

KATEDRA BIOMATERIAŁÓW I INŻYNIERII WYROBÓW MEDYCZNYCH

WYDZIAŁ INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ



**Politechnika
Śląska**

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Kształtowanie własności fizykochemicznych stopu
Ti-13Nb-13Zr z wykorzystaniem niskotemperaturowej
metody osadzania warstw atomowych ALD**

mgr inż. Julia Lisoń-Kubica

PROMOTOR

dr hab. inż. Marcin Basiaga, prof. PŚ

PROMOTOR POMOCNICZY

dr inż. Magdalena Antonowicz-Hüpsch

ZABRZE 2025

Dedykuję tę pracę ukochanemu synkowi Kajetanowi oraz mężowi Mateuszowi –
za nieustanną wiarę we mnie i cierpliwość w czasie jej powstawania
– oraz Mamie Beacie, za bezcenne wsparcie i otuchę przez wszystkie lata nauki.

Serdeczne podziękowania kieruję do mojego Promotora,
dr. hab. inż. Marcina Basiagi, prof. PŚ,
oraz Promotor pomocniczej,
dr inż. Magdaleny Antonowicz-Hüpsch,
za cierpliwość i cenne wskazówki, które były dla mnie nieocenionym wsparciem
podczas realizacji tej pracy.

Spis treści

WYKAZ WAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW I OZNACZEŃ.....	6
I. WPROWADZENIE.....	7
II. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA.....	8
1. Problematyka tworzenia się biofilmu bakteryjnego	8
1.1. Pochodzenie i rozwój biofilmu bakteryjnego na powierzchni implantów.....	15
1.2. Metody zwalczania biofilmu.....	20
2. Problematyka stosowania implantów ze stopów tytanu	26
3. Charakterystyka powłok bakteriobójczych i bakteriostatycznych	31
3.1. Metody modyfikacji powierzchni biomateriałów tytanowych	33
4. Podsumowanie przeglądu piśmiennictwa	41
III. Badania własne	43
1. Cel, założenia i teza pracy	43
2. Materiał do badań	46
3. Modyfikacja powierzchni.....	47
3.1. Naniesienie powłoki	47
4. Metodyka badań	50
4.1. Charakterystyka powłoki	50
4.1.1. Badania składu chemicznego powłoki	50
4.1.2. Badania mikrostruktury powłoki	50
4.1.3. Pomiary grubości powłoki	51
4.2. Badania własności fizycznych	51
4.2.1. Badania adhezji powłoki do podłoża	51
4.2.2. Badania własności tribologicznych powłoki.....	52
4.2.3. Badania zwilżalności powierzchni	53
4.2.4. Badania topografii powierzchni.....	53
4.3. Badania własności elektrochemicznych.....	54

4.3.1.	Badania odporności na korozję wżerową	54
4.3.2.	Badania odporności na korozję szczelinową	55
4.3.3.	Badania z wykorzystaniem elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej	55
4.3.4.	Badania przenikania jonów metali do roztworu	57
4.4.	Badania własności biologicznych	57
4.4.1.	Badania cytotoksyczności	57
4.4.2.	Badania cytokin prozapalnych	58
4.4.3.	Badania adhezji bakterii	58
4.4.4.	Badania proliferacji komórek	59
5.	Wyniki badań	60
5.1.	Charakterystyka powłoki	60
5.1.1.	Badania składu chemicznego powłoki	60
5.1.2.	Badania mikrostruktury powłoki	64
5.1.3.	Pomiary grubości powłoki	69
5.2.	Badania własności fizycznych	71
5.2.1.	Badania adhezji powłoki do podłoża	71
5.2.2.	Badania własności tribologicznych powłoki	73
5.2.3.	Badania zwilżalności powierzchni	77
5.2.4.	Badania topografii powierzchni	79
5.3.	Badania własności elektrochemicznych	84
5.3.1.	Badania odporności na korozję wżerową	84
5.3.2.	Badania odporności na korozję szczelinową	87
5.3.3.	Badania z wykorzystaniem elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej	89
5.3.4.	Badania przenikania jonów metali do roztworu	93
5.4.	Badania własności biologicznych	95

5.4.1.	Badania cytotoksyczności.....	95
5.4.2.	Badania cytokin prozapalnych	98
5.4.3.	Badania adhezji bakterii.....	99
5.4.4.	Badania proliferacji komórek	105
6.	Omówienie wyników badań	107
7.	Wnioski.....	121
Bibliografia.....		123
Streszczenie.....		132
Abstract.....		133

WYKAZ WAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW I OZNACZEŃ

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

ALD - metoda osadzania atomowego (*ang. Atomic Layer Deposition*)

ASTM - Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów (*ang. American Society for Testing and Materials*)

EDS - spektroskopia dyspersji energii (*ang. Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*)

EIS - elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna (*ang. Electrochemical Impedance Spectroscopy*)

EPS - pozakomórkowa substancja polisacharydowa (*ang. Extracellular Polymeric Substance*)

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

FTIR - spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (*ang. Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

ICP - OES- spektrometria atomowa emisyjna z indukcyjnie sprzężoną plazmą (*ang. Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy*)

ISO - Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (*ang. International Organization for Standardization*)

LDH - dehydrogenaza mleczanowa (*ang. lactate dehydrogenase*)

PBS - sól fizjologiczna buforowana fosforanem (*ang. Phosphate Buffered Saline*)

PDP - polaryzacja potencjodynamiczna (*ang. Potentio-Dynamic Polarization*)

RMA - współczynnik nierówności powierzchni (*ang. Rough Mean Square*)

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

SFE - swobodna energia powierzchniowa (*ang. Surface Free Energy*)

STEM - skaningowa transmisyjna mikroskopia elektronowa (*ang. Scanning Transmission Electron Microscope*)

TEM - transmisyjna mikroskopia elektronowa (*ang. Transmission Electron Microscopy*)

I. WPROWADZENIE

Biofilm stanowi jedno z największych wyzwań współczesnej implantologii, będący złożoną, odporną na antybiotyki i odpowiedź immunologiczną strukturą bakteryjną tworzącą się na powierzchniach zarówno biotycznych i abiotycznych. Adhezja bakterii do m.in. powierzchni implantów i formowanie biofilmu zależą w dużej mierze od własności powierzchni biomateriału, w tym jego chropowatości, zwilżalności oraz składu chemicznego. Ograniczona skuteczność konwencjonalnych metod leczenia, opartych na antybiotykach i antyseptykach, spowodowała poszukiwanie alternatywnych oraz prewencyjnych strategii, w tym modyfikacji powierzchni implantów w celu ograniczenia adhezji bakterii.

W implantologii, zwłaszcza w przypadku implantów kostnych tytan i jego stopy należą do najczęściej stosowanych biomateriałów, głównie ze względu na ich korzystne własności, takie jak wysoka odporność korozyjna czy odporność na ścieranie. Mimo to, nawet kolejne generacje stopów tytanu wzbogacone w pierwiastki witalne, m.in. cyrkon, tantal i żelazo, wykazują ograniczoną odporność na kolonizację bakteryjną. W odpowiedzi na to wyzwanie rozwijano liczne metody modyfikacji powierzchni, jednak w przypadku stopu Ti-13Nb-13Zr często napotymano problemy związane z trudnością w uzyskaniu jednorodnych powłok na implantach o złożonej geometrii oraz ryzykiem cytotoksyczności w przypadku powłok bazujących na metalach. Obiecującym rozwiązaniem w tym kontekście wydaje się tlenek cyny (SnO_2), który wykazuje silne działanie przeciwbakteryjne z niską toksycznością.

W celu precyzyjnego nanoszenia powłok o kontrolowanych właściwościach kluczowe znaczenie ma zastosowanie technologii atomowego nanoszenia warstw atomowych (ang. Atomic Layer Deposition (ALD)). Metoda ta umożliwia wytworzenie cienkich, jednorodnych warstw o grubości nanometrycznej, zapewniając pełne pokrycie nawet najbardziej skomplikowanych powierzchni, co jest szczególnie istotne w przypadku małych implantów kostnych i stomatologicznych. Powłoki uzyskiwane technologią ALD nie tylko wykazują właściwości antybakteryjne, ale także chronią implant przed inicjacją korozji i ograniczają reakcje zapalne.

Mimo obiecujących wyników, w literaturze dostępnych jest jedynie niewiele badań dotyczących modyfikacji powierzchni biomateriałów na bazie stopu Ti-13Nb-13Zr. Brakuje w szczególności kompleksowych analiz, które jednocześnie oceniałyby zarówno

własności fizykochemiczne (strukturę warstw, adhezję, uwalnianie jonów), jak i własności biologiczne (adhezję bakterii) modyfikowanej powierzchni. Ta luka badawcza uniemożliwia całościową ocenę przydatności takich implantów w warunkach kontaktu z tkankami.

W odpowiedzi na ten problem, celem niniejszej rozprawy doktorskiej jest kompleksowe zbadanie i scharakteryzowanie własności fizykochemicznych i biologicznych stopu Ti-13Nb-13Zr z powłoką SnO₂ naniesioną metodą ALD. Zaproponowany plan badań obejmuje ocenę materiału przygotowanego poprzez szlifowanie i piaskowanie, a następnie zmodyfikowanego powłoką SnO₂. Uzyskane wyniki mają umożliwić pełną charakterystykę uzyskanej warstwy powierzchniowej oraz stanowić podstawę do oceny jej przydatności w zastosowaniach medycznych w układzie kostnym i stomatognatycznym.

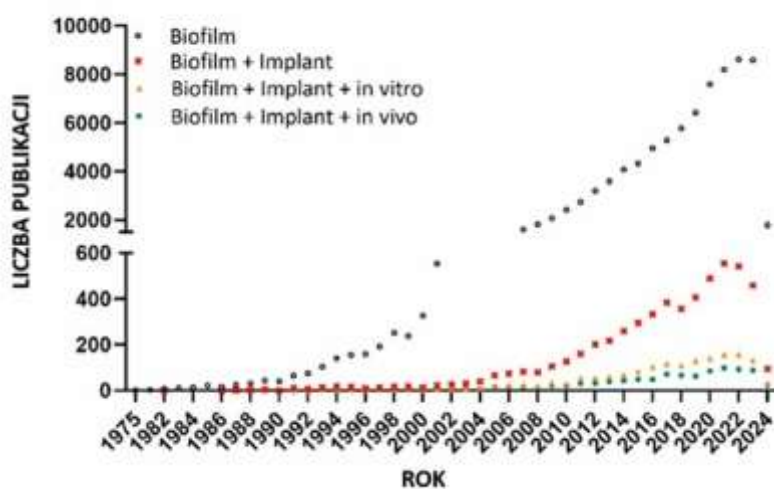
II. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA

1. Problematyka tworzenia się biofilmu bakteryjnego

Biofilm bakteryjny w ostatnich dekadach jest coraz częściej uznawany za główny czynnik patogenezy przewlekłych infekcji, zaburzając stan homeostazy organizmu [1]. Dostępne dane statystyczne wskazują, że [2] biofilm odpowiada za **60-80% wszystkich infekcji bakteryjnych u ludzi**. Według amerykańskiego Narodowego Instytutu Zdrowia (*NIH ang. National Institute Health*) [3] rozwój biofilmu wewnątrz organizmu jest powiązany z ponad 80% ludzkich zakażeń drobnoustrojami, co stanowi poważne zagrożenie zwłaszcza w przypadku niewłaściwego leczenia. Podobne dane zanotowano w **przypadku przewlekłych i trudno gojących się ran**, w których stwierdzono obecność biofilmu aż w 78% przypadków. Skala problemu jest ogromna również pod względem ekonomicznym, w 2019 roku na całym świecie przeznaczono około 260 miliardów dolarów na leczenie ran, które było związane z leczeniem powikłań po wystąpieniu biofilmu [4]. Inne źródła potwierdzają, że biofilm występuje w ok. **80% infekcji przewlekłych**, znacząco utrudniając skuteczną terapię. Podobne wartości (65–80%) podaje również Wu i wsp. [5], wskazując na biofilm jako dominujący mechanizm infekcji przewlekłych. Z kolei przegląd Sharma i wsp. [4] dowodzi, że nawet do 70% wszystkich zakażeń drobnoustrojowych ma związek z obecnością biofilmu, szczególnie w przypadku infekcji kości, płuc oraz układu moczowego. Biofilm stanowi

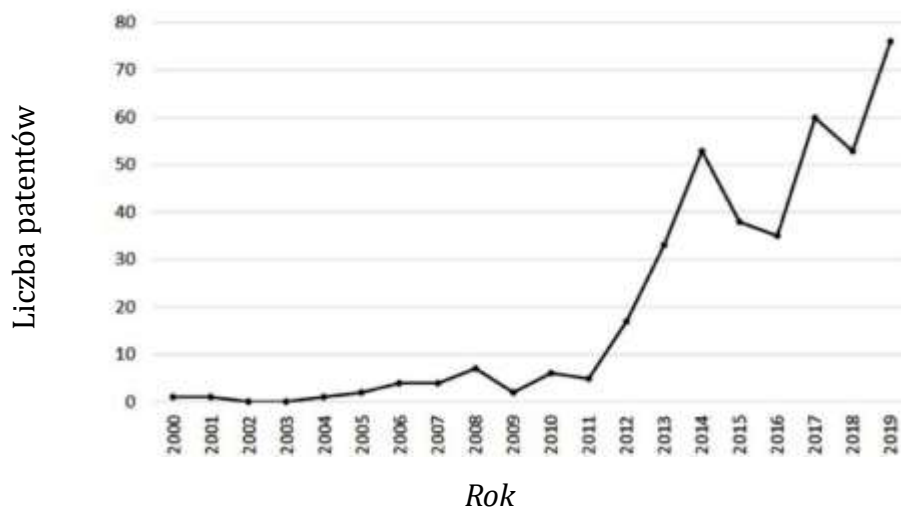
poważny problem kliniczny ze względu na niską skuteczność leków oraz wysoki poziom oporności na leki przeciwdrobnoustrojowe. Badania wykazują, że biofilm bakteryjny nie tylko powoduje zakażenia, lecz także wykazuje odporność na antybiotykoterapię. Brak dedykowanych metod leczenia dodatkowo wydłuża proces terapii [5]. Stosowanie antybiotyków i antyseptyków nie stanowi skutecznej metody tworzenia tzw. bariery pomiędzy środowiskiem a podłożem. Biofilm wymaga zastosowania znacznie wyższych stężeń antybiotyków niż w przypadku zwalczania pojedynczych komórek bakteryjnych [6]. Ponadto, szczególnie niepokojące jest występowanie zakażeń biofilmem w środowisku szpitalnym, które stanowią ponad 65% wszystkich zakażeń z czego aż 80% to zakażenia przewlekłe, a 60% dotyczy zakażeń bakteryjnych w organizmie człowieka. Dostępne dane jednoznacznie wskazują, że biofilm jest ogromnym wyzwaniem zarówno dla skutecznej kontroli zakażeń, jak i dla leczenia pacjentów [7]. Analiza literatury oraz liczby zapytań i wyszukiwań w bazie PubMed dotyczących biofilmu wskazuje na systematyczny wzrost liczby publikacji poświęconych zakażeniom rozwijającym się w wyniku jego powstawania po wszczepieniu implantów. W ciągu ostatnich 40 lat obserwuje się wyraźną tendencję wzrostową w tym zakresie - Rysunek 1. Co więcej, dzięki rosnącej świadomości problemu w ostatnich 20 latach liczba patentów dotycząca środków zapobiegających powstawaniu biofilmu zwiększyła się o blisko 80%, wskazując na wagę problemu- Rok

Rysunek 2.



Rysunek 1 Tendencja wzrostu liczby publikacji dotyczących biofilmu przedstawiający aktualny stan wiedzy w bazie PubMed zgodnie z wyszukiwanym terminem: biofilm

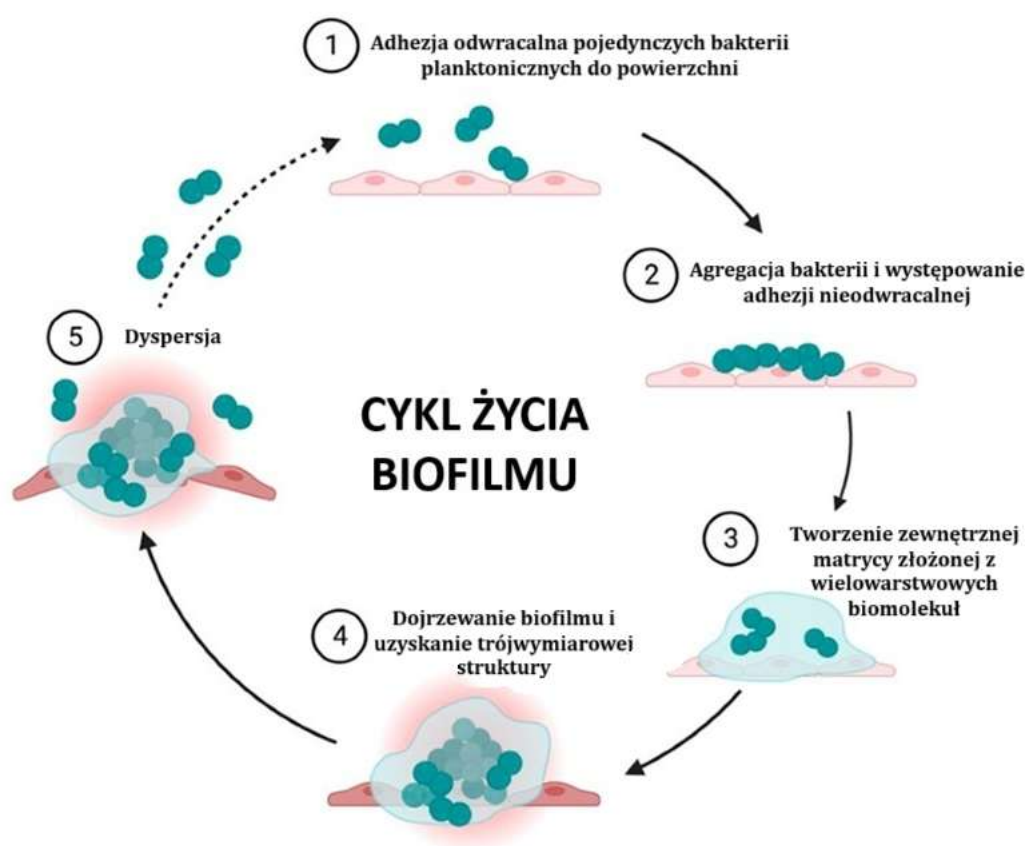
(czarny), biofilm + implant(czerwony), biofilm + implant+ in vitro (pomarańczowy)
i biofilmem + implantem + in vivo (zielony) [8]



Rysunek 2 Przegląd liczby patentów związanych z biofilmem w latach 2000-2019 [7]

Biofilm bakteryjny to utrwalona struktura mikroorganizmów otoczona pozakomórkowymi substancjami polimerycznymi (*EPS*, ang. *Extracellular Polymeric Substance*), stanowiąca matrycę z egzopolisacharydów, kwasów nukleinowych, białek, lipidów i innych biocząstek, mocno przytwierdzona do powierzchni zarówno organicznych, jak i nieorganicznych. Biofilm może być tworzony przez pojedynczy gatunek mikroorganizmu lub stanowić mieszaninę bakterii, grzybów, archeonów, pierwotniaków i drożdży. Struktura biofilmu charakteryzuje się nieodwracalną adhezją komórek mikroorganizmów do podłoża lub do siebie nawzajem oraz obecnością kanałów, które regulują wymianę gazów, składników odżywczych i substancji przeciwdrobnoustrojowych. EPS sprzyja adhezji drobnoustrojów do powierzchni biotycznych i abiotycznych. Po przyłączeniu, dalsza produkcja EPS tworzy matrycę, która otacza i spaja komórki, utrzymując je w bliskiej odległości oraz umożliwia interakcje międzykomórkowe w ograniczonej przestrzeni. Matryca EPS zapewnia również stabilność mechaniczną i złożone mikrośrodowiska chemiczne, które są kluczowe dla życia biofilmu. Dzięki temu mikroorganizmy wewnątrz biofilmu wykazują odmienne fenotypy w zakresie ekspresji genów i tempa wzrostu, a cała struktura cechuje się zwiększoną odpornością na antybiotyki i działanie układu [9], [10]. Istotnym elementem funkcjonowania biofilmu jest komunikacja między drobnoustrojami, tzw. quorum sensing (łac. *quorum*- ilość, której wystarczy, ang. *sensing* - odczuwanie). Mechanizm ten polega na

wydzieleniu i odbieraniu cząstek sygnałowych (autoinduktorów), których stężenie wzrasta wraz ze wzrostem liczby komórek. Umożliwia to regulację ekspresji genów i adaptację fenotypu do warunków środowiskowych. Początkowo sądzono, że biofilm rozwija się wyłącznie na powierzchniach stałych, takich jak tkanki gospodarza czy implanty. Obecne badania wskazują jednak, że może on powstawać również bez udziału powierzchni stałej [11]. Biofilm bakteryjny stanowi strukturę powszechnie obecną zarówno w środowisku naturalnym i sztucznym, jak i w organizmach żywych. Proces jego powstawania stanowi cykl życia bakterii i obejmuje następujące etapy [5], [12], [13] (Rysunek 3):



Rysunek 3 Cykl powstawania biofilmu [4]

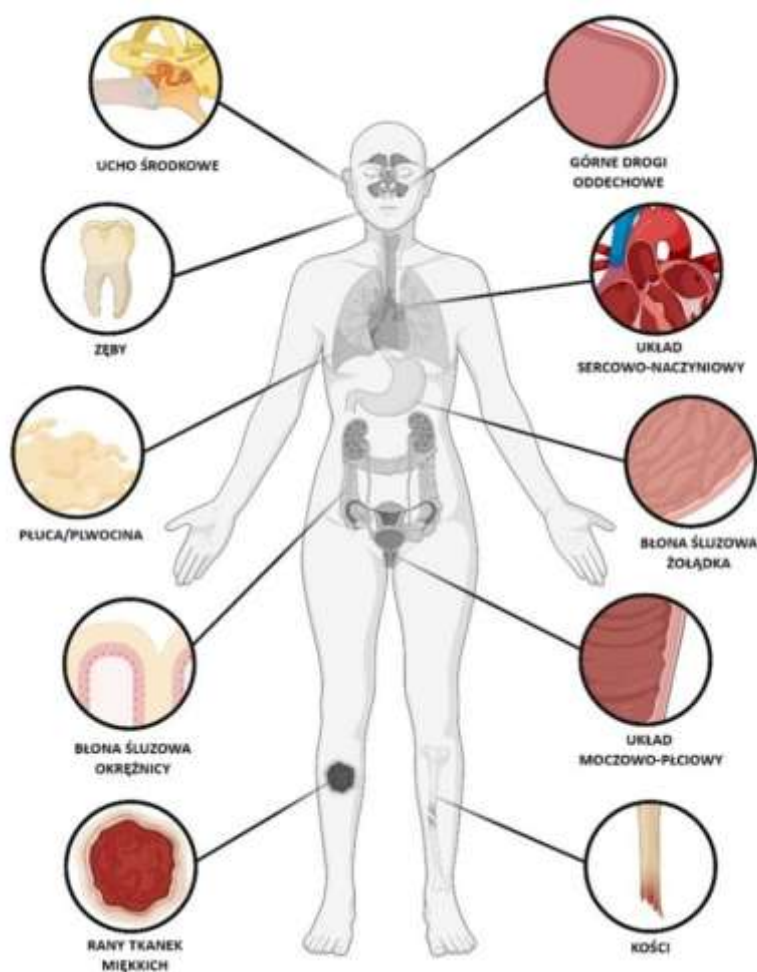
- 1. Adhezja odwracalna pojedynczych bakterii planktonicznych do powierzchni**, gdzie na adhezję bakterii wpływają siły przyciągania lub odpychania generowane przez poziom składników odżywczych, pH i temperaturę powierzchni. Pojedyncze bakterie ulegają interakcjom elektrostatycznym, jak oddziaływanie Lewisa, sił van der Waalsa, przyciąganiu hydrofobowemu i ruchom Browna. W początkowej fazie,

gdy bakterie znajdują się w odległości 5-10 nm od podłoża, dochodzi do powstania początkowego etapu wiązania, czyli adhezji niespecyficznej. W miarę zbliżania się do podłoża 2–4 nm działają oddziaływania długiego zasięgu, które ułatwiają bakteriom dotarcie do warstwy granicznej. Ostatecznie, przy odległości poniżej 1 nm, możliwe jest powstanie adhezji specyficznej, związanej z tworzeniem wiązań pomiędzy bakteriami a powierzchnią.

2. **Agregacja bakterii i występowanie adhezji nieodwracalnej**, czyli stałe przyczepienie bakterii do powierzchni.
3. **Tworzenie zewnętrznej matrycy złożonej z wielowarstwowych biomolekuł**, gdzie mikrokolonie i wydzielanie EPS tworzą zewnętrzną matrycę. Wydzielanie polisacharydów w szczepach tworzących biofilm umożliwia agregację, przyczepność i tolerancję powierzchniową, co pozwala na lepszą kolonizację powierzchni.
4. **Dojrzewanie biofilmu i uzyskanie trójwymiarowej struktury**, które opierają się na samodzielnie wytworzonych składnikach macierzy zewnątrzkomórkowej. Proces dojrzewania polega początkowo na tworzeniu układu bakterii w fazach proliferacji, adhezji międzykomórkowej i wytwarzania otaczającej drobnoustroje- macierzy zewnątrzkomórkowej EPS, która stanowi barierę utrudniającą penetrację leków i komórek układu immunologicznego. W jej skład wchodzi m.in. białka, kwasy nukleinowe, celuloza, enzymy, lipidy czy polisacharydy. Efektywność dojrzewania biofilmu zależy od czynników środowiskowych, takich jak dostępność tlenu, składników odżywczych czy obecność jonów żelaza, niezbędnych dla prawidłowego rozwoju komórek bakteryjnych.
5. **Dyspersja** to uwalnianie powstałych układów lub pojedynczych komórek bakteryjnych z dojrzałego biofilmu do środowiska. . Następnie, uwolnione bakterie odzyskują stan planktoniczny i przemieszczają się w poszukiwaniu nowych powierzchni do podłoża do osiedlenia. Dzięki temu procesowi biofilm rozszerza swoje występowanie, inicjując zakażenia w miejscach poprzez ponowne rozmnażanie i tworzenie nowych struktur. Do charakterystycznych cech powstającego biofilmu należą wysoka tolerancja na niesprzyjające warunki środowiskowe, takie jak zmiany temperatury, obniżona wilgotność, działanie antybiotyków oraz elementów układu immunologicznego, w tym makrofagów i przeciwciał. Niejednorodna struktura biofilmu sprzyja rozwojowi i rozmnażaniu drobnoustrojów, które różnicują się od

form planktonicznych, co prowadzi do zwiększonej oporności na antybiotyki oraz leki antyseptyczne.

Dane statystyczne wskazują, że do 2050 roku zakażenia bakteryjne mogą być przyczyną nawet 10 milionów zgonów rocznie [6]. Biofilm występuje w organizmie człowieka, gdzie wiąże się z wieloma chorobami przewlekłymi i może zaburzać homeostazę, czyli równowagę wewnętrzną organizmu. Stanowi poważne wyzwanie terapeutyczne ze względu na zwiększoną odporność oraz zdolność unikania zarówno diagnostyki, jak i odpowiedzi immunologicznej. Udowodniono, że biofilm jest wszechobecny i powstaje w różnych tkankach organizmu (Rysunek 4), a także na powierzchniach biotycznych i abiotycznych, w tym na wyrobach medycznych.



Rysunek 4 Występowanie biofilmu bakteryjnego w różnych tkankach i narządach człowieka [14]

Biofilm bakteryjny może tworzyć się m.in. na powierzchni ran, w jamie ustnej (na zębach i dziąsłach), w układzie moczowym, oddechowym, krwionośnym, a także w obrębie kości. Szczególnie podatne na kolonizację przez mikroorganizmy są powierzchnie ciał obcych, takich jak różnego rodzaju implanty, ponieważ jako ciała obce w momencie wprowadzenia do organizmu stwarzają one sprzyjające warunki do adhezji bakterii i rozwoju biofilmu [15]. Organizm ma ograniczoną zdolność do ich naturalnego oczyszczenia, a bakterie szybko kolonizują powierzchnie ciał obcych, prowadząc do trudnych do eradykacji, czyli usunięcia, przewlekłych zakażeń [5], [16], [17], [18], [19].

W przypadku implantów, takich jak endoprotezy stawów, implanty stomatologiczne, sztuczne zastawki serca, cewniki naczyniowe i moczowe, środowisko ich otoczenia sprzyja powstawaniu biofilmu bakteryjnego. Powierzchnia implantów, zwłaszcza wykonanych z polimerów lub metali o niskiej chropowatości, ułatwia adhezję bakterii. Po implantacji dochodzi także do osadzania się białek gospodarza, takich jak fibrynogen i fibronektyna, co dodatkowo ułatwia przyleganie bakterii. Warunki panujące w otoczeniu implantu, takie jak ograniczony przepływ płynów ustrojowych, lokalna hipoksja (niedobór tlenu w danym obszarze ciała), obniżona immunoreaktywność organizmu (zdolność substancji do wywoływania reakcji układu odpornościowego) oraz brak mechanizmów mechanicznego usuwania bakterii (obecnych np. w jelitach), także sprzyjają rozwojowi bakterii prowadząc do powstawania struktury biofilmu. W takich warunkach bakterie produkują macierz zewnątrzkomórkową (EPS), która chroni je przed działaniem antybiotyków oraz układu odpornościowego. Dzięki temu drobnoustroje ukryte w biofilmie mogą przetrwać dawki antybiotyków nawet 1000 razy większe niż ich planktoniczne odpowiedniki [20].

Biofilm na implantach często prowadzi do przewlekłych zakażeń, które mogą nie dawać ostrych objawów, lecz utrzymują się przez długi czas, prowadząc do degradacji tkanek, bólu, a nawet konieczności usunięcia implantu [15], [21]. Biofilm na implantach to nie tylko problem mikrobiologiczny, ale poważne wyzwanie materiałowe i kliniczne. Jego wysoka oporność i zdolność do przetrwania sprawiają, że biofilm jest częstą przyczyną powikłań pooperacyjnych, przewlekłych infekcji oraz znaczącego wzrostu kosztów opieki zdrowotnej [22].

1.1. Pochodzenie i rozwój biofilmu bakteryjnego na powierzchni implantów

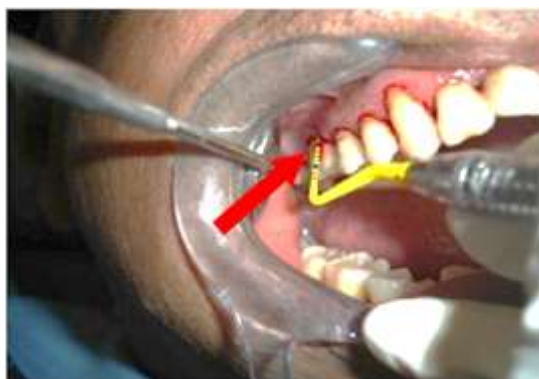
Osadzanie się bakterii na implantach związane jest ze zjawiskiem adhezji i mechanizmami przyczepności, w tym oddziaływaniami sił fizycznych, które prowadzą do nieodwracalnego przylegania bakterii do powierzchni i stanowią jedną z głównych przyczyn powstawania biofilmu [6], [15], [23]. Wartość chropowatości powierzchni odgrywa istotną rolę, jej wzrost sprzyja gromadzeniu się bakterii w zagłębieniach, natomiast powierzchnie gładkie, o niskiej chropowatości, ograniczają proces adhezji [24]. Nawet powierzchnie hybrydowe, stosowane np. w implantach stomatologicznych, łączące obszary częściowo gładkie i chropowate, sprzyjają gromadzeniu się biofilmu bakteryjnego na bardziej chropowatych obszarach. Co więcej, wpływ ma również charakter zwilżalności powierzchni. Im powierzchnia staje się bardziej hydrofobowa tym większa adhezja bakterii [25]. Pomimo podobnych wartości chropowatości, czy charakteru powierzchni, sam skład chemiczny materiału również wpływa na rozwój biofilmu bakteryjnego. Przykładowo stop Co-Cr-Mo wykazuje mniejszą podatność na kolonizację niż bardziej podatny stop Ti-6Al-4V [26]. Dodatkowo energia powierzchniowa warunkuje adsorpcję białek i początkowe etapy osadzania się mikroorganizmów. Powierzchnie o wyższym ładunku i energii powierzchniowej sprzyjają adsorpcji białek, a następnie adhezji komórek bakteryjnych, która z kolei poprzedza adhezję bakterii [27]. W ramach prowadzonych badań dotyczących adhezji patogenów porównuje się wpływ rodzaju zastosowanego biomateriału, ze szczególnym uwzględnieniem własności powierzchni implantu na rozwój biofilmu [28], [29], [30], [31]. Oprócz tego występują również czynniki biologiczne, ściśle powiązane między danym szczepem bakterii a białkami występującymi w organizmie i jego danym układzie, powodując działanie swoistego rzepu, co umożliwia trwałe połączenie, szczególnie w warunkach płynów ustrojowych [32]. Dodatkowo czynniki środowiskowe, jak obniżona odporność pacjenta, palenie tytoniu, czas operacji wszczepienia implantu, mikrobiologia organizmu mogą sprzyjać rozwojowi biofilmu. Istnieje również zjawisko *race for surface*, czyli zależność między tempem adhezji i wzrostem bakterii w postaci biofilmu a integracją tkankową implantu [33]. W przypadku większej agregacji, czyli skupieniu bakterii zwiększa się znacznie ryzyko zakażenia. W takim przypadku jedynym wyjściem może pozostać usunięcie implantu i reimplantacja. Dodatkowo stany zapalne

w organizmie powiązane z inną niezależną chorobą zwiększa ryzyko infekcji w grupach immunosupresyjnych, co stanowi potrzebę indywidualnego doboru biomateriału na implanty u pacjenta [34]. Wprowadzane do organizmu implanty mogą inicjować zakażenie miejsca operowanego (ZMO), które są jednymi z najczęstszych i najbardziej niebezpiecznych powikłań po zabiegach chirurgicznych, zwłaszcza w przypadku wszczepienia implantów. Dochodzi do niego, gdy bakterie kolonizują tkanki w miejscu cięcia chirurgicznego, wywołując stan zapalny, tworzenie ropnia lub rozwój biofilmu w obecności ciała obcego (np. implant) [35]. Miejsce powstawania biofilmu zależy zarówno od rodzaju implantu i miejsca jego osadzenia w organizmie, jak i od gatunku drobnoustroju, który zainicjował proces- Tabela 1. Najczęściej spotykane w organizmie szczepy bakterii to *Escherichia coli* oraz *Staphylococcus aureus*. *E. coli* stanowi naturalny składnik mikroflory jelitowej, jednak przy zaburzeniu równowagi mikrobiologicznej może wywoływać infekcje w innych narządach. Natomiast, *S. aureus* kolonizuje przede wszystkim skórę i błony śluzowe, a w przypadku uszkodzeń tkanek lub obecności implantów często powoduje zakażenia miejscowe i ogólnoustrojowe. Oba gatunki są jednymi z najczęstszych czynników infekcji u ludzi [36].

Tabela 1 Typy zakażenia a czynnik etiologiczny związany z wytwarzaniem biofilmu na powierzchni biomateriałów [37]

Typ zakażenia	Czynnik etiologiczny
Zakażenia miejsca operowanego (ZMO)	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> , <i>Echerichia coli</i>
Zakażenia związane z obecnością implantów stomatologicznych	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Echerichia coli</i>
Zakażenia związane z obecnością implantów ortopedycznych	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Cutibacterium acnes</i> , <i>Echerichia coli</i>
Zakażenia związane z obecnością cewnika urologicznego u pacjenta	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> (u młodych kobiet) <i>Echerichia coli</i>
Zakażenia związane z obecnością sztucznych zastawek serca	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococci</i> , <i>Echerichia coli</i> .
Zakażenia związane z obecnością wszczepów i cewników naczyniowych	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Echerichia coli</i> .

Szczególnym przykładem biofilmu związanego z implantami jest zjawisko periimplantitis (z *grec. peri-* około, z *łac. implantitis-* zapalenie implantu), czyli stan zapalny obejmujący zarówno dziąsła, jak i kość otaczającą implant zębowy. Schorzenie to rozwija się głównie na skutek kolonizacji powierzchni implantów stomatologicznych przez biofilm. Nieleczony periimplantitis może prowadzić nawet do utraty kości i rozchwiania implantu, co w konsekwencji może skutkować jego całkowitym usunięciem [38], [39]. Biofilm w jamie ustnej ma skład zbliżony do płytki nazębnej, zawiera komórki bakteryjne otoczone warstwą egzopolisacharydu, drobnoustrojów, składników śliny oraz fragmentów nabłonka. Obecność beztlenowych, patogennych szczepów sprzyja rozwojowi zapalenia błony śluzowej wokół implantu oraz innych stanów zapalnych jamy ustnej związanych z protezami zębowymi - Rysunek 5.



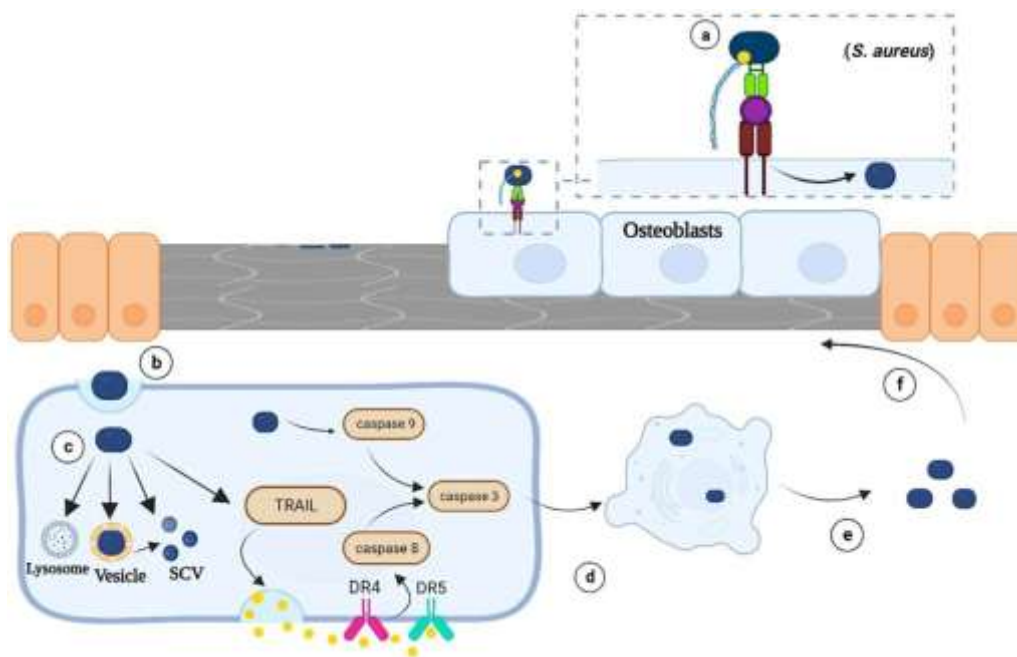
Rysunek 5 Zapalenie tkanki okołowszczepowej objawiające się krwawieniem u mężczyzny [40]

Natomiast, w układzie kostno-stawowym biofilm gromadzi się na protezach stawowych, zwłaszcza biodrowych i kolanowych – Rysunek 6. Rozwój biofilmu bakteryjnego na powierzchni płytki zastosowanej np. w obrębie stawu kolanowego prowadzi do ingerencji w obręb struktury kości, co może spowodować zapalenie szpiku kostnego [41].



Rysunek 6 Zakażenie występujące wokół płytki, po stabilizacji złamania, po unieruchomieniu wewnętrznym [40]

W przypadku obu wyżej wymienionych układów, zarówno w obrębie układu stomatognatycznego, jak i kostnego proces powstawania biofilmu bakteryjnego na powierzchni kości, poprzez agregację bakterii przebiega w zbliżony sposób, co przedstawiono na Rysunek 7. Przykładowo, kolonizacja implantu przez *Staphylococcus aureus* może prowadzić do wytworzenia matrycy bakteryjnej, a następnie przedostania się patogenów do krwiobiegu, co skutkuje rozwojem zakażeń ogólnoustrojowych, takich jak zapalenie kości i szpiku.

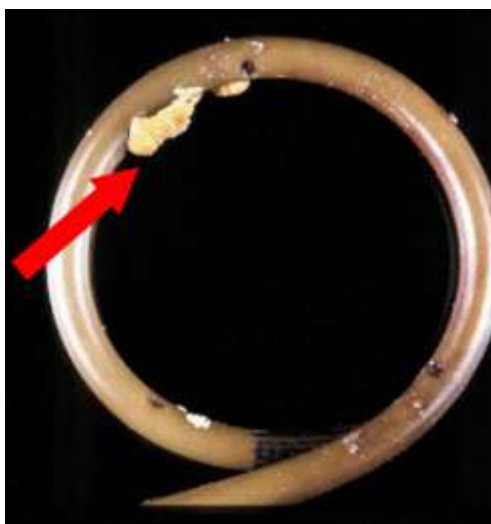


Rysunek 7 Proces powstawania zapalenia kości i szpiku wywołane przez *S. aureus* [42]:
a) adhezja kolagenu, b) penetracja błony komórkowej poprzez powstawanie wiązań bakterii z cząstkami kolagenu na osteoblastach, c) możliwe niszczenie bakterii obecnych w osteoblastach przez lizosomy, odizolowanie w pęcherzykach lub utworzenie małych wariantów kolonii, a następnie produkcja cytokin i aktywacja receptorów śmierci komórek d) apoptoza (śmierć komórki) zainfekowanych osteoblastów e) uwalnianie bakterii z osteoblastów f) rozproszenie uwalnianych bakterii i zakażenie innych komórek

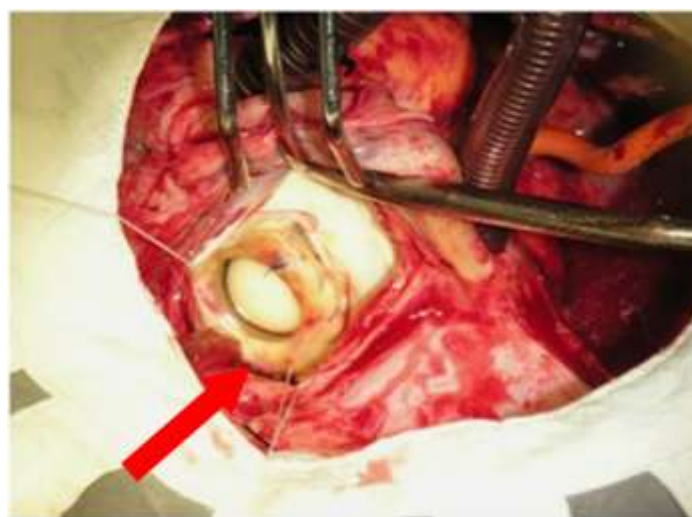
W układzie moczowym biofilm może kolonizować m.in. stenty urologiczne - Rysunek 8. W tym przypadku do zainfekowania wyrobu, dochodzi najczęściej podczas jego zakładania, powodując zakażenie układu moczowego. Początkowe powstawanie biofilmu na cewniku jest związane z inkrustacją, która jest wynikiem krystalizacji jonowych składników moczu oraz tworzenia się biofilmu włączając bakteryjną warstwę

biofilmu. Biofilm stopniowo dojrzewa, tworząc wielowarstwową strukturę EPS, która chroni bakterie przed działaniem antybiotyków i środków dezynfekcyjnych. W ten sposób dochodzi do powstawania twardych złogów na powierzchni stentu, utrudniających przepływ moczu i sprzyjających przewlekłym zakażeniom układu moczowego [43], [44].

W układzie sercowo-naczyniowym powstawanie biofilmu obserwuje się m.in. w miejscach wszczepienia sztucznych zastawek i stentów- Rysunek 9. Z powodu ciągłego przepływu krwi, obecność płytek krwi i fibryny może wywoływać agregację i uszkodzenie tkanki, co ostatecznie prowadzi do powstawania skrzepów fibrynowych. Obszary te są bardziej podatne na kolonizację bakterii, co może prowadzić do powstawania ich skupisk i zapaleń okołowszczepowych np. wsierdzia, czy zastawki [42].



Rysunek 8 Silnie inkrustowany stent moczowodu typu J-pigtail [45]



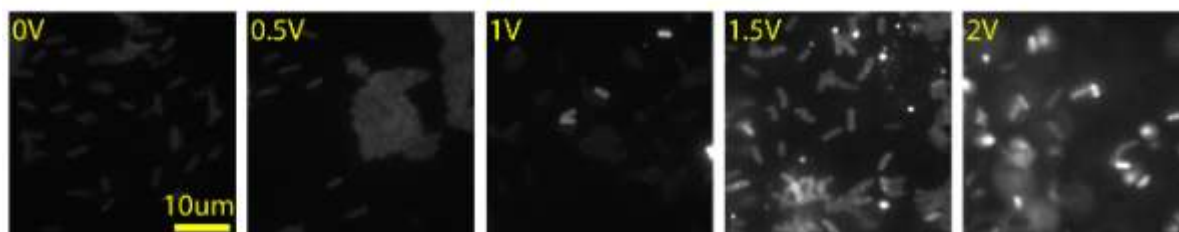
Rysunek 9 Zapalenie wsierdzia spowodowane zastosowaniem protezy zastawki z przeciekiem parazastawkowym [42]

Każda lokalizacja biofilmu wiąże się z innym zestawem drobnoustrojów i specyfiką mikrośrodowiska, co wpływa na dynamikę jego powstawania i oporność na leczenie. Różnice te determinują nie tylko skład mikrobiologiczny biofilmu, ale także jego strukturę, tempo wzrostu i podatność na czynniki zewnętrzne. Z tego względu skuteczność metod hamowania rozwoju lub eradykacji biofilmu zależy od miejsca jego występowania [46]. W dalszej części pracy omówione zostaną najważniejsze strategie zwalczania biofilmu bakteryjnego.

1.2. Metody zwalczania biofilmu

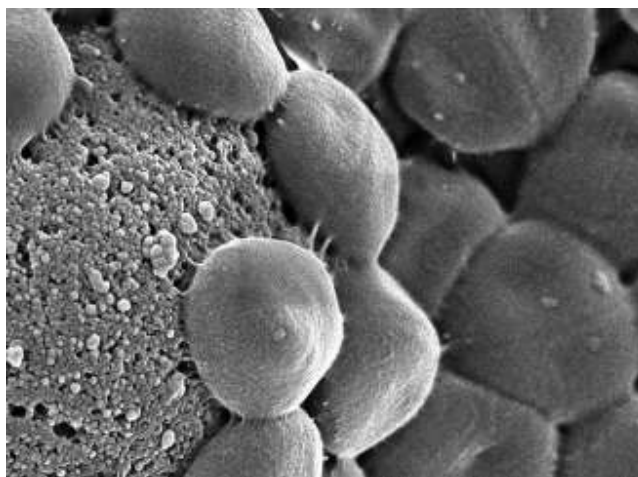
Komórki bakterii tworzące strukturę biofilmu są odizolowane od środowiska zewnętrznego, dlatego uzyskują oporność na środki dezynfekcyjne oraz antybiotyki. Komórki żywe w strukturze biofilmu, które pozostają nieaktywne metabolicznie przez określony czas po zastosowaniu antybiotyku posiadają jednak możliwość ponownej aktywności, co pozwala na budowanie struktury biofilmu na nowo. Przetrwanie trudnych warunków środowiska zewnętrznego sprawia, że eradykacja, czyli proces usuwania biofilmu stanowi dużą trudność, jednocześnie skłaniając ku poszukiwaniu nowych rozwiązań [47]. Ze względu na sposób działania, metody zwalczania biofilmu można podzielić na trzy kategorie: fizyczne, chemiczne i biologiczne. Do metod fizycznych zalicza się między innymi: wykorzystanie skrajnych temperatur (wysokich i niskich), zmiennego pola magnetycznego (*AMF*, ang. *Alternating Magnetic Field*) oraz ultradźwięków [22]. Podstawową metodą fizyczną, która z wysoką skutecznością powoduje niszczenie biofilmu jest mechaniczne usuwanie struktury poprzez oczyszczanie powierzchni, tj. szorowanie lub skrobanie. Daniluk i wsp. [48] jednak wykazali, że do wad tej metody można zaliczyć małą uniwersalność ze względu na różny rodzaj podłoża. Innym podejściem jest zastosowanie wysokiej temperatury. W badaniach Ricker i wsp. [49] potwierdzili, że biofilm poddany działaniu temperatury $T = 60 \div 80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ulega całkowitemu zniszczeniu. Podobnie Ivaške i wsp. [50] zastosowali niską temperaturę, oraz cykl kilkukrotnego zamrażania w temperaturze $T = -45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ i rozmrażania struktury bakteryjnej. Spowodowało to skuteczną eradykację biofilmu. Użycie zmiennego pola magnetycznego do niszczenia biofilmu polega na użyciu pól o wysokiej częstotliwości ($>100 \text{ kHz}$). Krishnamurthi i wsp. [51] potwierdzają, że powstający w trakcie generowania prąd wirowy pozwala na wytworzenie ciepła, którego efektem jest możliwość uszkodzenia błony komórkowej bakterii i usuwania komórek biofilmu z powierzchni podłoża. Intensywność błony bakteryjnej wzrosła po poddaniu bakterii działaniu prądu elektrycznego o natężeniu mikroamperów, co przedstawiono na Rysunek 10. Kolejnym sposobem jest zastosowanie ultradźwięków do zabijania bakterii zaadherowanych, jeszcze przed utworzeniem biofilmu oraz do zwalczania już wcześniej powstałych struktur bakteryjnych. W przypadku użycia ultradźwięków generowane jest pole ultradźwiękowe o dużej energii, co pozwala na przewodzenie odbicia fali na powierzchni. Przejściowa kawitacja, czyli zabieg oczyszczający przy użyciu ultradźwięków uznawany jest za najbardziej skuteczny w przypadku usuwaniu biofilmu

bakteryjnego. Przy użyciu dużego natężenia i niskich częstotliwości nie dochodzi do odwrotnego efektu, czyli proliferacji komórek. W efekcie dochodzi do niszczenia matrycy EPS i warstwy zewnętrznej błony biofilmu [52]. Ich skuteczność potwierdzono jednak głównie w redukcji liczby komórek bakteryjnych, które nie zdążyły ulec adhezji, co wykazali Axelsson i wsp. [53].



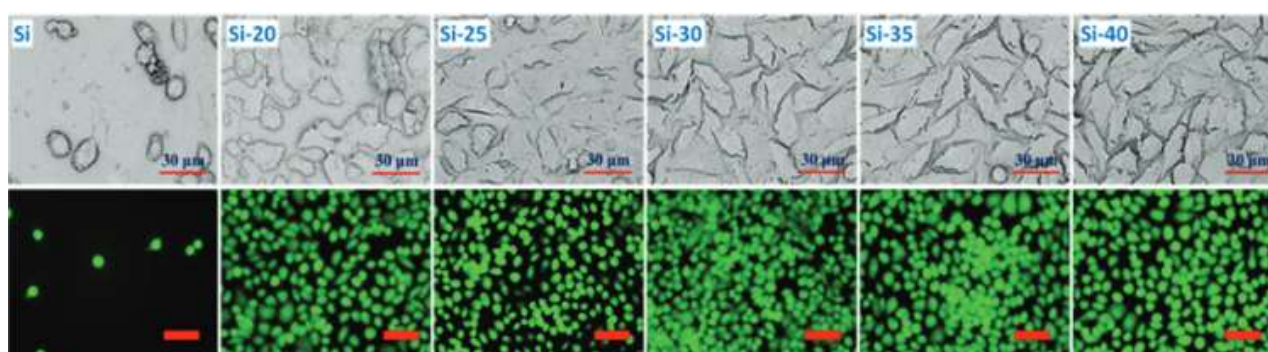
Rysunek 10 Obrazy fluorescencyjne błony komórkowej bakterii zabarwionej barwnikiem MitoTracker Green FM po poddaniu działaniu niskich napięć prądu stałego od 0 V do 2 V [51]

Wyróżnia się również metody chemiczne, wykorzystujące syntetyczny poli(glikol etylenowy (PEG), chitozan (CS) oraz połączenie różnych substancji leczniczych. Te metody mogą wpływać na przebieg procesu adhezji bakterii, ale również na wzrost i podział komórek. Najczęściej stosowany jest PEG, który jak wykazały badania obniża aktywność wody w środowisku komórkowym, hamuje działanie białek bakteryjnych i ogranicza dalszą adhezję bakterii, która prowadzi do powstawania biofilmu. Ambrose i wsp. [54] potwierdzili, że PEG w formie cienkich warstw lub hydrożeli ogranicza przyleganie bakterii takich jak *E. coli* i *S. aureus*. Zastosowanie grubych, miękkich hydrożeli PEG znacząco zmniejszało ich adhezję, co jest efektem zarówno obniżonej interakcji białek, jak i fizycznych właściwości powierzchni. Skuteczną eradykację biofilmu uzyskano jedynie poprzez połączenie kilku substancji na które mikroorganizmy nie wykazują oporności. Jacqueline i wsp. [25] zastosowali terapię skojarzoną, obejmującą moksyflokksacynę i daptomycynę, które w połączeniu z klarytromycyną skutecznie eliminowały szczepy bakterii *S. aureus*. Do oceny zdolności adhezyjnej bakterii, będącej kluczowym etapem w tworzeniu biofilmu, wykorzystuje się również Biofilm Ring Test. Metoda opiera się na unieruchamianiu kulek magnetycznych w agregatach bakteryjnych po uformowaniu biofilmu w mikropłytkach i umożliwia pomiar zdolności komórek do adhezji (Rysunek 11).



Rysunek 11 Staphylococcus aureus otaczających kulkę magnetyczną w teście Biofilm Ring Test po 6 godzinach inkubacji, SEM, pow. 45 000x [25]

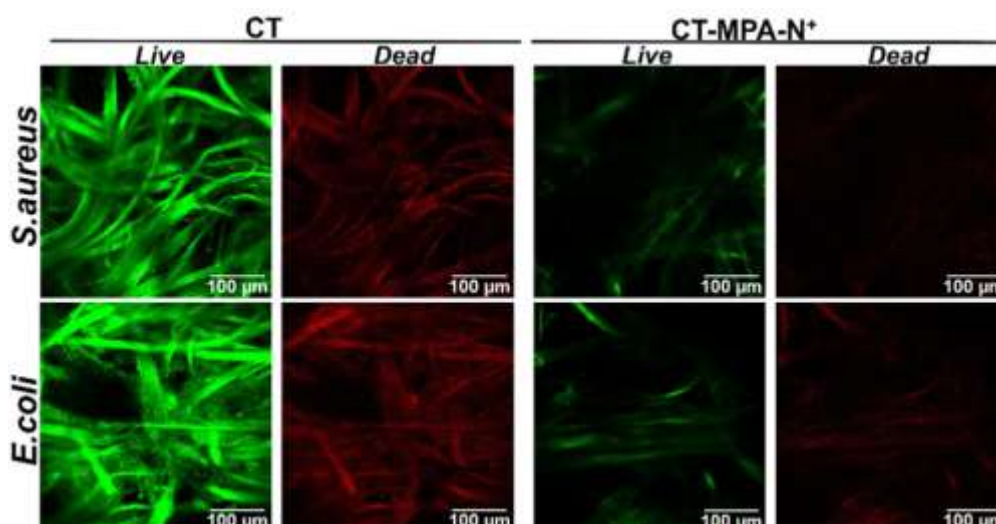
Do metod chemicznych należy również zastosowanie chitozanu będący liniowym polisacharydem hamujący wzrost bakterii poprzez dodatnio naładowane grupy aminowe, które oddziałują wraz z ujemnie naładowaną zewnętrzną błoną komórkową. Przyłączanie powstałych hydrożeli z dodatkiem chitozanu do powierzchni ma zapewniać działanie zapobiegające dalszemu rozwojowi biofilmu oraz przeciwbakteryjne [50]. He i wsp. [55] opracowali dwuwarstwową powłokę hydrożelową, zdolną do przełączania się pomiędzy trybem sprzyjającym adhezji komórek a trybem antybakteryjnego. Dodatkowo morfologię komórek namnażających się przez 7 dni na podłożach pokrytych szczotkami polimerowymi z hydrożelu krzemowego oraz na podłożach z hydrożelu krzemowego obserwowano za pomocą SEM i mikroskopii fluorescencyjnej (Rysunek 12).



Rysunek 12 Morfologia komórek po 7 dniach hodowli na powłokach hydrożelowych, 40 µm, mikroskop fluorescencyjny, SEM [55]

Na czystej płytce krzemowej (Si) zaobserwowano jedynie pojedyncze komórki o okrągłym kształcie, co wskazuje, że powierzchnia nie sprzyjała ich rozprzestrzenianiu

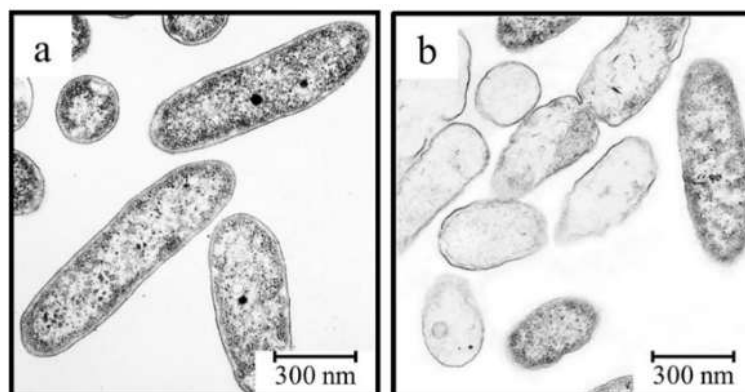
i wzrostowi. Natomiast na podłożach pokrytych dwuwarstwową powłoką komórki tworzyły niemal ciągłą warstwę o charakterystycznym, wrzecionowatym kształcie, rozciągając się na całej powierzchni. Zaobserwowano również, że gęstość komórek wzrastała wraz ze wzrostem gęstości szczotek polimerowych. Metody biologiczne zwalczania biofilmu wykorzystują najczęściej: fagoterapię, użycie soli amoniowej, enzymów, hamowanie zjawiska *quorum sensing*. Najskuteczniejszą z nich wydaje się fagoterapia, polegająca na wykorzystaniu wirusów atakujących bakterie. W szczególności metoda ta ma znaczenie w przypadku eliminacji bakterii wielolekoopornych. W badaniach Międzybrodzkiego i wsp. [56] potwierdzono skuteczność fagów wobec szczepów *S. aureus* opornych na wiele antybiotyków. Obiecującym kierunkiem są także niektóre związki chemiczne, takie jak sole amoniowe (QAS, ang. *quaternary ammonium salts*) z kwasem maleinowym, stosowane do modyfikacji powierzchni bawełnianych opatrunków tekstylnych. Li i wsp. [57] przedstawili modyfikację bawełnianej tkaniny z wykorzystaniem związków kwasu maleinowego pochodzących z kwasu żywicznego. Otrzymany materiał wykazywał silne działanie antibakteryjne zarówno wobec bakterii Gram-ujemnych (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), jak i Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus*). Co istotne, modyfikowana tkanina znacząco hamowała tworzenie biofilmu nawet po wielokrotnym kontakcie z roztworem PBS (ang. *Phosphate Buffered Saline*) i przechowywaniu przez 6 dni, zachowując przy tym dobrą biokompatybilność. Jak pokazano na Rysunek 13, po kontakcie z nieskażonym antibakteryjnym materiałem tekstylnym (CT, ang. *Cotton Textiles*) zaobserwowano liczne żywe i martwe bakterie *S. aureus* oraz *E. coli*. Natomiast po ekspozycji na tkaninę modyfikowaną czwartorzędowymi kationami amoniowymi kwasu maleopimarycznego (CT-g-MPAN+ ang. *Cotton Textiles Maleopimaric Acid Quaternary Ammonium Cations was Prepared*) liczba zielonych i czerwonych punktów fluorescencyjnych uległa znacznemu zmniejszeniu, co wskazuje na rozpad lub lizę komórek bakteryjnych bez zachowania ich integralnej morfologii.



Rysunek 13 Obrazy barwienia żywych i martwych biofilmów na nieskażonych powierzchniach CT i CT-g-MPA-N+ po 3 dniach hodowli bakteryjnej [57]

Wyróżnia się również wykorzystanie enzymu rozkładającego matrycę EPS, prowadząc do osłabienia połączeń między komórkami oraz ich adhezji do powierzchni podłoża. Dzięki temu biofilm traci tolerancję na czynniki środowiskowe, a komórki stają się bardziej wrażliwe na działanie antybiotyków. Badania Khana i wsp. [58] wykazały, że zastosowanie glikozydazy, proteazy oraz DNazy typu I, znacząco degradowało macierz EPS, pogarszając mechaniczną stabilność biofilmu i umożliwiając skuteczniejszą penetrację antybiotyków do wnętrza komórek bakteryjnych. Enzymy odgrywają również istotną rolę w metodzie zwanej *quorum quenching*, czyli zakłócaniu standardowego systemu *quorum sensing* (QS), będący mechanizmem pozwalającym na komunikację między komórkami odpowiedzialnego za regulację ekspresji genów. Blokowanie tego procesu prowadzi do degradacji szlaku komunikacyjnego komórek bakteryjnych i zahamowania dalszego wzrostu biofilmu. Kolejnym sposobem jest zastosowanie kwaśnej wody elektrolizowanej (AEW, ang. *Acid Electrolyzed Water*), która destabilizuje matrycę EPS poprzez rozpad wiązań w węglowodanach, co skutkuje degradacją biofilmu. Okanda i wsp. [59] potwierdzili, że AEW o pH= ok. 5,5 skutecznie niszczy polisacharydy matrycy EPS u szczepów *Pseudomonas aeruginosa*, ułatwiając ich usunięcie. Podobne działania wykazują fitochemikalia, czyli naturalne związki roślinne, które mogą działać jak inhibitory *quorum sensing*, ograniczając komunikację między komórkami bakteryjnymi. Na Rysunek 14 przedstawiono efekt działania lekko kwaśnej wody elektrolizowanej (SAEW ang. *Slightly Acidic Electrolyzed Water*). Widoczne są ciemnie

komórki bakteryjne zawierające materiał wewnętrzny oraz jasne komórki, które utraciły zawartość cytoplazmy po ekspozycji na SAEW. Komórki przed działaniem SAEW wykazywały częściowe zniszczenie ściany komórkowej, struktury błony oraz zmniejszoną gęstość cytoplazmy.



*Rysunek 14 Obraz wewnętrznej struktury szczepu, TEM [59]:
a) komórki bakteryjne przed utworzeniem biofilmu, b) komórki bakteryjne poddane działaniu 15 ppm SAEW po utworzeniu biofilmu*

Naturalne związki, takie jak berberyna, również wykazują zdolność hamowania rozwoju biofilmu, co potwierdzili w swoich badaniach Zhou i wsp. [60], [61]. Przedstawione dotychczas metody zwalczania biofilmu obejmują różne podejścia koncentrujące się na eliminacji istniejących struktur biofilmu, jak i na zapobieganiu ich powstawaniu. Jednak ich skuteczność może być jednak ograniczona ze względu na specyficzne warunki środowiska implantów oraz własności materiałów używanych do ich produkcji. Dlatego obiecującą strategią w profilaktyce i terapii zakażeń związanych z biofilmem jest modyfikacja powierzchni materiałów implantacyjnych, której celem jest utrudnienie adhezji bakterii lub nadanie powierzchni własności przeciwdrobnoustrojowych. Zagadnienie to zostało szczegółowo omówione w kolejnych rozdziałach.

2. Problematyka stosowania implantów ze stopów tytanu

Ze względu na trudności w zwalczaniu biofilmu coraz większą rolę odgrywa dobór i własności materiałów stosowanych w implantologii. Spośród dostępnych biomateriałów szczególne znaczenie mają stopy tytanu, które ze względu na korzystne własności mechaniczne, wysoką odporność na korozję oraz dobrą biokompatybilność są powszechnie wykorzystywane w medycynie. Jednak mimo wielu zalet, także na ich powierzchni może dochodzić do adhezji bakterii i formowania biofilmu, co stanowi poważne zagrożenie dla powodzenia procesu implantacji. Obecnie przemysł medyczny wymaga stosowania biomateriałów, które charakteryzują się jednocześnie odpowiednimi własnościami mechanicznymi i własnościami fizycznymi oraz chemicznymi [62]. Oprócz tego powinny one charakteryzować się niską gęstością, dużą wytrzymałością statyczną i zmęczeniową, odpornością na pękanie oraz wysoką odpornością korozyjną. Szacuje się, że około 70-80% implantów wykonywanych jest z biomateriałów metalowych, z czego tytan (Ti) i jego stopy stanowią około 40% rynku biomateriałów wykorzystywanych na implanty. Znalazły one szerokie zastosowanie w ortopedii i protetyce ze względu na korzystne własności mechaniczne, odporność na korozję (wyższą niż w przypadku stali 316L czy stopów Co-Cr-Mo), dużej wytrzymałości zmęczeniowej oraz modułowi sprężystości zbliżonemu do wartości modułu ludzkiej kości (około $E=79$ GPa). Dodatkową zaletą jest zachowanie funkcjonalności także w obecności płynów ustrojowych [63], [64]. Najczęściej stosowanym biomateriałem w tej grupie jest stop Ti-6Al-4V, wykorzystywany do produkcji elementów protez i implantów. Mimo powszechnego użycia posiada on pewne wady, takie jak niska aktywność biologiczna (ograniczająca rozrost tkanki włóknistej i sprzyjająca obluzowaniu protez), ryzyko wystąpienia metalozy i związanych z nią stanów zapalnych lub innych reakcji alergicznych. Dodatkowo wykazano niekorzystne działanie wanadu, którego cytotoksyczność może prowadzić do uszkodzeń układu nerwowego, rozwoju choroby Alzheimera czy nawet nowotworów [65]. Podobne wątpliwości budzi obecność aluminium (Al), którego długotrwała ekspozycja w tkankach może działać toksycznie. Te wymagania dotyczące implantów spowodowały rozwój stopów tytanu, jak Ti-6Al-7Nb.

W celu eliminacji szkodliwego wpływu wanadu i aluminium, opracowano bezwanadowe stopy tytanu nowej generacji. Początkowo modyfikacje polegały na zastąpieniu wanadu niobem, jak w stopie Ti-6Al-7Nb, jednak również w tym przypadku

obecność aluminium wiązała się z ryzykiem niekorzystnego wpływu na organizm. Następnie jednak opracowano stopy tytanu pozbawione już obu tych pierwiastków zastępując je jedynie pierwiastkami obojętnymi biologicznie, takimi jak: cyrkon (Zr), niob (Nb), tantal (Ta), czy molibden (Mo). Jednym z najbardziej obiecujących stopów tytanu tej generacji jest stop Ti-13Nb-13Zr, zawierający w swoim składzie jedynie pierwiastki witalne, niewywołujące stanów zapalnych i odczynów alergicznych [66], [67] (Tabela 2).

Tabela 2 Skład chemiczny (% wag) wybranych stopów tytanu zgodnie z zaleceniami norm ISO 5832-3 [68], ISO 5832-11 [69], ASTM F1713-08 [70]

Stop tytanu	% wag. pierwiastków									
	C	H	O	N	Fe	Nb	Al.	V	Zr	Ti
Ti-6Al-4V	≤0,08	≤0,015	≤0,2	≤0,05	≤0,3	-	5,5-6,75	3,5-4,5	-	Reszta
Ti-6Al-7Nb	≤0,08	≤0,009	≤0,2	≤0,05	≤0,25	6,5-7,5	5,5-6,75	-	-	Reszta
Ti-13Nb-13Zr	≤0,08	≤0,015	≤0,016	≤0,05	≤0,25	12,5-14,0	-	-	12,5-14,0	Reszta

Obecne w składzie chemicznym stopu Ti-13Nb-13Zr pierwiastki witalne, takie jak niob (Nb) oraz cyrkon (Zr), są nietoksyczne, poprawiają biokompatybilność oraz nie wywierają negatywnego wpływu na tkanki i ludzki organizm, co stanowi przewagę nad tradycyjnym stopem Ti-6Al-4V. Zmiana składu chemicznego skutkuje również zwiększoną odpornością korozyjną, wynikającą z wysokiej stabilności warstw pasywnych oraz niskiej szybkości rozpuszczania w płynach fizjologicznych [66], [71]. Wykazano, że stop Ti-13Nb-13Zr zachowuje pasywność w symulowanych warunkach fizjologicznych, takich jak roztwór Ringera, sztuczna ślina i sól fizjologiczna buforowana fosforanem (PBS), natomiast aktywność obserwuje się w roztworach kwasu solnego. Inne badania wskazują, że stopy oparte na układzie Ti-Nb-Zr są potencjalnie bardziej odporne na czynniki środowiskowe w zastosowaniach ortopedycznych niż stomatologicznych. Zainteresowanie tymi stopami wynika przede wszystkim z potrzeb w alloplastyce stawowej, gdzie istotną rolę odgrywa osteointegracja, czyli bezpośrednia interakcja między implantem metalowym a kością. Gładka warstwa pasywna dwutlenku tytanu (TiO₂), naturalnie powstająca na powierzchni tytanu, nie zawsze zapewnia jednak

odpowiednią bioaktywność i może prowadzić do tworzenia tkanki włóknistej zamiast trwałego połączenia z kością, co zwiększa ryzyko obluzowania implantu i stanu zapalnego. Ciągły proces prowadzenia badań dotyczący ulepszenia własności warstwy wierzchniej implantów i poprawienia osteointegracji pozwala na rozwój technik i metod modyfikacji powłok i warstw powierzchniowych. Poszukiwania nowych rozwiązań doprowadziły do opracowania nowych układów Ti-Nb-Zr oraz Ti-Nb-Sn, a także wprowadzenia pierwiastków stopowych takich jak tantal (Ta) i molibden (Mo), szczególnie istotnych w zastosowaniu medycznych. Materiały te znajdują potencjalne zastosowanie między innymi w śrubach kostnych, płytkach czy gwoździach śródszpikowych. Obecnie prowadzone są badania nad zastosowaniem stopów zawierających Nb i Zr w konstrukcji endoprotez stawu biodrowego i kolanowego, jako implantów długoterminowych.

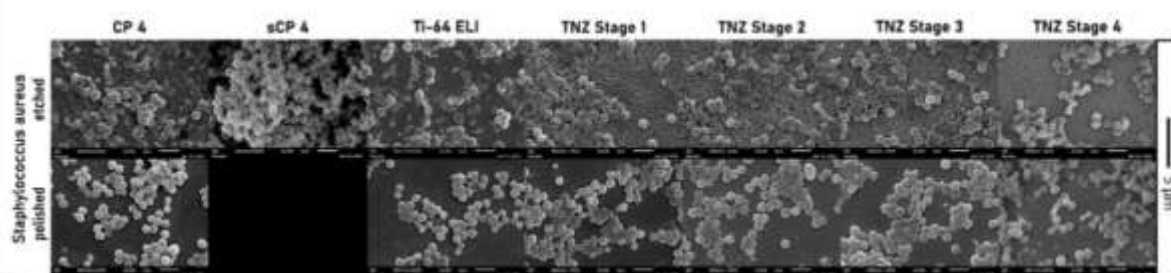
Stop Ti-13Nb-13Zr klasyfikowany jest jako stop typu β , chociaż niektóre badania wskazują jedynie tylko na jego zbliżenie do tej strefy [72]. Charakteryzuje się niższą temperaturą przemiany β podczas nagrzewania, wynosząc $T = 735^{\circ}\text{C}$, w porównaniu do powszechnie stosowanych stopów Ti-6Al-4V i Ti-6Al-7Nb. W tym przypadku dodatek Nb, jako stabilizator fazy β , powoduje obniżenie temperatury początku przemiany martenzytycznej, dzięki czemu stop Ti-13Nb-13Zr charakteryzuje się modułem Younga zbliżonym do wartości modułu kości ludzkiej [73]. Dodatkowo wykazuje lepsze własności mechaniczne w porównaniu do tradycyjnych stopów tytany, co czyni go jedną z najbardziej obiecujących alternatyw w implantologii - Tabela 3.

Tabela 3 Własności mechaniczne wybranych stopów tytanu zgodnie z zaleceniami norm: ISO 5832-3 [68], ISO 5832-11 [69], ASTM F1713-08 [70]

Stop tytanu	R _m [MPa]	R _e [MPa]	A [%]	Z [%]	E [GPa]
Ti-6Al-4V	860	780	10	-	114
Ti-6Al-7Nb	900	800	10	25	100-110
Ti-13Nb-13Zr	973-1037	836-908	10-16	27-53	79-84

Cyrkon (Zr), jako pierwiastek neutralny, nie wpływa istotnie na temperatury przemian fazowych, ale wzmacnia roztworowo fazy α i β . Popularne stopy z dodatkiem niobu czy wanadu posiadają wartość modułu w okolicach $E=100-110$ GPa [74], [75]. Prowadzone są liczne badania dotyczące stopu Ti-13Nb-13Zr, jego mikrostruktury, twardości, tribologii, czy odporności korozyjnej, co podkreśla rosnące zainteresowanie tym biomateriałem. Gołasz i wsp. [76] oraz Acimert i wsp. [77] pokazują, że w badaniach najczęściej stosuje się profilometrię optyczną oraz mikroskop sił atomowych (*AFM, ang. Atomic Force Microscopy*) do wyznaczania parametrów chropowatości oraz badania zwilżalności powierzchni. Ocena próbek bez powłok i modyfikacji powierzchni pozwala na stwierdzenie, że niemodyfikowany Ti-13Nb-13Zr wykazuje zakres hydrofilowości od bardzo wysokiej (kąt $\sim 26^\circ$) do umiarkowanej ($\sim 48-83^\circ$) zależnie od skali pomiaru i przygotowania powierzchni (różnice w polerowaniu/szlifowaniu oraz w aparaturze). Chropowatość mieści się od dziesiątek nanometrów (AFM) do ok. $0.6-1.9 \mu\text{m}$ (profilometria), a większa chropowatość sprzyja większej zwilżalności (niższym kątom), co jest korzystne dla adhezji komórkowej. Brakuje jednak szeroko wykonanych analiz obejmujących jego własności antybakteryjne, potencjalne uwalnianie jonów z powierzchni stopu, czy wpływu środowiska symulującego warunki ustrojowe na stabilność powierzchni. Zarówno zespół badawczy Łukaszyk i wsp. [78], jak i wielu innych autorów [75], [76] koncentrowali się głównie na charakterystyce fizykochemicznej stopu, nie rozwijając badań w kierunku aktywności przeciwbakteryjnej. Ocena stopu Ti-13Nb-13Zr z wykorzystaniem metod takich jak XRD, SEM, czy XPS, a także testów odporności na korozję, cytotoksyczności i własności mechanicznych, stanowi solidną podstawę do porównania go z konwencjonalnymi materiałami tytanowymi stosowanymi w implantologii. Nadal jednak brak jest kompleksowych badań dotyczących nasadzania bakterii i uwalniania jonów [66]. Dotychczas analizy obejmujące tworzenie się biofilmu

oraz cytotoksyczność prowadzono głównie dla stopu Ti-6Al-4V, natomiast analogiczne badania dla Ti-13Nb-13Zr są wciąż ograniczone [79]. Dostępnie wyniki wskazują jednak, że powierzchnia stopu Ti-13Nb-13Zr wykazuje najsilniejsze własności hamujące rozwój biofilmu w przypadku szczepów *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Staphylococcus aureus*, przewyższając w tym zakresie stop Ti-6Al-4V. Co więcej, pomimo wysokiej biokompatybilności stopu Ti-6Al-4V, to stop Ti-13Nb-13Zr mocniej wspiera różnicowanie osteoblastów, co ma kluczowe znaczenia dla zastosowań w chirurgii kostnej [71]. Badania hodowli *S. aureus* na powierzchni próbek obu stopów Ti-6Al-4V oraz Ti-13Nb-13Zr przez 24h wykazały znacznie niższą aktywność genów związanych z tworzeniem biofilmu na stopie Ti-13Nb-13Zr. Dodatkowo, obrazy uzyskane za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego potwierdziły mniejszą kolonizację bakteryjną na powierzchni stopu Ti-13Nb-13Zr po 24 godzinach inkubacji (Rysunek 15). Wyniki te wskazują na lepszą odporność w kontekście zastosowania na implanty i potencjalne zmniejszenie ryzyka infekcji [80].



Rysunek 15 *Staphylococcus aureus* na powierzchni tytanu i stopach tytanu trawionych, polerowanych i piaskowanych (gdzie: CP4- tytan Grade 4, sCP4- tytan Grade 4- po procesie piaskowania, Ti-64 ELI- stop tytanu Ti-6Al-4V, TNZ Stage 1-4- stop Ti-13Nb-13Zr- po procesach obróbki cieplnej, SEM [80])

Badania wykazały, że przenikalność i uwalnianie jonów ze stopu Ti-13Nb-13Zr jest znacznie mniejsze niż w przypadku czystego tytanu (cp-Ti), czy stopu Ti-6Al-4V, co jest bezpośrednio związane ze strukturą typu β . Oznacza to, że stopy o strukturze typu β (Ti-Nb-Zr) charakteryzują się niższą tendencją do jonizacji i uwalniania biologicznie niekorzystnych jonów niż tradycyjne stopy zawierające wanad i glin [81]. Jednocześnie minimalizuje to ryzyko wystąpienia cytotoksyczności, czy stanu zapalnego otaczającej tkanki. Analizy prowadzone dla czystego tytanu i stopu Ti-13Nb-13Zr poddanego wysokociśnieniowemu skręcaniu wykazały różnice w tempie uwalniania jonów w porównaniu do materiału niezmodyfikowanego. Nadal jednak brakuje

kompleksowych badań dotyczących wpływu zarówno długoterminowej kinetyki uwalniania, jak i wpływu uwolnionych jonów na organizm w odniesieniu do własności fizykochemicznych stopu nowej generacji [82]. Wskazuje to na potrzebę dalszych, kompleksowych analiz stopu Ti-13Nb-13Zr, szczególnie w odniesieniu do własności antibakteryjnych oraz długoterminowej biokompatybilności. Pomimo tego, że stop Ti-13Nb-13Zr wykazuje lepsze własności antibakteryjne i większą biokompatybilność niż dotychczas stosowane stopy tytanu z dodatkiem wanadu czy niobu, jego naturalna aktywność przeciwbakteryjna pozostaje niewystarczająca. Z tego względu coraz większą uwagę zwraca się na nowoczesne metody modyfikacji powierzchni, które mogą znacząco ograniczyć ryzyko kolonizacji bakteryjnej. Jednym z najbardziej obiecujących kierunków jest stosowanie powłok bakteriobójczych i bakteriostatycznych, tworzących aktywną barierę przeciwdrobnoustrojową. W kolejnej części pracy omówione zostaną dostępne metody modyfikacji powierzchni oraz charakterystyka powłok stosowanych w profilaktyce powstawania biofilmu na implantach. Poszukiwanie optymalnych kombinacji własności materiałów wiąże się nie tylko z opracowywaniem nowych stopów, lecz przede wszystkim z udoskonalaniem warstw powierzchniowych [64].

3. Charakterystyka powłok bakteriobójczych i bakteriostatycznych

Celem opracowywania funkcjonalnych powłok na powierzchniach implantów tytanowych jest nie tylko poprawa osteointegracji, ale również znaczące ograniczenie ryzyka infekcji związanych z tworzeniem się biofilmu bakteryjnego. W odpowiedzi na rosnące wyzwania związane z opornością bakterii na antybiotyki, opracowuje się powłoki, które działają bezpośrednio na granicy implant–tkanka, wykazując własności bakteriobójcze lub bakteriostatyczne. Mogą one zawierać aktywne składniki, takie jak jony metali np. srebra (Ag), miedzi (Cu), cynku (Zn), związki organiczne np. peptydy przeciwdrobnoustrojowe lub biomateriały hybrydowe, które jednocześnie wspierają integrację z tkanką kostną. Powłoki przeciwdrobnoustrojowe są nanoszone na powierzchnie w celu hamowania wzrostu i rozmnażania bakterii poprzez uwalnianie aktywnych składników. Srebro (Ag) pozostaje jednym z najczęściej stosowanych pierwiastków ze względu na silne działanie bakteriobójcze wynikające głównie z uwalniania jonów Ag^+ . Wiązanie jonów srebra z białkami i kwasem nukleinowym bakterii prowadzi do destabilizacji błony komórkowej, uszkodzeń białek enzymatycznych oraz zaburzeń replikacji DNA. Dodatkowo nanocząstki srebra wzmacniają powstawanie

reaktywnych form tlenu w bezpośrednim sąsiedztwie bakterii, co skutkuje spadkiem ich żywotności przy stosunkowo niewielkich dawkach [83]. Najczęściej stosuje się powłoki z jonami srebra Ag^+ i powłoki zawierające antybiotyki. Jony Ag^+ oddziałują z białkami i DNA, destabilizują błonę komórkową i struktury wewnętrzne, prowadząc do śmierci bakterii. Powłoki uwalniające Ag^+ skutecznie hamują wzrost bakterii. Przykładem są nanorurkowe warstwy TiO_2 z nanocząstkami Ag, które działają bakteriobójczo przeciwko *Staphylococcus aureus* przy zachowaniu wysokiej biogodności [84]. Podobne efekty uzyskiwano w powłokach uwalniających żelatynę w systemie kompozytowym wspomagających regenerację tkanki kostnej [52]. Kolejnym często stosowanym pierwiastkiem bakteriobójczym jest miedź (Cu). Działa poprzez bezpośrednie uszkodzenie błony komórkowej, destabilizację białek i generację reaktywnych form tlenu oraz przez katalizowanie reakcji. Jony miedzi wykazują szybkie działanie bakteriobójcze wobec typowych patogenów związanych z infekcjami okołowszczepowymi, a jednocześnie w odpowiednich stężeniach mogą wspierać proliferację i różnicowanie komórek kostnych. Z tego powodu opracowano zarówno powłoki uwalniające jony Cu (np. poprzez domieszkowanie TiO_2 lub stopów Ti-Cu), jak i powłoki kontaktowe (np. stopy Ti-Cu), które zapewniają długotrwały efekt przeciwbakteryjny przy wysokiej biokompatybilności [85]. Co więcej cynk (Zn) i jego tlenki łączą działanie antybakteryjne z wpływem na osteoblasty i komórki macierzyste poprawiającymi osteointegrację. Jony cynku hamują również niektóre enzymy bakteryjne co wpływa na wzrost błony i może współdziałać z generacją reaktywnych form tlenu, a jednocześnie bierze udział w polepszeniu proliferacji osteoblastów i ich różnicowaniu. Natomiast ze względu na cytotoksyczność cynku w dużym stężeniu nadal poszukuje się bardziej biokompatybilnego pierwiastka [86]. Inne rozwiązania obejmują powłoki z hydroksyapatytu (HA) i tlenków tytanu nanoszone metodą natryskiwania plazmowego [87], warstwy kompozytowe z polikaprolaktonu (PCL) i bioszklą z dodatkiem srebra oraz grafenu [88] czy implantację jonów Cu, Zn i Mg [89]. Hydroksyapatyt to mineralny składnik podobny do tkanki kostnej, poprawia integrację implantu. Co więcej, wykazano, że Cu działa bakteriobójczo wobec *S. aureus* z efektywnością >99%, podczas gdy Zn i Mg dodatkowo wspierają proliferację osteoblastów i różnicowanie komórek. Powłoki superhydrofobowe uzyskane poprzez anodowanie na powierzchni tytanu (kąt zwilżania >170°) opracowane przez Rao i wsp. [90] ograniczały przyleganie bakterii o około 98%. Modyfikację powierzchni wykonano przy użyciu modyfikacji ultradźwiękowej związkami

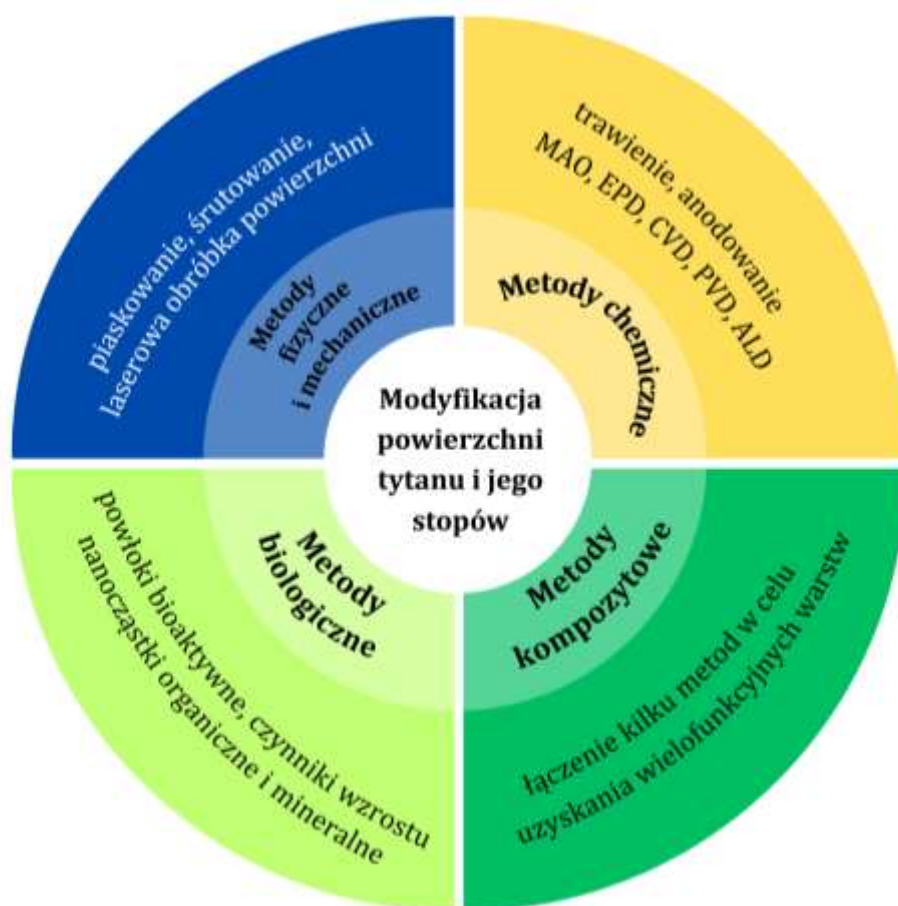
1H,1H,2H,2H-perfluorodecyloxytrietoxysilanu (FAS). W ostatnich latach rośnie zainteresowanie cyną i jej tlenkami jako alternatywnym materiałem na powłoki. Cyna wykazuje aktywność przeciwbakteryjną, a jednocześnie cechuje się stosunkowo niską cytotoksycznością w porównaniu do srebra czy miedzi, co czyni ją obiecującym materiałem w projektowaniu nowoczesnych implantów. Tlenek cyny (SnO_2) to półprzewodnikowy tlenek metalu, cechuje się, własnościami fotokatalitycznymi, wysoką trwałością chemiczną oraz stosunkowo niską toksycznością. Tlenek cyny (IV) stosowany w postaci nanowłókien, cienkowarstwowych powłok lub kompozytów z innymi tlenkami metali (np. TiO_2 czy RuO_2), ogranicza adhezję bakterii, niszczy biofilm i jednocześnie może stymulować różnicowanie komórek macierzystych, wspierając osteointegrację. Odpowiednio zaprojektowane struktury SnO_2 mogą wykazywać działanie pasywne wynikające z ich własności powierzchniowych lub aktywne, reagując na bodźce takie jak światło czy impulsy elektryczne. Zhou i wsp. [91] opisali wielowarstwową powłokę $\text{TiO}_2\text{-SnO}_2\text{-RuO}_2$ reagującą na bodźce elektryczne, która eliminowała bakterie i jednocześnie zwiększała ekspresję genów osteogennych. Naładowana elektrycznie powierzchnia skutecznie zwalczała bakterie zasiedlające implant, jednocześnie wspomagając integrację z tkanką kostną, co przekłada się na większą trwałość implantów. Inne badania potwierdziły wysoką biokompatybilność powłok SnO_2 (>90% żywotności komórek), ich aktywność wobec sześciu szczepów bakterii oraz silne własności antibakteryjne, wynikające z fotokatalitycznego działania SnO_2 [92]. Nanocząstki Sn ograniczają adhezję i proliferację *S. aureus*, nie wpływając negatywnie na biokompatybilność. Dzięki takim modyfikacjom możliwe jest zwiększenie trwałości implantów oraz ograniczenie ryzyka powikłań i konieczności reoperacji [93]. Podsumowując, modyfikacje powierzchni implantów z wykorzystaniem pierwiastków antibakteryjnych stanowią istotny kierunek w rozwoju biomateriałów. Łączą one funkcjonalność biologiczną z ochroną antibakteryjną, zwiększając skuteczność leczenia implantologicznego. Kluczowym aspektem pozostaje jednak dobór odpowiedniej metody nanoszenia powłok, która determinuje ich trwałość i aktywność biologiczną.

3.1. Metody modyfikacji powierzchni biomateriałów tytanowych

Ciągły rozwój biomateriałów obejmuje nie tylko opracowanie i obróbkę powierzchni materiałów najczęściej używanych do produkcji implantów, lecz także ich dalsze doskonalenie poprzez różne modyfikacje. Modyfikacje te odgrywają kluczową rolę

w poprawie własności fizykochemicznych, zwiększaniu osteointegracji oraz ograniczaniu ryzyka infekcji okołowszczepowych, związanych zarówno z gromadzeniem się bakterii, jak i migracją jonów z wnętrza metali. Dzięki temu zmniejszają prawdopodobieństwo tworzenia biofilmu bakteryjnego [19], [94]. Udoskonalenie powierzchni biomateriału pod kątem tych wszystkich własności pozwala na zwiększenie biokompatybilności, co ma zasadnicze znaczenie dla powodzenia leczenia implantologicznego. To właśnie powierzchnia implantu, pozostająca w bezpośrednim kontakcie z tkanką, decyduje o skuteczności osteointegracji i trwałości. Skuteczność implantu zależy zatem od zdolności do wspierania procesu integracji kostnej oraz odporności na kolonizację drobnoustrojów [95], [96], [97]. Pomimo tego, że stopy tytanu są powszechnie uznawane za biomateriały o bardzo dobrej biokompatybilności to ich powierzchnie wykazują biologiczną obojętność, co czyni je podatnymi na infekcje bakteryjne. Ponadto mogą one posiadać niewystarczającą stabilność mechaniczną i słabą stabilność początkową, w momencie osadzania implantu w kości. W związku z tym coraz większe znaczenie zyskują nowoczesne metody modyfikacji powierzchni, które stanowią wyzwanie w odniesieniu do klasycznych technik obróbki implantów [98]. Obecnie stosowane metody modyfikacji powierzchni implantów tytanowych mają na celu poprawę osteointegracji i ograniczenia ryzyka infekcji. Dzieli się je na cztery główne grupy (Rysunek 16) :

- **biologiczne,**
- **fizyczne i mechaniczne,**
- **kompozytowe,**
- **chemiczne.**



Rysunek 16 Sposoby modyfikacji powierzchni [98]

Dobór odpowiedniej metody modyfikacji powierzchni implantów zależy od wielu czynników, takich jak miejsce zastosowania implantu, wymagane własności fizykochemiczne, czy biologiczne. Zintegrowanie zaawansowanych technik modyfikacji powierzchni pozwala na znaczącą poprawę wydajności i trwałości implantów metalicznych [98], [99].

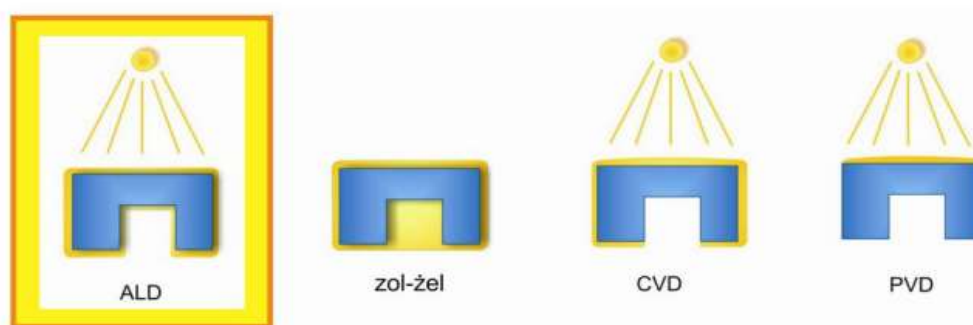
Metody biologiczne obejmują funkcjonalizację powierzchni biomolekułami, takimi jak peptydy, białka czy czynniki wzrostu, których zadaniem jest stymulowanie odpowiedzi komórkowej i wspomaganie osteointegracji. Zastosowanie powłok biologicznie aktywnych, np. hydroksyapatytu (HA), bioz szkła czy substancji przeciwdrobnoustrojowych, poprawia integrację implantu z kością, zmniejsza ryzyko infekcji i zwiększa biokompatybilność. Nowoczesnym rozwiązaniem są powłoki kompozytowe o strukturze gradientowej, które łączą różne funkcje, np. działanie antybakteryjne ze stymulacją wzrostu tkanki kostnej. Do najczęściej stosowanych należą powłoki przeciwbakteryjne, polidopaminowe i bioaktywne organiczne. Tworzą one

struktury tkankopodobnych, wspierają adhezję komórek, hamują proliferację bakterii, ułatwiają wzrost i integrację tkanki kostnej oraz zwiększają biokompatybilność i bioaktywność implantu. Takie modyfikacje odgrywają kluczową rolę w inicjowaniu zmian powierzchni w skali mikro i makro, co ułatwia tworzenie trwałego połączenia implantu z otaczającą tkanką kostną [98], [99]. Do fizycznych i mechanicznych metod modyfikacji powierzchni implantów należą piaskowanie, śrutowanie, powlekanie powierzchni oraz laserowa obróbka powierzchni (*LSE, ang. Laser Surface Enhancement*). Celem tych technik jest poprawa biokompatybilności, osteokonduktywności, odporności na zużycie, zmęczenie i zapewnienie długotrwałej stabilności implantów. Chang i wsp. [100] wykazali, że połączenie piaskowania z trawieniem kwasem zwiększa hydrofilowość i chropowatość tytanu, poprawiając własności powierzchni. Stosowane powłoki, najczęściej biologicznie aktywne, sprzyjają adhezji i wzrostowi komórek kostnych. Fouada i wsp. [101] pokazali, że pokrycie implantów tytanowych powłoką HA przyspiesza proces gojenia i zwiększa wiązanie z tkanką, choć różne techniki nanoszenia mogą wpływać na wytrzymałość i stabilność powłok. Niekiedy powłoki są podatne na rozwarstwianie, co może wywoływać stan zapalny. LSE polega na selektywnym topieniu lub zmianie struktury powierzchni za pomocą lasera, bez naruszania własności podłoża. Arthur i wsp. [102] wykazali, że metoda ta w przypadku implantów drukowanych 3D ze stopu tytanu poprawia odporność na korozję oraz własności mechaniczne. W porównaniu z metodami chemicznymi i biologicznymi techniki fizyczne i mechaniczne mogą jednak prowadzić do nadmiernej chropowatości, osłabiając wytrzymałość połączeń międzyfazowych. Ich wpływ na aktywność biologiczną ogranicza się głównie do poprawy własności mechanicznych poprzez zmianę topografii powierzchni.

Metoda kompozytowa powłok polega na łączeniu dwóch lub więcej metod w celu połączenia ich zalet i kompensacji ograniczeń pojedynczych technik. Typowe przykłady obejmują powłoki kompozytowe z tlenku tytanu, hydroksyapatytu (HA) i innych materiałów bioaktywnych. Wielowarstwowe struktury pozwalają łączyć funkcje poszczególnych warstw, zwiększając własności mechaniczne, odporność na korozję i aktywność antybakteryjną. Obróbki wstępne, np. alkaliczna, poprawiają przyczepność powłok, a obróbka cieplna zmniejsza naprężenia międzywarstwowe, stabilizując strukturę. Zbyt grube powłoki mogą jednak ulegać łuszczeniu. Song i wsp. [103] połączyli obróbkę alkaliczną, cieplną i elektrochemiczne osadzanie HA, uzyskując implanty o lepszej stabilności, bioaktywności i lepszej osteointegracji. Zhang i wsp. [104]

wykorzystali technologię SLM, czyli selektywnego topienia laserowego (ang. *Selective Laser Melting*), do wytworzenia porowatych rusztowań ze stopu tytanu, a następnie piaskowanie, trawienie kwasem i osadzanie warstw atomowych (ALD) tlenku tantalu uzyskując jednorodne warstwy poprawiające adhezję, proliferację i różnicowanie komórek macierzystych, cytokompatybilność oraz osteointegrację. Metody chemiczne polegają na obróbce powierzchni implantów związkami chemicznymi w celu wywołania reakcji i zmiany ich własności. Do najczęściej stosowanych technik należą: trawienie kwasem, utlenianie anodowe, mikrołukowe utlenianie (MAO ang. *Micro-Arc Oxidation*), osadzanie elektroforetyczne (EPD ang. *Electrophoretic Deposition*), fizyczne osadzanie z fazy gazowej (PVD ang. *Physical Vapour Deposition*), osadzanie z fazy gazowej (CVD ang. *Chemical Vapour Deposition*), oraz jego odmiana, atomowe osadzanie z fazy gazowej (ALD ang. *Atomic Layer Deposition*). Metody te poprawiają biokompatybilność i sprzyjają osteointegracji. Trawienie kwasem (HF, HNO₃, H₂SO₄ lub ich mieszaniny) prowadzi do powstania mikrowgłębień, zwiększa chropowatość, co ułatwia adhezję i wzrost komórek kostnych. Yang i wsp. [105] wykazali, że technika ta sprzyja adhezji makrofagów i obniża poziom ROS (ang. *Reactive Oxygen Species*), czyli reaktywnych form tlenu. Obniżenie poziomu ROS oznacza mniejsze ryzyko stresu oksydacyjnego, co sprzyja korzystnym procesom biologicznym, np. lepszemu gojeniu się implantów i wzrostowi komórek kostnych. Trawienie często łączy się z anodowaniem, które wykorzystuje układ elektrochemiczny i prowadzi do zmian morfologii oraz zwiększenia bioreaktywności. Utlenianie anodowe to technika prowadząca do powstania warstwy o regulowanej grubości, morfologii i strukturze krystalicznej, gdzie implant pełni rolę anody w układzie elektrolitycznym. El-wassefy i wsp. [106] wykazali, że powierzchnia anodowana posiada większą bioaktywność. W przypadku wytworzonych warstw fosforanu wapnia, z użyciem tej metody zaobserwowano poprawę własności mechanicznych połączenia implant-kość, co umożliwia wcześniejsze obciążenie implantu, przeprowadzając symulację w płynie ustrojowym. MAO to metoda elektrochemiczna pozwalająca na tworzenie aktywnych powłok tlenkowych, także na złożonych implantach drukowanych w technologii 3D. Kozelskaya i wsp. [107] pokazali, że proces ten umożliwia kontrolę grubości porowatych powłok i zwiększa aktywność biologiczną materiałów. EPD polega na osadzaniu naładowanych cząstek w polu elektrycznym, w niskiej temperaturze. Pozwala uzyskać jednorodne powłoki o kontrolowanej grubości, najczęściej z hydroksyapatytu, tlenku grafenu (GO) i srebra (Ag). Juliadmi i wsp. [108] zastosowali EPD do powlekania

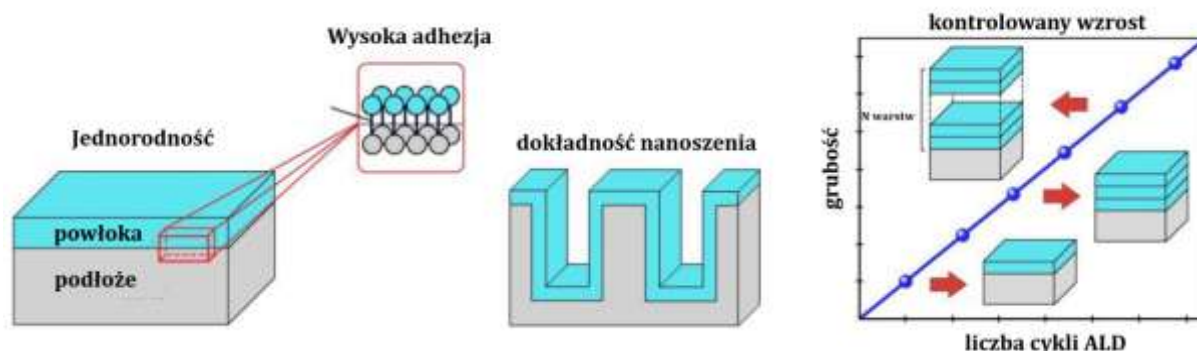
implantów hydroksyapatytem, uzyskując poprawę własności powierzchni. CVD opiera się na reakcjach chemicznych w fazie gazowej w wysokich temperaturach, umożliwiając precyzyjne wytwarzanie cienkich powłok, m.in. powłoki HA, które wspierają wzrost tkanki kostnej. Rifai i wsp. [109] uzyskali powłoki diamentowe metodą CVD, które poprawiały proliferację komórek i hamowały wzrost bakterii. W ostatnich latach szczególne znaczenie zyskała technologia ALD, pozwalająca na nanoszenie ultracienkich powłok o precyzyjnie kontrolowanej grubości, składzie i jednorodności. Dzięki zdolności do równomiernego osadzania warstw na powierzchniach o złożonej geometrii i dużej porowatości znajduje ona szerokie zastosowanie w modyfikacji implantów tytanowych stosowanych w ortopedii i stomatologii. Metoda ALD pozwala na uzyskanie warstw w skali nanometrowej, równomiernie pokrywających biomateriały o skomplikowanych kształtach. Dzięki temu możliwa jest dokładna kontrola mechanizmów wzrostu powłoki oraz jej ciągłości, co stanowi przewagę nad innymi technikami modyfikacji powierzchni-
Rysunek 17 [110].



Rysunek 17 Sposób osadzania warstw metodą ALD w porównaniu do metody sol- żel, CVD oraz PVD [110]

W porównaniu z innymi technikami nanoszenia warstw wierzchnich, metoda ALD wyróżnia się możliwością precyzyjnego kontrolowania grubości powłoki wyłącznie poprzez liczbę wykonanych cykli, niezależnie od jednorodności strumienia prekursorów, co stanowi ograniczenie w metodach takich jak CVD czy PVD. Dodatkowym atutem jest możliwość stosowania prekursorów o wysokiej reaktywności, ponieważ reagenty wchodzi ze sobą w kontakt dopiero na powierzchni podłoża, co umożliwia natychmiastowe powstawanie warstwy bez ryzyka niekontrolowanego wzrostu. Dzięki temu w każdym cyklu tworzy się ściśle określona, nanometrowej grubości warstwa. W porównaniu z innymi metodami nanoszenia cienkich warstw ALD wyróżnia się dzięki precyzyjnej możliwości sterowania liczbą cykli. Jeden cykl dostarcza określoną,

powtarzalną ilość prekursora, niezależnie od nieregularności strumienia prekursorów czy geometrii podłoża. ALD jest szczególnie cenna przy modyfikacji biomateriałów o porowatej i złożonej strukturze geometrycznej, ponieważ umożliwia równomierne i dokładne nanoszenie cienkich warstw nawet na trudno dostępnych fragmentach powierzchni. Ta cecha jest szczególnie istotna i daje ALD przewagę nad CVD i PVD w przypadku porowatych i trójwymiarowych implantów drukowanych, gdzie wymagane jest równomierne pokrycie trudno dostępnych miejsc i wewnętrznych kanałów [111]. Jest to również związane ze sposobem uzyskiwania powłoki na granicy podłoże- faza gazowa. Otrzymane powłoki są związane z podłożem za pomocą wiązań chemicznych, dlatego mają wysoką przyczepność, w porównaniu do powłok powstających przy użyciu innych metod osadzania (Rysunek 18). Co więcej metoda ALD zapewniają kontrolowany wzrost grubości uzyskanej powłoki, dzięki zwiększaniu liczby cykli podczas procesu wpływając na nanoszenie kolejnych warstw na powierzchni.



Rysunek 18 Główne korzyści technologii ALD [111]

Zastosowanie ALD pozwala nie tylko na poprawę biokompatybilności, ale także na nadanie powierzchni własności antybakteryjnych, co ma kluczowe znaczenie w zapobieganiu infekcjom okołowszczepowym. Dzięki tej technologii możliwe jest osadzanie cienkich warstw tlenków metali (np. TiO_2 , ZrO_2) oraz nanocząstek srebra (Ag), bez wpływu na strukturę samego implantu.

W ten sposób metoda ALD umożliwia połączenie kilku strategii działania [112]:

- Bezpośrednie osadzanie cienkiej warstwy o kontrolowanej grubości lub ilości nanocząstek pozwalających na działanie antybakteryjne.
- Nanoszenie aktywnych tlenków o fotokatalitycznej aktywności, które przy działaniu wybranego czynnika tj. światło, plazma, prąd generują reaktywne formy tlenu niszczące komórki bakteryjne.

- Modyfikację powierzchni, poprzez zmianę wartości energii powierzchniowej, charakteru zwilżalności powierzchni, czy topografii na poziomie nanometrów, co w kontekście biofilmu zmniejsza adhezję i początkowy rozrost bakterii.

Badania potwierdzają skuteczność tej metody Jenkins i wsp. [112] osadzili warstwę srebra na trójwymiarowych implantach tytanowych, uzyskując znaczną redukcję kolonizacji *Staphylococcus epidermidis*, przy jednoczesnym wspieraniu procesu angiogenezy (proces powstawania nowych naczyń krwionośnych- naczyń włosowatych z już istniejących naczyń) i osteointegracji w modelu *in vivo*, bez oznak cytotoksyczności. Podobnie Nazarow i wsp. [113] uzyskali powłokę TiO_2 z nanocząstkami srebra, która wykazała silny efekt przeciwdrobnoustrojowy przeciwko szczepom *Staphylococcus aureus* oraz zwiększała aktywność osteogenną i różnicowanie komórek MSC (mezenchymalne komórki macierzyste, ang. *Mesenchymal Stem Cells*). Powłoka wykazywała zdolność do wspierania różnicowania osteoblastów nawet bez czynników wzrostu w medium. Innym podejściem było zastosowanie tlenku cyrkonu (ZrO_2) osadzanego metodą ALD na powierzchni tytanu. Powłoki ZrO_2 , zwłaszcza w fazie tetragonalnej (czyli w zakresie temperatur: 1170–2370°C), wykazały zdolność do redukcji adhezji bakteryjnej oraz poprawy żywotności osteoblastów, tym samym stanowiąc alternatywę dla powłok zawierających srebro. Zhao i wsp. [114] Analizowali wpływ liczby cykli ALD w przypadku powłoki TiO_2 , wykazując, że ich zwiększenie prowadziło do mniejszego zużycia powierzchni oraz redukcji emisji jonów metali, co może ograniczać reakcje zapalne. Konopatsky'ego i wsp. [115] z kolei zastosowali ALD do modyfikacji nowoczesnego stopu tytanu Ti-18Zr-15Nb, nanosząc nanocząstki srebra. Otrzymane powierzchnie wykazywały lepsze własności antybakteryjne przy zachowaniu wysokiej biokompatybilności, wskazując na możliwość zastosowania tego typu modyfikacji powierzchni również w implantologii polegającej na zastosowaniu biomateriałów nowej generacji.

4. Podsumowanie przeglądu piśmiennictwa

Biofilm to złożona, silnie adhezyjna struktura mikroorganizmów osadzonych w macierzy zewnątrzkomórkowej, charakteryzująca się dużą odpornością na działanie antybiotyków oraz odpowiedź immunologiczną gospodarza. Zakażenia związane z implantami, spowodowane rozwojem biofilmu na ich powierzchni, są trudne do leczenia i często wymagają usunięcia implantu, co znacząco pogarsza rokowanie i jakość życia pacjentów. Skład bakteryjny biofilmu zależy od lokalizacji implantu, a także od jego materiału i geometrii, przy czym różne biomateriały – takie jak metale (stal chirurgiczna, tytan i jego stopy), polimery, ceramika i kompozyty – wykazują zróżnicowaną podatność na kolonizację bakterii i tworzenie biofilmu. Kluczową rolę w procesie powstawania biofilmu odgrywają własności powierzchni biomateriału, takie jak chropowatość, zwilżalność, skład chemiczny i energia powierzchniowa, które determinują adhezję bakterii. Niewystarczające działanie antybiotyków, których zadaniem jest eliminacja biofilmu spowodowały poszukiwania skutecznych metod zwalczania biofilmu, w tym fizycznych (ultradźwięki, temperatura, pole magnetyczne), chemicznych (PEG, chitozan, leki przeciwbakteryjne) i biologicznych (fagoterapia, enzymy, quorum quenching). Jednak ze względu na różnorodność materiałów implantacyjnych i specyfikę środowisk występowania, coraz większe znaczenie zyskuje modyfikacja powierzchni biomateriałów, której celem jest profilaktyczne ograniczenie adhezji bakterii i rozwoju biofilmu.

Wśród biomateriałów stosowanych w implantologii szczególną uwagę poświęca się tytanowi i jego stopom, ze względu na ich wysoką biokompatybilność, odporność na korozję oraz własności mechaniczne. Najczęściej używany stop Ti-6Al-4V, mimo wielu zalet zawiera w swoim składzie toksyczne pierwiastki i jest podatny na kolonizację bakteryjną. W odpowiedzi na to zagadnienie opracowano kolejną generację stopów tytanu, zawierające pierwiastki witalne (niob, cyrkon). Wybrane pierwiastki odpowiadają za lepszą biokompatybilność oraz niższy moduł Younga. Zastosowanie jednak stopu Ti-13Nb-13Zr nie jest całkowicie pozbawione wad. Badania własności biologicznych tego stopu i występujące na jego powierzchni kolonie bakteryjne wskazują na potrzebę poszukiwania metod modyfikacji powierzchni, w celu polepszania własności antibakteryjnych.

Modyfikacje powierzchni tytanowych biomateriałów stosowanych w implantach kostnych i stomatologicznych mają na celu poprawę własności fizykochemicznych,

zwiększenie osteointegracji oraz ograniczenie ryzyka zakażeń bakteryjnych, a tym samym powstawania biofilmu. Najnowsze technologie obejmują powłoki kompozytowe łączące funkcje antybakteryjne z pobudzaniem wzrostu tkanki kostnej oraz metody takie jak mikrołukowe utlenianie i osadzanie elektroforetyczne, pozwalające na precyzyjną kontrolę struktury powierzchni i jej własności funkcjonalnych. Niestety największą wadą tych metod, oprócz wysokiej temperatury osadzania, jest uzyskanie niejednorodnej powłoki na skomplikowanej geometrycznie powierzchni np. niewielkich implantów stomatologicznych, czy kostnych.

Dotychczasowe badania nad antybakteryjnymi powłokami na implantach tytanowych koncentrowały się głównie na wykorzystaniu znanych metali, takich jak srebro, miedź czy cynk, a także związków organicznych i materiałów hybrydowych. Choć wykazują one skuteczne działanie przeciwdrobnoustrojowe, ich zastosowanie często wiąże się z ryzykiem cytotoksyczności lub ograniczoną trwałością powłok. Tlenek cyny (SnO_2) zyskuje coraz większe znaczenie jako powłoka. Wykazuje silne własności bakteriobójcze i bakteriostatyczne, a jednocześnie cechuje się niską toksycznością dla komórek gospodarza. Dodatkowo, jego struktura umożliwia tworzenie powierzchni o własnościach antyadhezyjnych, skutecznie ograniczających tworzenie się biofilmu bakteryjnego.

Z tego względu skutecznym rozwiązaniem wydaje się połączenie pierwiastka cyny (Sn) wykazującego własności bakteriobójcze i technologii nanoszenia cienkich powłok Atomic Layer Deposition (ALD), która umożliwia precyzyjne, warstwowe nakładanie powłok o grubości nanometrycznej na powierzchnie implantów nawet o złożonej, porowatej strukturze. ALD wyróżnia się równomiernym pokryciem całej powierzchni, nawet w trudno dostępnych miejscach, dzięki sekwencyjnemu procesowi osadzania z użyciem wysoko reaktywnych prekursorów, eliminującym ryzyko niekontrolowanego wzrostu warstw. Badania potwierdzają, że powłoki te zmniejszają emisję jonów metali i zużycie powierzchni implantów, co może ograniczać reakcje zapalne. W efekcie ALD stanowi skuteczne rozwiązanie, jako metoda modyfikacji powierzchni, zapewniająca odpowiednie własności i antybakteryjność.

III. Badania własne

1. Cel, założenia i teza pracy

W związku z faktem, że leczenie zakażeń okołowszczepowych jest w dalszym ciągu wyzwaniem dla współczesnej medycyny, należy minimalizować ryzyko ich występowania. Dlatego też zasadne wydaje się twierdzenie, że najskuteczniejszą metodą w walce z zakażeniami byłoby stosowanie biomateriałów, które wykazują własności bakteriobójcze lub bakteriostatyczne (hamujące tworzenie biofilmu na powierzchni implantu). Obecnie produkowane biomateriały metalowe nie hamują jednak adhezji bakterii i rozwoju biofilmu. W związku z tym obiecującą metodą zapobiegającą powstawaniu biofilmu jest odpowiednia modyfikacja powierzchni implantu warstwami powierzchniowymi. Pomimo zaangażowania wielu ośrodków naukowych na świecie problematyka dotycząca powłok o własnościach antybakteryjnych opiera się na badaniach cząstkowych. Nie ma opracowań syntetyzujących kompleksowo zagadnienia fizykochemiczne oraz mikrobiologiczne implantów stosowanych w układzie kostnym. Na podstawie dostępnych pozycji literaturowych [116], [117], [118], [119], [120] oraz wyników badań wstępnych [121] sformułowano cel pracy:

Opracowanie warunków wytwarzania powłok antybakteryjnych metodą osadzania warstw atomowych na bazie SnO_2 na powierzchni stopu tytanu nowej generacji Ti-13Nb-13Zr oraz ustalenie zależności pomiędzy strukturą, własnościami fizykochemicznymi powłoki a ich aktywnością antybakteryjną.

Obecnie w literaturze nie istnieją doniesienia naukowe na temat modyfikacji stopu tytanu nowej generacji- Ti-13Nb-13Zr powłoką tlenku cyny (IV), pomimo tego, że zarówno sam stop, jak i powłoka wykazują duży potencjał aplikacyjny. Innowacyjne podejście pozwala na dokładną kontrolę parametrów powłoki i może prowadzić do poprawy własności fizykochemicznych i biologicznych stopu, takich jak biokompatybilność, zwilżalność, odporność korozyjną czy aktywność antybakteryjną. Niniejsza praca stanowi pierwszą próbę połączenia tych dwóch elementów, mającą na celu opracowanie nowej, funkcjonalnej modyfikacji powierzchni, która może znaleźć zastosowanie w inżynierii biomedycznej, zwłaszcza w implantologii. Dotychczasowe badania nad modyfikacją powierzchni stopu Ti-13Nb-13Zr koncentrowały się głównie na powłokach tlenków metali takich jak TiO_2 , ZnO czy Al_2O_3 . Zastosowanie tlenku cyny (IV) (SnO_2) w technologii

ALD pozostaje natomiast niemal całkowicie nieudokumentowane naukowo. W związku z tym, niniejsza praca podejmuje próbę wypełnienia luki badawczej, zakładając, że modyfikacja powierzchni stopu Ti-13Nb-13Zr za pomocą nanometrycznej powłoki SnO₂ osadzanej metodą ALD może korzystnie wpłynąć na jego własności fizykochemiczne i mikrobiologiczne, tym samym zwiększyć jego użyteczność w aplikacjach klinicznych. Ze względu na brak szeroko udokumentowanych badań dotyczących takiego podejścia, proponowana metodologia stanowi innowacyjne rozwiązanie w obszarze inżynierii biomedycznej, szczególnie w kontekście zastosowań na implanty krótko i długookresowe, co pozwala na przyjęcie następującej tezy badawczej:

Istnieje możliwość podwyższenia oporności na kolonizację mikrobiologiczną stopu Ti-13Nb-13Zr poprzez wytworzenie na jej powierzchni powłok na bazie SnO₂ metodą osadzania warstw atomowych

W celu weryfikacji postawionej tezy zrealizowano plan badawczy (Rysunek 19). Zawarty w nim szereg badań pozwoli na opisanie procesów zachodzących na powierzchni stopu Ti-13Nb-13Zr po jego wprowadzeniu do układu kostnego.

CHARAKTERYSTYKA POWŁOKI

Badania składu chemicznego powłoki,
Badania mikrostruktury powłoki,
Pomiary grubości powłoki

OCENA WŁASNOŚCI FIZYCZNYCH

Badania adhezji powłoki do podłoża
Badania własności tribologicznych powłoki
Badania topografii powierzchni
Badania zwilżalności powierzchni

OCENA WŁASNOŚCI ELEKTROCHEMICZNYCH

Badania odporności na korozję wżerową
Badania odporności na korozję szczelinową
Badania elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej
Badania przenikania jonów

OCENA WŁASNOŚCI BIOLOGICZNYCH

Badania cytotoksyczności
Oznaczanie cytokin prozapalnych
Badania adhezji bakterii do podłoża
Badania proliferacji komórek

Rysunek 19 Ramowy program badań

2. Materiał do badań

Do badań wykorzystano materiał w postaci prętów ze stopu Ti-13Nb-13Zr o średnicy 14 mm firmy BIMO TECH Sp. z o.o., z których wycięto krążki o grubości 2 mm. Skład chemiczny oraz własności mechaniczne przedstawiono w Tabeli 4 oraz w Tabeli 5, które są zgodne z wymaganiami normy ASTM F1713-08(2021) [70].

Tabela 4 Skład chemiczny stopy tytanu Ti-13Nb-13Zr w %wag

Stop	Wymagania	% wag. pierwiastków							
		C	H	O	N	Fe	Nb	Zr	Ti
Ti-13Nb-13Zr	wg ASTM F1713	≤0,08	≤0,012	≤0,15	≤0,05	≤0,25	12,5÷14,0	12,5÷14,0	reszta
	wg karty charakterystyki producenta	0,007	0,001	0,085	0,007	0,036	13,1	13,14	reszta

Tabela 5 Własności mechaniczne stopu Ti-13Nb-13Zr

Stop	Rodzaj analizy	R _m [MPa]	R _{p0,2} [MPa]	A [%]	Z [%]
Ti-13Nb-13Zr	wg ASTM F1713	≥550	≥345	≥15	≥30
	wg karty charakterystyki materiału producenta	793	686	18	36

W Tabeli 6 przedstawiono skład roztworu PBS, przygotowanego poprzez rozpuszczenie tabletki Fisher Bioreagents (Thermo Fisher Scientific, USA), symulującego płyn ustrojowy organizmu człowieka.

Tabela 6 Skład roztworu PBS

Składnik	Stężenie [mM]/ 1dm³ H₂O
NaCl	137
KCl	2,7
Na₂HPO₄	10
KH₂PO₄	1,8

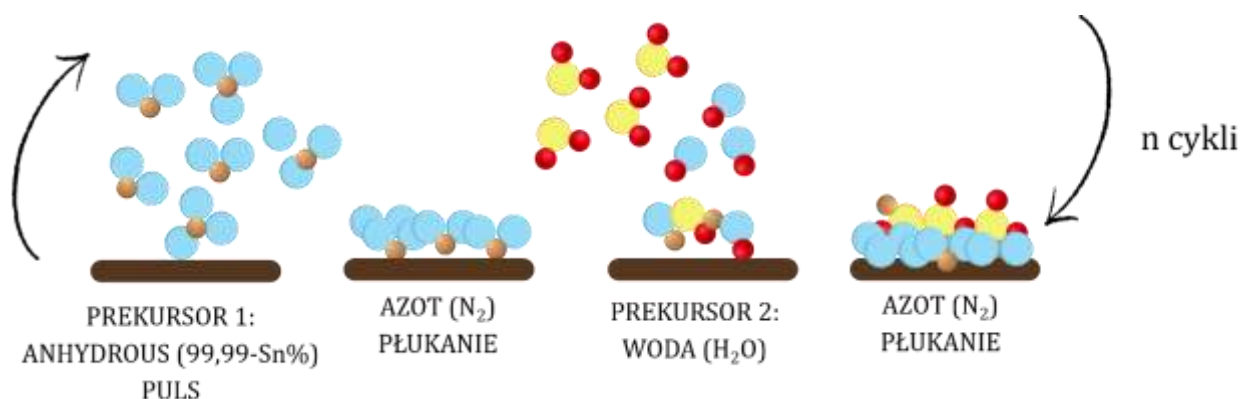
3. Modyfikacja powierzchni

W celu przygotowania powierzchni stopu Ti-13Nb-13Zr, próbki po cięciu poddano obróbce wibrościernej z wykorzystaniem kształtek ceramicznych na polerze firmy MarBad. Zabieg ten miał na celu uzyskanie zbliżonej chropowatości powierzchni na poziomie $R_a = 0,50 \mu\text{m}$, poprzez jej wygładzenie i ujednolicenie. Otrzymane parametry zweryfikowano za pomocą profilometru stykowego. Następnie próbki poddano procesowi szlifowania przy użyciu folii ściernych SiC o stopniowo zwiększanej gradacji ziarnistości: 500, 1200, 2000. Szlifowanie prowadzono z siłą nacisku 5N, w czasie $t = 5 \text{ min}$ dla każdej gradacji. Po zakończeniu szlifowania, próbki poddano dalszej obróbce powierzchniowej stosując dwa różne warianty: polerowanie i piaskowanie. Dla pierwszego wariantu wykonano proces polerowania mechanicznego na tarczy, w obecności koloidalnej zawiesiny roztworu o składzie: 5-chloro-2-metylo-2H-izotiazol-3-onu i 2 metylo-2H-izotiazol-3-onu (3:1), aż do uzyskania zbliżonej wartości chropowatości $R_a = 0,10 \pm 0,01 \mu\text{m}$, a dla drugiego wariantu wykonano piaskowanie przy użyciu piaskarki precyzyjnej Micra 2 firmy Dentalfarm, kulkami szklanymi SiO₂ (ziarnistość $50 \mu\text{m}$) firmy EcoSand w czasie $t = 2 \text{ min}$, gdzie chropowatość wynosiła $R_a = 0,24 \pm 0,01 \mu\text{m}$. Po przygotowaniu dwóch wariantów wszystkie próbki oczyszczono przez $t = 10 \text{ min}$ w myjce ultradźwiękowej o temperaturze $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ w roztworze izopropanolu, a następnie acetonie.

3.1. Naniesienie powłoki

W kolejnym etapie na przygotowane powierzchnie stopu Ti-13Nb-13Zr naniesiono powłokę tlenku cyny (IV) (SnO₂) metodą Atomic Layer Deposition (ALD),

wykorzystując prekursor chlorku cyny (IV) (SnCl_4) o nazwie zwyczajowej anhydrous 99,99- Sn% oraz wodę (H_2O)- Rysunek 20. Osadzanie prowadzono w reaktorze Beneq TFS200.



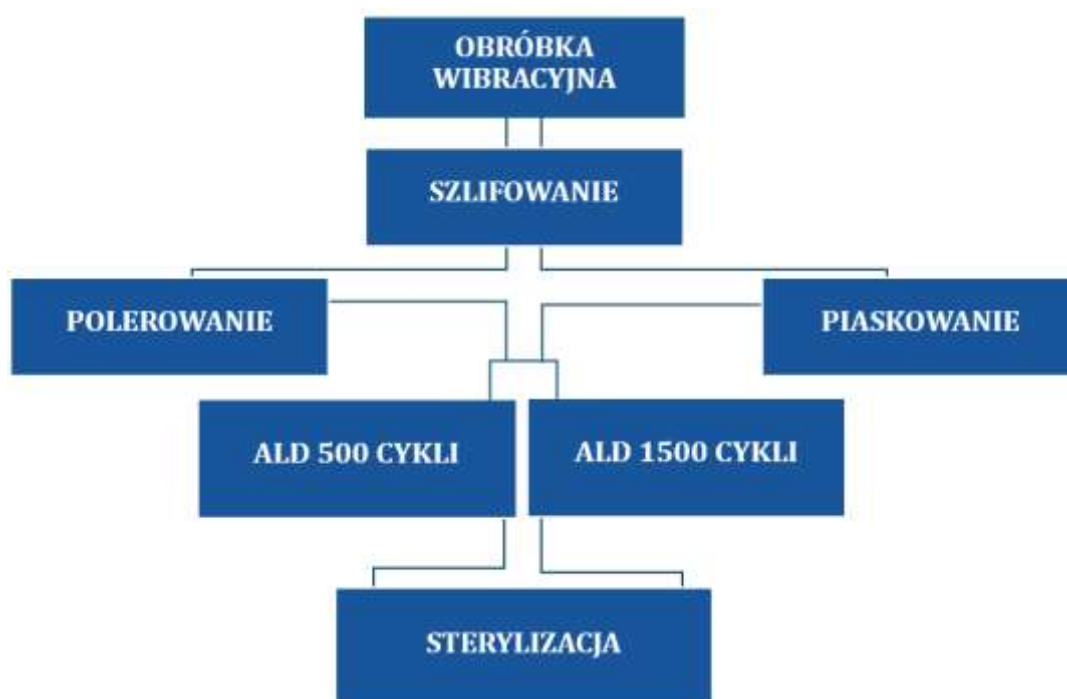
Rysunek 20 Schemat nanoszenia warstwy SnO_2 podczas procesu ALD, $n=500$ oraz $n=1500$ (schemat własny)

Proces prowadzono w temperaturze $T = 230\text{-}240^\circ\text{C}$, a czas trwania poszczególnych cykli oraz parametry płukania zostały zoptymalizowane na podstawie badań wstępnych [121]. Podczas tych badań proces odbywał się w temperaturze $T = 100^\circ\text{C}$, 200°C oraz 250°C , a parametry płukania i pulsów wynosiły odpowiednio 0,5 s oraz po 1 s. Wszystkie te procesy przeprowadzono zarówno dla 500 i 1500 cykli. Jako gaz nośny i płuczący zastosowano wysokiej czystości azot (N_2 wersja: 5.0) przy przepływie $100\text{ cm}^3/\text{min}$. Przeprowadzenie procesu w temperaturach $T = 100^\circ\text{C}$ oraz 200°C nie pozwoliło na uzyskanie powłoki SnO_2 na powierzchni. W przypadku prób zastosowania temperatury wyższej niż 250°C dalsze przeprowadzenie procesu uniemożliwiały ograniczenia technologiczne urządzenia. Proces zrealizowano z uzyskaniem powłoki tlenku cyny (IV) powtórzono 3- krotnie. Wszystkie zastosowane parametry przedstawiono w Tabeli 7.

Tabela 7 Parametry przeprowadzenia procesu ALD

	Etap procesu	Czas [s]
Chlorek cyny(IV) (SnCl_4)	Puls	2
	Płukanie	1
Woda (H_2O)	Puls	2
	Płukanie	1
Temperatura komory	230-240 °C	
Liczba cykli	500 i 1500 cykli	

Ostatnim etapem przygotowania próbek był proces sterylizacji parowej w autoklawie firmy BAISIC w temperaturze $T = 135\text{ }^{\circ}\text{C}$ i pod ciśnieniem $p = 2,1\text{ bar}$ w celu usunięcia drobnoustrojów z powierzchni próbek do dalszych badań. Populacja próbek dla każdego przeprowadzonego badania wynosiła po 5 sztuk dla każdego analizowanego wariantu. Cały schemat procesu od obróbki powierzchniowej do sterylizacji został umieszczony na Rysunek 21.



Rysunek 21 Schemat modyfikacji powierzchni dla obu wariantów

Próbki wykonane zgodnie z powyżej opisaną metodyką podzielono na 6 grup, bez powłoki oraz z powłoką, a w celu ujednolicenia przedstawienia wyników badań zastosowano następujące oznaczenia wszystkich wariantów zgodnie z zaproponowaną metodą obróbki i modyfikacji powierzchni:

- POL- próbki polerowane,
- PIA- próbki piaskowane,
- POL_500- próbki polerowane, 500 cykli nanoszenia powłoki tlenku cyny (IV),
- POL_1500- próbki polerowane, 1500 cykli nanoszenia powłoki tlenku cyny (IV),
- PIA_500- próbki piaskowane, 500 cykli nanoszenia powłoki tlenku cyny (IV),
- PIA_1500- próbki piaskowanie, 1500 cykli nanoszenia powłoki tlenku cyny (IV).

4. Metodyka badań

4.1. Charakterystyka powłoki

4.1.1. Badania składu chemicznego powłoki

Analizę składu chemicznego powłoki przeprowadzono metodą rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronów (XPS). Pomiary przeprowadzono przy użyciu systemu analizy powierzchni Nexsa G2 (Thermo Fisher Scientific) z monochromatycznym źródłem Al K- α i energią fotonów wynoszącą 1486,6 eV. Wszystkie widma zmierzono w próżni 10⁻⁷ Pa i w temperaturze pokojowej T = 25 °C. Analizowany obszar na każdej próbce miał średnicę 300 μ m. Widma przeglądowe zmierzono przy energii przejścia 100,00 eV i kroku elektronowoltowym 1,0 eV, natomiast dla widm o wysokiej rozdzielczości zastosowano energię przejścia 20,00 eV i krok elektronowoltowy 0,1 eV. We wszystkich pomiarach zastosowano kompensację ładunku. Widma zostały ocenione za pomocą oprogramowania Advantage 6 (Thermo Fisher Scientific). Dodatkowo w celu oceny grup funkcyjnych naniesionych powłok zastosowano spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR). Badania wykonano z wykorzystaniem spektrometru FT-IR Nicolet iS50 (ThermoScientific, USA) z detektorem DTGS. w zakresie widma 4000–400 cm⁻¹. Każdą analizę wykonano dla 64 zliczeń z rozdzielczością 4 cm⁻¹; anodyzacja Happ-Genzel. Analizę składu chemicznego przeprowadzono dla wariantów (w obszarze pomiarowym wynoszącym 300 μ m) dla próbek z naniesioną powłoką POL_500, POL 1500 oraz PIA_500, PIA_1500.

4.1.2. Badania mikrostruktury powłoki

Charakterystykę mikrostruktury powłoki przeprowadzono z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM). Mikrostrukturę scharakteryzowano za pomocą techniki TEM w tzw. jasnym polu obserwacji BF TEM, za pomocą skaningowej transmisyjnej mikroskopii elektronowej STEM, za pomocą dyfrakcji elektronów SAED oraz wysokorozdzielczej techniki TEM (HRTEM). Jakościową analizę chemiczną przeprowadzono metodą spektroskopii rentgenowskiej z dyspersją energii EDS. Kompleksową analizę TEM przeprowadzono przy użyciu mikroskopów TECNAI G2 F20 (200 kV) FEG (firmy FEI) oraz THEMIS (200 kV) FEG (firmy ThermoFisher Company). Cienkie folie do obserwacji TEM przygotowano techniką zogniskowanej wiązki jonów galu (FIB) na SCIOS II DualBeam (firmy ThermoFisher Company) wyposażonym

w mikromanipulator EasyLift in situ. Badanie przeprowadzono dla próbek naniesioną powłoką POL_500, POL 1500 oraz PIA_500, PIA_1500.

4.1.3. Pomiary grubości powłoki

W celu określenia funkcji optycznych i grubości warstw SnO₂ próbki zmierzono pod różnymi kątami padania, a zmierzone dane dopasowano do modelu w celu poprawy stabilności dopasowania. Funkcję optyczną podłoża określono w pierwszym etapie przy użyciu próbki referencyjnej. Funkcje optyczne podłoża dopasowano przy użyciu funkcji B-spline zgodnej z modelem Kramesa-Kroniga (KK). Pomiary wykonywano za pomocą elipsometru spektroskopowego Woollam RC2-DI w pełnym zakresie spektralnym od 0,74 eV do 6,42 eV. Pomiary przeprowadzono dla próbek naniesioną powłoką POL_500, POL_1500 oraz PIA_500, PIA_1500.

4.2. Badania własności fizycznych

4.2.1. Badania adhezji powłoki do podłoża

W celu oceny przyczepności powłoki SnO₂ do podłoża polerowanego oraz piaskowanego wykonano test zarysowania z wykorzystaniem platformy otwartej wyposażonej w Micro-Combi-Tester firmy CSM zgodnie z zaleceniami normy PN-EN ISO 20502:2016- 05 [122]. Za pomocą diamentowego stożka Rockwella wykonano rysę o długości $l = 3$ mm, stopniowo zwiększając obciążenie wgłębnika z szybkością ładowania $v_s = 10$ N/min i prędkością stołu $v_t = 10$ mm/min, przy wzrastającej sile obciążającej F_c w zakresie 0,03-30 N. Jako siłę krytyczną wyznaczono minimalną siłę normalną powodującą utratę przyczepności badanej powłoki do podłoża. Do oceny siły krytycznej L_c wykorzystano zmiany emisji akustycznej, siły tarcia i współczynnika tarcia oraz obserwacje mikroskopowe. Dodatkowo w celu jakościowego określenia adhezji powłoki tlenku cyny (IV) do podłoża POL i PIA Oraz jej jednorodności zastosowano skaningową mikroskopię akustyczną (SAM *ang. Scanning Acoustic Microscopy*). Badania przeprowadzano przy użyciu mikroskopu skaningowego KSI Evo II. Do wykonania testów używano głowicy szafirowej o częstotliwości 75 MHz w trybie skanowania powierzchni C-scan.

4.2.2. Badania własności tribologicznych powłoki

Odporność powłoki na zużycie ścierne przeprowadzono metodą ball-on-disc przy użyciu tribometru TRB firmy Anton Paar przykładając obciążenie 5 N. Jako przeciwpróbkę w parze trącej z badanym materiałem zastosowano kulkę wykonaną z tlenku aluminium (III)- Al_2O_3 ($R_a = 0,05$) o średnicy 6 mm, a stolik z badanym materiałem obracał się z prędkością 0,5 cm/s. Pomiary prowadzono zadając długość przebytej przez kulkę drogi równej 27 m. Opór ruchu określono podczas tarcia technicznie suchego – TDF (*ang. Test of Dry Friction*), co opisano wyżej oraz współczynnik tarcia na mokro- PBS, przy użyciu roztworu PBS- Tabela 6. Wszystkie testy tribologiczne powtórzono 3 razy przy ustalonych parametrach umieszczonych w Tabela 8.

Tabela 8 Parametry techniczne i środowiskowe testu

Parametry testu	Jednostka	Para trąca
		Kulka Al_2O_3 – próbka
Obciążenie	N	5
Prędkość	cm/s	2
Liczba cykli	-	1000
Częstotliwość	Hz	15
Wilgotność	%	26
Temperatura	°C	23±1

Następnie po przeprowadzeniu badań tribologicznych w celu oceny morfologii powierzchni, analizy geometrycznej struktury powierzchni otrzymanego śladu tarcia wykorzystano kolejno skaningowy mikroskop elektronowy Tescan VEGA (*SEM, ang. Scanning Electron Microscopy*) oraz profilometr optyczny Leica DCM8 z trybem interferometrycznym (z oprogramowaniem LeicaMap przy powiększeniu 20x. Pojedynczy pomiar obejmował powierzchnię o wymiarach 840 x 630 μm . Jednocześnie oceniono pole powierzchni zużycia oraz głębokość wytarcia używane do jakościowego określenia odporności materiału na zużycie ścierne. Pomiary przeprowadzono dla próbek podłoża w stanie wyjściowym- polerowanych i piaskowanych oraz z naniesioną powłoką POL_500, POL 1500 oraz PIA_500, PIA_1500.

4.2.3. Badania zwilżalności powierzchni

W celu oceny charakteru powierzchni przeprowadzono badania zwilżalności powierzchni. Pomiary kąta zwilżania przeprowadzono metodą siedzącej kropli, natomiast swobodną energię powierzchniową (SEP) wyznaczono metodą Owens-Wendta dla wszystkich wariantów. Pomiary kątów zwilżania wykonano przy użyciu kropli wody destylowanej (θ_w) oraz diiodometanu (θ_d) w temperaturze pokojowej $T = 23 \pm 1$ °C na stanowisku badawczym składającym się z goniometru SURFTENS UNIVERSAL firmy OEG GmbH oraz komputera z oprogramowaniem Surftens 4.5. Na powierzchnię każdej próbki nanoszono po pięć kropli wody destylowanej i diiodometanu, każda o objętości 1 mm³. Pomiar kątów zwilżania rozpoczynano 15 s po ich osadzeniu na próbce. Czas trwania jednego pomiaru wynosił 60 s przy częstotliwości próbkowania 1 Hz. Każda powierzchnia była badana w różnych obszarach w celu uniknięcia efektu niejednorodności powierzchni. Na podstawie przeprowadzonych badań wyznaczono średnie wartości kąta zwilżania θ_{sr} oraz swobodnej energii powierzchniowej γ_s . Przyjęte do obliczeń wartości swobodnej energii powierzchniowych (SEP) oraz ich składowe: polarną i dyspersyjną wynosiły odpowiednio: dla wody destylowanej: $\gamma_{sp} = 51.0$ [mJ/m²] i $\gamma_{sd} = 21.8$ [mJ/m²] oraz dla diiodometanu: $\gamma_{sp} = 6.7$ [mJ/m²] i $\gamma_{sd} = 44.1$ [mJ/m²]. Badania zwilżalności przeprowadzono dla próbek podłoża w stanie wyjściowym- polerowanych i piaskowanych oraz dla próbek z naniesioną powłoką POL_500, POL 1500 oraz PIA_500, PIA_1500.

4.2.4. Badania topografii powierzchni

Badania topografii powierzchni przeprowadzono za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego SEM (*ang. Scanning Electron Microscope*), Tescan VEGA. Badania przeprowadzono w warunkach wysokiej próżni przy napięciu 20 kV, wykorzystując detektor elektronów wtórnych (SE). Obrazy zarejestrowane w zakresie powiększeń 25x-10000x.

Dodatkowo zastosowano mikroskop sił atomowych AFM XE-100 firmy Park Systems. W badaniach zastosowano tryb bezkontaktowy pracy mikroskopu, w którym do obrazowania wykorzystuje się ostrze odsunięte na odległość 1-10 nm od powierzchni. W celu opisu powierzchni łączników określono współczynnik nierówności powierzchni (RMA- *Rough Mean Square*) wyrażany w nanometrach i określany według wzoru:

$$RMS = \sqrt{\frac{1}{n} * \sum_{i=1}^n (Z_i - \bar{Z})^2}$$

gdzie:

n – liczba przykładowych punktów,

Z_i – wysokość każdego punktu dla współrzędnej z,

$\bar{Z}$ – średnia wartość próbki dla współrzędnej z.

Współczynnik RMS stanowi odchylenie standardowe od wartości średniej obliczane z obszaru na podstawie siatki punktów (charakteryzowanych przez wysokość Z_i). Wyznaczono także chropowatość powierzchni łączników R_a . Współczynnik nierówności powierzchni RMS oraz chropowatość powierzchni R_a obliczono w programie XEI zintegrowanym z mikroskopem AFM, który jest narzędziem do edycji uzyskanych obrazów oraz ich obróbki. Ponadto ocenę topografii powierzchni przeprowadzono również z wykorzystaniem profilometru optycznego Leica DCM8 metodą różnicowania konfokalnego. Do badań zastosowano zielone światło i powiększenie 20x. Analizowany obszar wynosił w każdym pomiarze, a uzyskane wyniki analizowano przy użyciu oprogramowania Leica Map Premium. Na tej podstawie wyznaczono parametry R_a i S_a zgodnie z zaleceniami normy ISO 25178-2:2021 [123]. Badania w przypadku oceny topografii powierzchni przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego oraz profilometru optycznego dokonano dla próbek podłoża w stanie wyjściowym-polerowanych i piaskowanych oraz z naniesioną powłoką POL_500, POL 1500 oraz PIA_500, PIA_1500. Badania przy użyciu mikroskopu sił atomowych przeprowadzono dla próbek z naniesioną powłoką POL_500, POL 1500 oraz PIA_500, PIA_1500.

4.3. Badania własności elektrochemicznych

4.3.1. Badania odporności na korozję wżerową

Badanie odporności na korozję wżerową wykonano metodą potencjodynamiczną (polaryzacja potencjodynamiczna), zgodnie z zaleceniami normy PN-EN ISO 10993-15 [124]. Pomiary przeprowadzono za pomocą potencjostatu-galwanostatu AUTOLAB PGSTAT100 (Metrohm Autolab BV, Holandia) w temperaturze $T = 37 \pm 1$ °C. Zastosowano układ trzech elektrod. gdzie elektrodą roboczą była badana próbka, elektrodą odniesienia była elektroda kalomelowa nasycona (SCE), a elektrodą przeciwległą była siatka

platynowa. Badania przeprowadzano w roztworze PBS o składzie umieszczonym w Tabeli 6. Powierzchnia styku próbki z medium korozyjnym została ograniczona do $0,283 \text{ cm}^2$ za pomocą uszczelki typu O-ring o średnicy 6 mm. Wszystkie pomiary korozji przeprowadzono dla trzech równoległych próbek. Próbki stabilizowano przez 1 godzinę w obwodzie otwartym przed testami EIS i PDP, a następnie określono potencjały obwodu otwartego (E_{OCP}/OCP). Z uzyskanych krzywych wyznaczano opór polaryzacyjny R_p oraz gęstość prądu $j(1V)$. Do wyznaczenia oporu polaryzacyjnego zastosowano metodę Sterna. Badania przeprowadzono dla próbek podłoża w stanie wyjściowym- polerowanych i piaskowanych oraz dla próbek z naniesioną powłoką POL_500, POL_1500 oraz PIA_500, PIA_1500.

4.3.2. Badania odporności na korozję szczelinową

W związku ze skomplikowaną geometrią implantów na które dedykowane są badane próbki zarówno polerowane i piaskowane istnieje ryzyko występowania korozji szczelinowej. Z tego względu przeprowadzono badania odporności na korozję szczelinową metodą chronoamperometryczną, zgodnie z zaleceniami normy ASTM F746-04 (2021) [125]. Badanie przeprowadzano w roztworze PBS, o składzie umieszczonym w Tabeli 6. Próbki polaryzowano do wartości potencjału $+800 \text{ mV}$. Jeżeli po 20. sekundach nie stwierdzono gwałtownego przyrostu gęstości prądu, próbki poddawano dalszej polaryzacji przy tej samej wartości przez 900 sekund. Jeżeli w tym czasie gęstość prądu uległa podwyższeniu, wówczas wartość potencjału $E_{np} < E_{ks}$ przyjmowano za odpowiadającą potencjałowi krytycznemu korozji szczelinowej. Badania przeprowadzono dla próbek podłoża w stanie wyjściowym- polerowanych i piaskowanych oraz dla próbek z naniesioną powłoką POL_500, POL_1500 oraz PIA_500, PIA_1500.

4.3.3. Badania z wykorzystaniem elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej

W celu analizy procesów elektrochemicznych zachodzących na granicy metal-elektrolit przeprowadzono badania za pomocą elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (EIS). Pomiary przeprowadzono za pomocą potencjostatu-galwanostatu AUTOLAB PGSTAT100 (Metrohm Autolab BV, Holandia) w temperaturze $T = 37^\circ\text{C}$. Zastosowano układ trzech elektrod. gdzie elektrodą roboczą była badana próbka,

elektrodą odniesienia była elektroda kalomelowa nasycona (SCE), a elektrodą przeciwległą była siatka platynowa. Badania przeprowadzano w roztworze PBS o składzie umieszczonym w Tabeli 6. Badane warianty były umieszczone w objętości elektrolitu 1g/10ml przygotowanego roztworu, zgodnie z zaleceniami normy przedmiotowej ISO 10993 – 15 [124]. Powierzchnia styku próbki z medium korozyjnym została ograniczona do 0,283 cm² za pomocą uszczelki typu O-ring o średnicy 6 mm. Wszystkie pomiary korozji przeprowadzono dla trzech równoległych próbek. Próbki stabilizowano przez 1 godzinę w obwodzie otwartym przed testami EIS i PDP, a następnie określono potencjały obwodu otwartego (E_{OCP}/OCP). Pomiary elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej przeprowadzono przy E_{OCP} w zakresie częstotliwości od 100 kHz do 10 mHz z amplitudą 10 mV i 10 punktami na dekadę. Do dopasowania wyników EIS wykorzystano oprogramowanie ZSimpWin (wersja 3.60). Wartości te pozwalają na uogólnienie informacji o powierzchni poprzez traktowanie badanego interfejsu jako idealnego kondensatora opisanego równaniem:

$$C_{eff} = \frac{\epsilon \epsilon_0 A}{d} \quad (1)$$

gdzie ϵ jest stałą dielektryczną materiału oddzielającego elektrolit od metalowego podłoża, ϵ_0 jest przenikalnością elektryczną wolnej przestrzeni, A jest rzeczywistą powierzchnią interfejsu, a d jest długością separacji. W kolejnym etapie, po 5 minutach stabilizacji obwodu otwartego, przeprowadzono badania polaryzacji potencjodynamicznej (PDP) w zakresie potencjałów od $E_{OCP} - 200$ mV do 1 V względem elektrody odniesienia (SCE). Szybkość skanowania wynosiła 10 mV·min⁻¹. Uzyskane krzywe potencjodynamiczne zostały przeanalizowane za pomocą oprogramowania NOVA 2.1. Na podstawie nachylenia odcinka linii prostej w pobliżu przejścia prądu katodowego do zakresu prądu anodowego (od $E(i=0) - 15$ mV do $E(i=0) + 15$ mV) określono rezystancję polaryzacyjną ($R_p(PDP) = dE/di$). Stosunkowo głęboką polaryzację anodową (do 1 V vs. SCE) wykorzystano do sprawdzenia występowania przebicia powłoki ochronnej w warunkach silnej polaryzacji anodowej oraz do określenia potencjału przebicia. W przypadku braku przebicia wartość odporności na korozję badanych próbek określono jako gęstość prądu przy potencjale 1 V vs. SCE ($j(1V)$). Badania przeprowadzono dla próbek podłoża w stanie wyjściowym- polerowanych i piaskowanych oraz dla próbek z naniesioną powłoką POL_500, POL 1500 oraz PIA_500, PIA_1500.

4.3.4. Badania przenikania jonów metali do roztworu

Z powodu występowania ryzyka przenikania jonów metali z powierzchni badanych próbek przeprowadzono badania przenikania jonów metali do roztworu fizjologicznego PBS o składzie umieszczonym w Tabeli 6 po 3, 6 i 9 tygodniach ekspozycji z wykorzystaniem metody emisji spektrometrii atomowej z plazmą indukcyjnie sprzężoną ICP-OES Spectro Arcos (SPECTRO Analytical Instrument, Kleve, Niemcy). Stosunek próbka: elektrolit wynosił 1:15. Roztwory konserwowano kwasem azotowym (65%, p.p., Mach chemikálie, s.r.o., Czechy). Dla analizowanego materiału określono stężenie Ti, Nb, Zr, Sn. Badania przeprowadzono dla próbek podłoża w stanie wyjściowym- polerowanych i piaskowanych oraz dla próbek z naniesioną powłoką POL_500, POL 1500 oraz PIA_500, PIA_1500.

4.4. Badania własności biologicznych

4.4.1. Badania cytotoksyczności

Badanie cytotoksyczności zostało przeprowadzone metodą bezpośrednią zgodnie z zaleceniami normy ISO 10993-5:2009 [126] na fibroblastach ludzkich dermalnych NHDF (PromoCell C-12302). Jako medium wykorzystano suplementowany PromoCell Fibroblast Growth Medium 2 wzbogacony antybiotykami (SIGMA ALDRICH Antibiotic Antimycotic Solution). W celu zapewnienia wiarygodności statystycznej z każdego rodzaju wykorzystano 3 próbki. Jako materiał odniesienia wykorzystano polistyren (PS). Z nad próbek przed wybarwieniem pobrane zostało medium hodowlane w celu oceny poziomu LDH – dehydrogenazy mleczanowej. LDH jest cytoplazmatycznym enzymem uwalnianym po rozerwaniu błony komórki nekrotycznej lub apoptycznej, dlatego jego aktywność mierzy się w celu wykrycia cytotoksycznego działania materiałów lub czynników środowiskowych. Żywotność komórek została oceniona po 48-godzinnej inkubacji przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej. W barwieniu komórek zastosowano MitoTracker Green i jodek propidyny (PI). MitoTracker barwi tylko aktywne mitochondria, które informują o ilości komórek żywych. Substancja po oświetleniu światłem niebieskim daje zielony sygnał. Natomiast jodek propidyny przenika wewnątrz komórki tylko w przypadku naruszenia ciągłości błony komórkowej, która zostaje przerywana na skutek śmierci komórki lub działania czynnika cytotoksycznego. Po wprowadzeniu do cytoplazmy oznacza kwasy nukleinowe, a po wzbudzeniu zielonym

światłem barwi jądro komórki nekrotycznej na czerwono. Badania prowadzono przy wykorzystaniu skaningowego mikroskopu konfokalnego Carl Zeiss Exciter 5 dla próbek podłoża w stanie wyjściowym- polerowanych i piaskowanych oraz dla próbek z naniesioną powłoką POL_500, POL 1500 oraz PIA_500, PIA_1500.

4.4.2. Badania cytokin prozapalnych

Badanie cytokin prozapalnych przeprowadzono w celu ilościowej analizy reakcji zapalnej. Cytokiny prozapalne odgrywają kluczową rolę w koordynowaniu komórkowej odpowiedzi immunologicznej i w modulowaniu układu odpornościowego. Cytokiny prozapalne ogólnie regulują wzrost, aktywację komórek, różnicowanie i zasiedlanie komórek odpornościowych do miejsc infekcji w celu kontrolowania i eliminowania patogenów wewnątrzkomórkowych. Badanie przeprowadzono z wykorzystaniem testów Invitrogen cytokine ELISA kits firmy Thermo Fisher, zawierających receptory najistotniejszych cytokin prozapalnych. Do badań został wykorzystany nadsącz z hodowli fibroblastów L929, które zostały wyhodowane do pełnej konfluencji. Pomiarów dokonano metodą kolorymetryczną za pomocą spektrofotometru Elisa firmy Tehrmo Fisher. Podstawą kolorymetrycznych metod oznaczania jest zależność między absorbancją, a stężeniem oznaczanego składnika w badanym roztworze. Badania przeprowadzono dla próbek podłoża w stanie wyjściowym- polerowanych i piaskowanych oraz dla próbek z naniesioną powłoką POL_500, POL_1500 oraz PIA_500, PIA_1500.

4.4.3. Badania adhezji bakterii

Badania mikrobiologiczne przeprowadzono z wykorzystaniem bakterii wzorcowych Gram-dodatnich *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) i Gram ujemnych *Escherichia coli* (ATCC 25922). Hodowle przygotowano w pożywce płynnej (TSB, Biotech, Polska), poprzez inkubację bakterii w medium przez czas 18h, w temperaturze 37°C (240CLW, POL-EKO). Na powierzchnię próbek naniesiono bakterie w ilości 100 µl i inkubowano w cieplarni w temperaturze 37°C przez 4h. Następnie odciągnięto medium hodowlane, próbki przepłukano sterylną wodą i przełożono do nowej płytki hodowlanej. Adhezje bakterii do powierzchni, obserwowano przy użyciu skaningowej mikroskopii elektronowej, TESCAN VEGA. w warunkach wysokiej próżni przy napięciu 10 kV, wykorzystując detektor elektronów wtórnych (SE). Obrazy zarejestrowane w zakresie powiększeń 500x-10000x. Próbki przed obserwacją napyłono warstwą srebra o grubości

30 nm. Badania przeprowadzono dla próbek podłoża w stanie wyjściowym- polerowanych i piaskowanych, będącymi próbkami kontrolnymi w każdym badaniu oraz dla próbek z naniesioną powłoką POL_500, POL_1500 oraz PIA_500, PIA_1500.

4.4.4. Badania proliferacji komórek

Badanie proliferacji zostało wykonane na fibroblastach dermalnych Human Dermal Fibroblasts w wersji ze skóry dorosłej (NHDF-Ad). W badaniu oceniono jakościowo morfologię komórek, adhezję i kierunek procesów wydłużania na podstawie wyglądu cytoszkieletu, oraz ilość i rozmieszczenie jąder komórkowych a także ich zdolność do podziału. Proliferacja komórek została oceniona po 24-godzinnej inkubacji przy użyciu mikroskopii konfokalnej. Jako medium komórkowe wykorzystano FGMTM-2 Growth Media firmy Lonza. Ludzkie fibroblasty skórne firmy Lonza mają gwarancję 15 podwojeń populacji przy zastosowaniu FGMTM-2 Growth Media. Hodowlę prowadzono w dedykowanym medium suplementowanym w inkubatorze w $T = 37^{\circ}\text{C}$, 99% wilgotności i 5% CO_2 . Komórki zostały utrwalone formaldehydem, błony komórkowe zostały otwarte za pomocą TritonX-100. Do oceny proliferacji do barwienia jąder komórkowych zastosowano Invitrogen™ DAPI D1306 firmy Thermo Fisher pozwalający na barwienie kontrastowe jądrowe i chromosomowe. DAPI emituje niebieską fluorescencję po związaniu z regionami AT DNA. Do barwienia F-aktyny (aktyny fibrylarnej) zastosowano barwnik Alexa Fluor 488 firmy Thermo Fisher (drugorzędowe przeciwciało królicze IgG) o zielonej fluorescencji. Aktyna jest elementem cytoszkieletu biorącym udział w podziale komórek, utrzymywaniu i zmianach kształtu oraz w ruchach komórki. Aktyna znakowana fluorescencyjnie jest ważnym narzędziem do badania dynamiki strukturalnej cytoszkieletu w żywych i utrwalonych komórkach. Badania przeprowadzono dla próbek podłoża w stanie wyjściowym- polerowanych i piaskowanych oraz dla próbek z naniesioną powłoką POL_500, POL_1500 oraz PIA_500, PIA_1500.

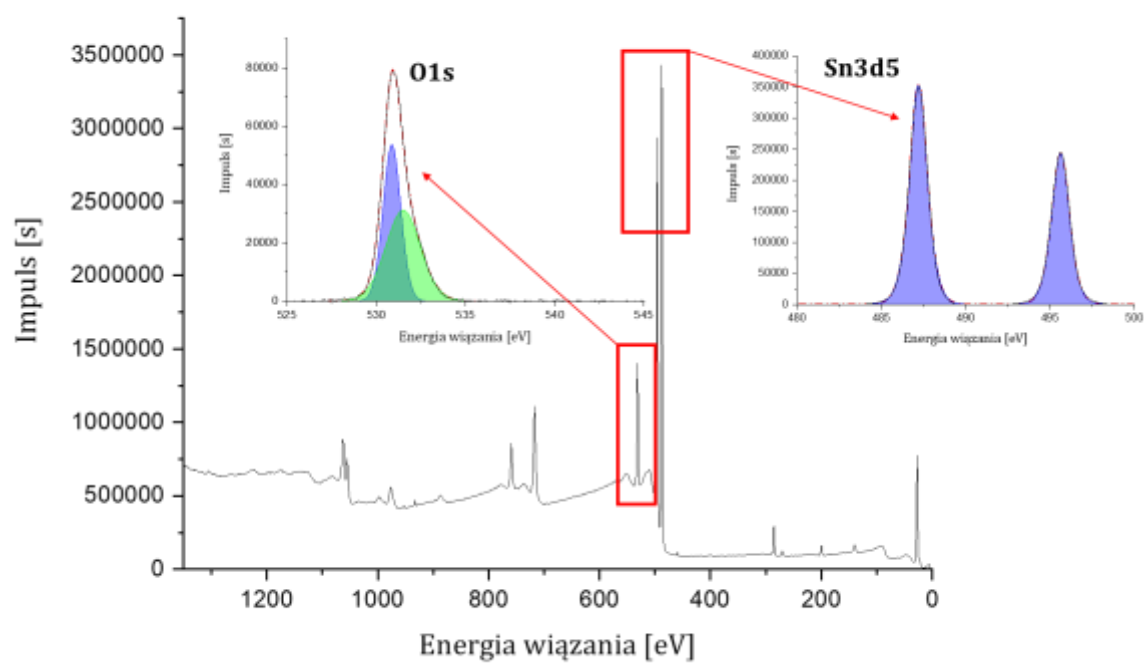
5. Wyniki badań

5.1. Charakterystyka powłoki

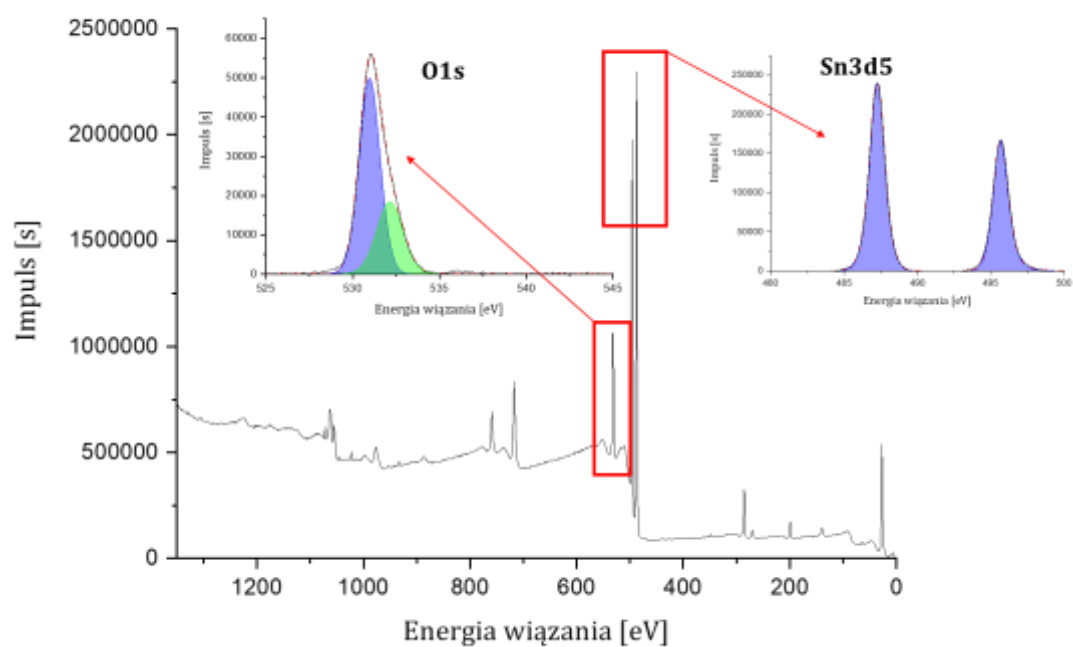
5.1.1. Badania składu chemicznego powłoki

Wszystkie widma pomiarowe warstwy powierzchniowej przedstawiono na Rysunek 22. W przypadku każdego wariantu powłoki wszystkie oczekiwane poziomy energetyczne związane z cyną i tlenem są dobrze widoczne, w przypadku każdego wariantu powłoki. Tylko w przypadku próbki polerowanej, przy użyciu 500 cykli (POL_500) wykryto również poziom energetyczny dla tytanu, co wynika z niewielkiej grubości warstwy pasywnej lub podłoża. W pozostałych próbkach nie wykryto podłoża ani warstwy pasywnej. Wyróżniono dwa obszary energetyczne dotyczące zawartości cyny (Sn 3d5) oraz tlenku O (O 1s). Na podstawie uzyskanych wyników skład powierzchni wynosił dla próbki POL_500: 65,45% Sn; 20,55% O, PIA_500: 59,39% Sn; 21,57%O, POL_1500: 65,06% Sn; 21,3% O, PIA_1500: 58,14% Sn; 22,68% O. Dopasowanie tlenu ujawnia dwa jego rodzaje: ~530,8 eV pochodzi z powłoki tlenku cyny (IV), a drugi ~531 eV pochodzi z węgla organicznego (C-O), co może świadczyć o pozostałościach środka polerującego, używanego podczas przygotowania powierzchni próbek polerowanych. Obszar Sn 3d5 ujawnił jeden składnik z rozszczepieniem na dwa obszary. Odnotowano występowanie głównego składnika, czyli cyny w przypadku wszystkich wariantów, który przypada na ~490 eV.

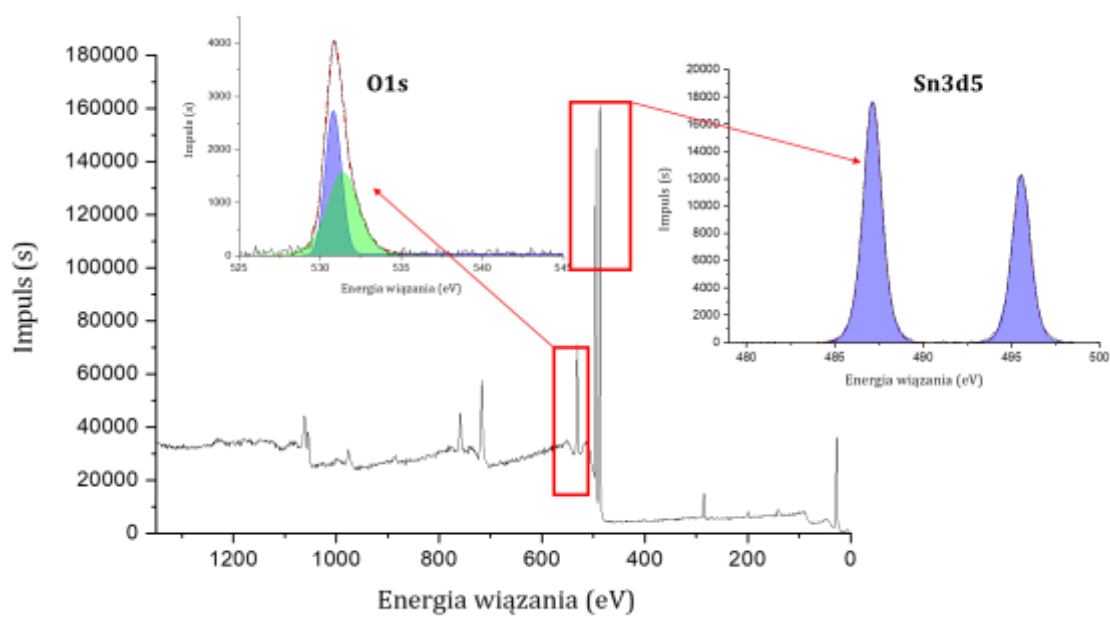
a)



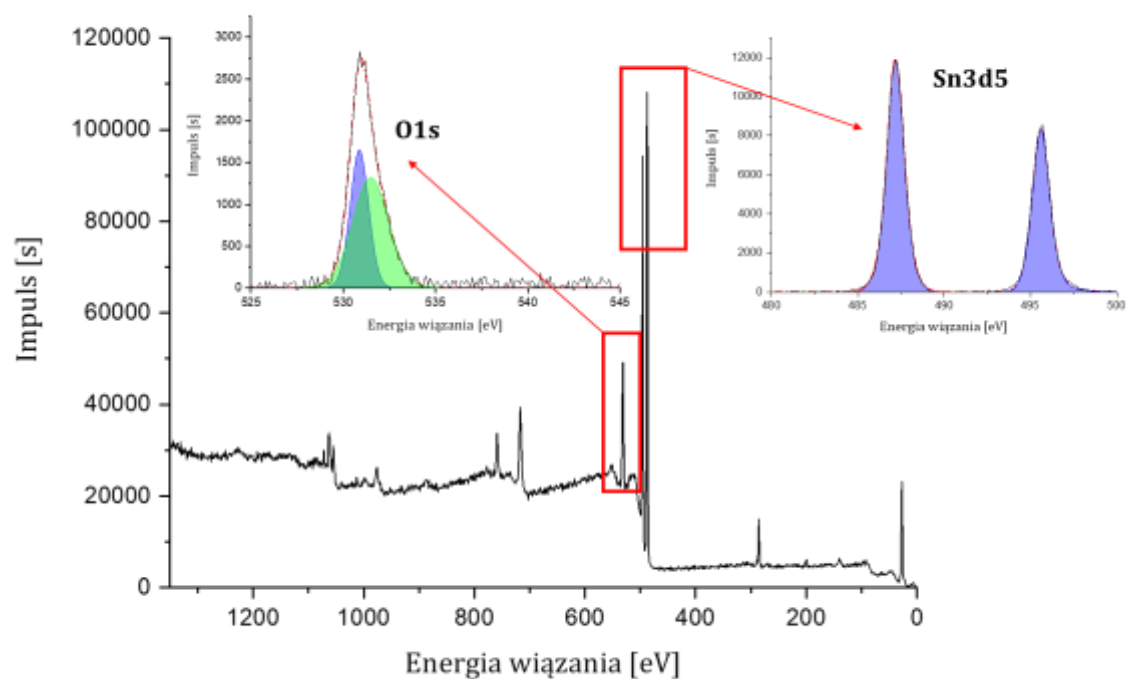
b)



c)

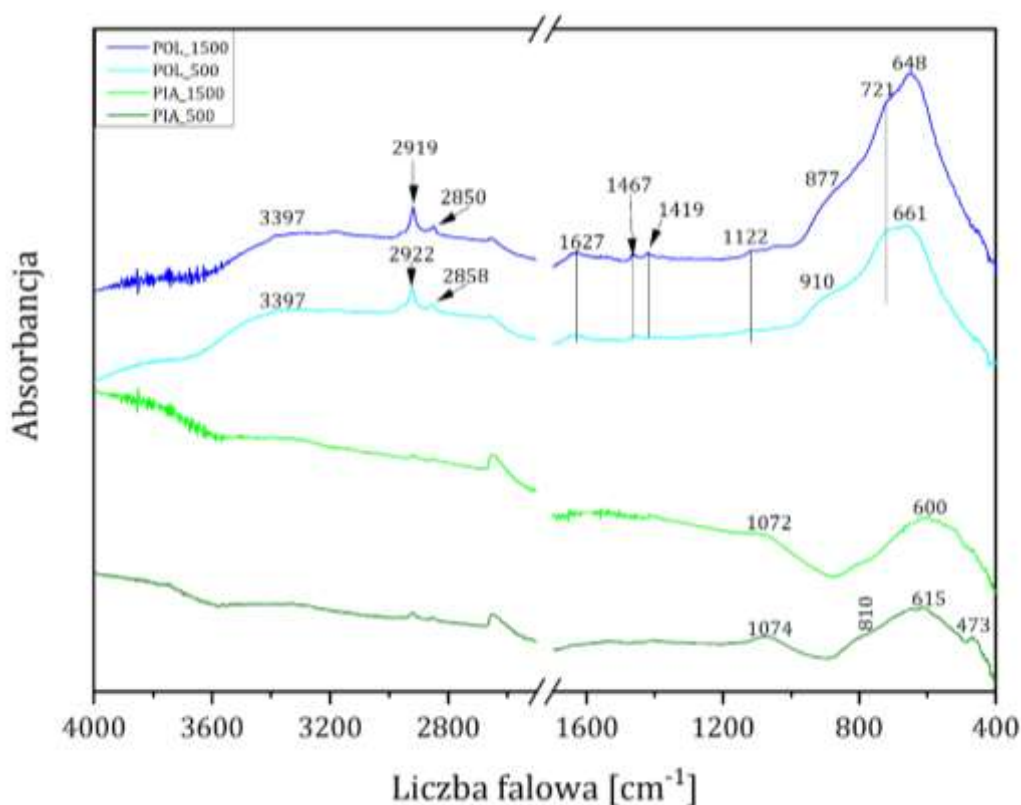


d)



Rysunek 22 Widma przeglądowe z zaznaczonymi głównymi poziomami energetycznymi rdzenia i wyróżnionymi obszarami energetycznymi po rozkładzie O1s oraz Sn3d5 dla próbek: a) POL_500 b) PIA_500 c) POL_1500 d) PIA_1500

Dodatkowo w celu oceny grup funkcyjnych zastosowano spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera. Widma zarejestrowane zarówno dla próbek POL_500, POL_1500 i PIA_500, PIA_1500 przedstawiono na Rysunek 23. Widma FTIR próbek polerowanych wykazują drgania OH przy wartościach 3397 cm^{-1} oraz 1627 cm^{-1} , co jest związane z zaadsorbowaną wodą. Pasma występujące a w przedziale $2850\text{--}2922\text{ cm}^{-1}$ oraz $1467 - 1419\text{ cm}^{-1}$ są związane grupami C-H pochodzącymi z roztworu o składzie: 5-chloro-2-metylo-2H-izotiazol-3-onu i 2 metylo-2H-izotiazol-3-onu (3:1), użytej do przygotowania powierzchni polerowanej próbek. Małe pasmo w graniach 1123 cm^{-1} pochodzi z wiązania Sn-OH- grup hydroksylowych połączonych z atomami cyny w strukturze. Natomiast szerokie pasmo w okolicach $661/648\text{ cm}^{-1}$ wynika z asymetrycznej wibracji O-Sn-O-. Pasma dla próbki POL_500 przy wartościach 910 cm^{-1} oraz 661 cm^{-1} przypisuje się drgania Sn-OH. Kolejne pasmo przy 721 cm^{-1} jest związane z drganiami O-Sn-O, natomiast pasmo przy 877 cm^{-1} wynika z drgań deformacyjnych grup Sn-OH. Zwiększenie grubości powłoki przekłada się na wzrost intensywności sygnałów w widmach FTIR, co ułatwia identyfikację pasm charakterystycznych dla SnO_2 . W przypadku próbek piaskowanych, widma dla próbek PIA_500 oraz PIA_1500 również są bardzo zbliżone. Szerokie pasmo przy 615 cm^{-1} oraz 473 cm^{-1} jest związane z drganiami grup: Sn-O-Sn. Wąskie pasmo przy wartościach $1072/1074\text{ cm}^{-1}$ wynika z obecności grup -OH przyłączonych do tlenu powierzchniowego związku SnO_{2-x} . Pasma to może być związane z drganiami Si-O. Obecność tego pasma wynika z pozostałości kulek szklanych SiO_2 , użytych do przygotowania powierzchni piaskowanej. Drgania te powtarzają się również dla pasma przy 810 cm^{-1} (drgania zginające Si-O) oraz przy 473 cm^{-1} (drgania kołyszące Si-O). Przesunięcie głównego pasma przy 600 cm^{-1} , po użyciu 1500 cykli powinno wynikać z bardziej precyzyjnego wykrycia powłoki SnO_2 . Jest to związane z większą grubością powłoki, w porównaniu do nanoszenia przy użyciu 500 cykli. Potwierdza to wyższą intensywność tego pasma w porównaniu z próbkami PIA_500 oraz brak pasm odpowiadających SiO_2 (810 oraz 473 cm^{-1}).

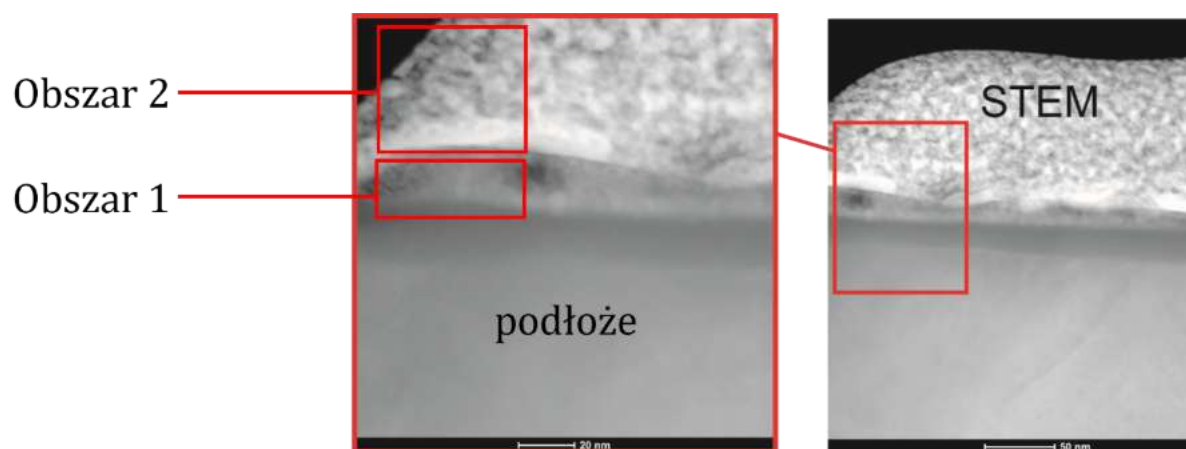


Rysunek 23 Przykładowe widmo FTIR próbek z naniesioną powłoką: POL_1500, POL_500, PIA_1500, PIA_500

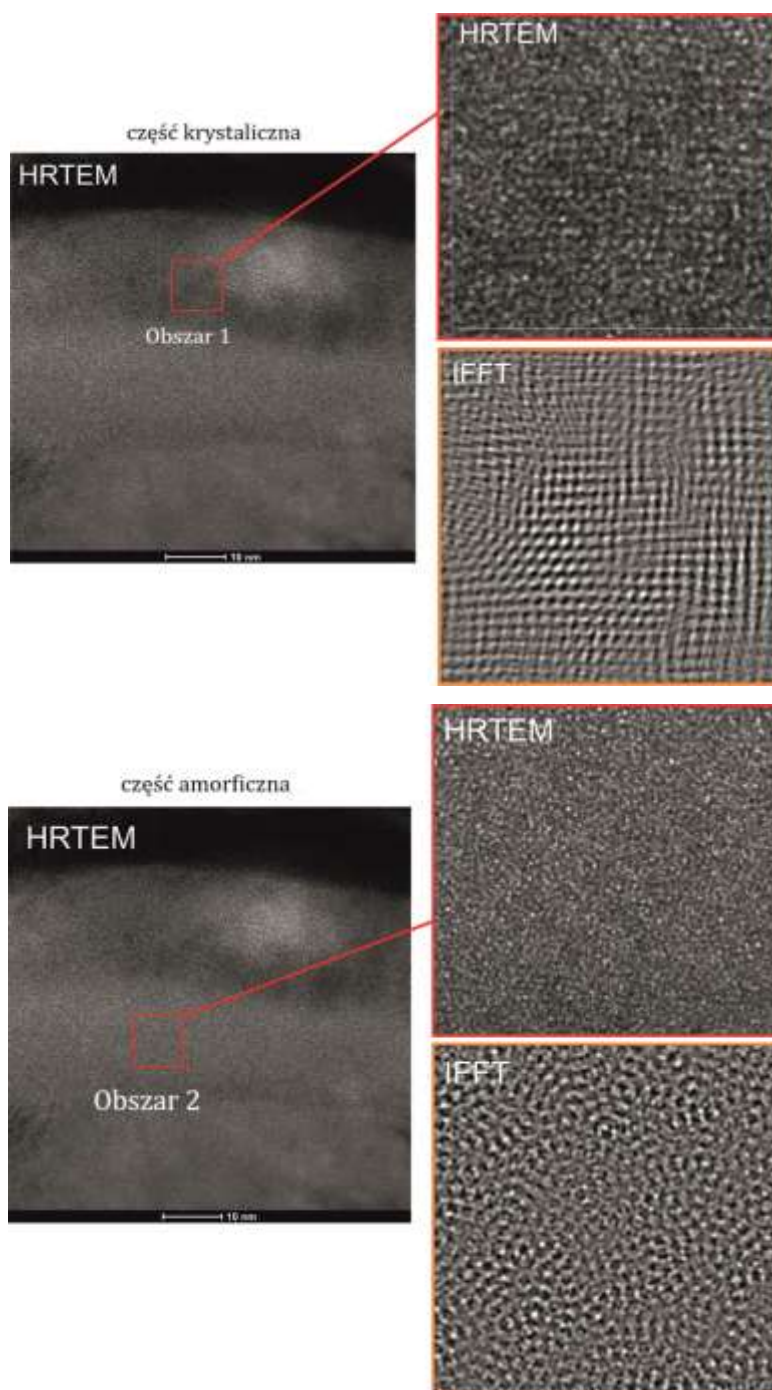
5.1.2. Badania mikrostruktury powłoki

Wyniki przeprowadzonych badań mikrostruktury powłoki SnO₂ naniesionej na podłoże polerowane i piaskowane przedstawiono na Rysunkach 23-26. Obrazy dla powłoki próbki polerowanej (POL_1500) i piaskowanej (PIA_1500) zostały uzyskane na przekroju poprzecznym w polu jasnym (TEM BF), przy wykorzystaniu kontrastu dyfrakcyjnego. Dla próbki polerowanej zaobserwowano wyraźny podział na dwa obszary w powłoce- Rysunek 24. Bezpośrednio pierwszy od podłoża- **Obszar 1**, charakteryzował się ułożeniem warstw atomowych charakterystycznych dla nakładania techniką ALD, mając charakter amorficzny. Następnie zaobserwowano obszar przejściowy i **Obszar 2**, gdzie nie wyróżniono już ułożenia warstw atomowych, a ta część powłoki miała charakter nanokrystaliczny. Widoczna linia pomiędzy obszarami to interfejsa, pomiędzy powłoką a podłożem powstała na styku dwóch materiałów. Granica pomiędzy obszarami jest prosta, ze względu na sposób przygotowania powierzchni. Podział powłoki na część amorficzną oraz krystaliczną potwierdzony został za pomocą obrazów

wysokorozdzielczych (HRTEM)- Rysunek 25. Obraz rzeczywisty został również przefiltrowany poprzez nałożenie masek na refleksy na transformacie Fouriera (IFFT) .



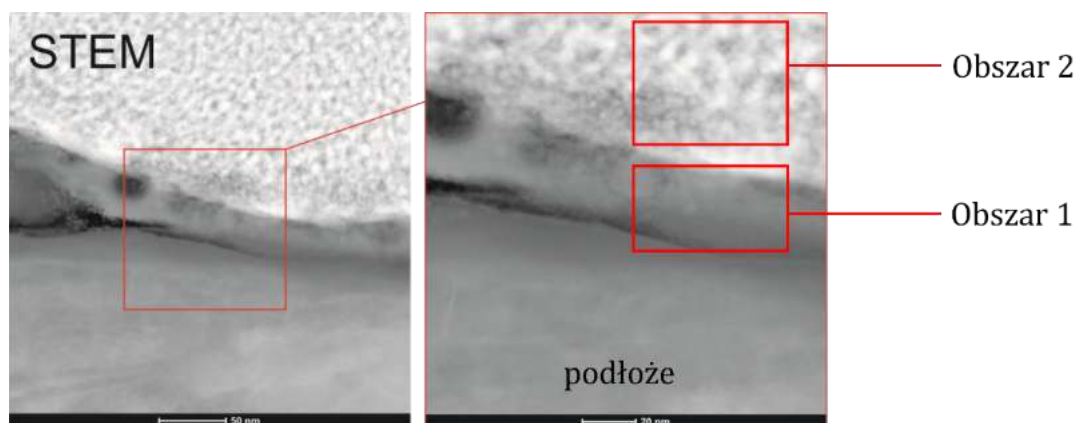
Rysunek 24 Analiza mikrostrukturalna na granicy podłoże – powłoka SnO₂ dla próbki POL_1500, STEM



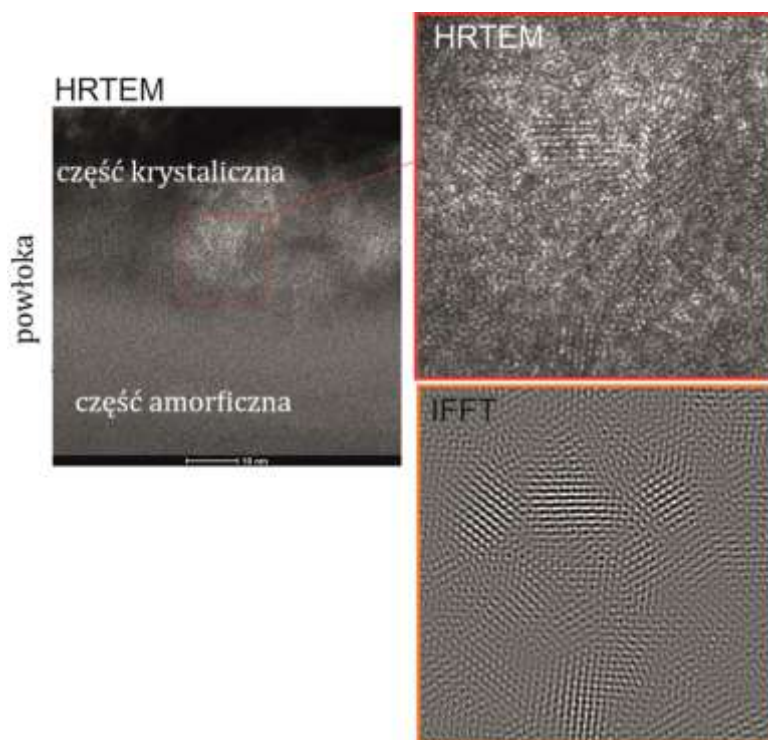
Rysunek 25 Analiza mikrostrukturalna na granicy podłoże– powłoka SnO₂ dla próbki POL_1500, HRTEM, IFFT

W przypadku próbki piaskowanej (PIA_1500) wyróżniono również dwa obszary w powłoce (Rysunek 26). Bezpośrednio pierwszy od podłoża **Obszar 1** mający charakter amorficzny oraz **Obszar 2** o charakterze nanokrystalicznym. Nierówna granica powłoki z podłożem jest spowodowana procesem przygotowania podłoża przed nakładaniem powłoki – proces piaskowania. Podział powłoki na część amorficzną oraz krystaliczną

potwierdzony został również, jak w przypadku przykładowej próbki POL_1500 za pomocą obrazów wysokorozdzielczych (HRTEM)- Rysunek 27. Obraz rzeczywisty został również przefiltrowany poprzez nałożenie masek na refleksy na transformacie Fouriera (IFFT) .

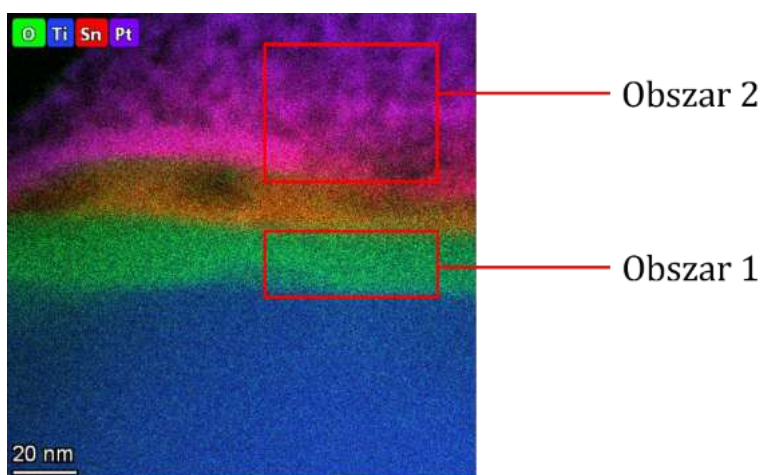


Rysunek 26 Analiza mikrostrukturalna na granicy podłoże– powłoka SnO_2 dla próbki PIA_1500, STEM

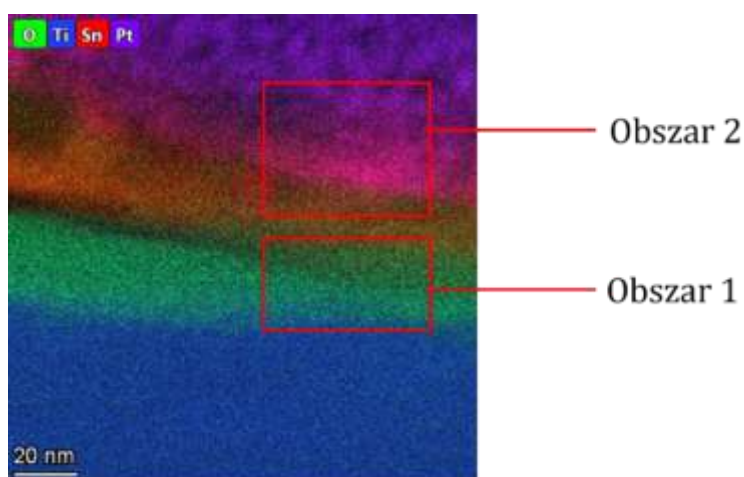


Rysunek 27 Analiza mikrostrukturalna na granicy podłoże– powłoka SnO_2 dla próbki PIA_1500, HRTEM

Ponadto przeprowadzono również jakościową analizę składu chemicznego EDS pomiędzy podłożem a powłoką wzdłuż linii prostopadłe do granicy podłoże/powłoka- (Rysunek 28, Rysunek 29) . Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że powłoka SnO₂ naniesiona metodą ALD niezależnie od sposobu przygotowania podłoża i liczby cykli procesu nanoszenia skutecznie eliminuje z warstwy wierzchniej pierwiastki stopowe, co może spowodować zwiększenie biogodności biomateriału



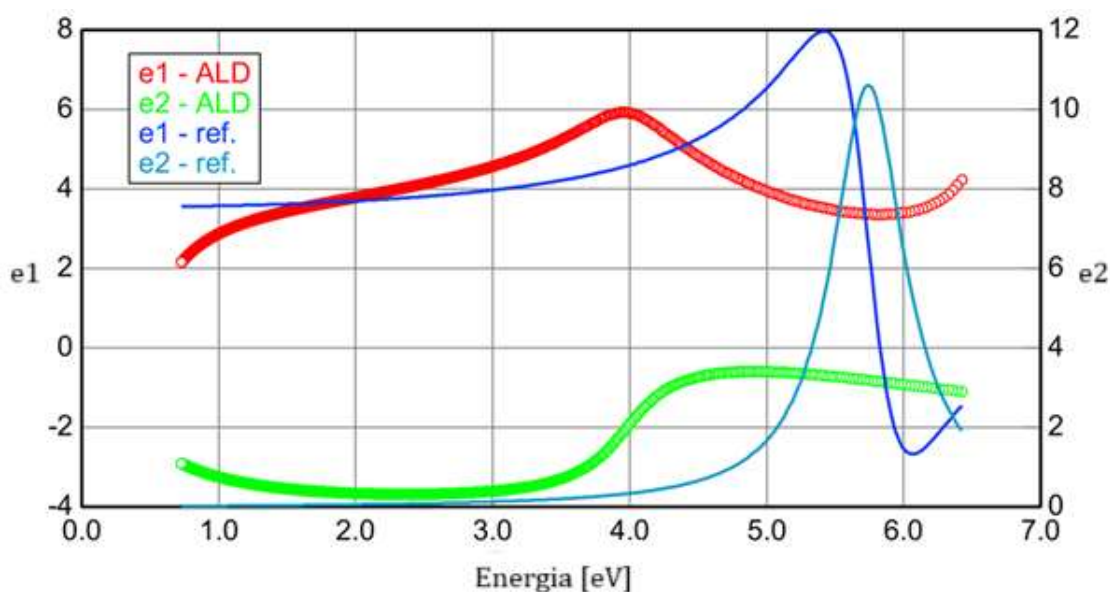
Rysunek 28 Mapa intensywności pierwiastków próbki POL_1500, STEM+EDS: obszar 1- tlen, obszar 2- cyna



Rysunek 29 Mapa intensywności pierwiastków próbki PIA_1500, STEM+EDS: obszar 1 – tlen, obszar 2 - cyna

5.1.3. Pomiary grubości powłoki

W pierwszym etapie opracowano model podłoża, który pozwolił na określenie i wyznaczenie parametrów funkcji podłoża za pomocą funkcji B-spline zgodnej z KK. Chropowatość powierzchni została zasymulowana przy użyciu BEMA o grubości około 10 nm. W kolejnym etapie określony model podłoża i wartość parametru chropowatości pozwoliły na opracowanie modelu powłoki SnO_2 . Model optyczny powłoki oparto na funkcji modelu Tanguy'ego i modelu swobodnych elektronów Drude'a. Na Rysunek 30 przedstawiono porównanie uzyskanej funkcji optycznej opracowanych cienkich powłok.

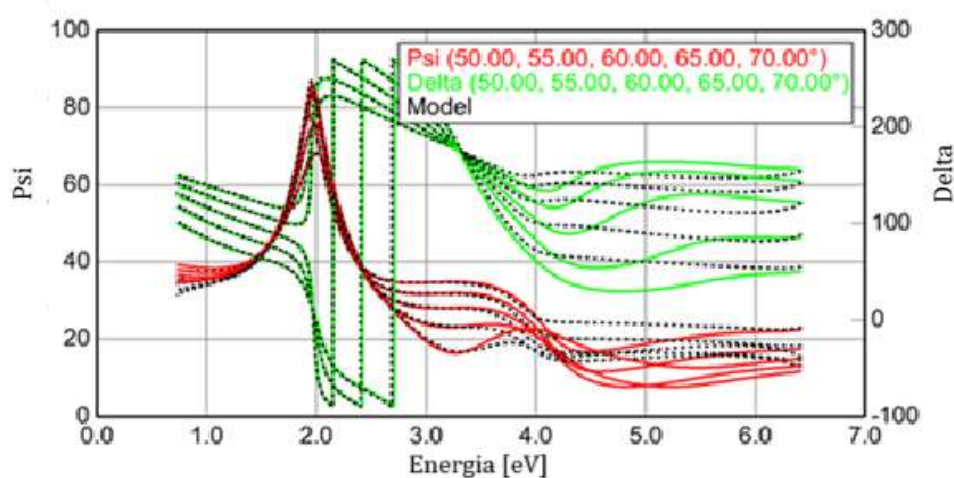


Rysunek 30 Dopasowanie funkcji optycznych z wartościami referencyjnymi (oprogramowania CompleteEASE SW), gdzie: e1-ALD-część rzeczywista absorpcji powłoki SnO_2 uzyskana podczas badania, e2-ALD- część urojona absorpcji powłoki SnO_2 uzyskana podczas badania, e1-ref.-dane referencyjne powłoki SnO_2 z bazy CompleteEASE, e2-ref.-dane referencyjne powłoki SnO_2 z bazy CompleteEASE

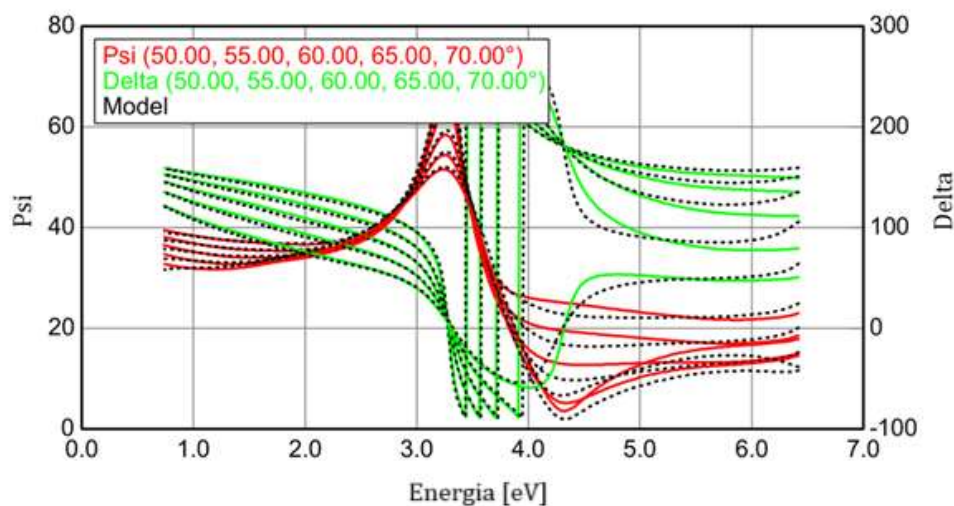
Uzyskana w ten sposób funkcja optyczna została porównana z funkcją optyczną czystego związku tlenku cyny (IV) dostępną w bazie danych CompleteEASE. Dopasowanie modelu zostało uzyskane poprzez mierzone na powierzchni próbki kąty psi oraz delta pod kątem padania 55, 60, 65 i 70 stopni. Pozwoliło to na uzyskanie modelu optycznego używanych podczas modyfikacji powłok SnO_2 , w oparciu o funkcję modelu Tanguy'ego i modelu swobodnych elektronów Drude'a. Zaobserwowano różnice w postaci przerwy optycznej opracowanej powłoki SnO_2 , która jest o około 1 eV niższa niż w przypadku funkcji czystego SnO_2 z baz danych. Opracowane powłoki SnO_2 wykazują również udział

w obszarze niskiej energii fotonów, przy pozostałym udziale swobodnych elektronów. Pozwoliło to na dopasowanie grubości cienkich powłok, które wynoszą odpowiednio **37 nm dla 500 cykli**, zarówno w przypadku próbki POL_500 oraz PIA_500 (Rysunek 31a) i **94 nm dla 1500 cykli**, dla próbek POL_1500 oraz PIA_1500 (Rysunek 31b). Analiza wykazała, że potrojenie liczby cykli w trakcie osadzania powłoki powoduje podwojenie uzyskanej grubości. Prawdopodobnie jest to związane z nieliniowym, początkowym wzrostem powłok SnO₂ na początku procesu, przy pierwszych kilkudziesięciu cyklach.

a)



b)



Rysunek 31 Przykładowe modele elipsometryczne powłok SnO₂ dla: a) POL_500 b) PIA_500

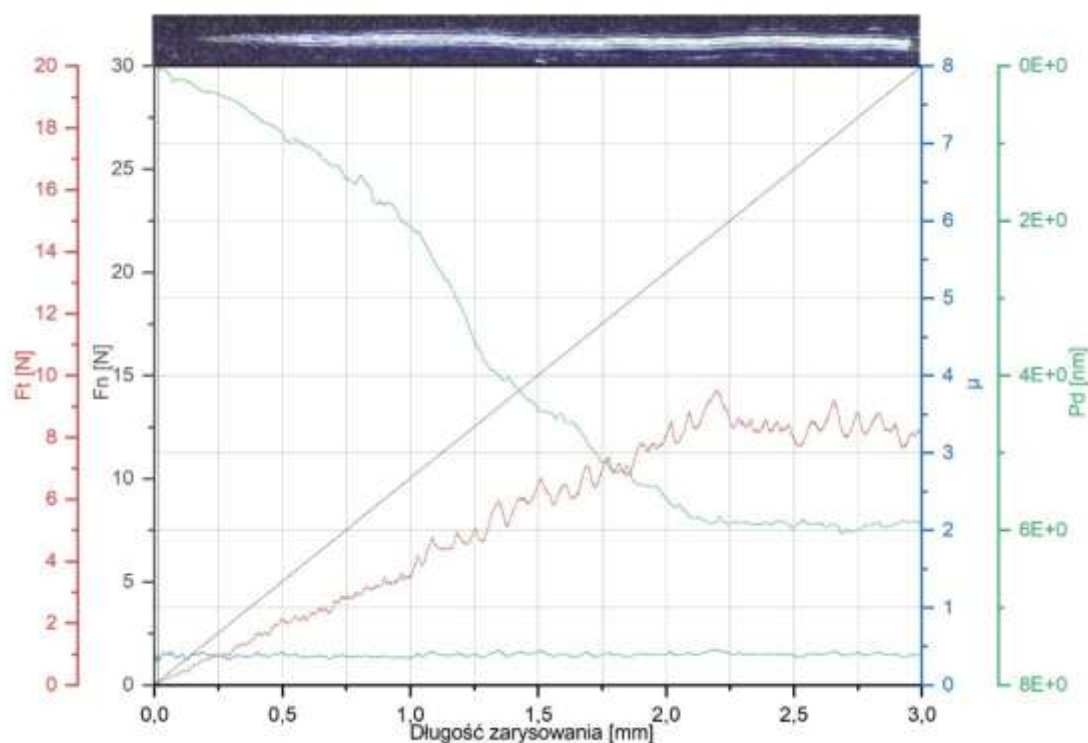
5.2. Badania własności fizycznych

5.2.1. Badania adhezji powłoki do podłoża

Wyniki przeprowadzonych badań adhezji powłoki do podłoża przedstawiono w Tabeli 9 oraz Rysunek 32. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono zróżnicowane wartości siły krytycznej będącej miarą adhezji. Udowodniono, że największą adhezją charakteryzowały się powłoki SnO₂ naniesione na powierzchnie polerowane. Ponadto stwierdzono nieznaczne różnice w wartościach siły krytycznej w zależności od zastosowanej ilości cykli procesu nanoszenia. Energia wiązania była zbyt niska, aby wywołać charakterystyczne pęknięcia i oderwanie warstwy. Na podstawie oceny makroskopowej rysy stwierdzono ciągłą perforację powłoki.

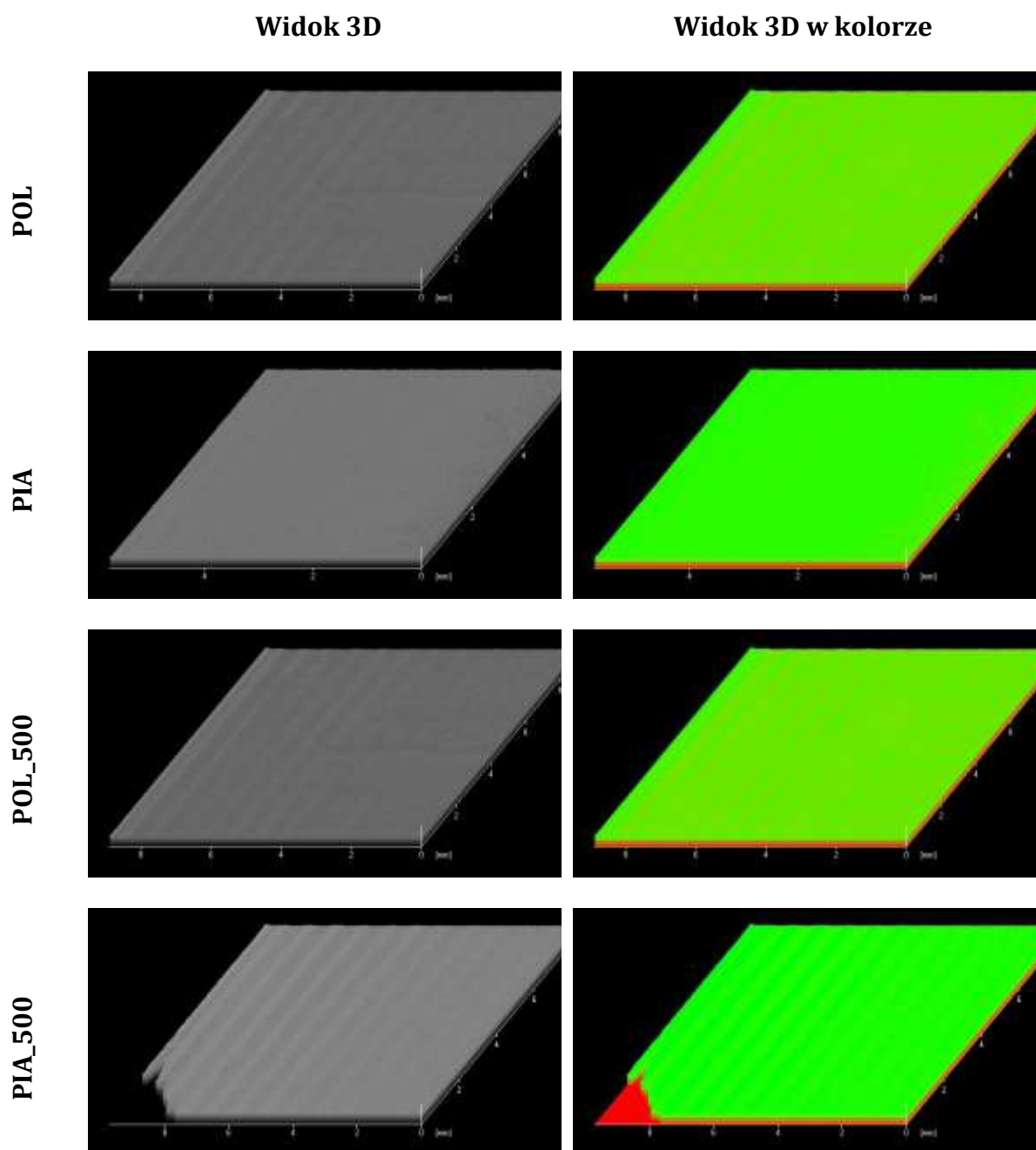
Tabela 9 Wartości siły krytycznej L_c , powodującej całkowite uszkodzenie powłoki

	POL_500	PIA_500	POL_1500	PIA_1500
L_c [N]	6,67±0,28	3,77±0,79	7,14±0,63	5,04±0,45

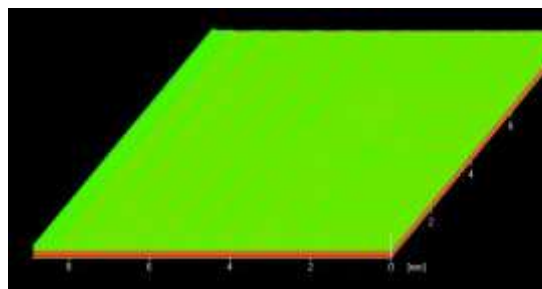
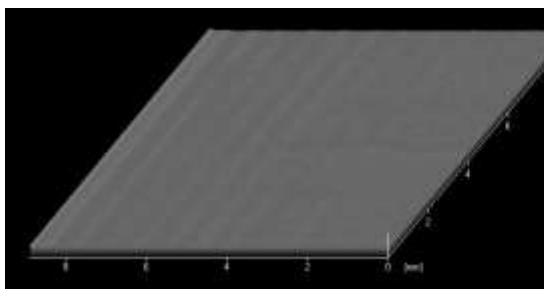


Rysunek 32 Przykładowy wykres i zarysowanie dla PIA_1500

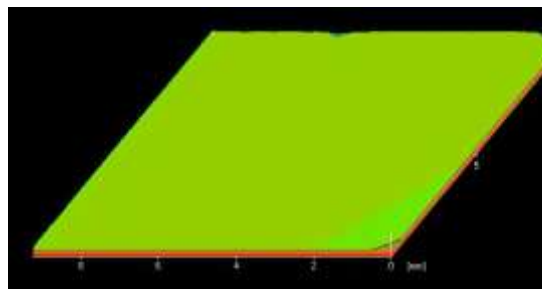
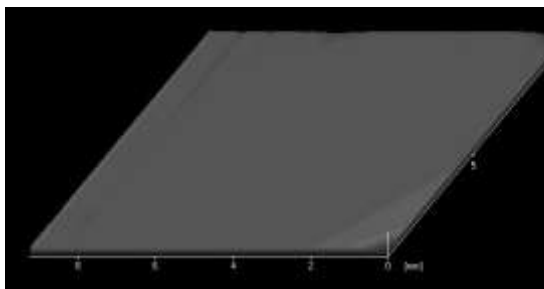
Przeprowadzone obserwacje powierzchni polerowanej oraz piaskowanej z wykorzystaniem SAM (Rysunek 33), nie ujawniły żadnych miejscowych defektów powłoki ani jej deliminacji. Zaobserwowano jedynie nierówności powierzchni dla próbek piaskowanych oznaczone na obrazach kolorem czerwonym.



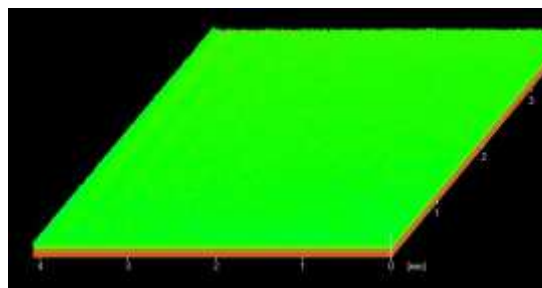
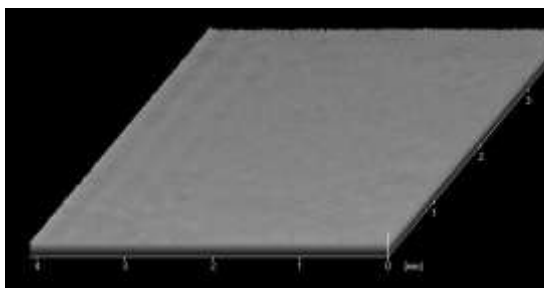
PIA_500



POL_1500



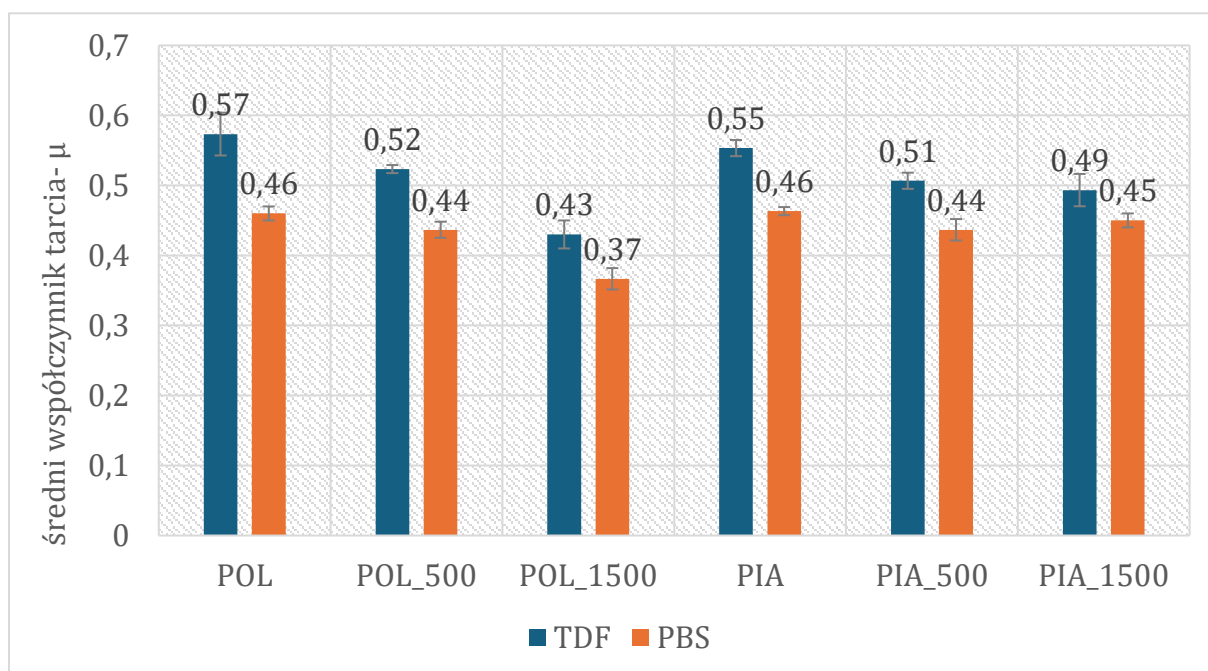
PIA_1500



Rysunek 33 Obrazy akustyczne: kolor czerwony- podłoże, kolor zielony- powłoka, SAM

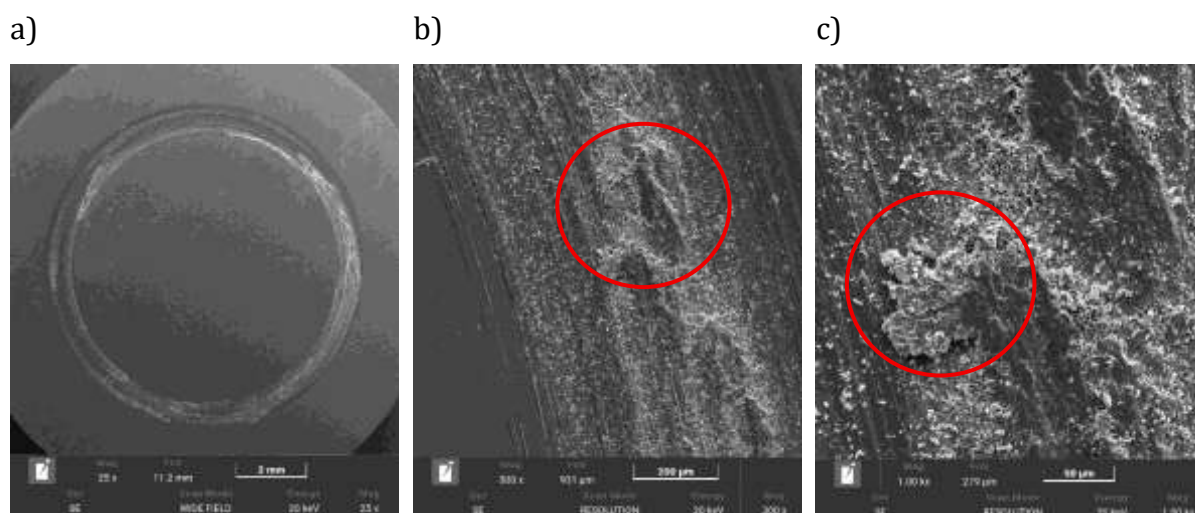
5.2.2. Badania własności tribologicznych powłoki

Analizę wyników testów tribologicznych przedstawiono na Rysunek 34. Najwyższą wartość średniego współczynnika tarcia suchego (TDF) zaobserwowano dla próbki piaskowanej, bez modyfikacji powierzchni. Zaobserwowano spadek tej wartości, wraz ze zwiększającą się liczbą cykli procesu ALD, zarówno w przypadku próbek polerowanych (POL_500 oraz POL_1500), jak i piaskowanych (PIA_500 oraz PIA1500). Najwyższą wartość średniego współczynnika tarcia na mokro (PBS) zaobserwowano dla próbki polerowanej i piaskowanej bez powłok (POL i PIA). Odnotowano spadek tej wartości po naniesieniu powłoki dla próbek polerowanych (POL_500, POL_1500) i piaskowanych (PIA_500, PIA_1500). W przypadku wszystkich wariantów odnotowano niższe średnie wartości współczynnika tarcia w testach z użyciem roztworu PBS.

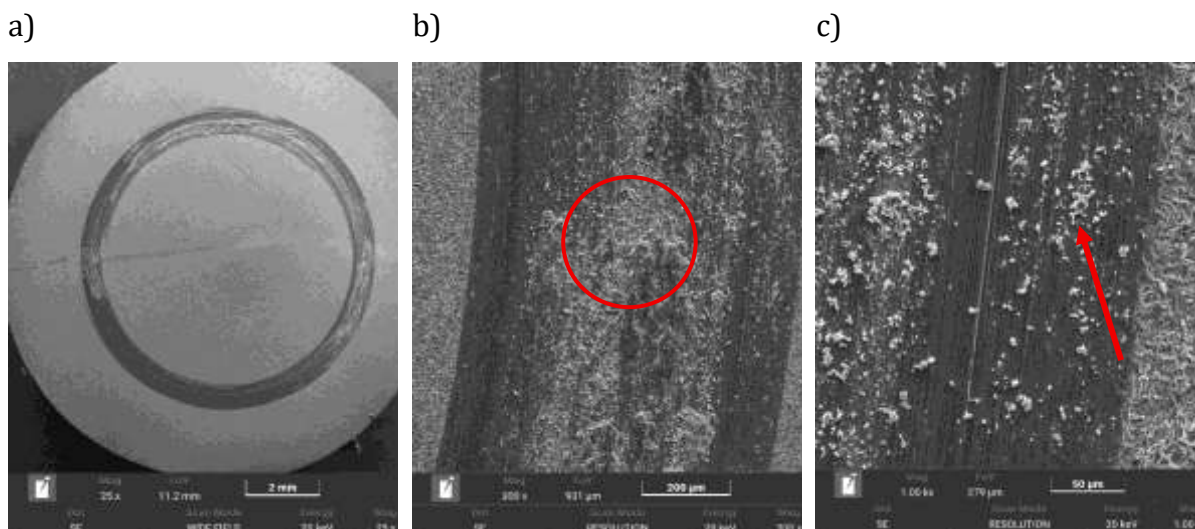


Rysunek 34 Średnie współczynniki tarcia podczas: tarcia technicznie suchego (TDF) oraz tarcia na mokro (PBS)

Analiza powierzchni śladu zużycia wskazuje, że dla wszystkich badanych wariantów dominującym mechanizmem zużycia jest zużycie ściernie. Wynika to z przygotowania powierzchni. Zarysowania i bruzdy widoczne na zdjęciach SEM powstały w wyniku ruchu luźnych produktów zużycia w obszarze tarcia. W śladach zużycia zaobserwowano również zbierający się nadmiar powłoki po wytarciu (Rysunek 35bc, Rysunek 36bc).

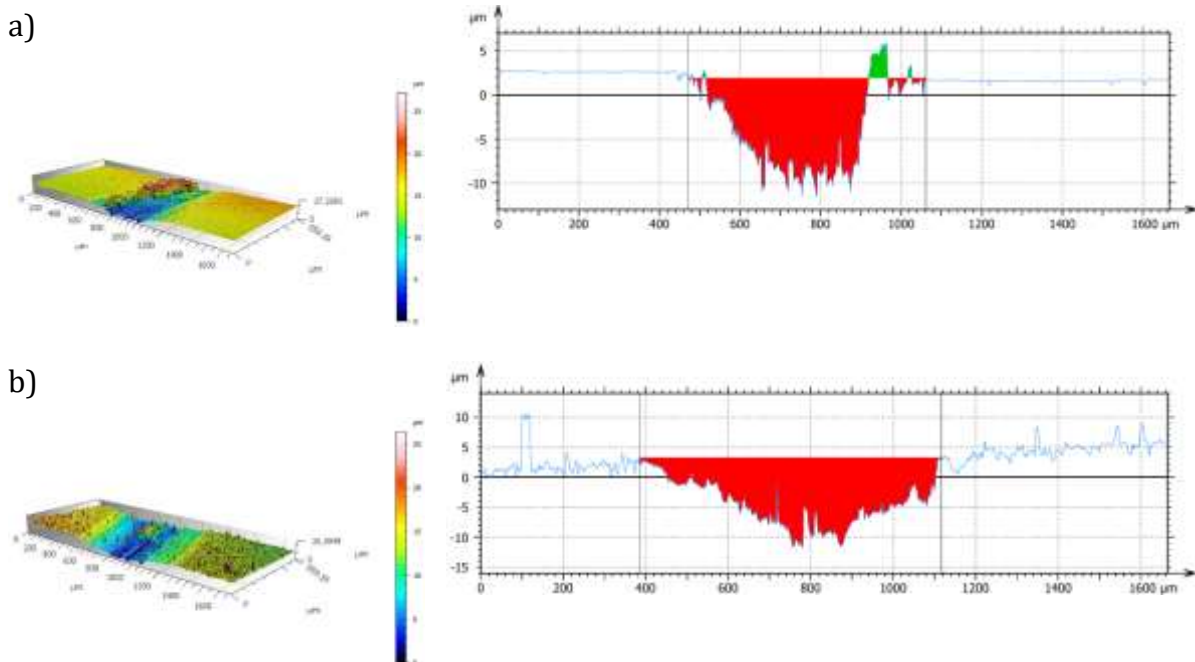


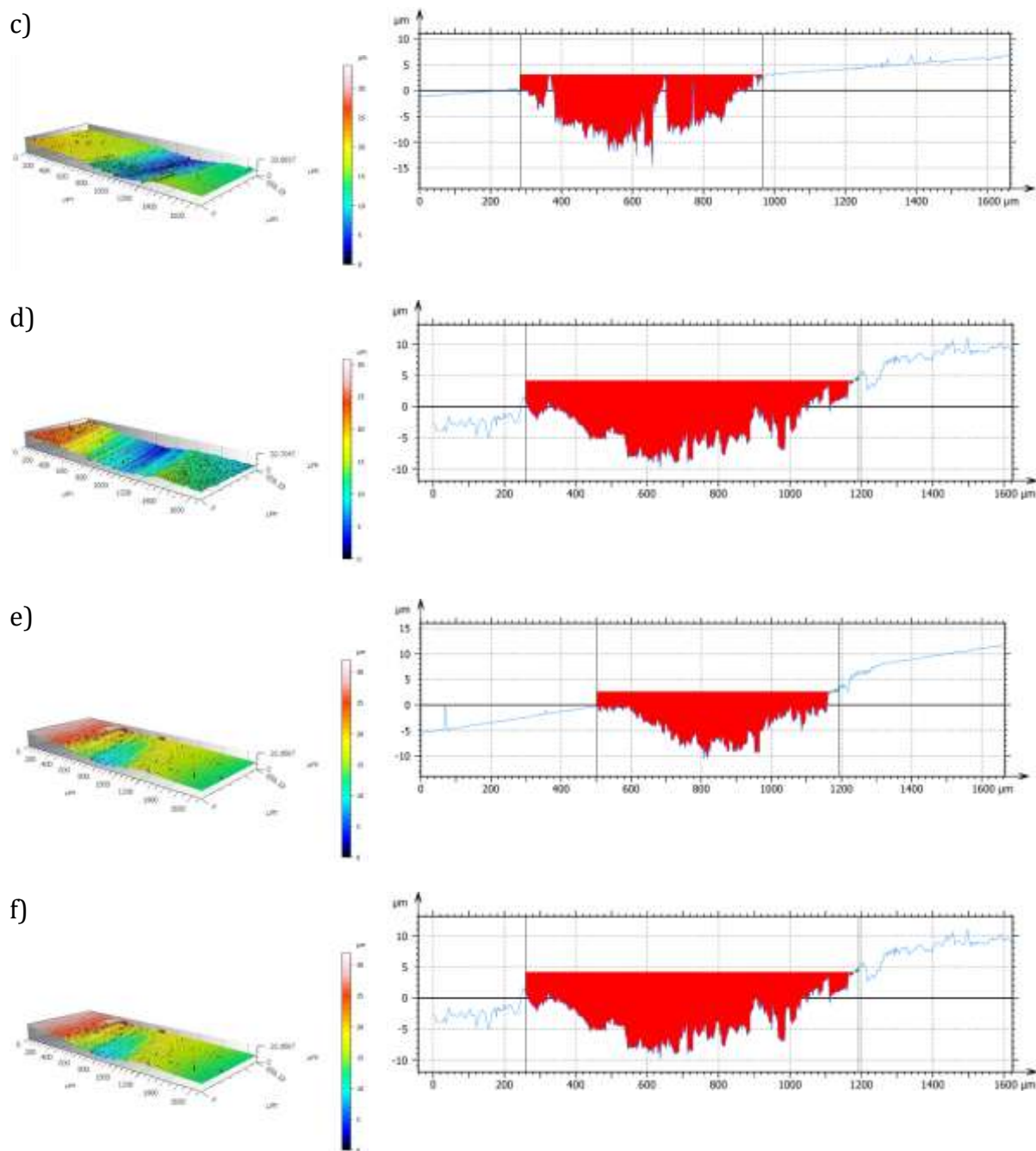
Rysunek 35 Morfologia śladów zużycia po tarcii technicznie suchym TDF dla próbki POL_1500, SEM, pow.: a) 25x, b) 300 x c) 1000x



Rysunek 36 Morfologia śladów zużycia po tarcii technicznie suchym TDF dla próbki PIA_1500, SEM, pow.: a) 25x, b) 300 x c) 1000x

Po przeprowadzeniu obserwacji morfologii śladów zużycia (Rysunek 37) przeprowadzono analizę struktury geometrycznej powierzchni. Za miarę zużycia próbki przyjęto głębokość i powierzchnię tarcia określoną na podstawie wygenerowanego profilu zużytej powierzchni (powstałego śladu wytarcia po badaniach tribologicznych).





Rysunek 37 Obrazy izometryczne śladów wytarcia i profile wytarcia na przekroju poprzecznym podczas tarcia suchego TDF: a) POL, b)PIA, c) POL_500 d) PIA_500 e) POL_1500 f) PIA_1500

5.2.3. Badania zwilżalności powierzchni

Wyniki pomiarów zwilżalności powierzchni i energii powierzchniowej (SEP) oraz przykładowe krople naniesione na powierzchnię wariantów przed i po naniesieniu powłoki, przedstawiono na Rysunek 38 oraz Tabela 10. Powierzchnia próbek polerowanych zarówno przed, jak i po naniesieniu powłoki, niezależnie od wariantu wykazuje charakter hydrofilowy, natomiast kąt zwilżania wodą ulega zwiększeniu wraz z liczbą nanoszonych cykli. W przypadku próbek piaskowanych zarówno próbka PIA oraz pozostałe dwa warianty próbek piaskowanych, po nanoszeniu powłoki (PIA_500, PIA_1500) wykazują również charakter hydrofilowy. Analizując wartość kąta zwilżania diiodometanem odnotowano wzrost kąta zwilżania, wraz ze wzrastającą liczbą cykli podczas modyfikacji powierzchni dla próbek polerowanych, porównując wartości próbek POL, POL_500 a POL_1500. Podobną zależność zaobserwowano dla próbek piaskowanych, gdzie kąt zwilżania podczas pomiaru zwilżalności diiodometanem również wzrastał wraz z ilością nanoszonych warstw, porównując wartości dla próbek PIA, PIA_500 oraz PIA_1500. Zastosowanie modyfikacji powierzchni w przypadku próbek polerowanych oraz piaskowanych spowodowało zmniejszenie wartości energii powierzchniowej wraz ze zwiększeniem ilości cykli.



Rysunek 38 Przykładowe krople na powierzchni próbek a) POL b) POL_500 c) POL_1500

Tabela 10 Średnie wartości kąta zwilżania wodą, diiodometanem, energii powierzchniowej oraz składowych polarnych

Wariant	$\theta_{\text{śr. H}_2\text{O}}$ [°]	$\theta_{\text{śr. I}_2\text{CH}_2}$ [°]	Składowa dyspersyjna γ^d [mN/m]	Składowa polarna γ^p [mN/m]	SEP [mN/m]
POL	41 ±2,7	47 ±3,0	35,77	25,12	60,9
PIA	76 ±1,1	80 ±0,8	17,41	12,97	30,4
POL_500	62 ±3,2	55 ±0,9	25,24	10,44	35,7
PIA_500	75 ±0,5	66 ±1,8	20,74	12,74	32,5
POL_1500	87 ±3,8	56 ±0,5	30,89	3,42	34,3
PIA_1500	74 ±0,8	76 ±4,4	31,52	14,64	46,2

5.2.4. Badania topografii powierzchni

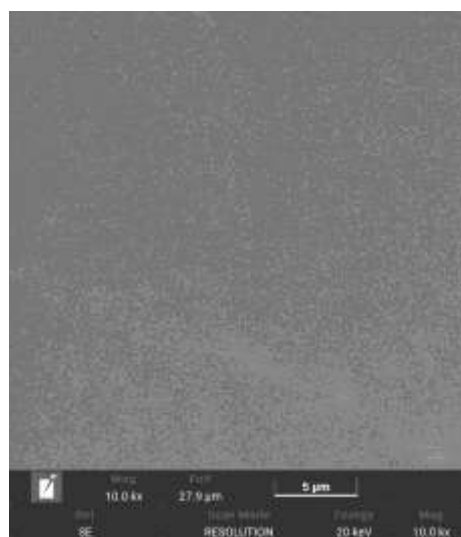
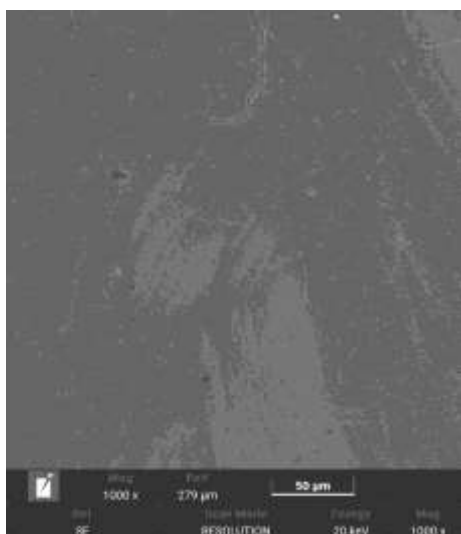
Wyniki badań topografii powierzchni przeprowadzonej z wykorzystaniem mikroskopii skaningowej, mikroskopii sił atomowych oraz profilometrii optycznej pozwoliły na określenie zróżnicowanej morfologii powierzchni w zależności od sposobu jej przygotowania. Stwierdzono również różnice w morfologii w zależności od ilości cykli procesu ALD. Powierzchnia próbki POL jest jednorodna i nie posiada śladów mechanicznych lub kierunkowych struktur. Wytworzona na powierzchni POL_500 powłoka jest ciągła i odwzorowała topografię powierzchni, jednak zaobserwowano śladowe struktury przypominające smugi lub rysy, które mogą być związane z procesem obróbki powierzchni. Widoczne ciemniejsze i jaśniejsze obszary wskazują na większe zróżnicowanie topografii niż w przypadku próbki POL. Podobnie w przypadku próbki POL_1500 zaobserwowano nieliczne struktury ale również mniejsze zróżnicowanie szarości obrazów, co jest związane z gładszą powierzchnią i mniejszą ilością nierówności na powierzchni. W przypadku próbki PIA widoczna jest nieciągłość struktury, która wynika ze sposobu przygotowania powierzchni, o nieregularnych, płatowych fragmentach. Próbką PIA_500, po naniesieniu powłoki charakteryzuje się bardziej chropowatą powierzchnią, o większej ilości drobnych cząstek na powierzchni płatków. Struktura próbki POL_1500 jest w największym stopniu pokryta drobnymi, ziarnistymi strukturami, o różnej wielkości. Świadczą one o największej ilości powłoki, co sprawiło, że struktura jest najbardziej heterogeniczna (Rysunek 39).

Wariant

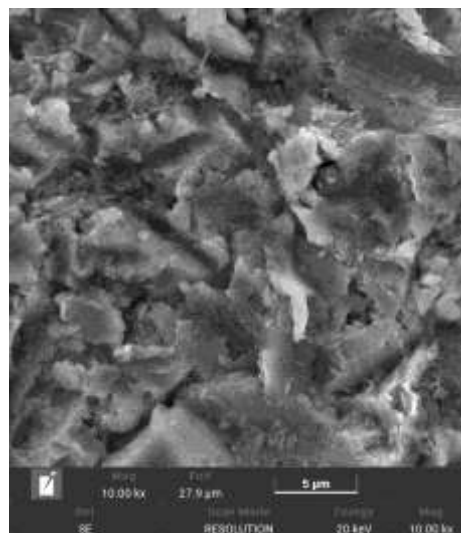
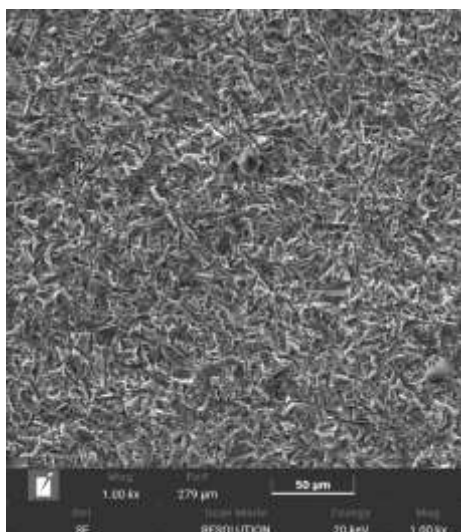
pow. 1000 x

pow. 10 000x

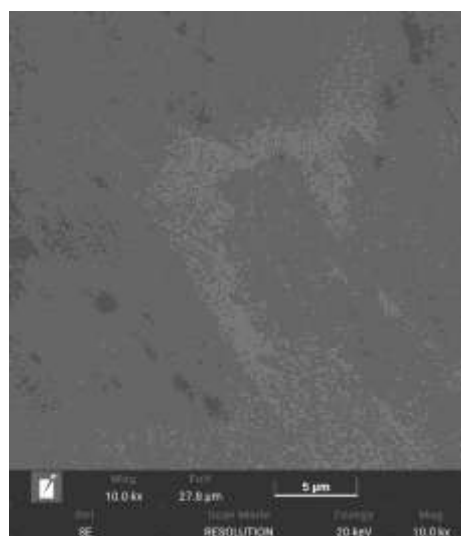
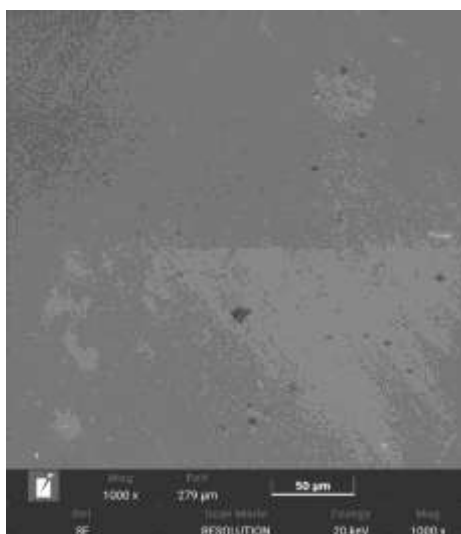
POL



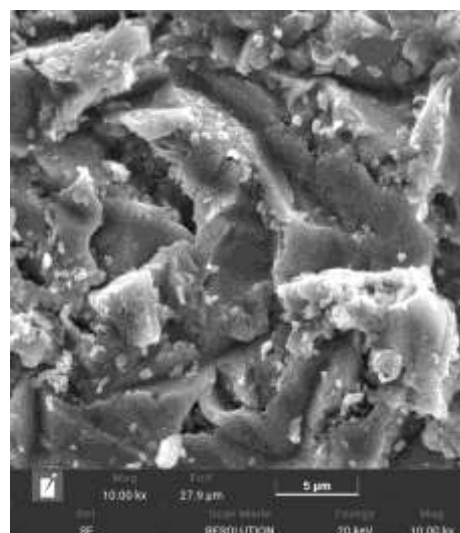
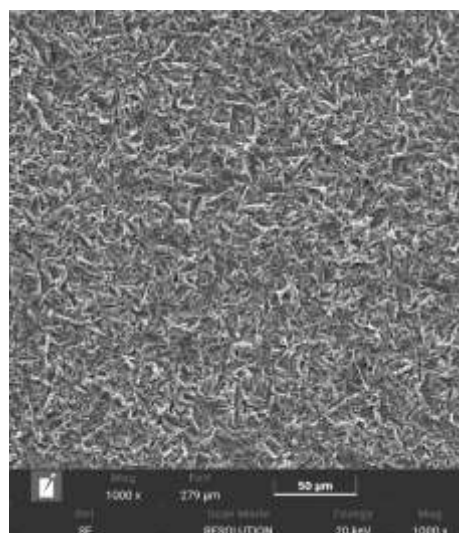
PIA



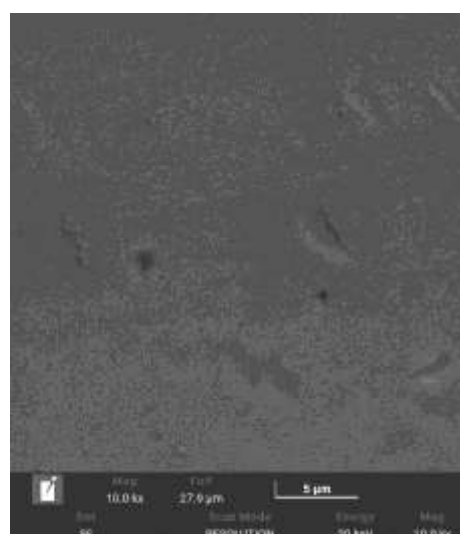
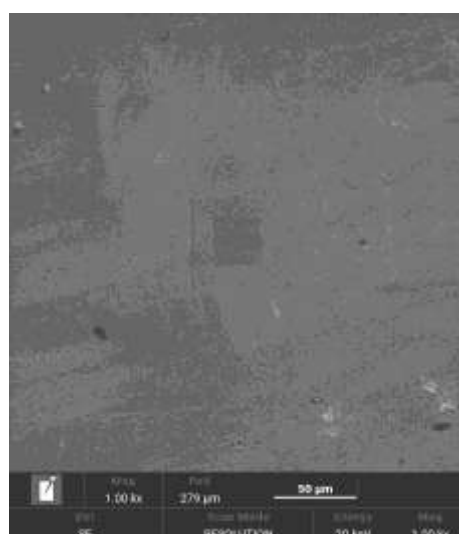
POL_500



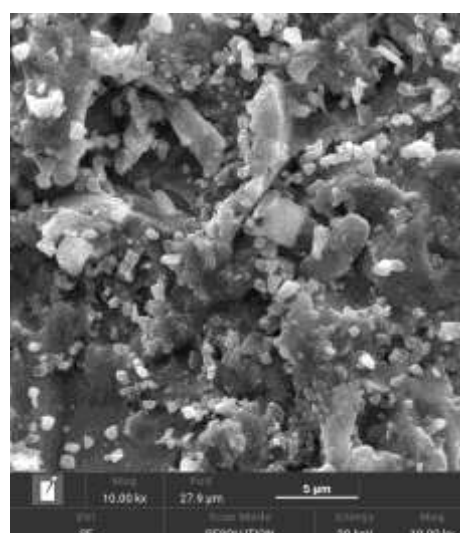
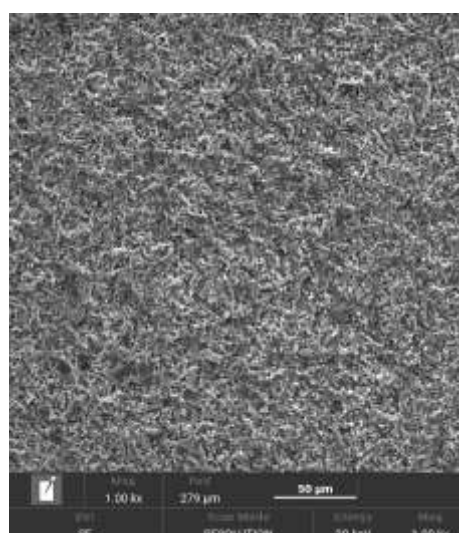
PIA_500



POL_1500



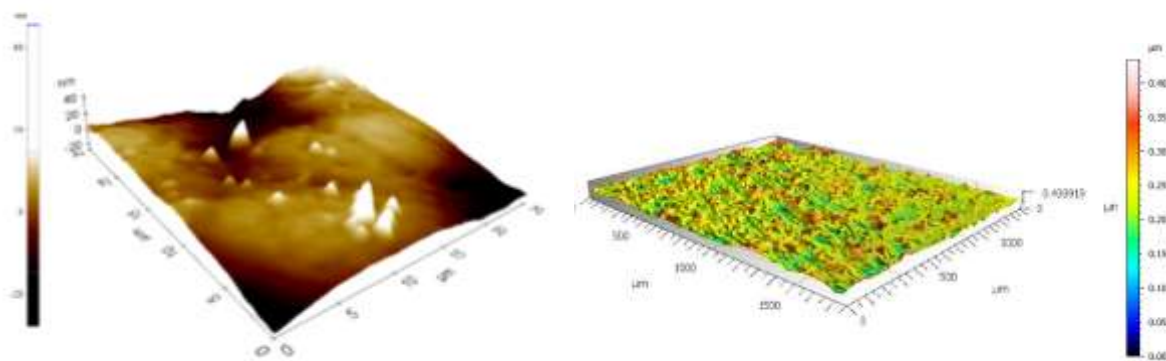
PIA_1500



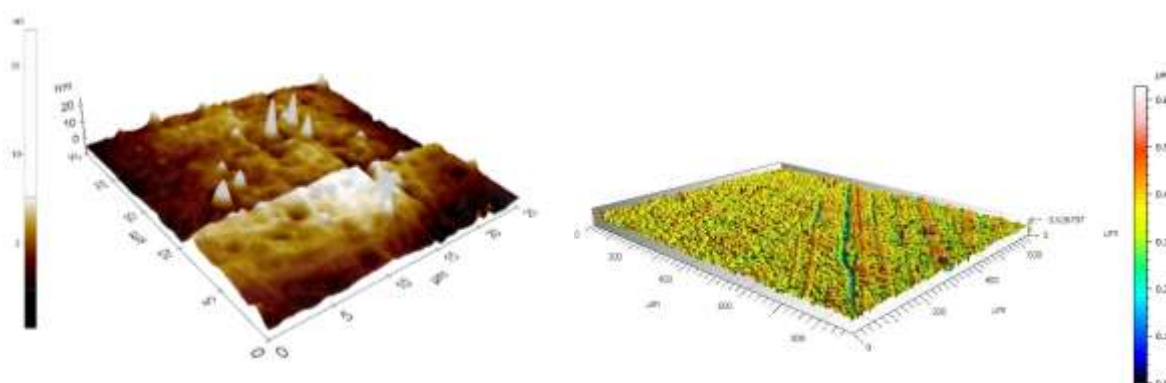
Rysunek 39 Powierzchnia próbek, SEM

Obrazy morfologii powierzchni uzyskane z wykorzystaniem mikroskopu sił atomowych AFM nie wykazały znaczących różnic w morfologii powierzchni próbek polerowanych, bez względu na ilość liczby cykli (Rysunek 40, Rysunek 41).

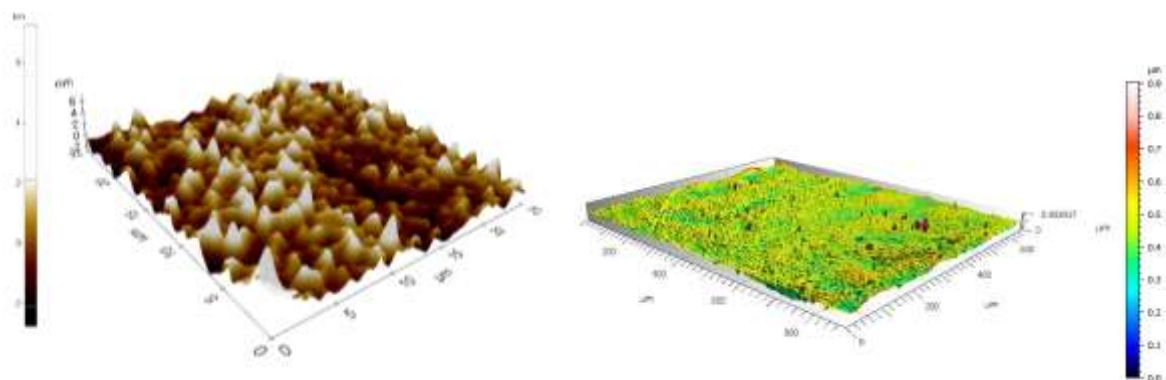
a)



b)

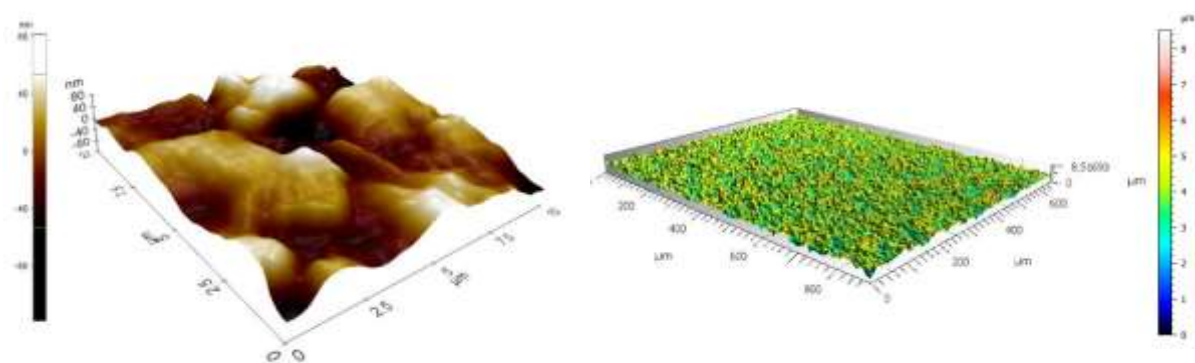


c)

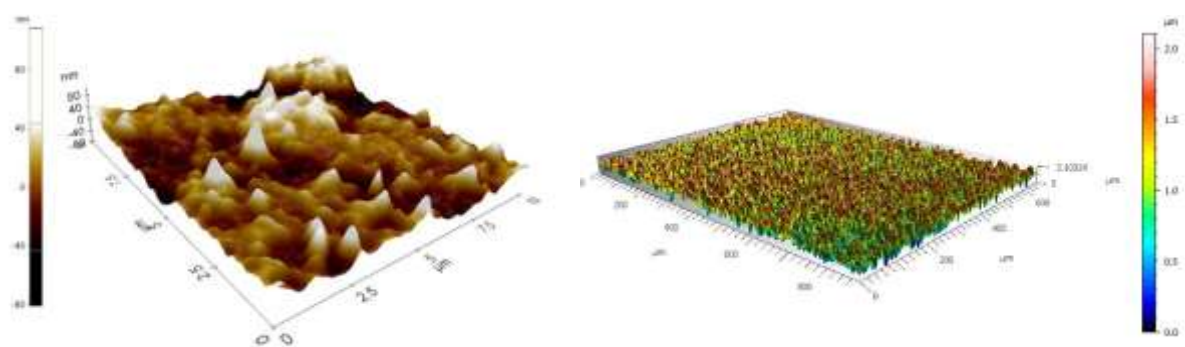


Rysunek 40 Morfologia powierzchni 3D dla próbek: a) POL b)POL_500, c)POL_1500, AFM, profilometria optyczna

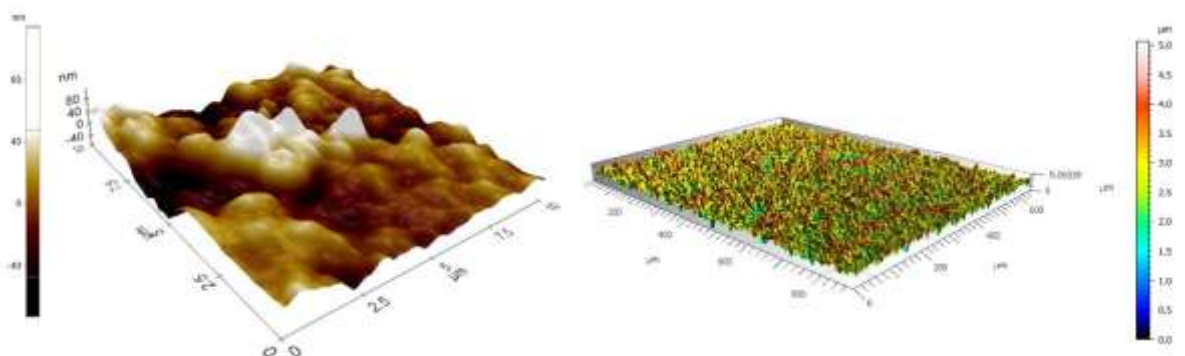
a)



b)



c)



Rysunek 41 Morfologia powierzchni 3D dla próbek: a) PIA b)PIA_500, c)PIA_1500, AFM, profilometria optyczna

W przypadku próbek piaskowanych największą chropowatością charakteryzowała się próbka bez powłoki (PIA), odpowiednio o wartości $R_a=0,31\ \mu\text{m}$, podczas pomiaru przy użyciu AFM oraz o wartości $R_a=0,26\ \mu\text{m}$, podczas pomiaru przy użyciu profilometru optycznego. Najniższą wartość $R_a=0,02\ \mu\text{m}$ charakteryzuje się próbka polerowana po naniesieniu 1500 cykli (POL_1500), którą odnotowano podczas pomiaru przy użyciu profilometrii optycznej. Najniższą wartość $R_a=0,02$ uzyskano również dla próbki POL_1500, przy użyciu metody pomiarowej AFM. Naniesiona powłoka SnO_2 spowodowała nieznaczne zmniejszenie chropowatości w przypadku próbek polerowanych w porównaniu do wariantów przed modyfikacją metodą ALD lub oscylowanie w granicach podobnych wartości $0,02\pm0,01$. Biorąc pod uwagę próbki piaskowane odnotowano zwiększenie wartości parametru R_a , w przypadku obu metod pomiarowych (*Rysunek 40, Rysunek 41, Tabela 11*).

*Tabela 11 Średnie wartości parametrów chropowatości R_a i S_a , *AFM, **profilometr optyczny*

Wariant	$R_a\ [\mu\text{m}]^*$	$R_a\ [\mu\text{m}]^{**}$	$S_a\ [\mu\text{m}]^{**}$
POL	$0,05\pm0,02$	$0,02\pm0,01$	$0,03\pm0,01$
PIA	$0,31\pm1,90$	$0,26\pm0,03$	$0,53\pm0,04$
POL_500	$0,05\pm0,02$	$0,03\pm0,01$	$0,03\pm0,01$
PIA_500	$0,35\pm1,20$	$0,34\pm0,01$	$0,63\pm0,02$
POL_1500	$0,02\pm0,01$	$0,03\pm0,01$	$0,03\pm0,01$
PIA_1500	$0,38\pm1,10$	$0,37\pm0,02$	$0,68\pm0,02$

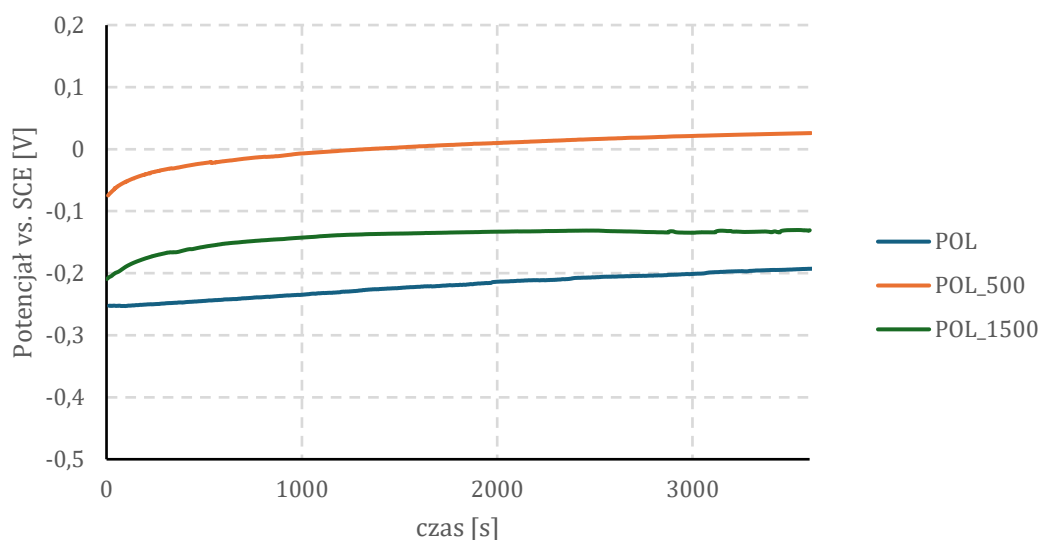
5.3. Badania własności elektrochemicznych

5.3.1. Badania odporności na korozję wżerową

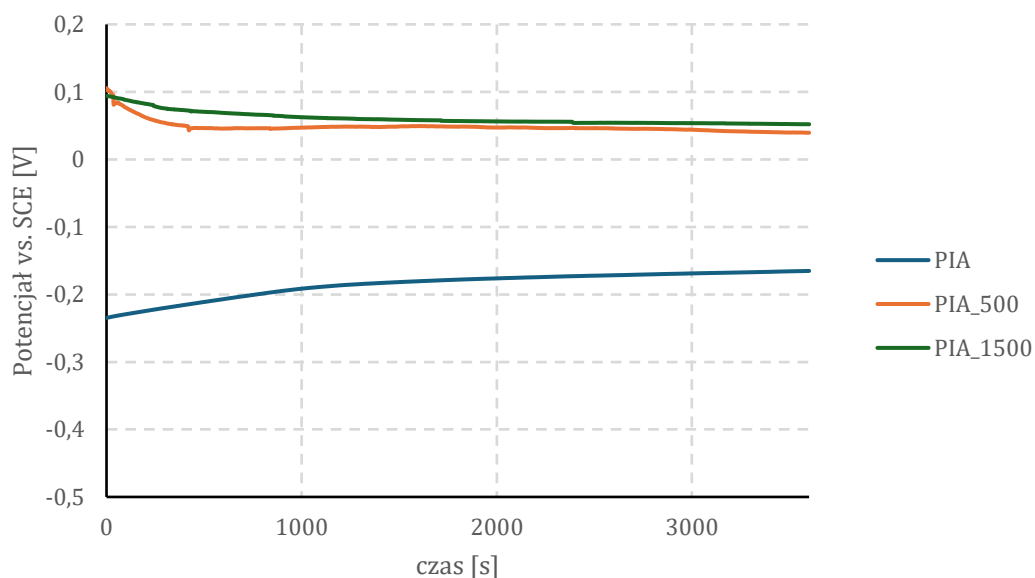
Na Rysunek 42 przedstawiono w postaci krzywych potencjodynamicznych zmiany potencjału w obwodzie otwartym. Wartości E_{ocp} zarówno dla wariantów polerowanych, jak i piaskowanych są zbliżone, a ich średnie wartości wynoszą odpowiednio: dla próbek polerowanych $E_{ocp}= -0,195\ \text{V}$ oraz dla próbek piaskowanych $E_{ocp}= -0,165\ \text{V}$. Niezależnie od sposobu przygotowania powierzchni, po naniesieniu powłoki SnO_2 nastąpił wzrost

wartości E_{ocp} (przesunięcie dodatnie o 100-180mV). W przypadku próbek POL oraz PIA, a także próbek polerowanych po naniesieniu powłoki tj. POL_500 oraz POL_1500 zaobserwowano niewielki wzrost w przebiegu E_{ocp} -czas. W przypadku próbek piaskowanych, po naniesieniu powłoki tj. PIA_500 oraz PIA_1500 przebieg był inny i zaobserwowano spadek E_{ocp} .

a)



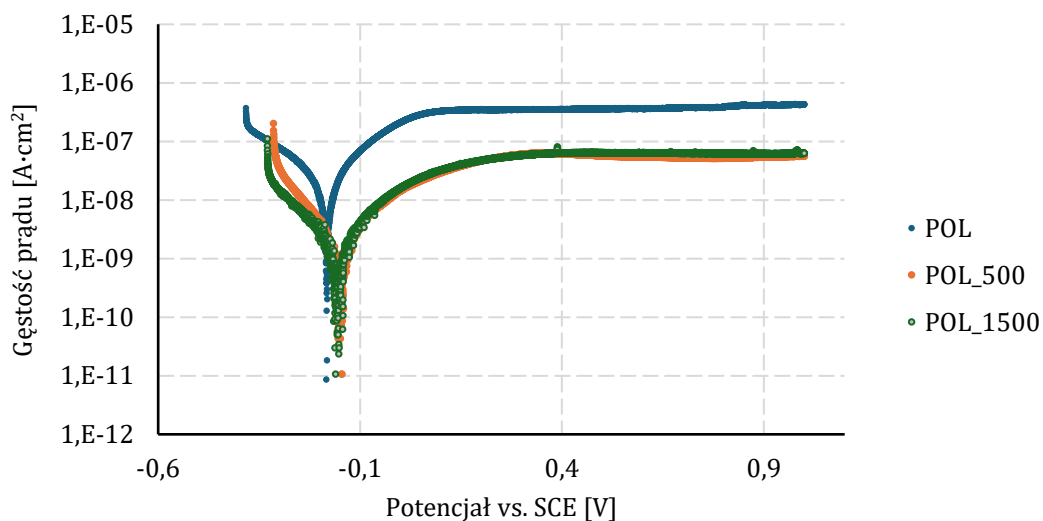
b)



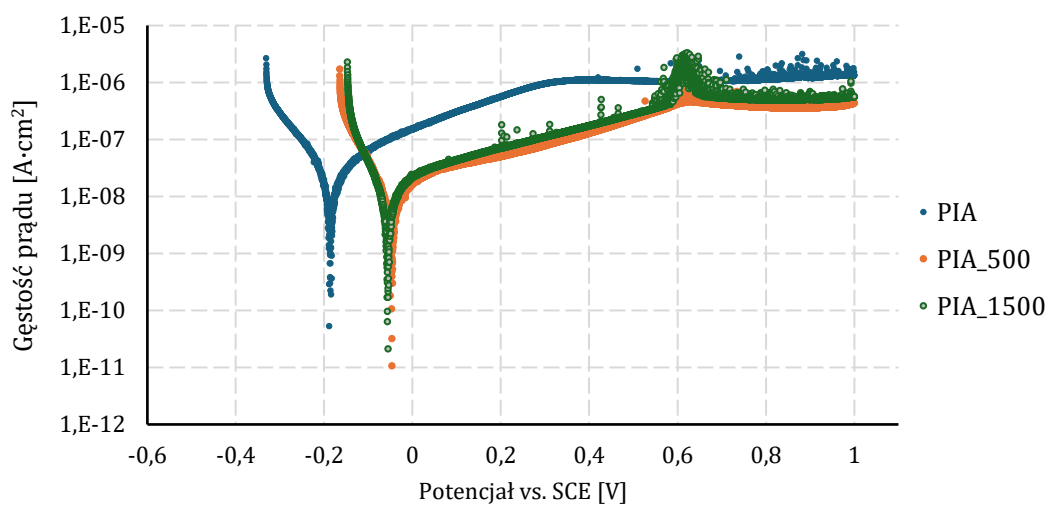
Rysunek 42 Przykładowe przebiegi krzywych E_{ocp} dla próbek a) polerowanych
b) piaskowanych

Wartości R_p i $j(1V)$ (Tabela 12) uzyskane na podstawie krzywych potencjodynamicznych (Rysunek 43) ilościowo reprezentują własności odporności na korozję badanych próbek.

a)



b)



Rysunek 43 Krzywe potencjodynamiczne zarejestrowane dla próbek: a) POL, POL_500, POL_1500 b) PIA, PIA_500, PIA_1500

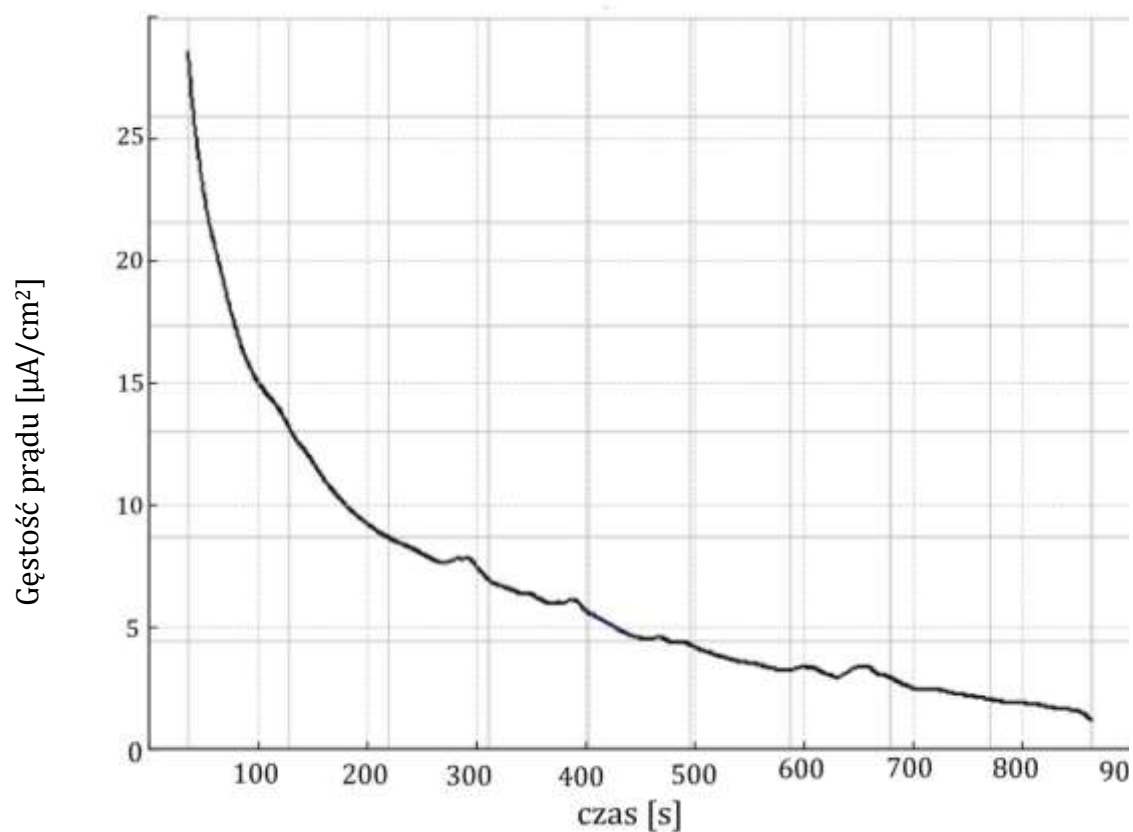
Tabela 12 Wyniki badań potencjodynamicznych

Wariant	E _{ocp} [V]	PDP	
		R _p (PDP) [MΩ·cm ²]	j _(1v) / [nA·cm ⁻²]
POL	-0,196 ± 0,078	2,51 ± 1,03	385 ± 35
POL_500	-0,044 ± 0,070	17,75 ± 3,66	54 ± 3
POL_1500	-0,095 ± 0,028	10,1 ± 4,78	124 ± 59
PIA	-0,165 ± 0,027	0,80 ± 0,12	1350 ± 5
PIA_500	-0,023 ± 0,012	2,69 ± 0,59	423 ± 20
PIA_1500	-0,041 ± 0,092	1,01 ± 0,52	632 ± 45

Wartości uzyskane na podstawie krzywych potencjodynamicznych pozwoliły na ilościową analizę własności antykorozyjnych wszystkich wariantów. W przypadku próbek polerowanych – najniższą odporność na polaryzację stwierdzono dla próbki niemodyfikowanej powłoką (POL), gdzie $R_p=2,5 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^2$, a najwyższą dla próbek POL_500 ($R_p=17,8 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^2$). Podobną zależność stwierdzono w przypadku wariantu próbek piaskowanych, gdzie najniższa wartość R_p wystąpiła dla próbki niemodyfikowanej powłoką (PIA), gdzie $R_p= 0,8 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^2$ oraz najwyższą gęstością prądu $j= 1,35 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$. Najwyższą rezystancję polaryzacyjną dla wariantu próbek piaskowanych uzyskano w przypadku powłoki PIA_500 ($R_p = 2,7 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^2$). Próbki polerowane, bez względu na ilość cykli nanoszenia powłoki SnO₂ charakteryzują się wyższą odpornością na polaryzację (R_p) oraz niższą gęstością prądu (j) niż próbki piaskowane, co wskazuje na ich lepszą odporność na korozję.

5.3.2. Badania odporności na korozję szczelinową

Przebieg zmian gęstości prądu w funkcji czasu przy stałej polaryzacji powierzchni przedstawiono na Rysunek 44. Uzyskane wyniki badań odporności na korozję szczelinową potwierdziły odporność wszystkich wariantów na ten rodzaj korozji (Tabela 13).



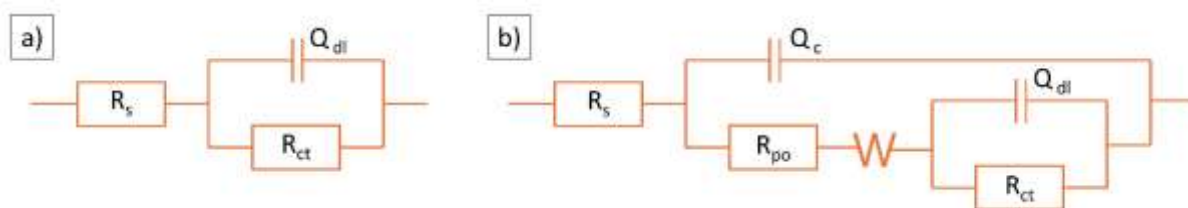
Rysunek 44 Przykładowa krzywa zmiany gęstości prądu w funkcji czasu dla próbki POL_500

Tabela 13 Wyniki badań potencjostatycznych

Wariant	Odporność na korozję szczelinową	Gęstość prądu po 20 s, mA/cm ²	Gęstość prądu po 900 s, mA/cm ²	Gęstość ładunku elektrycznego, mC/cm ²
POL	Tak	6,25	1,40	0,85
PIA	Tak	14,32	8,47	7,78
POL_500	Tak	5,20	1,10	2,22
PIA_1500	Tak	5,96	1,25	2,24
PIA_500	Tak	8,74	1,24	2,60
PIA_1500	Tak	58,46	3,49	10,45

5.3.3. Badania z wykorzystaniem elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej

Analiza widm pozwoliła na znalezienie odpowiedniego obwodu zastępczego- Rysunek 45. Obwody elektryczne równoważne (EEC) użyte do dopasowania były różne w przypadku wariantów niemodyfikowanych (POL i PIA) i dla próbek z naniesioną powłoką (POL_500, POL_1500, PIA_500, PIA_1500). W przypadku pierwszej grupy (POL, PIA) zastosowano układ R(QR), a do dopasowania danych otrzymanych dla próbek z powłoką zastosowano bardziej złożony obwód R(Q(RW(RQ))), gdzie R(QR) to opór elektrolitu w szeregu z równoległym połączeniem CPE i oporu przeniesienia ładunku. W obu obwodach elektrycznych występują trzy typowe elementy, tj.: R_s – rezystancja omowa roztworu (środką korozyjnego), która jest stosunkowo niewielka i może być uznana za nieistotną; Q_{dl} – element stałej fazy (CPE) reprezentujący elektryczną warstwę podwójną badanej próbki; R_{ct} – rezystancja przenoszenia ładunku związana z szybkością korozji podłoża stopu. Ponadto w drugim obwodzie równoważnym występuje kolejny element stałej fazy Q_c odnoszący się do własności dielektrycznych warstwy ochronnej (tj. głównie powłoki ALD + naturalnej powłoki pasywnej); R_{po} – rezystancja wynikająca z porowatości i defektów warstwy oraz W – element Warburga ilustrujący proces dyfuzji skończonej.



Rysunek 45 Obwody elektryczne a) układ R(QR) dla próbek niemodyfikowanych: POL, PIA b) R(Q(RW(RQ))) dla próbek z powłoką SnO₂: (POL_500, POL_1500, PIA_500, PIA_1500)

Odpowiedź impedancyjna CPE może być opisana przez:

$$Z_Q^{-1} = Y_Q = Q(j\omega)^n$$

gdzie j jest jednostką urojoną ($\sqrt{-1}$), ω jest częstotliwością kątową, natomiast Q i n są odpowiednio parametrami admitancji i przesunięcia fazowego CPE.

Przy $n = 1$ faza jest przesunięta o -90° , a znaczenie Q sprowadza się do czystej pojemności. Przy $n = 0$ lub -1 wartość ta wynosi 0 lub $+90^\circ$, co daje element obwodu, który można przedstawić odpowiednio jako czysty rezystor lub cewkę indukcyjną. Zwyczajowo CPE traktuje się jako kondensator nieidealny dla wartości n bliskich 1 . Impedancja odpowiadająca dyfuzji o skończonej długości może być opisana równaniem:

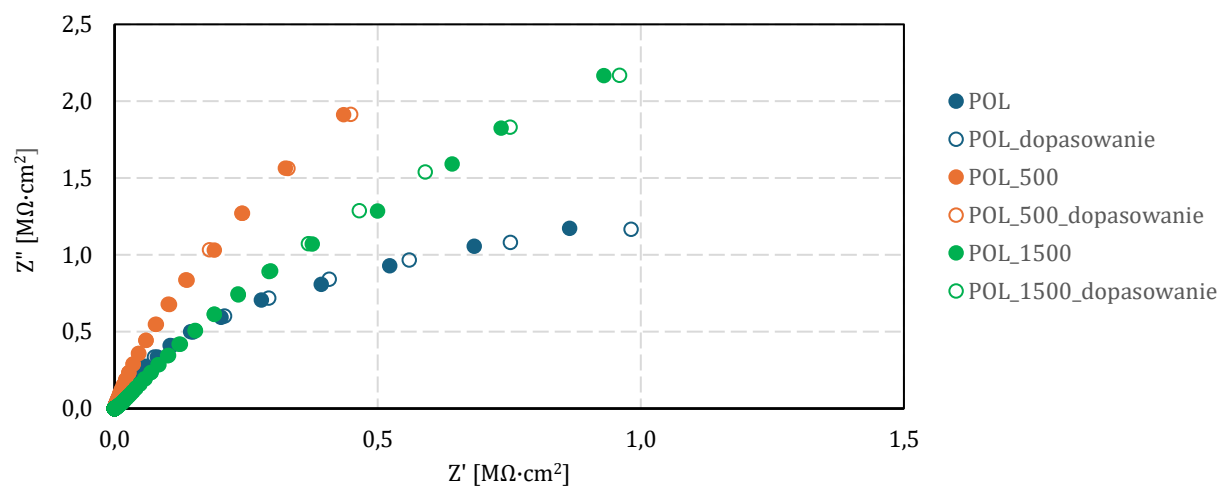
$$Z_W^{-1} = Y_W = Y_o(j\omega)^{0.5} \coth[B(j\omega)^{0.5}]$$

Parametry Y_o i B są stałymi charakterystycznymi dla W . Umieszczenie impedancji Warburga szeregowo, a nie równolegle do impedancji dwuwarstwowej Q_{dl} (Rysunek 45) może wydawać się niekonwencjonalne. Jednak może tak być w przypadku, gdy stałe czasowe $R_{ct}Q_{dl}$ i W są dobrze rozdzielone. Podsumowanie uzyskanych wyników i najlepszych dopasowań w przypadku próbek po modyfikacji powierzchni POL_500, POL_1500 oraz PIA_500, PIA_1500) przedstawiono w Tabeli 14, gdzie dane dopasowane nałożono na punkty pomiarowe pokazane na wykresach Nyquista (Rysunek 46). Oznaczenia A i B to wybrane, najlepsze dopasowania dla danych wariantów.

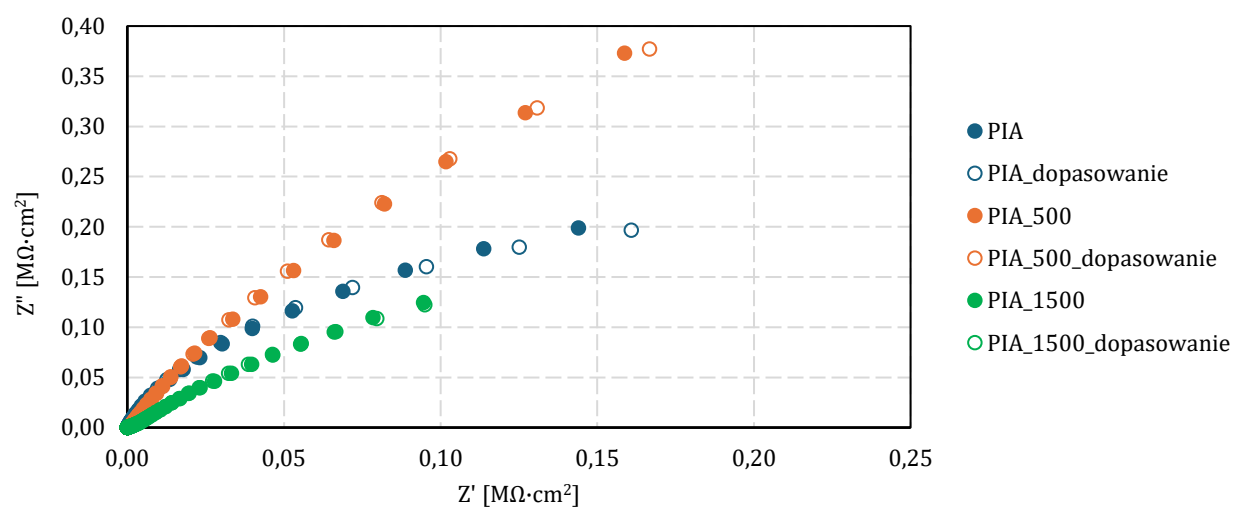
Tabela 14 Podsumowanie wybranych dopasowań elementów EEC oraz wartości χ^2 wskazujące na jakość dopasowania

	R_s $\Omega \cdot \text{cm}^2$	Q_c $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^n$	n_c / -	R_{po} $\text{k}\Omega \cdot \text{cm}^2$	Y_o $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{0.5}$	B $\text{s}^{0.5}$	Q_{dl} $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^n$	n_{dl} / -	R_{ct} $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}^2$	χ^2 / -
PIA	44.2 ± 3.6	-	-	-	-	-	37.96 ± 0.79	0.893 ± 0.004	0.56 ± 0.09	$<6.34\text{E-}4$
POL	58.7 ± 1.1	-	-	-	-	-	7.49 ± 0.61	0.930 ± 0.008	1.75 ± 0.69	$<4.85\text{E-}4$
PIA_500 A	32.4	13.70	0.763	620.4	76.4	3.94	11.170	1.000	2.71	2.45E-04
PIA_500 B	12.9	3.88	0.443	35.6	5788	0.04	35.300	0.911	0.82	1.07E-04
PIA_1500 A	44.7	25.00	0.626	3540.0	39.6	1140.00	26.940	0.974	0.54	1.80E-04
PIA_1500 B	57.7	44.50	0.621	10100.0	28.6	572.00	30.090	1.000	0.94	7.30E-04
POL_500 A	14.1	0.45	0.690	19.8	1216	84.76	6.200	0.953	18.21	6.63E-05
POL_500 B	42.3	1.03	0.718	11.5	1322	59.40	4.770	0.990	15.98	3.21E-05
POL_1500 A	62.4	3.19	0.812	32.4	3.7	3304.00	1.120	1.000	12.28	1.06E-04
POL_1500 B	58.4	5.45	0.766	0.9	34.6	578.00	0.700	1.000	3.43	6.25E-04

a)



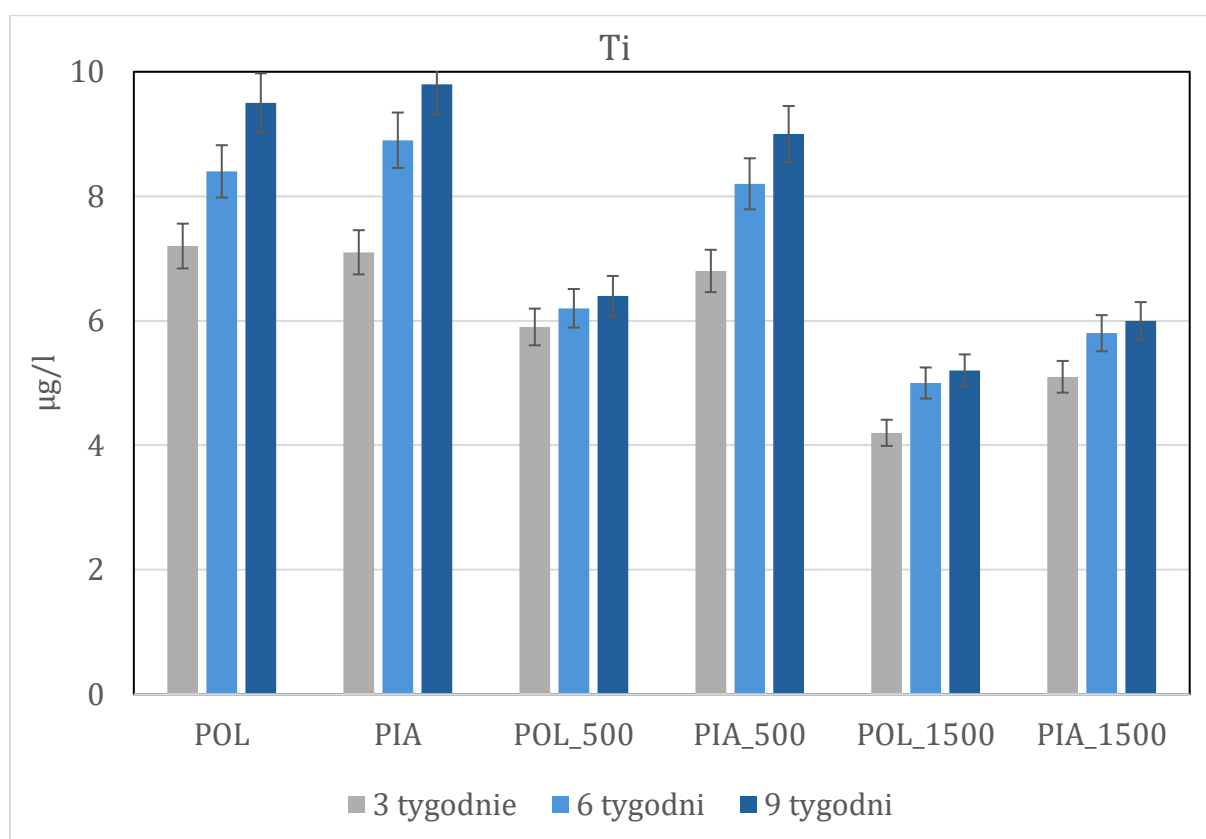
b)



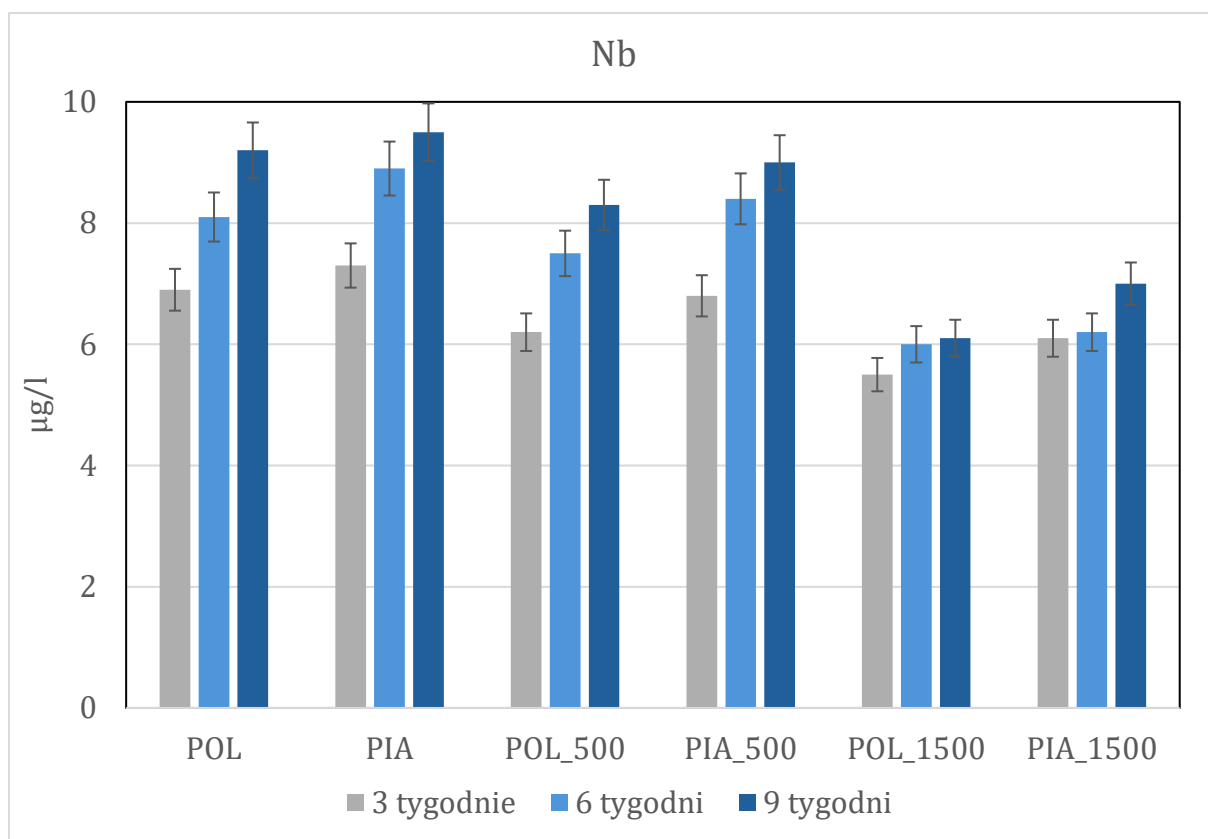
Rysunek 46 Wykresy Nyquista dla badanych próbek: a) polerowanych b) piaskowanych

5.3.4. Badania przenikania jonów metali do roztworu

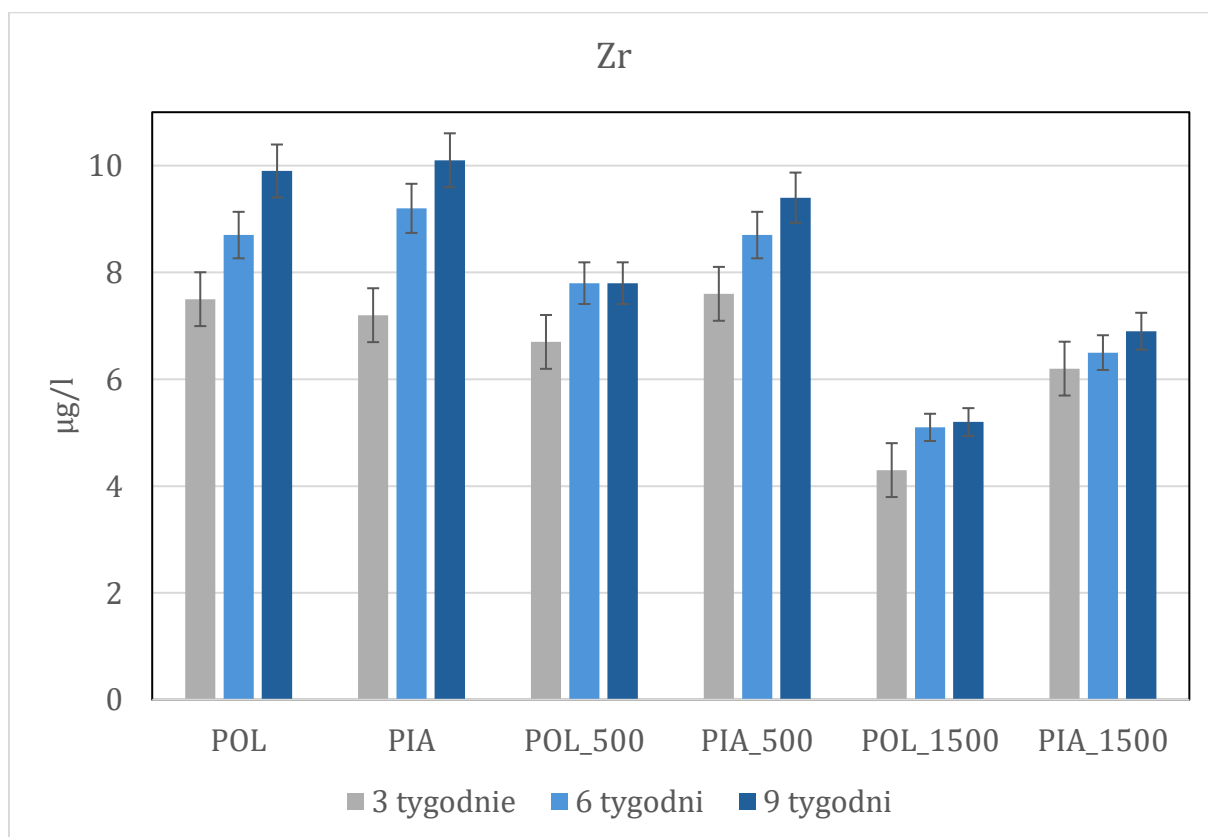
Na podstawie przeprowadzonych badań zaobserwowano brak znaczącego przenikania i różnic w zawartości procentowej jonów do roztworu takich pierwiastków jak: tytan (Ti), niob (Nb) oraz cyrkonu (Zr), których ilość zmierzona w roztworze nie przekraczała 10 µg/l w przypadku każdego wariantu próbek. Zaobserwowano, że przygotowanie powierzchni wpływa na stopień przenikania jonów cyny do roztworu fizjologicznego. Zaobserwowano również, że większe własności zabezpieczające przed przenikaniem jonów do roztworu wykazują próbki uprzednio polerowane. Ponadto stwierdzono, że naniesienie powłoki SnO₂ bez względu na ilość cykli procesu spowodowało zmniejszenie przenikania jonów bezpośrednio ze stopu tytanu oraz jonów Sn⁴⁺ do roztworu. Dodatkowo zaobserwowano, że im większa ilość cykli procesu nanoszenia tym mniejsze przenikanie jonów cyny, jako pierwiastka z powłoki oraz tytanu, niobu cyrkonu z podłoża, co przedstawiono na (Rysunek 47, Rysunek 48, Rysunek 49, Rysunek 50).



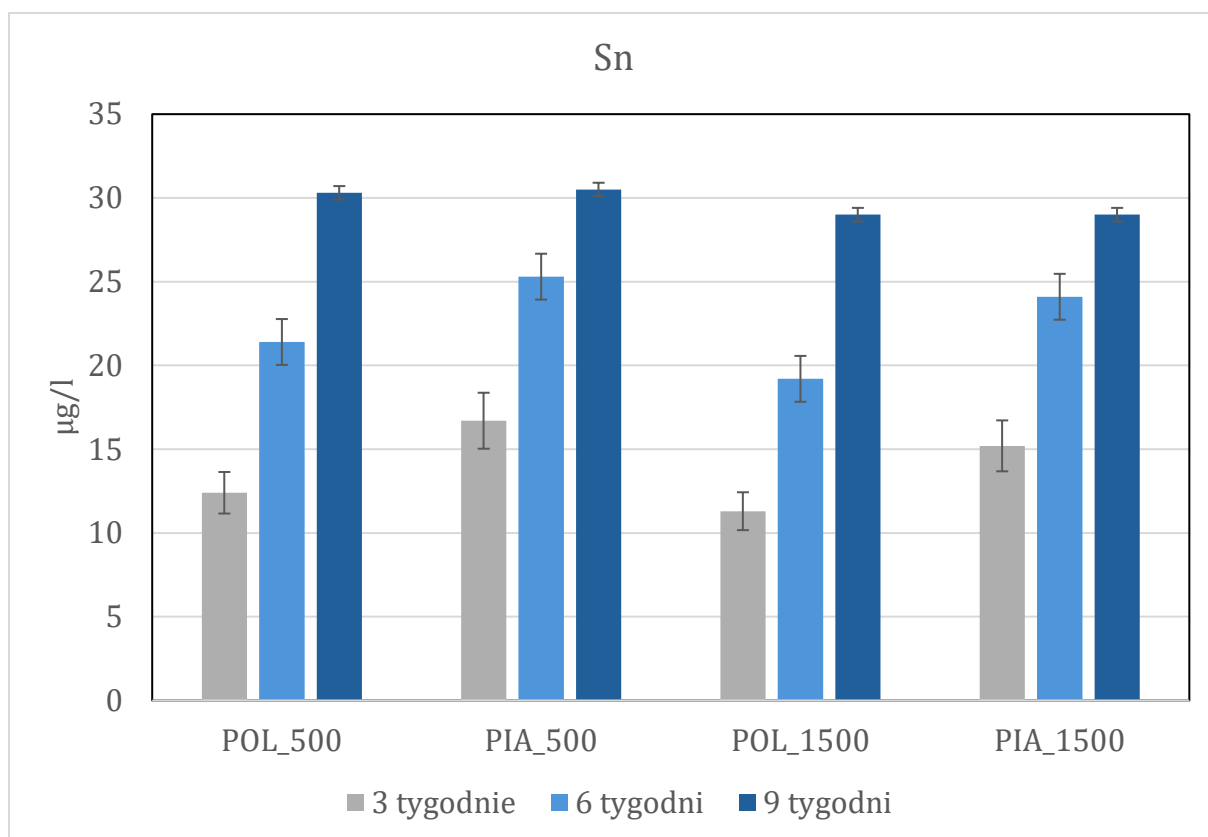
Rysunek 47 Stężenie jonów tytanu uwolnionych do roztworu PBS



Rysunek 48 Stężenie jonów niobu uwolnionych do roztworu PBS



Rysunek 49 Stężenie jonów cyrkonu uwolnionych do roztworu PBS

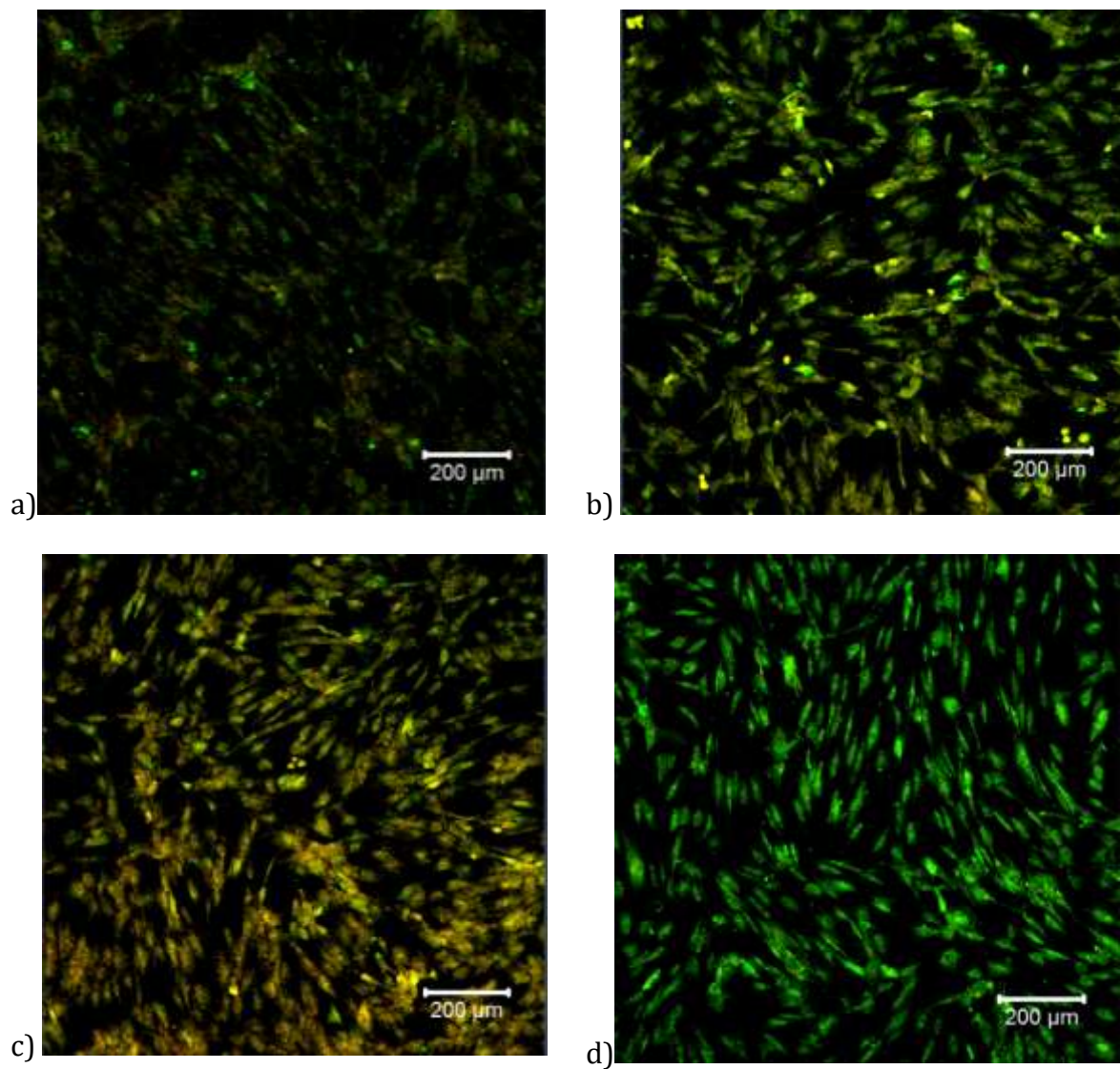


Rysunek 50 Stężenie jonów cyny uwolnionych do roztworu PBS

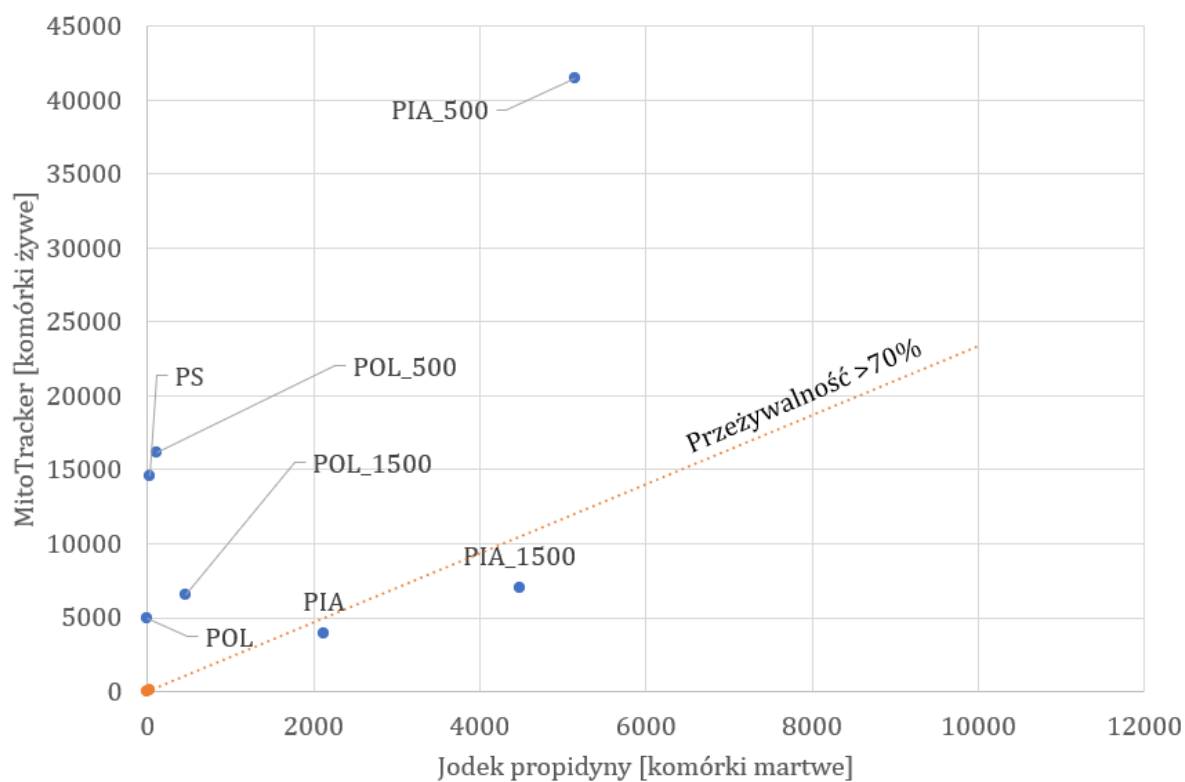
5.4. Badania własności biologicznych

5.4.1. Badania cytotoksyczności

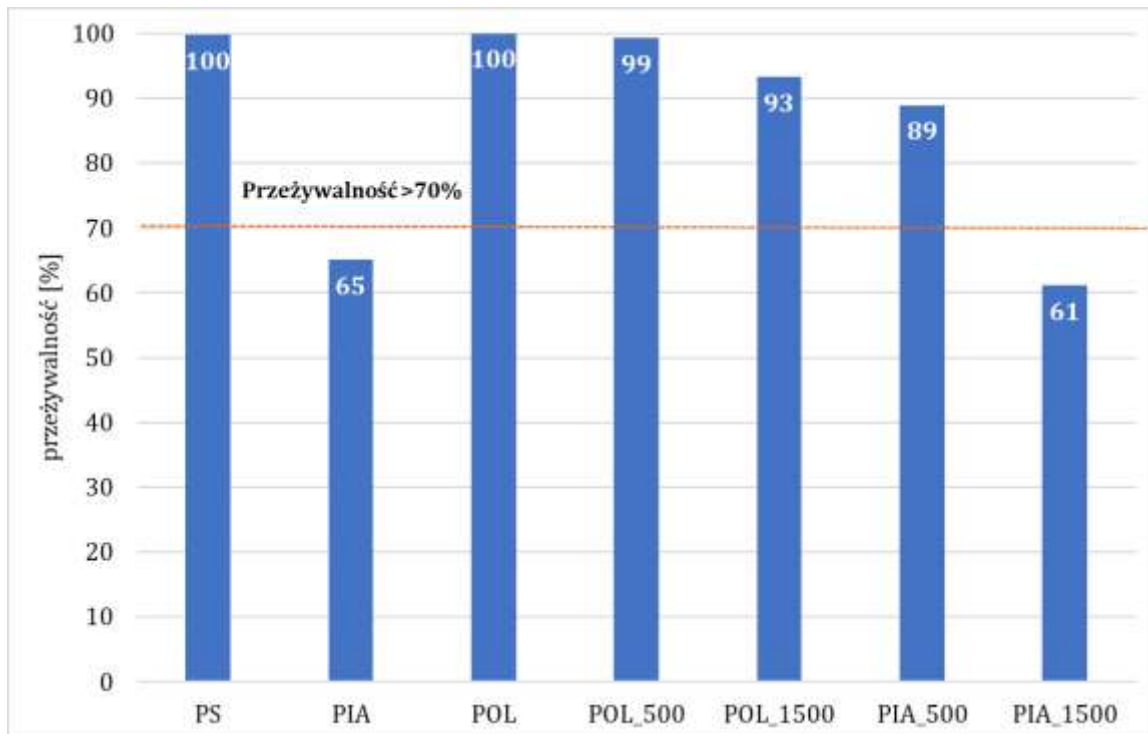
Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono na Rysunkach 51-53. Na podstawie badań stwierdzono przeżywalność na poziomie: 100%, 99% i 93% kolejno dla próbek POL, POL_500 i POL_1500. Z kolei w przypadku próbek PIA zaobserwowano zdecydowanie mniejszą przeżywalność komórek odpowiednio na poziomie 65%, 89% i 61% dla PIA, PIA_500 i PIA_1500. Zgodnie z zaleceniami normy ISO 10993-5 [126]. Zmniejszenie żywotności komórek o ponad 30% uważa się za efekt cytotoksyczny, co zaobserwowano w przypadku PIA oraz PIA_1500.



*Rysunek 51 Kolor zielony-komórki żywe, kolor czerwony- komórki martwe, dla próbek:
a) PIA b) PIA_500 c) PIA_1500 d) POL_500, mikroskop konfokalny*



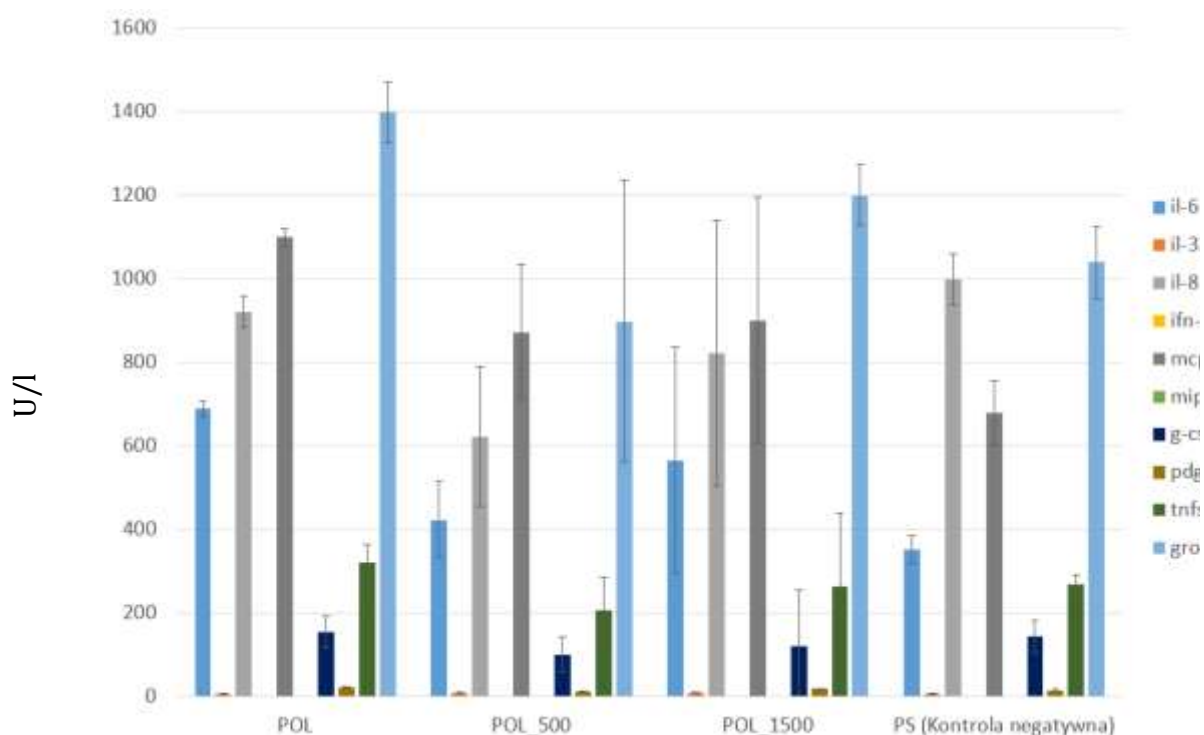
Rysunek 52 Liczba komórek żywych względem komórek martwych



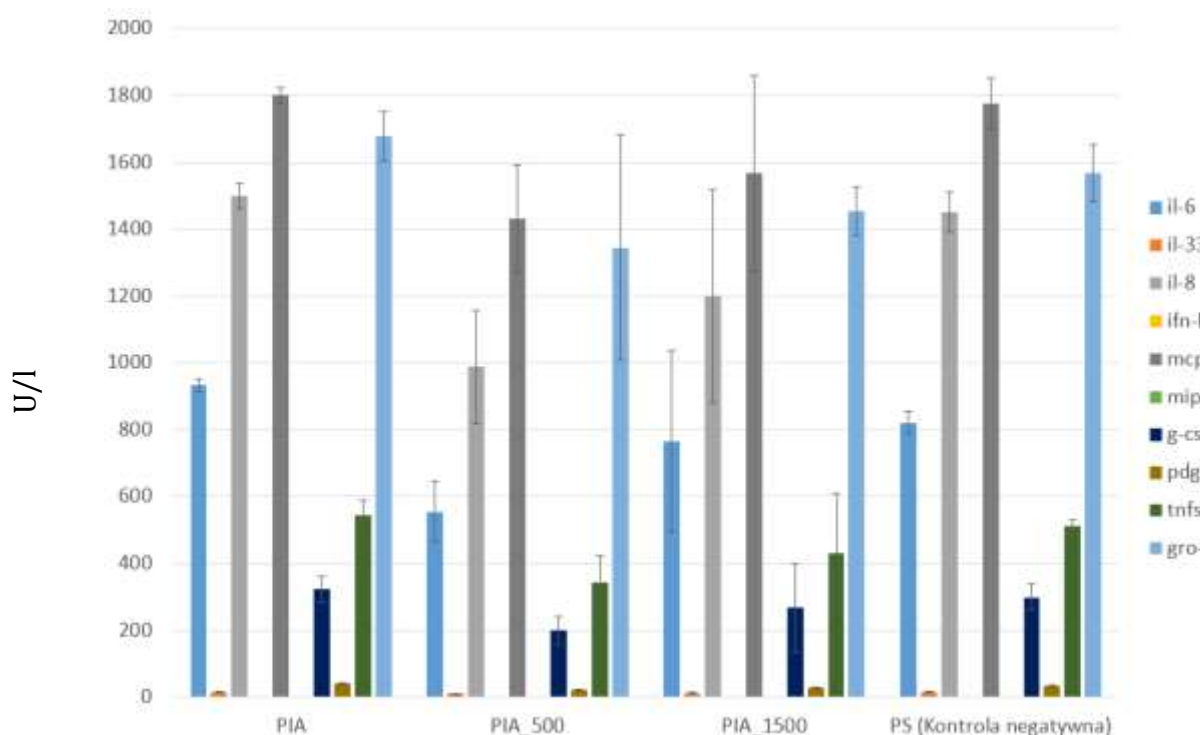
Rysunek 53 Przeżywalność komórek

5.4.2. Badania cytokin prozapalnych

Poziomy wszystkich badanych cytokin prozapalnych dla analizowanych materiałów przedstawiono na Rysunek 54 oraz Rysunek 55. W przypadku próbki referencyjnej POL i PIA zaobserwowano zróżnicowany wpływ materiału na poszczególne poziomy cytokin. Podwyższony ich poziom zaobserwowano w przypadku podłoża PIA. Z kolei niezależnie od naniesionej powłoki zaobserwowano obniżony poziom wszystkich badanych cytokin prozapalnych w porównaniu do materiału wyjściowego (POL i PIA), co jest zjawiskiem korzystnym.



Rysunek 54 Wartości cytokin prozapalnych dla próbek polerowanych (POL, POL_500, POL_1500), (U/l)



Rysunek 55 Wartości cytokin prozapalnych dla próbek piaskowanych (PIA, PIA_500, PIA_1500) (U/l)

5.4.3. Badania adhezji bakterii

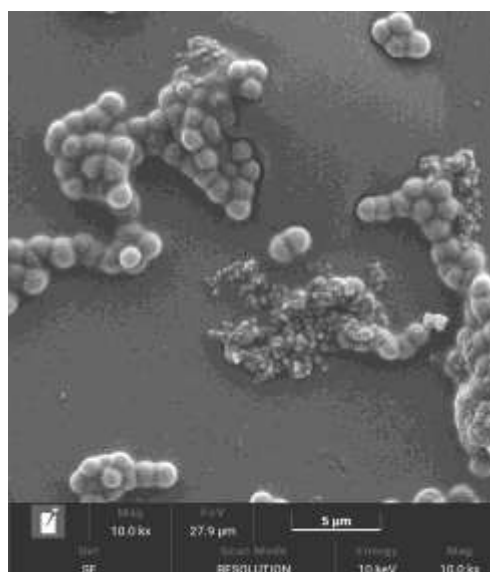
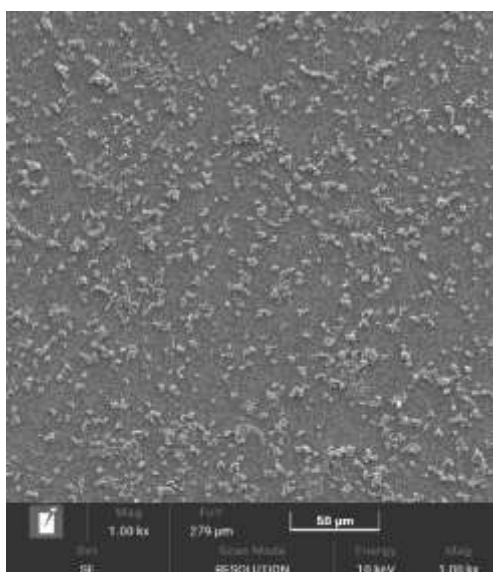
Ilość zaadherowanych szczepów bakterii *Staphylococcus aureus* oraz *Escherichia coli* oraz procesu powstawania biofilmu bakteryjnego przedstawiono na Rysunek 56 oraz Rysunek 57. Stwierdzono widoczne różnice w przypadku ilości zaadherowanych bakterii do powierzchni, w zależności od sposobu jej przygotowania i czasu inkubacji na powierzchni próbki. Analizując ilość bakterii szczepu *S. aureus* osiadających na powierzchni próbek przez 4h zaobserwowano spadek ilości bakterii w przypadku próbek polerowanych, po naniesieniu coraz większej ilości cykli. W przypadku próbek piaskowanych nie zauważono znaczących różnic w zmniejszeniu się ilości bakterii po naniesieniu powłoki na powierzchnię próbki (Rysunek 56).

Wariant

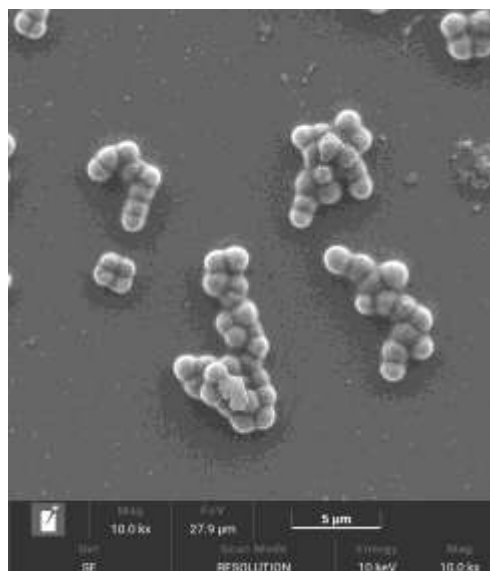
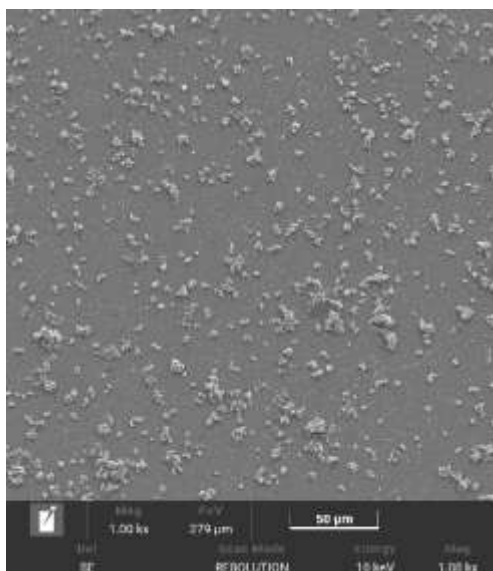
Pow. 1000x

Pow. 10 000x

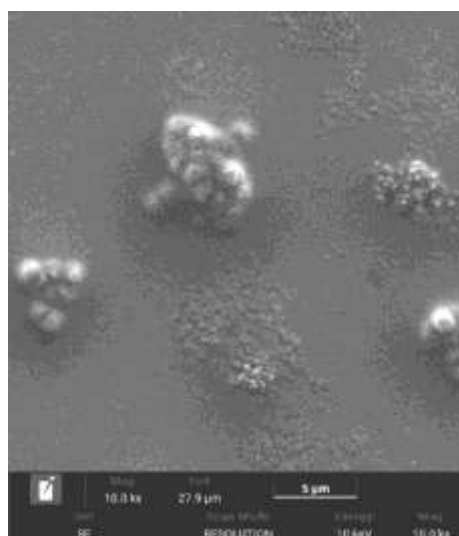
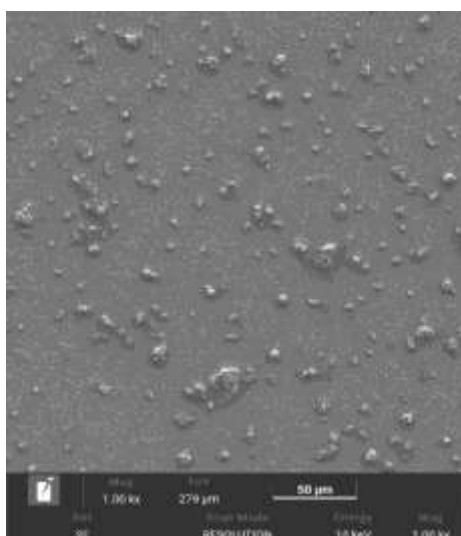
POL



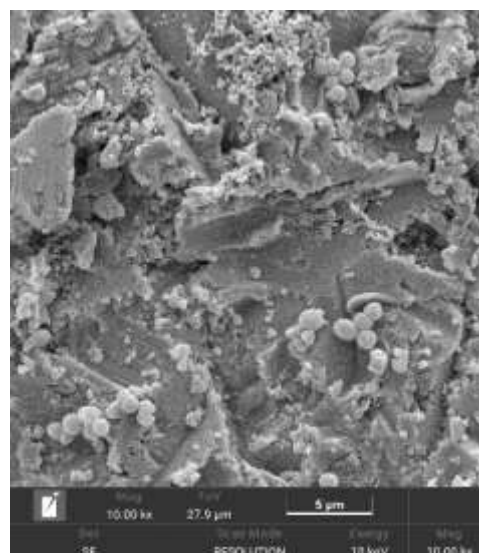
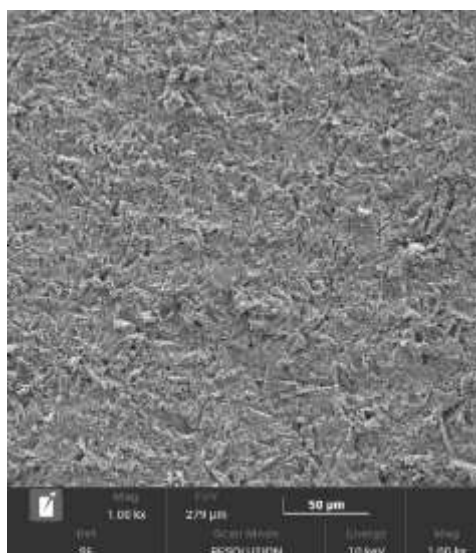
POL_500



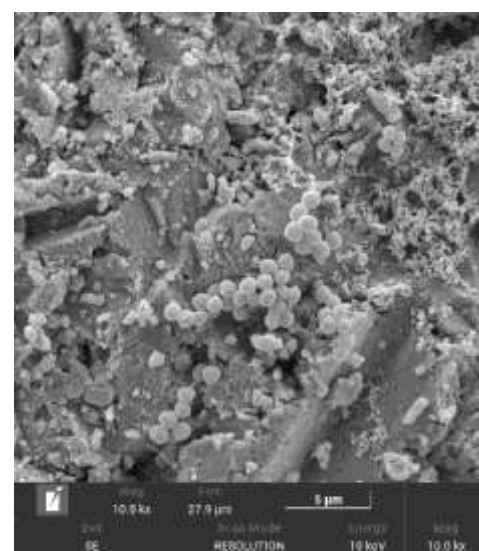
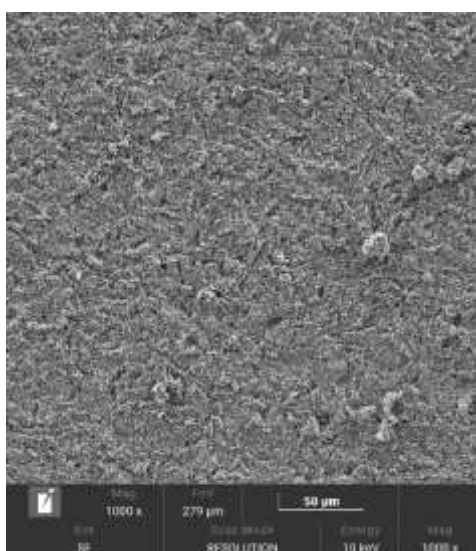
POL_1500



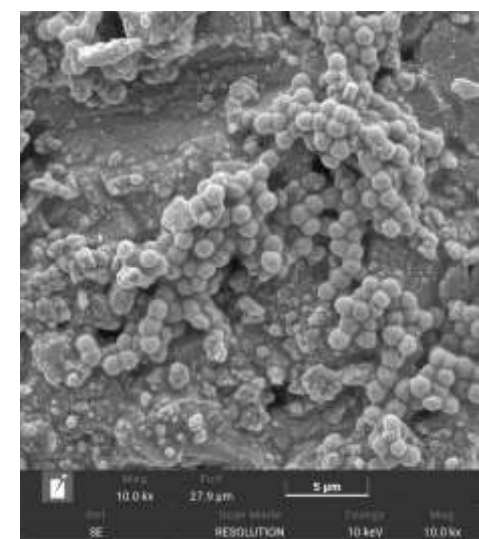
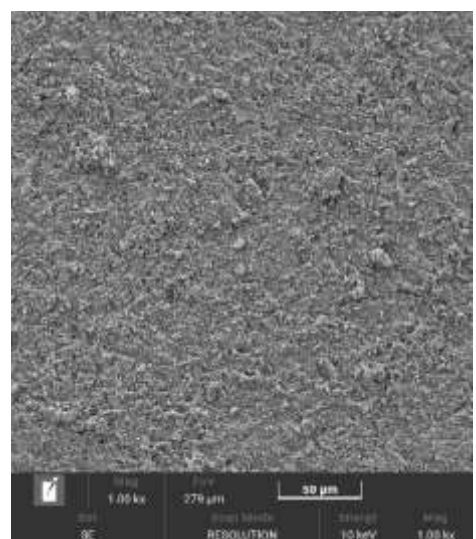
PIA



PIA_500



PIA_1500



Rysunek 56 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) eksponowane przez 4h, pow. 1000x i 10 000x, SEM

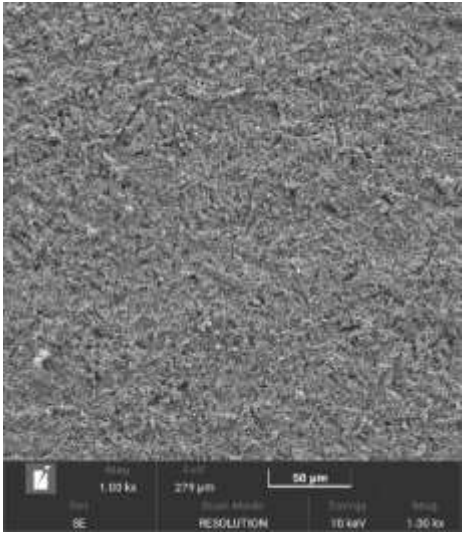
Analizując ilość bakterii szczepu *Escherichia coli* osiadających na powierzchni próbek przez 4h zaobserwowano podobną tendencję, jak w przypadku bakterii *S. aureus*, spadek ilości bakterii w przypadku próbek polerowanych, po naniesieniu coraz większej ilości cykli. Przy powiększeniu 10 000x, dla próbki POL_1500 zaobserwowano grudkowate skupiska, szczególnie w pobliżu pojedynczych bakterii. W przypadku próbek piaskowanych ilość bakterii osadzonych na powierzchni jest podobna w przypadku próbki PIA, jak i po modyfikacji powierzchni, natomiast w przypadku próbki PIA_1500 zauważono tworzenie się skupisk bakteryjnych i rozwój biofilmu- Rysunek 57.

Wariant

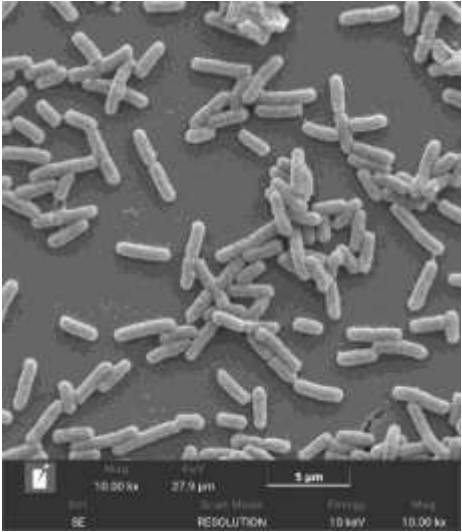
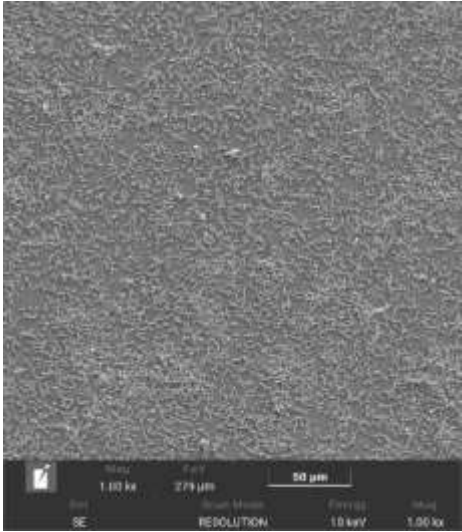
Pow. 1000x

Pow. 10 000x

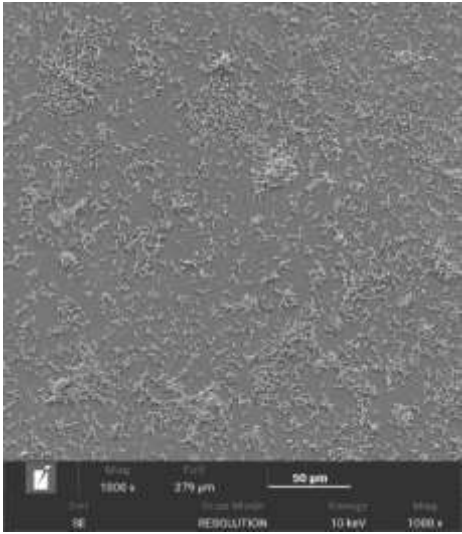
POL



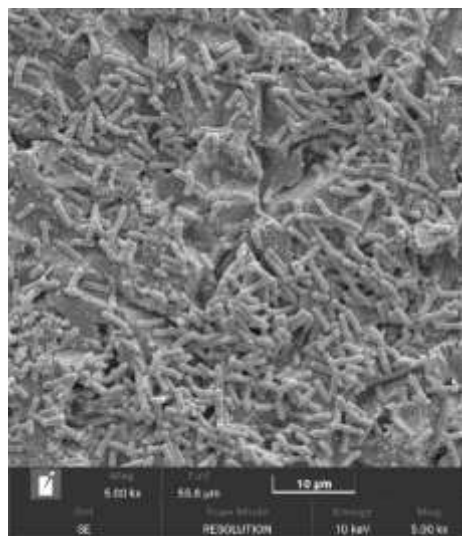
POL_500



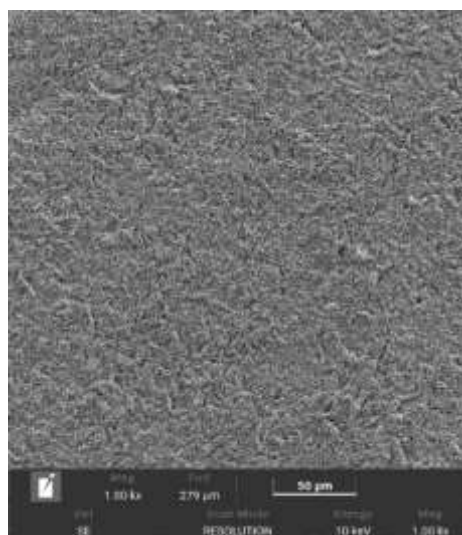
POL_1500



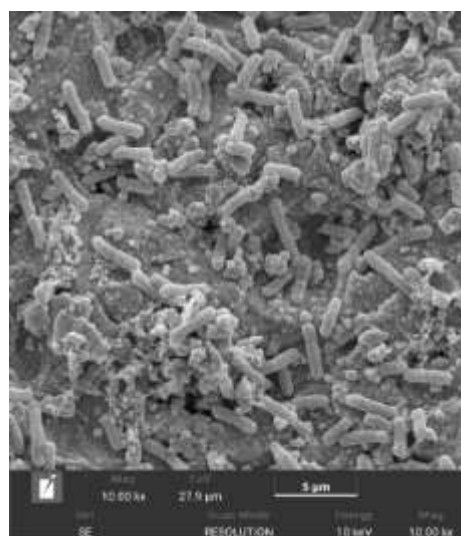
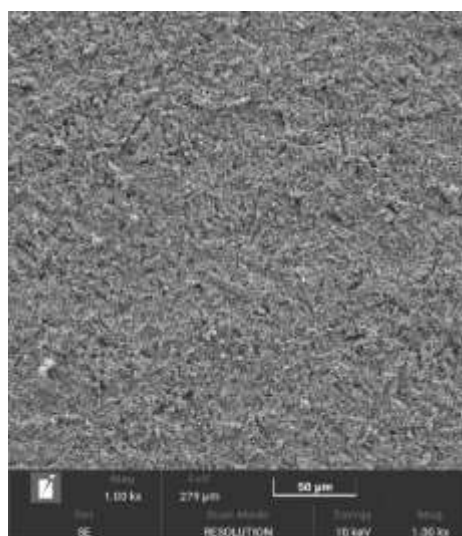
PIA



PIA_500



PIA_1500

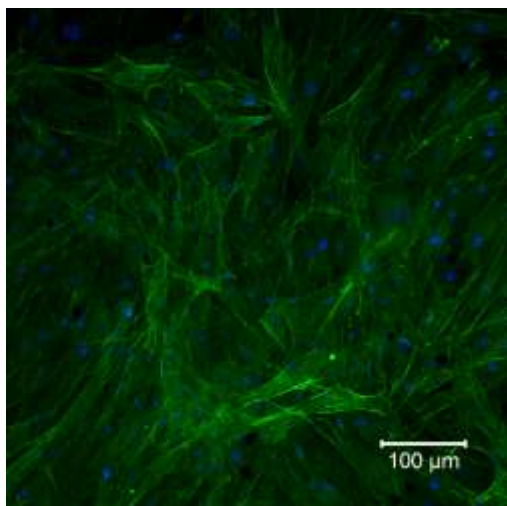


Rysunek 57 *Escherichia coli* (ATCC 25922) eksponowane przez 4h na powierzchni, pow. 1000x i 10000x, SEM

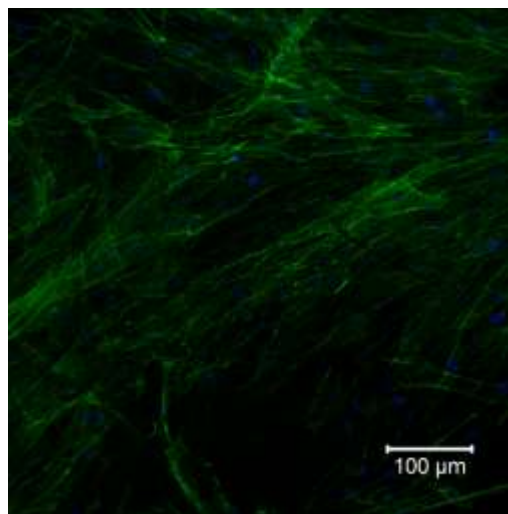
5.4.4. Badania proliferacji komórek

Wyniki przeprowadzonych badań proliferacji komórek przedstawiono na Rysunek 58. Analizując zdjęcia z mikroskopii konfokalnej, niezależnie od zastosowanego podłoża, można zaobserwować typowy prawidłowy wygląd fibroblastów z wrzecionowatym, wydłużonym kształtem oraz zróżnicowanym kierunkiem wydłużania. W obu przypadkach można zaobserwować liczne okrągłe lub owalne jądra komórkowe, niektóre w fazie podziału (zbliżone do siebie lub częściowo nakładające się niebieskie punkty). W przypadku powłoki można zauważyć większe zróżnicowanie cytoszkieletu.. Widoczne są również miejsca o zwiększonym zagęszczeniu jąder komórkowych.

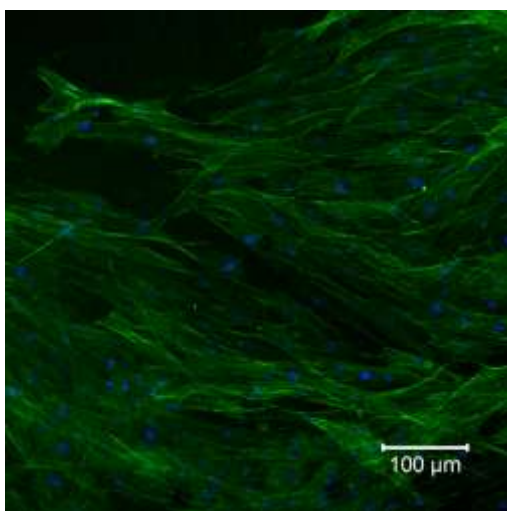
POL



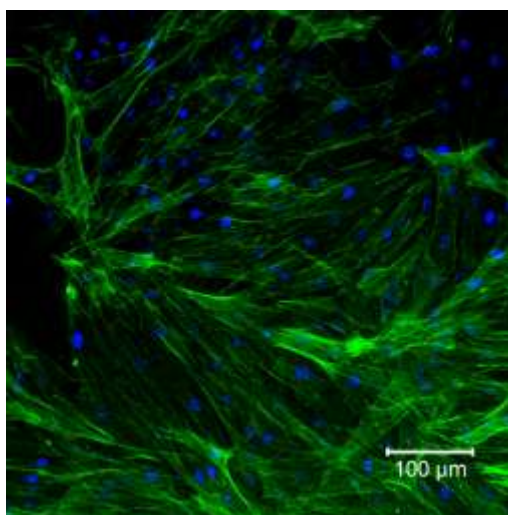
PIA



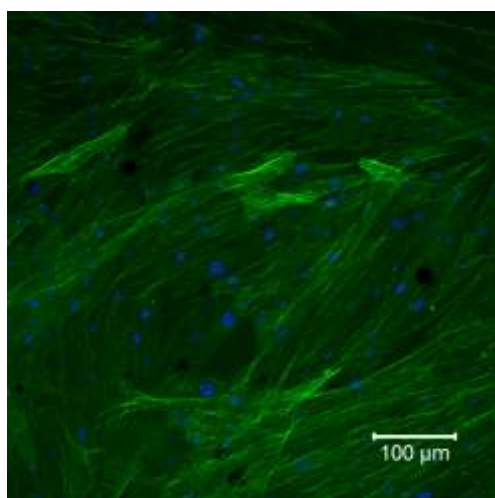
POL_500



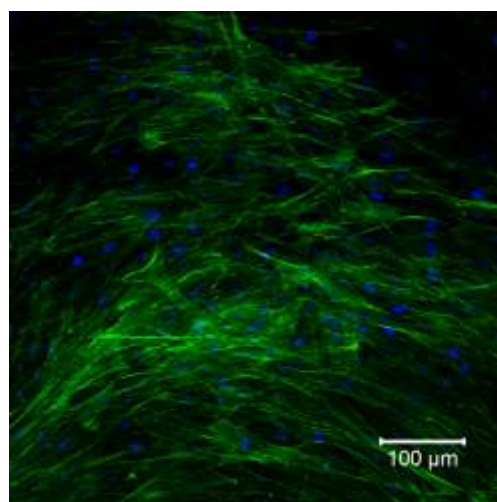
PIA_500



POL_1500



PIA_1500



Rysunek 58 Przykładowe zdjęcia badań proliferacji wykonane za pomocą skaningowego mikroskopu laserowego

6. Omówienie wyników badań

Biofilm bakteryjny to złożona i silnie adhezyjna struktura mikroorganizmów osadzona w macierzy zewnątrzkomórkowej, cechująca się wysoką odpornością zarówno na antybiotyki, jak i na odpowiedź immunologiczną gospodarza. Problematyka powstawania zakażeń bakteryjnych i biofilmu na powierzchni implantów jest ściśle związana z lokalizacją umieszczenia implantu, jego materiałem i geometrią. Własności powierzchni biomateriału, takie jak chropowatość, zwilżalność, skład chemiczny oraz energia powierzchniowa, mają decydujące znaczenie dla procesu tworzenia się biofilmu bakteryjnego.

Ograniczona skuteczność antybiotyków w zwalczaniu biofilmu spowodowała rozwój alternatywnych metod przeciwdziałania, obejmujących metody fizyczne (ultradźwięki, zmiany temperatury, pole magnetyczne), chemiczne (włączenie do materiału związków takich jak: PEG, chitozan, związki przeciwbakteryjne) oraz biologiczne (fagoterapia, enzymy, quorum quenching). Coraz większe znaczenie zyskuje jednak profilaktyczne podejście polegające na modyfikacji powierzchni biomateriałów w celu ograniczenia adhezji bakterii i formowania biofilmu.

W implantologii szczególną rolę odgrywa tytan i jego stopy, które cenione są za wysoką biokompatybilność, odporność korozyjną oraz własności mechaniczne. Najczęściej stosowany stop Ti-6Al-4V, mimo licznych zalet, zawiera pierwiastki toksyczne i pozostaje podatny na kolonizację bakteryjną. Opracowano więc kolejne generacje stopów, np. Ti-13Nb-13Zr, zawierające pierwiastki witalne (niob, cyrkon), które poprawiają biokompatybilność i obniżają moduł Younga. Niemniej jednak badania wskazują [75], [76], [78], [79], że także ten stop wymaga dodatkowych modyfikacji powierzchniowych w celu zwiększenia odporności na rozwój biofilmu.

Modyfikacje powierzchni biomateriałów tytanowych stosowane w implantach kostnych i stomatologicznych mają na celu zarówno poprawę własności fizykochemicznych i osteointegracji, jak i ograniczenie ryzyka infekcji. W przypadku implantów stomatologicznych istotna jest nie tylko część zakotwiczana w kości, czyli śruba, ale również łącznik oraz korona protetyczna, które razem tworzą kompletną konstrukcję. Część śródkostna musi charakteryzować się wysoką wytrzymałością mechaniczną, odpornością na korozję oraz odpowiednią chropowatością i energią powierzchniową sprzyjającą osteointegracji. Łącznik, będący strefą kontaktu z tkankami miękkimi, powinien minimalizować ryzyko powstawania mikroszczelin i kolonizacji

bakteryjnej, jednocześnie przenosząc znaczne obciążenia mechaniczne. Z kolei część naddziąsłowa, czyli korona, musi spełniać wymagania estetyczne, być odporna na zużycie i zapewniać prawidłową funkcję żucia. Z tego względu modyfikacje powierzchni w implantologii stomatologicznej nie ograniczają się wyłącznie do śruby, ale coraz częściej obejmują także łącznik, co pozwala poprawić integrację tkanek miękkich i zmniejszyć ryzyko periimplantitis. Stosowane technologie obejmują m.in. powłoki kompozytowe o łączonym działaniu antybakteryjnym i osteoindukcyjnym, mikrołukowe utlenianie czy osadzanie elektroforetyczne, pozwalające precyzyjnie kontrolować strukturę powierzchni. Wadą tych metod bywa jednak trudność w uzyskaniu jednorodnych powłok na powierzchniach o skomplikowanej geometrii, np. niewielkich implantach stomatologicznych.

Dotychczasowe badania nad powłokami antybakteryjnymi koncentrowały się na wykorzystaniu metali (srebro, miedź, cynk), związków organicznych czy materiałów hybrydowych. Mimo skutecznego działania przeciwdrobnoustrojowego ich stosowanie często wiąże się z ryzykiem cytotoksyczności lub ograniczoną trwałością. Obiecującą alternatywą jest zastosowanie tlenku cyny (SnO_2), który wykazuje silne właściwości bakteriobójcze i bakteriostatyczne przy niskiej toksyczności wobec komórek gospodarza [91], [92]. Dodatkowo jego struktura sprzyja tworzeniu powierzchni antyadhezyjnych, utrudniających rozwój biofilmu.

Szczególnie wartym uwagi rozwiązaniem jest połączenie właściwości cyny z technologią Atomic Layer Deposition (ALD), umożliwiającą nanoszenie cienkich, równomiernych powłok o grubości nanometrycznej, nawet na powierzchniach o złożonej i porowatej strukturze. Proces ten, oparty na sekwencyjnym osadzaniu powłoki z użyciem reaktywnych prekursorów, zapewnia pełne pokrycie bez ryzyka niekontrolowanego wzrostu warstw. Badania wskazują, że powłoki uzyskane metodą ALD zmniejszają przenikanie jonów metali i zużycie powierzchni implantów, ograniczając równocześnie reakcje zapalne [111], [112], [114], [115]. Tym samym ALD stanowi nowoczesną i skuteczną metodę modyfikacji powierzchni implantów, łączącą właściwości ochronne z działaniem antybakteryjnym.

Do tej pory nie osiągnięto jednak wieloaspektowości badań w przypadku stopu nowej generacji Ti-13Nb-13Zr, szczególnie w przypadku analizy nanoszonych powłok, takich jak TiO_2 , ZrO_2 czy jonów srebra (Ag) [111], [112], [114], [115]. Potwierdza to niewielka ilość publikacji w kontekście wyczerpania zagadnienia w zakresie

zastosowania w obrębie inżynierii biomedycznej. Nie ma opracowań, które dotyczą jednocześnie zagadnień związanych z własnościami fizykochemicznymi oraz biologicznymi. Jednocześnie nie ma informacji o parametrach nanoszenia powłoki, w szczególności tlenku cyny (IV), metodą ALD. Brakuje informacji dotyczących analizy struktury warstw powierzchniowych, adhezji powstałych warstw do podłoża, poziomu stężenia jonów pierwiastków stopowych z powierzchni do organizmu oraz odniesienia do własności biologicznych, w tym szczególnie istotnej adhezji bakterii do podłoża. Uniemożliwia to całościową ocenę badanego stopu wraz z powłoką, biorąc również pod uwagę zastosowanie w obrębie układu kostnego. Dotychczas nierozwiązanym problemem pozostaje kompleksowe wykonanie badań zawierające zarówno odniesienie do oceny własności fizykochemicznych oraz biologicznych ukazujących pełną charakterystykę uzyskanej warstwy powierzchniowej w warunkach kontaktu ze środowiskiem tkankowym. Dlatego też w ramach rozprawy doktorskiej zaproponowano kształtowanie własności fizykochemicznych stopu Ti-13Nb-13Zr poprzez naniesienie powłoki SnO_2 z wykorzystaniem niskotemperaturowej metody osadzania warstw atomowych metodą ALD.

W celu ujednolicenia dotychczas prowadzonych badań i uzyskania kompleksowego podejścia zaproponowano plan badań (Rysunek 19), który może przyczynić się do rozwiązania jednocześnie wszystkich zagadnień. Przedstawiony program badań obejmuje szereg badań pozwalających na ocenę własności fizykochemicznych i biologicznych.

W pracy zastosowano stop tytanu nowej generacji Ti-13Nb-13Zr. Stop ten jest obecnie wykorzystywany w przypadku implantów ortopedycznych i stomatologicznych. W pierwszym etapie zaproponowano wstępny proces obróbki powierzchni poprzez szlifowanie, a następnie przygotowanie dwóch wariantów: polerowanych (POL) oraz piaskowanych (PIA). Wariant polerowany jest szczególnie istotny w przypadku elementów implantów, które nie powinny trwale zrastać się z kością, np. łączników protetycznych lub komponentów czasowych. Gładka, wypolerowana powierzchnia ogranicza adhezję bakterii i tworzenie biofilmu, co może zmniejszać ryzyko rozwoju periimplantitis. Z kolei wariant piaskowany dedykowany jest elementom, które mają uzyskać stabilną i trwałą osteointegrację, jak w przypadku śruby implantu stomatologicznego osadzonej w kości. Zwiększona chropowatość powierzchni sprzyja adhezji komórek osteoblastów i przyspiesza proces integracji implantu z tkanką kostną.

Ze względu na niewielkie rozmiary oraz skomplikowaną geometrię implantów kostnych w kolejnym etapie zaproponowano dalszą modyfikację poprzez naniesienie powłoki SnO_2 metodą ALD. Ostatni etap przygotowania powierzchni obejmował sterylizację parową w temperaturze $T = 135\text{ }^\circ\text{C}$ i pod ciśnieniem $p = 2,1\text{ bar}$.

W pierwszym etapie przeprowadzanych badań scharakteryzowano naniesioną powłokę z wykorzystaniem metody XPS oraz FTIR. Przeprowadzono analizę składu chemicznego oraz ocenę grup funkcyjnych naniesionych powłok. Wyniki badań wskazują, że wytworzona powłoka jest jednorodna i składa się z tlenku cyny (IV). Wskazują na to wyróżnione dwa obszary energetyczne dotyczące zawartości cyny oraz tlenu. Jedynie w przypadku próbki polerowanej, przy użyciu 500 cykli (POL_500- Rysunek 22a) wykryto poziom energetyczny wskazujący na zawartość tytanu, co świadczy o wytworzeniu cienkiej warstwy pasywnej na powierzchni podłoża polerowanego (POL). Zawartość całkowita Sn rośnie wraz ze wzrostem liczby zastosowanych cykli, zarówno w przypadku wariantu próbek polerowanych (POL_500, POL_1500) jak i piaskowanych (PIA_500, PIA_1500)- Rysunek 23. Na podstawie badań stwierdzono, że wytworzona powłoka jest jednorodna, a w grupach funkcyjnych występują rodzaje tlenu: pochodzący z powłoki tlenku cyny (IV), po modyfikacji powierzchni oraz węgla organicznego, będącego pozostałością środka polerującego, używanego podczas przygotowania powierzchni podłoża (POL).

Obecność powłoki tlenku cyny (SnO_2) została potwierdzona również w analizie z zastosowaniem spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR), która pozwoliła na identyfikację kluczowych grup funkcyjnych na powierzchni modyfikowanych stopów tytanu. Widma dla obu typów próbek, zarówno polerowanych (POL_500, POL_1500) oraz piaskowanych (PIA_500, PIA_1500) wykazały charakterystyczne pasma drgań wiązań O-Sn-O oraz pozostałości substancji związanych z przygotowaniem powierzchni próbek (Rysunek 23). Zauważono, że zwiększenie liczby cykli nanoszenia powłoki przekłada się na wyższą intensywność pasm charakterystycznych dla SnO_2 . Sugeruje to, że grubsza powłoka daje silniejszy sygnał w widmie, co ułatwia jej identyfikację i potwierdza, że proces nanoszenia przebiega zgodnie z oczekiwaniami. Widma FTIR próbek polerowanych wykazały obecność śladowych ilości związków organicznych z roztworu stosowanego do polerowania. Z kolei na próbkach piaskowanych zaobserwowano pasma drgań Si-O, co wskazuje na pozostałości kulek szklanych użytych do przygotowania powierzchni piaskowanych.

Różnice w intensywności pasm między próbkami PIA i POL wynikają również z morfologii próbek. Na podstawie badań stwierdzono, że próbki polerowane mają bardziej jednorodną powierzchnię niż próbki piaskowane.

W badaniach mikrostruktury, z wykorzystaniem TEM, niezależnie od sposobu przygotowania powierzchni powłoka SnO_2 miała wyraźny, dwuwarstwowy charakter (Rysunek 24. Rysunek 26). Bezpośrednio na powierzchni podłoża osadziła się pierwsza warstwa o strukturze amorficznej (Obszar 1), co jest typowe dla początkowych etapów osadzania metodą ALD. Powyżej tej warstwy, powłoka przekształciła się w strukturę nanokrystaliczną (Obszar 2). Ten podział został potwierdzony obrazami o wysokiej rozdzielczości (HRTEM)- Rysunek 25, Rysunek 27. Kształt granicy między podłożem a powłoką był kluczowym elementem różnicującym obie próbki. W przypadku próbek polerowanych granica była prosta i równa, co wynikało z niskiej chropowatości podłoża- Rysunek 28. Natomiast próbki piaskowane miały nierówną, pofałdowaną granicę, co było bezpośrednim efektem wcześniejszego procesu piaskowania- Rysunek 29. Analiza składu chemicznego wzdłuż linii prostopadłej do powierzchni (EDS) wykazała, że powłoka SnO_2 izoluje pierwiastki stopowe na powierzchni biomateriału. Na podstawie badań stwierdzono, że mikrostruktura powłoki SnO_2 na stopie tytanu ma charakter dwuwarstwowy, co jest zgodne z mechanizmem osadzania ALD. Proces przygotowania podłoża determinuje morfologię układu powłoka- podłoże.

Badania własności optycznych powłok tlenku cyny (SnO_2), przy użyciu elipsometrii wykazały kluczowe różnice pomiędzy podłożem (POL, PIA), a wariantami po modyfikacji powierzchni (POL_500, POL_1500 oraz PIA_500, PIA_1500), co pozwoliło na precyzyjne określenie ich grubości (Rysunek 31). Do analizy własności powłoki zastosowano złożony model optyczny, który uwzględniał cechy zarówno ciała stałego (model Tanguy'ego), jak i swobodne elektrony (model Drude'a). To połączenie pozwoliło na dokładne scharakteryzowanie własności optycznych powłok, które nie były typowe dla czystego tlenku cyny. Stwierdzono, że przerwa optyczna opracowanych powłok SnO_2 jest znacząco niższa niż w przypadku czystego SnO_2 z baz danych. Ta różnica może wynikać z defektów w strukturze powłoki lub innych czynników związanych z procesem osadzania. Dodatkowo, powłoki wykazały udział swobodnych elektronów, co jest typowe dla materiałów półprzewodnikowych w niskiej energii fotonów. Na podstawie modelu optycznego udało się precyzyjnie wyznaczyć grubość powłok. Na podstawie badań stwierdzono, że zwiększenie liczby cykli osadzania z 500 do 1500 powoduje ponad

dwukrotny wzrost grubości powłoki. Grubości cienkich powłok wynoszą odpowiednio 37 nm dla 500 cykli, zarówno w przypadku próbki POL_500 oraz PIA_500 (Rysunek 31a) i 94 nm dla 1500 cykli, dla próbek POL_1500 oraz PIA_1500 (Rysunek 31b). Zauważono jednak, że wzrost ten nie był liniowy, co może być spowodowane nieliniowym wzrostem powłoki w początkowych etapach procesu ALD.

Z punktu widzenia oceny potencjalnego zastosowania badanych wariantów, kluczowe znaczenie ma także przyczepność powłoki do podłoża. Badania adhezji powłoki tlenku cyny (SnO_2) do podłoża wykazały różnice związane ze sposobem przygotowania powierzchni. Wykazano, że powłoka na powierzchniach polerowanych charakteryzowała się lepszą adhezją w porównaniu do powłoki naniesionej na powierzchnie piaskowane. Sugeruje to, że podłoże (POL) o niższej chropowatości, sprzyja powstawaniu mocniejszego wiązania powłoki z podłożem (Tabela 9). Zaobserwowany brak sygnału emisji akustycznej sugeruje, że energia wiązania była zbyt niska, by wywołać typowe dla tego rodzaju testów pęknięcia i odrywanie się warstwy. Pomimo braku sygnału akustycznego, obserwacje za pomocą mikroskopii akustycznej (SAM) nie wykazały żadnych defektów ani delaminacji powłoki na wariantach próbek polerowanych (POL_500, POL_1500) oraz piaskowanych (PIA_500, PIA_1500)- Rysunek 33. Świadczy to o ciągłości powłoki i braku widocznych gołym okiem pęknięć czy rozwarstwień. W przypadku próbek piaskowanych, obrazy z SAM uwidoczniły jedynie nierówności powierzchni, co jest zgodne z procesem ich przygotowania. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że powłoka SnO_2 jest ciągła i przylega do podłoża. Stwierdzono, że przygotowanie powierzchni przez polerowanie zapewnia lepszą adhezję niż piaskowanie.

W przypadku implantów ortopedycznych i stomatologicznych ważnym zagadnieniem jest również odporność powłoki na zużycie. W ramach oceny własności mechanicznych analizowanych powłok przeprowadzono dodatkowo badania tribologiczne, w tym testy tarcia (TDF, PBS) oraz analizę zużycia powierzchni. Badania wykazały, że zarówno modyfikacja powierzchni, jak i warunki przeprowadzenia testu mają nieznaczny wpływ na odporność na zużycie. Zaobserwowano, że naniesienie powłoki tlenku cyny (SnO_2) obniża średni współczynnik tarcia, zarówno w warunkach tarcia technicznie suchego (TDF), jak i na mokro (PBS) dla wszystkich badanych wariantów. Wartości współczynnika tarcia były niższe we wszystkich wariantach próbek testowanych w warunkach symulujących płyn ustrojowy (PBS). Najwyższe wartości

współczynnika tarcia odnotowano dla próbek bez powłoki, zwłaszcza dla tych o nierównej powierzchni (piaskowanych) (Rysunek 34). Obserwacje mikroskopu elektronowego (SEM) wykazały widoczne rysy i bruzdy, powstałe w wyniku ruchu produktów zużycia w strefie tarcia (Rysunek 35, Rysunek 36). Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono zmniejszenie współczynnika tarcia, tym samym zwiększenie odporności na zużycie próbek po naniesieniu powłoki SnO₂.

Bezpośrednio po wszczepieniu implant ma pierwszy kontakt z płynami ustrojowymi, które w przeważającej części składają się z wody. W związku z tym istotnym parametrem jest charakter i zwilżalność powierzchni. Aby zapewnić implantowi możliwość osteointegracji powierzchnia powinna wykazywać charakter hydrofilowy. Badania te wykazały (Tabela 10), że wszystkie próbki, zarówno polerowane (POL), jak i piaskowane (PIA) jak i z powłoką (POL_500, POL_1500 oraz PIA_500, PIA_1500) miały charakter hydrofilowy, co jest korzystne w kontekście integracji z tkankami biologicznymi. Jednakże, wraz ze wzrostem grubości powłoki (zwiększeniem liczby cykli nanoszenia), zaobserwowano wzrost kąta zwilżania wodą- Rysunek 38. Powierzchnia stawała się mniej hydrofilowa, chociaż wciąż pozostawała w granicach 90 stopni. W środowisku wodnym większą adhezję bakterii obserwuje się w przypadku powierzchni hydrofobowych [127]. Wzrost liczby cykli nanoszenia powłoki spowodował również wzrost kąta zwilżania diiodometanem, zarówno dla próbek polerowanych, jak i piaskowanych. Wskazuje to również na zmiany komponentów energii powierzchniowej związanych z oddziaływaniami dyspersyjnymi. Modyfikacja powierzchni poprzez nałożenie powłoki SnO₂ doprowadziła do zmniejszenia całkowitej energii powierzchniowej (Tabela 10). Zależność ta była widoczna dla obu typów próbek i korelowała ze wzrostem liczby cykli nanoszenia. Mniejsza energia powierzchniowa może wpływać na adhezję białek oraz zmniejszać ryzyko powstawania biofilmu bakteryjnego. Co więcej hydrofilowa powierzchnia w przypadku wszystkich wariantów promuje własności osteokonduktywne. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że naniesienie powłoki SnO₂ zmienia własności powierzchni, powodując, że jest ona mniej hydrofilowa i charakteryzuje się niższą wartością energii powierzchniowej.

Implanty stosowane w obrębie układu kostnego powinny wykazywać również własności osteokonduktywne, które są ściśle związane z chropowatością oraz zwilżalnością powierzchni. Im wyższa chropowatość, tym lepsze zapewnienie procesu osteointegracji między kością a implantem. Otrzymane powłoki, w przypadku próbek

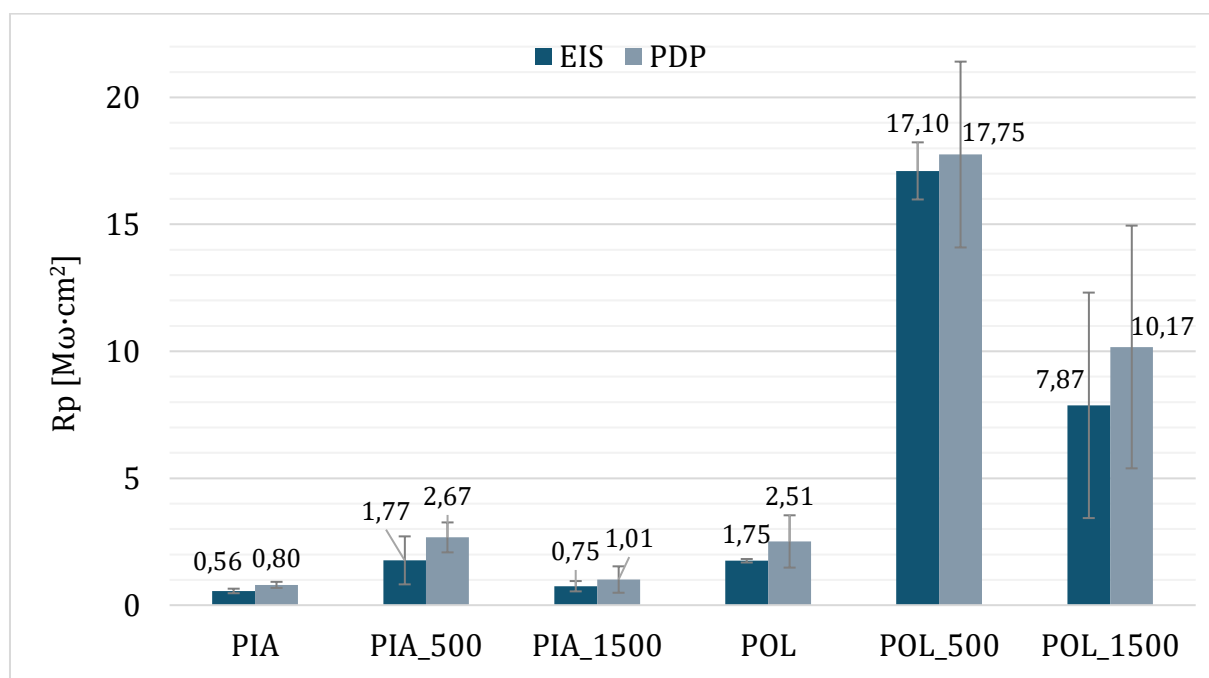
piaskowanych (PIA_500, PIA_1500) charakteryzują się zbliżonymi wartościami parametru chropowatości (Tabela 11), do sugerowanych, najlepszych własności osteokonduktywnych mieszczących się w granicach $R_a = 0,1-0,3\mu\text{m}$.

Badania topografii powierzchni przy użyciu różnych technik (mikroskopia skaningowa, mikroskopia sił atomowych, profilometria optyczna) wykazały, że powierzchnia polerowana przed nałożeniem powłoki jest gładka i jednorodna. Zauważono jednak, że nawet niewielka grubość powłoki (POL_500, PIA_500) wprowadziła zróżnicowanie morfologii (Rysunek 40b, Rysunek 41b), podczas gdy grubsza powłoka (POL_1500, PIA_1500) doprowadziła do ujednolicenia powierzchni, redukując jej chropowatość i nierówności (Rysunek 40c, Rysunek 41c). Wzrost liczby cykli (POL_1500, PIA_1500) spowodował, że powierzchnia stała się jeszcze bardziej heterogeniczna, z drobnymi, ziarnistymi strukturami pokrywającymi jej obszar. Najmniejszą wartość chropowatości osiągnięto dla próbki polerowanej z najgrubszą powłoką ($R_a = 0,02\mu\text{m}$). Naniesienie powłoki na próbki polerowane nieznacznie zmniejszyło ich chropowatość lub utrzymało ją na podobnym poziomie. W przypadku próbek piaskowanych, naniesienie powłoki spowodowało wzrost wartości chropowatości. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że topografia powierzchni jest ściśle związana ze sposobem jej przygotowania (Rysunek 39, Rysunek 40).

Ze względu na kluczowe znaczenie odporności korozyjnej w zastosowaniach implantologicznych oraz zwiększone ryzyko wystąpienia zarówno korozji wżerowej, jak i szczelinowej w środowisku organizmu, zdecydowano się na kompleksową ocenę zachowania badanych wariantów powierzchni. Materiał został poddany działaniu roztworu symulującego płyny ustrojowe, a następnie przeprowadzono badania odporności na korozję wżerową oraz analizę zjawisk elektrochemicznych zachodzących na powierzchni próbek metodą spektroskopii impedancyjnej (EIS). Dodatkowo wykonano testy odporności na korozję szczelinową, co pozwala na ocenę zachowania materiału w warunkach odzwierciedlających wąskie przestrzenie kontaktu charakterystyczne dla implantów stomatologicznych i ortopedycznych, gdzie brak odpowiedniej odporności może prowadzić do miejscowego uszkodzenia materiału i utraty integralności połączenia z tkanką. Nałożenie powłoki tlenku cyny (SnO_2) na stop tytanu znacząco poprawia jego odporność na korozję w warunkach symulujących środowisko biologiczne. Proces ALD jest skuteczniejszy na polerowanych

powierzchniach, które pozwalają na utworzenie bardziej stabilnej i ochronnej warstwy. Uzyskane wyniki są zgodne z danymi badań potencjodynamicznych (PDP) i potwierdzają hipotezę dotyczącą stanu powierzchni (piaskowanej/polerowanej) przed nałożeniem powłok SnO₂. Zazwyczaj możliwe jest wyodrębnienie pojemności efektywnych (C_{eff}) z par RQ zgodnie z wyrażeniami opisanymi przez Bruga (1). W badaniu uzyskanie C_{eff} z Q_c jest skomplikowane przez impedancję Warburga połączoną szeregowo z R_{po} i R_{ct} . Z tego względu analiza ogranicza się do założenia przybliżonej równości między Q_c i C_{eff} , przynajmniej pod względem rzędów wielkości wartości dla różnych typów próbek. Można zatem stwierdzić, że biorąc pod uwagę znacznie większe wartości Q_c serii próbek piaskowanych i pokrytych SnO₂ w porównaniu z próbkami polerowanymi, ich powierzchnia wystawiona na działanie elektrolitu podczas badania jest również znacznie większa. Grubość powłok SnO₂ powinna być odwrotnie proporcjonalna do wartości Q_c zarówno dla serii próbek PIA, jak i POL, co nie ma miejsca. Może to sugerować, że grubsze powłoki są obciążone większą ilością wad procesowych w porównaniu z serią 500 cykli. Ponadto występuje również zależność między grubością powłoki a R_{po} lub R_{ct} zarówno dla serii PIA, jak i POL (Tabela 14). R_{po} wzrasta wraz z grubością, podczas gdy R_{ct} maleje. Możliwe, że w przypadku cieńszych wariantów powłok układ SnO₂-podłoże jest chroniony w większym stopniu niż w przypadku grubszych warstw, stąd wyższy R_{ct} (mniejsza powierzchnia aktywnych miejsc korozji). W przypadku grubszych warstw obszar, na którym może dojść do inicjacji korozji, jest większy (niższe R_{ct}). Jednak tworzenie się produktów korozji skutecznie uszczelnia bardziej wadliwą strukturę tych powłok, powodując wyższą odporność elektrolitu w porach warstw (wyższe R_{po}). Suma zidentyfikowanych oporów może być traktowana jako opór polaryzacyjny ($R_p(EIS) = R_S + R_{po} + R_{ct}$) i odpowiada ogólnej odporności na korozję danego wariantu powierzchni, podobnie jak R_p określony przez PDP. Graficzne porównanie wartości odpowiadających sobie nawzajem przedstawiono na Rysunek 59. Na podstawie wyników stwierdzono, że polerowanie jest bardziej korzystną obróbką wstępną, zapewniającą poprawę odporności na korozję w porównaniu z bardziej chropowatą powierzchnią. Stwierdzenie to dotyczy również powierzchni pokrytych SnO₂. Zaobserwowano również, że warstwy ALD utworzone podczas procesu przy użyciu 500 cykli są lepsze niż grubsze powłoki wytworzone w procesie 1500 cykli, co jest zgodne z powyższym wyjaśnieniem, gdzie grubości powłok wynoszą odpowiednio 37 nm dla 500 cykli, zarówno w przypadku

próbki POL_500 oraz PIA_500 (Rysunek 31a) i 94 nm dla 1500 cykli, dla próbek POL_1500 oraz PIA_1500 (Rysunek 31b).



Rysunek 59 Porównanie wyników odporności na polaryzację badanych próbek określonej metodami elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej i polaryzacji potencjodynamicznej

Badania odporności na korozję szczelinową potwierdziły, że wszystkie badane warianty, niezależnie od sposobu przygotowania powierzchni czy naniesienia powłoki, wykazują wysoką odporność na korozję szczelinową (Tabela 13). Analiza przebiegu zmian gęstości prądu w funkcji czasu w warunkach polaryzacji powierzchni wykazała, że żaden z badanych wariantów nie uległ korozji wewnątrz szczelin.

Zastosowanie stopu Ti-13Nb-13Zr niesie ze sobą ryzyko uwalniania jonów poszczególnych pierwiastków. Jednak tym samym poprawiać biokompatybilność stopu poprzez ograniczenie przenikania jego produktów degradacji do środowiska tkankowego. W celu oceny tego zjawiska przeprowadzono analizę spektrometryczną próbek poddanych 3, 6 oraz 9 tygodniowej ekspozycji w roztworze PBS.

W modelach in vitro i in vivo te przedziały odpowiadają istotnym etapom gojenia się tkanek:

- 3 tygodnie – faza wstępnej integracji implantu, proliferacja komórek,
- 6 tygodni – wstępna stabilizacja, początek remodelingu tkanki,
- 9 tygodni – bardziej dojrzała odpowiedź biologiczna.

We wszystkich badanych wariantach, zarówno tych z powłoką, jak i bez niej, zaobserwowano znikome uwalnianie jonów tytanu, niobu i cyrkonu do roztworu. Świadczy to o dużej stabilności chemicznej stopu Ti-13Nb-13Zr w warunkach symulujących środowisko biologiczne. Nałożenie powłoki tlenku cyny (SnO_2) dodatkowo zmniejszyło uwalnianie jonów zarówno ze stopu tytanu, jak i samej powłoki (jony cyny). Na tej podstawie stwierdzono, że naniesiona powłoka działa jako bariera ochronna, zapobiegając kontaktowi podłoża z agresywnym środowiskiem i minimalizując ryzyko wystąpienia reakcji w organizmie. Stwierdzono, że im grubsza powłoka (większa liczba cykli ALD), tym skuteczniejsza jest ochrona przed uwalnianiem jonów. Redukcja uwalniania dotyczyła zarówno pierwiastków stopowych, jak i jonów cyny z samej powłoki (Rysunek 48-51). Zaobserwowano, że powierzchnie polerowane wykazują lepsze własności ochronne, co skutkuje mniejszym uwalnianiem jonów cyny do roztworu. Wskazuje to, że gładkie podłoże pozwala na utworzenie bardziej odpornej na przenikanie jonów i jednolitej powłoki.

Celem badań własności biologicznych przygotowanych wariantów próbek i powłok było określenie ich biokompatybilności oraz wpływu na komórki i mikroorganizmy, co pozwala na określenie bezpieczeństwa i skuteczności potencjalnego zastosowania w organizmie. Wszystkie materiały stosowane na implanty muszą wykazywać brak działania cytotoksycznego. Przeprowadzone badania cytotoksyczności pozwoliły na stwierdzenie, że próbki polerowane (POL) wykazały cytokompatybilność, z przeżywalnością komórek na poziomie 100% (Rysunek 53). Naniesienie powłoki SnO_2 na te próbki (POL_500, POL_1500) nieznacznie obniżyło żywotność komórek, ale wciąż pozostawała ona na bardzo wysokim poziomie (powyżej 90%). W przypadku próbek piaskowanych (PIA) zaobserwowano znacznie niższą przeżywalność komórek. Wariant piaskowany bez powłoki i z grubsza powłoką (PIA_1500) wykazała efekt cytotoksyczny, oznaczający spadek żywotności komórek o ponad 30% w porównaniu do próby kontrolnej zgodnie z normą ISO 10993-5 [126]. Jest to najprawdopodobniej związane z wartościami parametru R_a chropowatości powierzchni piaskowanej. Na podstawie

przeprowadzonych badań stwierdzono, że naniesienie powłoki SnO₂ na gładką, polerowaną powierzchnię nie wywołuje efektu cytotoksycznego i zachowuje wysoką biokompatybilność. Natomiast w przypadku powierzchni o większej wartości parametru Ra dla chropowatości, przygotowanych przez piaskowanie, powłoka może w różnym stopniu wpływać na żywotność komórek, a w niektórych przypadkach prowadzić do efektów cytotoksycznych.

Cytokiny prozapalne są odpowiedzialne za zapoczątkowanie odpowiedzi immunologicznej w organizmie podczas infekcji, wystąpienia uszkodzenia tkanki czy choroby. Przeprowadzone badania cytokin prozapalnych wykazały zróżnicowany wpływ na poziom cytokin prozapalnych dla wariantów bez powłoki, czyli podłoża (POL i PIA) (Rysunek 54, Rysunek 55). Podwyższony poziom tych cytokin zaobserwowano w przypadku podłoża piaskowanego (PIA), co sugeruje, że jego topografia wywołuje silniejszą odpowiedź zapalną organizmu w porównaniu do gładkiego podłoża polerowanego (POL). Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że niezależnie od sposobu przygotowania podłoża (POL, PIA), naniesienie powłoki tlenku cyny (SnO₂) spowodowało obniżenie poziomu wszystkich badanych cytokin prozapalnych (POL_500, POL_1500, PIA_500, PIA_1500). Chropowata powierzchnia piaskowanego wariantu (PIA_500, PIA_1500) wywołuje silniejszą reakcję zapalną. Z kolei naniesienie powłoki SnO₂ na powierzchnię polerowaną (POL_500, POL_1500) skutecznie redukuje tę reakcję. Pozwala to na stwierdzenie, że zawarta w powłoce substancja aktywna działa w sposób przeciwzapalny oraz może ograniczać infekcje.

Ze względu na to, że implanty są wprowadzane do środowiska naturalnie zasiedlonego przez mikroorganizmy zarówno w jamie ustnej jak i w obrębie układu kostnego kluczowe znaczenia ma ocena podatności materiału na kolonizację bakterii. Badania adhezji bakterii wykazały, że modyfikacja powierzchni ma znaczący wpływ na zdolność mikroorganizmów przylegania do próbki, a efekt ten jest zależny od sposobu przygotowania podłoża. Stwierdzono, że naniesienie powłoki tlenku cyny (SnO₂) spowodowało zmniejszenie liczby zaadherowanych bakterii (Rysunek 56, Rysunek 57). Co więcej, efekt ten był bardziej widoczny wraz ze wzrostem grubości powłoki, co sugeruje, że grubsza warstwa lepiej zapobiega przyleganiu bakterii. W przeciwieństwie do próbek polerowanych (POL), po modyfikacji powierzchni (POL_500, POL_1500), w przypadku powierzchni piaskowanych (PIA) naniesienie powłoki (PIA_500, PIA_1500) nie przyniosło znaczących korzyści w zmniejszeniu adhezji bakterii. Oznacza to, że

chropowatość powierzchni jest kluczowym czynnikiem, który sprzyja przyleganiu bakterii, a sama powłoka SnO_2 nie jest w stanie w pełni zniwelować tego efektu. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że powłoka tlenku cyny (SnO_2) jest skuteczna w ograniczaniu adhezji bakterii, ale tylko na powierzchniach polerowanych, o małej wartości parametru Ra- chropowatości.

Ocena biokompatybilności materiału stanowi kolejny etap weryfikacji jego przydatności w implantologii, ponieważ umożliwia określenie, czy powierzchnia wspiera prawidłowe funkcjonowanie komórek gospodarza. Szczególną rolę odgrywają tu fibroblasty, które uczestniczą w tworzeniu i przebudowie tkanki łącznej, a tym samym w procesie gojenia i integracji implantu z otaczającymi tkankami miękkimi. Badania proliferacji komórek na powierzchni próbek przeprowadzono z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej. Badania pozwoliły na ocenę ich zdolności do wspierania wzrostu komórkowego i prawidłowego funkcjonowania fibroblastów. Niezależnie od rodzaju podłoża, wszystkie warianty wspierały prawidłowy wzrost komórek. Obserwowane fibroblasty miały typowy, wrzecionowaty i wydłużony kształt, a ich orientacja była zróżnicowana. Wskazuje to, że ani modyfikacja powierzchni (POL_500, POL_1500, PIA_500, PIA_1500), ani rodzaj podłoża (POL, PIA) nie wywierały negatywnego wpływu na podstawowe procesy komórkowe. Widoczne na zdjęciach liczne, okrągłe lub owalne jądra komórkowe, a także jądra w fazie podziału (blisko położone lub częściowo nakładające się) świadczą o aktywnej proliferacji komórek na wszystkich badanych powierzchniach (Rysunek 58). Wskazuje to, że materiały te są biokompatybilne i sprzyjają namnażaniu się komórek. W przypadku próbek z naniesioną powłoką, zaobserwowano większe zróżnicowanie cytoszkieletu oraz miejsca o zwiększonym zagęszczeniu jąder komórkowych. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że powłoka ma wpływ na adhezję i organizację komórek, co jest zjawiskiem korzystnym. Wszystkie badane warianty materiałów wykazują wysoką biokompatybilność i wspierają prawidłowy wzrost oraz proliferację fibroblastów.

Reasumując, przeprowadzone badania potwierdziły słuszność przyjętej tezy. Możliwe jest wytworzenie wielofunkcyjnej powłoki na bazie cyny metodą osadzania warstw atomowych na podłożu ze stopu Ti-13Nb-13Zr o własnościach fizykochemicznych dostosowanych do zastosowania w układzie kostnym, czy stomatognatycznym, zapewniających ograniczenie adhezji bakterii na jego powierzchni. Na podstawie wyników przeprowadzonych badań można stwierdzić, że analizowana

powłoka SnO₂, naniesiona na stop Ti-13Nb-13Zr w opisanych warunkach, stanowi obiecujący kierunek do poprawy własności implantów stosowanych w układzie kostnym. Wyniki badań biologicznych wskazują na przydatność powłoki tlenku cyny w zakresie ograniczania adhezji bakterii, cytotoksyczności czy poprawy proliferacji komórek. Uzyskane wyniki z przeprowadzonych badań wskazują na potrzebę rozwiązania następujących zagadnień:

- wytworzenie powłoki o większej grubości przy jednoczesnym zachowaniu własności fizykochemicznych,
- przeprowadzenie badań ilościowych dotyczących adhezji bakterii
- przeprowadzenie badań jakościowych i ilościowych określenia zdolności szczepu grzybów *Candida albicans* do adhezji do badanej powierzchni
- przeprowadzenie badań ilościowych dotyczących proliferacji komórek.

7. Wnioski

1. Zastosowanie metody ALD pozwoliło uzyskać jednorodne powłoki SnO₂, których grubość wzrastała wraz z liczbą cykli (37 nm dla 500 cykli i 94 nm dla 1500 cykli). Powłoki te charakteryzowały się korzystnymi właściwościami mechanicznymi, w tym dobrą adhezją do podłoża oraz odpornością na zużycie ściernie.
2. Ocena topografii powierzchni powłoki SnO₂ wykazała tendencję do dziedziczenia parametrów stereometrycznych powierzchni stopu Ti-13Nb-13Zr ukształtowanej przez zabiegi poprzedzające proces jej nanoszenia.
2. Wytworzona powłoka SnO₂ pełni skuteczną funkcję bariery chroniącej przed wpływem środowiska zewnętrznego, co potwierdzono ograniczeniem przenikania jonów stopu Ti-13Nb-13Zr oraz jonów powłoki SnO₂ do roztworu PBS. Jej własności barierowe zostały dodatkowo zweryfikowane w badaniach potencjostatycznych i potencjodynamicznych, wykazując poprawę odporności na korozję wżerową i zapewnienie odporności na korozję szczelinową.
3. Powłoka SnO₂ spowodowała zmniejszenie wartości kąta zwilżania w przypadku próbek polerowanych, pozostawiając charakter hydrofilowy powierzchni, co jest zjawiskiem korzystnym, ograniczając tym samym, ilość cytokin prozapalnych a w konsekwencji adhezję bakterii *S. aureus* i *E. Coli* do podłoża.
5. Zastosowana powłoka SnO₂ nanoszona metodą ALD nie zaburza morfologii fibroblastów, umożliwiając ich prawidłową proliferację i prawidłową organizację cytoszkieletu, co jest zjawiskiem korzystnym w przypadku aktywności metabolicznej komórek.
6. Uzyskane wyniki wskazują na potrzebę rozszerzenia programu badań w kontekście gotowego wyrobu. Obiecujące wyniki badań biologicznych dają podstawę do badań nad możliwością zastosowania zaproponowanej modyfikacji powierzchni na implanty stosowane w chirurgii kostnej. Z punktu widzenia aplikacyjnego najkorzystniejsze własności fizykochemiczne i biologiczne zapewnia powłoka SnO₂ naniesiona na stop Ti-13Nb-13Zr uprzednio poddany procesowi polerowania.

7. Najkorzystniejsze własności fizykochemiczne oraz biologiczne zapewnia powłoka SnO_2 naniesiona na stop Ti-13Nb-13Zr (uprzednio poddany procesowi polerowania) przy 1500 cyklach procesu nanoszenia w temperaturze 230- 240 °C.

Podsumowując, potwierdzono tezę pracy, że możliwe jest opracowanie warunków wytwarzania antybakteryjnych powłok na bazie cyny metodą osadzania warstw atomowych na powierzchni stopu Ti-13Nb-13Zr o własnościach fizykochemicznych odpowiednich do zastosowania w obrębie układu kostnego, zapewniających **podwyższenie oporności na kolonizację mikrobiologiczną.**

Bibliografia

- [1] E. Czyżewska-Dors, A. Dors, i M. Pomorska-Mól, „Właściwości biofilmu bakteryjnego warunkujące oporność na antybiotyki oraz metody jego zwalczania”, 2018.
- [2] P. Mayer, A. C. Smith, J. Hurlow, B. R. Morrow, G. A. Bohn, i P. G. Bowler, „Assessing Biofilm at the Bedside: Exploring Reliable Accessible Biofilm Detection Methods”, *Diagnostics*, t. 14, nr 19, s. 2116, wrz. 2024, doi: 10.3390/diagnostics14192116.
- [3] M. Jamal *et al.*, „Bacterial biofilm and associated infections”, *J. Chin. Med. Assoc.*, t. 81, nr 1, s. 7–11, sty. 2018, doi: 10.1016/j.jcma.2017.07.012.
- [4] S. Sharma, J. Mohler, S. D. Mahajan, S. A. Schwartz, L. Bruggemann, i R. Aalinkeel, „Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment”, *Microorganisms*, t. 11, nr 6, s. 1614, cze. 2023, doi: 10.3390/microorganisms11061614.
- [5] B. Wu *et al.*, „Human organoid biofilm model for assessing antibiofilm activity of novel agents”, *Npj Biofilms Microbiomes*, t. 7, nr 1, sty. 2021, doi: 10.1038/s41522-020-00182-4.
- [6] H.-C. Flemming, J. Wingender, i U. Szewzyk, Red., *Biofilm Highlights*. w Springer Series on Biofilms. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. doi: 10.1007/978-3-642-19940-0.
- [7] K. P. Rumbaugh, „How well are we translating biofilm research from bench-side to bedside?”, *Biofilm*, t. 2, s. 100028, grudz. 2020, doi: 10.1016/j.biofilm.2020.100028.
- [8] S. Cometta, D. W. Hutmacher, i L. Chai, „In vitro models for studying implant-associated biofilms - A review from the perspective of bioengineering 3D microenvironments”, *Biomaterials*, t. 309, s. 122578, wrz. 2024, doi: 10.1016/j.biomaterials.2024.122578.
- [9] L. Karygianni, Z. Ren, H. Koo, i T. Thurnheer, „Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities”, *Trends Microbiol.*, t. 28, nr 8, s. 668–681, sie. 2020, doi: 10.1016/j.tim.2020.03.016.
- [10] A. Zhao, J. Sun, i Y. Liu, „Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies”, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, t. 13, kwi. 2023, doi: 10.3389/fcimb.2023.1137947.
- [11] M. B. Miller i B. L. Bassler, „Quorum Sensing in Bacteria”.
- [12] A. T. Poortinga, R. Bos, i H. J. Busscher, „Controlled electrophoretic deposition of bacteria to surfaces for the design of biofilms”, *Biotechnol. Bioeng.*, t. 67, nr 1, s. 117–120, sty. 2000, doi: 10.1002/(sici)1097-0290(20000105)67:1%3C117::aid-bit14%3E3.0.co;2-6.
- [13] A. T. Poortinga, R. Bos, i H. J. Busscher, „Reversibility of Bacterial Adhesion at an Electrode Surface”, *Langmuir*, t. 17, nr 9, s. 2851–2856, maj 2001, doi: 10.1021/la001673y.
- [14] E. K. Perry i M.-W. Tan, „Bacterial biofilms in the human body: prevalence and impacts on health and disease”, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, t. 13, sie. 2023, doi: 10.3389/fcimb.2023.1237164.
- [15] R. M. Donlan i J. W. Costerton, „Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms”, *Clin. Microbiol. Rev.*, t. 15, nr 2, s. 167–193, kwi. 2002, doi: 10.1128/cmr.15.2.167-193.2002.
- [16] S. Zheng *et al.*, „Implication of Surface Properties, Bacterial Motility, and Hydrodynamic Conditions on Bacterial Surface Sensing and Their Initial Adhesion”, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, t. 9, luty 2021, doi: 10.3389/fbioe.2021.643722.

- [17] X. Zhao, F. Zhao, J. Wang, i N. Zhong, „Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives”, *RSC Adv.*, t. 7, nr 58, s. 36670–36683, 2017, doi: 10.1039/c7ra02497e.
- [18] M. Toyofuku, T. Inaba, T. Kiyokawa, N. Obana, Y. Yawata, i N. Nomura, „Environmental factors that shape biofilm formation”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, t. 80, nr 1, s. 7–12, sty. 2016, doi: 10.1080/09168451.2015.1058701.
- [19] X. Wang, M. Liu, C. Yu, J. Li, i X. Zhou, „Biofilm formation: mechanistic insights and therapeutic targets”, *Mol. Biomed.*, t. 4, nr 1, grudz. 2023, doi: 10.1186/s43556-023-00164-w.
- [20] P. Li, R. Yin, J. Cheng, i J. Lin, „Bacterial Biofilm Formation on Biomaterials and Approaches to Its Treatment and Prevention”.
- [21] M. Caldara, C. Belgiovine, E. Secchi, i R. Rusconi, „Environmental, Microbiological, and Immunological Features of Bacterial Biofilms Associated with Implanted Medical Devices”, *Clin. Microbiol. Rev.*, t. 35, nr 2, kwi. 2022, doi: 10.1128/cmr.00221-20.
- [22] M. Maciejewska, M. Bauer, i M. Dawgul, „NOWOCZESNE METODY ZWALCZANIA BIOFILMU BAKTERYJNEGO”.
- [23] M. Bakalakos, M.-M. Ampadiotaki, C. Vlachos, N. Sipsas, S. Pneumáticos, i J. Vlamis, „Molecular Mechanisms of Biofilm Formation on Orthopaedic Implants: Review of the Literature”, *Maedica - J. Clin. Med.*, t. 1, nr 1, mar. 2024, doi: 10.26574/maedica.2024.19.1.129.
- [24] O. T. Jensen, E. Weiss, i D. W. Grainger, „The job to be done with biofilm and titanium implants”, *Front. Oral Maxillofac. Med.*, t. 3, s. 21–21, wrz. 2021, doi: 10.21037/fomm-21-54.
- [25] C. Jacqueline i J. Caillon, „Impact of bacterial biofilm on the treatment of prosthetic joint infections”, *J. Antimicrob. Chemother.*, t. 69, nr suppl 1, s. i37–i40, wrz. 2014, doi: 10.1093/jac/dku254.
- [26] I. Yoda *et al.*, „Effect of surface roughness of biomaterials on Staphylococcus epidermidis adhesion”, *BMC Microbiol.*, t. 14, nr 1, s. 234, grudz. 2014, doi: 10.1186/s12866-014-0234-2.
- [27] J. J. Y. Sung, „Bacterial biofilm and clogging of biliary stents”, *J. Ind. Microbiol.*, t. 15, nr 3, s. 152–155, wrz. 1995, doi: 10.1007/BF01569819.
- [28] S. Hahnel, A. Wieser, R. Lang, i M. Rosentritt, „Biofilm formation on the surface of modern implant abutment materials”, *Clin. Oral Implants Res.*, t. 26, nr 11, s. 1297–1301, lis. 2015, doi: 10.1111/clr.12454.
- [29] P. Bermejo, M. C. Sánchez, A. Llama-Palacios, E. Figuero, D. Herrera, i M. Sanz Alonso, „Biofilm formation on dental implants with different surface micro-topography: An in vitro study”, *Clin. Oral Implants Res.*, t. 30, nr 8, s. 725–734, sie. 2019, doi: 10.1111/clr.13455.
- [30] T. Wassmann, S. Kreis, M. Behr, i R. Buergers, „The influence of surface texture and wettability on initial bacterial adhesion on titanium and zirconium oxide dental implants”, *Int. J. Implant Dent.*, t. 3, nr 1, s. 32, grudz. 2017, doi: 10.1186/s40729-017-0093-3.
- [31] 698 Chambers Pass, Fort Sam Houston, TX 78234, USA, S. Shiels, L. Mangum, i J. Wenke, „Revisiting the “race for the surface” in a pre-clinical model of implant infection”, *Eur. Cell. Mater.*, t. 39, s. 77–95, sty. 2020, doi: 10.22203/eCM.v039a05.
- [32] S. D. Sinha, S. Chatterjee, P. K. Maity, S. Tarafdar, i S. P. Moulik, „I. Activity of *Pseudomonas aeruginosa* on Polypropylene and High density Polyethylene in presence of serum albumin.”.

- [33] R. Pérez-Tanoira *et al.*, „Competitive colonization of prosthetic surfaces by *staphylococcus aureus* and human cells”, *J. Biomed. Mater. Res. A*, t. 105, nr 1, s. 62–72, sty. 2017, doi: 10.1002/jbm.a.35863.
- [34] A. Minkiewicz-Zochniak *et al.*, „Biofilm Formation on Dental Implant Biomaterials by *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Patients with Cystic Fibrosis”, *Materials*, t. 14, nr 8, s. 2030, kwi. 2021, doi: 10.3390/ma14082030.
- [35] S. Pal, A. Sayana, A. Joshi, i D. Juyal, „*Staphylococcus aureus*: A predominant cause of surgical site infections in a rural healthcare setup of Uttarakhand”, *J. Fam. Med. Prim. Care*, t. 8, nr 11, s. 3600, 2019, doi: 10.4103/jfmprc.jfmprc_521_19.
- [36] „637-648”.
- [37] M. Oleksy-Wawrzyniak, „Ocena zdolności klinicznych szczepów bakteryjnych do tworzenia biofilmu oraz możliwości jego eradykacji z cewników moczowych za pomocą metod chemicznych i fizycznych”.
- [38] M. Nowak, S. Kubanek, i W. Hędzielek, „Współczesne poglądy na temat leczenia periimplantitis — przegląd piśmiennictwa”, *Dent. Forum*, t. 46, nr 2, s. 194–201, sie. 2021, doi: 10.20883/df.2018.26.
- [39] E. Bravo *et al.*, „Biofilm formation on dental implants with a hybrid surface microtopography: An in vitro study in a validated multispecies dynamic biofilm model”, *Clin. Oral Implants Res.*, t. 34, nr 5, s. 475–485, maj 2023, doi: 10.1111/clr.14054.
- [40] V. Nandakumar, S. Chittaranjan, V. M. Kurian, i M. Doble, „Characteristics of bacterial biofilm associated with implant material in clinical practice”, *Polym. J.*, t. 45, nr 2, s. 137–152, luty 2013, doi: 10.1038/pj.2012.130.
- [41] W. Szlauer, E. Obłąk, E. Paluch, i K. Baldy-Chudzik, „Biofilm and methods of its eradication”, *Postępy Hig. Med. Dośw.*, t. 73, s. 397–413, sie. 2019, doi: 10.5604/01.3001.0013.1605.
- [42] L. Kadirvelu, S. S. Sivaramalingam, D. Jothivel, D. D. Chithiraiselvan, D. Karaiyagowder Govindarajan, i K. Kandaswamy, „A review on antimicrobial strategies in mitigating biofilm-associated infections on medical implants”, *Curr. Res. Microb. Sci.*, t. 6, s. 100231, 2024, doi: 10.1016/j.crmicr.2024.100231.
- [43] / Piotr Zapała, Bartosz Dybowski, Piotr Radziszewski, „Posocznica moczowa, urosepsa”, *Przegląd Urol. Pismo Pol. Tow. Urol.*, t. Katedra i Klinika Urologii Ogólnej, Onkologicznej i Czynnościowej. Warszawski Uniwersytet Medyczny.” *Przegląd Urologiczny*, 2013.
- [44] A. M. Dziewa i A. Ksykiewicz-Dorota, „Metody monitorowania i rejestracji zakażeń szpitalnych”.
- [45] M. Rouprêt, M. Daudon, V. Hupertan, B. Gattegno, P. Thibault, i O. Traxer, „Can ureteral stent encrustation analysis predict urinary stone composition?”, *Urology*, t. 66, nr 2, s. 246–251, sie. 2005, doi: 10.1016/j.urology.2005.03.054.
- [46] V. Gordon, L. Bakhtiari, i K. Kovach, „From molecules to multispecies ecosystems: the roles of structure in bacterial biofilms”, *Phys. Biol.*, t. 16, nr 4, s. 041001, kwi. 2019, doi: 10.1088/1478-3975/ab1384.
- [47] H. Niu, J. Gu, i Y. Zhang, „Bacterial persisters: molecular mechanisms and therapeutic development”, *Signal Transduct. Target. Ther.*, t. 9, nr 1, s. 174, lip. 2024, doi: 10.1038/s41392-024-01866-5.
- [48] K. J. Daniluk, M. Wójcicki, i E. Juszczuk-Kubiak, „Biofilm bakteryjny i możliwości jego eliminacji w przemyśle spożywczym”, *Zywnosc Nauka Technol. Jakosc Food Sci. Technol. Qual.*, t. 127, nr 2, s. 5–20, 2021, doi: 10.15193/zntj/2021/127/374.

- [49] A. O'Toole, E. B. Ricker, i E. Nuxoll, „Thermal mitigation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms”, *Biofouling*, t. 31, nr 8, s. 665–675, wrz. 2015, doi: 10.1080/08927014.2015.1083985.
- [50] A. Ivaškė, R. Jakubovskis, R. Boris, i J. Urbonavičius, „Effects of Low Temperature, Freeze–Thaw Cycles, and Healing Conditions on Viability of Non-Ureolytic Bacteria in Biological Self-Healing Concrete”, *Materials*, t. 17, nr 23, s. 5797, lis. 2024, doi: 10.3390/ma17235797.
- [51] V. R. Krishnamurthi, A. Rogers, J. Peifer, I. I. Niyonshuti, J. Chen, i Y. Wang, „Microampere Electric Current Causes Bacterial Membrane Damage and Two-Way Leakage in a Short Period of Time”, *Appl. Environ. Microbiol.*, t. 86, nr 16, s. e01015-20, sie. 2020, doi: 10.1128/AEM.01015-20.
- [52] Y. Li, X. Li, Y. Hao, Y. Liu, Z. Dong, i K. Li, „Biological and Physiochemical Methods of Biofilm Adhesion Resistance Control of Medical-Context Surface”, *Int. J. Biol. Sci.*, t. 17, nr 7, s. 1769–1781, 2021, doi: 10.7150/ijbs.59025.
- [53] L. Axelsson *et al.*, „Cleaning of Conveyor Belt Materials Using Ultrasound in a Thin Layer of Water”, *J. Food Prot.*, t. 76, nr 8, s. 1401–1407, sie. 2013, doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-563.
- [54] U. Ambrose, K. Middleton, i D. Seal, „In vitro studies of water activity and bacterial growth inhibition of sucrose-polyethylene glycol 400-hydrogen peroxide and xylose-polyethylene glycol 400-hydrogen peroxide pastes used to treat infected wounds”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, t. 35, nr 9, s. 1799–1803, wrz. 1991, doi: 10.1128/AAC.35.9.1799.
- [55] M. He, Q. Wang, W. Zhao, J. Li, i C. Zhao, „A self-defensive bilayer hydrogel coating with bacteria triggered switching from cell adhesion to antibacterial adhesion”, *Polym. Chem.*, t. 8, nr 35, s. 5344–5353, 2017, doi: 10.1039/C7PY00967D.
- [56] R. Międzybrodzki, J. Borysowski, W. Fortuna, B. Weber-Dąbrowska, i A. Górski, „Terapia fagowa jako alternatywa w leczeniu zakażeń wywołanych przez bakterie antybiotykooporne”, *Kardiologia Torakochirurgia Pol.*
- [57] Z. Li *et al.*, „Construction of antimicrobial and biocompatible cotton textile based on quaternary ammonium salt from rosin acid”, *Int. J. Biol. Macromol.*, t. 150, s. 1–8, maj 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.259.
- [58] M. A. Khan *et al.*, „Antibiofilm and anti-quorum sensing activity of Psidium guajava L. leaf extract: In vitro and in silico approach”, *PLOS ONE*, t. 18, nr 12, s. e0295524, grudz. 2023, doi: 10.1371/journal.pone.0295524.
- [59] T. Okanda, R. Takahashi, T. Ehara, K. Ohkusu, N. Furuya, i T. Matsumoto, „Slightly acidic electrolyzed water disrupts biofilms and effectively disinfects *Pseudomonas aeruginosa*”, *J. Infect. Chemother.*, t. 25, nr 6, s. 452–457, cze. 2019, doi: 10.1016/j.jiac.2019.01.014.
- [60] M. A. Rather, K. Gupta, i M. Mandal, „Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies”, *Braz. J. Microbiol.*, t. 52, nr 4, s. 1701–1718, grudz. 2021, doi: 10.1007/s42770-021-00624-x.
- [61] K. Zhou *et al.*, „Natural phytochemical-based strategies for antibiofilm applications”, *Chin. Med.*, t. 20, nr 1, s. 96, lip. 2025, doi: 10.1186/s13020-025-01147-5.
- [62] W. Abd-Elaziem, M. A. Darwish, A. Hamada, i W. M. Daoush, „Titanium-Based alloys and composites for orthopedic implants Applications: A comprehensive review”, *Mater. Des.*, t. 241, s. 112850, maj 2024, doi: 10.1016/j.matdes.2024.112850.
- [63] M. Kaur i K. Singh, „Review on titanium and titanium based alloys as biomaterials for orthopaedic applications”, *Mater. Sci. Eng. C*, t. 102, s. 844–862, wrz. 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.04.064.

- [64] E. Marin i A. Lanzutti, „Biomedical Applications of Titanium Alloys: A Comprehensive Review”, *Materials*, t. 17, nr 1, s. 114, grudz. 2023, doi: 10.3390/ma17010114.
- [65] C. C. Gomes *et al.*, „Assessment of the genetic risks of a metallic alloy used in medical implants”, *Genet. Mol. Biol.*, t. 34, nr 1, s. 116–121, sty. 2011, doi: 10.1590/S1415-47572010005000118.
- [66] V. Hoppe, P. Szymczyk-Ziółkowska, M. Rusińska, B. Dybała, D. Poradowski, i M. Janeczek, „Assessment of Mechanical, Chemical, and Biological Properties of Ti-Nb-Zr Alloy for Medical Applications”, *Materials*, t. 14, nr 1, s. 126, grudz. 2020, doi: 10.3390/ma14010126.
- [67] V. Hoppe *et al.*, „Study of cytotoxic activity of Ti–13Nb–13Zr medical alloy with different surface finishing techniques”, *J. Mater. Sci.*, t. 56, nr 31, s. 17747–17767, lis. 2021, doi: 10.1007/s10853-021-06430-y.
- [68] *ISO 5832-3:2021 Implants for surgery — Metallic materials Part 3: Wrought titanium 6-aluminium 4-vanadium alloy.*
- [69] *ISO 5832-11:2024 Implants for surgery — Metallic materials Part 11: Wrought titanium 6-aluminium 7-niobium alloy.*
- [70] *Standard Specification for Wrought Titanium-13Niobium-13Zirconium Alloy for Surgical Implant Applications ASTM F1713-08*, 2008.
- [71] D. D. C. R. Mello *et al.*, „Titanium alloys: in vitro biological analyzes on biofilm formation, biocompatibility, cell differentiation to induce bone formation, and immunological response”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, t. 30, nr 9, s. 108, wrz. 2019, doi: 10.1007/s10856-019-6310-2.
- [72] A. L. R. Ribeiro, P. Hammer, L. G. Vaz, i L. A. Rocha, „Are new TiNbZr alloys potential substitutes of the Ti6Al4V alloy for dental applications? An electrochemical corrosion study”, *Biomed. Mater.*, t. 8, nr 6, s. 065005, lis. 2013, doi: 10.1088/1748-6041/8/6/065005.
- [73] K. V. Sergienko *et al.*, „Physical and Mechanical Properties of Ti-Zr-Nb Alloys for Medical Use”, *Metals*, t. 14, nr 11, s. 1311, lis. 2024, doi: 10.3390/met14111311.
- [74] J. V. Calazans Neto, C. A. S. Celles, C. S. A. F. De Andrade, C. R. M. Afonso, B. E. Nagay, i V. A. R. Barão, „Recent Advances and Prospects in β -type Titanium Alloys for Dental Implants Applications”, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, t. 10, nr 10, s. 6029–6060, paź. 2024, doi: 10.1021/acsbiomaterials.4c00963.
- [75] R. P. Kolli i A. Devaraj, „A Review of Metastable Beta Titanium Alloys”, *Metals*, t. 8, nr 7, s. 506, cze. 2018, doi: 10.3390/met8070506.
- [76] P. Gołasz *et al.*, „Modification of Ti-13Nb-13Zr Alloy Surface via Plasma Electrolytic Oxidation and Silver Nanoparticles Decorating”, *Materials*, t. 18, nr 2, s. 349, sty. 2025, doi: 10.3390/ma18020349.
- [77] Ö. B. Acimert, B. B. Okur, A. K. Dayauç, T. Küçükömeroğlu, i Y. Kanca, „Structural, Mechanical and Tribological Properties of Hydroxiapatite Reinforced Ti-13Nb-13Zr/HA Composite Produced by Friction Stir Process (FSP)”, *Metall. Mater. Trans. B*, t. 55, nr 4, s. 2739–2749, sie. 2024, doi: 10.1007/s11663-024-03138-7.
- [78] A. Łukaszczyk, S. Zimowski, W. Pawlak, B. Dubiel, i T. Moskalewicz, „Microstructure, Micro-Mechanical and Tribocorrosion Behavior of Oxygen Hardened Ti–13Nb–13Zr Alloy”, *Materials*, t. 14, nr 8, s. 2088, kwi. 2021, doi: 10.3390/ma14082088.
- [79] P. Szymczyk-Ziółkowska *et al.*, „The Impact of EBM-Manufactured Ti6Al4V ELI Alloy Surface Modifications on Cytotoxicity toward Eukaryotic Cells and Microbial Biofilm Formation”, *Materials*, t. 13, nr 12, s. 2822, cze. 2020, doi: 10.3390/ma13122822.
- [80] L. Klinge, L. Kluy, C. Spiegel, C. Siemers, P. Groche, i D. Coraça-Huber, „Nanostructured Ti-13Nb-13Zr alloy for implant application—material scientific, technological, and

- biological aspects", *Front. Bioeng. Biotechnol.*, t. 11, s. 1255947, sie. 2023, doi: 10.3389/fbioe.2023.1255947.
- [81] M. C. Rossi, B. N. Ventura, L. Milián, A. V. Escuder, i V. Amigó Borrás, „Study of Electrochemical and Biological Characteristics of As-Cast Ti-Nb-Zr-Ta System Based on Its Microstructure”, *Metals*, t. 12, nr 3, s. 476, mar. 2022, doi: 10.3390/met12030476.
- [82] I. Dimić *et al.*, „Microstructure and metallic ion release of pure titanium and Ti-13Nb-13Zr alloy processed by high pressure torsion”, *Mater. Des.*, t. 91, s. 340–347, luty 2016, doi: 10.1016/j.matdes.2015.11.088.
- [83] O. Bilek, T. Fialova, A. Otahal, V. Adam, K. Smerkova, i Z. Fohlerova, „Antibacterial activity of AgNPs-TiO₂ nanotubes: influence of different nanoparticle stabilizers”, *RSC Adv.*, t. 10, nr 72, s. 44601–44610, 2020, doi: 10.1039/D0RA07305A.
- [84] G. Li, Q. Zhao, H. Yang, i L. Cheng, „Antibacterial and Microstructure Properties of Titanium Surfaces Modified with Ag-Incorporated Nanotube Arrays”, *Mater. Res.*, t. 19, nr 3, s. 735–740, maj 2016, doi: 10.1590/1980-5373-MR-2015-0534.
- [85] P. Mahmoudi, M. R. Akbarpour, H. B. Lakeh, F. Jing, M. R. Hadidi, i B. Akhavan, „Antibacterial Ti-Cu implants: A critical review on mechanisms of action”, *Mater. Today Bio*, t. 17, s. 100447, grudz. 2022, doi: 10.1016/j.mtbio.2022.100447.
- [86] Z. Wang, X. Wang, Y. Wang, Y. Zhu, X. Liu, i Q. Zhou, „NanoZnO-modified titanium implants for enhanced anti-bacterial activity, osteogenesis and corrosion resistance”, *J. Nanobiotechnology*, t. 19, nr 1, s. 353, paź. 2021, doi: 10.1186/s12951-021-01099-6.
- [87] P. Bansal, G. Singh, i H. S. Sidhu, „Plasma-Sprayed HA/Sr Reinforced Coating for Improved Corrosion Resistance and Surface Properties of Ti-13Nb-13Zr Titanium Alloy for Biomedical Implants”, *J. Mater. Res.*, t. 36, nr 2, s. 431–442, sty. 2021, doi: 10.1557/s43578-020-00044-x.
- [88] S. A. I. Jariya, N. Manivannan, B. M. Ali, T. S. N. S. Narayanan, i K. Ravichandran, „Engineering the surface of titanium to improve its bioactivity and antibacterial activity through a multi-functional coating approach”, *New J. Chem.*, t. 47, nr 12, s. 5843–5862, 2023, doi: 10.1039/D2NJ04485D.
- [89] H. Zhang, Z. Wu, Z. Wang, X. Yan, X. Duan, i H. Sun, „Advanced surface modification techniques for titanium implants: a review of osteogenic and antibacterial strategies”, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, t. 13, s. 1549439, mar. 2025, doi: 10.3389/fbioe.2025.1549439.
- [90] Q. Rao *et al.*, „A Titanium-Based Superhydrophobic Coating with Enhanced Antibacterial, Anticoagulant, and Anticorrosive Properties for Dental Applications”, *Coatings*, t. 14, nr 5, s. 571, maj 2024, doi: 10.3390/coatings14050571.
- [91] R. Zhou *et al.*, „Correction to “Electrical Responsive Coating with a Multilayered TiO₂-SnO₂-RuO₂ Heterostructure on Ti for Controlling Antibacterial Ability and Improving Osseointegration””, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, t. 17, nr 5, s. 8750–8750, luty 2025, doi: 10.1021/acsami.5c00928.
- [92] R. G. S. V. Prasad *et al.*, „Biocompatible and Antibacterial SnO₂ Nanowire Films Synthesized by E-Beam Evaporation Method”, *J. Biomed. Nanotechnol.*, t. 11, nr 6, s. 942–950, cze. 2015, doi: 10.1166/jbn.2015.2025.
- [93] S. Ferraris i S. Spriano, „Antibacterial titanium surfaces for medical implants”, *Mater. Sci. Eng. C*, t. 61, s. 965–978, kwi. 2016, doi: 10.1016/j.msec.2015.12.062.
- [94] K. Anselme, P. Davidson, A. M. Popa, M. Giazson, M. Liley, i L. Ploux, „The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale”, *Acta Biomater.*, t. 6, nr 10, s. 3824–3846, paź. 2010, doi: 10.1016/j.actbio.2010.04.001.

- [95] C. Sotova *et al.*, „Dental Implants: Modern Materials and Methods of Their Surface Modification”, *Materials*, t. 16, nr 23, s. 7383, lis. 2023, doi: 10.3390/ma16237383.
- [96] G. Zhu, G. Wang, i J. J. Li, „Advances in implant surface modifications to improve osseointegration”, *Mater. Adv.*, t. 2, nr 21, s. 6901–6927, 2021, doi: 10.1039/D1MA00675D.
- [97] R. A. Gittens, R. Olivares-Navarrete, Z. Schwartz, i B. D. Boyan, „Implant osseointegration and the role of microroughness and nanostructures: Lessons for spine implants”, *Acta Biomater.*, t. 10, nr 8, s. 3363–3371, sie. 2014, doi: 10.1016/j.actbio.2014.03.037.
- [98] S. Long, J. Zhu, Y. Jing, S. He, L. Cheng, i Z. Shi, „A Comprehensive Review of Surface Modification Techniques for Enhancing the Biocompatibility of 3D-Printed Titanium Implants”, *Coatings*, t. 13, nr 11, s. 1917, lis. 2023, doi: 10.3390/coatings13111917.
- [99] J. Li *et al.*, „Recent Advancements in the Surface Modification of Additively Manufactured Metallic Bone Implants”, *Addit. Manuf. Front.*, t. 4, nr 1, s. 200195, mar. 2025, doi: 10.1016/j.amf.2025.200195.
- [100] Chang, Y.R.; Xu, F.F.; Li, J.; You, Y.H.; Liu, C.; Yin, L.H., „Surface Morphology and Surface Properties of Ti and TiZr Implant Materials”, *Mater. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, t. 54, s. 118–123, 2019.
- [101] M. F. A. Fouda, A. Nemat, A. Gawish, i A. R. Baiuomy, „Does the Coating of Titanium Implants by Hydroxyapatite affect the Elaboration of Free Radicals. An Experimental Study”, 2009.
- [102] N. K. K. Arthur, S. M. Kobjane, A. P. I. Popoola, B. N. Masina, i S. L. Pityana, „The Effect of Laser Shock Processing on the Anti-Corrosion Performance of LENS-Fabricated Ti-6Al-4V Alloy”, *J. Compos. Sci.*, t. 7, nr 6, s. 218, maj 2023, doi: 10.3390/jcs7060218.
- [103] Song, P.; Hu, C.; Pei, X.; Sun, J.; Sun, H.; Wu, L.; Jiang, Q.; Fan, H.; Yang, B.; Zhou, C., „Dual Modulation of Crystallinity and Macro-/Microstructures of 3D Printed Porous Titanium Implants to Enhance Stability and Osseointegration”, *J Mater Chem B*, t. 7, s. 2865–2877, 2019.
- [104] Zhang, X.; Guan, S.; Qiu, J.; Qiao, Y.; Qian, S.; Tan, J.; Yeung, K.W.K.; Liu, X, „Atomic Layer Deposition of Tantalum Oxide Films on 3D-Printed Ti6Al4V Scaffolds with Enhanced Osteogenic Property for Orthopedic Implants”, *ACS Biomater Sci Eng*, nr 9, s. 4197–4207, 2023.
- [105] H. Attar *et al.*, „Comparative study of microstructures and mechanical properties of in situ Ti–TiB composites produced by selective laser melting, powder metallurgy, and casting technologies”, *J. Mater. Res.*, t. 29, nr 17, s. 1941–1950, wrz. 2014, doi: 10.1557/jmr.2014.122.
- [106] N. A. El-wassefy, I. M. Hammouda, A. N. E. A. Habib, G. Y. El-awady, i H. A. Marzook, „Assessment of anodized titanium implants bioactivity”, *Clin. Oral Implants Res.*, t. 25, nr 2, luty 2014, doi: 10.1111/clr.12031.
- [107] A. I. Kozelskaya *et al.*, „Bioactive coatings on 3D printed titanium implants with a complex internal structure for bone replacement”, *J. Phys. Conf. Ser.*, t. 2144, nr 1, s. 012015, grudz. 2021, doi: 10.1088/1742-6596/2144/1/012015.
- [108] D. Juliadmi *et al.*, „The Coating of Bovine-Source Hydroxyapatite on Titanium Alloy (Ti-6Al-4V ELI) Using Electrophoretic Deposition for Biomedical Application”, *Mater. Sci. Forum*, t. 1000, s. 97–106, lip. 2020, doi: 10.4028/www.scientific.net/MSF.1000.97.
- [109] Rifai, A.; Tran, N.; Lau, D.W.; Elbourne, A.; Zhan, H.; Stacey, A.D.; Mayes, E.L.H.; Sarker, A.; Ivanova, E.P.; Crawford, R.J., „Polycrystalline Diamond Coating of

- Additively Manufactured Titanium for Biomedical Applications”, *ACS Appl Mater Interfaces*, t. 10, nr 8474–8484, 2018.
- [110] A. D. Dobrzańska-Danikiewicz, L. A. Dobrzański, M. Szindler, A. Achtelek-Franczak, i L. B. Dobrzański, „6. Obróbka powierzchni materiałów mikroporowatych wytworzonych metodą selektywnego spiekania laserowego w celu u efektywnienia proliferacji żywych komórek”, nr 1, 2017.
- [111] D. Nazarov, L. Kozlova, E. Rogacheva, L. Kraeva, i M. Maximov, „Atomic Layer Deposition of Antibacterial Nanocoatings: A Review”, *Antibiotics*, t. 12, nr 12, s. 1656, lis. 2023, doi: 10.3390/antibiotics12121656.
- [112] A. Devlin-Mullin *et al.*, „Atomic Layer Deposition of a Silver Nanolayer on Advanced Titanium Orthopedic Implants Inhibits Bacterial Colonization and Supports Vascularized de Novo Bone Ingrowth”, *Adv. Healthc. Mater.*, t. 6, nr 11, s. 1700033, cze. 2017, doi: 10.1002/adhm.201700033.
- [113] D. V. Nazarov, N. P. Bobrysheva, O. M. Osmolovskaya, M. G. Osmolovsky, i V. M. Smirnov, „ATOMIC LAYER DEPOSITION OF TIN DIOXIDE NANOFILMS: A REVIEW”.
- [114] X. Zhao *et al.*, „Atomic layer deposited TiO₂ nanofilm on titanium implant for reduced the release of particles”, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, t. 12, s. 1346404, kwi. 2024, doi: 10.3389/fbioe.2024.1346404.
- [115] A. Konopatsky *et al.*, „Surface Modification of Biomedical Ti-18Zr-15Nb Alloy by Atomic Layer Deposition and Ag Nanoparticles Decoration”, *J. Funct. Biomater.*, t. 14, nr 5, s. 249, kwi. 2023, doi: 10.3390/jfb14050249.
- [116] C. Jin, K. Baek, J. Lee, S. Park, i C. Lee, „TeO₂-core/SnO₂-sheath nanowires”, *Phys. E Low-Dimens. Syst. Nanostructures*, t. 43, nr 7, s. 1346–1350, maj 2011, doi: 10.1016/j.physe.2011.03.004.
- [117] A. Rosental, A. Tarre, A. Gerst, T. Uustare, i V. Sammelselg, „Atomic-layer chemical vapor deposition of SnO₂ for gas-sensing applications”, *Sens. Actuators B Chem.*, t. 77, nr 1–2, s. 297–300, cze. 2001, doi: 10.1016/S0925-4005(01)00746-8.
- [118] E. C. Stevens, M. B. M. Mousa, i G. N. Parsons, „Thermal atomic layer deposition of Sn metal using SnCl₄ and a vapor phase silyl dihydropyrazine reducing agent”, *J. Vac. Sci. Technol. Vac. Surf. Films*, t. 36, nr 6, s. 06A106, lis. 2018, doi: 10.1116/1.5055212.
- [119] M.-J. Choi *et al.*, „SnO₂ thin films grown by atomic layer deposition using a novel Sn precursor”, *Appl. Surf. Sci.*, t. 320, s. 188–194, lis. 2014, doi: 10.1016/j.apsusc.2014.09.054.
- [120] H.-E. Cheng, D.-C. Tian, i K.-C. Huang, „Properties of SnO₂ Films Grown by Atomic Layer Deposition”, *Procedia Eng.*, t. 36, s. 510–515, 2012, doi: 10.1016/j.proeng.2012.03.074.
- [121] J. Lisoń-Kubica *et al.*, „Modern methods of surface modification for new-generation titanium alloys”, *Acta Bioeng. Biomech.*, t. 24, nr 4, 2022, doi: 10.37190/ABB-02175-2022-01.
- [122] *PN-EN ISO 20502:2016- 05 Ceramika wysokiej jakości (ceramika zaawansowana, techniczna ceramika zaawansowana) -- Oznaczanie adhezji powłok ceramicznych w próbie zarysowania.*
- [123] *ISO 25178-2:2021 Geometrical product specifications (GPS) — Surface texture: Areal Part 2: Terms, definitions and surface texture parameters.*
- [124] *ISO 10993-15:2019 Biological evaluation of medical devices Part 15: Identification and quantification of degradation products from metals and alloys.*
- [125] *ASTM F746-04(2021)-(Test Method) Standard Test Method for Pitting or Crevice Corrosion of Metallic Surgical Implant Materials.*
- [126] *ISO 10993:2018 Biological evaluation of medical devices.*

- [127] E. Maikranz *et al.*, „Different binding mechanisms of *Staphylococcus aureus* to hydrophobic and hydrophilic surfaces”, *Nanoscale*, t. 12, nr 37, s. 19267–19275, 2020, doi: 10.1039/D0NR03134H.

Streszczenie

Biofilm bakteryjny, to utrwalona struktura mikroorganizmów utworzona z jednego lub większej ilości gatunków, otoczona błoną komórkową. W ostatnich dekadach jest uznawany za główny czynnik przewlekłych infekcji, zaburzając tym samym stan homeostazy organizmu. Ryzyko jego powstawania zależy od wielu czynników, w tym od własności powierzchni biomateriału, takich jak chropowatość, skład chemiczny i energia powierzchniowa. W związku z ograniczoną skutecznością tradycyjnego leczenia przy użyciu antybiotyków i środków antyseptycznych, coraz większe znaczenie zyskują modyfikacje powierzchni implantów, mające na celu zapobieganie adhezji bakterii. Współczesna implantologia w dużej mierze opiera się na tytanie i jego stopach, które charakteryzują się biokompatybilnością i odpornością na korozję. Pomimo wymienionych zalet stopów tytanu i zastosowaniu pierwiastków witalnych, jak w przypadku stopu Ti-13Nb-13Zr wymagają one dodatkowych modyfikacji powierzchni, aby zwiększyć ich odporność na biofilm bakteryjny. Dotychczasowe próby modyfikacji powierzchni powłokami metalicznymi lub organicznymi często wiązały się z ryzykiem występowania cytotoksyczności lub ograniczoną trwałością powstałej warstwy. Celem niniejszej pracy było kompleksowe scharakteryzowanie własności fizykochemicznych i biologicznych stopu Ti-13Nb-13Zr z naniesioną powłoką SnO_2 metodą ALD. Przeprowadzone badania potwierdziły, że powłoka SnO_2 jest jednorodna, ciągła i dwuwarstwowa, a jej grubość zależy od ilości cykli. Charakteryzuje się ona dobrą adhezją do podłoża oraz zwiększoną odpornością na zużycie ścierne i odpornością na korozję wżerową i szczelinową. Co więcej, powłoka skutecznie ogranicza uwalnianie jonów tytanu, niobu i cyrkonu do roztworu, działając jako bariera ochronna. Badania biologiczne wykazały, że powłoka SnO_2 ogranicza adhezję bakterii i reakcje zapalne (poprzez obniżenie poziomu cytokin), jednocześnie wspierając proliferację komórek. Najkorzystniejsze własności uzyskano dla powłoki naniesionej na polerowane podłoże. Podsumowując, praca ta potwierdza tezę o możliwości wytworzenia powłoki z tlenku cyny (IV) na stopie Ti-13Nb-13Zr, która zapewnia korzystne własności fizykochemiczne i biologiczne.

Abstract

A bacterial biofilm is a persistent structure of microorganisms composed of one or more species, embedded in an extracellular matrix. In recent decades, it has been recognized as a major factor in chronic infections, disrupting the body's homeostasis. The risk of its formation depends on many factors, including the properties of the biomaterial surface such as roughness, chemical composition, and surface energy. Due to the limited effectiveness of conventional treatment with antibiotics and antiseptics, implant surface modifications aimed at preventing bacterial adhesion have gained increasing importance. Modern implantology largely relies on titanium and its alloys, which are characterized by high biocompatibility and corrosion resistance. Despite these advantages, titanium alloys even when alloyed with vital elements, as in the case of Ti-13Nb-13Zr still require additional surface modifications to enhance their resistance to bacterial biofilm formation. Previous attempts to modify the surface with metallic or organic coatings have often been associated with risks of cytotoxicity or limited durability of the resulting layer. The aim of this study was to comprehensively characterize the physicochemical and biological properties of Ti-13Nb-13Zr alloy coated with SnO₂ using the ALD method. The results confirmed that the SnO₂ coating is homogeneous, continuous, and bilayered, with its thickness dependent on the number of deposition cycles. It exhibits strong adhesion to the substrate as well as increased resistance to abrasive wear, pitting, and crevice corrosion. Moreover, the coating effectively limits the release of titanium, niobium, and zirconium ions into the solution, acting as a protective barrier. Biological studies demonstrated that the SnO₂ coating reduces bacterial adhesion and inflammatory responses (by lowering cytokine levels) while simultaneously supporting cell proliferation. The most favorable properties were observed for the coating applied to a polished substrate. In summary, this study confirms the feasibility of producing a tin(IV) oxide coating on Ti-13Nb-13Zr alloy, providing advantageous physicochemical and biological properties.