

2. Stan wiedzy o materiałach stosowanych w implantologii oraz medycynie regeneracyjnej

Leszek A. Dobrzański

Centrum Badawczo-Projektowo-Produkcyjne Inżynierii Medycznej i Stomatologicznej
ASKLEPIOS

ul. Jana III Sobieskiego 12/1

44-100 Gliwice

Adres korespondencyjny e-mail: leszek.adam@gmail.com

Spis treści

2.1. Współczesne uwarunkowania w zakresie poprawy stanu zdrowia i bezpieczeństwa zdrowotnego społeczeństwa	18
2.2. Implanty oraz materiały stosowane w implantologii	24
2.3. Inżynieria tkankowa jako techniczne wspomaganie medycyny regeneracyjnej	37
2.4. Skafoldy tkankowe i kostne oraz materiały i technologie do nich stosowane	47
2.5. Ogólna charakterystyka tytanu i jego stopów możliwych do zastosowania na skafoldy kostne i tkankowe	60
2.6. Perspektywy zastosowań nowo opracowanych materiałów i technologii w medycynie i stomatologii	79
2.7. Literatura do artykułu 2	85

2.1. Współczesne uwarunkowania w zakresie poprawy stanu zdrowia i bezpieczeństwa zdrowotnego społeczeństwa

Jednym z fundamentalnych działań w skali światowej, zaliczanych także do priorytetów Unii Europejskiej, a w tym także w Polsce jest poprawa stanu zdrowia i opieki zdrowotnej oraz bezpieczeństwa zdrowotnego społeczeństwa. Do wielu zadań z tym związanych należy zapobieganie zagrożeniom zdrowotnym, wczesne rozpoznawanie chorób, szybkie i skuteczne wdrażanie procedur medycznych, zapewnienie kompleksowości i ciągłości terapii prowadzące do lepszego stanu zdrowia i poprawy jakości życia społeczeństwa. Europejska strategia zdrowotna zapewnia zagadnieniom związanym ze zdrowiem pierwszoplanowe miejsce w polityce wspólnotowej oraz zawiera program działań na rzecz obywateli, uznając ich prawo do własnego zdrowia i opieki zdrowotnej i obejmuje 3 cele strategiczne:

- promowanie zdrowia wśród starzejącego się społeczeństwa,
- chronienie obywateli przed zagrożeniami dla zdrowia i życia,
- wspieranie dynamicznych systemów opieki zdrowotnej i nowych technologii.

Chodzi przede wszystkim o sprostanie coraz częściej występującym problemom i o ochronę przed poważnymi zagrożeniami dla zdrowia, m.in. takimi jak choroby cywilizacyjne, pandemie i bioterroryzm.

Europejska strategia zdrowotna ponadto wspiera badania, zwłaszcza wykorzystujące nowoczesne technologie, aby zapewnić pełniejszą profilaktykę chorób i bezpieczne leczenie pacjentów, zwracając uwagę na powiązania między zdrowiem i dobrobytem gospodarczym.

W świetle przedstawionych ogólnych spostrzeżeń, należy zwrócić uwagę, że do istotnych i kosztownych problemów współczesnej medycyny należy konieczność wymiany lub uzupełnienia narządów lub tkanek, w celu zapobiegania biologicznej i społecznej degradacji pacjentów i przywracania im ich funkcji życiowych, normalnych lub akceptowalnie zbliżonych do normalnych, wynikających ze znaczącego wzrostu przypadków utraty lub uszkodzenia tych narządów lub tkanek w populacji ludzkiej w wyniku ubytków pourazowych, poresekcyjnych, jak również powstających w wyniku operacyjnego leczenia guzów nowotworowych lub procesów zapalnych oraz w wyniku innych schorzeń a także wypadków w pracy, komunikacyjnych i sportowych. Do najliczniej występujących przypadków należą spowodowane silnym rozwojem chorób cywilizacyjnych, w tym raka, a liczba zachorowań na nowotwory złośliwe systematycznie wzrasta. Ponadto znacząco zwiększa się liczba ofiar wypadków

komunikacyjnych [1], i np. w Polsce wynosi najwięcej w Unii Europejskiej, tj. 109 ofiar śmiertelnych na milion mieszkańców, gdy w Wielkiej Brytanii ta liczba wynosi najmniej w Unii Europejskiej tj. 31, a średni roczny spadek tego wskaźnika na Łotwie i w Estonii wynosi 10%, gdy w Polsce średniorocznie wzrasta o 4%. Analogicznie, liczba ofiar śmiertelnych w wypadkach kolejowych wynosi w Polsce 543, co jest liczbą najwyższą w skali Unii Europejskiej, gdy np. w Estonii, Finlandii i Holandii, liczba ta nie przekracza 20. W ślad za tym, niemal proporcjonalnie, wzrasta liczba osób poszkodowanych w tych wypadkach i wymagających, długotrwałej na ogół opieki medycznej. Wraz ze wzrostem aktywności sportowej, zwłaszcza młodzieży oraz promocji regeneracyjnego uprawiania sportu przez propagowanie zdrowego trybu życia zwiększają się rzesze ludzi dojrzałych uprawiających sport, co niechybnie wiąże się ze znaczącym wzrostem liczby wypadków sportowych i związanych z tym poważnych uszkodzeń ciała ludzkiego wielu osób w skali globalnej. Globalnie wzrost starzenia się społeczeństwa odgrywa ważną rolę we wzroście częstości występowania urazów sportowych, gdyż w miarę starzenia maleje sprawność funkcji ciała i ruchów, co sprawia, że ciało jest bardziej podatne na urazy. Przykładowo, zgodnie z European Injury Database (UE IDB), corocznie średnio 6,1 mln osób w Unii Europejskiej jest poddawanych leczeniu szpitalnemu z powodu urazów sportowych.

Wzrastają oczekiwania pacjentów w zakresie ochrony zdrowia, a aspekty ekonomiczne w skali Państwa, przemawiają za skutecznym usuwaniem niepełnosprawności m.in. ruchowej i przywracaniem ludzi poprzednio niepełnosprawnych do sprawności fizycznej oraz najczęściej równocześnie do aktywności zawodowej, przynajmniej częściowej, choć często również pełnej, co w istotny sposób zmniejsza parcie na malejące zasoby funduszy ubezpieczeń społecznych. Duże znaczenie ma skrócenie czasu oczekiwania na leczenie, obniżona cena i dostępność produktu lub usługi medycznej i terapii, zmniejszenie ryzyka niepowodzenia leczenia, m.in. przez spersonalizowanie wyrobów medycznych wytwarzanych według indywidualnych cech anatomicznych pacjenta, a w końcu zmniejszenie dyskomfortu terapii dla pacjenta i jego rodziny. Z powodu wskazanych powyżej skutków chorób cywilizacyjnych i wypadków, w tym nowotworów złośliwych, często konieczne są rekonstrukcje kości, m.in. nóg i rąk i w rejonie twarzoczaszki, jak również skóry i innych tkanek miękkich, a także przełyku i naczyń krwionośnych.

W wyniku obrażeń ciała związanych z licznymi wypadkami, w tym najczęściej z wypadkami przy pracy, wypadkami komunikacyjnymi oraz wypadkami związanymi z uprawianiem

sportu, a także w wyniku interwencji chirurgicznym, wynikających ze stosowanych metod terapeutycznych leczenia wielu schorzeń, w tym najczęściej chorób o podłożu onkologicznym lub usuwania stanów zapalnych, następuje przerwanie ciągłości tkanek, wymagające w celu powrotu do stanu normalnego ich regeneracji [2]. Inicjowana w momencie przerwania ciągłości tkanki jej regeneracja jest procesem niezwykle złożonym oraz czasochłonnym. Czas regeneracji zależy od typu tkanki oraz rozległości uszkodzenia. Gojenie się rany w warunkach naturalnych rozpoczyna się od fazy oczyszczania nazywanej również fazą zapalną, po której następuje faza przebudowy, inicjująca proces odtwarzania naczyń krwionośnych, nerwów i migracji komórek. Ostatnią fazą jest przywracanie funkcji naturalnej tkanki, polegające na obkurczaniu i wytwarzaniu się blizny, w której komórki produkują kolagen, a następnie przekształcają powstałą strukturę kolagenu w strukturę uporządkowaną nadającą własności wytrzymałościowe tkance. Szybkość regeneracji zależy również od obecności czynników wzrostu w środowisku rany. Przykładem ważnego w procesie regeneracji czynnika wzrostu jest PDGF (j. ang.: platelet-derived growth factor). Czynniki ten w kontakcie z fibroblastami uruchamia w komórkach procesy odpowiedzialne za produkcję kolagenu, białka będącego fundamentem każdego skafoldu w organizmie żywym. Następnie powstająca struktura kolagenu jest zasiedlana przez komórki właściwej tkanki, których obecność prowadzi do powstawania naczyń krwionośnych. Z rozwojem naczyń krwionośnych proces regeneracji ulega spotęgowaniu, ponieważ z krwią napływają substancje odżywcze oraz tlen, które przyspieszają podział komórkowy czyli regenerację.

Procesowi gojenia się rany często towarzyszy powstanie wysięku, który pod względem chemicznym zawiera mieszaninę cytokin, czynników wzrostu i enzymów proteolitycznych niszczących czynniki wzrostowe PDGF. Równocześnie obecność wysięku prowadzi do produkowania przez komórki proteazy, tj. związku, który uwalniany jest przez zdrowe komórki w celu zniszczenia, rozłożenia martwych komórek. Obecność proteazy przyczynia się również do przebudowy powstałego już kolagenowego ECM (j. ang.: extracellular matrix) w kierunku tkanki bliznowatej o maksymalnej wytrzymałości. W warunkach normalnych proces uwalniania proteazy jest pod ścisłą kontrolą organizmu, który kontroluje jej obecność przez system biochemicznych ścieżek. W warunkach niesterylnych, tj. warunkach w których pojawiają się bakterie w środowisku rany, proces regeneracji ulega zaburzeniu. Obecność drobnoustrojów prowadzi do nadmiernej produkcji proteazy, nadmiar proteazy produkowanej przez komórki zatrzymuje proces regeneracji na etapie stanu zapalnego. Jeżeli drobnoustroje

nie zostaną usunięte ze środowiska rany, powstawanie wysięku będzie kontynuowane, co wywoła w komórkach nadmierną produkcję proteazy, która może prowadzić do powstawania ran gojących się od kilku dni do kilku miesięcy a nawet lat. Dlatego tak istotne jest modyfikowanie materiału o związki chemiczne lub cząstki eliminujące drobnoustroje ze środowiska rany. Zadanie to nie należy do łatwych ponieważ na zakażenia szczególnie narażone są rany poddane operacjom chirurgicznym, rany w których obecne są zanieczyszczenia, owrzodzenia, odleżyny oraz rany z rozległym i głębokim zniszczeniem tkanek jakie powstają podczas oparzeń [3-16]. Dodatkowym utrudnieniem w walce z drobnoustrojami pojawiającymi się w ranach jest coraz częstsze pojawianie się bakterii lekoopornych, których zwalczanie ze względu na ich antybiotykową odporność jest znacząco utrudnione. Zdolność bakterii do uodparniania się na antybiotyki, może prowadzić do powstania szczepów odpornych na wszystkie dotychczas stosowane antybiotyki stosowane w leczeniu, których w ostatnich latach przybywa. Przykładem „superbakterii”, tj. bakterii całkowicie odpornej na wszystkie dotychczas stosowane antybiotyki, a jest ich ponad 150, jest bakteria *Klebsiella pneumoniae* (pałeczka zapalenia płuc) [17]. Superbakterie niosą za sobą ryzyko wywołania globalnej pandemii, ryzyko to związane jest ze zdolnością wymiany informacji DNA (kwas dezoksyrybonukleinowy) między bakteriami różnego szczepu. Wymiana DNA między szczepem superbakterii odpornej na stosowane antybiotyki, a szczepem bakterii występującym w środowisku naturalnym jaką jest bakterią *Escherichia coli*, może prowadzić do powstania zmian na poziomie biochemii komórkowej *Escherichia coli* uodparniając ją na dotychczas skuteczne wobec niej antybiotyki [18].

W celu wymiany lub uzupełnienia narządów lub tkanek, w tym kości usuniętych w wyniku zabiegów operacyjnych w następstwie różnych schorzeń i wypadków, bardzo często stosowane są implanty. Wszczepialne urządzenia biomedyczne są obecnie łącznie uważane za medyczne implanty bioniczne, gdzie jako bionikę rozumie się wytwarzanie i badanie systemów biologicznych, w celu opracowania i wdrożenia sztucznych systemów inżynierskich, które mogą odtwarzać utracone funkcje systemów biologicznych [19]. Ogólnie, medyczne implanty bioniczne obejmują liczne rozwiązania dotyczące usuwania różnych dysfunkcji ludzkiego organizmu, m.in. implanty układu sercowo-naczyniowego (stenty, protezy naczyniowe, zastawki serca, rozruszniki serca, defibrylatory), implanty układu pokarmowego, urządzenia neuronowe (implanty i protezy neuronalne do centralnego (CNS) i obwodowego układu nerwowego (PNS), ślimaka, siatkówki, protezy ortopedyczne (przeszczepy kostne, płytki

kostne, pletwy i urządzenia łączące i stabilizujące, w tym śruby aplikowane w obszarach kostek, kolan i rąk, pręty i szpilki do stabilizacji złamań kończyn), śruby i płyty w rekonstrukcjach czaszkowo-szczękowo-twarzowych, implanty dentystyczne. W różnych, wymienionych integralnych obszarach wymagane jest zróżnicowane podejście metodyczne, zastosowanie różnych materiałów i technologii oraz klinicznych metod aplikacyjnych, dotyczących uzupełnienia ubytków kostnych, chrząstek stawowych, przełyku i/lub naczyń krwionośnych, uzupełnień stomatologicznych i skóry oraz innych organów i tkanek.

Wykonane badania foresightowe wskazują, że globalny rynek zdefiniowanych uprzednio medycznych implantów bionicznych w latach 2012-2017 wzrośnie o 7,1% (przy przewidywanej skumulowanej rocznej stopie wzrostu (CAGR)), osiągając w 2017 roku wartość 1,782 mld USD [20]. Wśród podstawowych przyczyn takiej dynamiki wzrostu wskazuje się m.in. wzrost nakładów na opiekę zdrowotną, rozwój nowoczesnych technologii medycznych wobec zdecydowaną poprawę stanu i możliwości diagnozowania różnych schorzeń, jak również robotyzację i komputeryzację wielu procedur medycznych, umożliwiających skuteczne leczenie wielu chorób, niemożliwych do leczenia nawet jeszcze przed kilku laty. Dynamika wzrostu wspomnianych rynków wynika także ze wzrostu zachorowalności na różne choroby w tym choroby cywilizacyjne m.in. nowotwory złośliwe [1, 21] choroby układu krążenia i związane ze starzeniem się społeczeństw, w tym geriatryczne zapalenia stawów oraz osteoporoza, a także drastyczne zwiększanie się uszkodzeń ciał w wyniku wypadków komunikacyjnych, m.in. wobec stale zwiększającej się liczby samochodów, a wreszcie rozwój sportu, w tym masowego i ogromna liczba wypadków związanych z masowym uprawianiem jego różnych dyscyplin. Spowodowana przez to utrata lub uszkodzenie narządów lub tkanek w wyniku ubytków pourazowych, poresekcyjnych, jak również powstających w wyniku operacyjnego leczenia guzów nowotworowych lub procesów zapalnych oraz w wyniku innych schorzeń powoduje konieczność, a zarazem obecnie często daje możliwość, wymiany lub uzupełnienia tych narządów lub tkanek, w celu zapobiegania biologicznej i społecznej degradacji pacjentów i przywracania im ich funkcji życiowych, normalnych lub akceptowalnie zbliżonych do normalnych. Dokonania współczesnej implantologii, dzięki osiągnięciom lekarzy i inżynierów, wielu ludziom w skali globalnej dały szansę na powrót do normalnych lub quasi-normalnych warunków funkcjonowania, a wielokrotnie wręcz do zdrowia i pełnej aktywności społecznej i zawodowej po przebytych ciężkich urazach bądź ubytkach, a także po przebyciu innych schorzeń. Stanowi to realną i zauważalną przesłankę do intensyfikacji badań

naukowych i prac wdrożeniowych, łączących aktywność m.in. w zakresie farmacji, bioinżynierii, biotechnologii, chemii, elektroniki i biofizyki, co nieuchronnie prowadzi do wzrostu nakładów przemysłowych na inwestycje związane z pozyskiwaniem know-how oraz rozbudową środków wytwórczych w tym zakresie.

2.2. Implanty oraz materiały stosowane w implantologii

Implantami są wszelkie przyrządy medyczne wykonane z jednego lub więcej biomateriałów, które mogą być umieszczone częściowo lub całkowicie pod powierzchnią nabłonka, i które mogą pozostać przez dłuższy okres w organizmie [22, 23].

Można wyróżnić:

- implanty chirurgiczne (umieszczane w zamierzonym miejscu w organizmie metodami chirurgicznymi),
- inne implanty (przykładowo igły, dreny, sączki),
- protezy implantowane (protezy wewnętrzne lub endoprotezy fizycznie zastępujące organ lub tkankę),
- sztuczne organy (zastępujące w całości lub częściowo funkcję jednego z głównych organów, często w sposób nie anatomiczny) [24].

Ze względu na medyczne zastosowanie lub konkretne umiejscowienie w organizmie wśród implantów można wydzielić:

- ortopedyczne (stosowane by wspomóc, zastąpić lub uzupełnić tymczasowo lub na stałe kość, chrząstkę, więzadła, ścięgna lub powiązane z nimi tkanki),
- ustne (stosowane w celu poprawy, zwiększenia lub zastąpienia jakiegokolwiek twardej lub miękkiej tkanki w jamie ustnej, obejmujące szczękę, żuchwę lub staw skroniowo-żuchwowy),
- czaszkowo-twarzowe (stosowane w celu poprawienia lub zastąpienia tkanek twardych lub miękkich w obszarze czaszkowo-twarzowym z wyjątkiem mózgu, oczu i ucha wewnętrznego),
- dentystryczne (stosowane do uzupełniania ubytków zębów) [25].

Wymagania, jakie ma spełnić materiał i konstrukcja implantu definiowane są w zależności od funkcji w organizmie człowieka, jaką ma implant. Korona stomatologiczna musi na przykład mieć dużą odporność na ścieranie, dużą wytrzymałość na ściskanie oraz wysoką twardość. Natomiast endoproteza stawu biodrowego powinna charakteryzować się dużą wytrzymałością na zginanie, dużą wytrzymałością zmęczeniową oraz ciągliwością. Ważnym elementem charakterystyki implantu jest również biotolerancja materiału, z jakiego został wykonany.

Biotolerancję (biokompatybilność) definiuje się jako zgodność biologiczną. Oznacza to harmonię interakcji w obrębie materii żywej. Biomateriał o optymalnej biotolerancji nie wywołuje ostrych lub chronicznych reakcji lub stanu zapalnego i nie przeszkadza należytemu

różnicowaniu amputowanego otoczenia tkanek. Najczęściej pojęcie biotolerancji wiąże się z inicjowaniem reakcji toksykologicznych i immunologicznych oraz efektami drażnienia tkanek [23].

Z wymienionych powodów projekt implantu uwzględniać powinien liczne czynniki obejmujące:

- własności mechaniczne:
 - wytrzymałość na rozciąganie i ściskanie,
 - wytrzymałość na zginanie i skręcanie,
 - wytrzymałość zmęczeniową,
 - twardość,
 - odporność na ścieranie,
 - sztywność,
 - ciągliwość,
- biotolerancję:
 - nietoksyczność,
 - obojętność immunologiczną,
 - odporność korozyjną w środowisku tkanek i płynów ustrojowych,
 - brak tendencji do tworzenia zakrzepów,
 - zachowanie pierwotnych własności mechanicznych/fizycznych/chemicznych podczas eksploatacji,
- technologiczność:
 - zapewnienie wymaganej jakości,
 - dotrzymanie sterylności podczas procesu wytwarzania oraz przechowywania,
 - zapewnienie żądanej jakości powierzchni,
 - koszt wytworzenia.

Projektowanie implantu obejmuje [22, 24]:

- ustalenie cech geometrycznych implantu na podstawie warunków anatomiczno-fizjologicznych oraz techniki operacyjnej lub zabiegowej przewidywanej do zastosowania, analizę cech wymiarowych implantów odpowiadających cechom antropometrycznym populacji pacjentów dorosłych, dzieci, mężczyzn, kobiet, o różnym wieku i budowie ciała,

- analizę stanu naprężeń i przemieszczeń w układzie implant-tkanki,
- dobór materiału implantu spełniającego kryterium własności mechanicznych i biofizycznych, reakcji odczynowych i immunologicznych oraz biotolerancji w środowisku tkanek i płynów ustrojowych,
- opracowanie dokumentacji konstrukcyjnej, technologicznej i odbiorowej.

Biomateriałem (materiałem biomedycznym) jest każda inna substancja niż lek albo kombinacja substancji syntetycznych lub naturalnych, która może być użyta w dowolnym czasie, a której zadaniem jest uzupełnianie lub zastąpienie tkanek narządu lub jego części w celu spełnienia ich funkcji [26].

Biomateriały cechują się wymaganą biotolerancją (biokompatybilnością), czyli zgodnością biologiczną i harmonią interakcji z żywą materią. Biomateriały o wymaganej biotolerancji po wprowadzeniu do organizmu nie wywołują ostrych lub chronicznych reakcji albo stanu zapalnego otaczających tkanek.

W tabelicy 2.1 podano ważniejsze kryteria jakości biomateriałów, obejmujące zespół wymagań stawianych implantom. W tablicach 2.2-2.4 przedstawiono odpowiednio skład chemiczny i własności biomechaniczne typowych stopów przeznaczonych na implanty oraz rodzaje implantów wytwarzanych z niektórych stali Cr-Ni-Mo.

Tablica 2.1. Przykładowe wymagania stawiane materiałom stosowanym na implanty chirurgiczne (według H.J. Racka) [24]

Własności mechaniczne	Własności technologiczne	Biotolerancja
<ul style="list-style-type: none"> • wytrzymałość na rozciąganie, • granica plastyczności, • wytrzymałość zmęczeniowa, • twardość, • odporność na ścieranie, • sztywność, • plastyczność (wydłużenie, przewężenie), • ciągliwość (odporność na kruche pękanie). 	<ul style="list-style-type: none"> • zapewnienie założonej jakości biomateriału, • zapewnienie wymaganej jakości powierzchni i implantu, • przydatność materiału i produktu do efektywnej sterylizacji, • minimalne koszty wytwarzania. 	<ul style="list-style-type: none"> • reakcje z tkankami i płynami ustrojowymi, • stabilność własności: <ul style="list-style-type: none"> ▪ mechanicznych, ▪ fizycznych, ▪ chemicznych, • degradacja związana z: <ul style="list-style-type: none"> ▪ uszkodzeniami lokalnymi implantu (zmiany szkodliwe), ▪ systematycznymi efektami korozyjnymi (szkodliwe uszkodzenia).

Tablica 2.2. Porównanie składu chemicznego stali przeznaczonych na implanty chirurgiczne z innymi stopami metali stosowanymi do tego celu [24]

Podstawowy pierwiastek	Oznaczenie stopu, norma	Stężenie masowe pierwiastków ¹⁾ , %										
		C	Si	Mn	Fe	Co	Cr	Mo	Ni	V	Ti	inne
Żelazo	X2CrNiMo18-14-3 (D) PN-ISO 5832-1	≤0,03	≤1	≤2	reszta	–	17-19	2,3-3,5	13-15	–	–	Cu ≤0,5
Tytan	Ti ²⁾ ISO 5832-2	≤0,1	–	–	≤0,5	–	–	–	–	–	reszta	–
	TiAl6V4 ²⁾ ISO 5832-3	≤0,08	–	–	≤0,3	–	–	–	–	3,5-4,5	reszta	Al: 5,5-6,7
Kobalt	CoCr28Mo6 ISO 5832-4	≤0,35	≤1	≤1	≤1	reszta	26,5-30	4,5-7	2,5	–	–	–
	CoCr20W15Ni10 ISO 5832-5	≤0,15	≤1	≤2	≤3	reszta	19-21	–	9-11	–	–	W: 14-16
	CoNi35Cr20Mo10 ISO 5832-6	≤0,025	≤0,15	≤0,15	≤1	reszta	19-21	9-10,5	33-37	–	≤1	–

¹⁾ P ≤0,015 do ≤0,025, S ≤0,01 do ≤0,015; ²⁾ N₂ ≤0,05, O₂ ≤0,05, H₂ ≤0,015.

Tablica 2.3. Porównanie własności mechanicznych stali przeznaczonych na implanty chirurgiczne oraz innych stopów metali stosowanych do tego celu [24]

Oznaczenie stopu, norma	Stan	Wytrzymałość na rozciąganie R_m min., MPa	Granica plastyczności $R_{p0,2}$ min., MPa	Wydłużenie A min., %	Moduł Younga E , GPa	Wytrzymałość zmęczeniowa Z_{go} , MPa
X2CrNiMo18-14-3 (D) PN-ISO 5832-1	przesycony	490	190	40	200	240
	po obróbce plastycznej na zimno	860	690	12	200	410
Ti ISO 5832-2	przesycony	240-550	170-440	24-15	110	250
	po obróbce plastycznej na zimno	680	52	10		400
TiAl6V4 ISO 5832-3	przesycony	860	1000	10	220	500
CoCr28Mo6 ISO 5832-4	odlewany	665	450	8	200	250
CoCr20W15Ni10 ISO 5832-5	odlewany	860	310	10	220	200
CoNi35Cr20Mo10 ISO 5832-6	przesycony	800	300	40	220	250
	po obróbce plastycznej	1200	1000	10	220	500

Tablica 2.4. Rodzaje implantów wytwarzanych z niektórych stali Cr-Ni-Mo [24]

Rodzaj implantów		Igły śródszpikowe		Płytki kostne		Śruby kostne, nakrętki do śrub kostnych	Groty i druty kostne	Igły kostne okrągłe	Igły udowe	Druty kostne	Endoprotezy	
		taśma zimno walcowana	taśma zimno walcowana szeroka, blacha	profile specjalne	taśma zimno walcowana							taśma zimno walcowana szeroka, blacha
Postać materiału												
Znak stali	Stan materiału	taśma zimno walcowana	taśma zimno walcowana szeroka, blacha	profile specjalne	taśma zimno walcowana	taśma zimno walcowana szeroka, blacha	pręty walcowane h9 Ø 8 mm	pręty walcowane Ø 8 mm	pręty walcowane na gorąco	pręty walcowane h11	drut	pręty walcowane h11
X2CrNiMoN18-13-3 X2CrNiMo18-15-3	przesycony	○	○	●	○	○	●	●	●	○	○	●
	walcowany, R_m 860 MPa	●	●	○	○	○	○	○	●	○	●	●
	na zamówienie	●	●	●	●	●	○	○	●	●	○	●
X2CrNiMo18-15-4	walcowany, R_m 860 MPa	●	●	○	●	●	○	○	●	○	●	○
	na zamówienie	●	●	○	●	●	○	○	●	○	●	○
X2CrNiMnMoN22-13-6	przesycony	●	●	●	●	●	●	●	○	●	●	●
	na zamówienie	●	●	●	●	●	○	○	●	○	●	●

○ możliwe zastosowanie, ● nie stosowane.

Biomateriały podzielić można na następujące grupy [24, 25]:

- metalowe,
- ceramiczne,
- węglowe,
- polimerowe,
- kompozytowe.

Wśród biomateriałów metalowych można z kolei wydzielić następujące grupy [24]:

- stale Cr-Ni-Mo, o strukturze austenitycznej,
- tytan i jego stopy,

- stopy na osnowie kobaltu,
- tantal, niob i ich stopy,
- metale szlachetne.

Biomateriały ceramiczne cechują się odmiennymi własnościami od biomateriałów metalowych, do których można zaliczyć [22]:

- porowatość, umożliwiającą wrastanie tkanek i trwalsze połączenie tkanek z implantami,
- większą odporność na ścieranie oraz wytrzymałość na ściskanie,
- większą odporność korozyjną w środowisku tkanek i płynów ustrojowych,
- większą biotolerancję.

Wśród biomateriałów ceramicznych dla potrzeb chirurgii można wyróżnić trzy kategorie materiałów:

- resorbowanych w organizmie,
- z kontrolowaną reaktywnością powierzchniową,
- obojętne.

Biomateriały ceramiczne resorbowane w organizmie złożone są z hydroksyapatytów i pokrewnych fosforanów wapniowych wytworzonych sztucznie, biorących udział w metabolizmie i przechodzących do tkanek. Ich skład chemiczny i fazowy są podobne do faz nieorganicznych występujących w kościach i zębach, są biologicznie aktywne i cechują się największą możliwą biotolerancją.

Związki te mogą być wytwarzane sztucznie, jedną z podanych metod [22]:

- mokrą, polegającą na reakcjach zobojętniania kwasów i zasad, zachodzących w wodnych roztworach lub zawiesinach, przykładowo $\text{Ca}(\text{OH})_2, \text{H}_3\text{PO}_4$ lub soli wapniowych typu CaCl_2 i $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ fosforem, np. $\text{Na}_2\text{HPO}_4, (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, w wyniku czego powstają proszki amorficzne lub drobnokrystaliczne,
- suchą, w której w stanie stałym w temperaturze wyższej od 900°C zachodzą reakcje $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i CaCO_3 lub $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ i CaCO_3 , a w wyniku tego powstaje drobnoziarnisty hydroksyapatyt z dużym udziałem fazy krystalicznej,
- hydrotermalną, w której z CaHPO_4 lub $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, w temperaturze $120\text{-}300^\circ\text{C}$ i przy ciśnieniu pary wodnej $0,2\text{-}8,5$ MPa powstają duże kryształy (do 10 mm),
- topnikową, w której między mieszaniną sproszkowanego wapna i fosforu oraz topników $\text{B}_2\text{O}_3, \text{CaF}_2$ i CaCl_2 z udziałem fazy ciekłej powstają duże kryształy apatytu,

- zol-żel, w której w wyniku hydrolizy alkoholanów lub soli i następnej kondensacji powstają proszki, włókna lub cienkie warstwy hydroksyapatytu.

W celu dalszego zbliżenia struktury chemicznej i fazowej syntetycznego hydroksyapatytu do właściwej dla kości i zębów, wprowadza się do nich CO_3^{2-} , Mg^{2+} , Na^+ lub SiO_2 .

Na strukturę tych materiałów wpływ wywierają metody i warunki technologiczne. Własności biomechaniczne zależą z kolei od gęstości, porowatości i wielkości ziarn [24].

Hydroksyapatyty mogą być łączone w kompozyty z kolagenem lub polimerami biodegradowalnymi, także mogą być nanoszone głównie metodą napyłania plazmowego, ale również elektroforezy, CVD i PVD, rozpyłania jonowego i osadzania elektrochemicznego, na powierzchni implantów długotrwałych z biomateriałów metalowych, np. endoprotez stawowych lub wszczepów stomatologicznych.

Biomateriały ceramiczne hydroksyapatytowe przez strefę międzywarstwową łączą się z tkanką kostną. Stosowane są do uzupełniania ubytków miazgi zębowej i szkliwa, ubytków kostnych w szczęce i żuchwie lub dnie oczodołu, a w postaci warstw powierzchniowych na długotrwałe endoprotezy stawowe i wszczepy stomatologiczne.

Również atrakcyjne własności fosforów metali przejściowych układu okresowego pierwiastków, szczególnie ich odporność chemiczna, stanowią argument za podjęciem badań nad możliwością zastosowania ich w obszarach biomedycznych.

Do biomateriałów ceramicznych z kontrolowaną reaktywnością w tkankach należą bioszklą i materiały bioszklano-ceramiczne, spełniające następujące warunki [22, 24]:

- reaktywne powierzchnie zawierają Ca^{2+} i PO_4^{3-} i cechują się odczynem alkalicznym,
- stężenia pierwiastków mieszczą się w zakresie zapewniającym wymaganą biotolerancję i reaktywność,
- połączenia biomateriał-szkło wykazują wymagane własności mechaniczne.

Szkło sodowo-wapniowe zawierające $45\%\text{SiO}_2$ - $(23-25)\%\text{CaO}$ - $(24-25)\%\text{Na}_2\text{O}$ - $(1-10)\%\text{P}_2\text{O}_5$ oraz modyfikatory ZnO , B_2O_3 i CaF_2 , wiąże się z kością w ciągu 30 dni. Szklą o małej reaktywności, nie tworzą z kością wiązań. Bioszklą mogą cechować się dużą reaktywnością, lub wiązać się z kością nie tworząc właściwych struktur bioszkieł.

W wyniku hydrolizy zachodzącej na powierzchni materiału implantowanego, jony wapnia i fosforu dyfundują do substancji biologicznej. Jony te przyspieszając wytwarzanie się tkanki kostnej na styku między biomateriałem a kością, pomagają w zrośnięciu się implantu z tkanką.

Bioszklą w kontakcie z tkanką kostną zaczynają reagować szybko. Już po kilku godzinach jony H^+ zastępują jony Na^+ , które dyfundują do płynu tkankowego. Na powierzchni implantu pokrytego bioszklą tworzy się ciągła warstwa żelu, na którym rozpoczyna się akumulowanie jonów wapnia i fosforanowych, z kolei powstawanie wiązań chemicznych z żelowatą krzemionką, a następnie na powierzchni żelu krystalizacja apatytu o zdefektowanej strukturze hydroksyapatytu węglanowego, zbliżonej do naturalnego apatytu kostnego. Stosowane są bioszklą o zróżnicowanym składzie chemicznym, w których głównymi składnikami są SiO_2 , CaO oraz Na_2O , a dodatkami mogą być P_2O_5 , F_2 , MgO , CaF_2 , $CaSiO_3$, TiO_2 , ZrO_2 a także srebro, węgiel krzemu lub włókna metalowe, co umożliwia kształtowanie ich własności fizycznych i chemicznych, a zwłaszcza ich biologicznej aktywności [22].

Regulacja składu chemicznego umożliwia także regulowanie ich rozpuszczalności, a zatem także szybkości działania. Te biomateriały są stosowane na pokrycia implantów metalowych w ortopedii i stomatologii, oraz do uzupełniania ubytków kostnych, w tym na implanty do rekonstrukcji ucha środkowego, do klejenia kości oraz w stomatologii, zamiast porcelany. Pewną odmianą bioceramiki aktywnej są szkła jonomerowe, utwardzające się pod wpływem światła, zawierające szkło fluorkowo-glinokrzemianowe $CaF_2-Al_2O_3-SiO_2$ z dodatkiem Na_3AlF_6 , NaF i niekiedy $AlPO_4$. Ta grupa biomateriałów jest stale rozwijana [24].

Biomateriały ceramiczne obojętne wykazują minimalne zmiany chemiczne w kontakcie z tkankami i płynami fizjologicznymi, a implanty z tych materiałów są otaczane delikatną kilkumikronową włóknistą tkanką, która nie łączy się chemicznie z tymi materiałami. Do tej grupy biomateriałów zaliczają się Al_2O_3 , węgle pirolityczne, azotek lub oksyazotek krzemu, węgiel krzemu, tlenki cyrkonu, tytanu i magnezu oraz spinele $MgAl_2O_4$ i $Ca_2Al_2O_4$. Spośród tych materiałów najbardziej przydatny jest tlenek aluminium (biokorund), cechujący się wysoką wytrzymałością na ściskanie, zginanie i ścieranie, które to z kolei własności zależą od jakości zastosowanego surowca oraz technologii [22].

Biomateriały węglowe mają perspektywiczne znaczenie w chirurgii, gdyż cechują się:

- dobrą biotolerancją,
- atrombogennością i dobrą hemozgodnością,
- dobrymi własnościami fizykochemicznymi,
- odpornością na promieniowanie jonizujące i niejonizujące.

Biomateriały węglowe można podzielić na [22]:

- biomateriały kompozytowe:
 - włókna węglowe,
 - biomateriały kompozytowe węgiel-węgiel,
- warstwy węglowe:
 - diamentowe, zawierające diament nanokrystaliczny, tetraedryczny i amorficzny o rozmiarach ziarn nieprzekraczających kilkudziesięciu nanometrów,
 - diamentopodobne, które są mieszaniną amorficznego i nanokrystalicznego węgla z przeważającym udziałem diamentu o sieci romboedrycznej lub regularnej, zawierającego wodór z małym udziałem grafitu, karbinu α i β (α – zawiera wiązanie acetylenowe $-C \equiv C-$, β – zawiera wiązania kumulene $=C=C=$).

Tablica 2.5. Porównanie własności biomateriałów węglowych z metalowymi i kompozytowymi [24]

Rodzaj biomateriału	Gęstość ρ , g/cm ³	Wytrzymałość na rozciąganie R_m , MPa	Moduł sprężystości wzdłużnej E , GPa	Wytrzymałość właściwa R_m/ρ , MPa·m ³ /kg	Sztwność właściwa E/ρ , MPa·m ³ /kg
Węgiel szklisty	1,4	124	32	0,09	22,8
Wysokowytrzymałe włókna węgla	1,74	2900	215	1,66	123,6
Włókna węglowe o wysokim module sprężystości	1,95	2200	390	1,12	200
Biomateriały kompozytowe węgiel-węgiel (1D)	1,45	1350	175	0,93	120
Biomateriały kompozytowe węgiel-węgiel (3D)	1,85	250	90	0,14	48,5
Biomateriały kompozytowe włókno węglowe-osnowa epoksydowa (1D)	1,56	1400	130	0,9	83
Biomateriały kompozytowe włókno węglowe-osnowa epoksydowa (1D) (izotropowe)	1,56	450	50	0,26	32
Włókna szklane	2,5	1725	70	0,69	28
Biomateriały kompozytowe włókno szklane-osnowa (1D)	1,9	1400	42	0,75	22,1
Stopy kobaltu	7,7	1200	220	0,12	28,5
Stopy tytanu	45	1000	120	0,1	26,6
Stal Cr-Ni-Mo	7,8	110	210	0,14	26,9

Włókna węglowe, biomateriały kompozytowe wzmacniane włóknami węglowymi o osnowie węglowej i węgiel szklisty cechują się dobrą biotolerancją i charakteryzują się korzystnym zespołem własności mechanicznych co decyduje o ich zastosowaniu na endoprotezy, elementy do zespalania odłamów kostnych i uzębienia, sztuczne zastawki serca i protezy więzadeł oraz do operacji okołostawowych. Porównanie własności biomateriałów węglowych z metalowymi i kompozytowymi przedstawiono w tablicy 2.5.

Oprócz biomateriałów kompozytowych czysto węglowych zastosowanie znajdują także biomateriały kompozytowe o osnowie polimerowej wzmacnianej włóknami węglowymi.

Biomateriały polimerowe można podzielić na:

- naturalne,
- syntetyczne.

Biomateriały polimerowe naturalne, tzn. białka (kolagen, fibrynogen, jedwab, wszczepy tkankowe) i wielocukry (celuloza, chityna), są wytwarzane w organizmach żywych jako składniki strukturalne tkanek.

Biomateriały polimerowe syntetyczne znajdują szerokie zastosowanie. Zastosowanie biomateriałów polimerowych syntetycznych przedstawiono w tablicy 2.6, w tablicy 2.7 podano podstawowe własności fizykochemiczne tej grupy biomateriałów a w tablicy 2.8. porównano własności różnych materiałów polimerowych stosowanych w medycynie.

Tablica 2.6. Zastosowanie biomateriałów polimerowych syntetycznych [24]

Rodzaj biomateriału polimerowego syntetycznego	Zastosowanie
Silikony SI	chirurgia plastyczna i rekonstrukcyjna
Politetrafluoroetylen PTFE	protezy naczyniowe, nici chirurgiczne
Poliuretany PUR	elementy sztucznego serca, protezy naczyniowe o małym przekroju
Poli(metakrylan metylu) PMMA	chirurgia plastyczna i rekonstrukcyjna, cewniki, główki i panewki endoprotez stawowych
Polietylen PE	nici i siatki chirurgiczne
Polipropylen PP	nici i siatki chirurgiczne, protezy naczyniowe
Poli(tereftalan etylenu) PET	ortopedia, soczewki wewnątrzgałkowe
Poliamidy PA	nici i siatki chirurgiczne

Tablica 2.7. Własności fizykochemiczne biomateriałów polimerowych syntetycznych stosowanych na implanty [24]

Rodzaj biomateriału polimerowego	Wytrzymałość na rozciąganie R_m , MPa	Wydłużenie A , %	Twardość według skali Shore'a	Gęstość, g/cm ³	Absorbacja wody, %
Silikony SI	2,4-7	100-700	A 15-A 65	1-1,15	0,1
Politetrafluoroetylen PTFE	13-34	200-400	D 50-D 65	2,2	0
Poliuretany PUR	1-69	10-1000	A 10-D 90	1,05-15	0,6-0,7
Polietylen PE	4-38	20-1000	D 41-D 70	0,91-0,97	0,001
Polipropylen PP	31-210	60-1000	D 74-D 90	0,91	0,05
Poli(metakrytan metylu) PMMA	55-85	2-7	M 60-M 100	1,2	0,1-0,4
Poli(tereftalan etylu) PET	17-280	50-120	-	2,2	0,8
Poliamidy PA	63-126	250-550	-	1,14	2,5-7,5

Tablica 2.8. Porównanie własności biomateriałów polimerowych [24]

Materiały polimerowe	Wytrzymałość na skręcanie	Moduł sprężystości	Zmęczenie	Smarność	Odporność na wodę	Absorbacja wody	Biostabilność
Akryliki	☉	☉	☉	☉	☉	☉	○
Epoksydy	☉	☉	○	☉	☉	☉	○
Fluorowęglany	☉	☉	☉	○	☉	☉	○
Hydrozele	☉	☉	☉	○	○	○	☉
Poliacetale	☉	☉	○	☉	☉	☉	○
Poliamidy	☉	☉	☉	☉	☉	○	☉
Poliwęglany	☉	☉	☉	☉	☉	☉	○
Poliestry	☉	☉	○	☉	☉	☉	○
Polieteroketony	☉	☉	○	☉	☉	☉	○
Poliimidy	☉	☉	○	☉	☉	☉	○
Poliolefiny	☉	☉	☉	☉	☉	☉	○/☉
Poliolefiny elastomerowe	☉	☉	○	☉	☉	☉	○/☉
Poliolefiny krystaliczne	☉	☉	○	☉	☉	☉	○
Polisulfony	☉	☉	○	☉	☉	☉	○/☉
Poliuretany	☉	☉	○	☉	○	☉	☉/☉
Polichlorek winylu	☉	☉	☉	☉	☉	☉	○
Silikony	☉	☉	☉	☉	☉	☉	○

Oznaczenia: ○ – wysoki, ☉ – średni, ☉ – niski, ☉ – zmienne

W celu zapewnienia właściwej współpracy implantów ze środowiskiem tkankowym o cechach piezoelektryków i półprzewodników organicznych, ich własności fizykochemiczne mogą być regulowane przez nanoszenie na implantach metalowych powłok [22]:

- bioceramicznych, zawierających Al_2O_3 , ale także kompozycje $CaO-Al_2O_3$, $CaO-TiO_2$, $CaO-ZrO_2$, nanoszonych na powierzchnie endoprotez ze stopów kobaltu lub tytanu metodami metalurgii proszków, implantacji jonowej lub napylenia plazmowego,
- kompozytowych, ze szkła i biomateriałów ceramicznych powierzchniowo aktywnych, zawierających $Na_2O-CaO-SiO_2$ z udziałem P_2O_5 , CaF_2 , MgF_2 lub Ta_2O_5/TiO_2 , resorbowanych w sposób kontrolowany przez tkanki, nanoszonych na powierzchnie endoprotez,
- szklistych, zawierających węgiel, silikonowych lub innych, np. ZrO_2 , SiN_4 , $BaTiO_2$, stosowanych do pokrywania powierzchni endoprotez,
- resorbowanych w organizmie, zawierających uwodniony apatyt o strukturze krystalicznej lub amorficznej ($CaHPO_4 \cdot 2H_2O$, $CaHPO_4$, $Ca_4H(PO_4)_3 \cdot 2,5H_2O$, $Ca_3(PO_4)_2(OH)$, $Ca_5(PO_4)_3(OH)$, $Ca_4(PO_4)_2O$) o bardzo dobrej biotolerancji, nanoszonych na implanty krótkotrwale i rozpuszczających się w płynach ustrojowych, w wyniku czego następuje aktywizacja zrостu kostnego.

Tablica 2.9. Biomateriały kompozytowe nanoszone na podłoże biomateriałów metalowych [24]

Osnowa	Elementy wzmacniające
Typ 1. Biomateriały kompozytowe prawie obojętne	
Polisulfon, węgiel, polietylen, poli(metakrylan metylu)	Włókna
Węgiel	SiC
Żywica epoksydowa	Al_2O_3 i stal austenityczna
Typ 2. Biomateriały kompozytowe porowate obojętne	
Hydroksyapatyt	Poli L-laktyd
Typ 3. Biomateriały kompozytowe bioaktywne	
Bioszkło	Włókna ze stali austenitycznej, włókna tytanowe
Kolagen, polietylen	Hydroksyapatyt
Poli(metakrylan metylu)	Fosforanowo-krzemianowe szkła apatytowe
Polimer	Szkło fosforanowe
Hydroksyapatyt	Żelatyna resocynowo-formaldehydowa
AW/ceramika szklana	Hartowane szkło ZrO_2
Typ 4. Biomateriały kompozytowe resorbowane	
PLA/PGA	PLS/PGA włókna, hydroksyapatyt
Polihydroksybuturat	Hydroksyapatyt

Powłoki ceramiczne i szkliste zwiększają także odporność na zużycie trybologiczne, oraz wpływają na zmniejszenie współczynnika tarcia.

Biomateriały do długotrwałego użytkowania w chirurgii kostnej, protetyce stomatologicznej i kardiochirurgii wytwarzane są jako kompozytowe, w których elementem nośnym implantu jest biomateriał metalowy lub polimerowy przenoszący obciążenia mechaniczne, a powierzchnia pokrywana jest biomateriałem kompozytowym (tabl. 2.9).

Implanty ze stali Cr-Ni-Mo oraz stopów Co z warstwami pasywno-diamantowymi, są stosowane w chirurgii rekonstrukcyjnej i zabiegowej. Cechują się dobrą biotolerancją minimalizującą powikłania odczynowe, dobrą odpornością korozyjną i obojętnością względem środowiska tkankowego. Prowadzone są z dobrym skutkiem badania nad wytwarzaniem warstw węglowych na gwoździach śródszpikowych ze stali Cr-Ni-Mo X2CrNiMo17-13 (AISI 316L) [27, 28]. Godnymi rozważenia do zastosowania jako powłoki biomedyczne są dyfuzyjne warstwy fosforów metali przejściowych ze względu na swoje własności korozyjne [29].

Nie sposób dziś przecenić dokonania współczesnej implantologii, gdzie odwaga, wyobraźnia i wiedza lekarzy wspieranych przez dokonania inżynierów, wielu ludziom w skali globalnej dały szansę na powrót do normalnych lub quasi-normalnych warunków funkcjonowania, a wielokrotnie wręcz do zdrowia po przebytych ciężkich urazach bądź ubytkach, a także po przebyciu innych schorzeń. Jednym z wyzwań medycyny regeneracyjnej jest odbudowa odcinkowych ubytków kostnych i to zarówno w chirurgii szczękowo-twarzowej, stomatologii regeneracyjnej, laryngologii, w tym otolaryngologii, ortopedii i traumatologii, jak i uzupełnienia tkanek miękkich, np. w przypadku protezowania/ implantowania przełyku oraz naczyń krwionośnych, w których kikuty m.in. kostne lub narządowe nie mają ze sobą kontaktu. Dotyczy to zarówno ubytków pourazowych, jak również poresekcyjnych, powstających w wyniku operacyjnego leczenia guzów nowotworowych lub procesów zapalnych.

2.3. Inżynieria tkankowa jako techniczne wspomaganie medycyny regeneracyjnej

Techniczne wspomaganie medycyny regeneracyjnej stanowi inżynieria tkankowa, dynamicznie rozwijająca się od połowy lat 90. ubiegłego wieku i umożliwiająca wykorzystanie osiągnięć nauk o życiu oraz nowoczesnych technologii do rozwoju materiałów biologicznych mogących przywrócić, utrzymać bądź usprawnić funkcje poszczególnych tkanek lub narządów [30]. Aktualne sposoby wymiany narządów i tkanek, głównie wykorzystują autografy, alloprzeszczypty lub urządzenia metalowe lub wykonane z innych materiałów inżynierskich [31]. Oprócz wszczepialnych implantów, a właściwie zamiast nich, od kilku lat intensywnie rozwijanym kierunkiem są skafoldy tkankowe (j. ang.: scaffold) kości i tkanek w inżynierii tkankowej [19]. W samych USA rynek inżynierii tkankowej i regeneracyjnej medycyny wzrasta z 6,9 mld USD w 2009 roku do 32 mld USD w roku 2018 [32]. To świadczy o znaczeniu tych technologii we współczesnej medycynie oraz obszarach techniki ją wspomagających. O tym jak istotne znaczenie mają działania polegające na opracowywaniu nowoczesnych biomateriałów i jak wiele jest jeszcze do zrobienia w tym zakresie, świadczy problem transplantacji organów. Zastąpienie niebiodegradowalnych implantatów materiałami ulegającymi całkowitej resorpcji oddała konieczność wykonania ponownej operacji, będącej dyskomfortem dla pacjentów oraz dodatkowym obciążeniem dla finansów służby zdrowia. Bardzo duże zapotrzebowanie na różnego rodzaju organy, mała liczba dawców, konieczność przyjmowania leków po przeszczepie stały się „siłą napędową” inżynierii tkankowej, dzięki której istnieje możliwość wytworzenia narządów bez ryzyka odrzucenia po przeszczepie. Inżynieria tkankowa zajmuje się poszukiwaniem innowacyjnych sposobów odtworzenia naturalnej tkanki i stanowi alternatywne rozwiązanie do stosowanych obecnie konwencjonalnych metod leczenia. Naturalne skafoldy tkankowe ECM (j. ang.: extracellular matrix) to komponent organiczny bądź nieorganiczny, który połączony z komórkami tworzy tkankę. Skafold stanowi integralną część każdej tkanki, jest podporą dla komórek, nadaje tkankom sprężystość, elastyczność oraz wytrzymałość. ECM zbudowane jest ze składników białkowych (w tym głównie kolagenu typu I), polisacharydowych (jak kwas hialuronowy), jak również ze składników nieorganicznych (w tym hydroksyapatytu, będącego podstawowym budulcem tkanki kostnej).

Rozwój medycyny regeneracyjnej, po raz pierwszy wzmiankowanej w 1992 roku [33], jako stosunkowo nowego działu medycyny, którego celem jest leczenie za pomocą zastępowania komórek starych i chorych przez komórki młode, w tym metodami inżynierii tkankowej oraz terapii komórkami lub regeneracji organizmu za pomocą terapii genowej, stwarza liczne nowe wyzwania m.in. w zwalczaniu symptomów i skutków chorób, a nawet ich przyczyn [34-38]. Z kolei inżynieria tkankowa jest interdyscyplinarną dziedziną, która stosuje zasady inżynierii i nauk przyrodniczych w kierunku rozwoju substytutów biologicznych, przywracania, utrzymania lub poprawy funkcji tkanek lub całych narządów [23, 30] i polega na zrozumieniu zasad wzrostu tkanek i zastosowania tego do produkcji funkcjonalnej tkanki zastępczej do użytku klinicznego [39]. Pojęcie "inżynierii tkankowej" zostało wprowadzone w 1985 roku przez Y.C. Fung [40]. Inżynieria tkankowa, jako dyscyplina nauk technicznych wykorzystująca wiedzę medyczną oraz metody inżynierii materiałowej [41, 42], dynamicznie rozwijająca się od połowy lat 90. ubiegłego wieku, zajmuje się konstruowaniem i wytwarzaniem skafoldów, podtrzymujących rozwijające się tkanki, manipulacjami komórkami somatycznymi i macierzystymi, wpływaniem na warunki wzrostu tkanek oraz ich strukturę oraz utrzymaniem sprzyjających temu wzrostowi warunków fizykochemicznych otoczenia, w celu wytwarzania funkcjonalnych zamienników uszkodzonych tkanek lub całych narządów [41, 42].

Aktualne sposoby wymiany narządów i tkanek, głównie wykorzystują autografy, allo-przeszczypty lub urządzenia metalowe lub wykonane z innych materiałów inżynierskich [31]. Postęp naukowy w tym zakresie zapewnia unikatowe możliwości laboratoryjnego wytworzenia żywych komórek/tkanek z kombinacji zmodyfikowanej macierzy zewnątrzkomórkowej (j. ang.: engineered extracellular matrices "scaffolds"), komórek i aktywnych biologicznie cząsteczek. Stosowanie terapii opartych na żywych komórkach w medycynie, jest stosunkowo nową koncepcją, gdyż pierwszego udanego przeszczepu allogenicznego ludzkich krwiotwórczych komórek macierzystych dokonano dopiero w 1968 roku [43], co dzisiaj jest rutynową procedurą stosowaną klinicznie do regeneracji szpiku kostnego. Dwa dziesięciolecia później, komórki zastosowano do regeneracji tkanek szkieletowych [44], a dopiero później do innych zastosowań terapeutycznych [45]. Intensywny rozwój tej specjalności nastąpił w połowie lat dziewięćdziesiątych XX wieku, a dotychczas w praktyce klinicznej znalazły powszechne zastosowanie nowoczesne implanty skóry i tkanki chrzęstnej, a w ostatnim dziesięcioleciu następuje stały wzrost liczby prób klinicznych terapii opartych na komórkach [46]. Zastosowanie terapeutyczne komórek lub terapii opartej na komórkach, obejmuje globalny rynek

o przychodzie w wysokości ponad miliarda dolarów USD [47]. Wśród strategii terapeutycznych wymienić można bezpośrednie przeszczepienie pożądanego typu komórek, pobranych metodą biopsji lub pochodzących z hodowli komórek macierzystych, zarówno w systemie autologicznym jak i allogenicznym, np. przy leczeniu zawału serca lub na umieszczaniu wszczepianych komórek we wnętrzu otoczki z polimeru, np. jako jedna z metod leczenia cukrzycy, implantacja matryc, polegająca na umieszczeniu samego skafoldu, zawierającego substancje indukujące migracje i wzrost komórek, które następnie jest stopniowo kolonizowane przez komórki biorcy, np. przy leczeniu oparzeń i poważnych urazów oraz implantacja matryc z komórkami, polegająca na wszczepianiu kompletnych struktur, wyhodowanych *in vitro*, niewymagających długotrwałej adaptacji do warunków panujących w organizmie biorcy, a zadowalające obiecujące wyniki kliniczne osiągnięto przy odtwarzaniu takich tkanek, jak chrząstki oraz powłoki skórne.

Rozwijaną współcześnie strategią leczenia są metody inżynierii tkankowej, odpowiednio scaffold-based vascularized bone tissue engineering (SBV BTE), vascular tissue engineering (VTE) lub scaffold-based tissue engineering (SBTE). Obiecujące rezultaty osiągane są poprzez zastosowanie skafoldów tkankowych w połączeniu z autologicznymi komórkami macierzystymi szpiku kostnego oraz czynnikami wzrostu (głównie BMP-2). Przegląd aktualnej sytuacji [48] wskazuje skalę i różnorodność obecnie dostępnych metod terapeutycznych opartych na komórkach, będących w fazie badań klinicznych. Wśród stale zwiększającej się liczby stosowanych rodzajów komórek i ocenianych wskazań klinicznych, ważne znaczenie ma, jak produkty oparte na komórkach są wytwarzane, a następnie dostarczane do pacjentów na klinicznie istotną skalę. W obecnie prowadzonych badaniach klinicznych stosowane są zarówno zarodkowe komórki macierzyste, jak i indukowane produkty pochodzące z pluripotencjalnych komórek macierzystych [49], pomimo przeszkód i problemów technicznych, etycznych oraz dotyczących bezpieczeństwa produktów [50]. W inżynierii tkankowej powszechnie stosowane są metody, w których dla inicjacji regeneracji komórek macierzystych wykorzystywane są trójwymiarowe konstrukcje inżynierskie umożliwiające transplantację, wstrzykiwanie lub implantację tkanek *ex vivo*. W przeciwieństwie do czystych terapii, w których komórki macierzyste są wstrzykiwane bezpośrednio do krążenia obwodowego lub lokowane w konkretnych tkankach, w licznych przypadkach klinicznych konieczne jest wykorzystanie nośników komórek macierzystych do ich transportu oraz skafoldów do trójwymiarowego pogrupowania ich w określonym miejscu organizmu. Badania nad

zastosowaniem komórek macierzystych w tym kontekście są ustawicznie rozwijane, ze znacznym nasileniem w ostatnim dziesięcioleciu [31, 51-60]. Co oczywiste, skuteczność terapii opartych na komórkach zależy od zachowania ich żywotności po wszczępieniu [61, 62], a problem ten nadal jest aktualny. Jednym z głównych wyzwań w transplantacji skafoldów na bazie komórek jest brak zagnieżdżenia i związany z tym niedobór masowego transportu tlenu i składników odżywczych, wymaganych dla prawidłowego funkcjonowania oraz przetrwania komórek w uszkodzonej tkance beznaczyniowej [63-67], co może doprowadzić do niedokrwienia tkanki i nekrozy [68]. Bieżące dylematy etyczne i obawy nowotworzenia u pacjentów mają ograniczone zastosowanie kliniczne w przypadku embrionalnych komórek macierzystych [69], jednak znacznie większy jest potencjał translacyjny w przypadku somatycznych komórek macierzystych, w szczególności, krwiotwórczych komórek macierzystych (j. ang.: hematopoietic stem cells – HSC) ze szpiku kostnego [70, 71], jednak trudnych do rozszerzenia *in vitro*, wspomagających komórek zrębu szpiku kostnego (j. ang.: bone marrow stromal cells – BMSCs) [72], których badanie i zastosowanie kliniczne jest obecnie standardem, a których subpopulacja ma własności mezenchymalnie regenerujące tkankę [45]. Takie naturalnie multipotentne i samo odnawialne komórki (j. ang.: multipotent and self-renewing cells – MSCs) nie są ograniczone tylko do szpiku kostnego, a ich obecność w dużych ilościach występuje w mazi stawowej, ścięgnach, mięśniach szkieletowych i tkance tłuszczowej [72]. Ugruntowaną pozycję w badaniach nad komórkami macierzystymi i w medycynie regeneracyjnej i chirurgii rekonstrukcyjnej mają komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej ASCs (j. ang.: adipose-derived stem cells – ASCs) [73]. Terminy mezenchymalne komórki macierzyste (j. ang.: mesenchymal stem cell – MSCs) i komórki macierzyste szpiku kostnego (j. ang.: bone marrow stromal cells – BMSCs) stosowano wymiennie, co nie jest precyzyjne i nie w pełni uzasadnione [74]. Ponieważ komórki, określane przez wiele ośrodków jako mezenchymalne komórki macierzyste MSCs, mogą obejmować multipotentne komórki pochodzące z innych tkanek niż ze szpiku kostnego, takich jak łożyska [26], krwi pępowinowej, tkanki tłuszczowej, mięśni dorosłych, zrębu rogówki [75], płynu owodniowego (j. ang.: amniotic fluid) [76] lub miazgi zębów mlecznych niemowląt, chociaż nie mają możliwości odtwarzania całego narządu, zaproponowano zamiennie jako lepsze określenie multipotentne komórki macierzyste (j. ang.: multipotent stromal cell – MSCs). Najbardziej prymitywne multipotentne komórki macierzyste MSCs mogą być uzyskane z przewodu tkanki pępowinowej (j. ang.: umbilical cord tissue) i krwi pępowinowej. Bardzo bogatym źródłem

komórek macierzystych dla mezenchymalnych są rozwijające się zarodki zębów mądrości, choć uważane za multipotencjalne, mogą okazać się pluripotencjalnymi i najpewniej w przyszłości będą stanowić główne źródło dla bankowości osobistej, badań i wielu terapii, w tym wytwarzania hepatocytów. Natomiast tkanka tłuszczowa jest najbogatszym źródłem multipotentnych komórek zrębowych MSCs, gdy ich obecność we krwi obwodowej jest kontrowersyjna i niewiele ich grup z krwi obwodowej jest w stanie rozszerzyć hodowlę komórek [77]. Rodzajem pluripotencjalnych komórek macierzystych, które zostały sztucznie otrzymane z komórek nie-pluripotencjalnych, przeważnie komórek somatycznych dorosłego człowieka przez wymuszenie ekspresji odpowiednich genów w tych komórkach [78], są komórki iPSC (j. ang.: induced pluripotent stem cells), po raz pierwszy w roku 2006 z komórek myszy, a w roku 2007 z komórek ludzkich przez [78-81]. Są one podobne do naturalnych pluripotencjalnych komórek macierzystych pod wieloma względami, takimi jak np.: ekspresja genów, białek i receptorów, okres podziału, morfologia oraz możliwości różnicowania, jednak ich własności i podobieństwa są wciąż analizowane [79]. W roku 2010 pojawiły się informacje iż komórki mezenchymalne znajdujące się w miazdze trzecich zębów trzonowych dobrze rodują w zakresie otrzymywania komórek iPS, gdyż zabieg odróżnicowywania z ich udziałem przebiega z wydajnością do 100 razy większą niż z udziałem fibroblastów skóry [82]. W miarę rozwoju inżynierii tkankowej i medycyny regeneracyjnej atrakcyjne stały się, wśród innych, terapie komórkowe, które w przypadkach wielu schorzeń zyskują pozycje bezkonkurencyjne. Komórki autologiczne (pozyskiwane bezpośrednio z organizmu przyszłego biorcy), izogeniczne (syngeniczne) (pochodzące z organizmów o identycznym materiale genetycznym: bliźniąt jednojajowych, klonów, linii zwierzęcych hodowanych wsobnie przez długi okres), allogeniczne (pochodzące od dawcy tego samego gatunku, np. fibroblasty z tkanki łącznej napletka, do wytwarzania transplantów skórnych), ksenogeniczne (pozyskiwane od innych organizmów żywych) stanowią źródło komórek dla inżynierii tkankowej [23]. Mogą być przy tym komórkami pierwotnymi (pochodzącymi bezpośrednio z organizmu żywego) lub wtórnymi (pobranymi z banku komórek i tkanek). Komórki macierzyste (komórki pnia), wykorzystane np. do rekonstrukcji twarzoczaszki [45, 83-89], cechują się brakiem zróżnicowania i zdolnością do nieograniczonej liczby podziałów, w celu uzyskania komórek wyżej specjalizowanych, które zależnie od źródła klasyfikuje się jako zarodkowe (uzyskane z embrionu) lub somatyczne (pochodzące od dorosłego organizmu), chociaż możliwe jest krzyżowanie tych obu klas przez klonowanie zarodkowe i przez

przeniesienie jądra komórki somatycznej (SCNT) [90], także w połączeniu z wykorzystaniem biodegradowalnych skafoldów [91]. Komórki macierzyste autologiczne są tymi najkorzystniejszymi, gdyż nie wywołują odpowiedzi immunologicznej i tym samym nie powodują szkodliwych immunosupresyjnych efektów ubocznych. W zależności od etapu rozwoju tkanek, komórki macierzyste można podzielić na kategorie dorosłych i zarodkowych komórek macierzystych [45, 85, 86]. Autologiczne komórki macierzyste i progenitorowe mogą pochodzić z krwi pępowinowej [92] lub tkanki [93]. Dorosłe komórki macierzyste występują m.in. w szpiku kostnym, krwi obwodowej, tkance tłuszczowej, tkance nerwowej, mięśniach i skórze właściwej, i mają zdolność przekształcania na wiele tkanek, w tym kości, chrząstek, mięśni, ścięgien. Komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego i z tkanki tłuszczowej, mogą służyć do hodowli komórek i tkanek mezenchymalnych, w adipocyty, chondrocyty, osteoblasty i szkieletowe miocyty i mogą być wykorzystane do wytworzenia tkanek, np. tłuszczu, chrząstek, kości i mięśni [93-97]. Komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego wykazują duży potencjał do terapii autologicznych [45], bez leczenia immunosupresyjnego [98-100]. Trudniejszy materiał do hodowli stanowią komórki zróżnicowane, tworzące struktury dojrzałego organizmu. Rozwój technik hodowli ludzkich komórek macierzystych zmierza do wprowadzania kolejnych nowych klinicznych zabiegów regeneracyjnych nie mających konkurencji w innych dotychczas stosowanych metodach klinicznych, w tym w celu leczenia raka, urazów, stanów zapalnych lub chorób związanych z zaawansowanym wiekiem, a potencjalnie nawet w leczeniu chorób Parkinsona i Alzheimerera, osteoporozy i chorób serca oraz wątroby, metabolicznych chorób wieńcowych i zaburzeniach autoimmunologicznych [31]. Pomimo tego uważa się, że w porównaniu z embrionalnymi komórkami macierzystymi dorosłe komórki macierzyste zwykle są przydatne w ograniczonym stopniu do odtwarzania różnych typów komórek i tkanek [31]. W terapiach opartych na komórkach muszą być uwzględniane rygorystyczne wymagania dotyczące bezpieczeństwa, zwłaszcza że w wielu procesach hodowli komórek wykorzystuje się surowce pochodzenia zwierzęcego, co jest potencjalnym zagrożeniem przeniesienia do biorcy patogenu lub powikłań immunologicznych [101]. Zastosowanie pluripotencjalnych komórek macierzystych wymaga z kolei zachowania wymogów dotyczących bezpieczeństwa w związku z oczyszczaniem poprodukcyjnym, ograniczając możliwości nieograniczonego wzrostu liczby komórek przekazywanych pacjentowi [102]. Uznawanym na całym świecie dowodem bezpieczeństwa i skuteczności nowych metod terapeutycznych jest dopuszczenie ich przez Amerykańską Agencję ds.

Żywności i Leków (Food and Drug Administration – FDA), której akceptację dotychczas uzyskało kilka żywych substytutów skóry, wytwarzanych z ludzkich fibroblastów, świńska warstwa podśluzówkowa jelita cienkiego, zastępująca oponę twardą lub stosowana do leczenia urazów skóry, chondrocyty autologiczne do regeneracji ubytków tkanki chrzęstnej oraz bezkomórkowe rusztowania sprzyjające regeneracji skóry. Przegląd terapii opartych na komórkach i to zarówno z punktu widzenia obrazu klinicznego, jak i wyzwań produkcyjnych, wskazuje że terapie te mają wysoki potencjał, pomimo zbyt wielu niezaspokojonych dotychczas potrzeb pacjentów, wymagający jednak intensyfikacji rozwoju technologii i potencjału wytwórczego produktów opartych na komórkach w skali odpowiadającej wymogom klinicznym i umożliwiającej likwidację lub przynajmniej zmniejszenie luk produkcyjnych w tym zakresie. Chociaż kilka systemów produkcyjnych jest już dostępnych w odniesieniu do rozwoju i manipulacji terapeutycznych niektórych typów komórek, optymalny i uniwersalny rodzaj platformy produkcyjnej jeszcze nie został opracowany ze względu na zróżnicowanie typów komórek i zastosowań klinicznych. Konieczne jest pokonywanie wielu wyzwań i lepsze zdefiniowanie wymagań produkcyjnych w odniesieniu do różnych technologii, w celu ułatwienia zastosowań produktów i dalszego rozwoju technologii. Z wyjątkiem mezenchymalnych komórek macierzystych MSCs (j. ang.: mesenchymal stem cells), wytwarzania większości istotnych terapeutycznie typów komórek nie opanowano jeszcze w zadowalającej technologicznie skali, choć wyniki uzyskane dotychczas są obiecujące. Konieczna jest wobec tego szeroka promocja w przemyśle i w środowisku akademickim, bieżącej działalności klinicznej wykorzystującej elementy inżynierii tkankowej oraz zidentyfikowanie luk w możliwościach produkcyjnych służących terapiom opartym na komórkach. Postęp w tym zakresie wymaga dalszych szczegółowych dociekań dotyczących mechanizmu działania terapeutycznego *in vivo*, opartego m.in. na mezenchymalnych komórkach macierzystych MSCs, co wymaga przezwyciężenia wielu przeciwności, dla ułatwienia rozwoju i optymalizacji procesu. Istnieje pilna potrzeba optymalizacji sposobu dostawy produktów opartych na komórkach dedykowanych do każdego ze wskazań terapeutycznych. Postęp badań klinicznych związany jest ściśle z wytwarzaniem produktów w rozwijających się zautomatyzowanych procesach, umożliwiających zwiększoną kontrolę jakości i wydajności [103-107] oraz z opracowaniem standardów referencyjnych i wdrożeniem zamkniętych funkcjonalnie systemów produkcyjnych. Konieczne staje się budowanie mocnych rynkowych marek na konkurencyjnym rynku producentów produktów opartych na komórkach oraz minimalizacja ich kosztów produkcji,

w celu umożliwienia refundowalnych aplikacji terapeutycznych oferowanych produktów, pomimo że wysokie wymagania dotyczące jakości i bezpieczeństwa istotnie zwiększają koszty wytwarzania na wszystkich etapach. Rozwój wprowadzanych technologii musi uwzględniać konieczność i możliwości dostosowania warunków wytwarzania do skali odpowiadającej realnym potrzebom klinicznym. Z pewnością wymaga to również analizy limitów możliwych do wykorzystania zbiorów komórek oraz czasu ich hodowli, w odniesieniu do poszczególnych produktów, co z pewnością odbiega od laboratoryjnych warunków prowadzenia bioprosesów. Celem procesów produkcyjnych jest znaczne zwiększenie liczby komórek w porównaniu ze skalą laboratoryjną, bez negatywnego wpływu na potencjał terapeutyczny komórek, który pogarsza się w czasie w hodowli [108]. Zasadnicze znaczenie dla zachowania skuteczności i jakości produktu opartego na komórkach ma zagrożenie zablokowania funkcji komórek [109], co jest szczególnie istotne, gdyż różne typy komórek są przylegające, wobec czego przed dalszą obróbką muszą być indywidualnie oddzielane od podłoża, na którym są hodowane. Wobec tego możliwe jest osiągnięcie wielkości produkcyjnych partii komórek sięgających bilionów komórek, choć zależy to każdorazowo od indywidualnych wymagań dotyczących danego pacjenta oraz rozwoju rynku produktów dotyczących danego wskazania terapeutycznego [110]. W przypadku wielu technologii produkcyjnych opartych na komórkach, brak jest jednak porównywalnych danych wiarygodnych dla prowadzenia procesów produkcyjnych w warunkach, odbiegających wielokrotnie od występujących w reaktorach laboratoryjnych. Jeżeli produkty wykazują długotrwałą stabilność, jak w przypadku terapii allogenicznych model zarządzania technologią wytwarzania stosownych produktów opartych na komórkach jest zbliżony do stosowanego w produkcji biofarmaceutyków [111]. Terapie autologiczne, z istoty spersonalizowane, są skomplikowane ze względu na krótkoterminowość dostępności i konserwacji komórek, wobec czego metody zarządcze wymienione uprzednio, nie mogą być stosowane [112], a zapewnienie ciągłej dyspozycyjności terapeutycznej produktu opartego na komórkach wiąże się ze znacznymi ubytkami produktu, wynikającymi z przeterminowania, co bez wątpienia wpływa na zwiększenie liczebności wytwarzanej partii produktów, a przez to ich ogólnych kosztów. Wobec różnorodności typów komórek i wskazań klinicznych, a ponadto zróżnicowania modeli biznesowych obecnych i potencjalnych wytwórców produktów opartych na komórkach, konieczne jest opracowanie i to najpewniej w skali globalnej wielu komplementarnych, a być może nawet alternatywnych platform produkcyjnych, co rzuca wyzwanie wielu ośrodkom naukowym w różnych krajach. Ważnym

czynnikiem determinującym postęp w tym zakresie jest pełna interpretacja mechanizmu działania terapeutycznego mezenchymalnych komórek macierzystych MSCs (j. ang.: mesenchymal stem cell-based therapies – MSC) *in vivo*, co nadal pozostaje sprawą otwartą [113]. Na przełomie wieków XX i XXI wskazano na własności immunomodulujące mezenchymalnych komórek macierzystych MSCs [114, 115], m.in. w chorobie zwyrodnieniowej stawów oraz choroby Crohna, co ma związek z wydzielaniem czynników troficznych, wskazując także, że DNA dawcy jest zatrzymywane w płucach, węzłach chłonnych i jelicie biorcy po infuzji mezenchymalnych komórek macierzystych MSCs [116]. Współczesne technologie allogeniczne z wykorzystaniem mezenchymalnych komórek macierzystych MSCs są wykorzystywane przy leczeniu zawału serca [117] wymagającego 35-350 milionów komórek na dawkę, umożliwiając dostarczanie odpowiednich produktów dla 10 000 chorych rocznie. Proces produkcyjny, który zmniejsza rozbieżność biologiczną nieuchronnie zapewnia wyższą jakość produktu. Małe zmiany w środowisku komórek na początku hodowli komórek prowadzą do dużych zmian końcowych, co wykazano m.in. w hodowli embrionalnych komórek macierzystych, gdzie zmiany poziomu rozpuszczonego tlenu w pożywce hodowlanej prowadzą do zmiany charakterystyki wzrostu komórek [118] i potencjał różnicowania [119], czemu można przeciwdziałać np. przez mieszanie, aby mikrośrodowisko komórek było ustalone podczas hodowli. Dobrze znana fizyczna charakterystyka mieszania układu reaktora adaptowana do tradycyjnych procedur biologicznych [120-122] i stosowanych w przemyśle biofarmaceutycznym [123] może być podstawą procesów opartych na komórkach. Brak ciągłej kontroli procesu jest jednak kluczową barierą dla konsekwentnego wdrażania terapii opartych na komórkach. Strategie kontroli procesów są rutynowe w bioreaktorach zbiornikowych z mieszaniem [124, 125], natomiast są słabo zdefiniowane w przypadku bardziej awangardowych bioprocessów. Wydajny zbiór technologii opartych na komórkach, nie tylko z mieszaniem [126-128], lecz także takich jak bioreaktory zbiornikowe [129], rocking-motion [130, 131], napędzane pneumatycznie [122, 132], T-flasks [103], kolby obracające [133, 134] i wielowarstwowe [135], ze złożem fluidalnym [136], z pustych włókien [137], z przedmuchaniem zwykle powietrzem [138], wymaga uwzględnienia wrażliwości komórek i ograniczeń czasowych produktu. Zaangażowanie przemysłu, głównie małych i średnich prywatnych firm biotechnologicznych, w technologii oparte na komórkach znacząco wzrasta od 2004 roku, a ranking zaangażowania terapeutycznego obejmuje kolejno choroby przewodu pokarmowego (48%), płuc (40%), chrząstki (36%), neurologiczne (28%), cukrzyca (26%)

i choroby kości (25%) [139]. Na rynku amerykańskim i w Europie działa po ok. 100 firm specjalizujących się w tej dziedzinie, a w Polsce najpewniej jedna lub najwyżej kilka. Podstawą prowadzonych prac musi być intensyfikacja badań podstawowych w zakresie lepszego scharakteryzowania warunków biogenetycznych terapii opartych na komórkach, co jest absolutnie niezbędne dla poprawy poziomu technologii, powtarzalności, jakości i masowości procesów produkcyjnych oraz rozwoju zdolności produkcyjnych. Kilka potencjalnych modeli biznesowych dominuje w związku z produkcją przemysłową opartą na komórkach, zwłaszcza "point-of-care" i modele urządzeń "off-the-shelf" [139]. Ponadto konieczna jest optymalizacja metody terapeutycznej dostawy produktów opartych na komórkach [140], ze względu na brak pełnych dowodów klinicznych w tym zakresie. Podobnie jak w przypadku procesów produkcyjnych, istnieje potrzeba indywidualizacji doboru systemu dostawy produktów opartych na komórkach ze względu na poszczególne wskazania terapeutyczne [141].

2.4. Skafoldy tkankowe i kostne oraz materiały i technologie do nich stosowane

W inżynierii tkankowej powszechnie stosowane są metody, w których dla inicjacji regeneracji komórek macierzystych wykorzystywane są trójwymiarowe konstrukcje inżynierskie umożliwiające transplantację, wstrzykiwanie lub implantację tkanek *ex vivo*. W przeciwieństwie do czystych terapii, w których komórki macierzyste są wstrzykiwane bezpośrednio do krążenia obwodowego lub lokowane w konkretnych tkankach, w licznych przypadkach klinicznych konieczne jest wykorzystanie nośników komórek macierzystych do ich transportu oraz skafoldów do trójwymiarowego pogrupowania ich w określonym miejscu organizmu. Zadaniem skafoldów tkankowych oraz kostnych jest umożliwienie przylegania komórek i zapewnienie mechanicznego utrzymania żywych komórek w trójwymiarowej strukturze oraz właściwego środowiska rozwoju [31, 141]. Niezależnie od miejsca przeznaczenia wytworzone skafoldy powinny cechować się :

- a) wymaganymi własnościami mechanicznymi,
- b) optymalną porowatością,
- c) biodegradowalnością zależną od czasu regeneracji uszkodzonej tkanki,
- d) możliwością sterylizacji,
- e) strukturą umożliwiającą dostęp wszystkim komórkom znajdującym się na powierzchni skafoldów do składników odżywczych (glukozy, aminokwasów, O₂),
- f) umożliwiać usuwanie produktów metabolicznych, (CO₂, związków azotu),
- g) uniemożliwiać bądź sprzyjać powstawaniu angiogenezy, tj. przerzastaniu skafoldu systemem naczyń krwionośnych.

Dobór materiału na skafoldy tkankowe stanowi zatem ważne zadanie inżynierskie. Własności skafoldów tkankowych w dużej mierze zależą od własności zastosowanego do ich otrzymania materiału, postaci (materiał lity, materiał porowaty), budowy przestrzennej, własności fizycznych i chemicznych. Materiały z przeznaczeniem na skafoldy tkankowe nie powinny być toksyczne, nie powinny uwalniać toksycznych pierwiastków, metabolitów lub związków. Wymagana jest mikroskopowa, porowata struktura skafoldów, umożliwiająca dyfuzję substancji odżywczych i produktów przemian materii przez nie. Rozmiary porów powinny być dostosowane do określonego typu komórki i być na tyle duże, aby umożliwić migrację komórek i tworzenie macierzy pozakomórkowej (j. ang.: extracellular matrix ECM),

dostarczanie sygnałów rozwojowych do komórek i promocji pozyskiwania komórek z otaczających tkanek, i na tyle małe, by nie doszło do zasklepienia porów w skafoldzie [31]. W transplantacji skafoldów na bazie komórek jednym z głównych problemów jest brak zagnieżdżenia, i w konsekwencji niedobór masowego transportu tlenu i składników odżywczych, wymaganych dla prawidłowego funkcjonowania oraz przetrwania komórek w uszkodzonej tkance beznaczyniowej [63-67], co może doprowadzić do niedokrwienia tkanki i nekrozy [68]. Użycie skafoldów zazwyczaj prowadzi do pomyślnych wyników, gdyż jako substytuty macierzy pozakomórkowej ECM zapewniają one stabilność strukturalną dla rozwoju tkanek i umożliwiają zapewnienie środowiska odpowiednich sygnałów, które stymulują komórki do proliferacji i różnicowania w miarę dojrzewania tkanki funkcjonalnej. Konieczne jest zapewnienie warunków do wypełniania porów skafoldu przez rekonstruowane komórki i gwarantujące neowaskularyzację [142] przy zapobieganiu skrzepom krwi [143]. Regeneracja w stanie naturalnym wymusza usuwanie sztucznego skafoldu [144], najkorzystniej przez bioabsorpcję, co zapewniają liczne substancje naturalne i syntetyczne wykorzystywane do tworzenia skafoldów [145, 146]. Szybkość bioabsorpcji powinna odpowiadać szybkości regeneracji danej tkanki, co umożliwia m.in. stopniowe przejmowanie przez nią obciążenia mechanicznego. Większość prowadzonych obecnie prac koncentruje się na projektowaniu i otrzymywaniu skafoldu z zastosowaniem różnych technologii wytwarzania, w tym także materiałów pochodzenia naturalnego jak: chitozan (pochodna chityny), kolagen lub elastyna jak również syntetycznego jak PCL (polikaprolakton), PLA (polilaktyd), PEO poli(tlenek etylenu). Wymienione polimery po wszczępieniu w ciało biorcy, ulegają degradacji do produktów łatwo usuwanych przez organizm człowieka, m.in. w cyklu kwasu cytrynowego nazywanego cyklem Krebsa [147]. Skafoldy kostne są zwykle wykonane z porowatego biodegradowalnego materiału, zapewniając wsparcie mechaniczne podczas regeneracji uszkodzonej lub chorej kości [148, 149]. Do zadań skafoldów, w tym także kostnych, należy umożliwienie zarówno przylegania i migracji komórek oraz zapewnienia niezbędnych warunków ich wzrostu poprzez promowanie wzrastania nowych naczyń krwionośnych [148, 150-152], służących dostarczaniu związków organicznych i sygnałów fizycznych oraz dyfuzji składników odżywczych oraz innych niezbędnych substancji, jak również zabezpieczenie odpowiednich własności mechanicznych i fizykochemicznych, sprzyjających integracji i rozwojowi tkanek.

Obecnie rozwój skafoldów tkankowych koncentruje się na trzech typach materiałów:

- naturalnych do których należy kolagen, chityna, elastyna, liofilizowana kość: mineralizowana – czyli kość z której usunięto kolagen pozostawiając wyłącznie część nieorganiczną (hydroksyapatyt), demineralizowana – kość z której usunięto materiał nieorganiczny, pozostawiając strukturę materiału organicznego (kolagenu), np. koral,
- ceramicznych w tym przede wszystkim hydroksyapatyt, bioz szkła,
- polimerowych w tym polimerów syntetycznych.

Żaden z materiałów z wymienionych trzech grup nie jest materiałem idealnym dla wszystkich typów występujących tkanek. Materiały naturalne w szczególności allogenne i ksenogenne niosą ryzyko przeniesienia wirusów ze źródła ich pochodzenia do miejsca ich aplikowania. Materiały ceramiczne posiadają bardzo długi czas degradacji oraz są kruche, a z kolei materiały polimerowe jak PLA, gwałtownie rozkładane, zakwaszają środowisko tkankowe. Dlatego poszukiwane są rozwiązania podtrzymujące i przyspieszające naturalny proces regeneracji, w których zastosowany materiał oprócz funkcji podtrzymywania i odtwarzania naturalnego skafoldu, będzie uwalniał środki lecznicze lub antybakteryjne, czyli zastępował funkcję układu odpornościowego, który w naturalnych warunkach zwalcza drobnoustroje, a którego oddziaływanie na środowisko powstałego uszkodzenia, jest niemożliwe przez rozległe uszkodzenie naczyń krwionośnych i obecność drobnoustrojów.

Należy podkreślić, że w zastosowaniu na skafoldy mogą być wykorzystywane także materiały metalowe, co m.in., jest przedmiotem prac własnych, w tym objętych niniejszym opracowaniem.

Do wykonania skafoldów mogą być użyte porowate bioz szkła resorbowalne [153], ze ścianami porów pokrywanymi hydroksy węglano-apatyt (HCA), zapewniającymi zwiększoną aktywność osteoblastów [154] oraz ekspresję genów związanych z kośćmi [155]. Podstawowym bioaktywnym materiałem ceramicznym stosowanym na skafoldy jest fosfat wapnia (CaPs), jako główny składnik kości, a także hydroksyapatyt (HA), β -fosforan trójwapniowy (β -TCP) lub mieszanina HA i β -TCP, znany jako dwufazowy fosforan wapnia [156-158]. Stosowane mogą być również polimery zarówno bioaktywne, jak i biodegradowalne [148, 159], w tym m.in. polimery naturalne jak: kolagen, fibryna, alginian, jedwab, kwas hialuronowy i chitozan wykorzystywane np. do rekonstrukcji kości [160] oraz syntetyczne, takie jak kwas poli(laktowy) (PLA), kwas poli(glikolowy) (PGA), polikaprolakton (PCL) i poli(fumaran propylenu) (PPF) o dużej wytrzymałości na ściskanie, porównywalnej do warstwy korowej kości [148], przy czym niektóre z nich, jak kwas poli(laktowy) (PLA) i kwas poli(glikolowy)

(PGA) mogą powodować negatywne reakcje tkankowe [161]. Materiały kompozytowe spełniają wymagania zarówno mechaniczne, jak i fizjologiczne, jak np. CaP-polimer skafold (j. ang.: interconnected tricalcium phosphate TCP) skafoldy pokrywane wewnątrz porów polikaprolaktonem (PCL), hydroksyapatytem HA/poli(estro-uretanem)(PU) [162] lub nanokompozyty kolagenu i bioszklą [163]. Opisane podejście dzisiaj uważane jest za klasyczne, chociaż ze wskazań medycznych nie w każdym przypadku może znaleźć zastosowanie kliniczne. Materiały metalowe porowate, aczkolwiek nie należą do biodegradowalnych, również są stosowane na skafoldy, głównie Ti i Ta [164], w tym po obróbce powierzchni porów [165] oraz Mg [166] lub biodegradowalne stopy Mg-Ca [167], znalazły zastosowanie głównie ze względu na relatywnie wysoką wytrzymałość na ściskanie oraz trwałość zmęczenia [148, 168]. Skafoldy trzeciej generacji, umożliwiają nie tylko tworzenie nowej tkanki i jej biomineralizację, lecz są również osteoindukcyjne, w tym wykonane z CaP, Si-TCP/HA [169], hydrożel kolagenu [170]. Skafoldy takie mogą być często podawane z lekami, w tym gentamycyną, wankomycyną, alendronianem, metotreksatem i ibuprofenem [171, 172] oraz czynnikami wzrostu i transkrypcyjnymi [159, 173, 174].

We wcześniejszych pracach własnych przedstawiono bardzo obszernie stan wiedzy w zakresie materiałów i technologii wytwarzania skafoldów [175, 176] oraz opis koncepcji synergicznego wykorzystania do tego celu dotychczasowych osiągnięć chirurgii i medycyny regeneracyjnej w zakresie protezowania/implantowania w leczeniu chorób cywilizacyjnych i ich skutków, inżynierii wytwarzania i inżynierii materiałowej w zakresie projektowania i wytwarzania protez/implantów z różnych materiałów inżynierskich oraz inżynierii tkankowej w zakresie doboru materiałów i technologii wytwarzania skafoldów. Tej tematyki dotyczą też wcześniejsze prace własne i projekty [175, 177-200], a także możliwe jest wykorzystanie różnych wysokospecjalizowanych technologii, wobec wyników dotychczasowych teoretycznych prac własnych w tym zakresie [22, 25, 201-204]. Liczące się badania w zakresie doboru materiałów na skafoldy są wykonywane również w innych ośrodkach naukowych w Polsce [141, 205-213].

W tablicy 2.10 zestawiono technologie stosowane do różnych implantów, wykonanych z różnych materiałów w odniesieniu do różnych obszarów zastosowań medycznych.

Wśród tradycyjnych, a zarazem najstarszych technologii wytwarzania skafoldów o porowatej strukturze można wyróżnić metodę emulgowania/liofilizacji [214], przez indukowany termicznie rozdział faz (j. ang.: Thermally Induced Phase Separation – TIPS) [215], odlewanie

Tablica 2.10. Technologie stosowane do różnych implantów

Etap wytwarzania	Badane materiały	Wykorzystane technologie	Obszary zastosowań
Wytwarzanie konstrukcji nośnej implantu	Ti, stopy Ti z V lub Nb, Mg (ewentualnie z dodatkami Ca, Zn and Mn), materiały ceramiczne Al ₂ O ₃ i ZrO ₂ , TiO ₂ , bioszklą resorbowalne, np. Hencha, z układu CaO-SiO ₂ -P ₂ O ₅ i SiO ₂ -Al ₂ O ₃ , hydroksyapatyty,	Selektywne laserowe spiekanie, spiekanie, wykorzystanie matrycy organicznej, liofilizacja gęstwy ceramicznej, metody zagęszczania wspomagane ciśnieniowo, spiekanie na gorąco/spiekanie iskrowe (SPS), odlewanie szkieletowe, obróbka plastyczna, mikroobróbka skrawaniem, komputerowo wspomagane wytwarzanie CAM, metody zol-żel, druk trójwymiarowy, elektroprzędzenie, osadzanie warstw atomowych ALD, fizyczne osadzanie z fazy gazowej PVD	Uzupełnienia ubytków kości długich, stawów biodrowych i kolanowych, kości twarzoczaszki, ubytków chrząstek stawowych, ubytków przełyku i/lub naczyń krwionośnych, uzupełnienia stomatologiczne, uzupełnienia skóry
Wytwarzanie części porowatej implantu	Ti, stopy Ti z V lub Nb, Mg (ewentualnie z dodatkami Ca, Zn i Mn), materiały ceramiczne Al ₂ O ₃ i ZrO ₂ , TiO ₂ , bioszklą resorbowalne, np. Hencha, z układu CaO-SiO ₂ -P ₂ O ₅ i SiO ₂ -Al ₂ O ₃ , hydroksyapatyty, polimery, materiały kompozytowe	infiltracja, druk trójwymiarowy, selektywne spiekanie laserowe, elektroprzędzenie, osadzanie warstw atomowych ALD, fizyczne osadzanie z fazy gazowej PVD, wtlaczanie, metody zol-żel	
Wytwarzanie pokryć wewnątrz porów części porowatej implantu	naturalne polimery białkowe, polisacharydowe oraz syntetyczne, w tym termoutwardzalne, w tym kolagen, fibryna, alginian, jedwab, kwas hialuronowy, chitozan, kwas poli(laktowy) (PLA), kwas poli(glikolowy) (PGA), polikaprolakton (PCL) i poli(fumaran propylenu) (PPF), glikol polietylenowy, Al ₂ O ₃ , bioszklą resorbowalne, hydroksy węglano-apatyt (HCA), fosforan wapnia (CaPs), hydroksyapatyt (HA), β-fosforan trójwapieniowy (β-TCP), dwufazowy fosforan wapieniowy, materiały kompozytowe: kolagen + hydroksyapatyt CaP-polimer fosforan trójwapieniowy (TCP)-polikaprolakton (PCL), hydroksyapatyt HA/poli(estro-uretan)(PU), kolagen-bioszkló		

Etap	Badane materiały	Wykorzystane	Obszary
Wytwarzanie i nanoszenie kultur tkankowych	adipocyty, chondrocyty, osteoblasty, fibroblasty i szkieletowe miocyty	transplantacja komórek, implantacja macierzy, implantacja komórek z macierzą, hodowla komórek ksenogenicznych oraz autologicznych na etapie działań klinicznych	

z rozpuszczalnika w połączeniu z ługowaniem cząstek stałych (j. ang.: Solvent Casting & Particulate Leaching – SCPL), gdzie pozostałości rozpuszczalnika mogą wywierać niekorzystny wpływ na struktury komórkowe [216]. Wykorzystywania wymienionych klasycznych metod nadal nie zaniechano, pomimo braku możliwości precyzyjnej kontroli wielkości, kształtu, dystrybucji i wzajemnych połączeń porów, jak również ogólnego kształtu skafoldu. Jako nowoczesna jest wykorzystywana w inżynierii tkankowej technologii replikacji powierzchni z mikro/nano wzorcami [217-219]. Formy pierwotne są produkowane przy użyciu twardego lub miękkiego materiału, z powodu wymaganej sztywności. Naturalne i syntetyczne biodegradowalne polimery mogą być odlewane do mikro/nano form do wytwarzania elementów z małą rozdzielczością [220, 221], w tym wytłaczania na gorąco (znany również jako nanolitografia) i litografii miękkiej (mikroodlewanie) dla osiągnięcia wzorców o wymiarach około 5 nm [222-225]. Metody obecnie najczęściej wykorzystywane nie wymagają stosowania form (j. ang.: solid freeform fabrication – SFF) do wytworzenia skafoldów z różnych materiałów, w tym polimerowych, hydrożeli, materiałów ceramicznych i metalowych [226-229]. Kluczowe zadania w tym zakresie dotyczą szerokiej aplikacji poszczególnych metod wytwarzania, nie tylko do wymienionych biokompatybilnych materiałów inżynierskich, lecz także do przetwarzania materiałów biologicznych [60]. W metodzie drukowania trójwymiarowego (3DP) [230] kolejne warstwy proszku są spryskiwane odpowiednim biokompatybilnym środkiem wiążącym, np. do scalania proszku wytwarzaniu skafoldów z kolagenu [231], a do scalania hydroksyapatytu stosowanego do regeneracji kości stosuje się 25% roztwór kwasu akrylowego w mieszaninie wody z gliceryną [232], a wodny roztwór kwasu cytrynowego – do scalania ceramiki na bazie fosforanu wapnia [233]. Metodą SFF trójwymiarowego drukowania kroplami ciekłego wosku można wytworzyć replikę powierzchni skafoldu, np. do wytwarzania zamienników kości i chrząstek [234]. Ograniczenia metody wynikają z zanieczyszczeń wosku biologicznie niekompatybilnymi rozpuszczalnikami [235], czego nie

wykazują materiały nowej generacji, takie jak BioBuild i BioSupport, rozpuszczające się w etanolu lub wodzie [235]. Metoda stereolitografii umożliwia kształtowanie trójwymiarowej postaci ciekłego polimeru [236], m.in. przy wykorzystaniu poli(fumaranu propylenu) (PPF) [237, 238], poli(glikolu etylenowego) (PEG) [239, 240]. W skondensowanym osadzaniu (j. ang.: Fused Deposition Modeling – FDM) [241] wykorzystywane są materiały polimerowe bez użycia rozpuszczalników, w tym poli(ε-kaprolaktonu) PCL [242, 243], poli(glikolu etylenowego)–poli(ε-kaprolaktonu)–poli(laktydu) PEG-PCL-PLA [243, 244] akrylonitryl-butadien-styren (ABS) [245] oraz hydroksyapatyt–poli(ε-kaprolaktonu) HA-PCL [243, 246]. Układanie kolejnych warstw odbywa się ze sterowaniem komputerowym i z wykorzystaniem metod komputerowego wspomagania projektowania (j. ang.: Computer Aided Design – CAD). Selekttywne spiekanie laserowe (j. ang.: Selective Laser Sintering – SLS) przypomina trójwymiarowe drukowanie, które rozpoczyna się od równomiernego rozproszczenia cienkiej warstwy proszku na powierzchni i następnego połączenia ziarn proszku w wyniku spiekania z ziarnami sąsiadującymi z częściowym nadtopianiem, według założonych cech konstrukcyjnych wytwarzanego elementu m.in. szkieletu, przy użyciu wiązki laserowej sterowanej komputerowo według programu CAD. Następnie, kolejno według tego samego sposobu są wytwarzane kolejne warstwy, aż do osiągnięcia pełnych wymiarów wytwarzanego elementu. Ta technika powszechnie stosowana do wytwarzania przyrostowego z materiałów metalowych i ceramicznych [187-190, 208], w tym m.in. implantów do celów stomatologicznych, została użyta do przygotowania szkieletów [229] z polimerów biodegradowalnych, np. polieterowego, poli(alkoholu winylowego), polikaprolaktonu [247] i poli(kwasu L-mlekowego) [248], a także nanohydroksyapatytu [249] oraz kompozytów złożonych z niektórych z tych polimerów i hydroksyapatytu [248, 250, 251].

Wyniki badań biologicznych korzystnie rokują na temat możliwości wykorzystania technologii selektywnego spiekania laserowego i jego różnych odmian technologicznych (DMLS, LENS i modified FDM), spiekania wiązką elektronową EBM oraz formowania wtryskowego metali MIM do wytwarzania różnych typów implantów (tabl. 2.11).

Szkielety nanowłókniste wytwarzane są przez elektroprzędzenie, a tak uzyskane nanowłókna o średnicy od 5 nm do ponad 1 mm są ciągłe i połączone ze sobą w sposób losowy [270, 271]. Ze względu na charakter elektroprzędzenia włókna są zorientowane przypadkowo [272] lub są ułożone w sposób uporządkowany [273], wykazują strukturę zbliżoną do macierzy pozakomórkowej (j. ang.: extracellular matrix ECM), posiadają dużą powierzchnię właściwą,

Tablica 2.11. Porównanie wyników badań biologicznych proliferacji żywych komórek na podłożach metalowych implantów wytworzonych metodą selektywnego spiekania laserowego i innymi

Proces technologiczny	Material	Badania biocompatybilności	Rodzaj wszczepianych komórek	Uwagi i źródła	
Selektywne spiekanie laserowe	DMLS	Ti6Al4V	<i>in vitro</i>	komórki ludzkie osteoblasty (HOB)	hodowane komórki wszczepione i rozmnażane na podłożach wytworzonych metodą SLS [252]
	DMLS	tytan	<i>in vitro i in vivo</i>	BMP-7 stransdukowane fibroblasty ludzkich dziąseł	badania <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> , dane z badań wykazujące znaczne wzrastanie kości [253]
	DMLS	Ti6Al4V	<i>in vivo</i>	ludzka przednia żuchwa, żuchwa świnki morskiej	narastanie kości wokół implantu, w bliskim kontakcie z powierzchnią implantu [254]
	DMLS	Ti6Al4V	<i>in vitro</i>	osteoblasty ludzkie	osteoblasty dobrze rozłożone i z wielu punktów kontaktowych [255]
	LENS	Tytan	<i>in vitro</i>	ludzkie komórki osteoblastów (OPC1)	komórki dobrze rozprówdzone na porowatym Ti [256]
	LENS	Ti6Al4V	<i>in vivo</i>	samce szczurów Sprague-Dawley	wzrost wapnia (kości) wewnątrz porów implantu [257]
	modified FDM	tytan	<i>in vitro</i>	L929 fibroblasty myszy	bardzo dobre przyleganie i proliferacja komórek kości [258]
Spiekania wiązką elektronową EBM	Ti6Al4V	<i>in vitro</i>	ludzkie osteoblasty płodowe (hFOB 1.19)	zmniejszona proliferacja komórek na bardzo chropowatej powierzchni [259]	
	Ti6Al4V	<i>in vivo</i>	kość czołowa świni domowej	więcej styku kości z bardziej porowatą próbką [260]	
	Ti6Al4V	<i>in vivo</i>	kość udowa i piszczel królika	oddziaływanie implantu wytworzonego metodą EBM porównywalne z obrabianym mechanicznie [261]	
	Ti6Al4V	<i>in vitro</i>	ludzkie komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej dorosłych (hASC)	zwiększona proliferacja na implantach porowatych wytworzonych metodą EBM w porównaniu do implantów polerowanych i niepolerowanych [262]	
	Ti6Al4V	<i>in vitro i in vivo</i>	osteoblasty z czaszki królików	proliferaacja porowatych implantów wytworzonych metodą EBM zbliżona do implantów powlekaných [263]	

Proces technologiczny	Material	Badania biocompatybilności	Rodzaj wszczepianych komórek	Uwagi i źródła
	Ti6Al4V	<i>in vivo</i>	owca	dobry kontakt kości z porowatym implantem [264]
Formowania wtryskowego metali MIM	Ti6Al4V	<i>in vitro</i>	L929 (ISO 10993)	pozytywne wyniki testów ISO10993 [265]
	Ti6Al4V0,5B	<i>in vitro</i>	komórki MG63	spełnione wymagania dla implantu [266]
	tytan i Ti6Al4V	<i>in vitro</i>	pre-osteoblasty MC-3T3-E1	adhezja komórek znacznie poprawiła się przez procesy BIODIZE® i BIOCOAT® [267]
	tytan	<i>in vitro</i>	pre-osteoblasty MC-3T3-E1	proces BIOCER® wpływa na zwiększoną proliferację komórek i adhezję [268]
	Ti6Al4V	<i>in vitro i in vivo</i>	L929 fibroblasty i zuchwa makaka jawajskiego - małpy koczokodanowatej	komórki rozmożyły się z filopodią i dołączyły do podłoża [269]

wysoką porowatość, małą wielkość porów i małą gęstość [270]. Jako materiał mogą być użyte materiały naturalne i inżynierskie, w tym m.in. kolagen, żelatyna, chitozan [270]. Spore znaczenie wśród materiałów stosowanych na skafoldy zyskały nanowłókna polimerowe. Do otrzymania nanowłókien polimerowych stosowanych jest obecnie wiele metod, wśród których największą rolę odgrywają: spontaniczny wzrost (j. ang.: Spontaneous Growth), syntezy oparte na szablonach (j. ang.: Template-based Synthesis), elektroprzędzenie i litografia. Trzy pierwsze zaliczane są do technik bottom-up, natomiast litografia klasyfikuje się w grupie technik top-down. Ponadto możliwe jest otrzymywanie nanowłókien polimerowych w sposób bezpośredni lub pośredni [274]. Struktura otrzymywanych nanowłókien zależy od wyboru metody – Spontaneous Growth umożliwia formowanie nanostruktur krystalicznych, natomiast Template-based Synthesis zazwyczaj prowadzi do utworzenia struktur polikrystalicznych i amorficznych. W przekroju nanowłókna o średnicy $d = 50$ nm znajduje się około 10 000 łańcuchów polimerowych o średniej długości makrocząsteczek wynoszącej 100 μm . W praktyce najczęściej otrzymywane są nanowłókna o średnicy od 50 do 500 nm. Istnieje kilka technologii [3, 275], którymi wytwarza się nanowłókna polimerowe. Najintensywniej rozwijaną jest elektroprzędzenie (j. ang.: electrospinning), umożliwiające otrzymywanie nanowłókien polimerowych za pomocą pola elektrycznego zarówno ze stopionych polimerów (elektroprzędzenie ze stopu), (j. ang.: melt-electrospinning), które polega na wcześniejszym stopieniu polimerów takich jak:

PP, PE, PMMA lub PET, a następnie poddaniu cieczy działaniu silnego pola elektrostatycznego w celu przekształcenia w postać nanowłókna, jak i z ich roztworów – elektroprzędzenie z roztworu (j. ang.: solution-electrospinning) polegające na przekształceniu polimeru w postać roztworu, a następnie poddaniu cieczy działaniu pola elektrostatycznego w celu rozciągnięcia strugi i odparowania rozpuszczalnika, co w konsekwencji prowadzi do powstania nanowłókien [4, 5, 275-277]. Do wytwarzania skafoldów wykorzystywana jest też zdolność niektórych biopolimerów, takich jak peptydy i kwasy nukleinowe do samoorganizacji, polegającej na niekowalencyjnych interakcjach w celu spontanicznego tworzenia trójwymiarowej struktury, w odpowiedzi na działanie czynników środowiskowych [278-280]. Tego typu skafoldy zastosowano m.in. do regeneracji tkanki nerwowej, aby zatrzymać krwawienie oraz do regeneracji mięśnia sercowego po zawale, jak również w produktach medycznych do powolnego uwalniania leków [281, 282] oraz do DNA, gdzie rozgałęzione cząsteczki DNA hybrydują ze sobą w obecności ligazy w hydrożelu [283]. Metoda wytwarzania skafoldów wykorzystująca samoorganizowalne nanowłókna należy do niewielu, umożliwiających tworzenie biokomponentów o własnościach zbliżonych do naturalnej macierzy pozakomórkowej (j. ang.: extracellular matrix – ECM), a skafoldy zawierające hydrożel, wykonane z użyciem tej technologii, wykazują korzystniejsze własności toksykologiczne i większą biokompatybilność niż tradycyjne materiały. Konwencjonalne hydrożele są szczególnie przydatne do trójwymiarowego lokowania komórek [284]. Hydrożele stosowane w inżynierii tkankowej powinny wykazywać niską lepkość przed wtryskiem i szybko żelować w środowisku fizjologicznym tkanki, a najistotniejsze jest żelowanie (przejście zol-żel) (j. ang.: transition) przez sieciowanie (j. ang.: cross-linking), które może przebiegać zarówno podczas ich wytwarzania *in vitro* jak i *in vivo* w trakcie wtryskiwania (j. ang.: injection). Sieciowanie fizyczne (j. ang.: physical cross-linking) jest wykorzystane m.in. w przypadku poli(N-isopropylakrylamidu) (poli(NIPAAM)), który może być wykorzystany do inżynierii tkankowej po wprowadzeniu kwasu akrylowego (AAc) lub PEG [284, 285] lub biodegradowalnych polimerów, w tym takich jak chitosan, żelatyna, kwas hialuronowy i dekstran [286-290] oraz do kopolimerów blokowych, takich jak poli(tlenek etylenu) PEO-PPO-PEO (Pluronic), poli(laktyd-ko-glikolid) PLGA-PEG-PLGA, PEG-PLLA-PEG, polikaprolakton PCL-PEG-PCL i PEG-PCL-PEG [291-295], a także agarozę (materiał polimerowy, polisacharyd ekstrahowany z wodorostów jako jeden z dwóch podstawowych składników agaru) [284], jako układy termowrażliwe [296], w celu uniknięcia stosowania potencjalnie cytotoksycznego promieniowania ultrafioletowego. Poli(NIPAAM) i hydrożele kopolimerów blokowych mogą

ulegać sieciowaniu w wyniku równoczesnego oddziaływania temperatury oraz pH, jak w przypadku akrylatów [297, 298], takich jak 2-(dimetylamino)etylu metakrylat (DMAEMA) lub 2-(dietylaminoetyl) metyl metakrylat. Samoorganizujące się hydrożele peptydów, w tym zawierające amfifile peptydowe (PAs) mogą formować nanowłókna [299, 300] wykorzystywane do trójwymiarowego formowania kultur tkankowych [299, 301-304]. Wśród hydrożeli sieciowanych chemicznie (j. ang.: chemical cross-linking hydrogels), cechujących się wiązaniami kowalencyjnymi, występują sieciowane światłem poli(glikol etylenowy) diakrylan (PEGDA), poli(glikol etylenowy) dimetakrylan (PEGDMA), poli(fumaran propylenu) (PPF) i oligo[fumaran poli(glikolu etylenowego)] (j. ang.: oligo(poly (ethylene glyco) fumarate – OPF) [305-309], a także naturalne hydrożele jak dekstran, alginian, chitosan i kwas hialuronowy syntezowane z PEGDA/PEGDMA [310-313] oraz hydrożele sieciowane w efekcie reakcji Michaela (j. ang.: Michael-type addition reaction) [314-316] i hydrożele sieciowane zasadami Schiffa (j. ang.: Schiff base – crosslinked hydrogels) [317-320]. W przypadku sieciowania enzymatycznego (j. ang.: enzyme-mediated cross-linking) [283] do katalizy hydrożeli gwiazdowego PEG (j. ang.: star-shaped PEG hydrogels) [321] i hydrożeli PEG katalizowanych przez transglutaminazę tkankową [322] wykorzystywane są transglutaminazy (w tym czynnik XIIIa) i peroksydaza chrzanowa (j. ang.: horseradish peroxidases – HRP) [284], a także tyrozynaza, fosfopanteteinylo transferaza, oksydaza lizynowa, osoczowa oksydaza aminowa i fosfatazy [323], co m.in. umożliwiło opracowanie nowych żeli poprzez wstawianie grup tyraminowych do naturalnych i syntetycznych polimerów, takich jak dekstran, kwas hialuronowy, alginian, celuloza, żelatyna, heparyna i PEG-PPO [324-330]. Do hydrożeli sieciowanych jonowo należą alginian sieciowany wapniem [284] oraz hydrożele chitosan–polilizyna, chitosan–fosforan glicerolu i chitosan–alginian [331-333]. Różne polimery syntetyczne i naturalne wykorzystywano do tego celu, w tym poli(glikol etylenowy) (PEG), oraz kopolimery zawierające PEG [313, 334], kwas hialuronowy (HA) [335] po reakcji utleniania przez koniugaty HA–tyramina [324] oraz w wyniku oddziaływania pomiędzy HA–SH [314, 336] i reakcji Michaela [315, 316], hydrożeli kolagenu i żelatyny przeważnie sieciowanych z użyciem aldehydu glutarowego, genipiny lub rozpuszczalnych w wodzie karbodiimidów [337-340], chitosan [341-344], dekstran 192 [345, 346]. oraz alginian [347]. Hydrożele wykorzystano do odtwarzania siatkówki [348], więzadeł [349], tkanki tłuszczowej [289], nerek [350], mięśni [351], naczyń krwionośnych [352, 353], a także serca, komórek neuronowych, krążków międzykręgowych, kości i chrząstek [284]. Hydrożele wykorzystano w celu zapobiegania zrostom [354, 355], do promowania adhezji komórkowej [316, 356, 357]. W celu poprawy

własności mechanicznych, opracowano tzw. silne hydrożele [358]. Stosuje się trójwymiarowe odwzorowywanie umieszczania ładunkiem komórek w hydrożelu przy wykorzystaniu lasera [359, 360], m.in. do bezpośredniego zapisu komórki śródbłonna do struktur naczyniowych [360]. Do najbardziej zaawansowanych technologicznie metod trójwymiarowego drukowania należy obecnie bezpośrednie drukowanie organów (j. ang.: organ printing) [361, 362], zapewniające największy możliwy obecnie stopień kontroli nad strukturą regenerowanych tkanek. Wiele warstw różnych typów komórek może być drukowanych w celu utworzenia organu [363]. Mieszanina polimery-komórka może być dozowana przy użyciu tej techniki prowadząc do tworzenia hydrożelu komórek [364]. Microfluidics umożliwia tworzenie trójwymiarowych układów komórek [365], jak również można wykorzystać hydrożele z fotopolimeryzujących roztworów polimerów [366], a także techniki SFF, w tym stereolitograficzne do tworzenia skafoldów z hydrożeli PEG [240]. Pierwszy system produkcyjny do trójwymiarowego drukowania tkanek został dostarczony dopiero w roku 2009 w oparciu o technologię NovoGen bioprinting [367]. Trójwymiarową strukturę uzyskuje się przez kolejne formowanie warstw komórek żywych na podłożu żelu lub matrycy cukrowej [368]. Niestety, pomimo ogromnego postępu w wytwarzaniu skomplikowanych konstrukcji tkanek w ciągu ostatnich kilku lat, jest on ograniczony w zakresie kontrolowanego unaczynienia. Unaczynienie (j. ang.: vascularization) nawet wobec drukowania organów, nadal pozostaje wielkim wyzwaniem w inżynierii tkankowej. Rozwój sieci naczyniowej w tkankach metabolicznie funkcjonalnych umożliwia transport substancji odżywczych i usuwanie odpadów, zapewniając zachowanie żywotności komórek przez długi czas [213]. Techniki mikroformowania poprzez drukowanie trójwymiarowe szablonów z włókien agarozy, służących do wytworzenia sieci mikrokanalikowej wewnątrz produktów hydrożelowych, w tym m.in. wewnątrz metakrylowanej żelatyny (j. ang.: methacrylated gelatin – GelMA), gwiazdowego poli(glikolu etylenowego-ko-laktyd) akrylanu (j. ang.: star poly(ethylene glycol-co-lactide) acrylate – SPELA), poli(glikolu etylenowego) dimetakrylanu (j. ang.: poly(ethylene glycol) dimethacrylate – PEGDMA) i poli(glikolu etylenowego) diakrylanu (j. ang.: poly(ethylene glycol) diacrylate – PEGDA) o różnych stężeniach. Potwierdzono też skuteczne formowanie jednowarstwowego śródbłonna wewnątrz wytworzonych kanałów (j. ang.: endothelial monolayers within the fabricated channels) [369]. Z kolei z doniesień prasowych wiadomo, że Chiny zaangażowały prawie 0,5 mld dolarów USD na rzecz ustanowienia 10 krajowych instytutów rozwoju druku organów [370], w których w 2013 roku rozpoczęto drukowanie uszu, wątroby i nerek z żywych tkanek i przewiduje się, że w pełni funkcjonalne drukowane narządy mogą być możliwe do uzyskania w ciągu

najbliższych kilkunastu lat [371, 372]. Tymczasem w pierwszych tygodniach drugiego kwartału 2014 roku doniesiono, że zespół australijski metodą tą po raz pierwszy uzyskał wydruk tkankowy nerki [373], natomiast amerykański zespół potwierdził 1 sierpnia 2014 roku gotowość druku serca [374].

Wykonany gruntowny przegląd stanu zagadnienia wskazuje na wysoki poziom zaawansowania technologicznego metod wytwarzania skafoldów tkankowych, w tym kosztnych jako podstawy technicznej w inżynierii tkankowej. W kolejnej części niniejszego opracowania szczególna uwaga zostanie zwrócona na oryginalne autorskie rozwiązania dotyczące konstrukcji, technologii i materiałów wykorzystywanych na urządzenia możliwe do zastosowania w inżynierii tkankowej i implantologii.

2.5. Ogólna charakterystyka tytanu i jego stopów możliwych do zastosowania na szkielety kostne i tkankowe

Jak wykazano w poprzednich podrozdziałach niniejszego opracowania spośród metali najistotniejszą rolę w produkcji implantów oraz szkieletów kostnych i tkankowych odgrywa tytan i jego stopy. Należy on również do materiałów inżynierskich, które w szczególności nadają się do wykorzystania w technologiach przyrostowych, w tym m.in. a właściwie głównie do selektywnego spiekania laserowego, jako technologii wytwarzania materiałów mikroporowatych, możliwych do zastosowania do wytwarzania wymienionych produktów i urządzeń medycznych, a zwłaszcza w razie potrzeby zasiedlania wytworzonych porów przez naturalne komórki ludzkie. Z tego względu w niniejszym podrozdziale ogólnie scharakteryzowano tytan i jego stopy.

Tytan jest pierwiastkiem o liczbie atomowej 22, dziewiątym w kolejności wśród występujących na Ziemi (0,63%) i siódmym wśród metali [24, 375], z tym że zawsze w rudach innych pierwiastków, najczęściej w skałach magmowych oraz skałach osadowych. Całkowite zasoby tytanu na Ziemi szacuje się na ponad 600 milionów ton [376]. Występuje głównie pod postacią minerałów: anatazytu, brukitu, ilmenitu, perowskitu, rutyłu, tytanitu oraz w wielu rudach żelaza, z których jedynie ilmenit i rutil mają znaczenie ekonomiczne. Złóża ilmenitu znajdują się w Australii (30,6% – orientacyjny udział w światowej produkcji dwutlenku tytanu), Kanadzie (18,2%), Nowej Zelandii, Norwegii (9,1%) i Ukrainie (8,5%), a rutyłu w Ameryce Północnej i Republice Południowej Afryki (20,1%). Roczna produkcja wynosi ok. 90 000 ton metalu i 4,3 milionów ton dwutlenku tytanu. Tytan jest zawarty w meteorytach, występuje na Słońcu i w gwiazdach typu M, a także stwierdzono jego obecność (12,1%) w skałach dostarczonych z Księżyca [377].

Otrzymywanie metalicznego tytanu zachodzi w pięciu głównych etapach [378]:

- przeróbka rud tytanu,
- otrzymywanie czterochlorku tytanu $TiCl_4$,
- redukcja $TiCl_4$ magnezem,
- oczyszczanie tytanu,
- topienie tytanu.

Ponieważ tytan reaguje z tlenem w temperaturze wyższej od $610^{\circ}C$, nie można go otrzymać przez redukcję dwutlenku tytanu. Do wytwarzania metalicznego tytanu stosowany jest

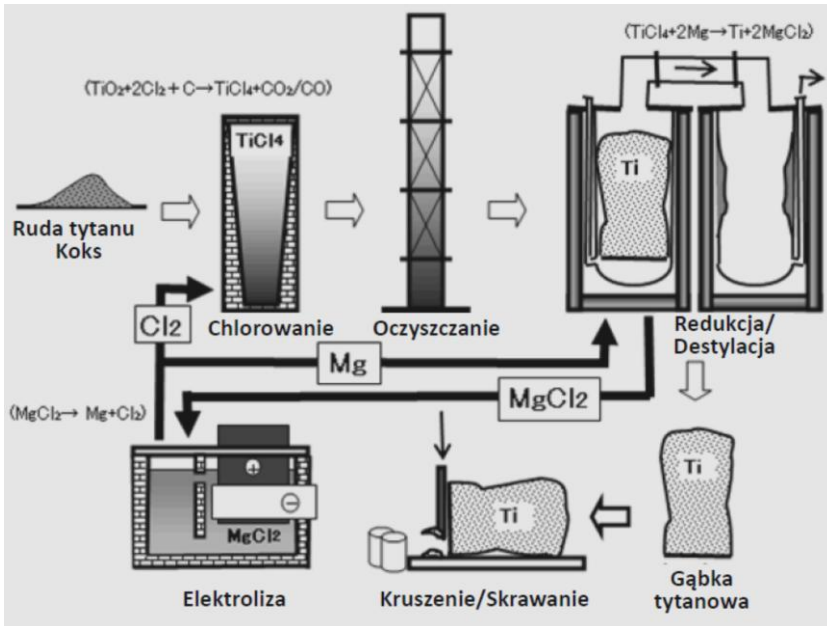
obecnie niemal powszechnie pirometalurgiczny proces W. Krolla, opracowany w 1945 roku w Luksemburgu, wymagający użycia magnezu, co znacznie podwyższa koszty uzyskiwania tytanu na skalę przemysłową [379]. Oczyszczony rutil lub ilmenit z rudy zbrykietowany z węglem jest redukowany naftą oraz koksem w reaktorze fluizacyjnym w temperaturze 1000°C, a następnie mieszany z chlorem gazowym, w wyniku czego powstaje czterochlorek tytanu $TiCl_4$ oraz jako zanieczyszczenia inne chlorki, które są usuwane przez destylację frakcyjną. Z kolei w retorcie ze stali nierdzewnej następuje redukcja uzyskanego $TiCl_4$ magnezem, przy 15-20% nadmiarze reduktora, w temperaturze 800-850°C do czystego tytanu. W wyniku reakcji, oprócz czystego tytanu, powstaje chlorek magnezu $MgCl_2$, który można ponownie zredukować do czystego magnezu, oraz w wyniku ubocznych reakcji redukcja chlorku tytanu do jego niższych chlorków $TiCl_2$ i $TiCl_3$. Techniczny tytan otrzymany w procesie W. Krolla powinien być rafinowany, może być oczyszczany przez ługowanie lub destylowany w próżni. Zasada procesu pozwalającego na otrzymanie czystego tytanu polega na rozkładzie termicznym czterojodku tytanu.



W temperaturze ok. 1400°C i przy wymaganym ciśnieniu reakcja ta przebiega w kierunku dysocjacji czterojodku tytanu, natomiast niska temperatura sprzyja jego tworzeniu. Zaletą tego procesu jest otrzymanie czystego tytanu niezawierającego domieszek (tlenu, azotu, węgla) obniżających jego własności mechaniczne [375, 378]. Otrzymana metaliczna gąbka tytanu jest poddawana obróbce mechanicznej przez kruszenie lub skrawanie, a następnie jest topiona w próżniowym piecu elektrycznym, w piecach łukowych, indukcyjnych, plazmowych, a zwłaszcza elektronowych, w temperaturze wyższej od 1668°C, a duża aktywność chemiczna tytanu w tej temperaturze oraz reagowanie niemal ze wszystkimi materiałami ogniotrwałymi, narzucają szczególne wymagania technologiczne i wymagają stosowania dwutlenku toru, zrekrystalizowanego tlenku wapnia i grafitu. Odlane sztabki tytanowe krystalizują w próżni, aby nie dopuścić do ich utlenienia (rys. 2.1).

Tytan jest podstawowym składnikiem wielu opracowanych i stosowanych w przemyśle stopów zawierających od jednego do kilku pierwiastków stopowych, w stężeniu od dziesiątych części % do kilkudziesięciu % [24, 375, 378]. Kształtowanie zmian struktury krystalograficznej przez dodatki stopowe i procesy cieplno-mechaniczne stanowi podstawę rozwoju stopów tytanu i ich własności w szerokim zakresie. Struktura fazowa stanowi również podstawę kategoryzacji produktów ze stopów tytanu, na jednofazowe α , dwufazowe $\alpha + \beta$ oraz

jednofazowe β . W tabelicy 2.12 podano wpływ dodatków stopowych na stabilizację odpowiednio faz α lub β w stopach tytanu [24, 375].

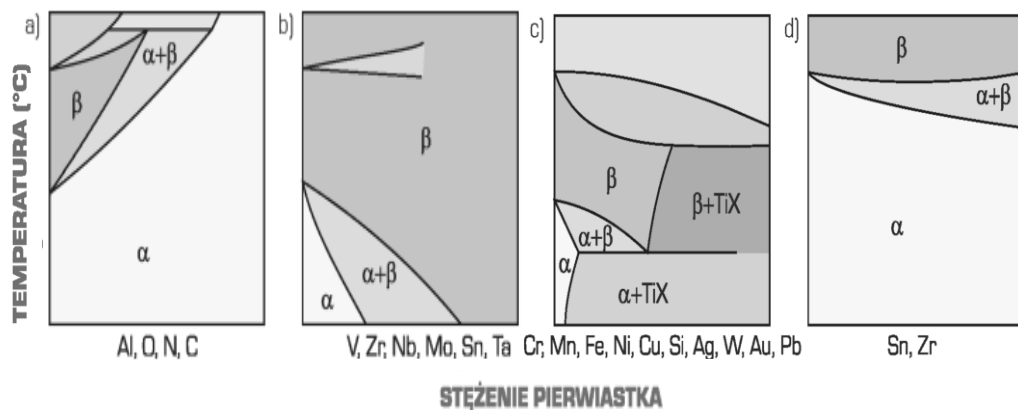


Rysunek 2.1. Schemat procesu W. Krolla wytwarzania tytanu (opracowano według materiałów promocyjnych Toho Titanium Co., Ltd. w Chigasaki City, Kanagawa w Japonii)

Tabela 2.12. Oddziaływanie dodatków stopowych na strukturę stopów tytanu (według S. Lampmana) [375]

Oddziaływanie na strukturę	Dodatek stopowy	Zakres stężenia masowego, %
Stabilizacja fazy α	Al	2-7
	Sn	2-6
Stabilizacja fazy β	V	2-20
	Mo	2-20
	Cr	2-12
Stabilizacja fazy β , umocnienie faz α i β	Cu	2-6
Słaba stabilizacja fazy β i zmniejszenie stopnia przemiany	Zr	2-8
Zwiększenie odporności na pełzanie	Si	0,05-1

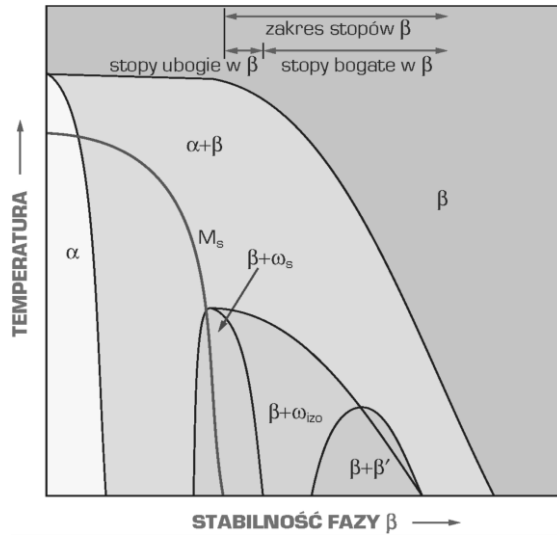
Stopy tytanu są umacniane przez dodatki pierwiastków stopowych, np. Al, Mo, Cr, Si, Fe. Własności Ti i jego stopów ulegają pogorszeniu w obecności zanieczyszczeń, którymi są głównie pierwiastki międzywęzłowe, tj. O, N, C, H. Schematy układów równowagi, jakie tworzy tytan z dodatkami stopowymi, przedstawiono na rysunku 2.2, natomiast na rysunku 2.3 przedstawiono schematycznie wykres równowagi stopów β stabilizowanych przez dodatki stopowe, z zaznaczeniem zakresu stabilności stopów bogatych i ubogich w fazę β .



Rysunek 2.2. Schematy wykresów równowagi tytanu z różnymi dodatkami stopowymi [375]

W tabelicy 2.13 podano przykłady stopów tytanu z podziałem na poszczególne grupy ze względu na skład fazowy. W tabelicy 2.14 przedstawiono natomiast charakterystykę porównawczą własności wybranych stopów tytanu [375].

Stopy tytanu charakteryzują się kombinacją własności wyróżniającą je spośród innych materiałów – wysoką wytrzymałością względną i żarowytrzymałością w połączeniu z dobrą odpornością na korozję. Stopy tytanu są stosowane w przemyśle środków transportu, głównie lotniczym i okrętowym, chemicznym na elementy aparatury chemicznej, spożywczym, elektrotechnicznym, elektronicznym, celulozowo-papierniczym, sprzętu medycznego i sportowego, a także w geologii i medycynie. Stosowane są na elementy turbin parowych, silników odrzutowych, samochodów, okrętów (stosując je do budowy niektórych nowoczesnych okrętów podwodnych nie tylko wykorzystuje się ich wysoką wytrzymałość i odporność na korozję, ale i paramagnetyczność utrudniającą wykrycie metodami magnetycznymi), na pokrycia samolotów i raket i wiele innych. Bez obaw można stosować tytan w budowie reaktorów atomowych, gdyż jego izotopy nie stają się promieniotwórcze [24, 375].



Rysunek 2.3. Schemat wykresu równowagi obejmującego stopy tytanu z zaznaczeniem obszarów stabilności stopów bogatych i ubogich w fazę β ; fazy ω_s , ω_{izo} i β' wydzielają się jako metastabilne podczas starzenia (według T. Dueringa i J. Williamsa) [375]

Tablica 2.13. Przykłady stopów tytanu [24, 375]

Przykłady stopów w grupach ¹⁾			
Stopy α	Stopy zbliżone do α	Stopy $\alpha + \beta$	Stopy β
TiAl5Sn2,5, TiPd, TiCu2,5, TiNi1Mo	TiAl8Mo1V1, TiSn11Zr5Al2,3Mo1Si, TiSn11Al2,5Zr1Mo1Si, TiAl6Zr4Sn2Mo2, TiAl5Sn5Zr2Mo2Si, TiAl6Nb2Ta1Mo1, TiAl6Sn2Zr1,5Mo1BiSi, TiAl6Zr5MoSi, TiAl5,5Sn3,5Zr3Nb1MoSi, TiAl5,5Sn4,5Zr4Nb0,7MoSi, TiAl6Sn4Zr3,5NbMoSiC	TiMn8, TiAl3V2,5, TiAl4V4, TiAl6V4, TiNb7Al6, TiAl6V6Sn2, TiAl7Mo4, TiAl6Mo6Zr4Sn2, TiAl6Sn2Zr2Mo2Cr2Si, TiMo5Al4,5Cr1,5, TiAl4Mo4Sn2Si, TiAl4Mo4Sn4Si, TiAl5Mo4Cr4Sn2Zr2, TiSn11Mo4Al2Si	TiV13Cr11Al3, TiMo8V8Al3Fe2, TiV8Cr6Mo4Zr4Al3, TiMo11,5Zr6Sn4,5, TiMo15Zr5Al3, TiV10Al3Fe2, TiV15Cr3Al3Sn3, TiAl5Mo4Cr4Sn2Zr2
¹⁾ Podane liczby odpowiadają średniemu stężeniu masowemu w % danego pierwiastka w stopie tytanu.			

Tablica 2.14. Charakterystyka porównawcza stopów tytanu (opracowano według danych zebranych przez N.A. Watermana i M.F. Ashby'ego) [24, 375]

Grupa stopów	Skład chemiczny lub znak stopu	Postać	Stan	granica astyczności	Wytrzymałość na rozciąganie	Praca łamania	Moduł sprężystości	Wydłużenie	Przewężenie	Kowalność ¹⁾	Skrawalność ¹⁾	Spawalność ¹⁾	
Tytan techniczny (faza α)	Ti (0,05% O i N)	●	●	●	●	-	●	○	○	○	○	○	
	Ti (0,07% O i N)	Σ ²⁾	●	●	●	-	●	○	○	○	○	○	
	Ti (0,13% O i N)	Σ	●	●	●	●	○	●	○	-	-	-	-
			●	●	●	-	-	-	⊗	○	○	○	○
	Ti (0,20% O i N)	Σ	●	●	●	●	-	●	⊗	-	-	-	-
			●	●	●	-	-	-	⊗	○	○	○	○
	Ti (0,28% O i N)	●/○	●	●	⊗	●	●	●	○	○	○	○	
Ti (0,30% O i N)	●/◆/○/♠	●	●	●	⊗	-	●	⊗	⊗	○	○	○	
Stopy Ti (faza α)	TiPd	●/♠	●	●	●	-	●	○	○	○	○	○	
	TiCu _{2,5}	Σ	●	●	⊗	⊗	-	●	○	-	-	-	
			●	●	●	⊗	-	-	○	⊗	○	○	○
			●	⊗	⊗	●	-	●	⊗	-	-	-	-
TiNi1Mo	●/○/○/○/○	●	●	●	-	●	⊗	●	○	○	○		
Stopy Ti (mieszanka α+β)	TiAl6V4	Σ	●	○	○	●	●	○	○	○	○	○	
	⊗		○	○	-	-	●	○	-	-	-		
	TiAl4V4	Σ bez ⊗/○	●	○	○	-	●	●	-	○	○	○	
	TiAl3V2,5	Σ bez ⊗	●	●	⊗	-	⊗	○	-	○	○	○	
	TiNb7Al6	●/○/◆/♠	●	○	○	-	⊗	●	-	○	○	○	
	TiAl4Mo4Sn2Si	●/○/♥	⊗	○	○	●	○	⊗	○	⊗	○	○	○
			○	-	-	-	-	○	●	●	●	○	○
	TiAl4Mo4Sn4Si	●/♠/♥	⊗	○	○	●	○	○	●	○	○	○	○
			○	-	-	-	-	○	●	●	●	⊗	○
	TiSn11Mo4Al2Si	●/♠/♥	○	○	○	●	○	○	●	○	○	○	○
			⊗	○	○	○	○	○	○	○	-	-	-
	TiAl6V6Sn2	●/○/○/○	●	○	○	●	○	○	○	○	-	-	-
⊗			○	○	●	○	○	○	⊗	○	-	-	
TiAl6Mo6Zr4Sn2	●/○/○/♥	⊗	○	○	-	○	○	○	-	-	-		
TiAl5Mo4Cr4Sn2Zr2	●/♥	⊗	○	○	-	○	○	⊗	-	-	○	-	
TiMo5Al4,5Cr1,5	●/○/♥	⊗	○	○	-	○	○	○	-	-	-	-	
		○	○	○	-	-	-	-	-	-	-	-	

Grupa stopów	Skład chemiczny lub znak stopu	Postać	Stan	Granica plastyczności	Wytrzymałość na rozciąganie	Praca lamania	Moduł sprężystości	Wydłużenie	Przewężenie	Kowalność ¹⁾	Skrwalność ¹⁾	Spawalność ¹⁾
Stopy Ti (zbliżone do α)	TiSn11Al2,5Zr1-Mo1Si	●/♥	● ○	○ ○	○ ○	● -	● -	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●
	TiAl6Zr4Sn2-Mo2Si	●/●/○/♥	●	○	○	-	●	●	●	●	●	●
	TiAl8Mo1V1	●/●/○/♥	●	○	○	●	○	●	●	●	●	●
	TiAl6Zr5MoSi	●/♠/♥	●	○	○	-	○	●	●	○	●	○
	TiAl5,5Sn3Zr3-Nb1MoSi	●/♠/♥	●	○	○	-	●	●	●	○	●	○
	TiAl6Sn4Zr3,5-NbMoSiC	●/♠/♥	● ●	○ ○	○ ○	- -	● -	● ●	● ●	● -	● -	○ -
Stopy Ti (faza β)	TiV15Cr3Al3Sn3	●/●	●	○	○	-	●	●	-	○	○	○
			○	○	○	-	●	-	-	-	-	-
			○	○	○	-	-	●	-	-	-	-
			◆	○	○	-	-	●	-	-	-	-
	TiV10Al3Fe2	●/○/♥	●	○	○	-	●	●	●	○	●	-
			●	○	○	-	○	●	●	-	-	-
Oznaczenia	Postać		Stan	MPa	MPa	J	GPa	%	%	% ¹⁾	% ¹⁾	% ¹⁾
	●	pręty, kęsiska	wyżarzony	100-300	200-400	10-20	80-90	5-10	15-25	40-50	10-25	10-25
	●	blachy	podwójnie wyżarzony	301-500	401-600	21-30	91-100	11-15	26-35	51-60	26-40	26-40
	●	taśmy	utwardzony wydzieleniowo po przesycaniu w wodzie	501-700	601-800	31-40	101-110	16-20	36-45	61-70	41-55	41-55
	○	arkusze	utwardzony wydzieleniowo po przesycaniu w powietrzu	701-900	801-1000	41-50	111-120	21-25	46-55	71-80	56-70	56-70
	○	rury	utwardzony wydzieleniowo po przesycaniu w oleju	901-1100	1001-1200	51-60	121-130	26-30	56-65	81-90	71-85	71-85
	○	druty	przesycony, odkształcony plastycznie na zimno 20% i starzony	1101-1300	1201-1400	61-70	131-140	31-35	66-75	91-100	86-100	86-100
	◆	elementy wyciskane	przesycony, odkształcony plastycznie na zimno 60% i starzony	¹⁾ Jednostki umowne; jako 100% przyjęto najwyższą wartość charakteryzującą jeden spośród analizowanych stopów. ²⁾ Σ wszystkie postacie półproduktów hutniczych. - Brak danych lub nie dotyczy.								
♠	odlewy	-										
♥	odkuwki	-										

Unikatowe własności stopów tytanu stwarzają znaczne możliwości doskonalenia procesów technologicznych, oprzyrządowania i produktów w najbardziej różnorodnych gałęziach przemysłu i gospodarki. Obecnie wytwarza się stopy tytanu odporne na korozję, o dużej wytrzymałości (do 1800 MPa), do pracy w temperaturze podwyższonej (do 800°C) i niskiej (do -250°C) oraz stopy o specjalnych własnościach. Na przykład stop typu TiAl5Sn3 o strukturze roztworu α , cechujący się wytrzymałością w granicach 750-1000 MPa, wykazuje ponadto bardzo dobrą żarowytrzymałość i odporność na korozję w większości agresywnych chemicznie środowisk [375].

Stopy tytanu o strukturze jednofazowej α wykazują lepszą odporność na pęcznienie od stopów β , wobec czego znajdują zastosowanie do pracy w wysokiej temperaturze. Ponieważ nie wykazują progu kruchości, w przeciwieństwie do stopów jednofazowych β , są także stosowane do pracy w warunkach kriogenicznych. Stopy te charakteryzują się wystarczającą wytrzymałością, ciągliwością i spawalnością, lecz gorszą odkształcalnością niż stopy o strukturze β . Wadom obróbki plastycznej tych stopów można przeciwdziałać przez zmniejszenie stopnia przerobu oraz częstsze podgrzewanie międzyoperacyjne. W przeciwieństwie do stopów o strukturze fazy β , stopy α nie mogą być umacniane metodami obróbki cieplnej. Stosowane może być tylko wyżarzanie normalizujące lub rekrytalizujące w celu obniżenia poziomu naprężeń wewnętrznych.

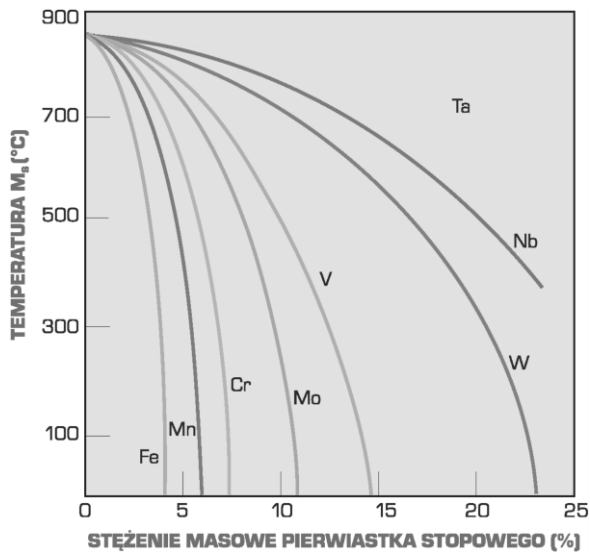
Stopy o strukturze dwufazowej $\alpha + \beta$ zawierają 10-50% fazy β w temperaturze pokojowej. Najbardziej typowym przykładem tych stopów jest stop TiAl6V4. Chociaż ten stop cechuje się małą odkształcalnością, generalnie stopy dwufazowe charakteryzują się dobrą podatnością na odkształcenie plastyczne. Własności tych stopów mogą być kształtowane metodą obróbki cieplnej. Przesycanie i następne starzenie odpowiednio w 480-650°C związane jest z wydzielaniem fazy α w osnowie β [375].

Stopy o strukturze fazy β zawierające dodatki stopowe obniżające temperaturę przemiany $\alpha \rightarrow \beta$ cechują się bardzo dobrą odkształcalnością w znacznie szerszym zakresie temperatury odkształcenia niż w przypadku stopów α , a blachy są walcowane. Dodatki stopowe stabilizujące fazę β można podzielić na 2 grupy: izomorficzne z fazą β lub sprzyjające przemianie eutektoidalnej. Izomorficzna faza α powstaje z rozpadu metastabilnej fazy β z dodatkami pierwszej grupy, natomiast druga grupa dodatków powoduje przemianę eutektoidalną, która występuje w temperaturze ponad 335°C poniżej temperatury przemiany $\beta \rightarrow \alpha$ czystego

tytanu. Powstaje wówczas mieszanina eutektoidalna $\beta \rightarrow \alpha + \text{TiX}$, gdzie X jest dodatkiem stopowym. Stopy β charakteryzują się bardzo dobrą utwardzalnością, a ich obróbka cieplna polega na przesycaaniu i następnym starzeniu w 450-650°C, w wyniku czego powstaje struktura dyspersyjnych cząstek wydzieleni fazy TiX w osnowie roztworu α .

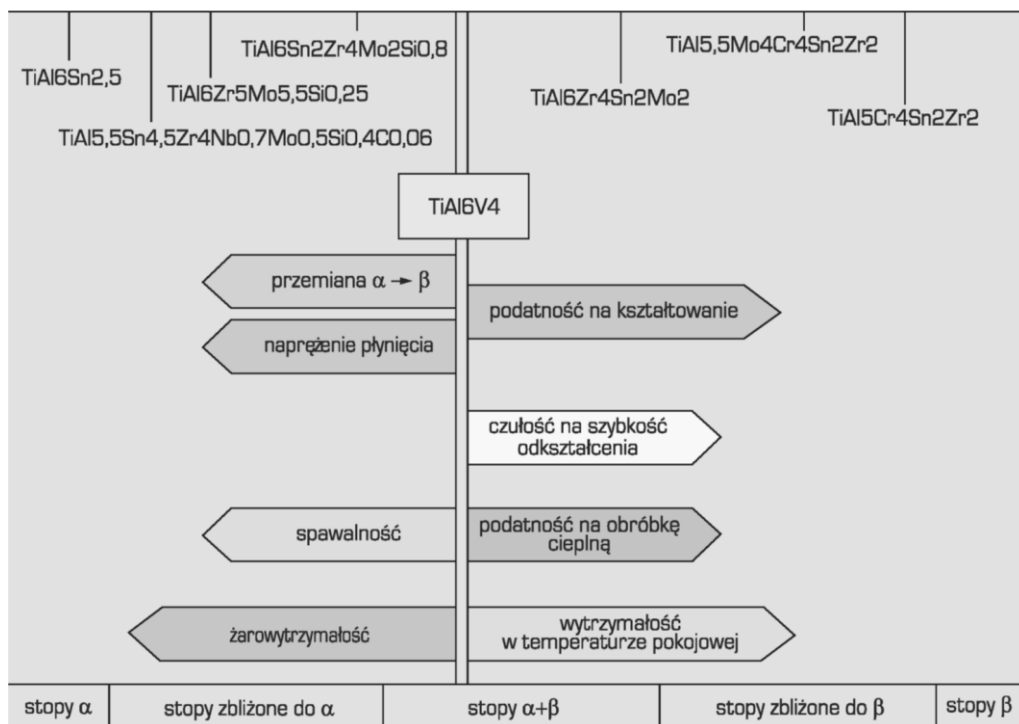
Przemiana fazowa $\beta \rightarrow \alpha$ może przebiegać dyfuzyjnie i bezdyfuzyjnie jako martenzytyczna, w zależności od szybkości chłodzenia. W wyniku przemiany martenzytycznej powstaje faza α' lub α'' przy wysokim stopniu stopowości. Fazy α , α' i α'' mają strukturę heksagonalną A3, lecz różnią się stopniem zdefektowania [375].

W trakcie odpuszczania zahartowanych roztworów α' i α'' następuje wydzielanie cząstek β lub faz międzymetalicznych TiX. Zwiększenie stężenia pierwiastków stabilizujących fazę β oraz zwiększenie szybkości chłodzenia wpływa na obniżenie temperatury początku przemiany martenzytycznej (rys. 2.4).



Rysunek 2.4. Wpływ pierwiastków stopowych na temperaturę początku przemiany martenzytycznej M_s stopów tytanu [375]

Tytan i jego stopy należą do materiałów konstrukcyjnych nadających się do kształtowania metodami obróbki plastycznej, jednak wymagają zachowania specjalnych warunków, np. zabezpieczania przed utlenianiem w wysokiej temperaturze. Kształtowanie stopów tytanu w temperaturze pokojowej jest trudne ze względu na duży opór odkształcenia.



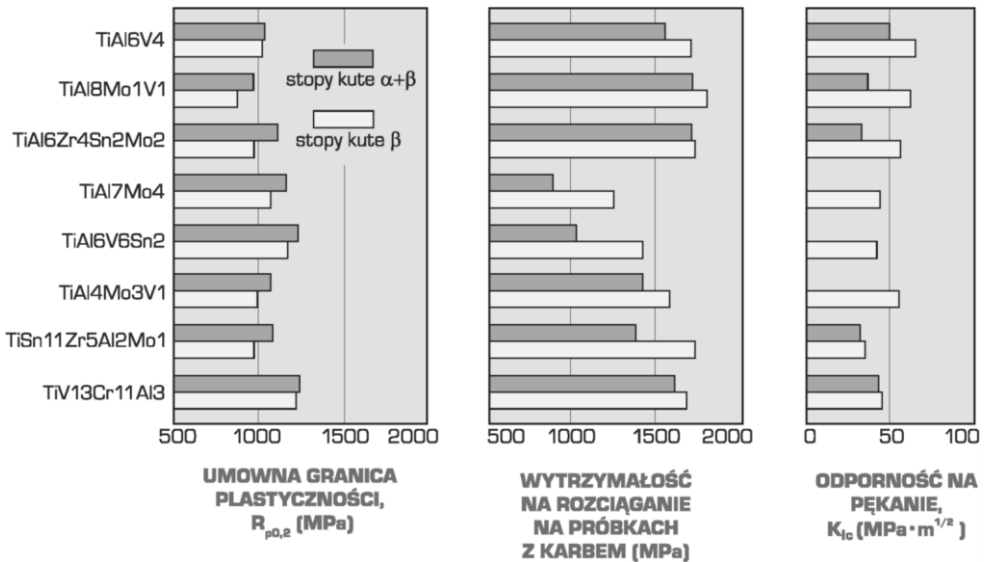
Rysunek 2.5. Schemat własności różnych grup stopów tytanu (według S. Lampmana) [375]

Właściwości stopów tytanu zależą od klasy stopu oraz od morfologii fazy α (rys. 2.5). Na rysunku 2.6 porównano podstawowe właściwości różnych stopów tytanu.

Spawanie tytanu wykonuje się w osłonie gazów obojętnych, pod topnikiem lub w próżni, co zabezpiecza obszar spawany przed reagowaniem z gazami atmosferycznymi. Uzyskane spoiny mają właściwości porównywalne z materiałem rodzimym [24, 375].

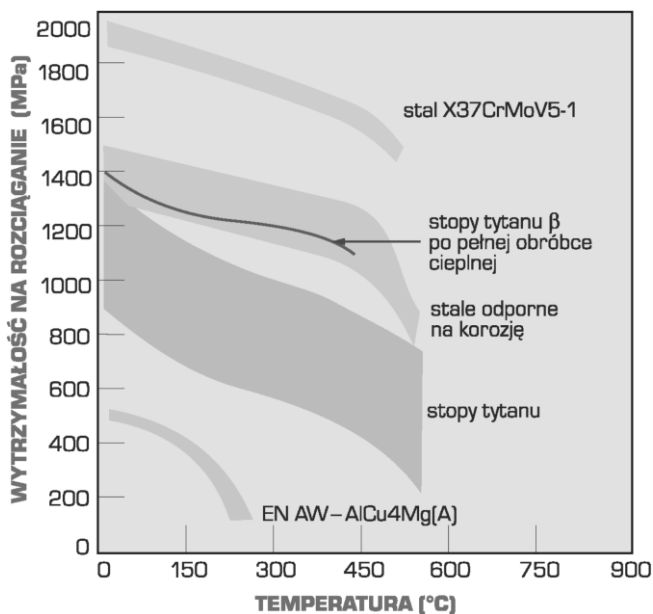
Wykonywanie odlewów ze stopów tytanu stwarza znaczne trudności z powodu wysokiej temperatury topnienia, dużej rozpuszczalności tlenu i azotu w ciekłym tytanie oraz dużej lepkości stopów w temperaturze odlewania (związanej z małą pojemnością cieplną tytanu). Przy zachowaniu ustalonych warunków możliwe jest jednak otrzymanie odlewów o wysokiej jakości.

Podczas obróbki skrawaniem stopy tytanu należą do materiałów trudno obrabialnych. Wynika to z ich właściwości fizykochemicznych oraz tendencji do tworzenia narostu i przylepiania się wiórów podczas skrawania, co sprzyja szybkiemu tępieniu i wykruszaniu się ostrza narzędzia skrawającego. Pracochłonność obróbki stopów tytanu jest kilkakrotnie większa niż podczas skrawania elementów ze stopów żelaza.



Rysunek 2.6. Porównanie własności mechanicznych wybranych stopów tytanu (według S. Lampmana) [375]

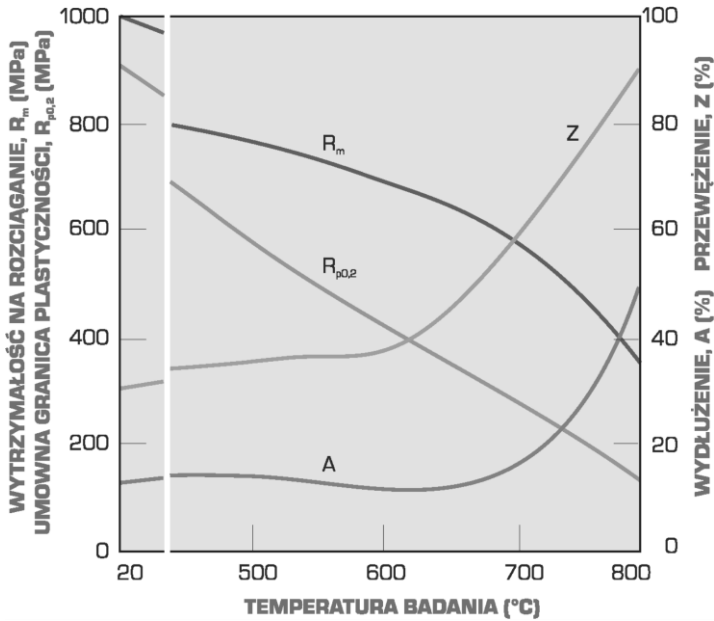
W porównaniu z innymi materiałami konstrukcyjnymi, tytan i jego stopy wyróżniają się przede wszystkim dużą wytrzymałością względną (stosunek wytrzymałości do gęstości) w szerokim zakresie temperatury. Na rysunku 2.7 porównano własności wytrzymałościowe oraz stosunek wytrzymałości do gęstości w podwyższonej temperaturze badania różnych materiałów inżynierskich ze stopami tytanu. Wytrzymałość na rozciąganie stopów tytanu osiąga 1500 MPa, co przy ich gęstości ok. 4,5 g/cm³ daje wytrzymałość względną równą 33. Natomiast powszechnie produkowane stale, o wytrzymałości na rozciąganie 1500-1800 MPa i gęstości 7,8 g/cm³, mają wytrzymałość względną 19-23. Wytrzymałość względną stopów aluminium i magnezu również ustępuje wytrzymałości stopów tytanu (i to tym bardziej, im wyższa jest temperatura pracy, na przykład w temperaturze 300-350°C stopy tytanu są dziesięciokrotnie bardziej wytrzymałe) stąd też ich duże zastosowanie w konstrukcjach lotniczych i kosmicznych. Niektóre stopy tytanu zachowują swoje własności w wysokiej temperaturze, np. wieloskładnikowy, żarowytrzymały stop typu TiZr11Al8Nb1MoSi, o strukturze roztworu α z wydzieleniami fazy międzymetalicznej Ti₃Al, jest przeznaczony do długotrwałej pracy w temperaturze nawet do 800°C (rys. 2.8), np. na łopatki i dyski sprężarek. Wytrzymałość względną tego stopu przewyższa ok. 2-krotnie wytrzymałość stali odpornych na korozję, a wytrzymałość zmęczeniowa jest 2,5 razy większa.



Rysunek 2.7. Porównanie wytrzymałości na rozciąganie różnych materiałów inżynierskich w podwyższonej temperaturze badania (według S. Lampmana) [375]

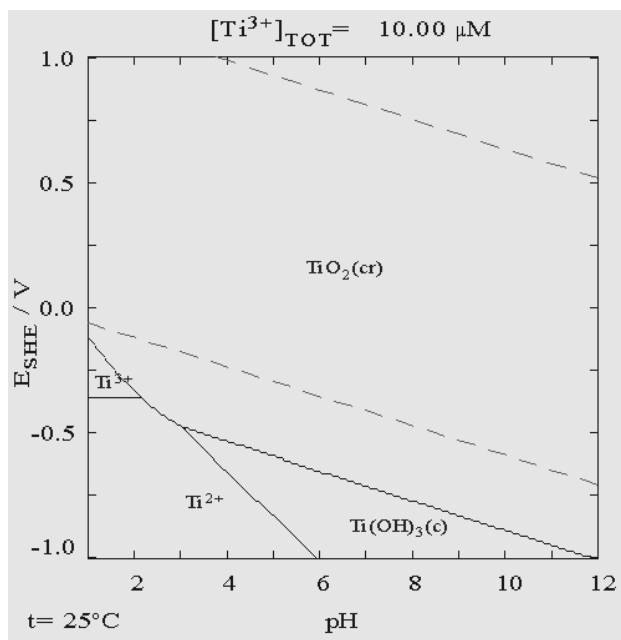
Największe własności wytrzymałościowe osiągają stopy Ti o strukturze dwufazowej $\alpha + \beta$. Uzyskuje się je wykorzystując przemiany fazowe zachodzące w tych stopach podczas obróbki cieplnej. W szczególności podczas chłodzenia tych stopów z zakresu istnienia fazy β zachodzi przemiana bezdyfuzyjna typu martenzytycznego w fazy α' lub α'' . Fazy te są roztworami różnowęzłowymi, więc nie wykazują tak dużego umocnienia jak martenzyt w stalach (będący przesyconym roztworem międzywęzłowym). W czasie następnego odpuszczania przebiega rozpad fazy martenzytycznej, często przez fazy pośrednie, z utworzeniem bardzo dyspersyjnych wydzieleni fazy β . Powoduje to zwiększenie wytrzymałości stopów o ok. 20 do 30% w porównaniu ze stanem zahartowanym. Na przykład, często stosowany stop typu TiAl6V4 może być hartowany z 880-950°C i odpuszczany w zakresie 400-600°C przez co osiąga wytrzymałość do ok. 1200 MPa. Stosowany jest na różnorodne elementy konstrukcyjne, zbiorniki ciśnieniowe (także pracujące w bardzo niskiej temperaturze), silnie obciążone elementy maszyn oraz różne elementy w przemyśle lotniczym i kosmicznym [375].

Tytan reaguje z kwasem siarkowym, fluorowodorowym, solnym (na gorąco) i stężonym azotowym oraz z gorącymi mocnymi zasadami; silnie ogrzany reaguje z tlenem, fluorowcami, azotem, siarką i węglem; wchłania w swoją sieć przestrzenną gazowy wodór i tlen. Jednakże Ti



Rysunek 2.8. Wpływ temperatury badania na własności stopu typu TiZr11Al8Nb1MoSi [375]

jest odporny na czynniki atmosferyczne oraz jest odporny na korozję w wielu innych środowiskach. Jest odporny na działanie rozcieńczonych kwasów np. siarkowego, solnego i większości kwasów organicznych, chloru gazowego oraz roztworów zasadowych oraz morskiej wody [380]. Wykres Pourbaix dla tytanu ukazuje bardzo wysoką reaktywność termodynamiczną przy niskiej aktywności z wodą i tlenem (rys. 2.9) [381]. Jego odporność na korozję jest znacznie większa niż żelaza, chromu lub niklu i jest związana z szybkim tworzeniem się na jego powierzchni cienkiej, pasywnej warstwy tlenków, mocno związanych z osnową metalu podstawowego, o grubości ok. 2 nm (po czterech latach osiąga grubość 25 nm), uniemożliwiającej bezpośrednią styczność metalu ze środowiskiem i dodatkowo zwiększającej odporność na korozję [376]. Warstwę pasywną tworzą nie tylko tlenki tytanu, lecz również np. siarczan tytanu $TiOSO_4$ w stężonym roztworze kwasu siarkowego lub wodorki tytanu w niektórych roztworach kwasu siarkowego i solnego. Wiele stopów tytanu ma znacznie wyższą odporność na korozję w różnych środowiskach w porównaniu z czystym tytanem, np. stop z dodatkiem ok. 0,2% Pd (o strukturze roztworu α), lub szczególnie odporny na korozję stop tytanu zawierający ok. 33% Mo (o strukturze roztworu β). W obecności związków organicznych tytan i jego stopy cechują się wyłącznie bardzo dużą odpornością na korozję [375].



Rysunek 2.9. Wykres Pourbaix dla tytanu w wodzie

Ze względu na bardzo dużą odporność na korozję, tytan i jego stopy znajdują też zastosowanie w budowie maszyn i aparatury chemicznej, przy czym wyższy koszt aparatury szybko rekompensuje się dzięki znacznemu przedłużeniu trwałości oraz zmniejszeniu strat związanych z remontami i wymianą oprzyrządowania.

W tabelicy 2.15 zestawiono obszary zastosowania tytanu i jego stopów.

Tytan i jego stopy są dobrze tolerowane przez organizm ludzki i znajdują coraz szersze zastosowanie w medycynie, zarówno w protetyce (np. na protezy stawów i różnorodne implanty, w tym druty śródszpikowe). Implanty ze stopów tytanu, pomimo że kosztowniejsze, mają wiele zalet w porównaniu ze stopami żelaza: są lżejsze i przede wszystkim nie ulegają korozji przez wiele lat. Właściwości biologiczne i fizykochemiczne tytanu spowodowały znaczący przełom w biomedycynie. Ponieważ tytan nie jest ferromagnetykiem pacjenci z implantami tytanowymi mogą być bezpiecznie badani metodami tomograficznymi obrazowania rezonansu magnetycznego MRI. Przygotowując tytan do wszczepienia należy go oczyścić w strumieniu plazmy, który po skończonym procesie ulega natychmiastowemu utlenieniu [376]. Tytan stosowany jest także w protetyce dentystycznej. Wykazuje kilkakrotnie niższe niż tradycyjne materiały protetyczne przewodnictwo cieplne, dużą twardość, wytrzymałość mechaniczną oraz

Tablica 2.15. Główne obszary zastosowania tytanu i jego stopów
(opracowano według M.M. Schwartz) [24, 375]

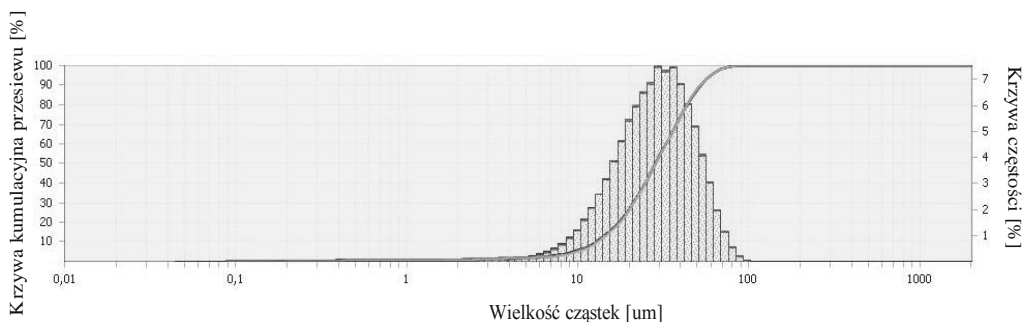
Zakresy zastosowań	Szczegółowe zastosowania
Turbiny gazowe	Obudowa, tarcze, łopatki sprężarki, przewody
Konstrukcje samolotów	Konstrukcja nośna skrzydeł, belki nośne kół, przewody hydrauliczne
Instalacje chemiczne	Mieszalniki, wymienniki ciepła, kondensatory, rurociągi
Petrochemia i chemia organiczna	Reaktory, kondensatory, przegrzewacze,
Energetyka	Kondensatory, łopatki turbin
Elektroliza	Katody dla miedzi, manganu, ochrona katodowa mostów, anody dla chlorków, chloranów, dwutlenku manganu
Papiernictwo	Systemy chlorujące, zbiorniki do wybielania, bębny płuczek
Technologia wody	Układy odsalania, wymiennik jonitowy do odsalania
Ochrona metali	Hydrometalurgia miedzi platerowanie i pokrywanie elektrolityczne chromu, niklu, srebra, złota, cynku
Pozyskiwanie energii i geologia	Rurociągi gazu ziemnego i do pozyskiwania energii geotermalnej, narzędzia profilujące, uszczelki, sprężyny
Medycyna	Narzędzia chirurgiczne, implanty
Ochrona środowiska	Kominy pieców do spalania odpadów, elementy instalacji związanych ze składowaniem odpadów nuklearnych, płomienice w instalacjach odsiarczania spalin, odtleniania i osuszania powietrza
Przemysł stoczniowy	Zawory kulowe, wymienniki ciepła, systemy rurociągów
Wysokowydajne pojazdy	Zawory, dławnice, sprężyny, pręty łączące

trwałość. Poza tym nie wywołuje reakcji alergicznych i jest odporny na korozję [376]. Do leczenia złamań kości stosuje się stopy tytanu z Al, Nb i Ta oraz tytanu z Al i Nb. Na przykład tzw. kłamry Blounta, których żywotność wynosi około 20 lat, wykonane są ze stopu tytanu (43-47%) z niklem (53-57%) charakteryzującego się pamięcią kształtu. Innym zastosowaniem stopów Ni-Ti są płytki implantacyjne oraz urządzenia do leczenia zgryzu u dzieci [376]. Tytan wykorzystywany jest również w produkcji narzędzi chirurgicznych, wózków inwalidzkich oraz kul ortopedycznych, jak i w technice medycznej (np. narzędzia chirurgiczne i elementy takich urządzeń jak dializatory, sztuczne serce).

Tytan wykorzystuje się do wytwarzania powłok z borku, azotku i węgliku tytanu, zwiększających twardość i odporność na zużycie narzędzi ze stali oraz z węglików spiekanych. Fazy międzymetaliczne tytanu, a zwłaszcza węglik tytanu TiC, są wykorzystywane także w produkcji innych spiekanych materiałów narzędziowych, takich jak węglikostale i węgliki spiekane i sialony oraz ceramika narzędziowa [24, 178, 203, 375, 382-390].

W przypadku zaspokojenia celów medycznych zwłaszcza przy wytwarzaniu endoprotez zwłaszcza ortopedycznych, jak i stomatologicznych szerokie zastosowanie znajdują spieki wytwarzane różnymi metodami klasycznej metalurgii proszków oraz innymi specjalistycznymi metodami z proszków tytanu i stopów tytanu jako materiały lite lub porowate.

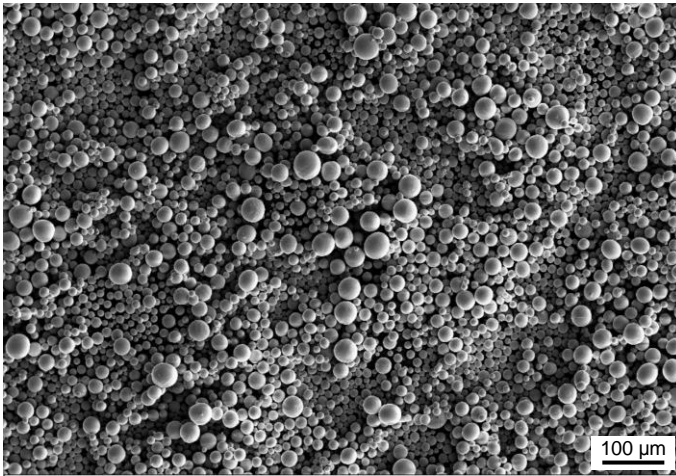
Przykładowo zastosowano proszek tytanowy o czystości grade 2 oraz wielkości ziarna do 45 μm o kształcie sferycznym, który można wykorzystać w procesie selektywnego spiekania laserowego do wytwarzania porowatych szkieletów tytanowych. Proszek posiada zmniejszone stężenie tlenu do 0,14%, w stosunku do zwykle stosowanych, w których średnio wynosi ono ok. 0,5%. Stężenie tlenu jest zmniejszone ze względu na bezpieczeństwo pracy oraz ze względu na wykluczenie możliwości tworzenia się niepożądanych tlenków. Dodatkowo podczas procesu stężenie tlenu w komorze roboczej jest odpowiednio zmniejszane i nie powinno przekraczać 100 ppm, gdy np. dla stali czyli materiałów zdecydowanie mniej reaktywnych niż tytan, może ono być znacznie większe i wynosi 1000 ppm. Ustalenie rozmiarów ziarn proszku tytanowego umożliwia badania przesiewowe wielkości ziarn proszku (rys. 2.10).



Rysunek 2.10. Krzywa kumulacyjna przesiewu proszku tytanu

Charakterystykę proszku tytanowego przedstawiono również przy zastosowaniu skaningowego mikroskopu elektronowego na rysunku 2.11.

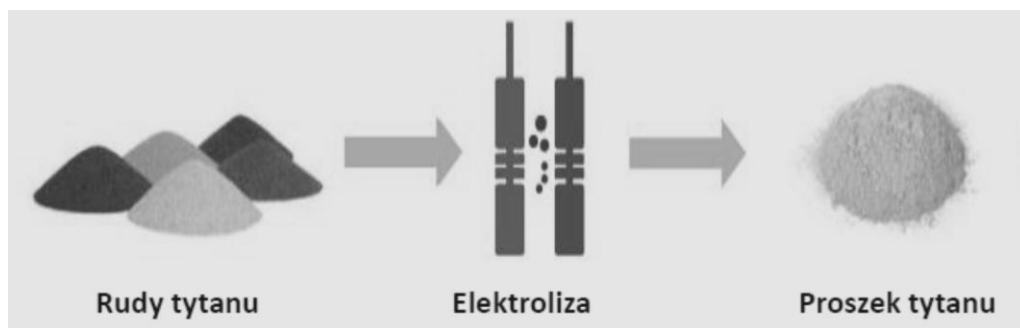
Zwykle do wytwarzania proszku metalicznego tytanu wykorzystuje się proces W. Krolla w celu wytworzenia gąbki tytanu, która następnie jest przetwarzana na postać pręta. Następnie w celu uzyskania proszku, metal przetapiany jest w piecach elektrycznych w ochronnej atmosferze argonu i transportowany do ogrzanej rurki o kalibrowanej średnicy. Płynny materiał wewnątrz dyszy poddawany jest rozpylaniu za pomocą gazu lub wody pod wysokim ciśnieniem. Podczas opadania cząsteczki zespala się tworząc ziarna proszku. Wymagający wielu etapów tradycyjny proces wytwarzania sproszkowanego tytanu jest bardzo energochłonny, toksyczny, bardzo kosztowny i pracochłonny, a ponadto o bardzo małej efektywności.



Rysunek 2.11. Charakterystyka proszku tytanowego o granulacji 0-45 μm

W ostatnich latach brytyjska firma MetalYSIS opracowała znacznie tańszy i bardziej przyjazny środowiskowo proces "FFC" od pierwszych liter nazwisk wynalazców: Derek Fray, Tom Farthing i George Chen [391], którzy przypadkowo wpadli na pomysł podczas próby oczyszczania tytanu. Metoda opracowana przez MetalYSIS polega na wykorzystaniu dwutlenku tytanu w procesie elektrolizy i bezpośrednim, jednoetapowym przekształceniu go na metaliczny proszek. Elementy tytanowe zawierają zazwyczaj niewielką warstwę dwutlenku tytanu na powierzchni, która tworzy się, gdy metal wystawiony jest na działanie powietrza. Próba usunięcia powłoki za pomocą elektrolizy okazała się udana, ponieważ jony tlenu zostały oddzielone od powierzchni. Proces MetalYSIS sprawia, że produkcja sproszkowanego metalu jest prostsza i znacznie tańsza. Proszek tytanu powstaje bezpośrednio w reakcji redukcji sproszkowanego ditlenku tytanu w temperaturze od 800 do 1000°C. Sposób jest przyjazny dla

środowiska, a produktem ubocznym jest CO₂ w niewielkim udziale. Ponadto, chlorek wapnia (CaCl₂) stosowany w elektrolizie, który wykazuje toksyczność zbliżoną do soli kuchennej może być zwracany do ponownego użycia. Proszek tytanu okazuje się szczególnie przydatny we współczesnych technologiach przyrostowych, zwłaszcza selektywnego spiekania laserowego, które zostaną opisane w kolejnych artykułach niniejszego opracowania. Technologie te, niekiedy w uproszczeniu określane jako druk 3D, są korzystne finansowo ze względu na zmniejszenie udziału odpadów w porównaniu do tradycyjnych metod produkcji i technologii obróbki elementów metalowych, związanych z bardzo dużym udziałem strat materiału wejściowego. Zastosowanie opisanej ekonomicznej i ciągłej technologii wytwarzania proszków tytanu może wpłynąć na bardziej dynamiczny rozwój rynku drukowanych, metalowych elementów, zwłaszcza że wstępnie szacuje się, że nastąpi zmniejszenie ceny proszków tytanu nawet o 75%, do wartości zbliżonych do ceny proszków stali specjalnych. Spore nadzieje są związane z bezpośrednim wykorzystaniem w skali przemysłowej rutyłu, jako rudy tytanu do wytwarzania proszków tego metalu (rys. 2.12), co jeszcze bardziej upraszcza proces technologiczny i jeszcze bardziej wpływa na redukcję kosztów wytwarzania proszków tytanu.



Rysunek 2.12. Schemat wytwarzania proszku tytanu z rudy rutyłowej metodą "FFC"

Przewiduje się możliwość rozszerzenia tej metody produkcyjnej na wytwarzanie proszków tantalu oraz metali ziem rzadkich o wymaganych rozmiarach ziarn proszku, czystości i stężeniu dodatków stopowych. Proszek tytanu wytworzony w procesie Metalysis został już wykorzystany do wytwarzania elementów samochodowych oraz elementów silników odrzutowych metodami przyrostowymi.

Podczas targów 3D Medical Expo w Maastricht pod koniec stycznia 2016 roku francuska firma Z3DLab zaprezentowała nowy kompozytowy proszek wykorzystywany w technologiach

przyrostowych, a zwłaszcza selektywnego spiekania laserowego nazwany ZTi, zawierający nie tylko tytan, lecz także cyrkon. Oba te pierwiastki są biokom-patylbilne, łączą synergicznie własności mechaniczne, a zwłaszcza wysoką twardość cyrkonu i dużą ciągliwość tytanu. Proszki te są dedykowane głównie do wytwarzania elementów protetycznych w stomatologii oraz w konstrukcjach kosmicznych. W przypadku zapotrzebowania na implanty kości, zazwyczaj wykorzystuje się tytan o ciągliwości porównywalnej do naturalnej ludzkiej kości. Jednocześnie jest jednak podatny na ścieranie, a także może powodować alergie. Cyrkon ma własności fizyczne podobne do tytanu, wykazuje sprężystość zbliżoną do naturalnej ludzkiej kości, lecz w przeciwieństwie do tytanu jest jednak odporny na ścieranie, a także wykazuje większą wytrzymałość o ok. 50%. Ocenia się, że proszek ZTi jest obecnie najtwardszym materiałem na świecie możliwym do wykorzystania w technologiach addytywnych wykorzystujących topienie laserem, co otwiera mu nowe perspektywy aplikacyjne, w tym nie tylko na rynku medycznym do wytwarzania implantów kości, dentystycznych, protez, śrub, płytek, bez zagrożenia wywołania reakcji alergicznych, ale także do wytwarzania elementów kosmicznych oraz w przemyśle samochodowym.

2.6. Perspektywy zastosowań nowo opracowanych materiałów i technologii w medycynie i stomatologii

Ze względu na główne zainteresowania prezentowane w niniejszej publikacji przytoczono tu rozważania literaturowe dotyczące dwóch technologii: wytwarzania przyrostowego, a zwłaszcza selektywne spiekanie laserowe SLS, w odniesieniu do materiałów sztywnych oraz elektroprzędzenia nanowłókien polimerowych, w odniesieniu do materiałów elastycznych. Selektywne spiekanie laserowe (j. ang.: Selective Laser Sintering – SLS) przypomina trójwymiarowe drukowanie, jest techniką powszechnie stosowaną do wytwarzania przyrostowego z materiałów metalowych i ceramicznych [187, 188, 208, 392-394], w tym m.in. implantów do celów stomatologicznych [175] i została użyta także do przygotowania skafoldów [229] z polimerów i kompozytów biodegradowalnych [247-251]. Skafoldy nanowłókniste tworzące mikroporowate maty, wytwarzane są przez elektroprzędzenie [2, 186, 199, 200, 395, 396], a tak uzyskane nanowłókna o średnicy od 5 nm do ponad 1 mm są ciągłe i połączone ze sobą w sposób losowy [270, 271]. Ze względu na charakter elektroprzędzenia włókna są zorientowane przypadkowo [272] lub są ułożone w sposób uporządkowany [273], wykazują strukturę zbliżoną do macierzy pozakomórkowej (j. ang.: extracellular matrix – ECM), posiadają dużą powierzchnię właściwą, wysoką porowatość, małą wielkość porów i małą gęstość [397]. Jako materiał mogą być użyte materiały naturalne i inżynierskie [270]. We wcześniejszych pracach własnych [175, 185] przedstawiono bardzo obszernie stan wiedzy w zakresie materiałów i technologii wytwarzania skafoldów oraz opis koncepcji synergicznego wykorzystania do tego celu dotychczasowych osiągnięć chirurgii i medycyny regeneracyjnej w zakresie protezowania/implantowania w leczeniu chorób cywilizacyjnych i ich skutków, inżynierii wytwarzania i inżynierii materiałowej w zakresie projektowania i wytwarzania protez/implantów z różnych materiałów inżynierskich oraz inżynierii tkankowej w zakresie doboru materiałów i technologii wytwarzania skafoldów [179-184, 398], a także możliwe jest wykorzystanie różnych wyspecjalizowanych technologii, wobec wyników dotychczasowych prac własnych w tym zakresie [22, 25, 191-197, 203, 204, 394, 399-405]. Liczące się badania w zakresie doboru materiałów na skafoldy tkankowe są wykonywane również w innych ośrodkach naukowych w Polsce [141, 205-213, 406]. Ogólne kryteria doboru materiałów na skafoldy tkankowe dotyczą rodzaju materiału i jego struktury, wytrzymałości mechanicznej, zdolności do osteokondukcji, łatwości wytwarzania oraz manipulowania w zastosowaniu klinicznym.

Należy przewidywać rozwój rynku, związanego z rozpowszechnieniem koncepcji i nowo opracowanych rozwiązań techniczno-klinicznych materiałów ze strefą porowatą, pełniącą rolę szkieletów dla wrastania żywych tkanek jest komplementarny w stosunku do globalnych rynków wyrobów medycznych, rozwijających się zgodnie z analizami potencjału rynku biomateriałów, bionicznych implantów medycznych, rynku sztucznych narządów, rynku urządzeń ortopedycznych, rynku naprawy tkanek miękkich i stabilizacji urazów ortopedycznych, rynku urządzeń naprawy tkanek miękkich, oraz drukowania 3D w zastosowaniach medycznych.

Światowy rynek biomateriałów szacowano na 25,2 miliardy dolarów USD w 2012 roku i jest przewidywany jego wzrost przy średniorocznym wskaźniku wzrostu 4,1% CAGR od roku 2013 do 2019, by osiągnąć w tym roku wartość 33,6 miliardów dolarów USD [407]. Biomateriały są stosowane do skutecznego leczenia różnych chorób, takich jak m.in. rak kości, urazy ortopedyczne, uszkodzenia tkanki, choroby układu krążenia, choroby dentystryczne. Biomateriały są biokompatybilne i nie wywołują żadnych reakcji immunologicznej w organizmie ludzkim. W krajach rozwiniętych, takich jak Stany Zjednoczone, Kanada, Niemcy, Francja, Wielka Brytania, Włochy i Hiszpania, ze względu na wysoki wskaźnik wykorzystania medycznych procedur implantologicznych nastąpił znaczący wzrost rynku i zastosowania implantów, w porównaniu do słabego przyrostu w innych częściach świata. Ameryka Północna jest największym rynkiem biomateriałów, wyprzedzając Europę. Zapotrzebowanie na liczne implanty medyczne i procedury przeszczepów na całym świecie wzrasta ze względu na starzenie się społeczeństwa, a wzrost długości życia ze względu na poprawę poziomu opieki zdrowotnej powoduje z kolei wysoką częstość występowania zapalenia stawów i osteoporozy. Zapadalność na choroby kości i złamania stają się coraz bardziej powszechne. W 2012 roku, zastosowania ortopedyczne miały poważny udział w rynku globalnym biomateriałów, ze względu na rosnącą liczbę wszczepionych endoprotez stawu biodrowego i kolanowego. Starzenie się społeczeństwa wpływa także znacząco na zapadalność na choroby oczu i problemy dentystryczne. Bezpieczne, niezawodne i niedrogie biomateriały obejmują metale, ceramikę, polimery i biomateriały pochodzenia naturalnego. W 2012 roku na rynku globalnym biomateriałów największy udział miały materiały metalowe, przy szybko rosnącym udziale biomateriałów polimerowych. Szacuje się, że udział polimerów będzie wzrastać w najszybszym tempie w okresie od roku 2013 do 2019. Stąd duże zainteresowanie nimi w ramach własnych rozwiązań, włącznie z nanowłóknami z biodegradowalnych polimerów jako szkieletów skóry i tkanek miękkich. Polimery są wykorzystywane w wielu protezach, takich

jak transskórna angioplastyka naczyń wieńcowych (PTCA), cewnikach, zastawkach serca, soczewkach kontaktowych, soczewkach wewnątrzgałkowych i podstawach protez dentystycznych, w zastosowaniach okulistycznych, a także w urologii i gastroenterologii, w tym na części sztucznego przelyku. Ameryka Północna i Europa na rynku globalnym biomateriałów w całym prognozowanym okresie od 2013 do 2019 roku utrzymają pozycje liderów, jednak kraje Azji i Pacyfiku, takie jak Japonia, Korea Południowa, Chiny, Indie i Tajwan odgrywają coraz bardziej kluczową rolę w rozwoju rynku biomateriałów, a w najbliższych latach nastąpi też jego rozwój w krajach Ameryki Łacińskiej.

Rynek medycznych implantów bionicznych i sztucznych narządów wzrasta z 12,67 miliardów dolarów USD w 2012 roku przy średniorocznym wskaźniku wzrostu 7,1% CAGR, aby osiągnąć wartość 17,82 miliardów dolarów USD w 2017 [20]. Trend rozwojowy tego rynku utrzymuje się w ciągu ostatnich dwóch dekad, a przewiduje się, że ten trend utrzyma się nadal do lat dwudziestych. Rynek ten został podzielony na pięć kategorii, w zależności od rodzaju produktów, technologii wykonania, oraz rodzaju w odniesieniu do oczu, uszu, ortopedii, serca i układu nerwowego i mózgu. Nowe i ulepszone technologie, zwiększająca się niewydolność narządów ze względu na starzenie i choroby związane z wiekiem, wzrost liczby wypadków i urazów prowadzących do amputacji, a także wzrost liczby osób oczekujących na przeszczep narządów są głównymi czynnikami wzrostu tego rynku. Ameryka Północna dominuje na rynku sztucznych narządów w 2012 roku, a następną jest Europa.

Światowy rynek urządzeń ortopedycznych został wyceniony na 29,2 miliardów dolarów USD w 2012 roku i wzrasta przy średniorocznym wskaźniku wzrostu 4,9% CAGR, aby osiągnąć szacowaną wartość 41,2 miliardów dolarów USD w 2019 roku [408]. Urządzenia ortopedyczne są stosowane w celu przywrócenia struktury kręgosłupa i stawów w różnych rodzajach złamań, nieprawidłowego wzrostu kości, uszkodzenia tkanek miękkich, urazach lub innych deformacjach. Urządzenia te mogą być wszczepiane chirurgicznie lub zewnątrznie podłączone przez minimalnie inwazyjne procedury, a tym samym mogą być klasyfikowane jako implanty lub wewnętrzne i zewnętrzne urządzenia mocujące. Szacuje się, że zapotrzebowanie na zabiegi ortopedyczne wzrośnie w najbliższej przyszłości z uwagi na wzrost populacji pacjentów geriatrycznych i otyłość na całym świecie. Główne segmenty urządzeń ortopedycznych, takie jak implanty, wewnętrzne i zewnętrzne urządzenia mocujące dotyczą różnych miejsc anatomicznych, a mianowicie bioder, kolan, barków, łokci, stóp, kostek i kończyn.

Światowy rynek urządzeń stabilizujących urazy ortopedyczne został wyceniony na 6,1 miliardów dolarów USD w 2014 roku i wzrasta przy średniorocznym wskaźniku wzrostu 7,29% CAGR, aby osiągnąć szacowaną wartość 9,3 miliardów dolarów USD w 2019 roku [409]. Do kluczowych czynników decydujących o wzroście tego rynku należą rosnące nakłady na opiekę zdrowotną, upowszechnienie aktywności sportowej, rosnąca liczba wypadków drogowych i wzrost populacji osób starszych, co decyduje o zwiększeniu złamań i urazów. Do ograniczeń rozwoju należą wysokie koszty zabiegu, niski poziom wiedzy na ten temat wśród wielu ludzi i nieuwzględnianie tego typu schorzeń w systemach ubezpieczeń zdrowotnych, zwłaszcza w krajach rozwijających się. Stabilizatory wewnętrzne mają największy udział w rynku urządzeń stabilizujących urazy ortopedyczne i przewiduje się ich rozwój przy średniorocznym wskaźniku wzrostu 6,8% CAGR do 2020 roku. Płytki mocujące i systemy śrubowe są najczęściej stosowane, a ich średnioroczny wskaźnik wzrostu w tym okresie wyniesie 7,1% CAGR, natomiast coraz częściej są stosowane wewnętrzne układy mocujące z materiałów bioresorbowalnych, a rozwój ich produkcji będzie jeszcze większy i ich średnioroczny wskaźnik wzrostu w tym okresie wyniesie 8,4% CAGR. Konkurencyjne dla tych zastosowań są oryginalne autorskie rozwiązania konstrukcyjne i technologiczne opisane w niniejszym artykule. Ameryka Północna, a zwłaszcza USA ma największy udział w rynku urządzeń stabilizujących urazy ortopedyczne, natomiast Azja, a zwłaszcza Chiny, Japonia i inne kraje Azji Południowo-Wschodniej, a także kraje wschodniej części Morza Śródziemnego stanowią rynki wzrostowe.

Światowy rynek ortopedyczny naprawy tkanek miękkich został wyceniony na 5,6 miliardów dolarów USD w 2013 roku i wzrasta przy średniorocznym wskaźniku wzrostu 7,2% CAGR, aby osiągnąć szacowaną wartość 8,5 miliardów dolarów USD w 2019 roku [32]. Do kluczowych czynników wpływających na rozwój tego rynku należy starzenie się społeczeństwa, wzrost otyłości, zwiększenie liczby uszkodzeń tkanek miękkich, w tym w dużej mierze w wyniku urazów sportowych, a także wprowadzenie nowych technologii medycznych, brak innych niż chirurgiczne możliwości klinicznych naprawy tkanek miękkich oraz zwiększenie wydatków na opiekę zdrowotną. Ograniczenia na jakie napotyka ten rynek są związane m.in. z tendencją do wypierania implantów metalowych przez materiały biodegradowalne, co wymaga zmiany technologii oraz stosowania zrobotyzowanych zabiegów kosztem tradycyjnych metod chirurgii i związanego z tym wzrostu kosztów. Wspomniane aspekty są ściśle związane z niektórymi aspektami własnych rozwiązań konstrukcyjnych i klinicznych.

Ameryka Północna, w tym USA ma największy udział w tym rynku, natomiast Azja, w tym Chiny, Indie i Japonia są najszybciej rozwijającymi się rynkami w skali światowej w tym zakresie.

Rynek drukowania 3D w zastosowaniach medycznych w 2012 roku wyceniono na 354,5 miliona dolarów USD. Przewiduje się jego wzrost przy znacznym średniorocznym wskaźniku wzrostu 15,4% CAGR, aby osiągnąć szacowaną wartość 965,5 milionów dolarów USD w 2019 roku [410]. Technologie druku 3D dostarczyły wiele rozwiązań w przemyśle medycznym i zrewolucjonizowały segment opieki zdrowotnej poprzez ułatwienia w produkcji implantów medycznych i chirurgicznych, takich jak prowadnice stomatologiczne, ortopedyczne i szczękowo-twarzowe. Z tych względów wymienione technologie znajdują się wśród rozpatrywanych w ramach własnych rozwiązań opisanych w niniejszym artykule. Produkcja odbywa się przy użyciu różnych materiałów, jak metale, polimery, ceramika i naturalne komórki biologiczne. Rozwijają się kolejne technologie, takie jak selektywne spiekanie laserowe oraz spiekanie wiązką elektronową i fotopolimeryzacja. Region Ameryki Północnej stanowił największy rynek dla druku 3D w zastosowaniach medycznych w roku 2012, natomiast przewiduje się, że Europa wykaże najwyższą stopę wzrostu o ponad 15% CAGR w latach 2013 do 2019.

Dokonana analiza bezsprzecznie wskazuje na zdecydowanie rozwojowy trend wszystkich światowych rynków związanych z biomateriałami oraz z różnymi produktami medycznymi, jednak z podziałem na tradycyjne segmenty tych rynków. Brak procedur synergicznego rozwiązywania wymienionych problemów w przypadkach, gdy nie jest możliwe wyłączone zastosowanie metod inżynierii tkankowej, choćby ze względu na rozległość ubytku kostnego lub tkankowego, ale także z innych przyczyn, uzasadnia celowość podejmowania wyzwań, zakreślonych w ramach własnych rozwiązań konstrukcyjnych i technologicznych. Wspomniana koncepcja synergicznego wykorzystania do tego celu dotychczasowych osiągnięć chirurgii i medycyny regeneracyjnej w zakresie protezowania/implantowania w leczeniu wskazanych uprzednio chorób cywilizacyjnych i ich skutków, inżynierii wytwarzania i inżynierii materiałowej w zakresie projektowania i wytwarzania protez/implantów zintegrowanych ze skafoldami tkanek i kości z różnych materiałów inżynierskich i biologicznych oraz inżynierii tkankowej w zakresie doboru materiałów i technologii wytwarzania skafoldów, stanowi istotne obecnie działania poznawcze i techniczne, bardzo dobrze rokując w zakresie uzyskania zamierzonych osiągnięć technicznych i klinicznych w porównaniu z tymi, które

obecnie są stosowane oraz korzystnej roli tych koncepcji w działalności przemysłowej i handlowej. Stanowi to silne uzasadnienie dalszej realizacji prac badawczo-wdrożeniowych oraz rozbudowy środków wytwórczych w tym zakresie [411], w celu wypracowania konkurencyjnych rozwiązań i umocnienia międzynarodowej pozycji polskiego sektora R & D w tym zakresie.

2.7. Literatura do artykułu 2

1. European Commission, Press Announcement, Towards a Strategy on Serious Road Traffic Injuries – Frequently asked questions, 19 March 2013.
2. L.A. Dobrzański (ed.), Polymer nanofibers produced by electrospinning applied in regenerative medicine, Open Access Library V/3 (2015) 1-168.
3. P.J. Brown, K. Stevens (ed.), Nanofibers and nanotechnology in textiles, CRC Press, Boca Raton, Boston, New York, Washington, Cambridge, 2007.
4. J.-H. He, Y. Liu, L.-F. Mo, Y.-Q. Wan, L. Xu, Electrospun Nanofibres and Their Applications, iSmithers, Shawbury, Shrewsbury, Shropshire, 2008.
5. Z.-M. Hung, Y.-Z.-Zhang, M. Kotacki, S. Ramakrishna, A review on polymer nanofibers by electrospinning and their application in nano composites, Composite Science and Technology 63/15 (2003) 2223-2253.
6. X.-F. Wang, Z.-M. Huang, Melt-electrospinning of PMMA, Chinese Journal of Polymer Science 28/1 (2010) 45-53.
7. J. Lin, B. Ding, J. Yu, Y. Hsieh, Direct Fabrication of Highly Nanoporous Polystyrene Fibers via Electrospinning, ACS Applied Materials & Interfaces 2 (2010) 521-528.
8. Y. Srivastava, I. Loscertales, M. Marquez, T. Thorsen, Electrospinning of hollow and core/sheath nanofibers using a microfluidic manifold, Microfluid and Nanofluid 4/3 (2007) 245-250.
9. Z. Sun, E. Zussman, A.L. Yarin, J.H. Wendorff, A. Greiner, Compound Core-shell Polymer Nanofibers by Co-Electrospinning, Advanced Materials 15/22 (2003) 1929-1932.
10. A. Espindola-González, A.L. Martínez-Hernández, F. Fernández-Escobar, V.M. Castaño, W. Brostow, T. Datashvili, C. Velasco-Santos, Natural-Synthetic Hybrid Polymers Developed via Electrospinning: The Effect of PET in Chitosan/Starch System, International Journal of Molecular Sciences 12 (2011) 1908-1920.
11. K. Kurzydłowski, M. Lewandowska, Nanomateriały inżynierskie konstrukcyjne i funkcjonalne, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2010.
12. E. Neubauer, M. Kitzmantel, M. Hulman, P. Angerer, Potential and challenges of metalmatrix-composites reinforced with carbon nanofibers and carbon nanotubes, Composites Science and Technology 70 (2010) 2228-2236.
13. C.F. Deng, D.Z. Wang, X.X. Zhang, A.B. Li, Processing and properties of carbon nanotubes reinforced aluminum composites, Materials Science and Engineering A 444 (2007) 138-145.

14. T. Kuzumaki, K. Miyazawa, H. Ichinose, K. Ito, Processing of carbon nanotubes reinforced aluminium composite, *Journal of Materials Research* 13/9 (1998) 2445-2449.
15. G. Zhao, F. Deng, Electroless Plating of Ni-P-CNTs Composite Coating, *Key Engineering Materials* 280-283 (2005) 1445-1448.
16. T. Noguchi, A. Magario, S. Fukazawa, S. Shimizu, J. Beppu, M. Seki, Carbon Nanotube/Aluminium Composites with Uniform Dispersion, *Materials Transactions* 45/2 (2004) 602-604.
17. B. Vastag, L.H. Sun, NIH superbug claims 7th victim, *The Washington Post*, September 14, 2012, http://www.washingtonpost.com/national/health-science/nih-superbug-claims-7th-victim/2012/09/14/09b3742e-fe9b-11e1-b153-218509a954e1_story.html, dostęp 3.04.2016.
18. W. Ziut, *Srebro koloidalne naturalny antybiotyk*, Drukarnia AKAPIT s.c., Lublin, 2010.
19. A. Arsiwala, P. Desai, V. Patravale, Recent advances in micro/nanoscale biomedical implants, *Journal of Controlled Release* 189 (2014) 25-45.
20. D. Lambrick, *World Artificial Organs Market by 2017*, MarketandMarkets, 2014, http://www.powershow.com/view0/608c4e-YjNiM/World_Artificial_Organs_Market_by_2017_powerpoint_ppt_presentation, dostęp 3.03.2016.
21. *Health and Health Care in 2012*, GUS, Warszawa, 2012.
22. J. Nowacki, L.A. Dobrzański, F. Gustavo, Implanty śródszpikowe w osteosyntezie kości długich, *Open Access Library* 11 (2012) 1-150.
23. D.F. Williams (ed.), *Definitions in Biomaterials*, Elsevier, Amsterdam – Oxford – New York – Tokyo, 1987.
24. L.A. Dobrzański, *Materiały inżynierskie i projektowanie materiałowe. Podstawy nauki o materiałach i metaloznawstwo*, WNT, Wydanie II zmienione i uzupełnione, Warszawa, 2006.
25. L.A. Dobrzański, *Metaloznawstwo opisowe*, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice, 2013.
26. S. Wang, X. Qu, R.C. Zhao, Clinical applications of mesenchymal stem cells, *Journal of Hematology & Oncology* 5 (2012) 1-9, doi:10.1186/1756-8722-5-19.
27. J. Grabarczyk, Warunki syntezy warstw węglowych na gwoździach śródszpikowych ze stali AISI 316L, *Inżynieria Materiałowa* 31/4(176) (2010) 981-983.
28. I. Kotela, J. Grabarczyk, M. Bednarenko, A. Kotela, Gwóźdź GAMMA pokryty warstwą węgla nanokrystalicznego w leczeniu złamań krętarzowych kości udowej u chorych w podeszłym wieku, *Kwartalnik Ortopedyczny* 3 (2011) 243-248.

29. J. Nowacki, Fosfor w warstwie wierzchniej, Seria Monografie, Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej, Łódź, 1996.
30. R. Langer, J.P. Vacanti, Tissue engineering, Science 260/5110 (1993) 920-926.
31. F. Yang, W.L. Neeley, M.J. Moore, J.M. Karp, A. Shukla, R. Langer, Tissue Engineering: The Therapeutic Strategy of the Twenty-First Century, in: C.T. Laurencin, L.S. Nair (eds.), Nanotechnology and Tissue Engineering: The Scaffold, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, 2008, 3-32.
32. Orthopedic Soft Tissue Repair Market (Surgical Procedures - ACL/PCL Reconstruction, Meniscal Repair, Rotator Cuff Repair, Hip Arthroscopy, Biceps Tenodesis and Shoulder Labrum Repair) - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends and Forecast, 2013 - 2019, Transparency Market Research, 2014, <http://www.transparencymarketresearch.com/soft-tissue-repair-sports-medicine.html>, dostęp 20.03.2016.
33. L.R. Kaiser, The future of multihospital systems, Topics in Health Care Financing 18/4 (1992) 32-45.
34. A. Atala, R. Lanza, J.A. Thomson, R. Nerem (eds.), Principles of regenerative medicine, Second Edition, Academic Press, San Diego, 2011.
35. Regenerative Medicine 2006, Report, US National Institutes of Health, 2006, http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/scireport/PDFs/Regenerative_Medicine_2006.pdf, dostęp 30.03.2016.
36. C.R. Cogle, S.M. Guthrie, R.C. Sanders, W.L. Allen, E.W. Scott, B.E. Petersen, An Overview of Stem Cell Research and Regulatory Issues, Mayo Clinic Proceedings 78/8 (2003) 993-1003.
37. C.M. Metallo, S.M. Azarin, L. Ji, J.J. De Pablo, S.P. Palecek, Engineering tissue from human embryonic stem cells, Journal of Cellular and Molecular Medicine 12/3 (2008) 709-729.
38. M.R. Placzek, I.-M. Chung, H.M. Macedo, S. Ismail, T. Mortera Blanco, M. Lim, J.M. Cha, I. Fauzi, Y. Kang, D.C.L Yeo, C.Y.J. Ma, J.M. Polak, N. Panoskaltzis, A. Mantalaris, Stem cell bioprocessing: fundamentals and principles, Journal of The Royal Society Interface 6/32 (2009) 209-232.
39. B.D. MacArthur, R.O.C. Oreffo, Bridging the gap, Nature 433/7021 (2005) 19.
40. Y.C. Fung, A Proposal to the National Science Foundation for An Engineering Research Center at UCSD. Center for the Engineering of Living Tissues, UCSD #865023, 2001.
41. R.P. Lanza, R. Langer, J. Vacanti, eds., Principles of Tissue Engineering, Academic Press, San Diego, 2000.

42. A. Atala, R.P. Lanza (eds.), *Methods of Tissue Engineering*, Academic Press, San Diego, 2002.
43. M. Tavassoli, W.H. Crosby, Transplantation of marrow to extramedullary sites, *Science* 161/3836 (1968) 54-56.
44. A.I. Caplan, Mesenchymal stem cells, *Journal of Orthopaedic Research* 9/5 (1991) 641-650.
45. M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig, D.R. Marshak, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science* 284/5411 (1999) 143-147.
46. E.J. Culme-Seymour, L.N. Davie, D.A. Brindley, S. Edwards-Parton, C. Mason, A decade of cell therapy clinical trials (2000–2010), *Regenerative Medicine* 7/4 (2012) 455-462.
47. C. Mason, M.J. McCall, E.J. Culme-Seymour, S. Suthasan, S. Edwards-Parton, G.A. Bonfiglio, B.C. Reeve, The global cell therapy industry continues to rise during the second and third quarters of 2012, *Cell Stem Cell* 11/6 (2012) 735-739.
48. A. Trounson, R.G. Thakar, G. Lomax, D. Gibbons, Clinical trials for stem cell therapies, *BMC Medicine* 9/52 (2011) 1-7, doi:10.1186/1741-7015-9-52.
49. M.D. Li, H. Atkins, T. Bubela, The global landscape of stem cell clinical trials, *Regenerative Medicine* 9/1 (2014) 27-39.
50. M.F. Pera, Stem cells: The dark side of induced pluripotency, *Nature* 471/7336 (2011) 46-47.
51. N.A. Peppas, R. Langer, New challenges in biomaterials, *Science* 263/5154 (1994) 1715-1720.
52. J.A. Hubbell, Biomaterials in tissue engineering, *Biotechnology (NY)* 13/6 (1995) 565-576.
53. J.A. Hubbell, Bioactive biomaterials, *Current Opinion in Biotechnology* 10/2 (1999) 123-129.
54. K.E. Healy, A. Reznika, R.A. Stile, Designing biomaterials to direct biological responses, *Annals of the New York Academy of Sciences* 875 (1999) 24-35.
55. R. Langer, D.A. Tirrell, Designing materials for biology and medicine, *Nature* 428/6982 (2004) 487-492.
56. M.P. Lütolf, J.A. Hubbell, Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering, *Nature Biotechnology* 23/1 (2005) 47-55.
57. F. Yang, C.G. Williams, D.A. Wang, H. Lee, P.N. Manson, J. Elisseeff, The effect of incorporating RGD adhesive peptide in polyethylene glycol diacrylate hydrogel on osteogenesis of bone marrow stromal cells, *Biomaterials* 26/30 (2005) 5991-5998.

58. J. Elisseeff, A. Ferran, S. Hwang, S. Varghese, Z. Zhang, The role of biomaterials in stem cell differentiation: Applications in the musculoskeletal system, *Stem Cells and Development* 15/3 (2006) 295-303.
59. N.S. Hwang, M.S. Kim, S. Sampattavanich, J.H. Baek, Z. Zhang, J. Elisseeff, Effects of threedimensional culture and growth factors on the chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells, *Stem Cells* 24/2 (2006) 284-291.
60. C.J. Bettinger, J.T. Borenstein, R. Langer, Micro-fabrication Techniques in Scaffold Development, in: C.T. Laurencin, L.S. Nair, eds., *Nanotechnology and Tissue Engineering: The Scaffold*, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, 2008.
61. C.E. Wilson, W.J. Dhert, C.A. van Blitterswijk, A.J. Verbout, J.D. De Bruijn, Evaluating 3D bone tissue engineered constructs with different seeding densities using the alamarBlue assay and the effect on in vivo bone formation, *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* 13/12 (2002) 1265-1269.
62. M.C. Kruyt, J.D. De Bruijn, C.E. Wilson, F.C. Oner, C.A. van Blitterswijk, A.J. Verbout, W.J. Dhert, Viable osteogenic cells are obligatory for tissue-engineered ectopic bone formation in goats, *Tissue Engineering* 9/2 (2003) 327-336.
63. J. Folkman Tumor angiogenesis: Therapeutic implications, *New England Journal of Medicine* 285/21 (1971) 1182-1186.
64. D.J. Mooney, G. Organ, J.P. Vacanti, R. Langer, Design and fabrication of biodegradable polymer devices to engineer tubular tissues, *Cell Transplant* 3/2 (1994) 203-210.
65. G. Li, A.S. Viridi, D.E. Ashhurst, A.H. Simpson, J.T. Triffitt, Tissues formed during distraction osteogenesis in the rabbit are determined by the distraction rate: Localization of the cells that express the mRNAs and the distribution of types I and II collagens, *Cell Biology International* 24/1 (2000) 25-33.
66. J.E. Sanders, S.G. Malcolm, S.D. Bale, Y.N. Wang, S. Lamont, Prevascularization of a bio-material using a chorioallontoic membrane, *Microvascular Research* 64/1 (2002) 174-178.
67. G.F. Muschler, C. Nakamoto, L.G. Griffith, Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering, *Journal of Bone and Joint Surgery* 86-A/7 (2004) 1541-1558.
68. G. Helmlinger, F. Yuan, M. Dellian, R.K. Jain, Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: High-resolution measurements reveal a lack of correlation, *Nature Medicine* 3/2 (1997) 177-182.
69. E.H. Lee, J.H.P. Hui, The potential of stem cells in orthopaedic surgery, *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume* 88-B/7 (2006) 841-851.

70. M. Raff, Adult stem cell plasticity: fact or artifact?, *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 19 (2003) 1-22. doi: 10.1146/annurev.cellbio.19.111301.143037.
71. S.J. Morrison, I.L. Weissman, The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype, *Immunity* 1/8 (1994) 661-673.
72. S. Bajada, I. Mazakova, J.B. Richardson, N. Ashammakhi, Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2/4 (2008) 169-183.
73. K.S. Johal, V.C. Lees, A.J. Reid, Adipose-derived stem cells: selecting for translational success, *Regenerative Medicine* 10/1 (2015) 79-96.
74. A. Porcellini, Regenerative medicine: a review, *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 31/2 (2009) 63-66.
75. M.J. Branch, K. Hashmani, P. Dhillon, D.R.E. Jones, H.S. Dua, A. Hopkinson, Mesenchymal Stem Cells in the Human Corneal Limbal Stroma, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53/9 (2012) 5109-5116.
76. Americord, What is Cord Tissue?, 2015, <http://americordblood.com/cord-tissue-banking>, dostep 4.04.2016.
77. P.-P. Chong, L. Selvaratnam, A.A. Abbas, T. Kamarul, Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells, *Journal of Orthopaedic Research* 30/4 (2012) 634-642.
78. M. Baker, Adult cells reprogrammed to pluripotency, without tumors, *Nature Reports Stem Cells* (2007), doi:10.1038/stemcells.2007.124.
79. S.S. Hall, Choroba na szalce, *Świat Nauki* 4/236 (2011) 40-43.
80. K. Takahashi, S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell* 126/4 (2006) 663-676.
81. K. Okita, T. Ichisaka, S. Yamanaka, Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells, *Nature* 448/7151 (2007) 313-317.
82. Y. Oda, Y. Yoshimura, H. Ohnishi, M. Tadokoro, Y. Katsube, M. Sasao, Y. Kubo, K. Hattori, S. Saito, K. Horimoto, S. Yuba, H. Ohgushi, Induction of Pluripotent Stem Cells from Human Third Molar Mesenchymal Stromal Cells, *Journal of Biological Chemistry* 285/38 (2010) 29270-29278.
83. S.P. Bruder, D.J. Fink, A.I. Caplan, Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy, *Journal of Cellular Biochemistry* 56/3 (1994) 283-294.

84. J.E. Aubin, Bone stem cells, *Journal of Cellular Biochemistry - Supplement* 30-31 (1998) 73-82.
85. M.J. Shambloott, J. Axelman, S. Wang, E.M. Bugg, J.W. Littlefield, P.J. Donovan, P.D. Blumenthal, G.R. Huggins, J.D. Gearhart, Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95/23 (1998) 13726-13731.
86. J.A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S.S. Shapiro, M.A. Waknitz, J.J. Swiergiel, V.S. Marshall, J.M. Jones, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science* 282/5391 (1998) 1145-1147.
87. V. Sottile, A. Thomson, J. McWhir, In vitro osteogenic differentiation of human ES cells, *Cloning Stem Cells* 5/2 (2003) 149-155.
88. C.M. Cowan, Y.Y. Shi, O.O. Aalami, Y.F. Chou, C. Mari, R. Thomas, N. Quarto, C.H. Contag, B. Wu, M.T. Longaker, Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects, *Nature Biotechnology* 22/5 (2004) 560-567.
89. M.S. Kim, N.S. Hwang, J. Lee, T.K. Kim, K. Leong, M.J. Shambloott, J. Gearhart, J. Elisseeff, Musculoskeletal differentiation of cells derived from human embryonic germ cells, *Stem Cells* 23/1 (2005) 113-123.
90. W.S. Hwang, Y.J. Ryu, J.H. Park, E.S. Park, E.G. Lee, J.M. Koo, H.Y. Jeon, B.C. Lee, S.K. Kang, S.J. Kim, C. Ahn, J.H. Hwang, K.Y. Park, J.B. Cibelli, S.Y. Moon, Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst, *Science* 303/5664 (2004) 1669-1674.
91. R.P. Lanza, J.B. Cibelli, M.D. West, Prospects for the use of nuclear transfer in human transplantation, *Nature Biotechnology* 17/12 (1999) 1171-1174.
92. C.L. Cetrulo Jr., Cord-blood mesenchymal stem cells and tissue engineering, *Stem Cell Reviews and Reports* 2/2 (2006) 163-168.
93. D. Baksh, R. Yao, R.S. Tuan, Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow, *Stem Cells* 25/6 (2007) 1384-1392.
94. A.I. Caplan, S.P. Bruder, Mesenchymal stem cells: Building blocks for molecular medicine in the 21st century, *Trends in Molecular Medicine* 7/6 (2001) 259-264.
95. P.A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J.W. Futrell, A.J. Katz, P. Benhaim, H.P. Lorenz, M.H. Hedrick, Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies, *Tissue Engineering* 7/2 (2001) 211-228.

96. D. Baksh, J.E. Davies, P.W. Zandstra, Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion, *Experimental Hematology* 31/8 (2003) 723-732.
97. R. Izadpanah, C. Trygg, B. Patel, C. Kriedt, J. Du-four, J.M. Gimble, B.A. Bunnell, Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue, *Journal of Cellular Biochemistry* 99/5 (2006) 1285-1297.
98. K. Le Blanc, L. Tammik, B. Sundberg, S.E. Haynes-worth, O. Ringden, Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex, *Scandinavian Journal of Immunology* 57/1 (2003) 11-20.
99. B. Maitra, E. Szekely, K. Gjini, M.J. Laughlin, J. Dennis, S.E. Haynesworth, O.N. Koc, Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation, *Bone Marrow Transplant* 33/6 (2004) 597-604.
100. S. Aggarwal, M.F. Pittenger, Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses, *Blood* 105/4 (2005) 1815-1822.
101. G. Moll, A. Hult, L. von Bahr, J.J. Alm, N. Heldring, O.A. Hamad, L. Stenbeck-Funke, S. Larsson, Y. Teramura, H. Roelofs, B. Nilsson, W.E. Fibbe, M.L. Olsson, K. Le Blanc, Do ABO Blood Group Antigens Hamper the Therapeutic Efficacy of Mesenchymal Stromal Cells?, *PLoS ONE* 9 (2014) e85040, doi: 10.1371/journal.pone.0085040.
102. E.A. Rayment, D.J. Williams, Concise review: mind the gap: challenges in characterizing and quantifying cell- and tissue-based therapies for clinical translation, *Stem Cells* 28/5 (2010) 996-1004.
103. R.J. Thomas, A. Chandra, Y. Liu, P.C. Hourd, P.P. Conway, D.J. Williams, Manufacture of a human mesenchymal stem cell population using an automated cell culture platform, *Cytotechnology* 55/1 (2007) 31-39.
104. R.J. Thomas, D. Anderson, A. Chandra, N.M. Smith, L.E. Young, D. Williams, C. Denning, Automated, scalable culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 102/6 (2009) 1636-1644.
105. R.J. Thomas, A.D. Hope, P. Hourd, M. Baradez, E.A. Miljan, J.D. Sinden, D.J. Williams, Automated, serum-free production of CTX0E03: a therapeutic clinical grade human neural stem cell line, *Biotechnology Letters* 31/8 (2009) 1167-1172.
106. Y. Liu, P. Hourd, A. Chandra, D.J. Williams, Human cell culture process capability: a comparison of manual and automated production, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 4/1 (2010) 45-54.

107. F.A.C. Soares, A. Chandra, R.J. Thomas, R.A. Pedersen, L. Vallier, D.J. Williams, Investigating the feasibility of scale up and automation of human induced pluripotent stem cells cultured in aggregates in feeder free conditions, *Journal of Biotechnology* 173/100 (2014) 53-58.
108. P. Hourd, A. Chandra, N. Medcalf, D.J. Williams, Regulatory challenges for the manufacture and scale-out of autologous cell therapies, ed. The Stem Cell Research Community, *StemBook*, 2014, doi/10.3824/stembook.1.96.1.
109. C. Mason, E. Manzotti, Regen: the industry responsible for cell-based therapies, *Regenerative Medicine* 4/6 (2009) 783-785.
110. Kirouac DC, Zandstra PW. The systematic production of cells for cell therapies. *Cell Stem Cell* 3/4 (2008) 369-381.
111. C. Mason, M. Hoare, Regenerative Medicine Bioprocessing: The need to learn from the experience of other fields, *Regenerative Medicine* 1/5 (2006) 615-623.
112. C. Mason, P. Dunnill, Assessing the value of autologous and allogeneic cells for regenerative medicine, *Regenerative Medicine* 4/6 (2009) 835-853.
113. P. Bianco, X. Cao, P.S. Frenette, J.J. Mao, P.G. Robey, P.J. Simmons, C.Y. Wang, The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine, *Nature Medicine* 19/1 (2013) 35-42.
114. K. Le Blanc, Rasmusson I, Sundberg B et al., Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells, *Lancet* 363/9419 (2004) 1439-1441.
115. K. Le Blanc, F. Frassoni, L. Ball et al., Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a Phase II study. *Lancet* 371/9624 (2008) 1579-1586.
116. L. von Bahr, I. Batsis, G. Moll, M. Hägg, A. Szakos, B. Sundberg, M. Uzunel, O. Ringden, K. Le Blanc, Analysis of Tissues Following Mesenchymal Stromal Cell Therapy in Humans Indicates Limited Long-Term Engraftment and No Ectopic Tissue Formation, *Stem Cells* 30/7 (2012) 1575-1578.
117. J.M. Hare, J.H. Traverse, T.D. Henry, N. Dib, R.K. Strumpf, S.P. Schulman, G. Gerstenblith, A.N. DeMaria, A.E. Denktas, R.S. Gammon, J.B. Hermiller Jr, M.A. Reisman, G.L. Schaer, W. Sherman, A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction, *Journal of the American College of Cardiology* 54/24 (2009) 2277-2286.

118. J. Wu, M.R. Rostami, D.P. Cadavid Olaya, E.S. Tzanakakis, Oxygen transport and stem cell aggregation in stirred-suspension bioreactor cultures, *PLoS ONE* 9/7 (2014) e102486, doi: 10.1371/journal.pone.0102486.
119. S. Prado-Lopez, A. Conesa, A. Armiñán, M. Martínez-Losa, C. Escobedo-Lucea, C. Gandía, S. Tarazona, D. Melguizo, D. Blesa, D. Montaner, S. Sanz-González, P. Sepúlveda, S. Götz, J.E. O'Connor, R. Moreno, J. Dopazo, D.J. Burks, M. Stojkovic, Hypoxia promotes efficient differentiation of human embryonic stem cells to functional endothelium, *Stem Cells* 28/3 (2010) 407-418.
120. P. Vrabel, R.G.J.M. van der Lans, K.C.A.M. Luyben, L. Boon, A.W. Nienow, Mixing in large-scale vessels stirred with multiple radial or radial and axial up-pumping impellers: modelling and measurements, *Chemical Engineering Science* 55/23 (2000) 5881-5896.
121. C. Langheinrich, A.W. Nienow, T. Eddleston, N.C. Stevenson, A.N. Emery, T.M. Clayton, N.K.H. Slater, Oxygen transfer in stirred bioreactors under animal cell culture conditions, *Food and Bioprocess Processing* 80/1 (2002) 39-44.
122. A.W. Nienow, Reactor engineering in large scale animal cell culture, *Cytotechnology* 50/1-3 (2006) 9-33.
123. J. Ganguly, G. Vogel, Process analytical technology (PAT) and scalable automation for bioprocess control and monitoring – a case study, *Pharmaceutical Engineering* 26/1 (2006) 1-9.
124. E. Trummer, K. Fauland, S. Seidinger, K. Schriebl, C. Lattenmayer, R. Kunert, K. Vorauer-Uhl, R. Weik, N. Borth, H. Katinger, D. Müller, Process parameter shifting: part I. Effect of DOT, pH, and temperature on the performance of Epo-Fc expressing CHO cells cultivated in controlled batch bioreactors, *Biotechnology and Bioengineering* 94/6 (2006) 1033-1044.
125. M. Butler, Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals, *Applied Microbiology and Biotechnology* 68/3 (2005) 283-291.
126. V. Singh, Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation, *Cytotechnology* 30/1-3 (1999) 149-158.
127. H. Kasuto, N. Drori-Carmi, B. Zohar, Methods and systems for harvesting cells, U.S. Patent 20140030805 A1, 2014.
128. G. Zeikus, Pneumatic bioreactor, U.S. Patent 7628528 B2, 2009.
129. C. Sieblist, O. Hägeholz, M. Aehle, M. Jenzsch, M. Pohlscheidt, A. Lübbert, Insights into large-scale cell-culture reactors: II. Gas-phase mixing and CO₂ stripping, *Biotechnology Journal* 6/12 (2011) 1547-1556.

130. J. Kim, J. Seong, B. Lee, Y. Hashimura, D. Groux, D. Oh, Evaluation of a novel pneumatic bioreactor system for culture of recombinant Chinese hamster ovary cells, *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 18/4 (2013) 801-807.
131. B. Lee, D. Fang, M. Croughan, M. Carrondo, S.-H. Paik, Characterization of novel pneumatic mixing for single-use bioreactor application, *BMC Proceedings* 5/Suppl.8 (2011) 1-2.
132. J. Rowley, E. Abraham, A. Campbell, H. Brandwein, S. Oh, Meeting lot-size challenges of manufacturing adherent cells for therapy, *BioProcess International* 10/ Suppl.3 (2012) 16-22.
133. O.-W. Merten, J. Dante, P. Nogueiez-Hellin, S. Laune, D. Klatzmann, J.-L. Salzmann, New Process for Cell Detachment: Use of Heparin, In: M.J.T. Carrondo, B. Griffiths, J.L.P. Moreira (eds.), *Animal Cell Technology. From Vaccines to Genetic Medicine*, Springer, 1997, 343-348.
134. S. Kedong, F. Xiubo, L. Tianqing, H.M. Macedo, J. LiLi, F. Meiyun, S. Fangxin, M. Xuehu, C. Zhanfeng, Simultaneous expansion and harvest of hematopoietic stem cells and mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 21/12 (2010) 3183-3193.
135. E.J. Abraham, K.A. Slater, S. Sanyal, K. Linehan, P.M. Flaherty, S. Qian, Scale-up of mammalian cell culture using a new multilayered flask, *Journal of Visualized Experiments* 58 (2011) pii:3418, doi: 10.3791/3418.
136. A.W. Nienow, Q.A. Rafiq, K. Coopman, C.J. Hewitt, A potentially scalable method for the harvesting of hMSCs from microcarriers, *Biochemical Engineering Journal* 85 (2014) 79-88.
137. M. Mikola, J. Seto, A. Amanullah, Evaluation of a novel Wave Bioreactor cellbag for aerobic yeast cultivation, *Bioprocess and Biosystems Engineering* 30/4 (2007) 231-241.
138. A.W. Nienow, C.D. Rielly, K. Brosnan, N. Bargh, K. Lee, K. Coopman, C.J. Hewitt, The physical characterisation of a microscale parallel bioreactor platform with an industrial CHO cell line expressing an IgG4, *Biochemical Engineering Journal* 76 (2013) 25-36.
139. T.J. Kean, P. Lin, A.I. Caplan, J.E. Dennis, MSCs: Delivery Routes and Engraftment, Cell-Targeting Strategies, and Immune Modulation, *Stem Cells International* 2013 (2013) 1-13, Article ID 732742.
140. K. Coopman, N. Medcalf, From production to patient: challenges and approaches for delivering cell therapies, in: *StemBook*, Harvard Stem Cell Institute, 2014, doi: 10.3824/stembook.1.97.1.

141. M. Noga, A. Pawlak, B. Dybala, B. Dabrowski, W. Swieszkowski, M. Lewandowska-Szumiel, Biological Evaluation of Porous Titanium Scaffolds (Ti-6Al-7Nb) with HAp/Ca-P surface seeded with Human Adipose Derived Stem Cells, E-MRS Fall Meeting, Warsaw, 2013.
142. J. Street, D. Winter, J.H. Wang, A. Wakai, A. McGuinness H.P. Redmond, Is human fracture hematoma inherently angiogenic?, *Clinical Orthopaedics and Related Research* 378 (2000) 224-237.
143. J.M. Karp, F. Sarraf, M.S. Shoichet, J.E. Davies, Fibrin-filled scaffolds for bone-tissue engineering: An in vivo study, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 71/1 (2004) 162-171.
144. K.F. Leong, C.M. Cheah, C.K. Chua, Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs, *Biomaterials* 24/13 (2003) 2363-2378.
145. L.S. Nair, C.T. Laurencin, Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery, *Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology* 102 (2006) 47-90.
146. J. Velema, D. Kaplan, Biopolymer-based biomaterials as scaffolds for tissue engineering, *Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology* 102 (2006) 187-238.
147. H.A. Krebs, P.D.J. Weitzman, Krebs' citric acid cycle: half a century and still turning, *Biochemical Society, London*, 1987, 25.
148. S. Bose, M. Roy, A. Bandyopadhyay, Recent advances in bone tissue engineering scaffolds, *Trends in Biotechnology* 30/10 (2012) 546-554.
149. Y. Khan, M.J. Yaszemski, A.G. Mikos, C.T. Laurencin, Tissue engineering of bone: material and matrix considerations, *Journal of Bone & Joint Surgery* 90/Suppl.1 (2008) 36-42.
150. J. Rouwkema, N.C. Rivron, C.A. van Blitterswijk, Vascularization in tissue engineering, *Trends Biotechnology* 26/8 (2008) 434-441.
151. H. Bramfeldt, G. Sabra, V. Centis, P. Vermette, Scaffold Vascularization: A Challenge for Three-Dimensional Tissue Engineering, *Current Medicinal Chemistry* 17/33 (2010) 3944-3967.
152. R.K. Jain, P. Au, J. Tam, D.G. Duda, D. Fukumura, Engineering vascularized tissue, *Nature Biotechnology* 23 (2005) 821-823.
153. J.R. Jones, L.M. Ehrenfried, L.L. Hench, Optimising bio-active glass scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials* 27/7 (2006) 964-973.

154. B.S. Miguel, R. Kriauciunas, S. Tosatti, M. Ehrbar, C. Ghayor, M. Textor, F.E. Weber, Enhanced osteoblastic activity and bone regeneration using surface-modified porous bioactive glass scaffolds, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 94/4 (2010) 1023-1033.
155. C. Wu, Y. Zhou, W. Fan, P. Han, J. Chang, J. Yuen, M. Zhang, Y. Xiao, Hypoxia-mimicking mesoporous bioactive glass scaffolds with controllable cobalt ion release for bone tissue engineering, *Biomaterials* 33/7 (2012) 2076-2085.
156. K. Rezwan, Q.Z. Chen, J.J. Blaker, A.R. Boccaccini, Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials* 27/18 (2006) 3413-3431.
157. V. Karageorgiou, D. Kaplan, Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis, *Biomaterials* 26/27 (2005) 5474-5491.
158. C.E. Wilson, C.A. van Blitterswijk, A.J. Verbout, W.J.A. Dhert, J.D. de Bruijn, Scaffolds with a standardized macro-architecture fabricated from several calcium phosphate ceramics using an indirect rapid prototyping technique, *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* 22/1 (2011) 97-105.
159. P. Lichte, H.C. Pape, T. Pufe, P. Kobbe, H. Fischer, Scaffolds for bone healing: Concepts, materials and evidence, *Injury* 42/6 (2011) 569-573.
160. S.-H. Lee, H. Shin, Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews* 59/4-5 (2007) 339-359.
161. H.-Y. Cheung, K.-T. Lau, T.-P. Lu, D. Hui, A critical review on polymer-based bioengineered materials for scaffold development, *Composites Part B: Engineering* 38/3 (2007) 291-300.
162. M.W. Laschke, A. Strohe, M.D. Menger, M. Alini, D. Eglin, In vitro and in vivo evaluation of a novel nanosize hydroxyapatite particles/poly(ester-urethane) composite scaffold for bone tissue engineering, *Acta Biomaterialia* 6/6 (2010) 2020-2027.
163. S.S. Banerjee, S. Tarafder, N.M. Davies, A. Bandyopadhyay, S. Bose, Understanding the influence of MgO and SrO binary doping on the mechanical and biological properties of β -TCP ceramics, *Acta Biomaterialia* 6/10 (2010) 4167-4174.
164. V.K. Balla, S. Bodhak, S. Bose, A. Bandyopadhyay, Porous tantalum structures for bone implants: Fabrication, mechanical and in vitro biological properties, *Acta Biomaterialia* 6/8 (2010) 3349-3359.
165. K. Das, V.K. Balla, A. Bandyopadhyay, S. Bose, Surface modification of laser-processed porous titanium for load-bearing implants, *Scripta Materialia* 59/6 (2008) 822-825.

166. F. Witte, H. Ulrich, C. Palm, E. Willbold, Biodegradable magnesium scaffolds: Part II: Periimplant bone remodelling, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 81/3 (2007) 757-765.
167. R. Nowosielski, A. Gawlas-Mucha, A. Borowski, A. Guwer, Fabrication and properties of magnesium based alloys Mg-Ca, *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering* 61/2 (2013) 367-374.
168. Y. Yun, Z. Dong, N. Lee, Y. Liu, D. Xue, X. Guo, J. Kuhlmann, A. Doepke, H.B. Halsall, W. Heineman, S. Sundaramurthy, M.J. Schulz, Z. Yin, V. Shanov, D. Hurd, P. Nagy, W. Li, C. Fox, Revolutionizing biodegradable metals, *Materials Today* 12/10 (2009) 22-32.
169. A. Papadimitropoulos, M. Mastrogiacomo, F. Peyrin, E. Molinari, V.S. Komlev, F. Rustichelli, R. Cancedda, Kinetics of in vivo bone deposition by bone marrow stromal within a resorbable porous calcium phosphate scaffold: An X-ray computed microtomography study, *Biotechnology and Bioengineering* 98/1 (2007) 271-281.
170. H. Naito, Y. Dohi, W.-H. Zimmermann, T. Tojo, S. Takasawa, T. Eschenhagen, S. Taniguchi, The Effect of Mesenchymal Stem Cell Osteoblastic Differentiation on the Mechanical Properties of Engineered Bone-Like Tissue, *Tissue Engineering Part A* 17/17-18 (2011) 2321-2329.
171. S. Bose, S. Tarafder, Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review, *Acta Biomaterialia* 8/4 (2012) 1401-1421.
172. E. Verron, I. Khairoun, J. Guicheux, J.-M. Bouler, Calcium phosphate biomaterials as bone drug delivery systems: a review, *Drug Discovery Today* 15/13-14 (2010) 547-552.
173. N. Kimelman-Bleich, G. Pelled, Y. Zilberman, I. Kallai, O. Mizrahi, W. Tawackoli, Z. Gazit, D. Gazit, Targeted gene-and-host progenitor cell therapy for nonunion bone fracture repair, *Molecular Therapy* 19/1 (2010) 53-59.
174. M. Keeney, J.J.J.P. van den Beucken, P.M. van der Kraan, J.A. Jansen, A. Pandit, The ability of a collagen/calcium phosphate scaffold to act as its own vector for gene delivery and to promote bone formation via transfection with VEGF(165), *Biomaterials* 31/10 (2010) 2893-2902.
175. L.A. Dobrzański, Overview and general ideas of the development of constructions, materials, technologies and clinical applications of scaffolds engineering for regenerative medicine, *Archives of Materials Science and Engineering* 69/2 (2014) 53-80.
176. L.A. Dobrzański, Obtaining of porous high-strength engineering materials for scaffolds assuring the synergy of classical prosthetics/implantation and tissue engineering methods, 2015, unpublished work.

177. L.A. Dobrzański et al., Opracowanie nowego gradientowego materiału kompozytowego o osnowie polimerowej wzmocnianego włóknami aramidowymi oraz cząstkami proszku tytanu, przeznaczonego do produkcji protezy wewnątrzustrojowej przelętku, Projekt N507 422136, Gliwice, 2009-2011.
178. L.A. Dobrzański, Report on the main areas of the materials science and surface engineering own research, *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering* 49/2 (2011) 514-549.
179. L.A. Dobrzański et al., Opracowanie metodologii komputerowego wspomagania projektowania materiałowego, technologicznego oraz konstrukcyjnego stałych stomatologicznych protez wielocłonowych w celu predykcji ich własności użytkowych, Projekt N507 438539, Gliwice, 2010-2013.
180. L.A. Dobrzański et al., Ustalenie istoty wpływu jednowymiarowych materiałów nanostrukturalnych na strukturę i własności nowo opracowanych funkcjonalnych materiałów nanokompozytowych i nanoporowatych, NANOCOPOR, Projekt UMO-2012/07/B/ST8 /04070, Gliwice, 2013-2016.
181. Dobrzański L.A. et al., Badanie struktury i własności nowoopracowanych porowatych materiałów biomimetycznych wytwarzanych metodą selektywnego spiekania laserowego, BIOLASIN, Projekt UMO-2013/08/M/ST8/00818 Gliwice, 2013-2016.
182. L.A. Dobrzański et al., Foresight wiodących technologii kształtowania własności powierzchni materiałów inżynierskich i biomedycznych, FORSURF, Projekt UDA-POIG.01.01.01-00.23/08-00, Gliwice 2009-2012.
183. L.A. Dobrzański, M. Pawlyta, A. Hudecki, Conceptual study on a new generation of the high-innovative advanced porous and composite nanostructural functional materials with nanofibers, *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering* 49/2 (2011) 550-565.
184. L.A. Dobrzański, M. Hetmańczyk, E. Łągiewka, Current state and development perspectives of Materials Science and Engineering in Poland, *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering* 43 (2010) 782-789.
185. L.A. Dobrzański, Applications of newly developed nanostructural and microporous materials in biomedical, tissue and mechanical engineering, *Archives of Materials Science and Engineering* 76/2 (2015) 53-114.
186. L.A. Dobrzański, A. Hudecki, G. Chladek, W. Król, A. Mertas, Biodegradable and antimicrobial polycaprolactone nanofibers with and without silver precipitates, *Archives of Materials Science and Engineering* 76/1 (2015) 5-26.

187. L.A. Dobrzański, A.D. Dobrzańska-Danikiewicz, T.G. Gawęł, A. Achteлик-Franczak, Selective laser sintering and melting of pristine titanium and titanium Ti6Al4V alloy powders and selection of chemical environment for etching of such materials, *Archives of Metallurgy and Materials* 60/3 (2015) 2039-2045, doi: 10.1515/amm-2015-0346.
188. L.A. Dobrzański, A.D. Dobrzańska-Danikiewicz, P. Malara, T. Gawęł, L.B. Dobrzański, A. Achteлик-Franczak, Fabrication of scaffolds from Ti6Al4V powders using the computer aided laser method, *Archives of Metallurgy and Materials* 60/2 (2015) 1065-1070, doi: 10.1515/amm-2015-0260.
189. L.A. Dobrzański, A.D. Dobrzańska-Danikiewicz, M. Szindler, A. Achteлик-Franczak, W. Pakieła, Atomic layer deposition of TiO₂ onto porous biomaterials, *Archives of Materials Science and Engineering* 75/1 (2015) 5-11.
190. L.A. Dobrzański, A.D. Dobrzańska-Danikiewicz, A. Achteлик-Franczak, L.B. Dobrzański, Comparative analysis of mechanical properties of scaffolds sintered from Ti and Ti6Al4V powders, *Archives of Materials Science and Engineering* 73/2 (2015) 69-81.
191. A.J. Nowak, L.A. Dobrzański, R. Rybczyński, R. Mech, Finite Element Method application for modelling of internal oesophageal prosthesis, *Archives of Materials Science and Engineering* 64/2 (2013) 198-204.
192. T. Stefański, P. Malara, A. Kloc-Ptaszna, B. Janoszka, L. Postek-Stefańska, K. Tyrpień-Golder, L.A. Dobrzański, Erosive potential of calcium-supplemented citric acid on bovine enamel, *Archives of Materials Science and Engineering* 64/2 (2013) 175-181.
193. J. Żmudzki, G. Chladek, P. Malara, L.A. Dobrzański, M. Zorychta, K. Basa, The simulation of mastication efficiency of the mucous-borne complete dentures, *Archives of Materials Science and Engineering* 63/2 (2013) 75-86.
194. G. Chladek, J. Żmudzki, P. Malara, L.A. Dobrzański, C. Krawczyk, Effect of influence of introducing silver nanoparticles on tribological characteristics of soft liner, *Archives of Materials Science and Engineering* 62/1 (2013) 5-14.
195. M. Król, L.A. Dobrzański, Ł. Reimann, I. Czaja, Surface quality in selective laser melting of metal powders, *Archives of Materials Science and Engineering* 60/2 (2013) 87-92.
196. Ł. Reimann, L.A. Dobrzański, Influence of the casting temperature on dental Co-base alloys properties, *Archives of Materials Science and Engineering* 60/1 (2013) 5-12.
197. L.A. Dobrzański, Ł. Reimann, Digitization procedure of creating 3D model of dental bridgework reconstruction, *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering* 55/2 (2012) 469-476.

198. Ł. Reimann, J. Żmudzki, L.A. Dobrzański, Strength analysis of a three-unit dental bridge framework with the Finite Element Method, *Acta of Bioengineering and Biomechanics* 17/1 (2015) 51-59.
199. L.A. Dobrzański, A. Hudecki, Structure, geometrical characteristics and properties of biodegradable micro- and polycaprolactone nanofibers, *Archives of Materials Science and Engineering* 70/1 (2014) 5-13.
200. L.A. Dobrzański, A. Hudecki, G. Chladek, W. Król, A. Mertas, Surface properties and antimicrobial activity of composite nanofibers of polycaprolactone with silver precipitations, *Archives of Materials Science and Engineering* 70/2 (2014) 53-60.
201. L.A. Dobrzański, M. Szczęśna (red. naukowa), praca zbiorowa: Ćwiczenia laboratoryjne z nauki o materiałach, International OCSCO World Press, Gliwice, Open Access Library 12/30 (2013) 1-215.
202. L.A. Dobrzański, T. Tański (red. naukowa), praca zbiorowa: Ćwiczenia laboratoryjne z inżynierii materiałowej i nanotechnologii, International OCSCO World Press, Gliwice, Open Access Library 10/28 (2013) 1-763.
203. L.A. Dobrzański, A.D. Dobrzańska-Danikiewicz, Kształtowanie struktury i własności powierzchni materiałów inżynierskich, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice, 2013.
204. A.D. Dobrzańska-Danikiewicz, Księga technologii krytycznych kształtowania struktury i własności powierzchni materiałów inżynierskich, International OCSCO World Press, Gliwice, Open Access Library 8 (2013) 1-823.
205. S. Rumiński, B. Ostrowska, W. Święszkowski, M. Lewandowska-Szumieł, Human Adipose-Derived Stem Cells differentiate into osteoblast-like cells on ϵ -Polycaprolactone/Tricalcium Phosphate Composite Scaffolds, EMRS Fall Meeting, Warsaw, 2013.
206. S. Rumiński, B. Ostrowska, W. Święszkowski, M. Lewandowska-Szumieł, Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells on Polycaprolactone/ Tricalcium Phosphate Composite Scaffolds, TERMIS, Istanbul, 2013.
207. M. Noga, A. Pawlak, B. Dybała, B. Dąbrowski, W. Święszkowski, M. Lewandowska-Szumieł, Preparation and Evaluation of Biological Properties of Bioimplants Composed of Adipose Derived Stem Cells and Porous Titanium Scaffold (Ti-6Al-7Nb) with HAp/Ca-P Surface, TERMIS, Istanbul, 2013.
208. M. Karoluk, A. Pawlak, E. Chlebus, Wykorzystanie technologii przyrostowej SLM w procesie przetwarzania stopu tytanu Ti-6Al-7Nb do zastosowań biomedycznych, XI

- Konferencja Naukowa im. Prof. Dagmary Tejszerskiej „Majówka Młodych Biomechaników”, Ustroń, 2014, 53-54.
209. I.M. Wojak-Cwik, V. Hintze, M. Schnabelrauch, S. Moeller, P. Dobrzynski, E. Pamula, D. Scharnweber, Poly(L-lactide-co-glycolide) scaffolds coated with collagen and glycosaminoglycans: Impact on proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Journal of Biomedical Materials Research A* 101/11 (2013) 3109-3122.
210. P. Wilczek, M. Zembala, T. Cichoń, R. Smolarczyk, S. Szala, M. Zembala, Scaffold construction for effective transfer of cardiac stem cells to the damaged heart, *Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska* 9/2 (2012) 231-242.
211. E. Stodolak-Zych, A. Frączek-Szczypta, A. Wiecheć, M. Błazewicz, Nanocomposite Polymer Scaffolds for Bone Tissue Regeneration, *Acta Physica Polonica A* 121/2 (2012) 518-521.
212. M.T. Błazewicz et al., Nanokompozytowe materiały dla medycyny regeneracyjnej, Projekt N N507 463537, 2009-2012.
213. L. Rzeszutko, Z. Siudak, A. Włodarczak, A. Lekston, R. Depukat, A. Ochała, R.J. Gil, W. Balak, M. Marć, J. Kochman, W. Zasada, D. Dudek, Use of bioresorbable vascular scaffolds (BVS) in patients with stable angina and acute coronary syndromes, Polish National Registry, *Kardiologia Polska* 72/12 (2014) 1394-1399.
214. N. Dagalakakis, J. Flink, P. Stasikelis, J.F. Burke, I.V. Yannas, Design of an artificial skin. Part III. Control of pore structure, *Journal of Biomedical Materials Research* 14/4 (1980) 511-528.
215. D.J. Mooney, D.F. Baldwin, N.P. Suh, J.P. Vacanti, R. Langer, Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents, *Biomaterials* 17/14 (1996) 1417-1422.
216. H.L. Wald, G. Sarakinos, M.D. Lyman, A.G. Mikos, J.P. Vacanti, R. Langer, Cell seeding in porous transplantation devices, *Biomaterials* 14/4 (1993) 270-278.
217. M.J. Lima, V.M. Correlo, R.L. Reis, Micro/nano replication and 3D assembling techniques for scaffold fabrication, *Materials Science and Engineering C* 42 (2014) 615-621.
218. G.J. Wang, C.L. Chen, S.H. Hsu, Y.L. Chiang, Bio-MEMS fabricated artificial capillaries for tissue engineering, *Microsystem Technologies* 12/1-2 (2005) 120-127.
219. C.Y. Tay, S.A. Irvine, F.Y.C. Boey, L.P. Tan, S. Venkatraman, Micro-/nano-engineered cellular responses for soft tissue engineering and biomedical applications, *Small* 7/10 (2011) 1361-1378.
-

220. E. Delamarche, A. Bernard, H. Schmid, B. Michel, H. Biebuyck, Patterned delivery of immunoglobulins to surfaces using microfluidic networks, *Science* 276/5313 (1997) 779-781.
221. J. Kim, H.N. Kim, Y. Lang, A. Pandit, Biologically inspired micro- and nanoengineering systems for functional and complex tissues, *Tissue Engineering Part A* 20/15-16 (2014) 2127-2130.
222. M. Schwartzman, S.J. Wind, Robust pattern transfer of nanoimprinted features for sub-5-nm fabrication, *Nano Letters* 9/10 (2009) 3629-3634.
223. S.Y. Chou, P.R. Krauss, W. Zhang, L. Guo, L. Zhuang, Sub-10 nm Imprint Lithography and Applications, *Papers from the 41st International Conference on Electron, Ion, and Photon Beam Technology and Nanofabrication*, Dana Point, California, USA, 1997, 2897-2904.
224. S. Zhang, L. Yan, M. Altman, M. Lässle, H. Nugent, F. Frankel, D.A. Lauffenburger, G.M. Whitesides, A. Rich, Biological surface engineering: a simple system for cell pattern formation, *Biomaterials* 20/13 (1999) 1213-1220.
225. H. Cao, Z. Yu, J. Wang, J.O. Tegenfeldt, R.H. Austin, E. Chen, W. Wu, S.Y. Chou, Fabrication of 10 nm enclosed nanofluidic channels, *Applied Physics Letters* 81/1 (2002) 174-176.
226. S. Bose, S. Suguira, A. Bandyopadhyay, Processing of controlled porosity ceramic structures via fused deposition, *Scripta Materialia* 41/9 (1999) 1009-1014.
227. J. Darsell, S. Bose, H.L. Hosick, A. Bandyopadhyay, From CT scan to ceramic bone graft, *Journal of the American Ceramic Society* 86/7 (2003) 1076-1080.
228. D.W. Hutmacher, M. Sittinger, M.V. Risbud, Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems, *Trends in Biotechnology* 22/7 (2004) 354-362.
229. A. Mazzoli, Selective laser sintering in biomedical engineering, *Medical & Biological Engineering & Computing* 51/3 (2013) 245-256.
230. E.M. Sachs, S.H. John, J.C. Michael, A.W. Paul, Three-dimensional printing techniques, *Massachusetts Institute of Technology, U.S. Patent* 5,204,055, 1993.
231. W.-Y. Yeong, C.-K. Chua, K.-F. Leong, M. Chandrasekaran, M.-W. Lee, Indirect fabrication of collagen scaffold based on inkjet printing technique, *Rapid Prototyping Journal* 12/4 (2006) 229-237.

232. T. Dutta Roy, J.L. Simon, J.L. Ricci, E.D. Rekow, V.P. Thompson, J.R. Parsons, Performance of hydroxyapatite bone repair scaffolds created via three-dimensional fabrication techniques, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 67/4 (2003) 1228-1237.
233. A. Khalyfa, S. Vogt, J. Weisser, G. Grimm, A. Rechtenbach, W. Meyer, M. Schnabelrauch, Development of a new calcium phosphate powder-binder system for the 3D printing of patient specific implants, *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* 18/5 (2007) 909-916.
234. I. Manjubala, A. Woesz, C. Pilz, M. Rumpler, N. Fratzl-Zelman, P. Roschger, J. Stampfl, P. Fratzl, Biomimetic mineral-organic composite scaffolds with controlled internal architecture, *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* 16/12 (2005) 1111-1119.
235. E. Sachlos, N. Reis, C. Ainsley, B. Derby, J.T. Czernuszka, Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid freeform fabrication, *Biomaterials* 24/8 (2003) 1487-1497.
236. M.J. Sawkins, K.M. Shakesheff, L.J. Bonassar, G.R. Kirkham, 3D Cell and Scaffold Patterning Strategies in Tissue Engineering, *Recent Patents on Biomedical Engineering* 6/1 (2013) 3-21.
237. M.N. Cooke, J.P. Fisher, D. Dean, C. Rimnac, A.G. Mikos, Use of stereolithography to manufacture critical-sized 3D biodegradable scaffolds for bone ingrowth, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 64/2 (2003) 65-69.
238. K.W. Lee, S. Wang, B.C. Fox, E.L. Ritman, M.J. Yaszemski, L. Lu, Poly(propylene fumarate) bone tissue engineering scaffold fabrication using stereolithography: Effects of resin formulations and laser parameters, *Biomacromolecules* 8/4 (2007) 1077-1084.
239. B. Dhariwala, E. Hunt, T. Boland, Rapid prototyping of tissue-engineering constructs, using photopolymerizable hydrogels and stereolithography, *Tissue Engineering* 10/9-10 (2004) 1316-1322.
240. K. Arcaute, B.K. Mann, R.B. Wicker, Stereolithography of three-dimensional bioactive poly (ethylene glycol) constructs with encapsulated cells, *Annals of Biomedical Engineering* 34/9 (2006) 1429-1441.
241. S.S. Crump, Apparatus and method for creating three-dimensional objects, Stratasys Inc., U.S. Patent 5,121,329A, 1992.
-

242. D.W. Hutmacher, T. Schantz, I. Zein, K.W. Ng, S.H. Teoh, K.C. Tan, Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modelling, *Journal of Biomedical Materials Research* 55/2 (2001) 203-216.
243. H.-T. Liao, Y.-Y. Chen, Y.-T. Lai, M.-F. Hsieh, C.-P. Jiang, The Osteogenesis of Bone Marrow Stem Cells on mPEG-PCL-mPEG/Hydroxyapatite Composite Scaffold via Solid Freeform Fabrication, *BioMed Research International* (2014) Article ID 321549.
244. M.E. Hoque, D.W. Hutmacher, W. Feng, S. Li, M.H. Huang, M. Vert, Y.S. Wong, Fabrication using a rapid prototyping system and in vitro characterization of PEG-PCL-PLA scaffolds for tissue engineering, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 16/12 (2005) 1595-1610.
245. K.C. Ang, K.F. Leong, C.K. Chua, M. Chandrasekaran, Investigation of mechanical properties and porosity relationships fabricated porous structures, *Rapid Prototyping Journal* 12/2 (2006) 100-105.
246. J.J. Sun, C.J. Bae, Y.H. Koh, H.E. Kim, H.W. Kim, Fabrication of hydroxyapatite-poly(epsilon-caprolactone) scaffolds by a combination of the extrusion and bi-axial lamination processes, *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* 18 (2007) 1017-1023.
247. J.M. Williams, A. Adewunmi, R.M. Schek, C.L. Flanagan, P.H. Krebsbach, S.E. Feinberg, S.J. Hollister, S. Das, Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering, *Biomaterials* 26/23 (2005) 4817-4827.
248. K.H. Tan, C.K. Chua, K.F. Leong, C.M. Cheah, W.S. Gui, W.S. Tan, F.E. Wiria, Selective laser sintering of biocompatible polymers for applications in tissue engineering, *Bio-Medical Materials and Engineering* 15/1-2 (2005) 113-124.
249. C. Shuai, C. Gao, Y. Nie, H. Hu, Y. Zhou, S. Peng, Structure and properties of nano-hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering with a selective laser sintering system, *Nanotechnology* 22/28 (2011) 285703.
250. C.K. Chua, K.F. Leong, K.H. Tan, F.E. Wiria, C.M. Cheah, Development of tissue scaffolds using selective laser sintering of polyvinyl alcohol=hydroxyapatite biocomposite for craniofacial and joint defects, *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* 15/10 (2004) 1113-1121.
251. F.E. Wiria, K.F. Leong, C.K. Chua, Y. Liu, Poly-epsilon-caprolactone=hydroxyapatite for tissue engineering scaffold fabrication via selective laser sintering, *Acta Biomaterialia* 3/1 (2007) 1-12.

252. D.A. Hollander, T. Wirtz, M.V. Walter, R. Linker, A. Schultheis, O. Paar, Development of individual three-dimensional bone substitutes using “selective laser melting”, *European Journal of Trauma and Emergency Surgery* 4 (2003) 228-234.
253. S.J. Hollister, C.Y. Lin, E. Saito, C.Y. Lin, R.D. Schek, J.M. Taboas, J.M. Williams, B. Partee, C.L. Flanagan, A. Diggs, et al., Engineering craniofacial scaffolds, *Orthodontics and Craniofacial Research* 8 (2005) 162-173.
254. C. Mangano, A. Piattelli, S. d’Avila, G. Iezzi, F. Mangano, T. Onuma, J.A. Shibli, Early human bone response to laser metal sintering surface topography: A histologic report, *Journal of Oral Implantology* 36 (2010) 91-96.
255. P.H. Warnke, T. Douglas, P. Wollny, E. Sherry, M. Steiner, S. Galonska, S.T. Becker, I.N. Springer, J. Wiltfang, S. Sivananthan, Rapid prototyping: Porous titanium alloy scaffolds produced by selective laser melting for bone tissue engineering, *Tissue Engineering Part C Methods* 15 (2009) 115-124.
256. W. Xue, B.V. Krishna, A. Bandyopadhyay, S. Bose, Processing and biocompatibility evaluation of laser processed porous titanium, *Acta Biomaterialia* 3 (2007) 1007-1018.
257. A. Bandyopadhyay, F. Espana, V.K. Balla, S. Bose, Y. Ohgami, N.M. Davies, Influence of porosity on mechanical properties and in vivo response of Ti6Al4V implants, *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 1640-1648.
258. F.E. Wiria, J.Y.M. Shyan, P.N. Lim, F.G.C. Wen, J.F. Yeo, T. Cao, Printing of titanium implant prototype, *Materials & Design* 31 (2010) S101-S105.
259. S. Ponader, E. Vairaktaris, P. Heintl, C.V. Wilmowsky, A. Rottmair, C. Körner, R.F. Singer, S. Holst, K.A. Schlegel, F.W. Neukam, et al., Effects of topographical surface modifications of electron beam melted Ti-6Al-4V titanium on human fetal osteoblasts, *Journal of Biomedical Materials Research A* 84 (2008) 1111-1119.
260. S. Ponader, C. von Wilmowsky, M. Widenmayer, R. Lutz, P. Heintl, C. Körner, R.F. Singer, E. Nkenke, F.W. Neukam, K.A. Schlegel, In vivo performance of selective electron beam-melted Ti-6Al-4V structures, *Journal of Biomedical Materials Research A* 92 (2009) 56-62.
261. P. Thomsen, J. Malmström, L. Emanuelsson, M. René, A. Snis, Electron beam-melted, free-form-fabricated titanium alloy implants: Material surface characterization and early bone response in rabbits, *Journal of Biomedical Materials Research B* 90 (2009) 35-44.
262. C.M. Haslauer, J.C. Springer, O.L.A. Harrysson, E.G. Lobo, N.A. Monteiro-Riviere, D.J. Marcellin-Little, In vitro biocompatibility of titanium alloy discs made using direct metal fabrication, *Medical Engineering & Physics* 32 (2010) 645-652.
-

263. X. Li, Y.F. Feng, C.T. Wang, G.C. Li, W. Lei, Z.Y. Zhang, L. Wang, Evaluation of biological properties of electron beam melted Ti6Al4V implant with biomimetic coating in vitro and in vivo, *PLoS One* 7 (2012) e52049, doi: 10.1371/journal.pone.0052049.
264. A. Palmquist, A. Snis, L. Emanuelsson, M. Browne, P. Thomsen, Long-term biocompatibility and osseointegration of electron beam melted, free-form-fabricated solid and porous titanium alloy: Experimental studies in sheep, *Journal of Biomaterials Applications* 27 (2013) 1003-1016.
265. J.A. Sago, M.W. Broadley, J.K. Eckert, H. Chen, Manufacturing of implantable biomedical devices by metal injection moulding, *Advances in Powder Metallurgy and Particulate Materials* 4 (2010) 89-99.
266. T. Ebel, C. Blawert, R. Willumeit, B.J.C. Luthringer, O.M. Ferri, F. Feyerabend, Ti-6Al-4V-0.5B: A modified alloy for implants produced by injection molding, *Advanced Engineering Materials* 13 (2011) B440-B453.
267. D. Auzene, C. Mallejac, C. Demangel, F. Lebel, J.L. Duval, P. Vigneron, J.C. Puipe, Influence of surface aspects and properties of MIM titanium alloys for medical applications, *PIM International* 6 (2012) 57-61.
268. C. Demangel, D. Auzène, M. Vayssade, J.-L. Duval, P. Vigneron, M.-D. Nagel, J.-C. Puipe, Cytocompatibility of titanium metal injection molding with various anodic oxidation post-treatments, *Materials Science and Engineering: C* 32 (2012) 1919-1925.
269. R. Ibrahim, M. Azmiruddin, M. Jabir, N. Muhamad, M. Rafiq, N. Hayaty, A. Kasim, S. Muhamad, K. Hanada, T. Shimizu, et al., Pre-Clinical Study on the Oral Maxillofacial (OMF) Titanium Alloy Implants Produced By Metal Injection Molding (MIM) Using Palm Oil Based Binder System, *Euro PM Congress and Exhibition and EPMA: Gothenburg, Sweden, 2013*.
270. R. Murugan, S. Ramakrishna, Nano-featured scaffolds for tissue engineering: A review of spinning methodologies, *Tissue Engineering* 12/3 (2006) 435-447.
271. T.J. Sill, H.A. von Recum, Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering, *Biomaterials* 29/13 (2008) 1989-2006.
272. J.A. Matthews, G.E. Wnek, D.G. Simpson, G.L. Bowlin, Electrospinning of collagen nanofibers, *Biomacromolecules* 3/2 (2002) 232-238.
273. F. Yang, R. Murugan, S. Wang, S. Ramakrishna, Electrospinning of nano=micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering, *Biomaterials* 26/15 (2005) 2603-2610.

274. R.W. Tuttle, A. Chowdury, E.T. Bender, R.D. Ramsier, J.L. Rapp, M.P. Espe, Electrospun ceramic fibers: Composition, structure and the fate of precursors, *Applied Surface Science* 254/16 (2008) 4925-4929.
275. A.L. Andradý, Science and technology of polymer nanofibers, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2008.
276. J.M. Deitzel, J. Kleinmeyer, D. Harris, N.C. Beck Tan, The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles, *Polymer* 42/1 (2001) 261-272.
277. C. Wang, K.-W. Yan, Y.-D. Lin, P.C.H. Hsieh, Biodegradable Core/Shell Fibers by Coaxial Electrospinning: Processing, Fiber Characterization, and Its Application in Sustained Drug Release, *Macromolecules* 43/15 (2010) 6389-6397.
278. J.D. Hartgerink, E. Beniash, S.I. Stupp, Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers, *Science* 294/5547 (2001) 1684-1688.
279. J.D. Hartgerink, E. Beniash, S.I. Stupp, Peptide-amphiphile nanofibers: A versatile scaffold for the preparation of self-assembling materials, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99/8 (2002) 5133-5138.
280. E. Beniash, J.D. Hartgerink, H. Storrie, J.C. Stendahl, S.I. Stupp Self-assembling peptide amphiphile nanofiber matrices for cell entrapment, *Acta Biomaterialia* 1/4 (2005) 387-397.
281. S. Zhang, F. Gelain, X. Zhao, Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for 3D tissue cell cultures, *Seminars in Cancer Biology* 15/5 (2005) 413-420.
282. F. Gelain, A. Horii, S. Zhang, Designer self-assembling peptide scaffolds for 3-d tissue cell cultures and regenerative medicine, *Macromolecular Bioscience* 7/5 (2007) 544-551.
283. S.H. Um, J.B. Lee, N. Park, S.Y. Kwon, C.C. Umbach, D. Luo, Enzyme-catalysed assembly of DNA hydrogel, *Nature Materials* 5/10 (2006) 797-801.
284. J.A. Hunt, R. Chen, T. van Veen, N. Bryan, Hydrogels for tissue engineering and regenerative medicine, *Journal of Materials Chemistry B* 2 (2014) 5319-5338.
285. J. Guan, Y. Hong, Z. Ma, W.R. Wagner, Protein-reactive, thermoresponsive copolymers with high flexibility and biodegradability, *Biomacromolecules* 9/4 (2008) 1283-1292.
286. S. Qin, Y. Geng, D.E. Discher, S. Yang, Temperature-Controlled Assembly and Release from Polymer Vesicles of Poly(ethylene oxide)-block- poly(*N*-isopropylacrylamide), *Advanced Materials* 18/21 (2006) 2905-2909.
287. R. Liu, M. Fraylich, B.R. Saunders, Thermoresponsive copolymers: from fundamental studies to applications, *Colloid and Polymer Science* 287 (2009) 627-643.

288. S. Ohya, Y. Nakayama, T. Matsuda, In vivo evaluation of poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM)-grafted gelatin as an in situ-formable scaffold, *Journal of Artificial Organs* 7/4 (2004) 181-186.
289. H. Tan, C.R. Chu, K.A. Payne, K.G. Marra, Injectable in situ forming biodegradable chitosan–hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering, *Biomaterials* 30/13 (2009) 2499-2506.
290. S.B. Lee, D.I. Ha, S.K. Cho, S.J. Kim, Y.M. Lee, Temperature/pH-sensitive comb-type graft hydrogels composed of chitosan and poly(*N*-isopropylacrylamide), *Journal of Applied Polymer Science* 92/4 (2004) 2612-2620.
291. B.K. Lau, Q.Q. Wang, W. Sun, L. Li, Micellization to Gelation of a Triblock Copolymer in Water: Thermoreversibility and Scaling, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 42 (2004) 2014-2025.
292. B. Jeong, Y.H. Bae, S.W. Kim, Thermoreversible Gelation of PEG–PLGA–PEG Triblock Copolymer Aqueous Solutions, *Macromolecules* 32/21 (1999) 7064-7069.
293. C. Hiemstra, Z.Y. Zhong, L.B. Li, P.J. Dijkstra, J. Feijen, In-Situ Formation of Biodegradable Hydrogels by Stereocomplexation of PEG–(PLLA)₈ and PEG–(PDLA)₈ Star Block Copolymers, *Biomacromolecules* 7/10 (2006) 2790-2795.
294. W.S. Shim, J.H. Kim, H. Park, K. Kim, I.C. Kwon, D.S. Lee, Biodegradability and biocompatibility of a pH- and thermo-sensitive hydrogel formed from a sulfonamide-modified poly(ϵ -caprolactone-co-lactide)–poly(ethylene glycol)–poly(ϵ -caprolactone-co-lactide) block copolymer, *Biomaterials* 27/30 (2006) 5178-5185.
295. C.Y. Gong, S.A. Shi, P.W. Dong, B. Kan, M.L. Gou, X.H. Wang, X.Y. Li, F. Luo, X. Zhao, Y.Q. Wei, Z.Y. Qian, Synthesis and characterization of PEG-PCL-PEG thermo-sensitive hydrogel, *International Journal of Pharmaceutics* 365/1-2 (2009) 89-99.
296. K. Park, H.H. Jung, J.S. Son, J.-W. Rhie, K.D. Park, K.-D. Ahn, D.K. Han, Thermo-sensitive and cell-adhesive pluronic hydrogels for human adipose-derived stem cells, *Key Engineering Materials* 342-343 (2007) 301-304.
297. K. Kurata, A. Dobashi, Novel Temperature- and pH-Responsive Linear Polymers and Crosslinked Hydrogels Comprised of Acidic L- α -Amino Acid Derivatives, *Journal of Macromolecular Science, Part A. Pure and Applied Chemistry* 41/2 (2004) 143-164.
298. K. Nagase, J. Kobayashi, A. Kikuchi, Y. Akiyama, H. Kanazawa, T. Okano, Preparation of thermoresponsive cationic copolymer brush surfaces and application of the surface to separation of biomolecules, *Biomacromolecules* 9/4 (2008) 1340-1347.

299. Y. Loo, S. Zhang, C.A.E. Hauser, From short peptides to nanofibers to macromolecular assemblies in biomedicine, *Biotechnology Advances* 30/3 (2012) 593-603.
300. C. Xu, J. Kopecek, Self-assembling hydrogels, *Polymer Bulletin* 58 (2007) 53-63.
301. S. Zhang, Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly, *Nature Biotechnology* 21/10 (2003) 1171-1178.
302. S.A. Gabriel, C. Catherine, N.L. Krista, E. Beniash, D.A. Harrington, J.A. Kessler, S.I. Stupp, Selective Differentiation of Neural Progenitor Cells by High-Epitope Density Nanofibers, *Science* 303/5662 (2004) 1352-1355.
303. M.A. Bokhari, G. Akay, S. Zhang, M.A. Birch, The enhancement of osteoblast growth and differentiation in vitro on a peptide hydrogel-polyHIPE polymer hybrid material, *Biomaterials* 26/25 (2005) 5198-5208.
304. R. Chen, J.A. Hunt, Biomimetic materials processing for tissue-engineering processes, *Journal of Materials Chemistry* 17/38 (2007) 3974-3979.
305. H. Lihong, E.S. Read, S.P. Armes, D.J. Adams, Direct Synthesis of Controlled-Structure Primary Amine-Based Methacrylic Polymers by Living Radical Polymerization, *Macromolecules* 40/13 (2007) 4429-4438.
306. Q. Yu, F. Zeng, S. Zhu, Atom Transfer Radical Polymerization of Poly(ethylene glycol) Dimethacrylate, *Macromolecules* 34/6 (2001) 1612-1618.
307. J.A. Killion, L.M. Geever, D.M. Devine, L. Grehan, J.E. Kennedy, C.L. Higginbotham, Modulating the mechanical properties of photopolymerised polyethylene glycol–polypropylene glycol hydrogels for bone regeneration, *Journal of Materials Science* 47/18 (2012) 6577-6585.
308. C. Ye, Z.H. Li, D. Li, C.Y. Gao, Fabrication and mineralization of poly(propylene fumarate)/hydroxyapatite porous hydrogels, *Acta Polymerica Sinica* 10 (2012) 1143-1150.
309. J.H. Hui, X. Ren, M.H. Afizah, K.S. Chian, A.G. Mikos, Oligo[poly(ethylene glycol) fumarate] Hydrogel Enhances Osteochondral Repair in Porcine Femoral Condyle Defects, *Clinical Orthopaedics* 471/4 (2013) 1174-1185.
310. J.S. Choi, H.S. Yoo, Pluronic/chitosan hydrogels containing epidermal growth factor with wound-adhesive and photo-crosslinkable properties, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 95/2 (2010) 564-573.
311. E.A. Kamoun, H. Menzel, Crosslinking behavior of dextran modified with hydroxyethyl methacrylate upon irradiation with visible light – Effect of concentration, coinitiator type, and solvent, *Journal of Applied Polymer Science* 117/6 (2010) 3128-3138.

312. S. Ibrahim, C.R. Kothapalli, Q.K. Kang, A. Ramamurthi, Characterization of glycidyl methacrylate – Crosslinked hyaluronan hydrogel scaffolds incorporating elastogenic hyaluronan oligomers, *Acta Biomaterialia* 7/2 (2011) 653-665.
313. A.D. Rouillard, C.M. Berglund, J.Y. Lee, W.J. Polacheck, Y. Tsui, L.J. Bonassar, B.J. Kirby, Methods for Photocrosslinking Alginate Hydrogels Scaffolds with High Cell Viability, *Tissue Engineering Part C* 17/2 (2011) 173-179.
314. D.J. Overstreet, D. Dutta, S.E. Stabenfeldt, B.L. Vernon, Injectable hydrogels, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 50/13 (2012) 881-903.
315. M.P. Lütolf, G.P. Raeber, A.H. Zisch, T. Nicola, J.A. Hubell, Cell-Responsive Synthetic Hydrogels, *Advanced Materials* 15/11 (2003) 888-892.
316. X.Z. Shu, K. Ghosh, Y. Liu, F.S. Palumbo, Y. Luo, R.A. Clark, G.D. Prestwich, Attachment and spreading of fibroblasts on an RGD peptide-modified injectable hyaluronan hydrogel, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 68/2 (2004) 365-375.
317. H. Tan, C.M. Ramirez, N. Miljkovic, H. Li, J.P. Rubin, K.G. Marra, Thermosensitive injectable hyaluronic acid hydrogel for adipose tissue engineering, *Biomaterials* 30/36 (2009) 6844-6853.
318. J. Maia, L. Ferreira, R. Carvalho, M.A. Ramos, M.H. Gil, Synthesis and characterization of new injectable and degradable dextran-based hydrogels, *Polymer* 46/23 (2005) 9604-9614.
319. K.K. Nishi, A. Jayakrishnan, Preparation and in vitro evaluation of primaquine-conjugated gum arabic microspheres, *Biomacromolecules* 5/4 (2004) 1489-1495.
320. D.A. Wang, S. Varghese, B. Shama, I. Strehin, S. Fermanian, J. Gorham, D.H. Fairbrother, B. Cascio, J.H. Elisseeff, Multifunctional chondroitin sulphate for cartilage tissue-biomaterial integration, *Nature Materials* 6/5 (2007) 385-392.
321. J.J. Sperinde, L.G. Griffith, Control and prediction of gelation kinetics in enzymatically cross-linked poly(ethylene glycol) hydrogels, *Macromolecules* 33/15 (2000) 5476-5480.
322. B.J. Ryan, N. Carolan, C. O'Fagain, Horseradish and soybean peroxidases: comparable tools for alternative niches? *Trends in Biotechnology* 24/8 (2006) 355-363.
323. L.S. Moreira Teixeira, J. Feijen, C.A. van Blitterswijk, P.J. Dijkstra, M. Karperien, Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: emerging strategies for tissue engineering, *Biomaterials* 33/5 (2012) 1281-1290.
324. R. Jin, L.S. Moreira Teixeira, P.J. Dijkstra, Z. Zhong, C.A. van Blitterswijk, M. Karperien, J. Feijen, Enzymatically crosslinked dextran-tyramine hydrogels as injectable scaffolds for cartilage tissue engineering, *Tissue Engineering Part A* 16/8 (2010) 2429-2440.

325. J.W.H. Wennink, K. Niederer, A.I. Bochyńska, L.S. Moreira Teixeira, M. Karperien, J. Feijen, P.J. Dijkstra, Injectable Hydrogels by Enzymatic Co-Crosslinking of Dextran and Hyaluronic Acid Tyramine Conjugates, *Macromolecular Symposia* 309-310/1 (2011) 213-221.
326. S. Sakai, K. Kawakami, Both ionically and enzymatically crosslinkable alginate-tyramine conjugate as materials for cell encapsulation, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 85/2 (2008) 345-351.
327. S. Sakai, Y. Ogushi, K. Kawakami, Enzymatically crosslinked carboxymethylcellulose-tyramine conjugate hydrogel: cellular adhesiveness and feasibility for cell sheet technology, *Acta Biomaterialia* 5/2 (2009) 554-559.
328. A.A. Amini, L.S. Nair, Enzymatically cross-linked injectable gelatin gel as osteoblast delivery vehicle, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 27/4 (2012) 342-355.
329. C. Fernandez, C.M. Hattan, R.J. Kerns, Semi-synthetic heparin derivatives: chemical modifications of heparin beyond chain length, sulfate substitution pattern and *N*-sulfo/*N*-acetyl groups, *Carbohydrate Research* 341/10 (2006) 1253-1265.
330. K.M. Park, Y.M. Shin, Y.K. Joung, H. Shin, K.D. Park, In situ forming hydrogels based on tyramine conjugated 4-arm-PPO-PEO via enzymatic oxidative reaction, *Biomacromolecules* 11/3 (2010) 706-712.
331. J.S. Patil, M.V. Kamalapur, S.C. Marapur, D.V. Kadam, Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: the novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: A review, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 5/1 (2010) 241-248.
332. K.E. Crompton, J.D. Goud, R.V. Bellamkonda, T.R. Gengenbach, D.I. Finkelstein, M.K. Horne, J.S. Forsythe, Polylysine-functionalised thermoresponsive chitosan hydrogel for neural tissue engineering, *Biomaterials* 28/3 (2007) 441-449.
333. J. Berger, M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, N.A. Peppas, R. Gurny, Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57/1 (2004) 19-34.
334. J.K. Tessmar, A.M. Gopferich, Customized PEG-derived copolymers for tissue-engineering applications, *Macromolecular Bioscience* 7/1 (2007) 23-39.
335. J.B. Leach, K.A. Bivens, C.W. Patrick Jr., C.E. Schmidt, Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: Natural, biodegradable tissue engineering scaffolds, *Biotechnology and Bioengineering* 82/5 (2003) 578-589.

336. J.L. Young, J. Tuler, R. Braden, P. Schüp-Magoffin, J. Schaefer, K. Kretchmer, K.L. Christman, A.J. Engler, In vivo response to dynamic hyaluronic acid hydrogels, *Acta Biomaterialia* 9/7 (2013) 7151-7157.
337. X.Z. Shu, Y. Liu, F.S. Palumbo, Y. Luo, G.D. Prestwich, In situ crosslinkable hyaluronan hydrogels for tissue engineering, *Biomaterials* 25/7-8 (2004) 1339-1348.
338. N.N. Fathima, B. Madhan, J.R. Rao, B.U. Nair, T. Ramasami, Interaction of aldehydes with collagen: effect on thermal, enzymatic and conformational stability, *International Journal of Biological Macromolecules* 34/4 (2004) 241-247.
339. D. MacAya, K.K. Ng, M. Spector, Injectable Collagen–Genipin Gel for the Treatment of Spinal Cord Injury: In Vitro Studies, *Advanced Functional Materials* 21/24 (2011) 4788-4797.
340. Y.J. Hwang, J.G. Lyubovitsky, The structural analysis of three-dimensional fibrous collagen hydrogels by Raman microspectroscopy, *Biopolymers* 99/6 (2013) 349-356.
341. J.B. Leach, K.A. Bivens, C.N. Collins, C.E. Schmidt, Development of photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol-peptide composite hydrogels for soft tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 70/1 (2004) 74-82.
342. J. Berger, M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, R. Gurny, Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57/1 (2004) 35-52.
343. Y. Hong, H. Song, Y. Gong, Z. Mao, C. Gao, J. Shen, Covalently crosslinked chitosan hydrogel: Properties of in vitro degradation and chondrocyte encapsulation, *Acta Biomaterialia* 3/1 (2007) 23-31.
344. A. Lahiji, A. Sohrabi, D.S. Hungerford, C.G. Frondoza, Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes, *Journal of Biomedical Materials Research* 51/4 (2000) 586-595.
345. R. Jin, C. Hiemstra, Z. Zhong, J. Feijen, Enzyme-mediated fast in situ formation of hydrogels from dextran–tyramine conjugates, *Biomaterials* 28/18 (2007) 2791-2800.
346. J.M. Jukes, L.J. van der Aa, C. Hiemstra, T. van Veen, P.J. Dijkstra, Z.Y. Zhong, J. Feijen, A Newly Developed Chemically Crosslinked Dextran–Poly(Ethylene Glycol) Hydrogel for Cartilage Tissue Engineering, *Tissue Engineering Part A* 16/2 (2010) 565-573.
347. A. Mosahebi, M. Simon, M. Wiberg, G. Terenghi, A novel use of alginate hydrogel as Schwann cell matrix, *Tissue Engineering* 7/5 (2001) 525-534.

348. B.G. Ballios, M.J. Cooke, D. van der Kooy, M.S. Shoichet, A hydrogel-based stem cell delivery system to treat retinal degenerative diseases, *Biomaterials* 31/9 (2010) 2555-2564.
349. U. Noth, K. Schupp, A. Heymer, S. Kall, F. Jakob, N. Schutze, B. Baumann, T. Barthel, J. Eulert, C. Hendrich, Anterior cruciate ligament constructs fabricated from human mesenchymal stem cells in a collagen type I hydrogel, *Cytherapy* 7/5 (2005) 447-455.
350. J. Gao, R. Liu, J. Wu, Z. Liu, J. Li, J. Zhou, T. Hao, Y. Wang, Z. Du, C. Duan, C. Wang, The use of chitosan based hydrogel for enhancing the therapeutic benefits of adipose-derived MSCs for acute kidney injury, *Biomaterials* 33/14 (2012) 3673-3681.
351. S.L. Hume, S.M. Hoyt, J.S. Walker, B.V. Sridhar, J.F. Ashley, C.N. Bowman, S.J. Bryant, Alignment of multi-layered muscle cells within three-dimensional hydrogel macrochannels, *Acta Biomaterialia* 8/6 (2012) 2193-2202.
352. S. Shinohara, T. Kihara, S. Sakai, M. Matsusaki, M. Akashi, M. Taya, J. Miyake, Fabrication of in vitro three-dimensional multilayered blood vessel model using human endothelial and smooth muscle cells and high-strength PEG hydrogel, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 116/2 (2013) 231-234.
353. Y. Liu, M.B. Chan-Park, Hydrogel based on interpenetrating polymer networks of dextran and gelatin for vascular tissue engineering, *Biomaterials* 30/2 (2009) 196-207.
354. T. Sawada, K. Tsukada, K. Hasegawa, Y. Ohashi, Y. Udagawa, V. Gomel, Cross-linked hyaluronate hydrogel prevents adhesion formation and reformation in mouse uterine horn model, *Human Reproduction* 16/2 (2001) 353-356.
355. Y. Yeo, C.B. Highley, E. Bellas, T. Ito, R. Marini, R. Langer, D.S. Kohane, In situ cross-linkable hyaluronic acid hydrogels prevent post-operative abdominal adhesions in a rabbit model, *Biomaterials* 27/27 (2006) 4698-4705.
356. D.L. Hern, J.A. Hubbell, Incorporation of adhesion peptides into nonadhesive hydrogels useful for tissue resurfacing, *Journal of Biomedical Materials Research* 39/2 (1998) 266-276.
357. J.A. Rowley, G. Madlambayan, D.J. Mooney, Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials, *Biomaterials* 20/1 (1999) 45-53.
358. T. Kaneko, S. Tanaka, A. Ogura, M. Akashi, Tough, thin hydrogel membranes with giant crystalline domains composed of precisely synthesized macromolecules, *Macromolecules* 38/11 (2005) 4861-4867.

359. D.J. Odde, M.J. Renn, Laser-guided direct writing of living cells, *Biotechnology and Bioengineering* 67/3 (2000) 312-318.
360. Y. Nahmias, R.E. Schwartz, C.M. Verfaillie, D.J. Odde, Laser-guided direct writing for threedimensional tissue engineering, *Biotechnology and Bioengineering* 92/2 (2005) 129-136.
361. V. Mironov, T. Boland, T. Trusk, G. Forgacs, R. Markwald, Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering, *Trends in Biotechnology* 21/4 (2003) 157-161.
362. V. Mironov, T. Trusk, V. Kasyanov, S. Little, R. Swaja, R. Markwald, Biofabrication: a 21st century manufacturing paradigm, *Biofabrication* 1/2 (2009) 1-16.
363. T. Boland, V. Mironov, A. Gutowska, E.A. Roth, R.R. Markwald, Cell and organ printing 2: Fusion of cell aggregates in three-dimensional gels, *The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* 272/2 (2003) 497-502.
364. R. Landers, R. Mülhaupt, Desktop manufacturing of complex objects, prototypes and biomedical scaffolds by means of computer-assisted design combined with computer-guided 3D plotting of polymers and reactive oligomers, *Macromolecular Materials and Engineering* 282/1 (2000) 17-21.
365. W. Tan, T.A. Desai, Layer-by-layer microfluidics for biomimetic three-dimensional structures, *Biomaterials* 25/7-8 (2004) 1355-1364.
366. D.R. Albrecht, G.H. Underhill, T.B. Wassermann, R.L. Sah, S.N. Bhatia, Probing the role of multicellular organization in three-dimensional microenvironments, *Nature Methods* 3/5 (2006) 369-375.
367. S. Writers, Invetech helps bring bio-printers to life, *LifeScientist*, 2009, <http://lifescientist.com.au/content/biotechnology/news/invetech-helps-bring-bio-printers-to-life-413047968>, dostęp 25.03.2016.
368. S. Bhatia, M. Birchall, et al., 3D-printed sugar network to help grow artificial liver, *BBC*, 2012, <http://www.bbc.com/news/technology-18677627>, dostęp 25.03.2016.
369. L.E. Bertassoni, M. Cecconi, V. Manoharan, M. Nikkhah, J. Hjortnaes, A.L. Cristino, G. Barabaschi, D. Demarchi, M.R. Dokmeci, Y. Yang, A. Khademhosseini, Hydrogel bioprinted microchannel networks for vascularization of tissue engineering constructs, *Lab on a Chip* 14/13 (2014) 2202-2211.
370. T.A. Campbell, R. Reid et al., 3D Printing: Challenges and Opportunities for International Relations, Transcript, Council on Foreign Relations, CFR.org, 2013, <http://www.cfr.org/>

- technology-and-science/3d-printing-challenges-opportunities-international-relations/p35509, dostęp 15.02.2016.
371. J.T. Quigley, Chinese Scientists Are 3D Printing Ears and Livers – With Living Tissue, Tech Biz, The Diplomat, 2013, <http://thediplomat.com/2013/08/-chinese-scientists-are-3d-printing-ears-and-livers-with-living-tissue/>, dostęp 15.03.2016.
372. How do they 3D print kidney in China, 3Ders.org, 2013, <http://www.3ders.org/articles/20130815-how-do-they-3d-print-kidney-in-china.html>, dostęp 15.03.2016.
373. M. Littre, Humans could be fitted with kidneys made on 3D PRINTERS thanks to Australian researchers who have already grown miniature organs in labs, by K. Lyons, DailyMailOnline, 2014, <http://www.dailymail.co.uk/sciencetech/article-2637158/Humans-fitted-kidneys-3D-printers.html>, dostęp 5.04.2016.
374. J. Hoying et al., New 3D bioprinter to reproduce human organs, change the face of healthcare: The inside story, by L. Gilpin, TechRepublic, 2014, <http://www.techrepublic.com/article/new-3d-bioprinter-to-reproduce-human-organs/>, dostęp 5.04.2016.
375. L.A. Dobrzański, Metaloznawstwo opisowe stopów metali nieżelaznych, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice, 2008.
376. J. Emsley, Nature's Building Blocks: An A-Z Guide to the Elements, Oxford University Press, Oxford, 2001.
377. E. Hill, M.J. Mellin, B. Deane, Y. Liu, L.A. Taylor, Apollo sample 70051 and high- and low-Ti lunar soil simulants MLS-1A and JSC-1A: Implications for future lunar exploration, *Journal of Geophysical Research* 112 (2007) 1-11, doi: 10.1029/2006JE002767.
378. M.J. Donachie Jr, Titanium. A Technical Guide. 2nd Edition, ASM International, Metals Park, OH, 2000.
379. J. Barksdale, Titanium, in: *The Encyclopedia of the Chemical Elements*, Reinhold Book Corporation, Skokie, IL, 1968, 732-738.
380. Titanium. *Columbia Encyclopedia*, 6th Edition, Columbia University Press, New York, 2000-2006.
381. Ignasi Puigdomenech, Hydra/Medusa Chemical Equilibrium Database and Plotting Software (2004) KTH Royal Institute of Technology, freely downloadable software, <https://www.kth.se/en/che/medusa/downloads-1.386254> , dostęp 21.02.2016.
-

382. L.A. Dobrzański, D. Pakuła, M. Staszuk, A.D. Dobrzańska-Danikiewicz, Struktura i własności wieloskładnikowych powłok na węglkach spiekanych oraz ceramice azotkowej i sialonowej, *Open Access Library V/1* (2015) 1-173.
383. L.A. Dobrzański, D. Pakuła, M. Staszuk, Chemical Vapor Deposition in Manufacturing, in: A.Y.C. Nee (ed.), *Handbook of Manufacturing Engineering and Technology*, Springer-Verlag, London, 2015, 2755-2803, doi: 10.1007/978-1-4471-4670-4_30.
384. L.A. Dobrzański, K. Gołombek, K. Lukaszewicz, Physical Vapor Deposition in Manufacturing, in: A.Y.C. Nee (ed.), *Handbook of Manufacturing Engineering and Technology*, Springer-Verlag, London, 2015, 2719-2754, doi: 10.1007/978-1-4471-4670-4_29.
385. K. Lukaszewicz, L.A. Dobrzański, J. Sondor, Microstructure, mechanical properties and corrosion resistance of nanocomposite coatings deposited by PVD technology, in: B.S.R. Reddy (ed.), *Advances in Diverse Industrial Applications of Nanocomposites*, InTech, Rijeka, Croatia, 2011, 1-16, doi: 10.5772/14117
386. M. Staszuk, L.A. Dobrzański, T. Tański, W. Kwaśny, M. Muszyńska-Staszuk, The effect of PVD and CVD coating structures on the durability of sintered cutting edges, *Archives of Metallurgy and Materials* 59/1 (2014) 269-274, doi: 10.2478/amm-2014-0044.
387. K. Lukaszewicz, L.A. Dobrzański, G. Kokot, P. Ostachowski, Characterization and properties of PVD coatings applied to extrusion dies, *Vacuum* 86/12 (2012) 2082-2088, doi: 10.1016/j.vacuum.2012.04.025.
388. L.A. Dobrzański, M. Staszuk, K. Gołombek, A. Śliwa, M. Pancielejko, Structure and properties PVD and CVD coatings deposited onto edges of sintered cutting tools, *Archives of Metallurgy and Materials* 55/1 (2010)187-193.
389. L.A. Dobrzański, L.W. Żukowska, J. Mikuła, K. Gołombek, D. Pakuła, M. Pancielejko, Structure and mechanical properties of gradient PVD coatings, *Journal of Materials Processing Technology* 201/1-3 (2008) 310-314, doi: 10.1016/j.jmatprotec.2007.11.283.
390. L.A. Dobrzański, K. Labisz, E. Jonda, A. Klimpel, Comparison of the surface alloying of the 32CrMoV12-28 tool steel using TiC and WC powder, *Journal of Materials Processing Technology* 191/1-3 (2007) 321-325.
391. D.J. Fray, G.Z. Chen, T.W. Farthing, Direct electrochemical reduction of titanium dioxide to titanium in molten calcium chloride, *Nature* 407/6802 (2000) 361-364, doi: 10.1038/35030069.

392. L.A. Dobrzański, A.D. Dobrzańska-Danikiewicz, A. Achtelik-Franczak, L.B. Dobrzański, M. Szindler, T.G. Gawęł, Porous selective laser melted Ti and Ti6Al4V materials for medical applications, in: L.A. Dobrzański (ed.), *Powder Metallurgy – Fundamentals and Case Studies*, InTech, Rijeka, Croatia, 2017, 161-181, doi: 10.5772/65375.
393. L.A. Dobrzański, A.D. Dobrzańska-Danikiewicz, A. Achtelik-Franczak, M. Szindler, Structure and properties of the skeleton microporous materials with coatings inside the pores for medical and dental applications, *International Conference on Frontiers in Materials Processing, Applications, Research, & Technology, FiMPART'2015*, 12-15.06.2015, Hyderabad, India, Springer, Singapore, 2017 (in press).
394. L.B. Dobrzański, *Struktura i własności materiałów inżynierskich na uzupełnienia protetyczne układu stomatognatycznego wytwarzane metodami przyrostowymi i ubytkowymi*, Akademia Górniczo-Hutnicza, Kraków, 2017, praca doktorska w toku.
395. L.A. Dobrzański, A. Hudecki: Sposób wytwarzania materiału kompozytowego o własnościach bioaktywnych i bakteriobójczych, *Zgłoszenie Patentowe P 410427 z 8.12.2014*, *Biuletyn Urzędu Patentowego 44/13 (2016) 25*.
396. L.A. Dobrzański, A. Hudecki: Sposób wytwarzania materiału kompozytowego o własnościach bioaktywnych i bakteriobójczych, *Zgłoszenie Patentowe P 410452 z 8.12.2014*, *Biuletyn Urzędu Patentowego 44/13 (2016) 25*.
397. R. Murugan, S. Ramakrishna, Design strategies of tissue engineering scaffolds with controlled fiber orientation, *Tissue Engineering 13/8 (2007) 1845-1866*, doi: 10.1089/ten.2006.0078.
398. L.A. Dobrzański, A.J. Nowak, W. Błazejewski, R. Rybczyński, The concept of preparation of oesophageal prosthesis based on long-fibre composite material, *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering 46/1 (2011) 18-24*.
399. L.A. Dobrzański, A.D. Dobrzańska-Danikiewicz, P. Malara, T.G. Gawęł, L.B. Dobrzański, A. Achtelik, Kompozyt wykonany z użyciem komputerowo wspomaganym metod laserowych na implanty twarzoczaszki oraz sposób jego wytwarzania, *Zgłoszenie Patentowe P 411689 z 23.03.2015*.
400. L.A. Dobrzański, A.D. Dobrzańska-Danikiewicz, P. Malara, T.G. Gawęł, L.B. Dobrzański, A. Achtelik-Franczak, Implanto-skafold lub proteza elementów anatomicznych układu stomatognatycznego oraz twarzoczaszki, *Zgłoszenie Patentowe P 414423 z 19.10.2015*.
-

401. L.A. Dobrzański, A.D. Dobrzańska-Danikiewicz, P. Malara, T.G. Gaweł, L.B. Dobrzański, A. Achtelek-Franczak: Implanto-skafold kostny, Zgłoszenie Patentowe P 414424 z 19.10.2015.
402. L.A. Dobrzański, A.D. Dobrzańska-Danikiewicz, P. Malara, L.B. Dobrzański, A. Achtelek-Franczak, Kompozyty biologiczno-inżynierskie dla medycyny regeneracyjnej, Zgłoszenie Patentowe P 414723 z 9.11.2015.
403. L.A. Dobrzański, A.D. Dobrzańska-Danikiewicz, P. Malara, A. Achtelek-Franczak, L.B. Dobrzański, M. Kremzer: Sposób wytwarzania materiałów kompozytowych o mikroporowatej szkieletowej strukturze wzmocnienia, Zgłoszenie Patentowe P 417552 z 13.06.2016.
404. L.A. Dobrzański, A. Achtelek-Franczak, M. Król, Computer aided design in Selective Laser Sintering (SLS) – application in medicine, Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering 60/2 (2013) 66-75.
405. L.A. Dobrzański, A. Nowak, P. Lampe, A. Pusz, Wewnątrzustrojowa proteza przelęku i sposób jej wykonania, Biuletyn Urzędu Patentowego 40/21 (2012) 4-5, Opis patentowy PL 218012, 2014.
406. M. Kolodziejczyk, I. Kalaszczynska, J. Sadlo, J. Kolmas, W. Kolodziejski, Ł. Pajchel, G. Kapron, G. Wilczynski, M. Lewandowska-Szumieł, Maturation of Newly Deposited Calcium-Phosphate Crystals in Human Adipose Derived Stem Cells Culture after Cell Differentiation to Osteoblast in vitro, Abstracts, European Chapter Meeting of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society, TERMIS, Istanbul, Turkey, 2013, 100.
407. Biomaterials Market for Implantable Devices (Material Type - Metals, Polymers, Ceramics and Natural, Applications - Cardiology, Orthopedics, Dental, Ophthalmology and Others) - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends and Forecast, 2013 - 2019, Transparency Market Research, 2014, <http://www.transparencymarketresearch.com/biomaterials-market.html>, dostęp 23.03.2016.
408. Orthopedic Devices Market (Hip, Knee, Spine, Shoulder, Elbow, Foot and Ankle, Craniomaxillofacial and Other Extremities) - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends and Forecast, 2013 - 2019, Transparency Market Research, 2014, <http://www.transparencymarketresearch.com/orthopedic-devices-market.html>, dostęp 20.03.2016.

409. Orthopedic Trauma Fixation Devices Market - Global Forecast, Market Share, Size, Growth and Industry Analysis 2014 - 2020, Transparency Market Research, 2014, <http://www.transparencymarketresearch.com/orthopedic-trauma-fixation-device-market.html>, dostęp 20.03.2016.
410. 3D Printing in Medical Applications Market (Medical Implants (Dental, Orthopedic, Cranio-maxillofacial), Surgical Guides, Surgical Instruments, Bio-engineered Products) - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends and Forecast, 2013 - 2019, Transparency Market Research, 2014, <http://www.transparencymarketresearch.com/3d-Printing-medical-applications.html>, dostęp 20.03.2016.
411. Centrum Projektowo-Badawczo-Produkcyjne Inżynierii Medycznej i Stomatologicznej ASKLEPIOS w Gliwicach, Projekt POIR.01.01.01-00-0485/16-00 pt. „IMSKA-MAT Innowacyjne implanto-skafoldy stomatologiczne i szczękowo-twarzowe wytwarzane z wykorzystaniem innowacyjnej technologii addytywnej wspomaganej komputerowym projektowaniem materiałowym ADD-MAT”, Gliwice, 2017-2021, w toku.