A., Schoen F., Lemons J. (red.) *Biomaterials science - An Introduction to Materials in Medicine*. San Diego: Elsevier Academic Press 2004, 153–170.

- [18] Billotte W. *Ceramic Biomaterials*. W: Wong J, Bronzino J. (red.) *Biomaterials*. Boca Raton: CRC Press 2007.
- [19] Hannouche D., Hamadouche M., Nizard R., Bizot P., Meunier A., Sedel L. *Ceramics in Total Hip Replacement*. *Clinical orthopaedics and related research* 430: 62–71, 2005.
- [20] Ślósarczyk A., Polesiński Z., Jaegermann Z., Karaś J., Stoach L., Ciecierska M., Łączka M. *Biomateriały ceramiczne*. W: Błażewicz S., Stoch L. (red.) *Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna 2000. Tom 4 Biomateriały*. Warszawa: Akademicka Oficyna Wydawnicza Exit 2003, 99–253.
- [21] Lukin E.S., Tarasova S.V., Korolev A.V. *Application of ceramics based on aluminum oxide in medicine (a review)*. *Glass and Ceramics* 58: 105–107, 2001.
- [22] Gogolweski S., *Biomateriały Polimerowe*. W: Błażewicz S., Stoch L. (red.) *Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna 2000. Tom 4 Biomateriały*. Warszawa: Akademicka Oficyna Wydawnicza Exit 2003, 257–330.
- [23] Leda H. *Materiały inżynierskie w zastosowaniach biomedycznych*. Poznań: Wydawnictwo Politechniki Poznańskiej 2012.
- [24] Hergenrother R., Lamba N. *Polymers*. W: Ratner B., Hoffman A., Schoen F., Lemons J. (red.) *Biomaterials science - An Introduction to Materials in Medicine*. San Diego: Elsevier Academic Press 2004, 67–79.
- [25] Lee H. B., Khang G., Lee J.H. *Polymeric Biomaterials*. W: Wong J, Bronzino J. (red.) *Biomaterials*. Boca Raton: CRC Press 2007.
- [26] Šišková A., Peptu C., Kowalczyk M. M., Kowalski W. J. *Zastosowania syntetycznych polimerów biodegradowalnych w medycynie*. W: Nawrat Z.(red.) *Postępy technologii biomedycznych*, Zabrze 2008, 53–77.
- [27] Middleton J., Tipton A. *Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices*. *Biomaterials*, 21: 2335–2346, 2000.
- [28] Błażewicz S., Chłopek J., Błażewicz M., Pamuła E. *Biomateriały węglowe i kompozytowe*. W: Błażewicz S., Stoch L. (red.) *Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna 2000. Tom 4 Biomateriały*. Warszawa: Akademicka Oficyna Wydawnicza Exit 2003, 331–421.
- [29] Migliaresi C., Alexander H. *Composites*. W: Ratner B., Hoffman A., Schoen F., Lemons J. (red.) *Biomaterials science - An Introduction to Materials in Medicine*. San Diego: Elsevier Academic Press 2004, 181–196.
- [30] Chłopek J. *Biomateriały kompozytowe*. *Kompozyty* 9(1): 3–18, 2009.
- [31] Chłopek J. *Kompozyty w medycynie*. *Kompozyty* 1(1): 50–54, 2001.
- [32] Lakes R.S. *Composite Biomaterials*. W: Wong J, Bronzino J. (red.) *Biomaterials*. Boca Raton: CRC Press 2007.
- [33] Szewczyk-Nykiel A., Kazior J., Nykiel M. *Characterization of AISI 316L – Hydroxyapatite composite biomaterials*. *Mechanics Technical Transactions* 6(106): 39–44, 2009.
- [34] Szafran M., Lipiec W., Okowiak J., Konopka K., Kurzydłowski K. J. *Nowe kompozyty*

- ceramika-polimer o osnowie z ceramicznego tworzywa porowatego z tlenku glinu*. Kompozyty 3(8): 337–342, 2003.
- [35] Paciorek J. *Materiały porowate – właściwości i zastosowanie*. Trendy ve vzdělávání 2012 Technika, didaktika technických a přírodovědných předmětů 5(1): 229–232, 2012.
- [36] Mour M., Das D., Winkler T., Hoenig E., Mielke G., Morlock M.M., Schilling A.F. *Advances in Porous Biomaterials for Dental and Orthopaedic Applications*. Materials 3: 2947–2974, 2010.
- [37] Rouquerol J., Avnir D., Fairbridge C.W., Everett C.W., Haynes J.H., Pernicone N., Ramsay J.D.F., Sing K.S.W., Unger K.K. *Recommendations for the characterization of porous solids (Technical Report)*, Pure and Applied Chemistry 66(8): 1739–1758, 1994.
- [38] Kubik J., Podworski A. *Porowatość i powierzchnia właściwa dla ośrodków o jedno- i dwuwymiarowej przepuszczalności*, Zeszyty Naukowe Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Bydgoszczy. Studia Techniczne 19: 115–138, 1997.
- [39] Perez R. A., Mestres G. *Role of pore size and morphology in musculo-skeletal tissue regeneration*. Materials Science and Engineering C 61: 922–939, 2016.
- [40] Arabnejad S., Johnston R. B., Pura J. A., Singh B., Tanzer M, Pasini D. *High-strength porous biomaterials for bone replacement: A strategy to assess the interplay between cell morphology, mechanical properties, bone ingrowth and manufacturing constraints*. Acta Biomaterialia 30: 345–356, 2016.
- [41] Szczepkowska M., Łuczuk M. *Porous materials for the medical applications*. Systemy Wspomagania w Inżynierii Produkcji 2(8): 231–239, 2014.
- [42] Matassi F., Botti A., Sirleo L., Carulli C., Innocenti M. *Porous metal for orthopedics implants*. Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism 10(2): 111–115, 2013.
- [43] Ryan G., Pandit A., Apatsidis D. P. *Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications*. Biomaterials 27: 2651–2670, 2006.
- [44] Wang X., Xu S., Zhou S., Xu W., Leary M., Choong P., Qian M., Brandt M., Xie Y. M. *Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: A review*. Biomaterials 83: 127–141, 2016.
- [45] Seramak T., Serbiński W., Zieliński A. *Porous biomaterial for orthopaedic implants based on titanium alloy*. Advances in materials science 11(1): 27–33, 2011.
- [46] Janik H., Marzec M. *A review: fabrication of porous polyurethane scaffolds*. Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications 48: 586–591, 2015.
- [47] DiRienzo A. L., Yakacki C. M., Frensemeier M., Schneider A. S., Safranski D. L., Hoyt A. J., Frick C. P. *Porous poly(para-phenylene) scaffolds for load-bearing orthopedic applications*. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials 30: 347–357, 2014.
- [48] Rezwani K., Chen Q. Z., Blaker J. J., Boccaccini A. R. *Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering*. Biomaterials 27(18): 3413–3431, 2006.

- [49] Geesala R., Bar N., Dhoke N. R., Basak P., Das A. *Porous polymer scaffold for on-site delivery of stem cells – Protects from oxidative stress and potentiates wound tissue repair*. *Biomaterials*. 77: 1–13, 2016.
- [50] Dubicki A. *Porowate struktury funkcjonalne w medycynie – zastosowanie, modelowanie i wytwarzanie*. W: Janiszewska M., Nowak B. A. (red.) *Wyzwania fizjoterapii – wybrane zagadnienia*. Lublin: Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o. 2017, 7–18.
- [51] Živić F., Grujović N., Mitrović S., Adamović D., Petrović V., Radovanović A., Đurić S., Palić N. *Friction and Adhesion in Porous Biomaterial Structure*. *Tribology in Industry* 38 (3): 361–370, 2016.
- [52] Cykowska M. *Struktury funkcjonalne w implantologii*. Aktualne problemy biomechaniki 7: 27–32, 2013.
- [53] Wang Z., Chang J., Bai F., Sun X., Lin K., Chen L., Lu J., Dai K. *Role of the porous structure of the bioceramic scaffolds in bone tissue engineering*. Available from Nature Precedings, 2010.
- [54] Banaszak J. *Inżynieria materiałów porowatych*. Poznań: Wydawnictwo Politechniki Poznańskiej 2005.
- [55] Szafran M., Rokicki G., Lipiec W. *Porowata ceramika infiltrowana metalami i polimerami*. *Kompozyty* 2(5): 313–317, 2002.
- [56] Wiśniewski P. *Właściwości ceramicznych tworzyw porowatych z piasku kwarcowego otrzymanych metodą spiekania ziaren*. *Glass and Ceramics* 60(2): 26–29, 2009.
- [57] Szafran M. *Makroskopowe i mikroskopowe aspekty projektowania ceramicznych tworzyw porowatych*. *Prace Naukowe Politechniki Warszawskiej. Chemia* 63: 3–97, 2000.
- [58] Kucharska M., Butruk B., Ciach T. *Otrzymywanie implantów kostnych techniką spieniania*. *Inżynieria i Aparatura Chemiczna* 48(5): 62–64, 2009.
- [59] Ślósarczyk A., Potoczek M., Paszkiewicz Z., Zima A., Lewandowska-Szumieł M., Chróścicka A. *Otrzymywanie, charakterystyka i ocena biologiczna wysokoporowatej bioceramiki hydroksyapatytowej*. *Ceramic Materials* 62(2): 224–229, 2010.
- [60] Sopyan I., Kaur J., Ramesh S., Hamdi M. *Bioactive porous ceramics via polymeric sponge method: the effect of preparation conditions on physical properties*. *International Conference on Smart Materials and Nanotechnology in Engineering*, 2007.
- [61] Lipiec W., Szafran M. *Kompozyty ceramika-poli(metakrylan metylu) o osnowie z ceramicznego tworzywa porowatego z tlenku glinu otrzymanego metodą osadzania ceramicznej masy lejnej na podłożu polimerowym*. *Kompozyty* 4(10): 216–220, 2004.
- [62] Manikandan D. *Synthesis, characterization and phase stability of porous hydroxyapatite*. *International Research Journal of Engineering and Technology* 2(9): 2624–2628, 2015.
- [63] Orlić S., Ivanković H., Tkalčec E. *Preparation of highly porous hydroxyapatite ceramics from cuttlefish bone*. 11. *Conference on Materials, Processes, Friction and Wear*, Vela Luka, 2006.
- [64] Potoczek M., Myalski J., Śleziona J., Śliwa R. E. *Ceramika porowata do infiltracji*

- metalami wytwarzana metodą żelowania spienionej zawiesiny*. Inżynieria Materiałowa 30(6): 536–539, 2009.
- [65] Puchała P., Kucharski G., Jaremczuk B., Monkos-Jaremczuk E. *Przegląd biomateriałów na podstawie piśmiennictwa*. Twój przegląd stomatologiczny 10: 28–36, 2008.
- [66] Szyszkowska A., Krawczyk P. *Materials used to regeneration bones cavities in stomatology. A review article*. Implantoprotetyka 9(4): 21–24, 2008.
- [67] Lee J. T.Y., Chow K. L., Wang K., Tsang W. H. *Is Macroporosity Absolutely Required for Preliminary in Vitro Bone Biomaterial Study? A Comparison between Porous Materials and Flat Materials*. Journal of Functional Biomaterials 2: 308–337, 2011.
- [68] Karageorgiou V., Kaplan D. *Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis*. Biomaterials 26: 5474–5491, 2005.
- [69] Shao R., Quan R., Zhang L., Wei X., Yang D., Xie S. *Porous hydroxyapatite bioceramics in bone tissue engineering: Current uses and perspectives*. Journal of the Ceramic Society of Japan 123 (1): 17–20, 2015.
- [70] Sopyan I., Mel M., Ramesh S., Khalid K.A. *Porous hydroxyapatite for artificial bone applications*. Science and Technology of Advanced Materials 8: 116–123, 2007.
- [71] Koźlik M., Wójcicki P., Rychlik D. *Bone Graft Substitutes*. Dental and Medical Problems 48(4): 547–553, 2011.
- [72] Dorozhkin S.V. *Bioceramics of calcium orthophosphates*. Biomaterials 31: 1465–1485, 2010.
- [73] Dorozhkin S.V. *Medical Application of Calcium Orthophosphate Bioceramics*. BIO 1: 1–51, 2011.
- [74] Dorozhkin S.V. *Bioceramics Based On Calcium Orthophosphates (Review)*. Glass and Ceramics 64: 442–447, 2007.
- [75] Zima A., Paszkiewicz Z., Ślósarczyk A. *TCP bioceramics (α TCP, β TCP, BCP) for orthopaedic and stomatological applications – preparation and in vitro evaluation*. Ceramic Materials 62(1): 51–55, 2010.
- [76] Giannoudis P.V., Dinopoulos H., Tsiridis E. *Bone substitutes: An update*. International Journal of the Care of the Injured 36: 20–27, 2005.
- [77] Hadjicharalambous C., Buyakov A., Buyakova S., Kulkov S., Chatzinikolaidou M. *Porous alumina, zirconia and alumina/zirconia for bone repair: fabrication, mechanical and in vitro biological response*. Biomedical Materials 10: 1–13, 2015.
- [78] Dudek A., Adamczyk L. *Properties of hydroxyapatite layers used for implant coatings*. Optica Applicata 43(1): 143–151, 2013.
- [79] Dudek A. *Investigations of microstructure and properties in bioceramic coatings used in medicine*. Archives of Metallurgy and Materials 56(1): 135–140, 2011.
- [80] Surowska B. *Biomateriały metalowe oraz połączenia metal–ceramika w zastosowaniach stomatologicznych*. Lublin: Wydawnictwo uczelniane 2009.
- [81] Walczak M. *Charakterystyka powłok ceramicznych SiO_2 i $\text{SiO}_2\text{--TiO}_2$ otrzymanych*

- metodą zol-żel*. Postępy nauki i techniki 9: 80–90, 2011.
- [82] Gan L., Pilliar R. *Calcium phosphate sol-gel-derived thin films on porous-surfaced implants for enhanced osteoconductivity. Part I: Synthesis and characterization*. Biomaterials 25: 5303–5312, 2004.
- [83] Gan L., Wang J., Tache A., Valiquette N., Deporter D., Pilliar R. *Calcium phosphate sol-gel-derived thin films on porous-surfaced implants for enhanced osteoconductivity. Part II: Short-term in vivo studies*. Biomaterials 25: 5313–5321, 2004.
- [84] Liua X., Chub P.K., Dinga C. *Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications*. Materials Science and Engineering R 47:49–121, 2004.
- [85] Wierzchoń T., Czarnowska E., Krupa D. *Inżynieria powierzchni w wytwarzaniu biomateriałów tytanowych*. Warszawa: Oficyna Wydawnicza 2004.
- [86] Toccafondi C., Dante S., Reverberi A.P., Salerno M. *Biomedical Applications of Anodic Porous Alumina*. Current Nanoscience 11: 572–580, 2015.
- [87] Walpole A.R., Briggs E.P., Karlsson M., Pålsgård E., Wilshaw P.R. *Nano-porous Alumina Coatings for Improved Bone Implant Interfaces*. Materialwissenschaft und Werkstofftechnik 34: 1064–1068, 2003.
- [88] Xifre-Perez E., Ferre-Borull J., Pallares J., Marsal L.F. *Mesoporous alumina as a biomaterial for biomedical applications*. Mesoporous Biomaterials 2: 13–32, 2015.
- [89] Singh M., Das G. *Highly ordered anodic porous alumina membrane and its surface modification approaches for biomedical application*. IOSR Journal of Applied Chemistry 7: 17–34, 2014.
- [90] Md Jani A.M., Losic D., Voelcker N.H. *Nanoporous anodic aluminium oxide: Advances in surface engineering and emerging applications*. Progress in Materials Science 58: 636–704, 2013.
- [91] Lee W., Ji R., Gösele U., Nielsch K. *Fast fabrication of long-range ordered porous alumina membranes by hard anodization*. Nature Materials 5: 741–747, 2006.
- [92] Zhao S., Chan K., Yelon A., Veres T. *Novel Structure of AAO Film Fabricated by Constant Current Anodization*. Advanced Materials 19: 3004–3007, 2007.
- [93] Briggs E.P., Walpole A.R., Wilshaw P.R., Karlsson M., Pålsgård E. *Formation of highly adherent nano-porous alumina on Ti-based substrates: a novel bone implant coating*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 15(9): 1021–1029, 2004.
- [94] Krasicka-Cydzik E. *Formowanie cienkich warstw anodowych na tytanie i jego implantowych stopach w środowisku kwasu fosforowego*. Zielona Góra: Oficyna Wydawnicza Uniwersytetu Zielonogórskiego, 2003.
- [95] Pisarek M., Roguska A., Andrzejczuk M. *Charakterystyka nanoporowatych warstw na Ti jako perspektywicznych podłoży dla zastosowań biomedycznych*. Inżynieria Materiałowa 2(180): 71–76, 2011.
- [96] Minagar S., Berndt C.C., Wanga J., Ivanova E., Wena C. *A review of the application of*

- anodization for the fabrication of nanotubes on metal implant surfaces. Acta Biomaterialia* 8: 2875–2888, 2012.
- [97] Chu P.K., Chen J.Y., Wang L.P., Huang N. *Plasma-surface modification of biomaterials. Materials Science and Engineering R* 36: 143–206, 2002.
- [98] Rogowska R. *Porowatość powłok otrzymywanych różnymi technikami PVD. Problemy eksploatacji* 1: 177–184, 2009.
- [99] Urbańczyk P. *Techniki kierunkowe otrzymywania powłok przeciwzuzyciowych*. [online], 2013. URL: http://tz.zssio.pl/wp-content/uploads/2013/11/techniki_kierunkowe.pdf.
- [100] Maitz M.F., Pham M.T., Matz W., Reuther H., Steiner G. *Promoted calcium-phosphate precipitation from solution on titanium for improved biocompatibility by ion implantation. Surface and Coatings Technology* 158–159: 151–156, 2002.
- [101] Montewka M., Skrzek A., Plewik D., Rudzki S., Wysokiński A., Koziół-Montewka M. *Zakażenia miejsca operowanego - charakterystyka czynników ryzyka, endogennych źródeł zakażenia i metody zapobiegania. Postępy Mikrobiologii* 51: 227–235, 2012.
- [102] Mycek B., Szymura-Olesiak J., Strach B., Zima A., Ślósarczyk A. *Badanie kinetyki uwalniania leków z bioceramicznych preparatów implantacyjnych. Materiały ceramiczne* 64: 387–392, 2012.
- [103] Mainardes R., Silva L. *Drug Delivery Systems: Past, Present, and Future. Current Drug Targets* 5: 449–455, 2004.
- [104] Diefenbeck M., Mückley T., Hofmann G.O. *Prophylaxis and treatment of implant-related infections by local application of antibiotics. Injury* 37: 95–104, 2006.
- [105] Orive G., Hernández R.M., Gascón A.R., Domínguez-Gil A., Pedraz J.L. *Drug delivery in biotechnology: Present and future. Current Opinion in Biotechnology* 14: 659–664, 2003.
- [106] Desai T.A., Sharma S., Walczak R.J., Boiarski A., Cohen M., Shapiro J., West T., Melnik K., Cosentino C., Sinha P.M., Ferrari M. *Nanoporous Implants for Controlled Drug Delivery*. W: Desai T., Bhatia S. (red.) *BioMEMS and Biomedical Nanotechnology: Therapeutic Micro/Nanotechnology*. New York: Springer 2007, 263–287.
- [107] Nevozhay D., Kańska U., Budzyńska R., Boratyński J. *Current status of research on conjugates and related drug delivery systems in the treatment of cancer and other diseases. Postępy higieny i medycyny doświadczalnej* 61: 350–360, 2007.
- [108] Wang Q., Huang J., Lai Y. *Smart Drug Delivery Strategies Based on Porous Nanostructure Materials*. W: Sezer A.D. (red.) *Smart Drug Delivery System*. InTech 2016, 63–90.
- [109] Niemirowicz K., Car H. *Nanocarriers in modern drug delivery systems. Chemik* 66: 868–881, 2012.
- [110] Arcos D., Vallet-Regi M. *Bioceramics for drug delivery. Acta Materialia* 61: 890–911, 2013.
- [111] Laskus A., Kolmas J. *Nowoczesne systemy dostarczania antybiotyków do kości na bazie hydroksyapatytu. BIULETYN Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu*

Medycznego 1: 1–6, 2016.

- [112] Bose S., Tarafder S. *Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review*. *Acta Biomaterialia* 8(4): 1401–1421, 2012.
- [113] Dion A., Langman M., Hall G., Filiaggi M. *Vancomycin release behaviour from amorphous calcium polyphosphate matrices intended for osteomyelitis treatment*. *Biomaterials* 26(35): 7276–7285, 2005.
- [114] Vorndran E., Geffers M., Ewald A., Lemm M., Nies B., Gbureck U. *Ready-to-use injectable calcium phosphate bone cement paste as drug carrier*. *Acta Biomaterialia* 9(12): 9558–9567, 2013.
- [115] Loca D., Locs J., Salma K., Gulbis J., Salma I., Berzina-Cimдина L. *Porous Hydroxyapatite Bioceramic Scaffolds for Drug Delivery and Bone Regeneration*. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering 18: 1–4, 2011.
- [116] Kang H.J., Kim D.J., Park S.J., Yoo J.B., Ryu Y.S. *Controlled drug release using nanoporous anodic aluminum oxide on stent*. *Thin Solid Films* 515: 5184–5187, 2007.
- [117] Noh K., Brammer K.S., Choi C., Kim S.H., Frandsen C.J., Jin S. *A New Nano-Platform for Drug Release via Nanotubular Aluminum Oxide*. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* 2: 226–233, 2011.
- [118] Gulpepe E., Nagesha D., Casse B.D.F., Banya R., Fitchorov T., Karma A., Amiji M., Sridhar S. *Sustained drug release from non-eroding nanoporous templates*. *Small* 6: 213–216, 2010.
- [119] Ayon A.A., Cantu M., Chava K., Agrawal C.M., Feldman M.D., Johnson D., Patel D., Marton D., Shi E. *Drug loading of nanoporous TiO₂ films*. *Biomedical materials* 1: 11–15, 2006.
- [120] Ahuja G, Pathak K. *Porous carriers for controlled/modulated drug delivery*. *Indian journal of pharmaceutical sciences* 71: 599–607, 2009.
- [121] Čolović B., Pašalić S., Jakanović V. *Influence of hydroxyapatite pore geometry on tigecline release kinetics*. *Ceramics International* 38: 6181–6189, 2012.
- [122] Yu M., Zhoun K., Zhang F., Zhang D. *Porous HA microspheres as drug delivery: Effects of porosity and pore structure on drug loading and in vitro release*. *Ceramics International* 40: 12617–12621, 2014.
- [123] Yu M., Zhoun K., Zhang F., Zhang D. *Preparation, characterization and in vitro gentamicin release of porous HA microspheres*. *Materials Science and Engineering C* 45: 306–312, 2014.
- [124] Chai F., Hornez J. C., Blanchemain N., Neut C., Descamps M., Hildebrand H.F. *Antibacterial activation of hydroxyapatite (HA) with controlled porosity by different antibiotics*. *Biomolecular Engineering* 24(5): 510–514, 2007.
- [125] Loh Q.L., Choong C. *Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size*. *Tissue Engineering: Part B* 19(6): 485–502, 2013.
- [126] Espinal L. *Porosity and its measurement*. W: Kaufmann E.N. (red.) *Characterization of*

- Materials*. New York: John Wiley & Sons, Inc. 2012.
- [127] Lawrence M., Jiang Y. *Porosity, Pore Size Distribution, Micro-structure*. W: Amziane S., Collet F. (red.) *Bio-aggregates Based Building Materials: State-of-the-Art Report of the RILEM Technical Committee 236-BBM*. Dordrecht: Springer 2017.
- [128] Widiatmoko E., Abdullah M., Khairurrijal. *A Method to Measure Pore Size Distribution of Porous Materials Using Scanning Electron Microscopy Images*. W: The Third Nanoscience and Nanotechnology Symposium 2010. Bandung: American Institute of Physics 2010.
- [129] Krupska A., Roźniakowski K., Wojtatowicz T.W. *Examinations of the materials` porosity with the aid of SEM*. Scientific Bulletin. Physic 20: 25–38, 2000.
- [130] Kozubowski J. *Mikroskop elektronowy skaningowy*. W: Internetowa encyklopedia PWN. Wydawnictwo Naukowe PWN.
- [131] N'Diaye M., Degeratu C., Bouler J-M., Chappard D. *Biomaterials porosity determined by fractal dimensions, succolarity and lacunarity on microcomputed tomographic images*. Materials Science and Engineering C 33(4): 2025–2030, 2013.
- [132] Ratajczyk E. *Rentgenowska tomografia komputerowa (CT) do zadań przemysłowych. Pomiary automatyka Robotyka 5: 104–113, 2012.*
- [133] Heljak M., Jaroszewicz J., Świąszkowski W., Kurzydłowski K.J. *Mikrotomografia rentgenowska jako metoda obrazowania w inżynierii materiałowej*. Badania nieniszczące 01/08/2009.
- [134] Lin C.L., Miller J.D. *3D characterization and analysis of particle shape using X-ray microtomography (XMT)*. Powder Technology 154: 61–69, 2005.
- [135] Jaegermann Z., Ślósarczyk A. *Gęsta i porowata bioceramika korundowa w zastosowaniach medycznych*. Kraków: Uczelniane Wydawnictwa Naukowo-Techniczne AGH 2007.
- [136] Wang H., Chu P.K. *Surface Characterization of Biomaterials*. W: Bandyopadhyay A., Bose S. (red.) *Characterization of Biomaterials*, Waltham: Elsevier 2013.
- [137] Garczyk Ż., Stach S., Wróbel Z. *Evaluation of implant surface porosity using IT tools*. W: Kępczak N., Solarczyk P. (red.) *The Book of Articles National Scientific Conference "Science and Young Researchers" III edition*. Łódź: Promovendi Foundation Publishing 2019.
- [138] Garczyk Ż., Stach S., Wróbel Z. *Przetwarzanie i analiza obrazu w ocenie stopnia porowatości powierzchni bioceramiki*. W: Czyż Z. (red.) *Współczesne problemy inżynierii materiałowej oraz mechaniki*. Lublin: Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o. 2018.
- [139] Papoulis A., Pillai S. U. *Probability, Random Variables and Stochastic Processes*. New York: McGraw-Hill 2001.
- [140] Castillo J.D., Puig P. *Testing departures from gamma, Rayleigh and truncated normal distributions*. Annals of the Institute of Statistical Mathematics 49(2): 255–269, 1997.
- [141] Leach R. *Characterisation of Areal Surface Texture*. Berlin: Springer 2013.

- [142] Wieczorkowski R., Zieliński R. *Komputerowe generatory liczb losowych*. Warszawa: WNT 1997.
- [143] Nowak-Brzezińska A. *Przygotowanie danych*. W: Wakulicz-Deja A. (red.) *Wybrane zagadnienia analizy danych*. Warszawa: Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT 2013.
- [144] Borsuk K. *Geometria analityczna wielowymiarowa*. TOM 23. Warszawa: Państwowe Wydawnictwo Naukowe 1976.
- [145] Marciniak A. *Grafika komputerowa w języku turbo Pascal*. Poznań: Nakom 1998.
- [146] Filist L., Malina A., Solecka A. *Encyklopedyczny słownik szkolny – matematyka*. Wrocław: Wydawnictwo Europa 2003.
- [147] Garczyk Ż., Stach S. *Three-dimensional model for assessing the pore volume of biomaterials intended for implantation*. W: Jin Z., Li J., Chen Z. (red.) *Computational Modelling of Biomechanics and Biotribology in the Musculoskeletal System*. Elsevier 2020.
- [148] Garczyk Ż., Jaegermann Z., Duda P., Swinarew A.S., Stach S. *Ceramic biomaterial pores stereology analysis by the use of microtomography*. *Materials* 14 (9): 1-11, 2021.

8. SPIS RYSUNKÓW

Rysunek 1. Schemat przekroju materiału porowatego – pory zamknięte: a; pory otwarte: b, c, d, e, f; pory ślepe: b, f; pory przelotowe: c-e-d oraz c-e-c [37]	23
Rysunek 2. Schematyczna ilustracja rodzajów porów uwzględnianych w opisie porowatości objętościowej: a) całkowitej, b) otwartej, c) zamkniętej, d) aktywnej [54]	26
Rysunek 3. Nakładanie warstwy metodą zol-żel [80].....	38
Rysunek 4. Schemat wzrostu warstwy w metodzie CVD [80]	39
Rysunek 5. Schemat procesu anodowania aluminium.....	40
Rysunek 6. Schemat metody osadzania elektroforetycznego [80].....	41
Rysunek 7. Schemat próżniowego natryskiwania plazmowego [80].....	42
Rysunek 8. Schemat ideowy stanowiska do realizacji metody PVD [99].....	43
Rysunek 9. Schemat metody implantacji jonowej wspomaganej plazmą	44
Rysunek 10. Podział systemów dostarczających leki	45
Rysunek 11. Sposób umieszczania leku w układzie homogenicznym [1]	47
Rysunek 12. Sposób umieszczania leku w układzie heterogenicznym [1]	48
Rysunek 13. Zasada działania mikroskopu optycznego: 1–próbka, 2–stół mikroskopu, 3–obiektyw, 4–płytko oświetlająca, 5–kondensator, 6–żarówka, 7–pryzmat optyczny, 8–okular [54].....	53
Rysunek 14. Schemat budowy skaningowego mikroskopu elektronowego [130].....	54
Rysunek 15. Schemat mikrotomografu [132].....	55
Rysunek 16. Porowaty biomateriał korundowy: (A) próbka, (B) obraz powierzchni próbki pozyskany z wykorzystaniem mikroskopu stereoskopowego.....	58
Rysunek 17. Skaningowy laserowy mikroskop konfokalny Olympus LEXT OLS4000	59
Rysunek 18. Skaner rentgenowski GE Phoenix v/tome/x	60
Rysunek 19. Analiza obrazu w programie SPIP na przykładzie obrazu uzyskanego z wykorzystaniem obiektywu MPLFLN2.5X: (A) warstwa obrazu, (B) warstwa natężenia, (C) warstwa topografii, (D) operacja filtrowania, (E) detekcja porów, (F) obraz wynikowy	62
Rysunek 20. Histogram przedstawiający rozkład średnic porów wyznaczonych na obrazach otrzymanych z wykorzystaniem obiektywu MPLFLN2.5X.....	64
Rysunek 21. Histogram przedstawiający rozkład średnic porów wyznaczonych na obrazach otrzymanych z wykorzystaniem obiektywu MPLFLN5X.....	64
Rysunek 22. Wykres funkcji gęstości prawdopodobieństwa dla rozkładu Rayleigha.....	65
Rysunek 23. Współrzędne punktu w układzie współrzędnych sferycznych [145].....	69
Rysunek 24. Możliwe do wyboru płaszczyzny przekroju: A) płaszczyzna X, B) płaszczyzna Y, C) płaszczyzna Z	70
Rysunek 25. Przykład różnych pozycji w płaszczyźnie Y.....	70
Rysunek 26. Schematyczne przecinanie pora płaszczyzną przekroju	71
Rysunek 27. Współrzędne punktu w układzie współrzędnych biegunowych [145].....	71
Rysunek 28. Czasza kulista powstała w wyniku przecięcia kuli płaszczyzną [146]	72
Rysunek 29. Okno graficzne interfejsu użytkownika zaimplementowanego programu.....	73
Rysunek 30. Panel parametrów wejściowych modelu 3D w zaimplementowanym programie	74
Rysunek 31. Przykład generowania trójwymiarowego modelu porów biomateriału	74
Rysunek 32. Przykład histogramu przedstawiającego rozkład średnic wygenerowanych porów modelu	75
Rysunek 33. Panel parametrów wejściowych modelu 2D w zaimplementowanym programie	75
Rysunek 34. Przykład wygenerowanego modelu wraz z wybraną płaszczyzną cięcia	76

<i>Rysunek 35. Przykład wygenerowanego modelu wraz z wybraną pozycją w płaszczyźnie X.....</i>	<i>76</i>
<i>Rysunek 36. Przykład generowania przekroju biomateriału: (A) analiza wszystkich porów powierzchni, (B) analiza po wykluczeniu porów przeciętych przez ramkę obrazu.....</i>	<i>78</i>
<i>Rysunek 37. Model porów biomateriału uzyskany w wyniku symulacji komputerowej.....</i>	<i>79</i>
<i>Rysunek 38. Histogram przedstawiający rozkład średnic porów dla wygenerowanego modelu</i>	<i>80</i>
<i>Rysunek 39. Przykład symulacji - przekrój modelu o wymiarach $5120 \mu\text{m} \times 5120 \mu\text{m} \times 5120 \mu\text{m}$</i>	<i>80</i>
<i>Rysunek 40. Przykład symulacji - przekrój modelu o wymiarach $2572 \mu\text{m} \times 2572 \mu\text{m} \times 2572 \mu\text{m}$</i>	<i>82</i>
<i>Rysunek 41. Próbka biomateriału podczas badania mikrotomografem.....</i>	<i>84</i>
<i>Rysunek 42. Wynik badania mikrotomografem - trójwymiarowy obraz próbki</i>	<i>84</i>
<i>Rysunek 43. Wyświetlenie danych pomiarowych pierwszej analizowanej próbki.....</i>	<i>85</i>
<i>Rysunek 44. Przykład analizy danych mikrotomograficznych - wydzielenie obszaru do analizy.....</i>	<i>85</i>
<i>Rysunek 45. Przykład analizy danych mikrotomograficznych przedstawiony dla jednej z warstw: (A) filtr medianowy, (B) binaryzacja, (C) morfologiczne otwarcie, (D) rozdzielenie połączonych porów, (E) usunięcie porów przeciętych ramką obrazu, (F) wynik analizy.....</i>	<i>86</i>

9. SPIS TABEL

<i>Tabela 1. Powłoki ceramiczne na podłożach implantów metalicznych [7].....</i>	<i>36</i>
<i>Tabela 2. Parametry porów wyznaczone dla poszczególnych obrazów otrzymanych z wykorzystaniem obiektywu MPLFLN2.5X.....</i>	<i>63</i>
<i>Tabela 3. Parametry porów wyznaczone dla poszczególnych obrazów otrzymanych z wykorzystaniem obiektywu MPLFLN5X.....</i>	<i>63</i>
<i>Tabela 4. Średnie wartości parametrów morfologicznych porów wyznaczonych na obrazach otrzymanych z wykorzystaniem obiektywu MPLFLN2.5X.....</i>	<i>66</i>
<i>Tabela 5. Średnie wartości parametrów morfologicznych porów wyznaczonych na obrazach otrzymanych z wykorzystaniem obiektywu MPLFLN2.5X.....</i>	<i>66</i>
<i>Tabela 6. Parametry charakteryzujące pory modelu o wymiarach 5120 μm × 5120 μm × 5120 μm.....</i>	<i>79</i>
<i>Tabela 7. Wartości parametrów charakteryzujących pory przekroju modelu o wymiarach 5120 μm × 5120 μm × 5120 μm.....</i>	<i>81</i>
<i>Tabela 8. Parametry charakteryzujące pory modelu o wymiarach 2572 μm × 2572 μm × 2572 μm.....</i>	<i>82</i>
<i>Tabela 9. Wartości parametrów charakteryzujących pory przekroju modelu o wymiarach 2572 μm × 2572 μm × 2572 μm.....</i>	<i>82</i>
<i>Tabela 10. Wartości parametrów charakteryzujących pory dla fragmentów próbek o wymiarach 5120 μm × 5120 μm × 5120 μm.....</i>	<i>87</i>
<i>Tabela 11. Wartości parametrów charakteryzujących pory dla fragmentów próbek o wymiarach 2572 μm × 2572 μm × 2572 μm.....</i>	<i>87</i>

10. STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Głównym celem badań było opracowanie i zaimplementowanie trójwymiarowego modelu porów biomateriału, stanowiącego narzędzie do wyznaczania objętości porów.

Proces tworzenia modelu składał się z trzech zasadniczych etapów. Pierwszy z nich to ustalenie założeń, które model powinien spełniać. W ramach tego etapu, przeprowadzono pomiary za pomocą skaningowego laserowego mikroskopu konfokalnego LEXT OLS4000. Materiał badawczy stanowiły próbki porowatego biomateriału korundowego wytworzone metodą spieniania chemicznego. Obrazy pozyskane z wykorzystaniem mikroskopu poddano analizie w oprogramowaniu SPIP firmy Image Metrology, która pozwoliła wysegmentować z obrazu powierzchni pory i dokonać ich pomiarów. Na podstawie otrzymanych parametrów przyjęto założenia modelu.

Kolejnym etapem badań była implementacja modelu. Model zaimplementowano w środowisku programistycznym pakietu Matlab. Aby umożliwić użytkownikowi wprowadzenie parametrów wejściowych modelu, zaprojektowano i wykonano graficzny interfejs użytkownika. Użytkownik ma możliwość określenia rozmiaru modelu, liczby porów oraz minimalnej i maksymalnej średnicy pora. Na podstawie tych parametrów generowany jest trójwymiarowy model. Kolejnym elementem jest możliwość wyboru płaszczyzny oraz pozycji przekroju. Generując przekrój użytkownik uzyskuje obraz powierzchni przedstawiający pory znajdujące się w wybranej płaszczyźnie i pozycji przekroju oraz parametry je charakteryzujące. Model umożliwia określenie objętości porów zarówno wewnątrz materiału jak i na jego powierzchni, co daje możliwość wyznaczenia objętości porów otwartych oraz szacowania średniej objętości porów na jednostkę powierzchni badanego materiału.

Ostatnia część badań polegała na weryfikacji opracowanego modelu. Metodę modelowania przetestowano poprzez porównanie wyników otrzymanych z wykorzystaniem modelu z danymi eksperymentalnymi uzyskanymi w wyniku mikrotomograficznych badań biomateriału.

W pierwszym kroku przeprowadzono symulację komputerową, w wyniku której wygenerowano trójwymiarową reprezentację porów biomateriału. Parametry wejściowe modelu dobrano w taki sposób, aby przekrój materiału otrzymany w wyniku przecięcia trójwymiarowego modelu płaszczyzną, charakteryzował się geometrią porów analogiczną do tej uzyskanej podczas wcześniejszej analizy obrazów rzeczywistej powierzchni biomateriału.

Następnie próbki porowatego biomateriału korundowego poddano pomiarom za pomocą wysokorozdzielczego skanera rentgenowskiego. Serię projekcji będących bezpośrednim wynikiem badania, poddano rekonstrukcji, a następnie wygenerowano trójwymiarowe obrazy

próbek. W kolejnym etapie przeprowadzono analizę obrazów z wykorzystaniem oprogramowania Thermo Scientific Avizo. Analiza umożliwiła wysegmentowanie porów i wykonanie ich precyzyjnych pomiarów, w wyniku których wyznaczono parametry charakteryzujące pory.

Porównując ze sobą wyniki uzyskane w obu etapach eksperymentu stwierdzono, że program generuje model o strukturze i geometrii porów zbliżonej do rzeczywistego biomateriału ceramicznego, co potwierdziło poprawność opracowanego modelu.

Model może zatem znaleźć praktyczne zastosowanie w celu zaprojektowania biomateriału o określonej strukturze wewnętrznej porów, która na powierzchni charakteryzować się będzie określoną objętością porów otwartych. Wyznaczona objętość umożliwi m. in. obliczenie, a następnie umieszczenie konkretnej objętości leku w porach otwartych biomateriału i dostarczenie do organizmu pacjenta podczas zabiegu implantacji.

11. ABSTRACT OF THE DOCTORAL DISSERTATION

The main aim of the study was to develop and implement a three-dimensional model of biomaterial pores as a tool for determining pore volume.

The process of creating the model consisted of three main stages. The first was to determine the assumptions that the model should meet. As part of this stage, measurements were performed using the confocal laser scanning microscope LEXT OLS4000. The research material were samples of a porous corundum biomaterial produced by chemical foaming. The images acquired using the microscope were analysed in the SPIP software from Image Metrology, which allowed to segment the pores from the surface image and measure them. Based on the obtained parameters, model assumptions were adopted.

The next stage was implementation. The model was implemented in the Matlab programming environment. To allow the user to enter the input parameters of the model, a graphical user interface was designed and implemented. The user can specify the size of the model, the number of pores and the minimum and maximum pore diameter. Based on these parameters, a three-dimensional model is generated. Another element is the choice of plane and cross-sectional position. By generating the cross-section, the user obtains a surface image showing the pores in the selected plane and cross-sectional position, as well as the parameters characterizing them. The model enables to determine the volume of pores both inside the material and on its surface, which gives the opportunity to determine the volume of open pores and to estimate the mean pore volume per unit area of the material tested.

The last part of the research involved verification of the developed model. The modelling method was tested by comparing the results obtained using the model with experimental data obtained as a result of microtomography of the biomaterial. In the first step, a computer simulation was carried out, resulting in a three-dimensional representation of biomaterial pores. The input parameters of the model were selected in such a way that the cross-section of the material, obtained as a result of intersecting the three-dimensional model with a plane, was characterized by pore geometry analogous to that obtained during previous analysis of the images of the real biomaterial surface, obtained using the confocal microscope.

Then, the porous corundum biomaterial samples were measured using a high-resolution X-ray scanner. The resulting series of projections was reconstructed, and then three-dimensional images of the samples were generated. In the next stage, image analysis was performed using the Thermo Scientific Avizo software. The analysis made it possible to segment the pores and perform their precise measurements, as a result of which parameters characterizing the pores were

determined.

The comparison of the results obtained in both stages of the experiment has shown that the program generates a model with the structure and geometry of pores close to the actual ceramic biomaterial, which confirmed the correctness of the developed model.

Therefore, the model can be used to design a biomaterial with a specific internal pore structure, which will have a specific volume of open pores on the surface. The determined volume will allow, among others, to calculate and then place a specific volume of drug in the open pores of the biomaterial and deliver it to the patient during implantation.