



**Politechnika
Śląska**

mgr inż. Katarzyna Leśniak-Ziółkowska

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Nowa generacja powierzchni
bakteriostatycznych/antybakteryjnych
otrzymywanych metodą PEO w zawiesinach
związków srebra, miedzi i cynku na implantach
dedykowanych tkance twardej**

Promotor: prof. dr hab. inż. Wojciech Simka

Promotor pomocniczy: dr hab. inż. Alicja Kazek-Kęsik

GLIWICE 2023

Dziękuję prof. dr hab. inż. Wojciechowi Simce za przekazanie mi ogromu wiedzy, własnego doświadczenia, wsparcia i nieustannego dostarczania motywacji oraz wiary w realizację niniejszego projektu.

Dziękuję dr hab. inż. Alicji Kazek-Kęsik za cenną naukę i poświęcony czas.

Dziękuję Koleżankom i Kolegom z zespołu za każdą poradę, pomocną dłoń i przyjazną atmosferę współpracy.

Przyjaciołom za wytrwałość, cierpliwość i wiarę we mnie.

Radkowi Ziółkowskiemu, za wszystko.

Krzysztofowi Tomaszowi Piekarskiemu za pierwsze kroki stawiane na ścieżce inżyniera.

*Badania przeprowadzone w niniejszej pracy wykonano w ramach projektu
„Diamentowy Grant” finansowanego przez Ministerstwo Edukacji i Nauki
(nr projektu: 04/010/DG_18/0088)*



Ministerstwo
Edukacji i Nauki



Diamentowy
Grant

Streszczenie

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej przeprowadzono badania mające na celu wykorzystanie nierozpuszczalnych związków cynku, miedzi oraz srebra w procesie plazmowego utleniania elektrochemicznego w celu wytworzenia porowatych warstw tlenkowych na powierzchni stopów tytanu charakteryzujących się działaniem antybakteryjnym.

Pierwszy etap badań obejmował określenie optymalnych parametrów procesu plazmowego utleniania elektrochemicznego, tj. napięcia oraz gęstości prądu. Za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej określono morfologię otrzymanych powierzchni, co w połączeniu z spektroskopią rentgenowską z dyspersją energetyczną oraz badaniami chropowatości otrzymanych powierzchni umożliwiło dobór najbardziej odpowiednich warunków prądowych procesu plazmowego utleniania elektrochemicznego.

Wykonano szereg następných badań z wykorzystaniem pozostałych nierozpuszczalnych związków cynku, miedzi oraz srebra. Charakterystyka fizykochemiczna otrzymanych warstw tlenkowych obejmowała pomiary kąta zwilżalności, grubości warstw tlenkowych oraz spektroskopię Ramana. Ilość uwolnionych jonów cynku, miedzi oraz srebra zdeterminowano za pomocą długoterminowych badań zanurzeniowych w roztworze Ringera. Właściwości bakteriostatyczne utworzonych powłok określono w badaniach adhezji bakterii *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 oraz *Escherichia coli* ATCC 25922. Wykonano także badania cytokompatybilności zmodyfikowanych powierzchni.

W rezultacie potwierdzono, że warstwy tlenkowe z dodatkiem pierwiastków takich jak cynk, miedź oraz srebro stanowią innowacyjny kierunek rozwoju biomateriałów implantacyjnych. Proces plazmowego utleniania elektrochemicznego pozwolił uzyskać warstwy o zwiększonej porowatości, chropowatości i hydrofilowości, co wspierało ich bioaktywność i prawidłową integrację z tkanką kostną. Dodatek antybakteryjnych pierwiastków przyczynił się do poprawy właściwości bakteriostatycznych otrzymanych powłok.

Abstract

In the context of this doctoral dissertation, research was conducted with the aim of utilizing insoluble compounds of zinc, copper, and silver in the process of electrochemical plasma oxidation to obtain porous oxide layers on titanium alloys surfaces characterized by antibacterial properties.

The first stage of the research involved determining the optimal parameters for the electrochemical plasma oxidation process, such as voltage and current density. Scanning electron microscopy was used to determine the morphology of the obtained surfaces, which, in combination with X-ray energy dispersive spectroscopy and roughness measurements of the surfaces, allowed for the selection of the most suitable current conditions for the electrochemical plasma oxidation process.

A series of following studies were conducted using the other insoluble compounds of zinc, copper, and silver. The physicochemical characterization of the obtained oxide layers included measurements of contact angle, oxide layer thickness, and Raman spectroscopy. The release of zinc, copper, and silver ions was determined through long-term immersion studies in a Ringer's solution. The bacteriostatic properties of the created coatings were confirmed in studies of bacterial adhesion, involving *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922. Additionally, cytocompatibility studies of the modified surfaces were performed. As a result, it was confirmed that oxide layers containing elements such as zinc, copper, and silver represent an innovative direction in the development of implantable biomaterials. The electrochemical plasma oxidation process allowed for the production of layers with increased porosity, roughness, and hydrophilicity, which supported their bioactivity and proper integration with bone tissue. The addition of antibacterial elements contributed to the improvement of the bacteriostatic properties of the obtained coatings.

Spis treści

Streszczenie	5
Abstract	6
Wykaz symboli i oznaczeń	9
1. Wstęp	11
1.1. Biomateriały	12
1.2. Biomateriały tytanowe	17
1.3. Czynniki wpływające na bioaktywność implantów tytanowych	22
1.4. Plazmowe utlenianie elektrochemiczne (PEO) jako skuteczna metoda funkcjonalizacji powierzchni stopów tytanu	25
1.5. Zakażenia septyczne tkanki kostnej	33
1.6. Metody leczenia zakażeń septycznych kości	37
1.7. Związki srebra, miedzi i cynku - właściwości bakteriostatyczne oraz bakteriobójcze	42
2. Cel pracy	46
3. Metodyka badawcza	47
3.1. Synteza związków cynku, miedzi oraz srebra	47
3.2. Przygotowanie powierzchni stopów tytanu	47
3.3. Plazmowe utlenianie elektrochemiczne	47
3.4. Charakterystyka właściwości fizykochemicznych powłok	49
3.5. Przekroje poprzeczne warstw tlenkowych	50
3.6. Spektroskopia Ramana	50
3.7. Badania zanurzeniowe w roztworze Ringera	51
3.8. Badania cytokompatybilności	52
3.9. Badania adhezji mikroorganizmów	53

4.	Wyniki badań i ich omówienie	55
4.1.	Dobór optymalnego napięcia oraz gęstości prądu podczas PEO wybranych stopów tytanu	55
4.2.	Charakterystyka fizykochemiczna warstw tlenkowych utworzonych na powierzchni stopu Ti-15Mo	67
4.3.	Przekroje poprzeczne warstw tlenkowych	74
4.4.	Skład chemiczny warstw tlenkowych	79
4.5.	Długoterminowe badania w roztworze Ringera	89
4.6.	Właściwości bakteriostatyczne	94
4.7.	Cytokompatybilność	102
5.	Podsumowanie	108
6.	Literatura	111
	Wykaz dorobku naukowego doktoranta	130

Wykaz symboli i oznaczeń

AgOx	tlenek srebra(I)
AgP	ortofosforan(V) srebra(I)
ASTM	Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów
CaP	ortofosforan(V) wapnia
CCD	układ elementów światłoczułych
CFU	jednostka tworząca kolonię
CpTi	komercyjnie czysty tytan
CuOx	tlenek miedzi(II)
CuP	ortofosforan miedzi(II)
DNA	kwasy deoksyrybonukleinowe
EDX	spektroskopia rentgenowska z dyspersją energetyczną
EMEM	medium do wzrostu komórek
EPS	polimerowa matryca polisacharydowa
EVA	kopolimer etylenu i octanu winylu
FBS	płodowa surowica bydlęca
FWHM	szerokość w połowie wysokości piku
GM	gummetal
HA	hydroksyapatyt
ICP-OES	spektrometria atomowa emisyjna z indukcyjnie sprzężoną plazmą
IDSS	wszczepialne systemy dostarczania leków
O _o	anion tlenu normalnie wbudowany w sieć krystaliczną
PAA	pirogronian sodu
PBP	specyficzne białka wiążące penicylinę
PC	poliwęglan
PCL	polikaprolakton
PDM	defekty punktowe
PEO	plazmowe utlenianie elektrochemiczne
PGA	poli(kwas glikolowy)
PLA	poli(kwas mlekowy)

PLGA	kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego
R_a	średnie arytmetyczne odchylenie profilu od linii średniej
RANKL	aktywator jądrowy czynnika kappa B
ROS	reaktywne formy tlenu
R_z	największe odchylenia od profilu średniej
$S^{100\% \text{ redukcji}}$	fluorescencja odczynnika Alamar Blue zredukowanego w 100%
SBF	symulowany roztwór fizjologiczny
SEM	skaningowa mikroskopia elektronowa
S^{kontrol}	fluorescencja pożywki bez komórek linii MG-63
S^x	fluorescencja próbek
TAV	stop Ti-6Al-4V
TCP	ortofosforan(V) wapnia
Ti_{Ti}	kation tytanu normalnie wbudowany w sieć krystaliczną
Ti^{x+}	międzywęzłowy kation tytanu
TM	stop Ti-15Mo
TNZ	stop Ti-13Nb-13Zr
TPU	termoplastyczny poliuretan
TSB	pożywka TSB Becton Dickinson
V_o	wakans tlenu
V_{Ti}	wakans tytanu
ZnOx	tlenek cynku
ZnP	ortofosforan(V) cynku
Λ	długość fali

1. Wstęp

Rekonstrukcja tkanki kostnej człowieka stanowi jedno z większych wyzwań dzisiejszej medycyny. Jej ubytki mogą powstać na skutek rozwoju infekcji, choroby lub przebycia urazu, uniemożliwiając prawidłowe funkcjonowanie organizmu. Najczęstszym rozwiązaniem problemu jest zastąpienie uszkodzonej tkanki kostnej biozgodnym materiałem charakteryzującym się dobrymi właściwościami mechanicznymi, a także wysoką odpornością na degradację w środowisku tkankowym [1–3]. Dobór właściwego biomateriału oraz jego bezpieczna i długotrwała eksploatacja stanowią niezbędne warunki do pomyślnej rekonstrukcji tkanki twardej oraz powrotu pacjenta do zdrowia i sprawności.

Prawidłowy przebieg procesu implantacji jest uzależniony od biokompatybilności materiału implantacyjnego, jego trwałości oraz właściwości mechanicznych, które powinny być możliwie jak najbardziej zgodne z właściwościami zastępowanej tkanki kostnej [4]. Dodatkowo proces implantacji, będący rodzajem bezpośredniej interwencji w organizm człowieka, niesie ze sobą ryzyko wystąpienia zakażenia bakteryjnego mogącego prowadzić do rozwoju stanu zapalnego, infekcji, a także całkowitego odrzucenia implantu i niepowodzenia operacji [5]. Wiedza o problemach towarzyszących dopasowaniu właściwego biomateriału oraz skutecznych metodach ochrony przed zakażeniem jest intensywnie rozwijana w celu doskonalenia technik inżynierii tkankowej i biomedycznej.

Mnogość badań naukowych doprowadziła do pojawienia się na rynku różnorodnych biomateriałów, spośród których wymienić można biomateriały ceramiczne, metalowe, polimerowe czy kompozytowe [6]. Problem zakażeń bakteryjnych jest aktualnie rozwiązywany za pomocą antybiotykoterapii [7]. Jednakże ze względu na wzrastającą oporność bakterii na działanie antybiotyków, a także niebezpieczne skutki uboczne i reakcje alergiczne wywołane w organizmie człowieka, prowadzone są intensywne badania mające na celu opracowanie alternatywnych metod leczenia oraz profilaktyki zakażeń bakteryjnych [8,9]. Złożoność możliwych problemów czyni ogół procesów związanych z implantacją tematyką interdyscyplinarną łączącą wiedzę i doświadczenie naukowców z zakresu nauk medycznych, chemicznych, inżynierii materiałowej oraz wielu innych.

1.1. Biomateriały

Implanty wszczepiane do organizmu ludzkiego produkowane są z różnego rodzaju biomateriałów, których główną rolą jest zastąpienie uszkodzonej tkanki lub narządu oraz w niektórych przypadkach spełnianie jego funkcji [6,10]. Wysokie wymagania stawiane materiałom implantacyjnym obejmują m.in. dobrą biogodność materiału, z którego wykonany jest implant, a w szczególności cechy jego powierzchni takie jak chropowatość czy zwilżalność. W celu zapewnienia prawidłowej aplikacji materiału musi on charakteryzować się szeregiem właściwości mechanicznych o parametrach zbliżonych do parametrów zastępowanej tkanki oraz zgodnych z przeznaczeniem implantu, m.in.: twardością, kruchością, elastycznością, odpornością na ścieranie, zginanie, a także optymalną wartością modułu sprężystości Younga [6].

Na przestrzeni lat dynamiczny rozwój technologii implantów dedykowanych tkance kostnej doprowadził do wyróżnienia trzech generacji biomateriałów [11]. Pierwsza z nich (lata '60 XX wieku) definiowała biomateriał jako materiał inertny względem organizmu ludzkiego oraz niewykazujący toksyczności. Wśród biomateriałów pierwszej generacji wyróżnić można szereg biomateriałów metalowych, ceramicznych oraz polimerów. Kolejne wyzwania stawiane na drodze rozwoju inżynierii biomedycznej spowodowały zmianę klasycznego podejścia do definicji biomateriału, którego obligatoryjną cechą stał się nie tylko inertny charakter, ale również bioaktywność. Wprowadzenie do technologii biomateriałów związków wspomagających wzrost tkanki kostnej oraz umacniających połączenie typu tkanka kostna-implant utworzyło drugą generację biomateriałów, do której zaliczyć można m.in. hydroksyapatyt (HA), ortofosforan(V) wapnia (TCP) oraz węglan wapnia czy bioszkła [11,12].

Aktualne badania mają na celu rozwój biomateriałów trzeciej generacji, których dodatkowym zadaniem jest zapewnienie dobrych warunków osteointegracji z jednoczesną możliwością modelowania pożądanej odpowiedzi tkankowej, np. różnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych [13].

Najogólniej, w zależności od przeznaczenia danego implantu, biomateriały można sklasyfikować względem rodzaju materiału, z którego zostały wykonane na:

- metalowe;
- ceramiczne;
- polimerowe;
- węglowe;
- kompozytowe [6,14].

Ze względu na unikalne właściwości, dużą różnorodność oraz biokompatybilność, polimery znajdują szerokie zastosowanie jako biomateriały. Na szczególną uwagę zasługują materiały implantacyjne uzyskane metodą druku 3D z wykorzystaniem polimerów biodegradowalnych [15]. Spośród szeregu materiałów polimerowych największe zainteresowanie znalazły: poli(kwas mlekowy) (PLA), poli(kwas glikolowy) (PGA), polikaprolakton (PCL), poliwęglan (PC) oraz poliamidy czy kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego (PLGA) [15,16]. Biodegradowalność polimeru oznacza, że zarówno on sam jak i produkty jego degradacji nie wywołują negatywnego działania na organizm ludzki [6]. Dużą zaletą polimerów biodegradowalnych jest brak konieczności usuwania ich z organizmu ludzkiego, co niweluje potrzebę kolejnej operacji i ryzyka wystąpienia zakażenia lub innych szkodliwych powikłań [17]. PLA, PGA oraz ich kopolimer PLGA to przykłady polimerów biodegradowalnych, których pierwszym przeznaczeniem w medycynie była produkcja rozpuszczalnych szwów chirurgicznych. Aktualnie mogą one służyć także jako materiały używane do rekonstrukcji różnych tkanek, np. porowate rusztowania wspomagające rekonstrukcję tkanki kostnej lub miękkiej [18].

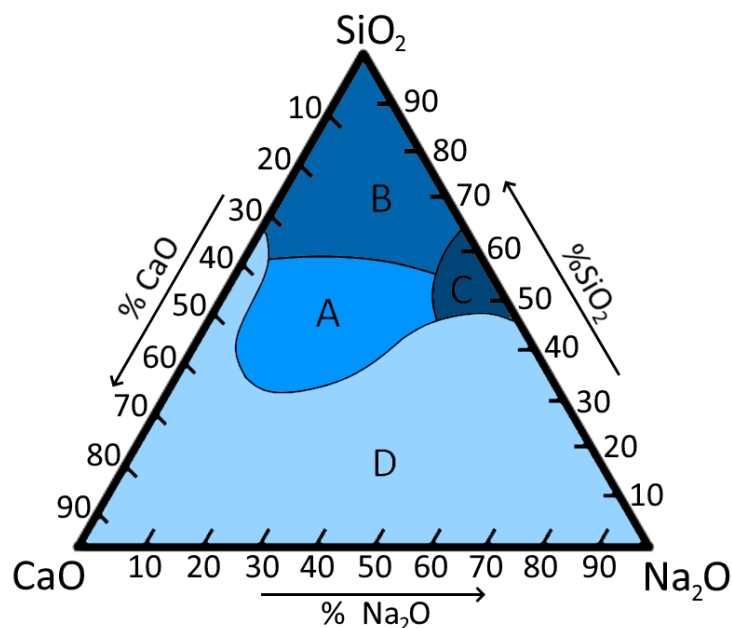
Rozpowszechnienie bioceramiki w technologii biomateriałów w znacznym stopniu poprawiło warunki osteointegracji implantu z tkanką kostną. Bioceramika znalazła szerokie zastosowanie w inżynierii biomedycznej ze względu na swoje unikalne właściwości, np. wyróżniającą się na tle innych biomateriałów porowatość [19]. W chirurgii ortopedycznej szczególne zastosowanie znalazły biomateriały ceramiczne takie jak: korund Al_2O_3 , tlenek cyrkonu ZrO_2 , bioszko, hydroksyapatyt (HA) czy ortofosforan(V) wapnia (TCP) [20]. Ze względu na typ oddziaływania pomiędzy biomateriałem ceramicznym a organizmem żywym, bioceramikę można podzielić na trzy grupy.

Pierwszą stanowi tzw. bioceramika obojętna, która umieszczona w organizmie żywym, nie wchodzi z nim w reakcje lub wchodzi w minimalnym stopniu, czemu towarzyszyć mogą niewielkie zmiany, np. składu chemicznego biomateriału [6]. Istotną zaletą materiałów bioceramicznych obojętnych jest brak ich toksycznego oddziaływania na środowisko tkankowe organizmu. Pomimo, że bioceramika obojętna nie wykazuje aktywności po umieszczeniu jej w środowisku organizmu żywego, on sam reaguje na nią poprzez stopniowe wytwarzanie wokół wszczepu włóknistej tkanki oplatającej implant [21]. Klasycznym przykładem bioceramiki obojętnej jest korund, Al_2O_3 , który znalazł zastosowanie w procesach rekonstrukcji stawu kolanowego i biodrowego jako główka nakładana na implant metalowy [6,21]. Pomimo zalet biokorundu takich jak: inertność, biogodność, stabilność chemiczna, porowatość czy odporność na ścieranie, materiał ten wykazuje stosunkowo niską odporność na pęknięcie i zginanie, co znacznie utrudnia pomyślny przebieg jego aplikacji w środowisku organizmu ludzkiego, szczególnie w postaci długoterminowego wszczepu. Z tego powodu rozpoczęto badania nad dodatkami, których obecność miała na celu poprawę właściwości mechanicznych biokorundu. Odkryto, że dodatek tlenku cyrkonu, ZrO_2 , poskutkowało w znacznej poprawie odporności na pęknięcie korundu, czyniąc bioceramikę cyrkonową drugim głównym filarem bioceramiki obojętnej [22,23].

Brak właściwości wspomagających procesy osteointegracji wykazywany przez bioceramikę obojętną skutkowało w poszukiwaniu biomateriałów stwarzających lepsze warunki procesów zespolenia implantu z tkanką kostną. Badania te doprowadziły do odkrycia ogromnej grupy materiałów ceramicznych wykazujących właściwości częściowej resorpcji w środowisku tkankowym. Biomateriały tego typu zawierają w swoim składzie pierwiastki lub związki zdolne do wytwarzania połączeń pomiędzy biomateriałem ceramicznym a dedykowaną tkanką, a następnie są one resorbowane w tkance [6]. Najważniejszym i najlepiej poznanym biomateriałem ceramicznym tej grupy z punktu widzenia dużej liczby badań naukowych oraz zastosowań jest hydroksyapatyt (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Hydroksyapatyt jest naturalnie występującym składnikiem nieorganicznym budującym tkankę kostną, którego główną rolą jest zapewnienie tkance twardej odpowiedniej wytrzymałości mechanicznej. Biomateriały ceramiczne hydroksyapatytowe cechują się wysokim stopniem biogodności z tkanką kostną ze względu na zbliżony skład chemiczny [24]. Parametrem w dużej mierze wpływającym na stopień biokompatybilności

tkanki twardej i wszczepu ceramicznego jest stosunek atomowy Ca/P, który w stechiometrycznym hydroksyapatycie wynosi 1,67. Aktualnie znane i najbardziej powszechnie wykorzystywane metody syntezy hydroksyapatytu pozwalają uzyskać biomateriał o stosunku Ca/P pomiędzy 0,5 a 2,0, natomiast najlepszymi właściwościami osteoindukcyjnymi charakteryzują się syntetyczne hydroksyapatyty o stosunku Ca/P możliwie jak najbardziej zbliżonym do wartości 1,67 [25]. Spośród innych resorbowalnych biomateriałów ceramicznych wykazujących właściwości wspomagające połączenie implantu z tkanką twardą zastosowanie znalazły także fosforany(V) wapnia typu α -Ca₃(PO₄)₂ (α -TCP) oraz β -Ca₃(PO₄)₂ (β -TCP), których stosunek atomowy Ca/P wynosi 1,5 [22].

Trzecią grupę bioceramiki stanowią materiały, które są reaktywne po wprowadzeniu do środowiska tkankowego lub środowiska płynów ustrojowych organizmu żywego. Są to tzw. biomateriały ceramiczne o kontrolowanej reaktywności w tkankach, a ich znanym przedstawicielem są bioszkieła. Bioszkieło umieszczone w środowisku tkankowym ulega hydrolizie, a produkty tego rozkładu wspomagają tworzenie oraz wzrost nowej tkanki kostnej [21]. Osteoindukcja wywołana przez hydrolizę bioszkieł jest uwarunkowana ich składem chemicznym. Najogólniej, bioszkieła składają się z Na₂O, CaO oraz SiO₂. Bioszkieło natychmiast po implantacji ulega hydrolizie, której rezultatem jest m.in. wymywanie jonów wapnia ze struktury wszczepu oraz uwalnianie krzemionki, co przyczynia się do powstania na powierzchni implantu swoistej struktury apatytowej – początkowo poprzez utworzenie cienkiej krzemionkowej warstwy, na której następnie osadzane są cząsteczki apatytu [21,26]. Struktura ta wykazuje podobieństwo do tkanki kostnej, dzięki czemu nowo tworząca się kość może wrastać w strukturę wszczepu, co skutkuje utworzeniem silnego połączenia typu implant-kość [21]. Projektowanie bioszkieł o pożądanej reaktywności wymaga precyzyjnego doboru stężenia poszczególnych składowych, co ilustruje **rys. 1**.



Rysunek 1. Układ potrójny $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2$. Symbole A-D symbolizują obszary różnej reaktywności bioszkieł w organizmie. A – prawidłowa reaktywność; B – zbyt niska reaktywność; C – zbyt wysoka reaktywność; D – brak integracji bioszkieła (zaadaptowano z [26])

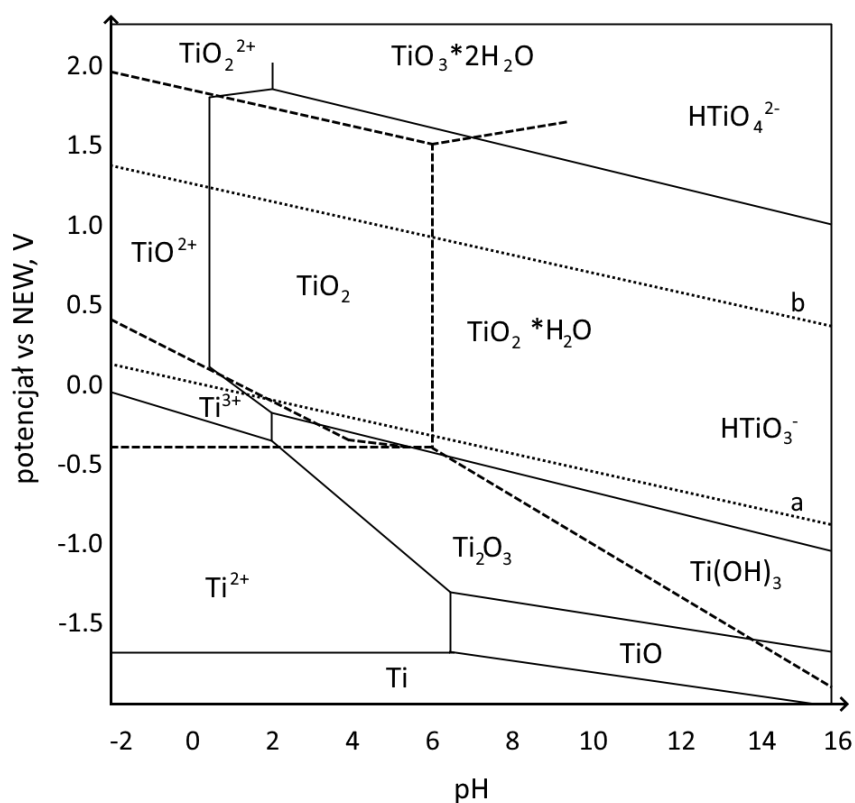
Grupą biomateriałów o zupełnie innych właściwościach niż biomateriały polimerowe czy ceramiczne są biomateriały metalowe. Ich bardzo dobre właściwości mechaniczne pozwalają na długoterminowe stosowanie implantu w organizmie ludzkim, a w konsekwencji trwałe zastąpienie uszkodzonej tkanki kostnej implantem wykonanym z metalu bądź jego stopu. Najczęściej wykorzystywanymi biomateriałami metalowymi są: stal 316 L, tytan oraz jego stopy, a także stopy kobaltu oraz chromu [27]. Biomateriały metalowe z powodzeniem są wykorzystywane w produkcji implantów ze względu na dobrą wytrzymałość mechaniczną, odporność zmęczeniową oraz korozyjną w środowisku tkankowym. Stanowią około 70-80% ogólnej ilości stosowanych implantów i są wykorzystywane w produkcji implantów ortopedycznych, m.in. protez stawu kolanowego, stawu biodrowego, płytek oraz śrub kostnych, drutów do stabilizacji złamań, ale także w produkcji implantów dentystycznych, sercowo-naczyniowych, np. sztucznej zastawki serca oraz stentów naczyniowych [27,28]. Ponadto biomateriały metalowe są wykorzystywane zarówno przy produkcji implantów krótkotrwałych jak i długoterminowych. Przykładem materiałów mogących pozostać w organizmie żywym maksymalnie do 2 lat są stopy z pamięcią kształtu, np. stop NiTi, tzw. nitinol, który znalazł zastosowanie m.in. jako tuleje dystansowe do kręgosłupa czy pręty Harringtona stosowane w leczeniu skoliozy. Innym przedstawicielem biomateriałów

metalowych krótkotrwałych są stale austenityczne, w tym najbardziej popularna stal 316L, często wykorzystywana w procesach stabilizacji tkanki kostnej po przebyłym urazie [21].

Poszukiwania biomateriałów o wysokiej odporności korozyjnej doprowadziły do opracowania implantów wykonanych ze stopów na osnowie kobaltu, których czas bezpiecznego użytkowania wynosi maksymalnie 15 lat. Jednakże grupę o najbardziej unikalnych właściwościach mechanicznych z jednoczesną dobrą odpornością korozyjną i możliwością przebywania w organizmie ludzkim nawet ponad 25 lat stanowią materiały wykonane z tytanu oraz jego stopów.

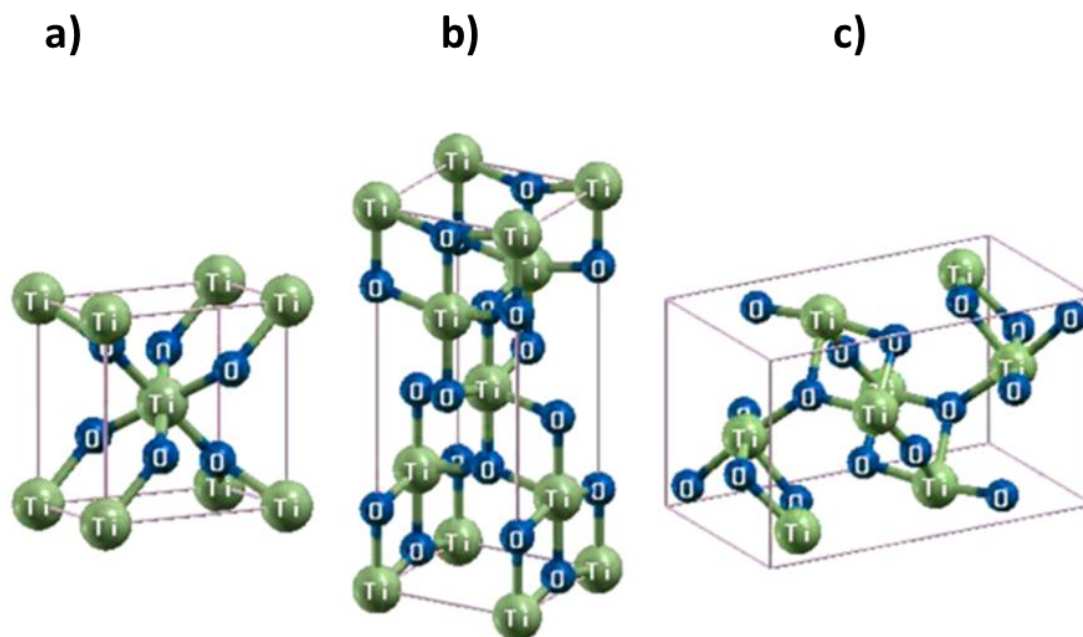
1.2. Biomateriały tytanowe

Tytan oraz stopy tytanu znajdują szerokie zastosowanie w inżynierii biomedycznej od lat '60 XX wieku. Powszechna aplikacja biomateriałów tytanowych jako materiałów implantacyjnych uzasadniona jest faktem, iż tytan wyróżnia się na tle innych biomateriałów metalowych wysoką biogodnością, brakiem negatywnego oddziaływania na organizm ludzki nawet w przypadku długoterminowego przebywania implantu w środowisku tkankowym, a także bardzo dobrą odpornością korozyjną w środowisku płynów ustrojowych [29]. W porównaniu do biomateriałów wytworzonych ze stali 316 L, tytanowe implanty charakteryzują się także niższym modułem sprężystości (modułem Younga), którego wartość mieści się w zakresie 55-110 GPa, podczas gdy dla stali 316 L wynosi on 200-210 GPa [29]. Obniżenie wartości modułu Younga jest kluczowym aspektem odpowiedniego doboru materiału implantacyjnego ze względu na stosunkowo niską wartość modułu sprężystości kości wynoszącą 15-30 GPa [30]. Zbyt wysoka wartość modułu Younga wpływa niekorzystnie na proces osteointegracji, ponieważ zwiększa ryzyko przeciążenia i zniszczenia implantu na skutek zaburzenia naturalnego rozkładu naprężeń występujących w tkance kostnej [31]. Skuteczną barierę chroniącą tytan przed korozją w środowisku płynów ustrojowych człowieka bogatym w jony chlorkowe stanowi jego zdolność do pasywacji oraz repasywacji. W wyniku tych samorzutnych procesów na powierzchni tytanu utworzona zostaje cienka warstwa tlenku tytanu(IV) [32]. Zakres, w którym tytan ulega pasywacji jest stosunkowo szeroki, co potwierdza wykres Pourbaix przedstawiony na **rys. 2**.



Rysunek 2. Diagram Pourbaix tytanu (zaadaptowano z [33])

Dobra biokompatybilność i biogodność materiałów tytanowych jest zapewniona poprzez stabilność chemiczną oraz mechaniczną powierzchniowej warstwy TiO_2 [34]. Powstała na powierzchni tytanu wskutek pasywacji warstwa tlenkowa składa się głównie z TiO_2 . Tlenek tytanu(IV) występuje w trzech odmianach krystalograficznych: jako anataz, rutyl lub brukit [35]. Rutyl oraz anataz to najczęściej występujące odmiany polimorficzne TiO_2 charakteryzujące się strukturą tetragonalną, podczas gdy rzadko występujący brukit wyróżnia się strukturą rombowa (**rys. 3**) [36].



Rysunek 3. Struktura tetragonalna rutylu (a), anatazu (b) oraz struktura rombowa brukitu (c) (zaadaptowano z [36])

Z punktu widzenia wykorzystania materiału w inżynierii biomedycznej, jedną z większych zalet anatazu jest udowodniona ułatwiona adsorpcja na jego powierzchni grup OH^- oraz PO_4^{3-} , których obecność wspomaga osadzanie związków wapnia oraz fosforu [37]. Rutyl natomiast jest również rozważany jako bardzo dobry materiał implantacyjny, ponieważ parametry jego sieci krystalicznej stwarzają lepsze warunki do krystalizacji hydroksyapatytu [38].

Aktualnie powszechnie stosowanymi biomateriałami tytanowymi są: komercyjnie czysty tytan (CpTi) oraz stop tytanu z glinem i wanadem Ti-6Al-4V [34]. Choć wyróżnić można kilkadziesiąt klas gatunkowych CpTi, Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów (ASTM, *ang. American Society for Testing and Materials*) dopuszcza do praktyki implantacyjnej klasy 1-5, spośród których klasy 1-4 stanowią gatunki tytanu niestopowego, natomiast klasę 5 charakteryzuje gatunek stopowy, wspomniany już Ti-6Al-4V [39]. W **tabeli 1** przedstawiono różnice w składzie chemicznym pomiędzy poszczególnymi klasami tytanu medycznego [40].

Tabela 1. Skład chemiczny oraz moduł sprężystości klas gatunkowych tytanu medycznego [40]

numer klasy gatunkowej	O	Fe	H	C	N	Al	V	Ti	granica
									plastyczności, MPa
1	0,18	0,20	0,015	0,08	0,03	-	-	reszta	170
2	0,25	0,30	0,015	0,08	0,03	-	-		275
3	0,35	0,30	0,015	0,08	0,03	-	-		380
4	0,40	0,50	0,015	0,08	0,05	-	-		483
5	0,13	0,25	0,012	0,08	0,05	5,5-6,5	3,5-4,5		795

Chociaż stop tytanu Ti-6Al-4V wykazuje większą wytrzymałość mechaniczną niż CpTi, zawiera on w swoim składzie glin oraz wanad – pierwiastki, które wykazują toksyczne oddziaływanie na organizm ludzki. Długotrwała aplikacja implantu w środowisku tkankowym prowadzi do korozji, która zachodząc nawet w minimalnym stopniu, prowadzi do uwolnienia z powierzchni implantu reaktywnych jonów. W wyniku tych procesów do środowiska płynów ustrojowych może przedostać się tlenek wanadu(V), charakteryzujący się bardzo dobrą rozpuszczalnością we wspomnianym środowisku. Wykazuje on właściwości toksyczne oraz kancerogenne [41]. Obecność glinu również stanowi zagrożenie dla zdrowia organizmu ludzkiego, ponieważ jego jony mają tendencję do gromadzenia się w poszczególnych partiach mózgu, prowadząc do szeregu schorzeń, m.in.: osteomalacji i epilepsji, a także choroby Alzheimera [42,43].

Bezwanadowe stopy tytanu

Zagrożenia związane z kancerogennością oraz toksycznością produktów korozji wanadu są przyczyną prowadzenia badań nad bezwanadowymi stopami tytanu o relatywnie niskim module Younga. Przykładami stopów tytanu o interesującym składzie i potencjalnie szerokim wachlarzu zastosowań są stopy tytanu z molibdenem Ti-Mo, m.in. Ti-15Mo [44]. Stop Ti-15Mo stanowi β -jednofazowy stop tytanu, którego struktura jest stabilizowana poprzez dodatek molibdenu będący jednocześnie pierwiastkiem stopowym o znacznie niższej toksyczności niż wanad czy glin [45,46]. Ponadto udowodniono, że wartość modułu Younga oraz twardość stopów tytanu z molibdenem są bezpośrednio uzależnione od ilości

znajdującego się w nim molibdenu [47], co stwarza możliwość projektowania stopów typu Ti-Mo o zmiennej wartości modułu Younga [48]. Przeprowadzono badania dowodzące, że dodatek molibdenu skutkuje w podwyższeniu twardości stopu Ti-Mo, obniżeniu jego modułu sprężystości, a także podwyższeniu odporności korozyjnej. Stężenie molibdenu diametralnie wpływa także na ostateczny skład fazowy powstałego stopu Ti-Mo. Przykładowo stopy Ti-3,2Mo oraz Ti-8Mo składają się jedynie z faz α i β oraz cechują się niższym modułem Younga niż stopy Ti-4,5Mo, Ti-6Mo czy Ti-7Mo, w przypadku których zaobserwować można powstanie dodatkowej fazy ω - niepożądaney ze względu na jej wpływ na utratę plastyczności materiału oraz nadanie mu większej kruchości. W celu uzyskania jednofazowego stopu β cechującego się stosunkowo niskim modułem Younga oraz dobrą odpornością korozyjną (badane medium: płyn Ringera), molibden musi zostać wprowadzony w skład stopu w przynajmniej 15%, co rozpowszechniło badania nad stopem Ti-15Mo [49–51]. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że stopy typu Ti-Mo wykazują dobrą cytokompatybilność oraz biokompatybilność z jednocześnie zachowaną dobrą odpornością korozyjną, stanowiąc interesujące biomateriały mogące znaleźć zastosowanie w chirurgii ortopedycznej [52].

Następnym bezwanadowym stopem tytanu o składzie zasługującym na szczególną uwagę jest stop typu Ti-Nb-Zr, np. Ti-13Nb-13Zr. Dużą zaletą składu chemicznego tego stopu jest fakt, że zarówno niob jak i cyrkon nie wykazują toksyczności, wspomagając tym samym biokompatybilność materiału i tkanki kostnej. Innym ważnym aspektem jest relatywnie wysoka wzajemna rozpuszczalność wspomnianych trzech pierwiastków stopowych [53]. Analogicznie do przypadku poprzednika, stopu Ti-15Mo, stop Ti-13Nb-13Zr wykazuje dobrą odporność na korozję, również w środowisku chlorkowym, co spowodowane jest powstawaniem na jego powierzchni pasywnej warstwy tlenkowej składającej się z tlenków tytanu (Ti_2O_3 oraz TiO_2), a także tlenków dodatków stopowych, np. Nb_2O_5 [54,55]. Tak jak w przypadku pozostałych materiałów stopowych z udziałem tytanu, powstająca na ich powierzchni warstwa pasywna charakteryzuje się podwójną budową. Dzięki występującej cienkiej i zwartej pierwszej wewnętrznej warstwie, materiał jest chroniony przed postępowaniem korozji. Natomiast druga, bardziej zewnętrzna warstwa, cechuje się porowatą strukturą, która wspomaga następcze procesy osteointegracji biomateriału z tkanką kostną poprzez ułatwienie adsorpcji cząsteczek wody oraz jonów z środowiska tkankowego na powierzchni

implantu [54]. Dodatek cyrkonu nie wpływa na stabilizację fazy β , jednak zapewnia lepszą odporność korozyjną oraz biokompatybilność stopu dzięki obecności cyrkonu [56,57]. Występujący w składzie niob odpowiada za stabilizację fazy β oraz obniżenie wartości modułu Younga do wartości ok. 60-90 GPa [58,59].

Innym stopem tytanu zawierającym w swoim składzie niob jest stop typu Ti-6Al-7Nb. Prace nad tym materiałem przeprowadzane były na przełomie lat '70 oraz '80 XX wieku i doprowadziły do wprowadzenia stopu Ti-6Al-7Nb na rynek biomateriałów pod nazwą handlową Protasul 100 [60]. Jest on stosowany m.in. w produkcji protez biodrowych [61]. Wykazuje właściwości zbliżone do właściwości powszechnie stosowanego stopu Ti-6Al-4V z tą różnicą, że cytotoksyczny wanad został zastąpiony niobem, nadając mu znacznie lepsze właściwości biozgodne. Obecność niobu skutkuje również zwiększeniem odporności korozyjnej stopu poprzez utworzenie zwartej warstwy tlenków niobu na drodze pasywacji powierzchni stopu [62]. Stop Ti-6Al-7Nb cechuje się zbliżonymi właściwościami mechanicznymi do stopu Ti-6Al-4V, w tym zbliżoną wartością modułu Younga, który dla stopu z niobem wynosi 105 GPa, a dla stopu Ti-6Al-4V 110 GPa [63].

W ostatnich latach wzrosło także zainteresowanie stopem tytanu powszechnie nazywanym „gummetalem” o ogólnym składzie Ti-Nb-Zr-Ta, np. Ti-36Nb-2Ta-3Zr-0,3O. Gummetal został zaprojektowany i stworzony przez firmę Toyota. Należy on również do β -fazowych stopów tytanu, a spośród innych stopów tytanu wyróżnia go wyjątkowo niski moduł sprężystości, mieszczący się w zakresie od 40 do 80 GPa przy jednoczesnym zachowaniu dobrej biokompatybilności, cytozgodności i odporności korozyjnej, a także odpowiednich właściwości mechanicznych w kontekście zastosowań w inżynierii biomedycznej [64,65]. Jego niski moduł Younga i brak toksycznych pierwiastków w składzie to jedne z większych zalet tego biomateriału, natomiast do tej pory na jego temat opublikowano niewiele badań i stanowi on jeden z prekursorów w dziedzinie bezwanadowych β -fazowych stopów tytanu o relatywnie niskim module Younga [65].

1.3. Czynniki wpływające na bioaktywność implantów tytanowych

Wszczepienie implantu chirurgicznego w strukturę tkanki kostnej stanowi rodzaj bezpośredniej ingerencji w organizm ludzki. Jak każdy zabieg chirurgiczny, implantacja również niesie ze sobą szereg wymagań stawianych biomateriałowi mających na celu

zapewnić dobre warunki integracji obcego materiału implantacyjnego z tkanką twardą. Wspomniany w poprzednim rozdziale tytan jest uważany za materiał inertny dla środowiska ludzkiego organizmu. Choć obojętność chemiczna tytanu generuje liczne zalety jego użytkowania (brak negatywnej reakcji organizmu), nie zapewnia ona dobrego i stabilnego połączenia typu implant-kość. Materiał bioaktywny powinien nie tylko nie oddziaływać w sposób negatywny na organizm człowieka, ale także indukować pozytywne reakcje przyspieszające prawidłowy wzrost i rozwój nowopowstającej tkanki kostnej [66]. Rozważając prawidłowość procesu zespolenia tkanki kostnej z powierzchnią wprowadzanego implantu, należy zwrócić uwagę na skład chemiczny kości. Związkiem naturalnie występującym w kości oraz decydującym o jej właściwościach mechanicznych i wytrzymałości jest hydroksyapatyt (HA) – fosforan wapnia o wzorze $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ [67]. Ze względu na relację pomiędzy składem chemicznym tkanki twardej a występującym w niej hydroksyapatytem, jego obecność w biomateriałach jest wysoce pożądana. Na ocenę biokompatybilności danego biomateriału duży wpływ ma stosunek atomowy Ca/P, który w naturalnym hydroksyapatycie wynosi 1,67. Syntetyczny hydroksyapatyt charakteryzuje się stosunkiem atomowym Ca/P w zakresie od 0,5 do 2,0 w zależności od wyboru metody jego otrzymywania. Właściwości bioaktywne oraz osteoindukcyjne wspomagające utworzenie oraz proliferację nowej tkanki kostnej są w znacznym stopniu zależne od obecności związków wapnia i fosforu (w szczególności hydroksyapatytu) w strukturze biomateriału [22,68]. Wynika to z roli, jaką pierwiastki te pełnią w procesie budowy tkanki kostnej. Dowiedziono, że zarówno wapń jak i fosfor wspomagają proces adsorpcji komórek kościotwórczych, regeneracji tkanki kostnej, a także różnicowania się komórek macierzystych w osteoblasty [69–71].

Prawidłowy proces osteointegracji jest uwarunkowany wieloma czynnikami, ale na szczególną uwagę zasługuje początkowy etap integracji implant-kość, którym jest przyłączenie do powierzchni implantu cząsteczek wody ułatwiających adhezję protein, a następnie komórek żywych oraz krystalizację hydroksyapatytu. Pomyślne formowanie kryształów hydroksyapatytowych jest związane z rodzajem ładunku obecnego na powierzchni implantu. Ujemnie naładowane grupy hydroksylowe OH^- powodują przyciąganie i chemisorpcję dodatnio naładowanych kationów wapnia. Następnie, jony Ca^{2+} ułatwiają przyłączenie do powierzchni biomateriału anionów fosforanowych,

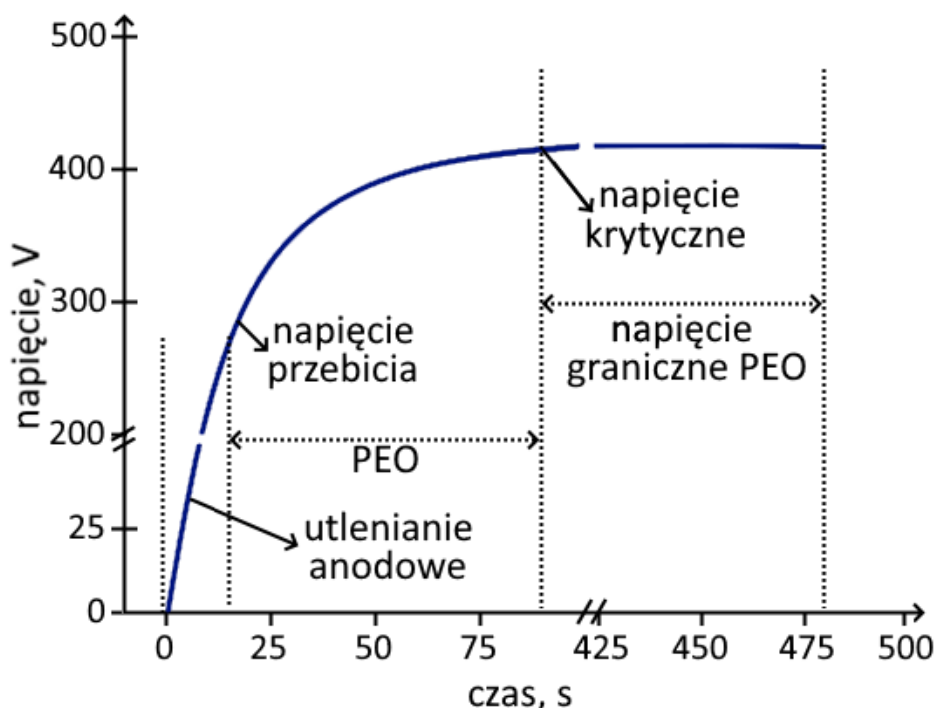
co ostatecznie skutkuje krystalizacją hydroksyapatytu [68]. Wynika stąd, że charakter hydrofilowy powierzchni implantu jest szczególnie istotny dla pomyślnego postępu procesu osteointegracji, w tym migracji oraz adhezji białek i komórek kościotwórczych do powierzchni biomateriału, a także ich proliferacji i wzrostu nowoutworzonej tkanki twardej [72].

Odpowiedź komórkowa oraz tkankowa organizmu na obecność implantu jest także uzależniona od chropowatości jego powierzchni. Znanych jest kilka podstawowych parametrów służących do pomiaru chropowatości powierzchni, ale jednym z najpowszechniej wykorzystywanych jest średnie arytmetyczne odchylenie profilu od linii średniej (R_a). Dowiedziono, że powierzchnia biomateriału o wartości R_a mieszczącej się w zakresie od 1,0 μm do 1,5 μm wykazuje preferencyjną chropowatość dla zapewnienia dobrego połączenia na granicy tkanka kostna-implant. Dodatkowym potwierdzeniem pozytywnego wpływu zwiększonej chropowatości powierzchni implantu na procesy osteointegracji były wyniki przeprowadzonych badań klinicznych [73]. Zwiększona chropowatość implantu wpływa na poprawę przyczepności makrocząsteczek do powierzchni biomateriału oraz kości, czego rezultatem jest zwiększona odporność na ściskanie oraz naprężenia. Wzrost chropowatości powierzchni odzwierciedla się również w podwyższeniu energii powierzchniowej, która zapewnia bardziej stabilną biointegrację komórek żywych organizmu z powierzchnią implantu niż w przypadku adhezji do powierzchni gładkiej, czego rezultatem jest szybszy proces osteointegracji oraz jego lepsze warunki [74]. Zwiększona energia powierzchniowa biomateriału umożliwia adhezję większej ilości komórek kościotwórczych, a także skraca jej czas [75].

1.4. Plazmowe utlenianie elektrochemiczne (PEO) jako skuteczna metoda funkcjonalizacji powierzchni stopów tytanu

Biokompatybilność oraz cytozgodność biomateriału implantacyjnego jest zależna od mnogości czynników, spośród których wymienić można strukturę, topografię i skład chemiczny warstwy wierzchniej implantu, a także jej porowatość, chropowatość, zwilżalność oraz odporność na korozję w środowisku tkankowym bogatym w chlorki. Cechy powierzchni materiału tytanowego mogą być modyfikowane szeregiem różnych metod funkcjonalizacji powierzchni mających na celu poprawę warunków osteointegracji implantu z tkanką kostną. Do metod tych należą m.in.: napylenie plazmowe, implantacja jonowa, nanoszenie powłok typu zol-żel oraz metody elektrochemiczne mające na celu wytworzenie na powierzchni materiału funkcjonalnej powłoki [34]. Technika umożliwiającą utworzenie na powierzchni implantu warstwy tlenkowej o zwiększonej porowatości i odporności korozyjnej jest plazmowe utlenianie elektrochemiczne (PEO) [38].

Plazmowe utlenianie elektrochemiczne to szczególny przypadek utleniania anodowego, podczas którego stosowane jest napięcie wyższe od napięcia przebicia warstwy dielektrycznej, wskutek czego na powierzchni utlenianego materiału powstaje porowata warstwa tlenkowa wzbogacona o związki pierwiastków znajdujących się w elektrolicie [76]. Najogólniej przebieg procesu PEO można scharakteryzować w trzech etapach, co przedstawiono na **rys. 4** [77].

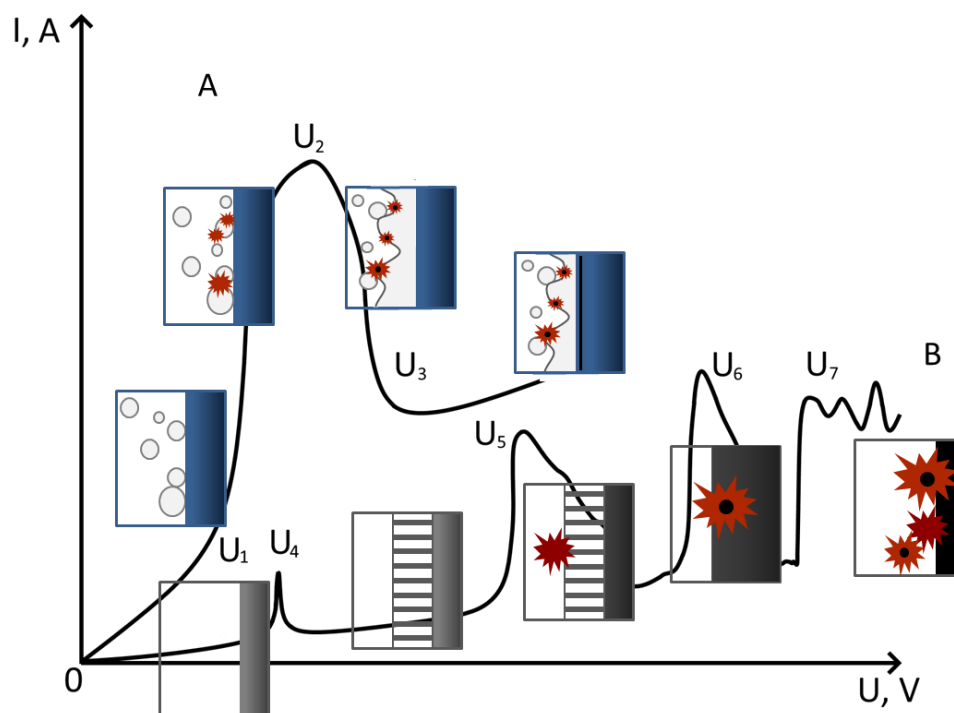


Rysunek 4. Wykres obrazujący zależność wzrostu napięcia w funkcji czasu oraz szczególne momenty plazmowego utleniania elektrochemicznego (zaadaptowano z [79])

Pierwszy etap obrazuje konwencjonalne utlenianie anodowe tytanu, które zachodzi przed osiągnięciem napięcia przebicia warstwy dielektrycznej oraz przed wystąpieniem na powierzchni utlenianego materiału wyładowań iskrowych. W tym etapie zaobserwować można liniowy wzrost napięcia podczas procesu. Wraz z postępem PEO na powierzchni utlenianego tytanu powstaje warstwa tlenkowa składająca się głównie z TiO_2 o właściwościach dielektrycznych. Wzrastająca grubość warstwy tlenkowej skutkuje zwiększeniem jej oporu elektrycznego. Na powierzchni obu elektrod wydzielane są pęcherzyki gazowe dodatkowo podnoszące opór, co wraz z dielektrycznym charakterem warstwy tlenkowej skutkuje w dalej wzrastającym napięciu postępującym aż do osiągnięcia tzw. napięcia przebicia warstwy dielektrycznej. Po jego osiągnięciu (etap II) następuje przebicie objawiające się licznymi mikrowyładowaniami elektrycznymi, a wydzielające się pęcherzyki gazu w pobliżu powierzchni elektrod pozwalają na utworzenie wysokotemperaturowej plazmy. Choć temperatura spowodowana mikrowyładowaniami może sięgać kilkunastu tysięcy kelwinów, czas ich trwania jest bardzo krótki, więc powierzchnia utlenianego materiału jest na bieżąco schładzana roztworem elektrolitu. Powstające silne pole elektryczne umożliwia wbudowywanie pierwiastków znajdujących się

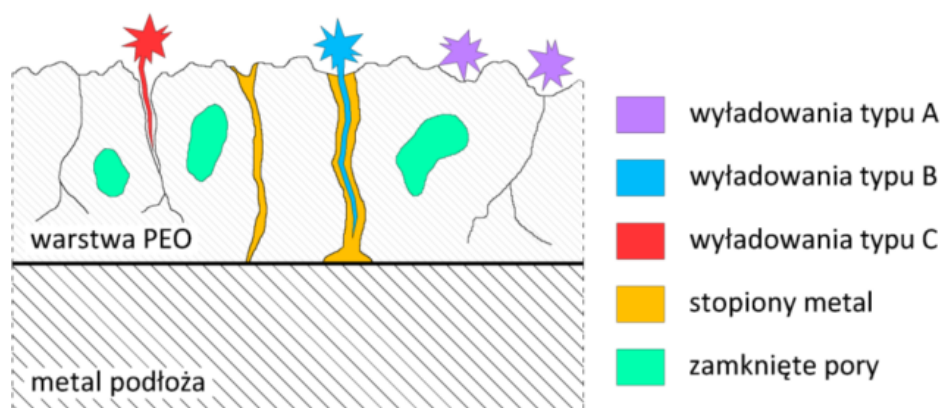
w elektrolicie w strukturę powstającej warstwy tlenkowej. Ostatecznie, układ osiąga napięcie krytyczne i potencjał stabilizuje się. Jednocześnie jony Ti^{4+} uwalniają się do elektrolitu na skutek roztwarzania tytanu, co jednak zachodzi w bardzo niewielkim stopniu [76,77].

Mechanizm zachodzących procesów dokładniej obrazuje **rys. 5** przedstawiający charakterystykę prądowo-napięciową dwóch układów, gdzie pierwszy (A) przedstawia zmiany zachodzące w podwójnej warstwie elektrycznej, a drugi (B) zmiany powstałe w dielektrycznej warstwie tlenkowej. W warunkach stosunkowo niskiego napięcia (od punktu 0 do punktów U_1 lub odpowiednio U_4) natężenie prądu rośnie proporcjonalnie do wzrostu napięcia, jednak z dalszym jego wzrostem tendencja ta ulega zmianie. Wraz z postępem procesu utleniania z powierzchni elektrody uwalniane są gazowe produkty reakcji ograniczające w pewnym stopniu wzrost natężenia prądu (U_1-U_2). Postępujący wzrost natężenia prądu skutkuje w lokalnym wrzeniu elektrolitu i powstawaniem plazmy, której cienka warstwa przylega do powierzchni elektrody i charakteryzuje się niskim przewodnictwem elektrycznym, powodując zgromadzenie większości ładunku elektrycznego w niewielkim obszarze. Prowadzi to do powstania silnego pola elektrycznego sięgającego do 10^8 V/m, co umożliwia zapoczątkowanie procesu jonizacji objawiającej się pojawieniem się licznych iskier. Stabilizacja warstwy plazmy skutkuje w spadku natężenia prądu (U_2-U_3) i ostatecznie wyładowania jarzeniowe przechodzą w intensywne wyładowania łukowe [78]. Zmiany zachodzące w obrębie warstwy tlenkowej przedstawione za pomocą krzywej B są bardziej skomplikowane. Utworzona w pierwszej kolejności warstwa pasywna zaczyna się roztwarzać (U_4). Następnie na skutek repasywacji (U_4-U_5) powstaje nowa warstwa tlenkowa o porowatej strukturze. Jonizacja tunelowa prowadzi do osiągnięcia potencjału przebicia (U_5) warstwy tlenkowej, na powierzchni której pojawiają się liczne, szybko poruszające się iskry. Ostatecznie dochodzi do jonizacji termicznej i pojawienia się mikrowyładowań łukowych (U_6) umożliwiających wbudowywanie pierwiastków pochodzących ze składników elektrolitu w strukturę intensywnie tworzącej się warstwy tlenkowej (U_6-U_7) [78].



Rysunek 5. Charakterystyka prądowo-napięciowa przedstawiająca zmiany zachodzące w dwóch układach: A – podwójnej warstwie elektrycznej na powierzchni elektrody oraz B – w obrębie powstającej warstwy dielektrycznej (zaadaptowano z [78])

Wraz z postępem procesu PEO czas trwania oraz intensywność mikrowyładowań rośnie, co bezpośrednio wpływa na morfologię i porowatość modyfikowanej powierzchni, a także na jej odporność korozyjną. Istnieją dwie różne teorie powstawania mikrowyładowań. Pierwsza z nich zakłada, że wyladowania są skutkiem osiągnięcia i przekroczenia potencjału przebicia warstwy dielektrycznej. Powstające mikrowyładowania prowadzą do utworzenia warstwy tlenkowej składającej się głównie z tytanu oraz tlenku tytanu(IV) oraz charakteryzującej się porowatą strukturą. Wyladowania natomiast mogą także powstawać w pęcherzykach gazu znajdujących się w mikroporach powierzchni modyfikowanego materiału. Takie wyladowania mają charakter wyladowań łukowych, a model ten tłumaczy wzrost warstwy tlenkowej wzbogaconej nie tylko o tlenek tytanu(IV), ale także o związki pierwiastków znajdujących się w kąpeli [77].



Rysunek 6. Typy wyładowań powstających w trakcie procesu PEO (zaadaptowano z [79])

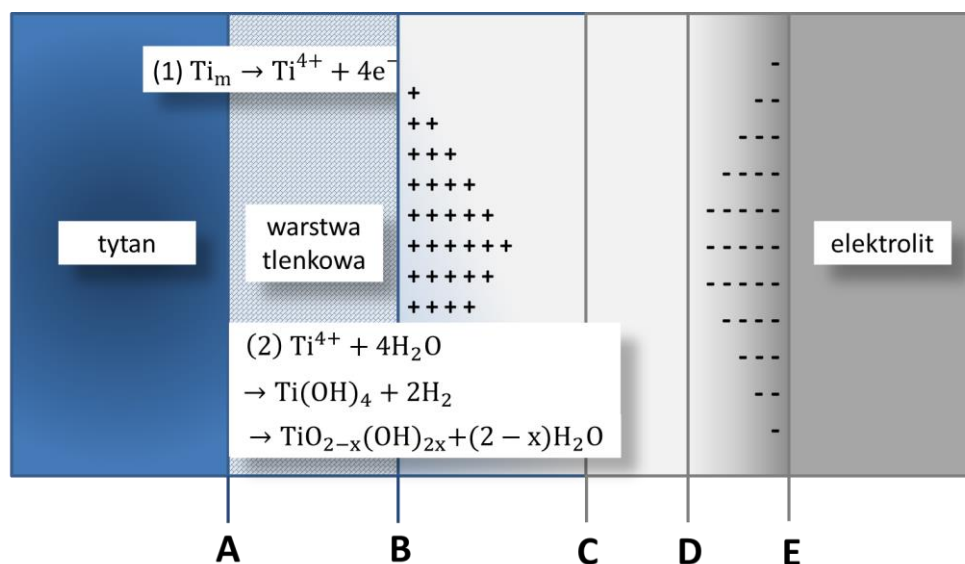
Bardziej szczegółowe badania mechanizmu procesu PEO pozwoliły wyróżnić trzy typy wyładowań powstających w trakcie procesu PEO (**rys. 6**). Wyładowania powstające na skutek osiągnięcia potencjału przebicia warstwy dielektrycznej są zobrazowane jako wyładowania typu B. Powstają one w silnym polu elektrycznym powodującym lokalne przerwanie ciągłości warstwy tlenkowej. Wzdłuż całej warstwy tlenkowej zachodzą reakcje z udziałem plazmy skutkujące w stopieniu metalu podłoża i transporcie jonów metalu do warstwy tlenkowej. Są to najsilniejsze z wymienionych typów wyładowania [79]. Wyładowania zachodzące w pęcherzykach gazów obecnych w mikroporach powierzchni materiału są słabszymi wyładowaniami typu A oraz C (**rys. 6**). Wyładowania typu A występują w cienkiej warstwie przy powierzchni warstwy tlenkowej, natomiast wyładowania typu C penetrują warstwę tlenkową głębiej niż wyładowania typu A. Zarówno wyładowania typu A jak i typu C są wyładowaniami stosunkowo słabymi. Wszystkie trzy typy wyładowań występują równocześnie w całej szerokości warstwy tlenkowej [79].

Plazmowe utlenianie elektrochemiczne pozwala na otrzymanie na powierzchni modyfikowanego materiału warstw tlenkowych o porowatej strukturze. Wielkość oraz rozmieszczenie porów zależą głównie od zastosowanych warunków prądowych. Choć powstałe pory są rozmieszczone regularnie oraz charakteryzują się średnicą rzędu od kilku do kilkunastu μm , możliwym jest także utworzenie struktur nanoporowatych [80]. Ostatecznie uzyskana morfologia powierzchni zależy od różnych czynników, np. napięcia oraz gęstości prądu, składu elektrolitu oraz jego przewodnictwa elektrycznego, czasu trwania procesu PEO czy temperatury kąpeli. Złożoność czynników wpływających na rodzaj oraz jakość otrzymanych powłok pozwala na stosunkowo precyzyjną kontrolę procesu oraz

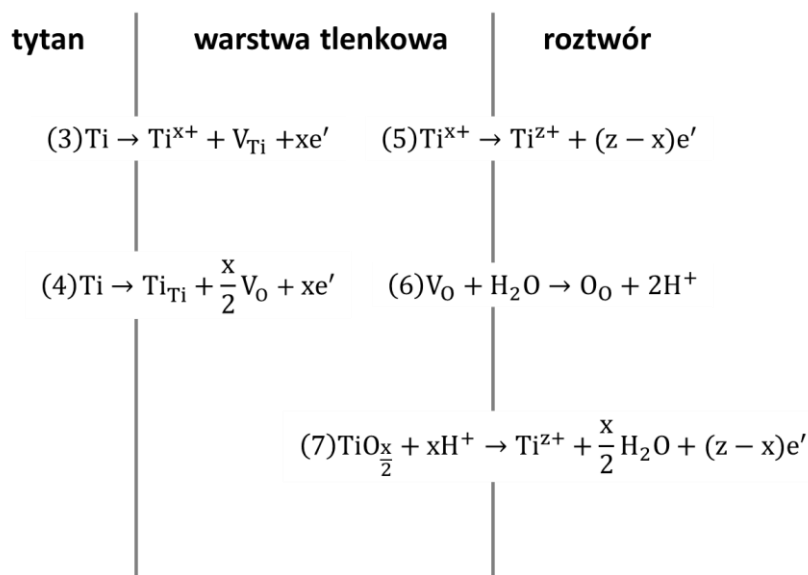
otrzymanie produktu o pożądanych cechach [77]. Plazmowe utlenianie elektrolityczne prowadzi do powstania na powierzchni utlenianego materiału mikro- oraz nanostruktur, spośród których rozróżnić można kilka rodzajów ze względu na mechanizm ich powstawania. Pierwszy typ to struktury powstałe na skutek oddziaływania pomiędzy utlenianym anodowo materiałem a składnikami kąpieli, np. nanosfery, nano- czy mikrokryształy znajdujące się wewnątrz poszczególnych porów. Drugi rodzaj struktur jest generowany jako efekt pewnych dodatkowych wydarzeń (np. wyżarzania) – w ten sposób tworzą się struktury znajdujące się na powierzchni materiału. Ostatni typ stanowią związki wbudowane w strukturę warstwy tlenkowej i są one charakterystycznym skutkiem procesu plazmowego utleniania elektrochemicznego [77]. Choć struktury porowate to standardowy rezultat procesu PEO, rozmiar, gęstość rozmieszczenia, a nawet kształt powstałych porów jest zależny od składu chemicznego elektrolitu. Przykładowo, dodatek wodorotlenku potasu lub sodu zwiększa znacznie przewodnictwo elektrolitu, obniżając tym samym jego opór oraz łagodząc i stabilizując powstałe wyładowania. Uzyskane w ten sposób warstwy tlenkowe charakteryzują się stosunkowo niewiele mniejszą porowatością oraz porami o mniejszych średnicach. Jest to następstwem niższej wartości napięcia przebicia warstwy dielektrycznej. Obecność w kąpieli kwasu siarkowego(VI) czy ortofosforowego(V) skutkuje w powstaniu powierzchni o relatywnie wyższej chropowatości i bardziej rozwiniętej powierzchni, ponieważ utworzone pory mają mniej kulisty kształt i bardziej rozbudowaną geometrię [77,81]. Porowatość oraz chropowatość warstw tlenkowych może być także kontrolowana poprzez dodatek surfaktantów, np. glikolu polietylenowego. Na skutek obniżonego napięcia powierzchniowego maleje wielkość powstających pęcherzy gazów na powierzchni anody podczas procesu, co w konsekwencji prowadzi do utworzenia porów o mniejszych rozmiarach [82].

Powszechnie wiadomym jest, że materiał, na powierzchni którego wytworzono powłokę tlenkową, zazwyczaj charakteryzuje się zwiększoną odpornością na korozję. W przypadku porowatych warstw mechanizm korozji jest nieco bardziej skomplikowany, ponieważ obecność porów może być przyczyną ułatwionego dostępu medium korozyjnego do podłoża. W związku z tym wzrost grubości warstwy tlenkowej przyczynia się do lepszej odporności materiału na korozję. Należy również zwrócić uwagę na fakt, że pomiędzy relatywnie grubą, porowatą warstwą tlenkową a tytanowym podłożem, znajduje się cienka, zwarta warstwa

tlenkowa, która powstaje z początkiem procesu utleniania anodowego [83,84]. Jest to związane z podwójną budową warstwy pasywnej tworzącej się na powierzchni tytanu (rys. 7) [85].



- A granica: metal | warstwa tlenkowa
- B-C warstwa niedoboru elektronów
- C granica: warstwa tlenkowa | elektrolit
- D gradient stężenia
- D-E warstwa nadmiaru anionów



Rysunek 7. Schematyczne przedstawienie procesów zachodzących na granicy tytan-warstwa pasywna oraz warstwa pasywna-roztwór. V_{Ti} – wakans tytanu, Ti_{Ti} – kation tytanu normalnie wbudowany w sieć krystaliczną, V_O – wakans tlenu, O_O – anion tlenu normalnie wbudowany w sieć

krystaliczną, Ti^{x+} - międzywęzłowy kation tytanu, z – stopień utlenienia formy jonowej, x – stopień utlenienia wakansu (zaadaptowano z [87])

Charakterystykę powstającej pasywnej warstwy na powierzchni tytanu tłumaczy model tzw. defektów punktowych (*ang. point deffective model*, PDM). Zakłada on, że defekty struktury krystalicznej są tworzone na drodze powstawania wakansów tlenowych oraz międzywęzłowych kationów na granicy metal-warstwa pasywna. Reakcje przedstawione na **rys. 7** tłumaczą sposób, w jaki wakansy tlenowe i kationy międzywęzłowe biorą udział w tworzeniu struktury warstwy pasywnej. Wakansy tlenowe absorbują światło widzialne w różnych, specyficznych zakresach, stąd otrzymane powłoki tlenkowe na powierzchni tytanu cechują się spektrum różnych barw, choć na ten fenomen wpływ ma również grubość powstającej powłoki tlenkowej [77,85].

Reasumując, warstwy tlenkowe otrzymane metodą plazmowego utleniania elektrochemicznego charakteryzują się porowatą strukturą, rozwiniętą powierzchnią oraz zwiększoną odpornością na korozję. Dużą zaletą procesu PEO jest możliwość relatywnie prostego kontrolowania warunków procesu utleniania anodowego wraz z właściwościami powstających warstw. Plazmowe utlenianie elektrochemiczne jest potencjalnie atrakcyjną metodą w kontekście modyfikacji biomateriałów. Charakterystyczną cechą i jedną z większych zalet procesu PEO jest zachodząca równocześnie z procesem inkorporacja związków znajdujących się w składzie kąpeli. Związki te mogą poprawiać bioaktywność biomateriału oraz warunki osteointegracji implantu z tkanką kostną, np. związki wapnia i fosforu [86], a także nadawać biomateriałom właściwości bakteriostatyczne i/lub bakteriobójcze, np. związki cynku, miedzi oraz srebra [87].

1.5. Zakażenia septyczne tkanki kostnej

Implantacja będąca rodzajem operacji i zabiegu bezpośrednio ingerującego w organizm ludzki niesie ze sobą nieodłączne ryzyko wywołania infekcji tkanki kostnej. Infekcja może mieć podłoże bakteryjne lub grzybiczne, prowadzące do powstania zakażenia septycznego tkanki kostnej, a w następstwie do rozwoju zapalenia kości. Jednymi z najczęściej występujących szpitalnych patogenów bakteryjnych wywołujących zapalenie tkanki kostnej są *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, natomiast szczep *Candida albicans* jest uważany za potencjalnie niebezpieczny dla ludzkiego zdrowia patogen grzybiczny [88–90].

Zapalenie tkanki kostnej objawia się zaczerwienieniem chorej tkanki, a także jej bólem i obrzękiem powodującym dyskomfort pacjenta. Dodatkowo dalszy wzrost biofilmu bakteryjnego czy grzybicznego zaburza w znaczny sposób aktywność komórek tkanki kostnej, osteoblastów, których podstawową rolą jest formowanie nowej, zdrowej tkanki twardej. Prowadzi to ostatecznie do konieczności usunięcia implantu i przeprowadzenia zazwyczaj długiej rekonwalescencji [91,92]. Leczenie septycznego zapalenia kości jest kłopotliwe ze względu na wzrastającą oporność bakterii na antybiotyki, co czyni antybiotykoterapię coraz mniej skuteczną. Przewlekłe lub nieleczone zapalenie tkanki kostnej może doprowadzić do rozwoju sepsy oraz, w przypadku najbardziej niebezpiecznych powikłań, nie tylko do niepowodzenia procesu implantacji, ale także do zgonu pacjenta [92].

W miarę postępu proliferacji komórek bakteryjnych wzrasta problematyczność leczenia zakażenia septycznego ze względu na powstający z czasem biofilm odporny na działanie środków bakteriobójczych. U podstaw tworzenia biofilmu leży zdolność komórek bakteryjnych do produkowania polisacharydów i makrocząstek. Powstający biofilm stanowi swojego rodzaju nagromadzenie drobnoustrojów, które są chronione dzięki wytworzeniu polimerowej matrycy polisacharydowej (*ang. extracellular polymeric substance, EPS*). Bakterie zorganizowane w biofilmie trwale przylegają do powierzchni implantu, a ich usunięcie stanowi bardzo trudne zadanie. Struktura EPS nie tylko chroni mikroorganizmy w niej żyjące przed ogólnoustrojowym działaniem farmakologii, ale także stanowi magazyn substancji odżywczych, wspomagając dalszy rozwój szkodliwych komórek bakteryjnych czy grzybiczych [93]. Rozwój biofilmu bakteryjnego można podzielić na poniższe etapy:

- adhezja pojedynczych komórek bakteryjnych. Etap ten jest stosunkowo łatwo odwracalny. Komórki bakteryjne wiążą się z podłożem za pomocą słabych oddziaływań van der Waalsa. Duży wpływ na początkową adhezję mikroorganizmów ma chropowatość, topografia, a także hydrofobowość powierzchni;
- nieodwracalna adhezja następných komórek mikroorganizmów. Rozpoczyna się produkcja EPS;
- dojrzewanie biofilmu. W strukturze nowego biofilmu tworzą się mikrokolonie bakteryjne oraz dochodzi do otoczenia ich przez EPS;
- oderwanie komórek z biofilmu i dalsze rozprzestrzenianie w celu utworzenia nowych kolonii bakteryjnych oraz rozwoju infekcji [94].

Staphylococcus aureus jest Gram-dodatnią bakterią stanowiącą najpowszechniej występujący i przenoszony patogen bakteryjny w środowisku szpitalnym. Jest odpowiedzialna za wywołanie takich chorób jak m.in. zapalenie kości i szpiku, zapalenie płuc i wśierdza czy ropień skóry [95]. Choć *S. aureus* w większości przypadków rozwija się w środowisku tlenowym, istnieją także sporadyczne incydenty wzrostu tej bakterii w warunkach beztlenowych. *S. aureus* to patogen w największym stopniu wywołujący stany zapalne oraz zakażenia bakteryjne u pacjentów w szpitalach [96]. Wykazano, że w ścianie komórkowej *S. aureus* znajdują się specyficzne związki, adhezyny, odpowiedzialne za połączenie komórek bakteryjnych z receptorami występującymi w strukturze osteoblastów. Jest to tzw. proces internalizacji komórek bakteryjnych przez osteoblasty i prowadzi on ostatecznie do apoptozy (śmierci) komórki ludzkiej. Komórki bakteryjne uwolnione z macierzy martwych osteoblastów mogą przenosić się na kolejne niezainfekowane komórki kostne, rozwijając w ten sposób szkodliwy dla środowiska tkankowego bakteryjny biofilm [92]. Unieszkodliwienie dojrzałego, wielowarstwowego biofilmu jest znacznie trudniejsze niż uśmiercenie pojedynczych komórek bakteryjnych, ponieważ jest on bardziej odporny na działanie układu immunologicznego organizmu gospodarza, a także na działanie antybiotyków. Ponadto komórki bakteryjne mogą przekazywać między sobą substancje odżywcze w obrębie biofilmu, co znacznie umacnia ich wielowarstwową strukturę [97].

Komórki bakteryjne *S. aureus* prowadzą do zapalenia oraz zniszczenia tkanki kostnej na drodze trzech różnych mechanizmów. Pierwszym z nich jest spowodowanie apoptozy

i martwicy osteoblastów na skutek zainfekowania przez komórki *S. aureus*. Drugi z nich stanowi zdolność *S. aureus* do wytwarzania i uwalniania do macierzy kostnej cytokin oraz chemokin. Białka te wykazują aktywność do osteoklastogenezy, czyli procesu powstawania osteoklastów skutkującym we wtórnej resorpcji tkanki kostnej i, w efekcie, w jej osłabieniu oraz zubożeniu. Trzeci z mechanizmów polega na indukcji osteoklastogenezy poprzez pobudzenie wydzielania przez osteoblasty tzw. RANKL (*ang. Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand*), czyli innego rodzaju białek powodujących wytwarzanie przez osteoblasty osteoklastów i resorpcję tkanki twardej. Leczenie bakteryjnego zapalenia tkanki kostnej jest szczególnie trudne, ponieważ komórki bakteryjne *S. aureus*, które zainfekowały osteoblasty, są następnie chronione przed działaniem układu immunologicznego gospodarza. Zakażenie tkanki kostnej przez bakterie grupy *S. aureus* stanowi szczególnie powszechny i niebezpieczny przypadek zapalenia tkanki kostnej, ponieważ komórki *S. aureus* oddziałują bezpośrednio na osteoblasty [92].

Choć bakterie Gram-dodatnie stanowią największą grupę patogenów prowadzących do zapalenia tkanki kostnej ryzykowne dla stanu zdrowia organizmu człowieka są również mikroorganizmy należące do grupy bakterii Gram-ujemnych, np. *Escherichia coli* [98]. *E. coli* stanowi bakterię komensalną przewodu pokarmowego człowieka, odgrywając ważną rolę w trawieniu oligosacharydów oraz polisacharydów [99]. Osłabienie organizmu pacjenta, np. podczas procesu implantacji, może doprowadzić do wystąpienia stanu zapalnego tkanki kostnej wywołanego patogennymi szczepami *E. coli* oraz, w konsekwencji, do rozwoju zapalenia kości [100]. Zakażenie *E. coli* może zostać rozproszony krwioobiegiem do wielu narządów, powodując niebezpieczny stan sepsy pacjenta [101].

Proliferacja mikroorganizmów szczepu *E. coli* prowadzi do powstania opornego na działanie antybiotyków szkodliwego biofilmu. Ponadto wykazano, że zakażenie *E. coli* może wspomagać rozwój chorobotwórczych drobnoustrojów z grupy *Candida* poprzez ułatwianie wzrostu opornego biofilmu [102].

E. coli jest powszechnie znaną bakterią odpowiedzialną za zakażenia układu moczowego. Przez możliwość przenoszenia mikroorganizmów bakteryjnych krwioobiegiem, bakteria ta w nielicznych przypadkach może być również czynnikiem wywołującym zapalenie kości oraz szpiku [103].

Zakażenia grzybiczne są znacznie mniej rozpowszechnionymi patogenami wywołującymi zapalenie tkanki kostnej, jednak nie są one mniej niebezpieczne. Do jednego z częściej występujących patogenów grzybiczych zaliczyć można szczep *Candida albicans*. Grzyb ten jest naturalnie występującym mikroorganizmem w jamie ustnej, gardle, przewodzie pokarmowym, a także na skórze człowieka, stąd w niesprzyjających warunkach osłabienia organizmu stosunkowo łatwo może doprowadzić do zakażenia. Stwierdzono, że zakażenie patogenem *C. albicans* znacznie wydłuża rekonwalescencję po procesie implantacji dentystycznej, ponieważ wspomniane szkodliwe mikroorganizmy grzybicze gromadzą się w bezpośrednim środowisku wierzchołka korzenia zęba, znacznie utrudniając dalszą skuteczną terapię i powodzenie procesu wszczepienia biomateriału. Ponadto sama obecność *C. albicans* sprawia, że skuteczna odpowiedź organizmu na konwencjonalne leczenie zakażenia septycznego jest utrudniona [104,105]. Zakażenie *C. albicans* prowadzi do wystąpienia choroby zwanej kandydozą, czyli oportunistyczną infekcją błony śluzowej. Czynnikiem zwiększającym ryzyko zachorowania są m.in. stany obniżonej odporności, cukrzyca czy kserostomia, ale także długotrwałe stosowanie antybiotyków i leków immunosupresyjnych oraz obecność różnego rodzaju protez czy implantów zębowych. Wśród objawów kandydozy wymienić można ból języka, uczucie palenia w jamie ustnej czy zaburzone odczuwanie smaków [106]. Pacjenci z obniżoną odpornością są szczególnie narażeni na ryzyko rozprzestrzenienia się kandydozy poza jamę ustną i gardło. Wówczas może dojść do zakażenia górnego odcinka przewodu pokarmowego, co stanowi śmiertelne zagrożenie dla zdrowia człowieka [107]. Obecność protezy w jamie ustnej dodatkowo zwiększa ryzyko zakażenia *Candida* ze względu na zmniejszony przepływ śliny oraz ułatwioną adhezję szkodliwych mikroorganizmów do powierzchni wszczepu [108].

1.6. Metody leczenia zakażeń septycznych kości

Omówione gatunki szkodliwych mikroorganizmów z grup *Staphylococcus*, *Escherichia* oraz *Candida* to jedynie przykłady patogenów odpowiedzialnych za powstanie stanu zapalnego tkanki kostnej. Rozwój stanu zapalnego prowadzi do powstania zakażenia septycznego kości będącego niebezpieczną i bolesną chorobą [109]. W przypadku wystąpienia zapalenia tkanki kostnej jako konsekwencji zabiegu wszczepiania implantu nieskuteczne leczenie może doprowadzić nie tylko do bólu i dyskomfortu pacjenta, ale także do konieczności usunięcia implantu ze względu na postępujące procesy resorpcji oraz degradacji tkanki kostnej [110]. Początek infekcji stanowi adhezja komórek bakteryjnych lub grzybiczych do powierzchni implantu, która postępując, prowadzi do ich namnażania, proliferacji oraz utworzenia biofilmu szczególnie opornego na działanie środków przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych. Warstwa biofilmu wykazuje także działanie niszczące biomateriał na drodze korozji mikrobiologicznej [111].

Profilaktyka zakażeń okołowszczepowych stanowi kluczową rolę w całości procesu implantacji. Zakażenia grzybicze tkanki kostnej występują znacznie rzadziej niż bakteryjne, często stanowiąc konsekwencję niekontrolowanego rozwoju zakażeń bakteryjnych. Z tego powodu profilaktyka zapalenia tkanki kostnej skupia się głównie na zapobieganiu wystąpienia zakażenia bakteryjnego wywołanego szczególnie przez *Staphylococcus aureus*, szczep bakterii będący jednym z najbardziej powszechnych patogenów szpitalnych. Zarówno profilaktyka jak i leczenie bakteryjnego zakażenia kości polega na podawaniu pacjentom antybiotyków. Konwencjonalne drogi dostarczania leków niosą ze sobą mnogość negatywnych skutków ubocznych, co stało się przyczyną intensywnego rozwoju badań nad alternatywnymi środkami bakteriobójczymi [112].

Antybiotykoterapia oraz problemy z nią związane

Standardowa procedura profilaktyki oraz leczenia zakażenia septycznego tkanki kostnej obejmuje doustne podawanie antybiotyków. Ogólnie mechanizm działania bakteriobójczego antybiotyków oparty jest na ich zdolności do zniszczenia komórki bakteryjnej, często na drodze przerwania integralności błony komórkowej [112]. Dzienna doustna dawka antybiotyku jest stosunkowo duża. Przykładowo osoba dorosła przyjmuje nawet 1,5 g

amoksycyliny dziennie podczas leczenia zakażenia bakteryjnego [113]. Wielkość doustnej dawki jest spowodowana faktem, że znaczna część antybiotyku jest wydalana przez układ pokarmowy, podczas gdy jedynie niewielka jego ilość jest dostarczana do miejsca objętego infekcją. Dodatkowo antybiotyk znajdujący się w układzie pokarmowym jest niestabilny, a jego wchłanianie zachodzi stosunkowo powoli [114,115]. Przyjmowanie wysokich doustnych dawek antybiotyków skutkuje w wystąpieniu reakcji alergicznych organizmu ludzkiego, m.in. wysypki, uczucia swędzenia, opuchlizny języka, a nawet płuc. Najbardziej niebezpieczną reakcją alergiczną jest potencjalnie śmiertelny wstrząs anafilaktyczny [116].

Oprócz szkodliwych reakcji alergicznych, warto zwrócić uwagę na szereg negatywnych skutków ubocznych wywoływanych przez przyjmowanie dużych, doustnych dawek antybiotyków. Wśród najbardziej destruktywnych wyróżnić można oddziaływanie antybiotyków na naturalną mikroflorę jelitową człowieka. Mikrobiota organizmu człowieka jest zasiedlana przez komensalne bakterie w chwili narodzin i pełni ona kluczową rolę w poprawnym działaniu układu odpornościowego człowieka [117]. Szacuje się, że 70% całkowitej odpowiedzi immunologicznej ze strony organizmu ludzkiego jest ściśle związane z mikroflorą jelitową zasiedloną przez około 100 bilionów różnych mikroorganizmów. Przez okres całego życia człowieka zachodzi mnogość interakcji pomiędzy naturalną mikrobiotą a układem odpornościowym [118]. Stąd zubożenie mikroflory jelitowej bezpośrednio skutkuje w zaburzeniu pracy układu odpornościowego człowieka, czyniąc organizm bardziej podatnym na występowanie i rozwój różnych infekcji.

Spektrum bakteriobójczego działania antybiotyków jest szerokie i nieselektywne, co oznacza, że atakują one nie tylko komórki bakteryjne szkodliwych patogenów, ale także bakterii komensalnych żyjących w układzie pokarmowym człowieka. Znanych jest wiele dowodów na szkodliwe konsekwencje przyjmowania antybiotyków. Odpowiednim przykładem jest amoksycylina, której przyjmowanie i obecność zaburza prawidłową ekspresję genów w jelicie. Dodatkowo leczenie amoksycyliną powoduje zmniejszenie populacji bakterii *Lactobacillus* będących podstawowym gatunkiem zasiedlającym mikrobiotę jelita. Zubożenie mikroflory w bakterie gatunku *Lactobacillus* skutkuje zaburzeniami pracy jelita grubego. Innymi przykładami destrukcyjnego działania antybiotyków jest obniżenie poziomu peptydoglikanów w surowicy, którego przyczyną może być przyjmowanie wankomycyny, ampicyliny, neomycyny czy metronidazolu [119]. Nawet

krótkotrwałe leczenie klindamycyną prowadzi do zubożenia 90% mikroflory jelita cienkiego i grubego, czyniąc je podatnymi na bardzo niebezpieczną bakterię *Clostridium difficile* powszechnie występującą w szpitalach i mogącą wywołać śmiertelnie niebezpieczny stan sepsy [120].

Antybiotykoterapia jest częstym wyborem nie tylko w leczeniu dorosłych osobników, ale także dzieci. W okresie niemowlęcym mikroflora jelitowa jest szczególnie intensywnie rozwijana. Przyjmowanie antybiotyków nie tylko silnie zaburza powstanie prawidłowej mikrobioty, ale może również przyczynić się do pojawienia się alergii, w tym astmy [121].

Istotnym problemem związanym z antybiotykoterapią jest jej malejąca skuteczność spowodowana wzrastającą opornością bakterii na działanie antybiotyków. Fenomen ten jest szczególnie niebezpieczny w skali całego świata. Jego przyczynami jest przede wszystkim brak odpowiedzialności ludzkości w kontekście zbyt częstego stosowania antybiotyków oraz przyjmowania ich zbyt dużych dawek. Antybiotyki rozpowszechnione są na całym świecie nie tylko w medycynie, ale również w przemyśle hodowlanym zwierząt [122,123]. Komórki bakteryjne wypracowały różnego rodzaju mechanizmy obronne obniżające ich podatność na działanie antybiotyków. Przykładem takiego mechanizmu jest umiejętność wytwarzania przez komórki bakteryjne beta-laktamaz, czyli enzymów hydrolizujących antybiotyki beta-laktamowe, np. penicyliny [124]. Takim mechanizmem charakteryzują się m.in. bakterie gatunku *E. coli* [125]. Natomiast bakterie Gram-dodatnie, np. *S. aureus*, unieszkodliwiają działanie antybiotyków poprzez mechanizm polegający na mutacji specyficznych białek wiążących penicylinę (*ang. penicillin binding proteins, PBP*), czyli miejsc docelowych podatnych na atak antybiotyku na komórkę bakteryjną [126].

Alternatywne systemy dostarczania leków

Konwencjonalna doustna droga dostarczania leku niesie ze sobą wspomniane negatywne skutki uboczne, dlatego prace naukowe badaczy rozszerzają wiedzę na temat alternatywnych systemów dostarczania leków. Wśród nowoczesnych rozwiązań dużą popularność zdobyły tzw. wszczepialne systemy dostarczania leków (*ang. implantable drug delivery systems, IDSS*). Ich główną zaletą jest możliwość dostarczenia określonej dawki leku precyzyjnie i bezpośrednio do miejsca zagrożonego infekcją lub zainfekowanego. Dodatkowo dzięki szerokiemu spektrum rodzajów materiałów – od obojętnej bioceramiki po polimery

biodegradowalne – stosunkowo łatwym zadaniem jest zaprojektowanie według potrzeb określonego i kontrolowanego czasu uwalniania danego leku [127].

Ogólnie DDS można podzielić na systemy degradujące (w tym biodegradowalne) oraz nieulegające degradacji mimo upływu czasu. Wśród polimerów niedegradujących szerokie zastosowanie w inżynierii biomedycznej znalazły: termoplastyczny poliuretan (TPU), elastomer silikonowy oraz kopolimer etylenu i octanu winylu (EVA). Warto zaznaczyć, że polimery te wykazują się stosunkowo niskim modułem Younga. Do przykładowych biomedycznych zastosowań niedegradujących polimerów zaliczyć można: implanty ortopedyczne, rusztowania (skafoldy) służące do regeneracji kości oraz nerwów, implanty podskórne, cewniki, urządzenia wspomagające pracę serca (pompy), wenflony czy enkapsulacje związków biologicznie czynnych [127].

Na szczególną uwagę zasługują degradujące systemy dostarczania leków ze względu na możliwość uwalniania niewielkiej dawki leku w sposób kontrolowany, co znacznie zwiększa skuteczność środka przeciwbakteryjnego oraz zmniejsza ilość negatywnych efektów ubocznych. Od lat zastosowanie w inżynierii biomedycznej znajdują polimery biodegradowalne takie jak: poli(kwas mlekowy) (PLA), poli(kwas glikolowy) (PGA), kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego (PLGA) czy polikaprolakton (PCL) [128]. PGA był pierwszym polimerem biodegradowalnym zastosowanym do wytworzenia rozpuszczalnych szwów [129].

Degradacja polimerów biodegradowalnych zachodzi na drodze hydrolizy. Produkty hydrolizy nie stanowią zagrożenia dla zdrowia organizmu ludzkiego, tzn. są nietoksyczne. Przykładowo PLGA hydrolizuje z wytworzeniem kwasu mlekowego. Hydrolizę polimeru rozpoczyna etap pobierania wody przez jego cząsteczki, po którym następuje rozerwanie wiązań estrowych łańcucha polimerowego. Degradacja postępuje w całej objętości materiału polimerowego [130]. Jednocześnie degradacja polimeru jest autokatalizowana, ponieważ wraz z jej postępowaniem pH ulega obniżeniu na skutek uwalniania coraz większej liczby grup karboksylowych [131].

Polimery biodegradowalne mogą stanowić swoistą matrycę, z której w sposób kontrolowany może być uwalniany antybiotyk lub substancja zwiększająca biokompatybilność implantu, np. hydroksyapatyt. Takie rozwiązanie niesie ze sobą szereg zalet, spośród których wymienić można:

- skuteczniejszy sposób dostarczania leku niż w przypadku metody konwencjonalnej (doustnej) – środek bakteriobójczy jest skierowany bezpośrednio w miejsce zakażenia;
- kontrolowany czas uwalniania leku – ilość negatywnych i toksycznych skutków ubocznych wywołanych przyjmowaniem jednorazowo dużych dawek leku zostaje zredukowana;
- w przypadku wystąpienia niebezpiecznej reakcji alergicznej uczulający środek może zostać łatwiej usunięty z organizmu pacjenta niż w przypadku podania doustnego; mniejsze dawki aktywne antybiotyku – korzystny wpływ na zjawisko wzrastającej oporności bakterii na antybiotyki;
- wśród IDDS istnieje duża różnorodność oraz wybór materiałów;
- wygoda oraz lepszy komfort pacjenta [132].

1.7. Związki srebra, miedzi i cynku - właściwości bakteriostatyczne oraz bakteriobójcze

Wspomniane mechanizmy oporności bakterii na antybiotyki oraz negatywne skutki uboczne przyjmowania antybiotyków prowadzą do konieczności poszukiwania i opracowania alternatywnych środków antybakteryjnych. Interesującym kierunkiem badań stały się związki nieorganicznego pochodzenia wykazujące udokumentowane działanie bakteriostatyczne lub przeciwbakteryjne. Wśród nich na szczególną uwagę zasługują związki cynku, miedzi oraz srebra [133].

Mechanizm antybakteryjnego działania cynku, miedzi oraz srebra oparty jest na wytwarzaniu tzw. reaktywnych form tlenu (*ang. reactive oxygen species, ROS*). Są to ugrupowania typu: H_2O_2 , rodnik $HO\cdot$ czy O_2 zdolne do wytworzenia tzw. stresu oksydacyjnego wywołującego szereg niekorzystnych zjawisk w obrębie komórki bakteryjnej, m.in.: zmniejszenia aktywności enzymów, uszkodzenia błony komórkowej, DNA oraz białek czy indukowaniu mutacji genetycznych. Stres oksydacyjny ostatecznie prowadzi do śmierci (apoptozy) komórki bakteryjnej [134].

Antyseptyczne działanie **srebra** było znane już we wcześniejszych latach i aktywnie wykorzystywane w medycynie do XIX wieku. Zainteresowanie właściwościami antybakteryjnymi srebra zmalało wraz z odkryciem penicyliny. Udokumentowano skuteczne działanie przeciwbakteryjne srebra zarówno na szczepy bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. Oprócz mechanizmu wytwarzania ROS sugeruje się także inne mechanizmy pozwalające na skuteczne działanie srebra prowadzące do uszkodzenia komórki bakteryjnej. Jeden z nich oparty jest na możliwości wiązania się jonów srebra z grupami tiolowymi powszechnie występującymi w różnego rodzaju białkach. Wówczas połączenia takie są zdolne do wprowadzenia negatywnych zmian w pełnionych rolach strukturalnych i funkcjonalnych komórki bakteryjnej, prowadząc do jej rozpadu oraz apoptozy. Jony srebra mogą również wpływać na strukturę białek tworzących błonę komórkową bakterii, prowadząc do utraty jej integralności i zniszczenia. Dodatkowo jony srebra są zdolne do obniżenia skuteczności działania wielu enzymów odpowiedzialnych za oddychanie i metabolizm komórki bakteryjnej [135].

Szczególne zainteresowanie skupia się także wokół połączenia antybakteryjnego działania srebra z unikalnymi właściwościami nanocząstek, takimi jak stosunkowo duża powierzchnia czynna. Ze względu na ich wyjątkowo małe rozmiary, nanocząstki srebra są w stanie nie tylko bezpośrednio wiązać się z błoną komórkową bakterii, ale także z łatwością wnikać w jej strukturę, prowadząc ostatecznie do lizy komórki [136]. Pomimo szeregu zalet wynikających z unikalnej budowy oraz właściwości nanocząstek srebra, zastosowanie ich w medycynie budzi wiele kontrowersji ze względu na ryzyko ich oddziaływania z komórkami organizmu ludzkiego. Uważa się, że nanocząstki srebra mogą prowadzić do zaburzeń oddychania mitochondrialnego oraz metabolizmu komórkowego, wnikając w strukturę komórki na drodze dyfuzji [137]. Wzrost użytkowania nanocząstek srebra w różnych gałęziach przemysłu doprowadził do wzmożonego przedostawania się ich do środowiska wodnego, co następnie staje się przyczyną szkodliwej kumulacji nanocząstek srebra w organizmach wodnych. Długoterminowe skutki zanieczyszczenia środowisk wodnych przez nanocząstki srebra nie są jeszcze znane. Ponadto udowodnione zostało toksyczne działanie nanocząstek srebra na ludzkie erytrocyty, komórki nerek i wątroby, a także okrężnicy [138].

Choć srebro wykazuje silne działanie antyseptyczne, jego zastosowanie niesie ze sobą pewne ryzyko cytotoksyczności. Z tego powodu interesującym kierunkiem badań jest poszukiwanie innych alternatywnych środków przeciwbakteryjnych o mniejszej cytotoksyczności. Pierwiastkiem zasługującym na szczególną uwagę jest **miedź**. Mechanizm jej działania przeciwbakteryjnego jest podobny do mechanizmu działania srebra i również opiera się o wytwarzanie ROS, ingerencję w DNA komórki bakteryjnej oraz, ostatecznie, zahamowanie proliferacji komórek bakteryjnych i ich apoptozę [139]. Jednak oprócz właściwości antyseptycznych miedzi pierwiastek ten wspomaga także różne procesy fizjologiczne zachodzące w organizmie ludzkim, a jego niedobór skutkuje w wystąpieniu stanów chorobowych [140]. Miedź odgrywa ważną rolę w procesach transkrypcji DNA, jest także mikroelementem warunkującym poprawne działanie wielu białek, w tym enzymów [141,142]. Utrzymanie prawidłowego stężenia miedzi warunkuje prawidłowe zachodzenie procesów enzymatycznych metabolizmu kości m.in. sieciowania kolagenu i elastyny, co w znacznym stopniu wpływa na powodzenie osteointegracji. Miedź odgrywa także ważną rolę w angiogenezie, czyli procesie tworzenia się naczyń włosowatych [143]. W odróżnieniu

od srebra, miedź jest metabolizowana w organizmie ludzkim i nie akumuluje się w tak dużym stopniu jak srebro, co może prowadzić do wystąpienia srebrzycy [144].

Pierwiastkiem wykazującym niższą cytotoksyczność niż srebro i miedź oraz jednocześnie posiadającym właściwości bakteriostatyczne jest **cynk**. Mechanizm przeciwbakteryjnego działania cynku również opiera się na wytwarzaniu ROS i jest on szczególnie skuteczny wobec szczepów bakterii Gram-dodatnich [145]. Ponadto uczestniczy w procesach metabolicznych kości, wpływając tym samym na proces osteointegracji. Obecność cynku indukuje procesy biomineralizacji tkanki kostnej [146]. Cynk odgrywa istotną rolę w syntezie DNA, wpływa na aktywność enzymatyczną oraz metabolizm kwasów nukleinowych i prawidłową gospodarkę hormonalną. Stwierdzono, że podłoża wzbogacone o ten pierwiastek zapewniają lepsze warunki do adhezji i proliferacji komórek, a także poprawę właściwości bakteriostatycznych wobec bakterii grupy *S. aureus* [111,145].

Różnorodność mechanizmów przeciwbakteryjnego działania srebra, miedzi oraz cynku sprawia, że mogą być one uznawane za atrakcyjny kierunek rozwoju badań dotyczących wykorzystania ich jako alternatywnych środków bakteriostatycznych i bakteriobójczych. Do tej pory w literaturze pojawiły się przykłady wytwarzania powłok tlenkowych na powierzchni materiałów tytanowych zawierających wbudowane w swoją strukturę związki srebra [93,147], miedzi [148,149] i cynku [150,151] na skutek wykorzystania źródeł (np. kąpeli elektrolitycznych stosowanych w PEO) o charakterze jonowym. Wykorzystanie nierozpuszczalnych związków cynku, miedzi oraz srebra, np. w postaci zawiesin tlenków lub fosforanów wspomnianych pierwiastków, stanowi ciekawy kierunek rozwoju badań nad zastosowaniem plazmowego utleniania elektrochemicznego w celu utworzenia funkcjonalnych i bakteriostatycznych powierzchni biomateriałów dedykowanych tkance twardej. Należy zwrócić szczególną uwagę na wpływ składu kąpeli elektrolitycznej, w tym rodzaju zastosowanych w niej dodatków, na intensywność, a także mechanizm wyładowań zachodzących podczas procesu PEO, które wpływają na różnorodność morfologii oraz składu powstających porowatych powierzchni tlenkowych [152,153].

Przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej była funkcjonalizacja powierzchni wybranych stopów tytanu w celu otrzymania warstw o właściwościach bioaktywnych i antyseptycznych. Ze względu na powszechne zastosowanie tytanu i jego stopów w inżynierii biomedycznej oraz implantologii obie te właściwości odgrywają istotną rolę w prawidłowym

funkcjonowaniu długoterminowego implantu dedykowanego tkance kostnej. Aktualnie w produkcji implantów do tkanki twardej stosowany jest tytan oraz jego stop Ti-6Al-4V, jednak ze względu na możliwe wystąpienie toksycznego oddziaływania produktów korozji wanadu na organizm ludzki oraz stosunkowo wysoki moduł Younga wspomnianych materiałów prowadzone są badania nad bezwanadowymi stopami tytanu. Praca dotyczy funkcjonalizacji na drodze plazmowego utleniania elektrochemicznego (PEO) stopów: Ti-6Al-4V, Ti-15Mo, Ti-13Nb-13Zr oraz Ti-36Nb-3Zr-2Ta.

Innym istotnym problemem związanym z tolerancją wszczepianego materiału jest ryzyko wystąpienia zakażenia septycznego tkanki kostnej. Obecnie w leczeniu i profilaktyce zakażeń okołowszczepowych stosuje się antybiotyki podawane konwencjonalną drogą doustną. Takie rozwiązanie niesie ze sobą jednak szereg niekorzyści, m.in. reakcje alergiczne, negatywne skutki uboczne i wzrastającą oporność mikroorganizmów na działanie antybiotyków. Z tego powodu prowadzone są intensywne badania nad alternatywnymi środkami bakteriobójczymi i grzybobójczymi. Interesującym kierunkiem rozwoju technologii biomateriałów są implanty tytanowe wzbogacone w swojej strukturze zarówno w pierwiastki bioaktywne, takie jak wapń i fosfor, jak i przeciwdrobnoustrojowe takie jak cynk, miedź czy srebro.

W niniejszej pracy w celu utworzenia wielofunkcyjnych biomateriałów wykorzystano proces plazmowego utleniania elektrochemicznego powierzchni wybranych stopów tytanu w kąpielach zawierających nierozpuszczalne związki wymienionych pierwiastków, a dokładniej ich tlenki oraz fosforany: Ag_2O , CuO , ZnO , Ag_3PO_4 , $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$, a także $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Do tej pory w literaturze znane jest otrzymywanie na powierzchniach tytanowych warstw tlenkowych zawierających związki cynku, miedzi i srebra z wykorzystaniem procesu PEO oraz kąpielach, w których źródła wspomnianych pierwiastków mają charakter jonowy. Główną innowacją pracy było zastosowanie niejonowych źródeł cynku, miedzi oraz srebra. Idea ta uzasadniona jest faktem, iż mechanizm wbudowania lub/i uwalniania danych cząstek z warstw tlenkowych jest zależny od struktury związku pierwotnie występującego w kąpielu służącej do utleniania anodowego. Różnice te mogą mieć istotny wpływ na właściwości nie tylko fizykochemiczne, ale i bakteriostatyczne oraz bioaktywne utworzonych warstw.

2. Cel pracy

Celem niniejszej pracy było określenie możliwości wykorzystania nierozpuszczalnych związków srebra, miedzi i cynku w procesie plazmowego utleniania elektrochemicznego wybranych stopów tytanu pod kątem wytworzenia warstw tlenkowych o działaniu co najmniej bakteriostatycznym.

Zakres prac obejmował określenie parametrów procesu plazmowego utleniania elektrochemicznego pod kątem uzyskania dobrej jakości warstw tlenkowych oraz ich charakterystykę fizykochemiczną, w tym badania:

- morfologii oraz chropowatości powierzchni – skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM);
- zwilżalności powierzchni – pomiary kąta zwilżania w warunkach dynamicznych;
- składu chemicznego warstw tlenkowych – spektroskopia rentgenowska z dyspersją energetyczną (EDX) oraz spektroskopia Ramana;
- grubości warstw tlenkowych wraz z analizą rozmieszczenia pierwiastków w przekroju poprzecznym warstwy tlenkowej – skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) oraz spektroskopia rentgenowska z dyspersją energetyczną (EDX).

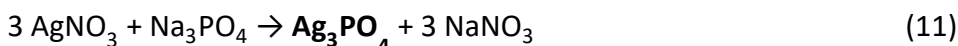
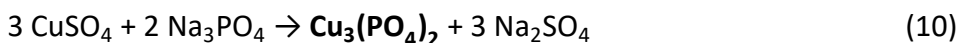
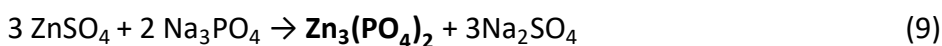
Dodatkowo przeprowadzone zostały badania zanurzeniowe w roztworze Ringera mające na celu określenie stężenia uwalnianych jonów pierwiastków stopowych: tytanu oraz molibdenu, a także jonów pierwiastków o działaniu antyseptycznym: cynku, miedzi i srebra. W tym celu wykorzystano technikę atomowej spektrometrii emisyjnej z indukcyjnie sprzężoną plazmą (ICP-OES).

Właściwości bioaktywne utworzonych warstw tlenkowych zostały scharakteryzowane za pomocą badań cytokompatybilności z wykorzystaniem komórek osteoblastopodobnych linii MG-63, natomiast właściwości antyseptyczne zostały określone na drodze badań adhezji mikroorganizmów grup: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) oraz *Escherichia coli* (ATCC 25922).

3. Metodyka badawcza

3.1. Synteza związków cynku, miedzi oraz srebra

Dodatkami stosowanymi do kąpeli w procesie PEO były komercyjne zakupione: tlenek cynku, ZnO (Merck KGaA, Niemcy) oraz tlenek miedzi(II), CuO (ChemPUR). Pozostałe związki wykorzystywane w procesie: tlenek srebra(I), Ag₂O; ortofosforan(V) cynku, Zn₃(PO₄)₂, ortofosforan(V) miedzi(II), Cu₃(PO₄)₂ oraz ortofosforan(V) srebra(I), Ag₃PO₄ zostały otrzymane metodą strąceniową według poniższych reakcji [154]:



Otrzymane osady poddano 7-dniowemu procesowi starzenia, po upływie którego przemyto je wodą destylowaną, zdekantowano oraz sączono próżniowo. Przesączone osady kilkunastokrotnie przepłukano wodą destylowaną, a następnie wysuszono je do stałej masy.

3.2. Przygotowanie powierzchni stopów tytanu

Badaniom poddano próbki w postaci walców wysokości 4 mm. Powierzchnie czołowe próbek stopów tytanu (BIMO Metals): Ti-6Al-4V ($\varnothing = 10$ mm), Ti-15Mo ($\varnothing = 10$ mm), Ti-13Nb-13Zr ($\varnothing = 10$ mm) oraz Ti-36Nb-3Zr-2Ta ($\varnothing = 6$ mm) szlifowano z wykorzystaniem papieru ściernego SiC o gradacji kolejno: 120, 240, 320, 600 oraz 1000. Wyszlifowane próbki odtłuszczano ultradźwiękowo w izopropanolu przez 3 minuty. Przygotowane w ten sposób powierzchnie poddano następnie procesowi plazmowego utleniania elektrochemicznego.

3.3. Plazmowe utlenianie elektrochemiczne

Próbki stopów tytanu zostały utlenione anodowo w kąpielach bazujących na 0,1 M roztworze Ca(H₂PO₂)₂ (ChemPUR) z dodatkiem nierozpuszczalnych tlenków lub fosforanów cynku, miedzi oraz srebra. Dodatkowo jeden z wariantów kąpeli PEO zawierał w swoim składzie ortofosforan(V) wapnia. W pierwszej kolejności przeprowadzono

badania wpływu napięcia oraz gęstości prądu na morfologię powierzchni oraz skład chemiczny otrzymanych warstw tlenkowych. W tym celu powierzchnie wszystkich wybranych stopów tytanu poddano procesowi plazmowego utleniania elektrochemicznego w kąpielach składających się z 0,1 M $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_2)_2$ oraz dodatku $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ w stężeniu 25 g/dm^3 w zakresie napięcia od 200 V do 350 V przy zastosowaniu trzech różnych gęstości prądu: 50, 100 lub 150 mA/cm^2 . Po wyborze optymalnego napięcia oraz gęstości prądu rozszerzono zakres badań o plazmowe utlenianie elektrochemiczne powierzchni wybranego stopu Ti-15Mo w kąpielach zawierających: ZnO, CuO, Ag_2O , $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$, Ag_3PO_4 , a także $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Proces PEO prowadzono przez 5 minut w elektrolizerze chłodzonym przeponowo glikolem etylenowym (5°C) oraz wyposażonym w tytanową katodę. Elektrolit intensywnie mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego. W procesie wykorzystano zasilacz wysokonapięciowy (Kikusui PWR 400-H). W **tabeli 2** na przykładzie stopu Ti-15Mo przedstawiono sposób oznaczenia próbek, który jest konsekwentnie stosowany w dalszej części pracy.

Tabela 2. Oznaczenie próbek

oznaczenie	napięcie, V	gęstość prądu, mA/cm^2	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_2)_2$, 0,1 M	CuO, g/dm^3	$\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$, g/dm^3	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, g/dm^3
TM	×	×	×	×	×	×
TM-PEO			✓	×	×	×
TM-PEO-CuOx			✓	10	×	×
TM-PEO-CuP	300	150	✓	×	25	×
TM-PEO-CuP+CaP			✓	×	10	10

W przypadku próbek pozostałych stopów zastosowano następujące akronimy:

TAV	Ti-6Al-4V
TNZ	Ti-13Nb-13Zr
GM	Ti-36Nb-3Zr-2Ta

Tlenek srebra(I) oraz tlenek cynku były stosowane jako dodatki do kąpeli PEO również w stężeniu równym 10 g/dm³. Stężenia dodatków fosforanów były analogiczne.

3.4. Charakterystyka właściwości fizykochemicznych powłok

Skaningowa mikroskopia elektronowa

Badania morfologii powierzchni zostały przeprowadzone techniką skaningowej mikroskopii elektronowej (Phenom ProX oraz Hitachi TM-3000) z zastosowaniem napięcia przyspieszającego równego 15 kV. Dzięki oprogramowaniu aplikacyjnemu (Phenom ProX) zapisano również rekonstrukcje profili 3D i określono w ten sposób chropowatość powierzchni, wyznaczając średni współczynnik chropowatości, Ra. Dodatkowo powierzchnie po procesie PEO poddano analizie pierwiastkowej z wykorzystaniem detektora służącego do spektroskopii rentgenowskiej z dyspersją energetyczną (EDX). Przeprowadzono analizy punktowe i obszarowe potwierdzające obecność wbudowanych w strukturę warstwy tlenkowej pierwiastków stopowych oraz pochodzących z kąpeli PEO.

Badania zwilżalności powierzchni

Celem tego etapu było określenie charakteru hydrofilowego powierzchni wybranych stopów tytanu oraz zbadanie wpływu rezultatów procesu PEO na zwilżalność badanych powierzchni. Stosując goniometr (Data Physics OCA15 EC), na powierzchnie badanych próbek stopów наносono kroplę wody destylowanej oraz symulowanego roztworu fizjologicznego (*ang. simulated body fluid, SBF*) o objętości 0,2 μ l. Następnie wyznaczano tzw. kąt zwilżalności, czyli kąt utworzony pomiędzy powierzchnią badanego materiału a styczną do powierzchni kropli stykającej się z powierzchnią materiału. Wyniki przedstawiono jako zmianę wartości kąta zwilżania w funkcji czasu.

3.5. Przekroje poprzeczne warstw tlenkowych

W celu określenia grubości warstw tlenkowych próbki zanurzono w żywicy epoksydowej (Mecaprex 2S, Presi). Przygotowane w ten sposób zgłady metalograficzne wyszlifowano z użyciem papieru ściernego SiC o gradacji końcowej 1000. Ostatnie polerowanie przeprowadzono z zastosowaniem zawiesiny diamentowej o wielkości ziaren 3 μm . Powierzchnie zgładów oczyszczono, osuszono i napyłono złotem (napyłarka Cressington 108 Auto). Grubość warstwy tlenkowej została odczytana z obrazów uzyskanych metodą skaningowej mikroskopii elektronowej z zastosowaniem napięcia przyspieszającego równego 15 kV (Phenom ProX).

Dodatkowo przekroje poprzeczne warstw tlenkowych poddano analizie rozmieszczenia pierwiastków w całej szerokości warstwy. Badania te zostały wykonane metodą spektroskopii rentgenowskiej z dyspersją energetyczną dzięki detektorowi EDX wbudowanemu w mikroskop SEM (Phenom ProX). Szczegółowo wykonano analizy rozmieszczenia Ti oraz pierwiastków stopowych, a także Ca, P, Zn, Cu i Ag.

3.6. Spektroskopia Ramana

W celu potwierdzenia obecności związków cynku oraz miedzi w otrzymanych warstwach tlenkowych wykonano pomiary metodą spektroskopii Ramana przy zastosowaniu mikroskopu ramanowskiego (inVia Renishaw). Jako detektor zastosowano kamerę CCD, a źródło promieniowania wzbudzającego stanowił laser czerwony o długości światła 633 nm. Widma rejestrowano w zakresie 10-1800 cm^{-1} . Wszystkie pomiary zostały wykonane w geometrii rozproszenia wstecznego przy użyciu obiektywu mikroskopu 50 \times z liczbową wartością apertury 0,75, co zapewniło obszar pomiaru 1 μm^2 . Widma rejestrowano z rozdzielczością 4 cm^{-1} i czasem naświetlania równym 10 s.

Próbki stopu Ti-15Mo utlenionego w zawiesinach zawierających związki srebra zostały także zbadane za pomocą spektroskopii Ramana, jednak w szerszym zakresie. Próbki zanalizowano przy użyciu konfokalnego mikroskopu ramanowskiego (alfa 300R WITec) wyposażonego w chłodzony powietrzem laser półprzewodnikowy ($\lambda = 532 \text{ nm}$) i detektor CCD. Laser był sprzężony z mikroskopem poprzez jednomodowy światłowód o średnicy 50 μm . Rozproszone promieniowanie było skupiane na światłowodzie wielomodowym ($\phi = 50 \mu\text{m}$) i monochromatorze siatkowym 600 linii/mm. W celu zachowania optymalnych

parametrów pomiędzy rozdzielczością boczną i głęboką zastosowano obiektyw Olympus MPLAN 100x/0.9 NA [155]. Monochromator spektrometru był kalibrowany z wykorzystaniem linii emisyjnych lampy Ne, natomiast sygnał płytki krzemowej ($520,7 \text{ cm}^{-1}$) był dostarczany do sprawdzenia ustawienia wiązki.

Powierzchniowa mapa obrazowania ramanowskiego w kierunku X-, Y- była zbierana w obszarze $21 \mu\text{m} \times 11 \mu\text{m}$ przy użyciu 63×33 pikseli (2 079 widm) (TM-PEO-AgOx) oraz w obszarze $28 \mu\text{m} \times 28 \mu\text{m}$ przy użyciu 86×86 pikseli (7 369 widm) (TM-PEO-AgP oraz TM-PEO-AgP+CaP) przy czasie integracji 300 ms na jedno widmo i precyzji przesuwania próbki podczas pomiarów $\pm 0,5 \mu\text{m}$. Dodatkowo w celu zbadania głębokości porów zastosowana została także opcja skanowania głębokościowego. Eksperyment przeprowadzono poprzez zebranie map profilujących od $+ 3,0$ do $- 3,0 \mu\text{m}$ w kierunku Z. Mapy obrazowania Ramana z profilowaniem wgłębnym zbierano w obszarze $21 \mu\text{m} \times 6 \mu\text{m}$ przy użyciu 63×18 pikseli (1 134 widma) dla próbki TM-PEO-AgOx oraz w obszarze $28 \mu\text{m} \times 6 \mu\text{m}$ przy użyciu 86×18 pikseli (1 548 widm) w przypadku próbek TM-PEO-AgP oraz TM-PEO-AgP+CaP przy czasie integracji 300 ms na widmo i precyzji przesuwania próbki podczas pomiarów $\pm 0,5 \mu\text{m}$.

Wszystkie widma były zbierane w zakresie $150 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ przy mocy 10 mW na próbkę i rozdzielczości spektralnej 3 cm^{-1} . Obrazy ramanowskie generowane były przy użyciu oprogramowania WITec ProjectFive Plus oraz filtru sumarycznego integrującego intensywność w zdefiniowanym zakresie częstotliwości ($300 - 900 \text{ cm}^{-1}$). Ostatecznie na uśrednionym widmie pochodzącym z poszczególnych próbek, przeprowadzono analizę pasmową dopasowania z wykorzystaniem funkcji Lorentza-Gaussa przy użyciu pakietu oprogramowania GRAMS 9.2.

3.7. Badania zanurzeniowe w roztworze Ringera

Próbki stopu Ti-15Mo po modyfikacji powierzchniowej PEO zanurzone w roztworze Ringera na okres 24 h, 3 dni, 7 dni, 11 dni oraz 14 dni; temperatura 37°C . Po upływie wspomnianych okresów czasu roztwory pobrano i zbadano w celu określenia stężenia wybranych jonów uwolnionych z powierzchni warstw tlenkowych. Oznaczono stężenie pierwiastków stopowych: tytanu oraz molibdenu, a także pierwiastków o działaniu bakteriostatycznym: cynku, miedzi i srebra. Badania zostały wykonane za pomocą atomowej

spektrometrii emisyjnej z indukcyjnie sprzężoną plazmą (ICP-OES) przy użyciu spektrometru Varian 710-ES (Santa Clara) wyposażonego w nebulizer (OneNeb). W **tabeli 3** przedstawiono parametry pracy spektrometru.

Tabela 3. Parametry pracy spektrometru

parametr		wartość				
moc plazmy		1,0 kW				
natężenie przepływu argonu		15 dm ³ /min				
natężenie przepływu gazu pomocniczego		1,5 dm ³ /min				
ciśnienie w nebulizerze		210 kPa				
szybkość obrotu pompy perystaltycznej		15 obr./min				
	Ti	Mo	Zn	Cu	Ag	
linie emisyjne	334,941	201,512	206,200	327,395	328,068	
λ , nm	336,122	202,032	202,548	324,754		
		203,846				

W celu wyznaczenia stężenia danego analitu zastosowano metodę krzywej kalibracyjnej. Krzywe kalibracyjne przygotowano przy użyciu matrycy (roztwór Ringera) oraz roztworów wzorcowych poszczególnych pierwiastków o stężeniu 1 mg/ml (Merck Millipore). Otrzymane wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną uzyskaną z sześciu równoległych pomiarów.

3.8. Badania cytokompatybilności

Próbki poddane badaniom cytokompatybilności wysterylizowano w autoklawie (Bravo 21 V SciCan) pod ciśnieniem 2,1 bar oraz w temperaturze 121°C. Następnie próbki umieszczono w 24-dołkowej płytce, a na powierzchnię każdej z nich naniesiono 1 cm³ zawiesiny zawierającej komórki osteoblastopodobne linii MG-63 w ilości równej 8,0·10³ komórek. Pożywkę do hodowli komórkowej stanowiło EMEM (*ang. Eagle's minimum essential medium*) (ATCC) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (*ang. foetal bovine serum*, FBS), 1% penicyliny/streptomycyny, 0,1% aminokwasów oraz 1% pirogronianu sodu (PAA). Hodowlę komórkową prowadzono przez 7 dni w 37°C w wilgotnej atmosferze 5% CO₂.

Aktywność metaboliczną komórek oceniono za pomocą testu Alamar Blue. W tym celu do każdej próbki (w trzykrotnym powtórzeniu) dodano 0,1 cm³ odczynnika Alamar Blue, a następnie inkubowano przez 4 h w temperaturze 37°C. Żywotność komórek linii MG-63 określono na podstawie wyznaczenia stopnia redukcji Alamar Blue, który zmierzono fluorescencyjnie (długość fali wzbudzenia = 530 nm, długość fali emisji = 590 nm; FLUOstar Omega, BMG Labtech) oraz wyznaczono, korzystając z równania:

$$\% \text{ redukcji Alamar Blue} = \frac{S^x \cdot S^{\text{kontrola}}}{S^{100\% \text{ redukcji}} \cdot S^{\text{kontrola}}} \cdot 100\% \quad (12)$$

gdzie:

S^x	fluorescencja próbek
S^{kontrola}	fluorescencja pożywki bez komórek linii MG-63
$S^{100\% \text{ redukcji}}$	fluorescencja odczynnika Alamar Blue zredukowanego w 100%

Wyniki przedstawiono jako średnia arytmetyczna trzech niezależnych powtórzeń.

3.9. Badania adhezji mikroorganizmów

Właściwości antybakteryjne i przeciwgrzybiczne otrzymanych warstw tlenkowych określono w badaniach adhezji bakterii szczepów *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 oraz *Escherichia coli* ATCC 25922. Hodowlę szczepów bakteryjnych *S. aureus* oraz *E. coli* prowadzono przez 18 h w temperaturze 37°C w 15 cm³ pożywki TSB (Bacto™ Tryptic Soy Broth, Becton Dickinson).

Badane próbki w trzykrotnym powtórzeniu autoklawizowano w 121°C pod ciśnieniem 2,1 bar (Bravo 21V, SiCan). Po sterylizacji próbki umieszczono w 24-dołkowej płytce do hodowli tkankowych, a na powierzchnię każdej próbki naniesiono 1 cm³ zawiesiny TSB zawierającej kolejno *S. aureus* lub *E. coli* w stężeniu $\sim 1,5 \cdot 10^8$ CFU/cm³. Dokładne stężenie zawiesiny bakteryjnej uzyskano za pomocą pomiaru gęstości optycznej (densytometr Grant-DEN-1). Próbki z zawiesiną zawierającą mikroorganizmy inkubowano przez 4 h w temperaturze 37°C. Po upływie tego czasu badane powierzchnie delikatnie opłukano sterylną wodą destylowaną, aby do dalszych badań wykorzystać jedynie kolonie bakterii, które skutecznie uległy adhezji do powierzchni próbek. Po wypłukaniu próbki umieszczono w nowej 24-dołkowej płytce do hodowli tkankowej. Za pomocą 1 cm³ sterylnej wody destylowanej pobrano mikroorganizmy przyłączone do badanych powierzchni

i przeniesiono je do roztworu. Następnie 100 μl roztworu z pobranymi bakteriami przyczepionymi do powierzchni rozprowadzono na płytkach agarowych za pomocą sterylnych g \acute aszczek. Zebrany roztwór rozprowadzono na płytkach agarowych w sześciu r \acute ożnych st \acute ężeniach. Opr \acute ócz 100 μl roztworu pobranego bezpośrednio z badanej powierzchni na płytkach agarowych rozprowadzono takż \acute e nast \acute ępuj \acute ące st \acute ężenia: $1 \cdot 10^{-1}$, $1 \cdot 10^{-2}$, $1 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-5}$ i $1 \cdot 10^{-6}$. Serię rozcieńczeń przygotowano poprzez zmieszanie 100 μl roztworu zawieraj \acute ącego mikroorganizmy z 900 μl sterylizowanego roztworu 0,9% NaCl. Po 24 godzinach inkubacji płytek agarowych w 37°C zliczono kolonie *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Escherichia coli* ATCC 25922 (licznik kolonii bakterii, Chemland).

4. Wyniki badań i ich omówienie

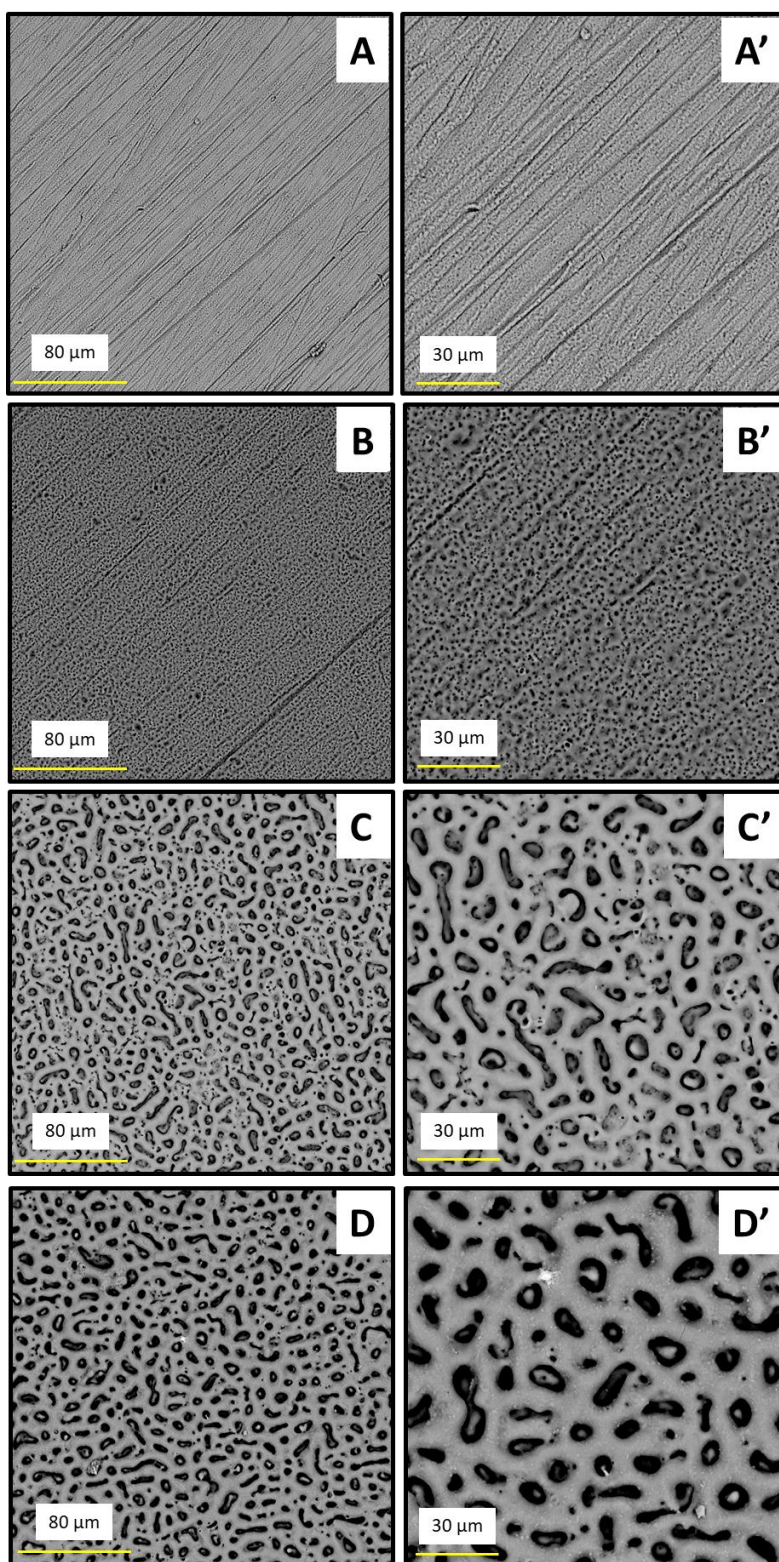
4.1. Dobór optymalnego napięcia oraz gęstości prądu podczas PEO wybranych stopów tytanu

Badania rozpoczęto od określenia wpływu poszczególnych parametrów procesu PEO na morfologię i chropowatość, a także skład chemiczny powierzchni czterech stopów tytanu: Ti-6Al-4V, Ti-15Mo, Ti-13Nb-13Zr oraz Ti-36Nb-3Zr-2Ta. Zastosowano następujące zakresy zmiany parametrów w procesie PEO:

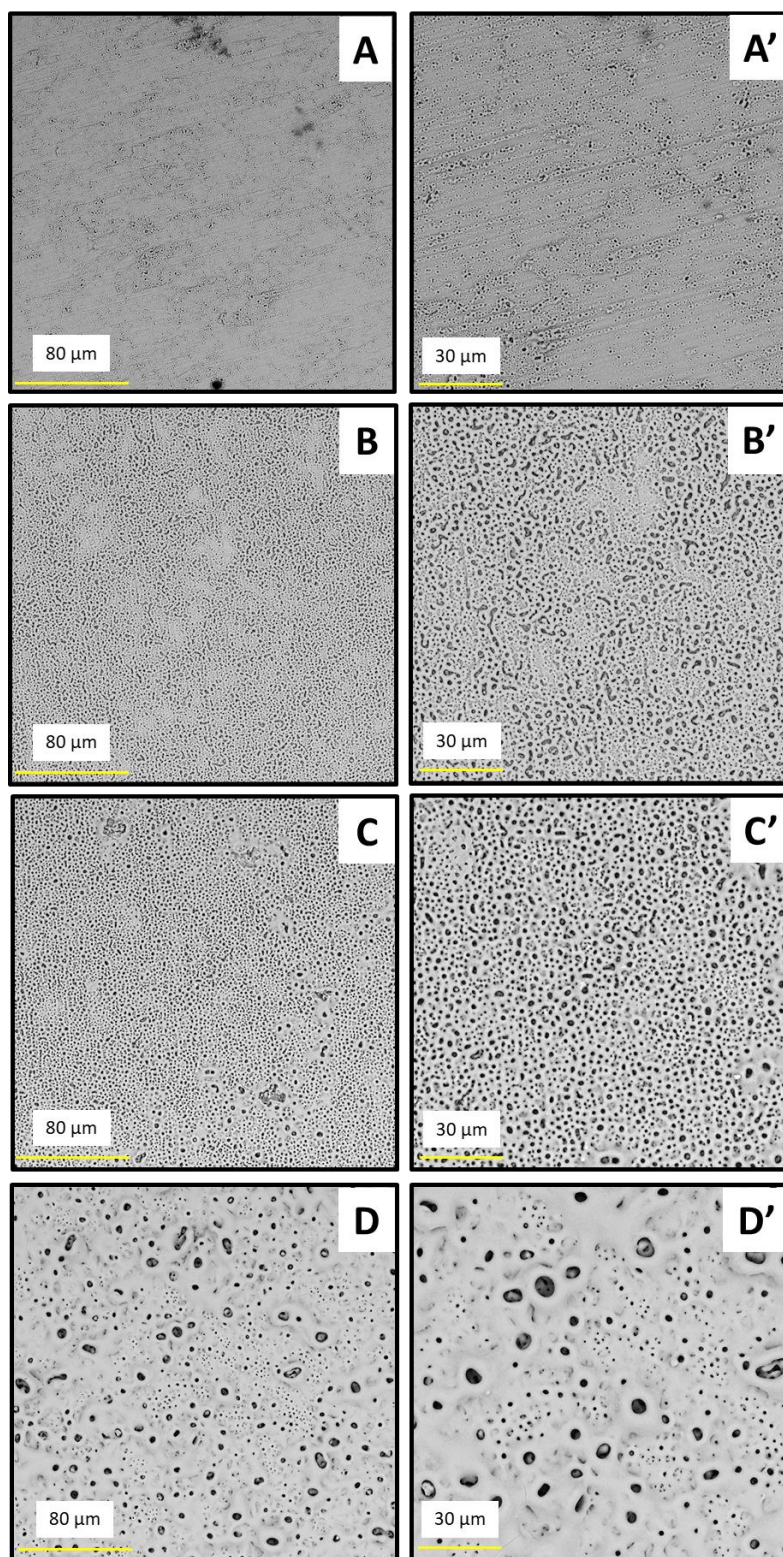
- gęstość prądu: 50, 100 i 150 mA/cm²;
- napięcie: 200, 250, 300 i 350 V.

Obrazy przedstawiające morfologię powierzchni badanych powłok tlenkowych przedstawiono na **rys. 8-11**. Jako kąpiel przeznaczoną do utleniania anodowego czterech stopów tytanu w wybranych warunkach prądowych wybrano zawiesinę składającą się z roztworu bazowego 0,1 M Ca(H₂PO₂)₂ oraz dodatku nierozpuszczalnego Cu₃(PO₄)₂ o stężeniu 25 g/dm³ (kąpiel „CuP”). Wybór ten był podyktowany dwoma czynnikami. Po pierwsze zdecydowano się wybrać zawiesinę o największym stężeniu nierozpuszczalnego osadu fosforanów ze względu na ewentualne problemy i przeszkody mogące wystąpić podczas plazmowego utleniania elektrochemicznego powierzchni stopu tytanu w kąpeli o wysokim stężeniu cząstek zawieszonych, jak przykładowo negatywny wpływ wzrastającej ilości nierozpuszczalnych cząstek Cu₃(PO₄)₂ na przewodność elektryczną kąpeli. Spośród możliwości wyboru fosforanu(V) cynku, miedzi(II) oraz srebra(I) zdecydowano się na Cu₃(PO₄)₂ jako dodatek pozwalający porównać między sobą uzyskane powierzchnie ze względu na jednocześnie dobre właściwości bakteriobójcze jak i cytokompatybilne miedzi. Atrakcyjność związków miedzi łącząca obie te cechy potwierdzona została kolejnymi badaniami przedstawionymi w dalszej części niniejszej pracy.

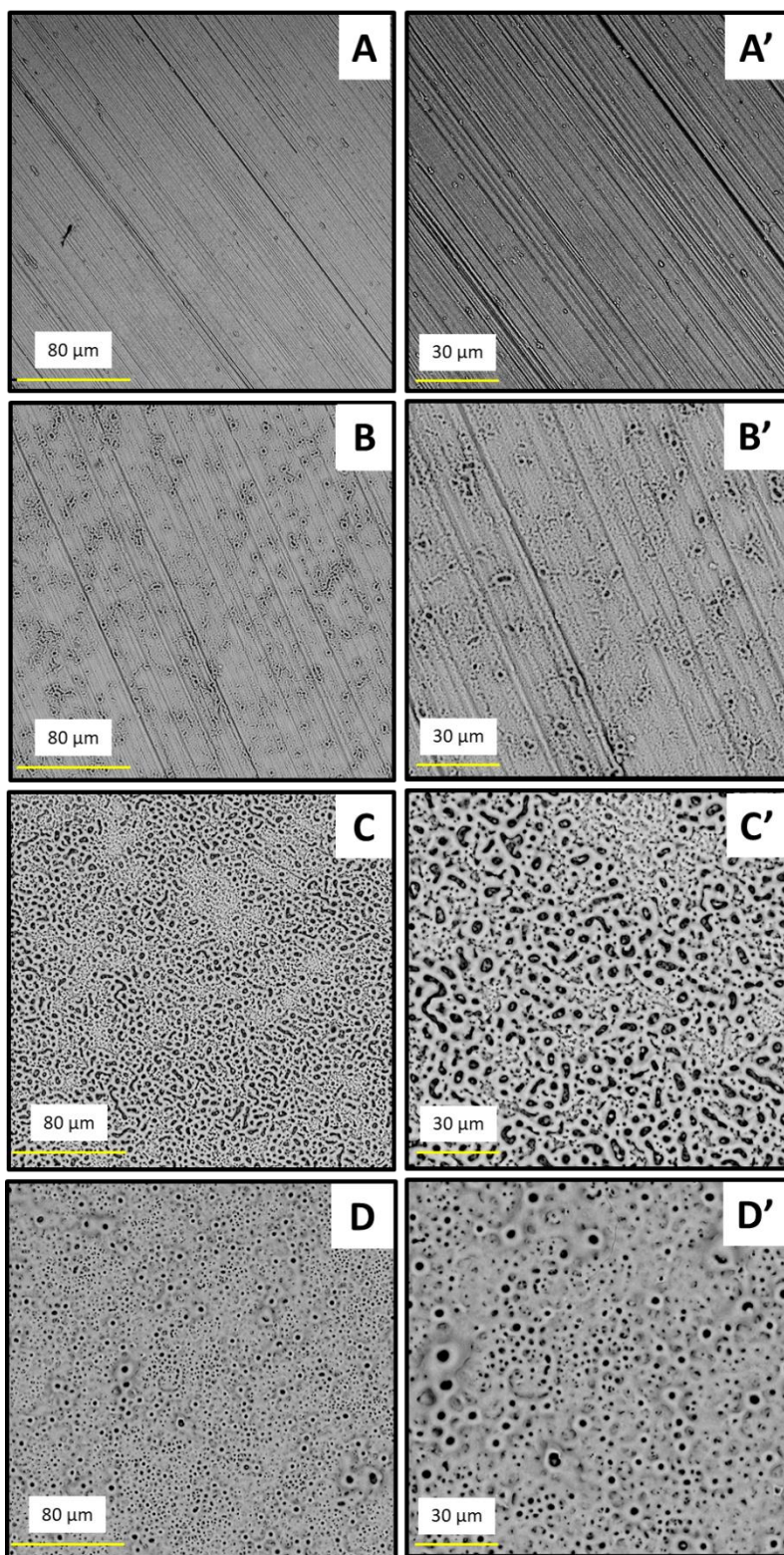
Na **rys. 8-11** przedstawiono tendencję, z jaką ulegała zmianie morfologia powierzchni poszczególnych stopów Ti wraz ze zmianą przyłożonego napięcia lub zastosowanej gęstości prądu podczas procesu PEO. Na **rys. 8** przedstawiono zmiany zachodzące na powierzchni stopu Ti-6Al-4V, **rys. 9** – Ti-15Mo, **rys. 10** – Ti-13Nb-13Zr, natomiast na **rys. 11** - Ti-36Nb-3Zr-2Ta.



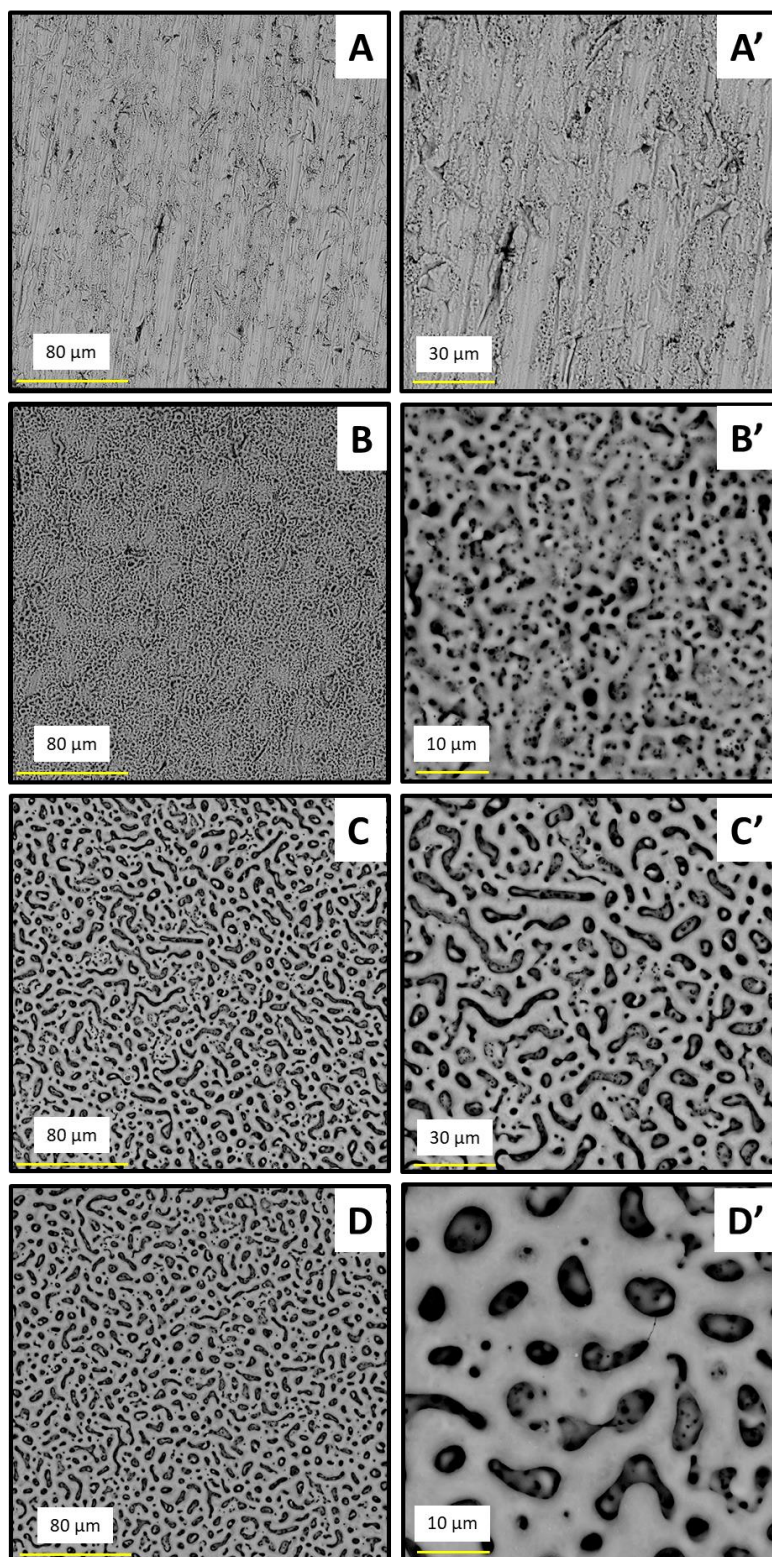
Rysunek 8. Obrazy SEM stopu TAV utlenionego plazmowo w kąpeli CuP w zakresie napięcia: 200 V (A oraz A'), 250 V (B oraz B'), 300 V (C oraz C') i 350 V (D oraz D'). Wszystkie wymienione próbki stopu TAV poddane były działaniu prądu o gęstości 150 mA/cm^2



Rysunek 9. Obrazy SEM stopu TM utlenionego plazmowo w kąpeli CuP w zakresie napięcia: 200 V (A oraz A'), 250 V (B oraz B'), 300 V (C oraz C') i 350 V (D oraz D'). Wszystkie wymienione próbki stopu TM poddane były działaniu prądu o gęstości 50 mA/cm²



Rysunek 10. Obrazy SEM stopu TNZ utlenionego plazmowo w kąpeli CuP w zakresie napięcia: 200 V (A oraz A'), 250 V (B oraz B'), 300 V (C oraz C') i 350 V (D oraz D'). Wszystkie wymienione próbki stopu TNZ poddane były działaniu prądu o gęstości 150 mA/cm^2



Rysunek 11. Obrazy SEM stopu GM utlenionego plazmowo w kąpeli CuP w zakresie napięcia: 200 V (A oraz A'), 250 V (B oraz B'), 300 V (C oraz C') i 350 V (D oraz D'). Wszystkie wymienione próbki stopu GM poddane były działaniu prądu o gęstości 100 mA/cm^2

Ze względu na znaczną ilość uzyskanych wyników, przedstawiono jedynie reprezentatywne obrazy SEM. Zaobserwowano zmianę stopnia porowatości, a także regularności rozmieszczenia porów w zależności od zmieniającego się napięcia. Wraz ze wzrostem napięcia zarówno ilość, jak i wielkość porów, znacznie zwiększają się. Porównując obrazy SEM otrzymane dla powierzchni GM widać, że powierzchnia utleniona anodowo przy napięciu 200-250 V charakteryzuje się niewielką, choć wzrastającą porowatością. Próbka GM-300-100 cechuje się równomierną porowatością, podczas gdy powierzchnia próbki GM-350-100 (**rys. 11 D'**) jest już spękana. W przypadku morfologii powierzchni stopu TM i TNZ dodatkowo można zauważyć, że pory są przerośnięte na skutek zbyt gwałtownego narastania powstającej warstwy tlenkowej. Niektóre z nich na drodze zbyt intensywnego procesu utleniania anodowego są zamknięte, co skutkuje w ostatecznie mniej rozwiniętej powierzchni niż w przypadku regularnie porowatej powierzchni powłoki uzyskanej przy utlenianiu anodowym z zastosowaniem napięcia 300 V. Regularna porowatość, rozwinięta powierzchnia oraz zwiększona chropowatość powierzchni implantu ma bardzo duży wpływ na zwiększenie prawdopodobieństwa pomyślnego przebiegu procesu osteointegracji. Dodatkowo napięcie wyższe niż 300 V często skutkowało w uzyskaniu powierzchni spękanych, co jest niedopuszczalne.

Aby dobrać optymalne warunki prądowe procesu PEO zbadano jakościowo i ilościowo skład chemiczny uzyskanych powłok tlenkowych za pomocą spektroskopii rentgenowskiej z dyspersją energii (EDX). Najważniejszym kryterium było określenie stosunków atomowych: Ca/Ti, P/Ti oraz Ca/P, ponieważ stopień wbudowania pierwiastków bioaktywnych był jednym z głównych zadań procesu PEO. Analizę EDX pod kątem obecności wapnia i fosforu, a także pierwiastków stopowych oraz tlenu i miedzi przeprowadzono dla wszystkich badanych stopów tytanu. Określono wpływ napięcia oraz anodowej gęstości prądowej na skład chemiczny uzyskanych powłok tlenkowych. Zgodnie z przewidywaniami stopień wbudowania wapnia i fosforu wzrastał razem z rosnącym napięciem oraz anodową gęstością prądu. W przypadku miedzi największy stopień inkorporacji jej związków w powłoki uzyskano na drodze anodowego utleniania powierzchni stopów tytanu w warunkach 300 V i 150 mA/cm², stąd te warunki prądowe zostały wybrane jako najbardziej korzystne oraz optymalne do dalszych badań omówionych w kolejnych podrozdziałach.

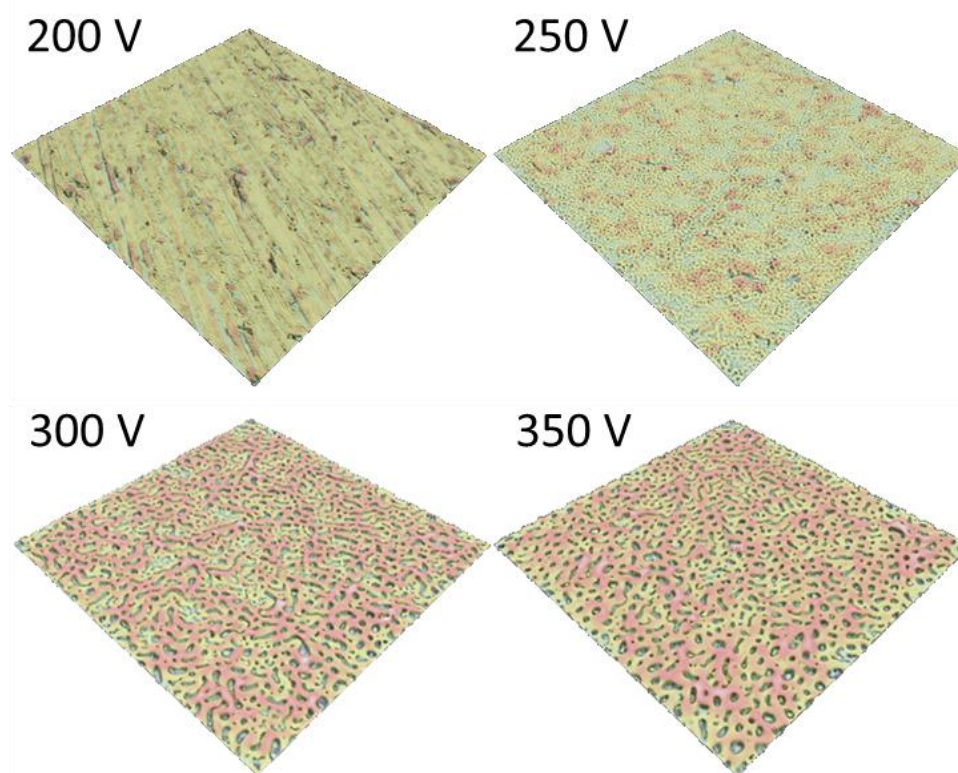
W **tabeli 4** przedstawiono stosunki atomowe wybranych pierwiastków stopowych oraz pochodzących z kąpeli do utleniania na przykładzie wyników uzyskanych dla stopu Ti-6Al-4V. Potwierdzono korzystny wpływ wzrastającego napięcia oraz anodowej gęstości prądu na ilość wbudowywanego pierwiastka. Związane jest to bezpośrednio z rosnącą energią wyładowań powstających w warstwie plazmy otaczającej utlenianą anodowo powierzchnię. Większa energia wyładowań prowadziła do większej ilości i intensywności wyładowań, a w konsekwencji do bardziej intensywnej jonizacji pierwiastków zawartych w kąpeli.

Tabela 4. Wpływ napięcia oraz anodowej gęstości prądu ($i_1 = 50 \text{ mA/cm}^2$, $i_2 = 100 \text{ mA/cm}^2$ oraz $i_3 = 150 \text{ mA/cm}^2$) na stosunki atomowe pierwiastków stopowych oraz wapnia i fosforu pochodzących z kąpielii zastosowanej podczas procesu PEO na przykładzie próbek stopu Ti-6Al-4V

	O/Ti			Al/Ti			V/Ti		
	i_1	i_2	i_3	i_1	i_2	i_3	i_1	i_2	i_3
200 V	2,3	2,8	2,9	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1
250 V	3,5	3,2	3,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
300 V	3,8	4,6	4,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1
350 V	4,9	4,8	4,5	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0
	Ca/Ti			P/Ti			Ca/P		
	i_1	i_2	i_3	i_1	i_2	i_3	i_1	i_2	i_3
200 V	-	-	-	0,1	0,1	0,1	-	-	-
250 V	0,0	0,0	0,0	0,3	0,3	0,3	0,0	0,0	0,1
300 V	0,1	0,1	0,1	0,5	0,5	0,5	0,1	0,1	0,2
350 V	0,1	0,2	0,2	0,6	0,6	0,6	0,2	0,3	0,3

Obecność Cu została potwierdzona dopiero w przypadku próbek utlenianych anodowo przy minimum 250/300 V. W tym przypadku również wyższa gęstość prądu gwarantowała większy stopień wbudowania się cząstek związków miedzi w powierzchnię stopu tytanu. Należy natomiast wziąć pod uwagę także morfologię powstałych powierzchni. Pomimo, że warunki prądowe 350 V i 150 mA/cm² zapewniały stosunek Ca/P najwyższy i najbliższy stosunkowi Ca/P występującemu w hydroksyapatycie, tj. 1,67, powierzchnie utleniane anodowo w takich warunkach prądowych były mocno spękane. Spękania, przerośnięte lub zarośnięte pory mają bezpośredni wpływ na obniżoną odporność korozyjną materiału czy też jego biointegralność, a także właściwości mechaniczne. Stąd do dalszych badań wybrano najbardziej optymalne warunki prądowe, jakimi było napięcie 300 V oraz gęstość prądu 150 mA/cm². Wybór stopu Ti-15Mo jako reprezentatywnego do bardziej szczegółowych badań fizykochemicznych, a także mikrobiologicznych, został podyktowany jego unikalnymi właściwościami, m.in. brakiem wanadu i glinu w składzie, modułem Younga niższym niż w przypadku Ti czy stopu Ti-6Al-4V, a także obecnością w składzie molibdenu pozytywnie sprzyjającego integracji tkanki kostnej z powierzchnią implantu [38].

Dodatkowo przeprowadzono badania chropowatości otrzymanych powierzchni warstw tlenkowych. W tym celu wykonano rekonstrukcje profili 3D za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego wyposażonego w specjalnie przystosowany do tego celu detektor. Podobnie jak w przypadku omawianych obrazów SEM 2D, tutaj również na **rys. 12** przedstawiono reprezentacyjnie przykład profili 3D uzyskanych dla stopu gummetal anodowo utlenionego z zastosowaniem gęstości prądu 150 mA/cm² oraz napięcia: 200 V, 250 V, 300 V i 350 V.



Rysunek 12. Profile 3D GM od 200 do 350 V, 150 mA. Pole widzenia: 268.50 μm

W **tabeli 5** przedstawiono wartości średniego współczynnika chropowatości R_a oraz największego odchylenia od profilu średniej R_z dla czterech zbadanych stopów tytanu. Znaczący wpływ na zmianę chropowatości powierzchni zaobserwowano w przypadku zmiany zastosowanego napięcia, stąd w tabeli uwzględniono jedną docelowo wybraną anodową gęstość prądu 150 mA/cm².

Tabela 5. Wpływ napięcia na zmianę Ra oraz Rz w przypadku próbek wszystkich badanych stopów tytanu utlenionych anodowo z zastosowaniem gęstości prądu 150 mA/cm²

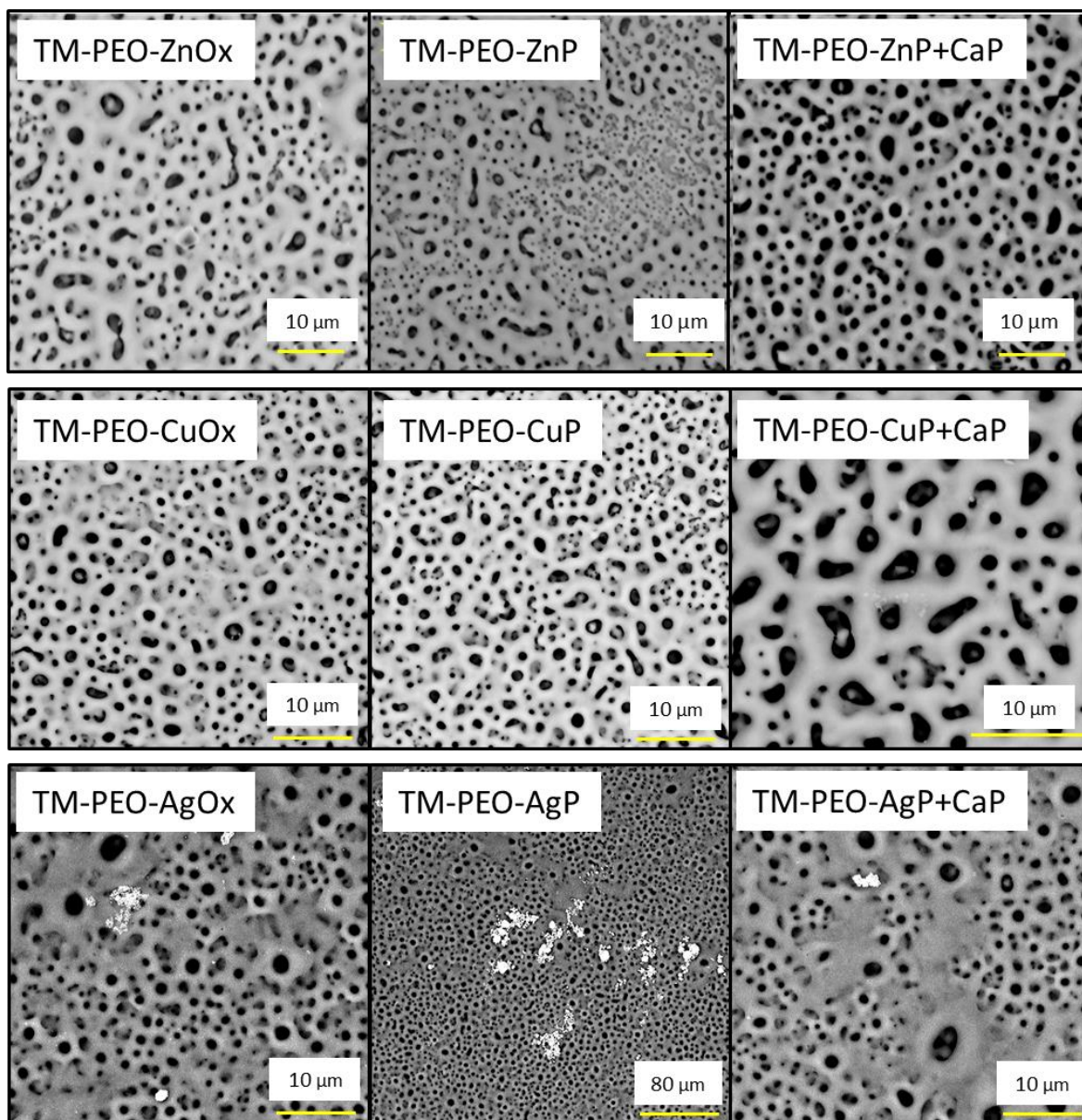
V	Ra, nm	SD	Rz, μm	SD	Ra, nm	SD	Rz, μm	SD	
Ti-6Al-4V					Ti-36Nb-3Zr-2Ta				
200	529,0	30,4	3,09	0,32	533,8	75,9	3,62	0,51	
250	543,0	68,9	3,30	0,46	518,3	39,5	2,99	0,48	
300	1295,0	71,4	6,06	0,73	1030,0	16,3	5,26	0,46	
350	1418,2	89,3	6,75	0,81	1056,5	87,8	5,25	0,55	
Ti-15Mo					Ti-13Nb-13Zr				
200	397,3	62,6	2,23	0,48	334,0	21,2	2,47	0,72	
250	518,3	39,5	2,99	0,48	524,8	36,8	3,37	0,60	
300	827,3	193,9	3,99	0,60	739,5	20,0	3,71	0,08	
350	1001,3	187,4	4,88	0,94	959,7	30,5	4,66	0,60	

Analizując powyższe wyniki badań można zauważyć, że wzrost zastosowanego napięcia skutkuje we wzroście chropowatości utlenianej anodowo powierzchni. Wiąże się to z faktem, iż wyższe parametry prądowe powodują bardziej intensywny przebieg reakcji podczas PEO, a co jest tego konsekwencją, większe zmiany w chropowatości powierzchni powstałej warstwy tlenkowej czy wcześniej wspomnianej porowatości.

4.2. Charakterystyka fizykochemiczna warstw tlenkowych utworzonych na powierzchni stopu Ti-15Mo

Morfologia powierzchni

Jak nadmieniono we wcześniejszym podrozdziale pracy, do dalszych badań wybrano stop Ti-15Mo poddawany procesowi PEO z zastosowaniem napięcia 300 V oraz anodowej gęstości prądu 150 mA/cm². Na **rys. 13** przedstawiono obrazy SEM powierzchni otrzymanych w wyniku anodowego utleniania stopu Ti-15Mo w kąpielach zawierających związki cynku, miedzi lub srebra. Za pomocą badań SEM określono także chropowatość otrzymanych powłok, jednak wyniki parametrów Ra oraz Rz w przypadku powierzchni poddanych anodowemu utlenianiu w kąpielach zawierających związki cynku oraz srebra były analogiczne jak w przypadku tych przedstawionych w poprzednim rozdziale (TM-300-150-CuP).



Rysunek 13. Obrazy SEM 2D stopu Ti-15Mo poddanego procesowi PEO (300 V, 150 mA/cm²) w kąpielach zawierających związki cynku, miedzi lub srebra

Obrazy SEM przedstawione na powyższym **rys. 13** dowodzą, że rezultatem procesu PEO było powstanie porowatych warstw tlenkowych na powierzchni modyfikowanych stopów tytanu. Porównując wszystkie obrazy SEM zauważyć można, że obecność wtrąceń na badanych powierzchniach jest widoczna szczególnie w przypadku próbek utlenianych anodowo w kąpielach zawierających związki srebra, jednakże inkluzja cząstek zarówno srebra, jak i cynku oraz miedzi została potwierdzona za pomocą badań EDX oraz spektroskopii Ramana, których wyniki przedstawiono w dalszej części pracy.

Uzyskane powierzchnie nie były spękałe ani uszkodzone, a każda próbka charakteryzowała się porowatą strukturą skutkującą w znacząco bardziej rozwiniętej i chropowatej powierzchni. Porowatość otrzymanych warstw tlenkowych stanowi naturalny efekt naprzemiennych procesów topnienia i krystalizacji zachodzących podczas gwałtownego procesu PEO [156,157]. Proces PEO jako wysokonapięciowa obróbka powierzchniowa prowadzi do występowania silnego pola elektrycznego i wyładowań w obszarze powstawania plazmy na powierzchni materiału poddanego tej obróbce. Zjawiska te skutkują formowaniem porowatej struktury wzbogaconej w związki pochodzące z kąpieli, które są topione podczas obróbki PEO jako skutek działania wysokotemperaturowej plazmy. Szybkie i częste zmiany warunków utleniania na powierzchni poddanej obróbce prowadzą do naprzemiennych procesów formowania i topnienia warstwy tlenkowej, podczas których zachodzi lokalna jonizacja, topnienie i inkluzja związków z kąpieli do warstwy tlenkowej [156,158].

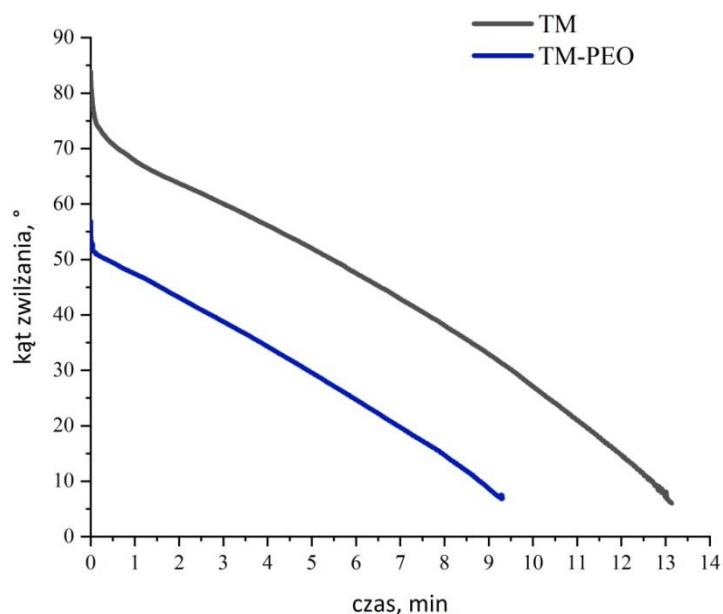
Rozmiar i liczba utworzonych porów na zmodyfikowanej powierzchni, a także ich otwarta lub zamknięta struktura, zależą od rodzaju i składu chemicznego zastosowanej kąpieli podczas procesu PEO oraz jej przewodnictwa elektrycznego. Rozmiar zawieszonych w kąpieli PEO cząstek istotnie wpływa na ich ostateczny rozkład w porowatej warstwie tlenkowej [157]. Zarówno zwiększona porowatość jak i rozwinięta powierzchnia są znaczącymi czynnikami ułatwiającymi docelową integrację powierzchni implantu z tkanką kostną, co jest spowodowane charakterystyką, strukturą i budową kości, stąd ważnym jest zapewnienie możliwie jak najbardziej odpowiednich i zbliżonych parametrów biomateriału.

Zwilżalność powierzchni

Ze względu na istotną rolę, jaką odgrywa zwilżalność powierzchni w procesie integracji świeżo wszczepionego implantu z tkanką kostną, przeprowadzono pomiary kąta zwilżania zmodyfikowanych powierzchni stopu Ti-15Mo. W tym celu za pomocą goniometru określono zmianę wodnego kąta zwilżania w funkcji czasu.

Wykres na **rys. 14** przedstawia wyniki otrzymane dla próbek odniesienia, tzn. wyszlifowanej i oczyszczonej powierzchni stopu Ti-15Mo, a także utlenionej powierzchni TM-PEO, po czym porównane zostały wyniki próbek odniesienia z wynikami otrzymanymi dla próbek utlenionych w zawiesinach związków cynku (**rys. 15**), miedzi (**rys. 16**) oraz srebra

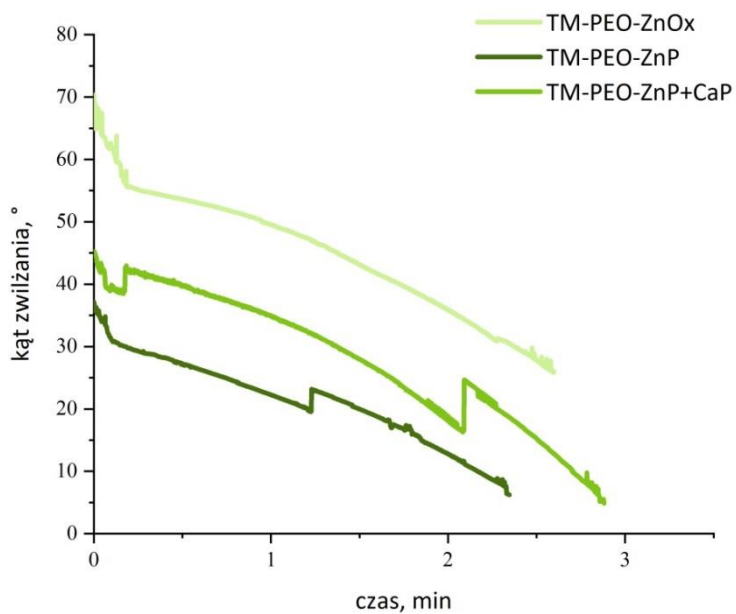
(rys. 17). Na podstawie tej analizy określono wpływ dodatku tlenków i fosforanów cynku, miedzi oraz srebra na charakter hydrofilowy powierzchni stopu tytanu.



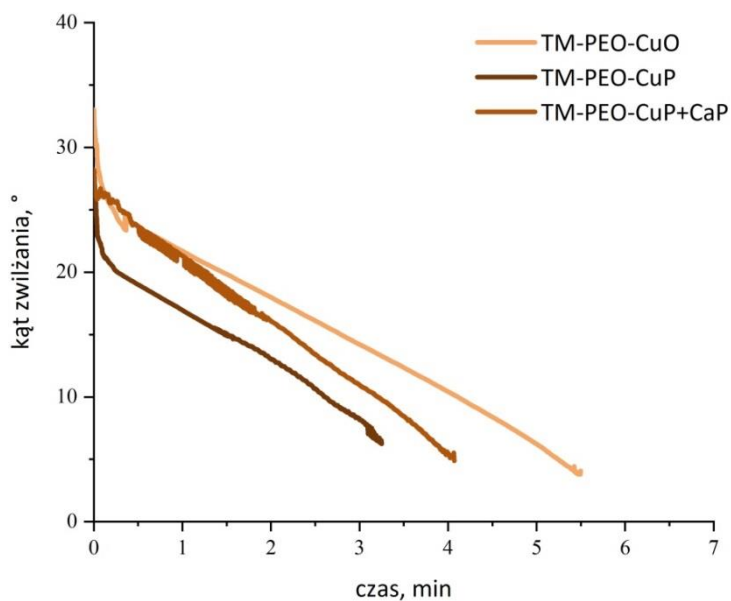
Rysunek 14. Zmiana wodnego kąta zwilżania w czasie dla próbek odniesienia TM oraz TM-PEO

Analizując **rys. 14**, można zaobserwować, że plazmowe utlenianie elektrochemiczne skutkuje w obniżeniu kąta zwilżalności badanej powierzchni, a co za tym jednocześnie idzie, zwiększeniem jej charakteru hydrofilowego. Przyczyną tego jest m.in. zmieniona morfologia powierzchni, która w rezultacie PEO staje się porowata. Krople cieczy łatwiej penetrują taką powierzchnię, wnikając w pory o różnej głębokości. Dodatkowo obecność w strukturze utlenionej powierzchni stopu grup fosforanowych typu H_2PO_4^- czy HPO_4^{2-} także zwiększa jej zwilżalność, ponieważ ugrupowania te wspomagają adsorpcję grup hydroksylowych OH^- [159].

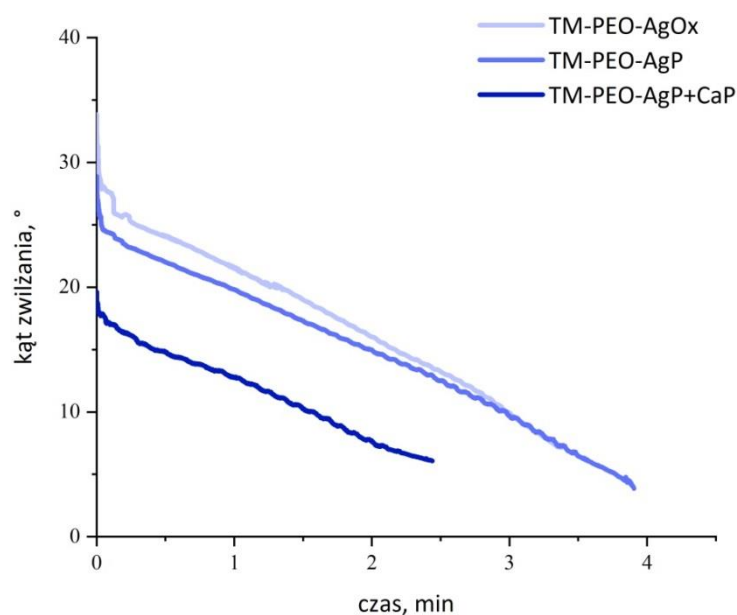
Na **rys. 15-17** zilustrowano wartości wodnego kąta zwilżania zbadane w przypadku powierzchni utlenianych w zawiesinach zawierających związki antybakteryjnych cynku, miedzi oraz srebra. W poniższej **tabeli 6** przedstawiono zgromadzone wyniki początkowego kąta zwilżania oraz całkowitego czasu rozplywu kropli wszystkich badanych powierzchni.



Rysunek 15. Zmiana kąta zwilżania TM-PEO-ZnOx, TM-PEO-ZnP oraz TM-PEO-ZnP+CaP w funkcji czasu



Rysunek 16. Zmiana kąta zwilżania TM-PEO-CuOx, TM-PEO-CuP oraz TM-PEO-CuP+CaP w funkcji czasu



Rysunek 17. Zmiana kąta zwilżania TM-PEO-AgOx, TM-PEO-AgP oraz TM-PEO-AgP+CaP w funkcji czasu

Tabela 6. Początkowy kąt zwilżania oraz całkowity czas rozptywu kropli badanych powierzchni

próbka	wartość początkowego kąta zwilżania, °	całkowity czas rozptywu kropli, s
TM	81,61	669
TM-PEO	50,20	187
TM-PEO-ZnOx	68,04	205
TM-PEO-ZnP	37,18	141
TM-PEO-ZnP+CaP	45,24	189
TM-PEO-CuOx	33,60	330
TM-PEO-CuP	28,04	198
TM-PEO-CuP+CaP	29,96	246
TM-PEO-AgOx	33,84	201
TM-PEO-AgP	28,89	234
TM-PEO-AgP+CaP	19,64	146

Obecność fosforanów cynku, miedzi i srebra dodatkowo obniża wartość wodnego kąta zwilżania, co zgadza się z wcześniejszymi rozważaniami na temat wpływu obecności grup fosforanowych w strukturze warstwy tlenkowej na zwilżalność powierzchni stopu.

Interesujący jest fakt, że obecność ZnO, CuO czy Ag₂O również korzystnie wpływa na charakterystykę hydrofilową powierzchni, choć w nieco mniejszym stopniu niż dodatek fosforanów tych pierwiastków. Pomimo braku obecności dodatkowych grup fosforanowych pochodzących z Zn₃(PO₄)₂, Cu₃(PO₄)₂ czy Ag₃PO₄, w strukturze powstałej warstwy tlenkowej obecne są jony Zn²⁺, Cu²⁺ czy Ag⁺. Kationy te mogą pozytywnie wpływać na wzrost zwilżalności powierzchni dzięki przyciąganiu przez nie ujemnie naładowanych grup hydroksylowych OH⁻. Ponadto analizując powyżej przedstawione obrazy SEM, zauważyć można, że dodatek związków cynku, miedzi czy srebra skutkowało w jeszcze większym rozwinięciu powierzchni oraz wzroście jej złożoności i chropowatości. Taka powierzchnia w porównaniu z powierzchnią wyszlifowaną i gładką również wykazuje zwiększoną tendencję do adsorbowania cząsteczek wody. Może być to także wytłumaczeniem, dlaczego powierzchnie zawierające związki srebra charakteryzują się najniższym (TM-PEO-AgP+CaP – 19,64°) kątem zwilżania w zestawieniu z powierzchniami zawierającymi cynk czy miedź, w przypadku których zaobserwowano mniejsze wtrącenia na powierzchni stopu, a jednocześnie mniej rozwiniętą powierzchnię.

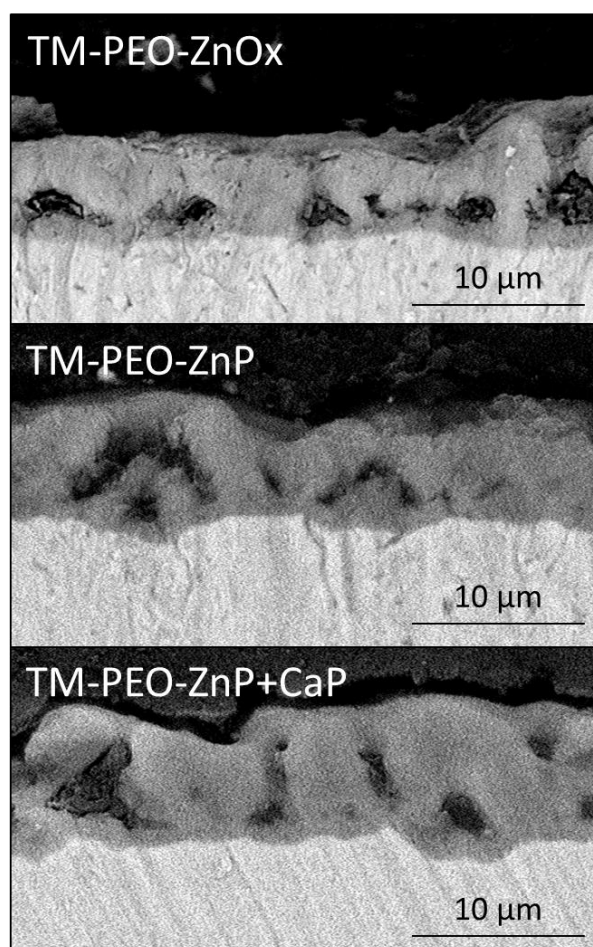
Zwilżalność biomateriałów stanowi bardzo istotną właściwość ich powierzchni w przypadku początkowych etapów osteointegracji implantu z tkanką kostną, ponieważ wpływa ona stymulująco na migrację oraz adhezję białek i komórek kostnych, zapewniając w ten sposób prawidłową proliferację komórek. W rezultacie utworzone zostają silniejsze wiązania pomiędzy powierzchnią implantu a tkanką kostną [38,160]. Dzieje się tak ze względu na związek pomiędzy dobrą zwilżalnością powierzchni implantu a krystalizacją na niej hydroksyapatytu. Wyższa hydrofilowość powierzchni biomateriału związana jest z obecnością na niej ujemnie naładowanych grup hydroksylowych OH⁻, które przyciągają dodatnio naładowane kationy wapnia Ca²⁺ znajdujące się w strukturze kryształów hydroksyapatytu Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂, promując w ten sposób tworzenie kryształów fosforanu wapnia i ułatwiając pośrednio osteointegrację i zwiększając biozgodność implantu [68].

4.3. Przekroje poprzeczne warstw tlenkowych

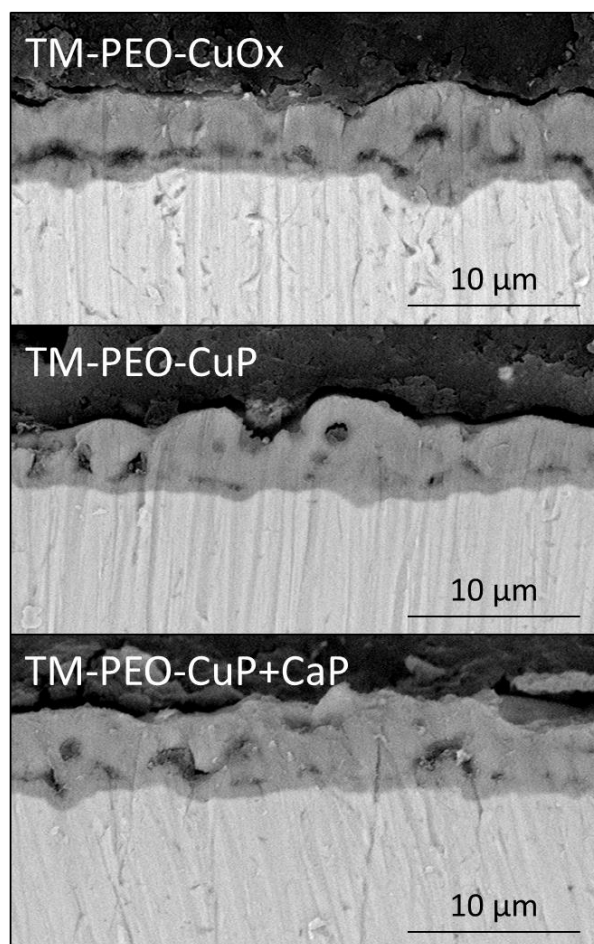
Na **rys. 17-19** przedstawiono przekroje poprzeczne warstw tlenkowych utworzonych wskutek plazmowego utleniania elektrochemicznego powierzchni stopu Ti-15Mo w kąpielach zawierających związki cynku, miedzi lub srebra. Na podstawie uzyskanych obrazów SEM można stwierdzić, że grubość utworzonych powłok tlenkowych silnie zależała od rodzaju dodatku użytego w kąpeli do utleniania anodowego. W przypadku próbek stopu Ti-15Mo utlenionych anodowo w zawiesinach zawierających związki cynku otrzymano najgrubsze warstwy tlenkowe sięgające wartości kilkunastu μm , podczas gdy zastosowanie związków miedzi poskutkowało w uformowaniu się cieńszych warstw tlenkowych o grubości nieprzekraczającej 10 μm . Najcieńsze warstwy zaobserwowano w przypadku próbek zmodyfikowanych związkami srebra, gdzie jedynie lokalnie pojawiały się niewielkie fragmenty warstw o grubości około 10 μm . Pozostałe partie powłok tlenkowych sięgały szerokości kilku μm .

Różnice w zmierzonej grubości warstw tlenkowych mogą być spowodowane inną charakterystyką zastosowanych dodatków do zawiesin. Choć wszystkie zastosowane proszki charakteryzują się znikomą rozpuszczalnością w wodzie, podczas prowadzenia procesu PEO zauważyć można było, że założone napięcie 300 V zdecydowanie najszybciej osiągnęto w przypadku utleniania anodowego stopu Ti-15Mo w zawiesinach zawierających tlenek cynku czy ortofosforan(V) cynku. Proces zachodził również znacznie łagodniej niż w pozostałych przypadkach, co pozwalało na stopniowy wzrost formowanej powłoki tlenkowej. Bez wątplenia najbardziej agresywny przebieg miał proces PEO w kąpielach zawierających związki srebra. Po osiągnięciu docelowego napięcia 300 V, natężenie prądu wciąż pozostawało na stosunkowo wysokim poziomie, powyżej 20-30 mA, co wskazuje na znacznie mniejszą szczelność warstwy zaporowej. Odzwierciedlenie tego widać także w przekrojach poprzecznych, gdzie warstwy tlenkowe próbek zmodyfikowanych związkami cynku lub miedzi są w swojej budowie porowate, ciągłe i dobrze przylegające do podłoża stopu, a ich grubość jest podobna w całym przekroju warstwy. Natomiast w przypadku warstw tlenkowych utworzonych na powierzchni próbek TM-PEO-AgOx, TM-PEO-AgP czy TM-PEO-AgP+CaP, grubość warstwy mają bardziej nieregularną budowę. Dodatkowo na **rys. 19** zauważyć można, że w miejscu utworzenia relatywnie dużego poru

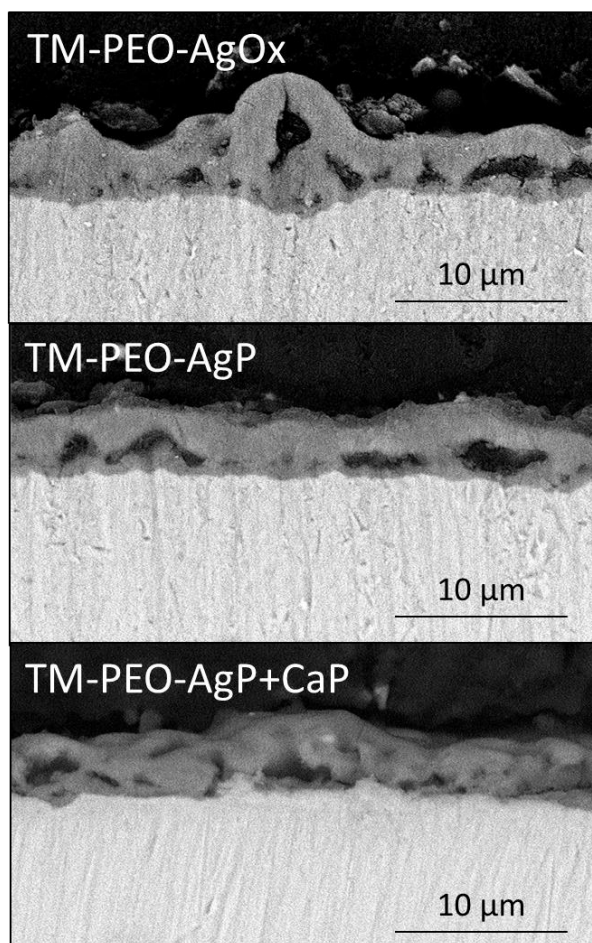
(TM-PEO-AgOx) występuje jednocześnie spękanie na powierzchni otaczającej go warstwy tlenkowej. Niewielkie uszkodzenia warstwy są widoczne także na powierzchni porowatej warstwy tlenkowej próbki TM-PEO-AgP+CaP, która charakteryzuje się również znacznie gorszą ciągłością przylegania do podłoża stopu. Warto zauważyć również, że na grubość powstałych powłok tlenkowych znacząco wpływa także skład atmosfery plazmy w kanałach mikrowyładowań: zarówno rodzaj jak i stężenie powstającego gazu, co także różnicuje omawiane przypadki.



Rysunek 17. Obrazy SEM przekrojów poprzecznych warstw tlenkowych utworzonych na powierzchni próbek stopu Ti-15Mo utlenionych plazmowo w zawiesinach zawierających związki cynku z zastosowaniem napięcia 300 V oraz gęstości prądu 150 mA/cm²

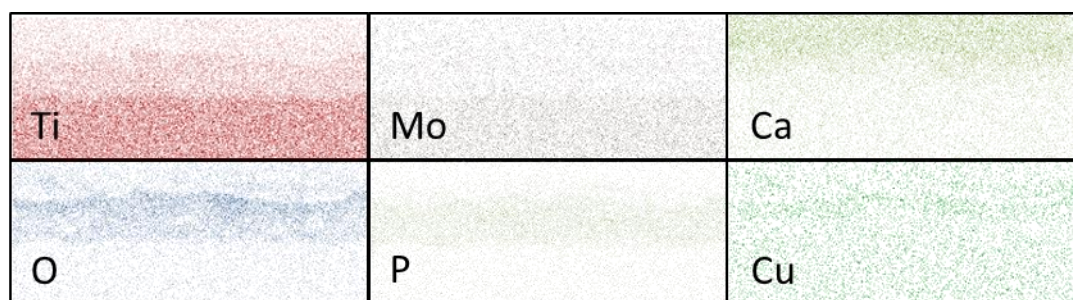


Rysunek 18. Obrazy SEM przekrojów poprzecznych warstw tlenkowych utworzonych na powierzchni próbek stopu Ti-15Mo utlenionych plazmowo w zawiesinach zawierających związki miedzi z zastosowaniem napięcia 300 V oraz gęstości prądu 150 mA/cm^2



Rysunek 19. Obrazy SEM przekrojów poprzecznych warstw tlenkowych utworzonych na powierzchni próbek stopu Ti-15Mo utlenionych plazmowo w zawiesinach zawierających związki srebra z zastosowaniem napięcia 300 V oraz gęstości prądu 150 mA/cm²

Dodatkowo na **rys. 20** przedstawiono analizę rozmieszczenia pierwiastków w strukturze warstwy tlenkowej - reprezentacyjnie dla próbki TM-PEO-CuP. Analiza typu „mapping” potwierdziła obecność warstwy tlenkowej na podstawie wyższych stężeń O, P i Ca oraz niższych stężeń Ti i Mo w obrębie powłoki tlenkowej. Niskie stężenie molibdenu w powłoce tlenkowej było zgodne z wcześniejszą analizą EDX powierzchniową. Analogiczne wyniki uzyskano dla pozostałej części omawianych powłok tlenkowych. Cząstki związków cynku, miedzi oraz srebra nie zostały zaobserwowane podczas mapowania EDX prawdopodobnie dlatego, że ich większość została wbudowana podczas procesu PEO w warstwie wierzchniej powłok tlenkowych. Bardzo niewielkie stężenie miedzi zostało zobrazowane na **rys. 20**, gdzie widoczne jest nieznaczne zagęszczenie tego pierwiastka przy wierzchniej warstwie powłoki. W przypadku cynku i srebra pierwiastki te nie zostały zaobserwowane w analizie mappingu EDX. Ich obecność w badanych powłokach została potwierdzona przy użyciu spektroskopii Ramana, której wyniki przedstawiono w dalszej części pracy.



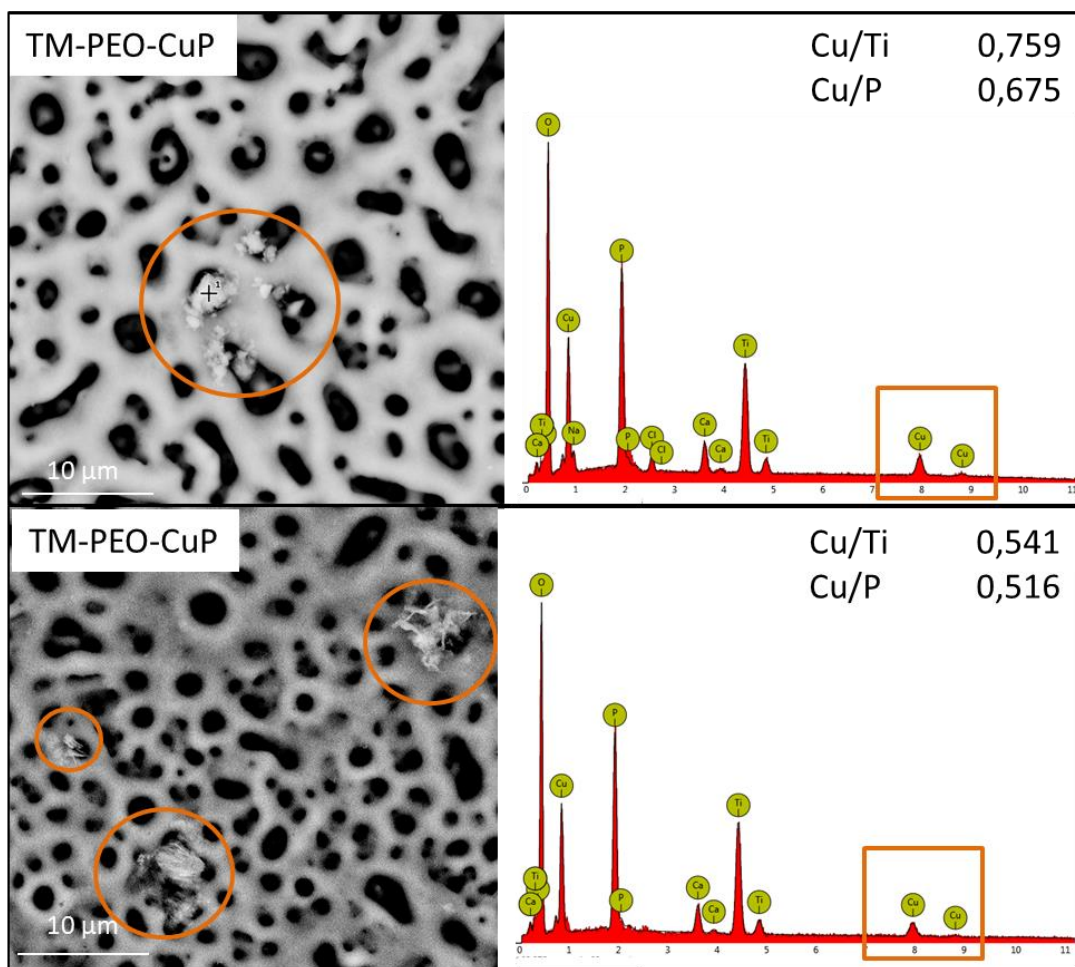
Rysunek 20. Analiza mapping EDX przekroju poprzecznego warstwy tlenkowej utworzonej na powierzchni próbki TM-PEO-CuP+CaP

4.4. Skład chemiczny warstw tlenkowych

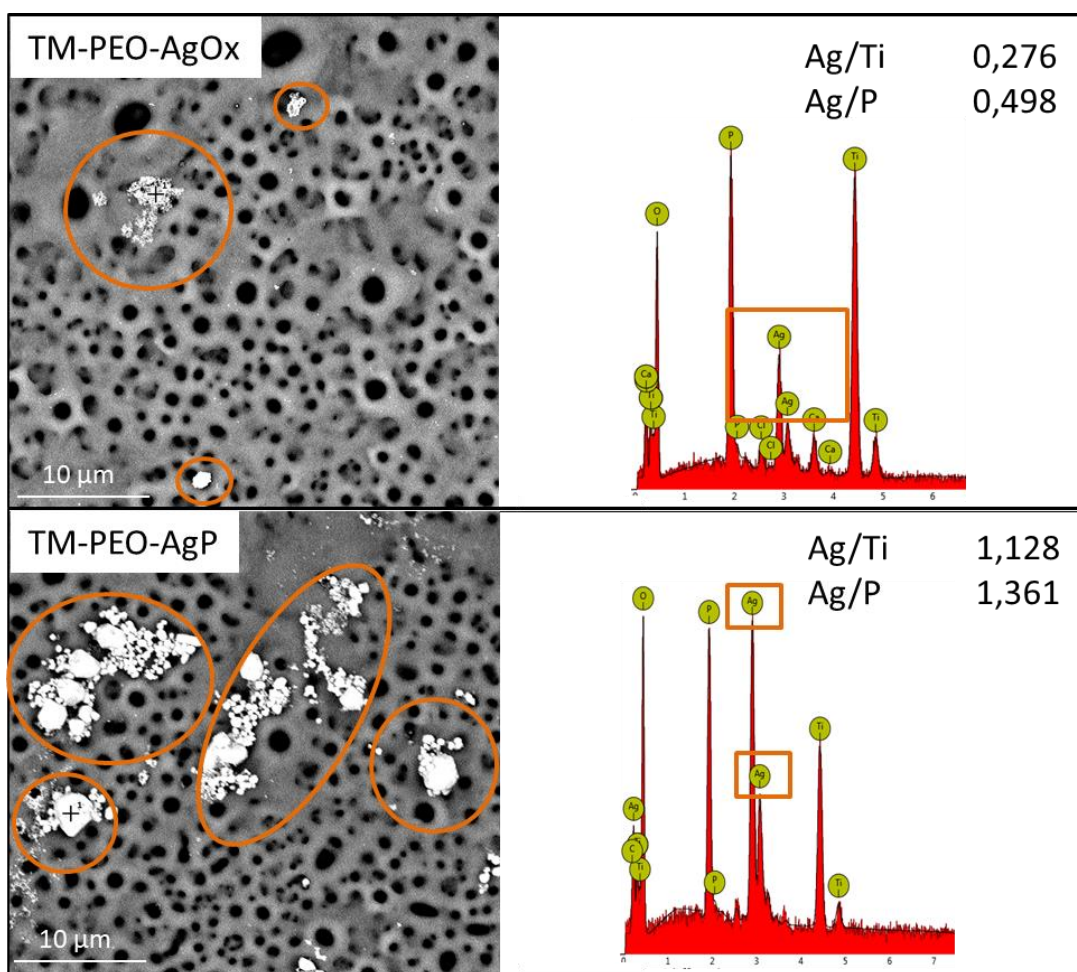
Spektroskopia rentgenowska z dyspersją energii

Wstępne potwierdzenie pomyślnego wbudowania związków cynku, miedzi oraz srebra w strukturę warstw tlenkowych uzyskano za pomocą spektroskopii rentgenowskiej z dyspersją energetyczną (EDX). Obserwując obrazy SEM uzyskanych powierzchni, nie dostrzeżono charakterystycznych wtrąceń mogących świadczyć o występowaniu na powierzchni warstw tlenkowych związków cynku. W ramach badań EDX przeprowadzono analizy charakteryzujące ilościowo skład chemiczny wybranego fragmentu próbki. Wskutek tych analiz nie potwierdzono obecności cynku nawet w znikomym stopniu, stąd o jego udanym wbudowaniu w strukturę warstwy tlenkowej zdecydowały późniejsze analizy spektroskopii Ramana czy badań zanurzeniowych w roztworze Ringera.

Zupełnie inaczej sytuacja wyglądała w przypadku próbek zmodyfikowanych związkami miedzi oraz srebra, gdzie na powierzchni wyraźnie zaobserwowano wytrącenia, które dzięki analizie EDX scharakteryzowano jako związki oczekiwanych pierwiastków. Na **rys. 21-22** przedstawiono przykłady aglomeracji cząstek miedzi oraz srebra wraz z odpowiadającymi im widmami punktowej analizy EDX.

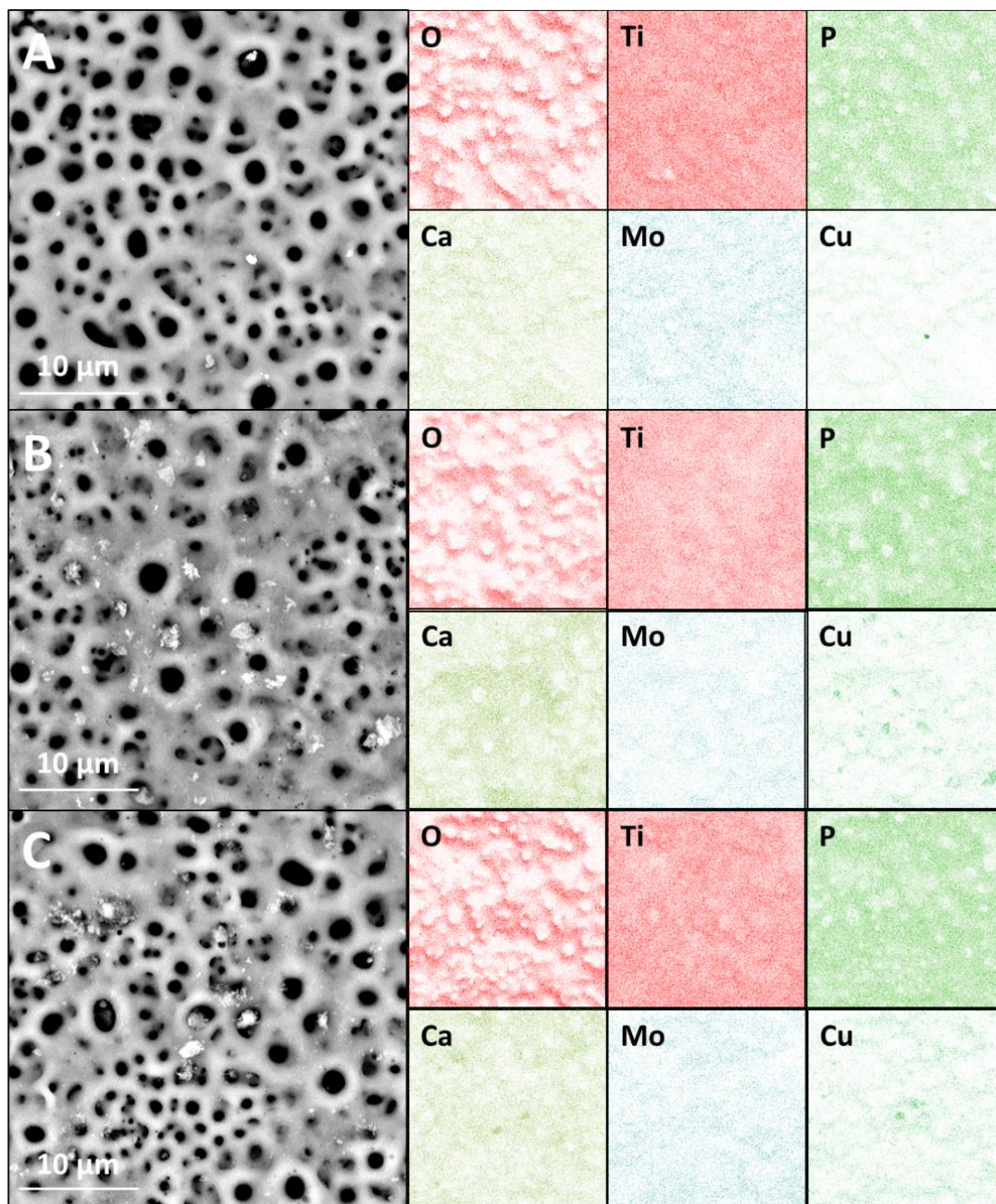


Rysunek 21. Obrazy SEM oraz widma EDX potwierdzające obecność związków miedzi na przykładzie fragmentów powierzchni próbki TM-PEO-CuP



Rysunek 22. Obrazy SEM oraz widma EDX potwierdzające obecność związków miedzi na przykładzie fragmentów powierzchni próbek oraz TM-PEO-AgOx oraz TM-PEO-AgP

Obecność pierwiastków stopowych Ti oraz Mo, a także bioaktywnych Ca oraz P potwierdzono za pomocą analizy EDX typu mapping. Na **rys. 23** przedstawiono rozmieszczenie wspomnianych pierwiastków w wybranych fragmentach badanych powierzchni na przykładzie próbek TM-PEO-CuOx, TM-PEO-CuP oraz TM-PEO-CuP+CaP. Wszystkie pierwiastki, z wyjątkiem miedzi, są jednorodnie rozmieszczone na powierzchni próbek. Miedź występuje w postaci miejscowych aglomeracji wytrąceń związków miedzi, w tym przypadku prawdopodobnie fosforanów miedzi. Analogicznie sytuacja wygląda dla próbek zawierających związki srebra, natomiast w przypadku związków cynku nie były one widoczne na obrazach SEM ani nie udowodniono wyraźnie jego występowania w widmach EDX. Może to świadczyć o jego relatywnie niewielkiej ilości w wierzchniej warstwie powłoki tlenkowej, a większej w głębszych partiach próbki.

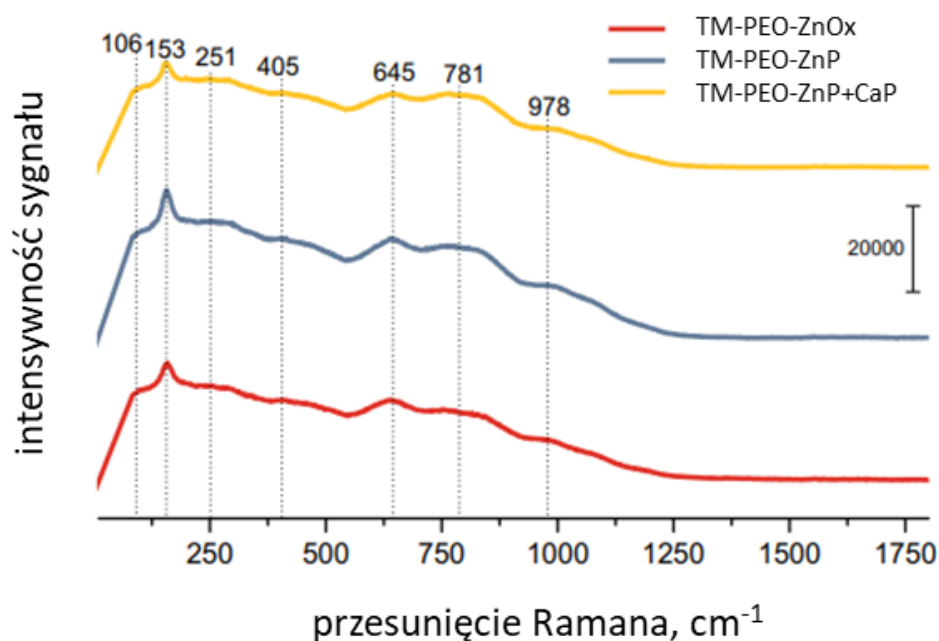


Rysunek 23. Obrazy SEM powierzchni próbek: A – TM-PEO-CuX, B - TM-PEO-CuP oraz C - TM-PEO-CuP+CaP wraz z analizą EDX obrazującą rozmieszczenie poszczególnych pierwiastków na powierzchni porowatej warstwy tlenkowej

Spektroskopia Ramana

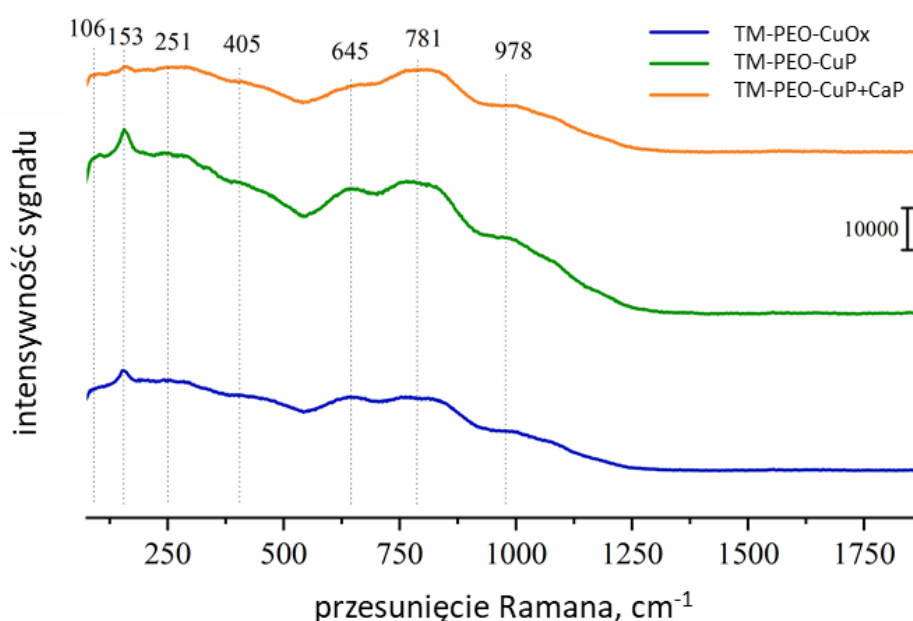
W celu potwierdzenia obecności cynku w badanych warstwach tlenkowych, a także sprecyzowania charakterystyki związków, w postaci których wbudowane zostały pożądane pierwiastki w strukturę warstwy tlenkowej przeprowadzono badania za pomocą spektroskopii Ramana. W wyniku analizy dowiedziono, że w każdym z badanych przypadków charakter uzyskanych związków cynku, miedzi oraz srebra był w znacznym stopniu amorficzny.

Rozpoczynając analizę uzyskanych wyników od powierzchni TM-PEO-ZnO, TM-PEO-ZnP oraz TM-PEO-ZnP+CaP, oscylacyjne widmo Ramana zostało przedstawione na **rys. 24**. Pasma 106 cm^{-1} i 153 cm^{-1} są przypisywane drganiom sieci krystalicznej. Pasma o wartości 251 cm^{-1} może być przypisane symetrycznemu drganiu zginającemu O-Me, co może wskazywać na obecność połączenia O-Zn. Pasma o wartości 978 cm^{-1} jest przypisywane symetrycznemu drganiu rozciągającemu ugrupowania $-\text{PO}_3$, podczas gdy asymetryczne drganie rozciągające tej grupy jest obserwowane przy wartości 781 cm^{-1} . Pasma o wartości 645 cm^{-1} jest przypisywane drganiu zginającemu $-\text{PO}_3$ poza płaszczyznę, a pasmo o wartości 405 cm^{-1} jest przypisywane symetrycznemu drganiu zginającemu $-\text{PO}_3$. Na podstawie tej analizy możliwym jest występowanie grup H_2PO_4^- czy HPO_4^{2-} w warstwie tlenkowej, a szeroki profil spektrów we wszystkich próbkach sugeruje, że są one złożone z fosforanów amorficznych. Ponadto występowanie grup fosforanowych w wierzchniej warstwie tlenkowej wspiera proces adsorpcji grup OH^- na jej powierzchni, co skutkuje w lepszej zwilżalności biomateriału [159], co koresponduje także z uzyskanymi wynikami badań wodnego kąta zwilżania.



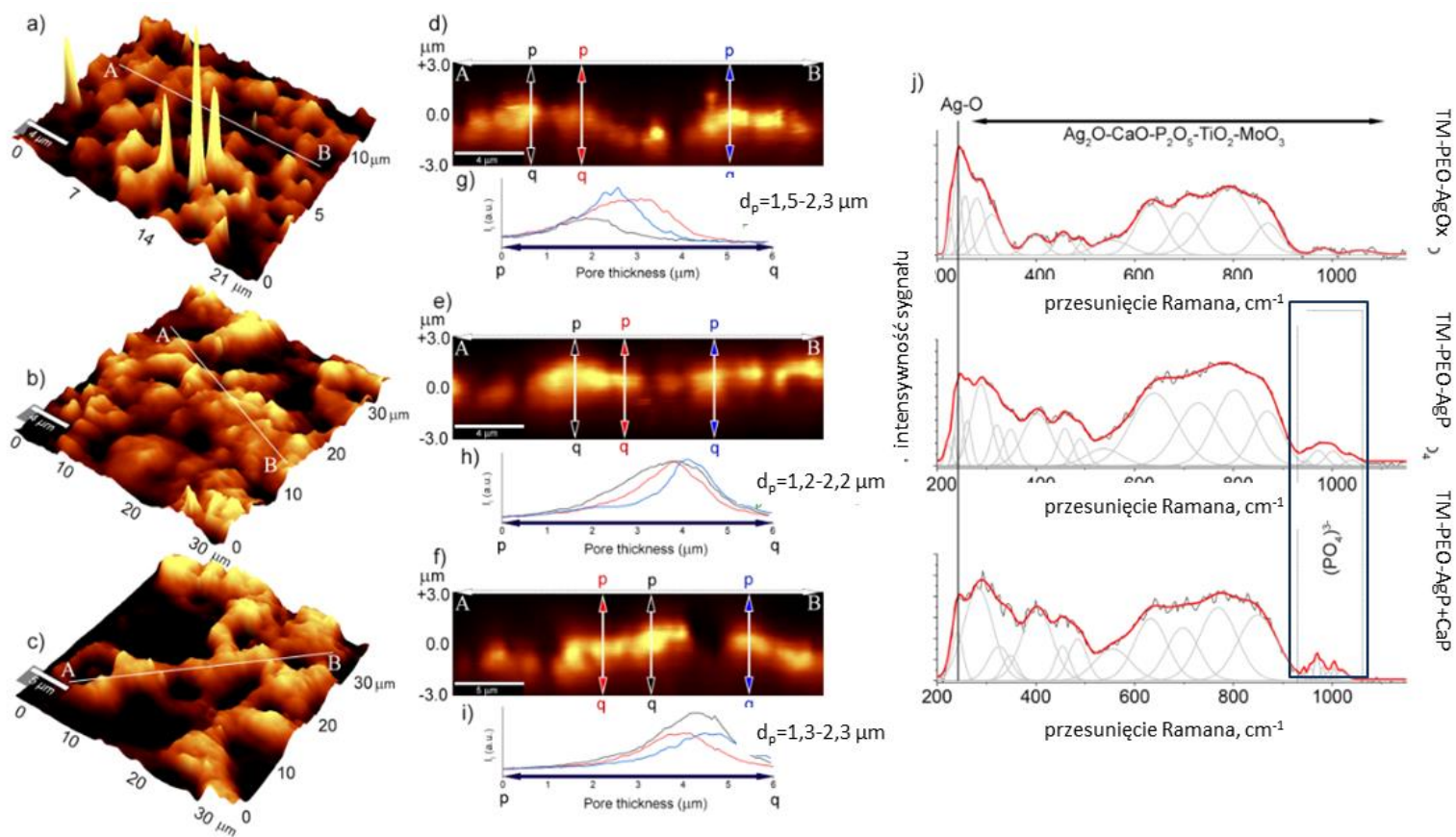
Rysunek 24. Widmo Ramana zarejestrowane dla próbek TM-PEO-ZnO, TM-PEO-ZnP oraz TM-PEO-ZnP+CaP

Na **rys. 25** przedstawiono oscylacyjne widmo Ramana uzyskane podczas analizy próbek wzbogaconych o związki miedzi. Zaobserwowano obecność sygnałów charakterystycznych dla drgań ugrupowań PO_4 oraz O-Me, które dowodzą pomyślnemu wbudowaniu w strukturę warstwy tlenkowej grup fosforanowych oraz atomów metalu połączonych z atomami tlenu. Sygnał przy 978 cm^{-1} jest charakterystyczny dla symetrycznych drgań rozciągających oraz zginających ugrupowań PO_3 . Sygnał przy 645 cm^{-1} świadczy o drganiach zginających poza płaszczyznę ugrupowań PO_4 , natomiast pasmo przy 405 cm^{-1} odpowiada za symetryczne drgania zginające PO_3 . Połączenie O-Cu jest bardzo prawdopodobne poprzez wystąpienie pasma w regionie 251 cm^{-1} , które jest specyficzne dla symetrycznego drgania zginającego wiązania O-Me. Sygnały przy 106 cm^{-1} oraz 153 cm^{-1} są charakterystyczne dla drgań sieci krystalicznej.



Rysunek 25. Widmo Ramana zarejestrowane dla próbek TM-PEO-CuOx, TM-PEO-CuP oraz TM-PEO-CuP+CaP

W znacznie szerszym zakresie zbadano próbki wzbogacone o związki srebra(I), tj.: TM-PEO-AgOx, TM-PEO-AgP oraz TM-PEO-AgP+CaP. Na **rys. 26** przedstawiono integralne mapy intensywności uzyskane w zakresie 300 - 900 cm^{-1} w odniesieniu do powierzchni próbek: **a** oraz **d**: TM-PEO-AgOx, **b** oraz **e**: TM-PEO-AgP, **c** oraz **f**: TM-PEO-AgP+CaP dla pomiarów w kierunku **a-c**: X-, Y- oraz **d-f**: X-, Z-. Linia poprzeczna AB ujawnia skan profilowania głębokościowego wykonanego dla danej próbki. Profil przekroju poprzecznego przez dany por przedstawiono na **rys. 26 g, h** oraz **i**, natomiast linie kolorowe pq (czarna, czerwona, niebieska) odnoszą się do przekrojów w różnych fragmentach profilu w obrębie powierzchni próbek **g**: TM-PEO-AgOx, **h**: TM-PEO-AgP oraz **i**: TM-PEO-AgP+CaP. Na **rys. 26 j** przedstawiono widma ramanowskie wyodrębnione jako średnie ze skanu powierzchni Ti-15Mo.



Rysunek 26. Integralne mapy intensywności uzyskane w zakresie 300 - 900 cm^{-1} w odniesieniu do powierzchni próbek TM-PEO-AgOx, TM-PEO-AgP oraz TM-PEO-AgP+CaP. Dokładny opis rysunku został umieszczony w tekście powyżej

W wyniku obrazowania powierzchni (w kierunku X-,Y-) i integracji zakresu $300 - 900 \text{ cm}^{-1}$ uzyskano profile strukturalne badanych powierzchni (**rys. 26 a-c**). Bardziej szczegółowa analiza ujawniła różny stopień porowatości powierzchni, a same pory charakteryzowały się różnymi rozmiarami średnicy oraz zmiennym kształtem. W przypadku powierzchni próbek TM-PEO-AgOx oraz TM-PEO-AgP+CaP pory były łatwo zauważalne, natomiast powierzchnię TM-PEO-AgP charakteryzowały masywne struktury, a zarysowany kształt porów był znacznie mniej wyrazisty. W niektórych miejscach poszczególnych próbek zaobserwowano znacznie wyższą intensywność sygnału, co odpowiada lokalnemu wzrostowi chropowatości (TM-PEO-AgOx).

Głębokość porów określono, wykonując obrazowanie wgłębne (w kierunku X-, Z-) i integrując jak poprzednio zakres $300 - 900 \text{ cm}^{-1}$ (**rys. 26 d-f**). W próbkach TM-PEO-AgOx i TM-PEO-AgP+CaP rozkład porów okazał się znacząco nieregularny, co wskazuje na stosunkowo dużą chropowatość powierzchni. Kolejną istotną informacją wynikającą z profilowania głębokościowego Ramana jest możliwość oszacowania grubości porów poprzez wykonanie przekrojów głębokościowych pq. Profile te zostały następnie dopasowane przy użyciu funkcji Gaussa, a szerokość w połowie maksimum (FWHM) została przyjęta jako parametr do ilościowego określenia zakresu zmienności grubości porów (**rys. 26 g-i**).

Wszystkie widma (**rys. 26 j**), niezależnie od składu elektrolitów użytych do funkcjonalizacji powierzchni, wskazują na podobny charakter chemiczny oraz strukturalny badanej powierzchni. Charakter głównych pasm z zakresu $300 - 900 \text{ cm}^{-1}$ sugeruje powstawanie strukturalnie nieuporządkowanych lub amorficznych materiałów kompozytowych przypominających szkło fosforowo-wapniowe lub fosforowo-wapniowo-tytanowe (-srebrne). Struktura zmodyfikowanej powierzchni jest silnie uzależniona od dodatków do kąpeli stosowanej podczas PEO. Jony z elektrolitów Ag^+ czy Ca^{2+} i z podłoża modyfikowanego materiału Ti^{4+} oraz Mo^{3+} silnie wpływają na polimeryzację nowo powstałej sieci fosforanowej. Zaobserwowano m.in. symetryczne i asymetryczne rozciągania struktur typu P-O-P. Podobne wyniki zostały uzyskane dla struktur $\text{TiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO}$ [161], szkła $\text{Na}_2\text{O-Al}_2\text{O}_3\text{-TiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ [162] lub innych szkieł fosforanowych domieszkowanych jonami pierwiastków alkalicznych i tytanu [163]. Pozostałe pasma znalezione w okolicach 400 cm^{-1}

przypisano ruchom zginającym O-P-O, natomiast w przedziale $300 - 360 \text{ cm}^{-1}$ ruchom zginającym PO_2 .

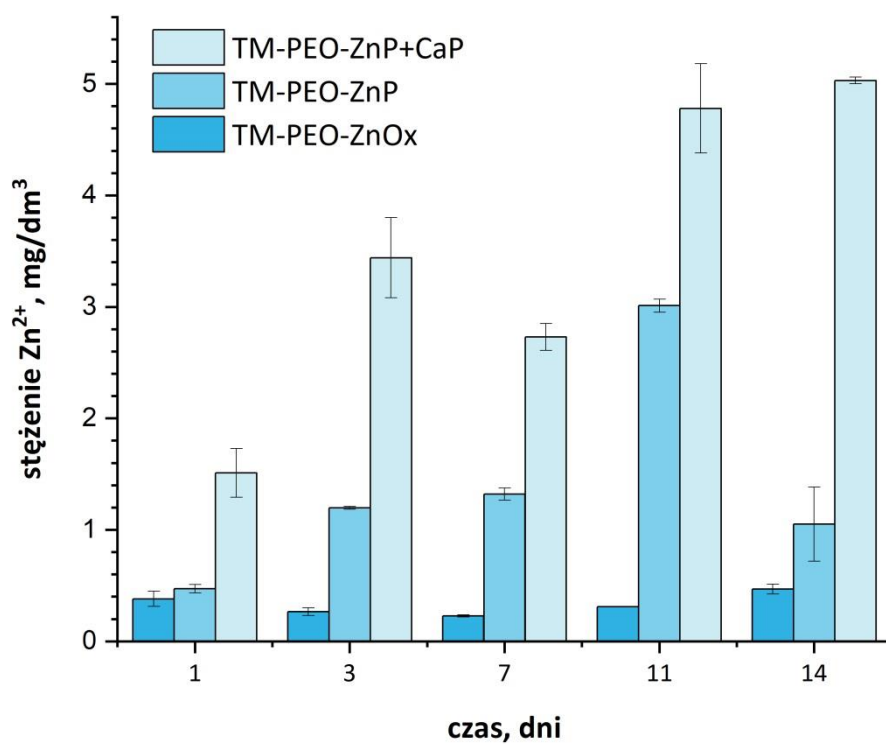
Struktury wszystkich powstałych warstw tlenkowych są amorficzne. Świadczy to o przebiegu procesu PEO. W trakcie powstających wyładowań, cząsteczki znajdujących się w zawiesinie fosforanów oraz tlenków zostały stopione i wbudowane w warstwę tlenkową w amorficznej postaci. Głównym zadaniem inkludowanych związków cynku, miedzi(II) oraz srebra(I) było nadanie powierzchni stopu Ti-15Mo właściwości bakteriostatycznych, na co największy wpływ ma stężenie uwolnionych jonów tych pierwiastków, którego wyniki przeprowadzonej analizy zostały przedstawione poniżej.

Badania z zakresu spektroskopii Ramana próbek stopu Ti-15Mo wzbogaconych o związki srebra wykonano w Instytucie Inżynierii Materiałowej Uniwersytetu Śląskiego.

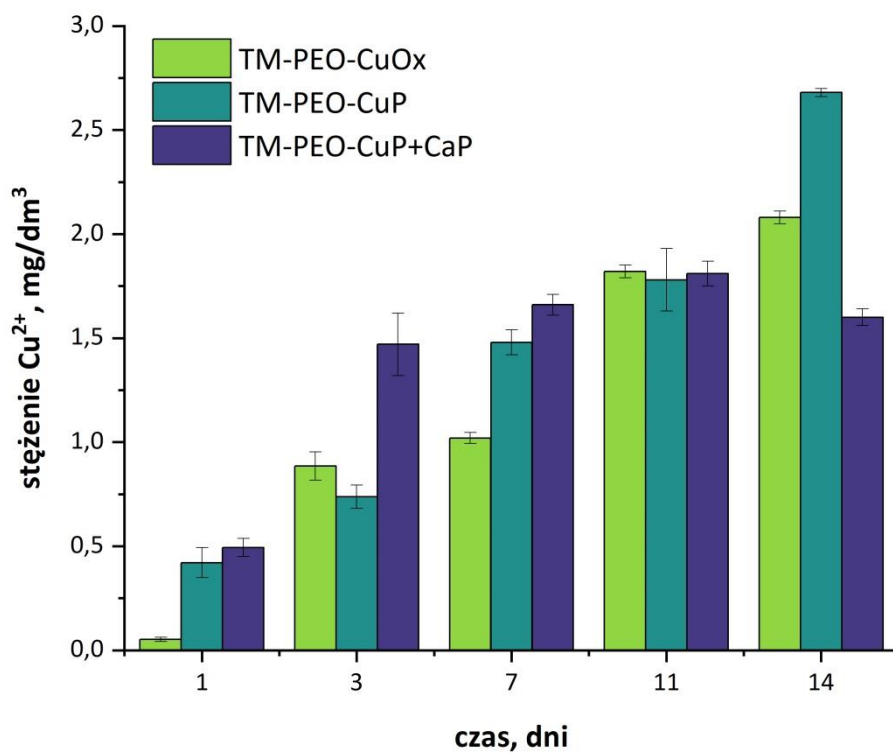
4.5. Długoterminowe badania w roztworze Ringera

Zadaniem związków cynku, miedzi oraz srebra wbudowanych w strukturę warstwy tlenkowej implantu jest zahamowanie adhezji bakterii na jego powierzchni. Umieszczenie biomateriału w środowisku płynów fizjologicznych człowieka skutkuje w jego interakcji z otoczeniem. Korozja tytanu w środowisku płynów ustrojowych jest znikoma, natomiast w różnego rodzaju reakcje wchodzi związki znajdujące się w warstwie wierzchniej implantu, np. związki wapnia, fosforu czy wspomnianych pierwiastków o działaniu bakteriostatycznym, tj. cynku, miedzi i srebra. Mechanizm działania bakteriostatycznego tych pierwiastków jest różnorodny, jednak powiązany nie tylko z występowaniem ich w samej strukturze warstwy tlenkowej (np. w postaci tlenków czy fosforanów), ale także z uwalnianiem ich jonów w bezpośrednie sąsiedztwo powierzchni implantu.

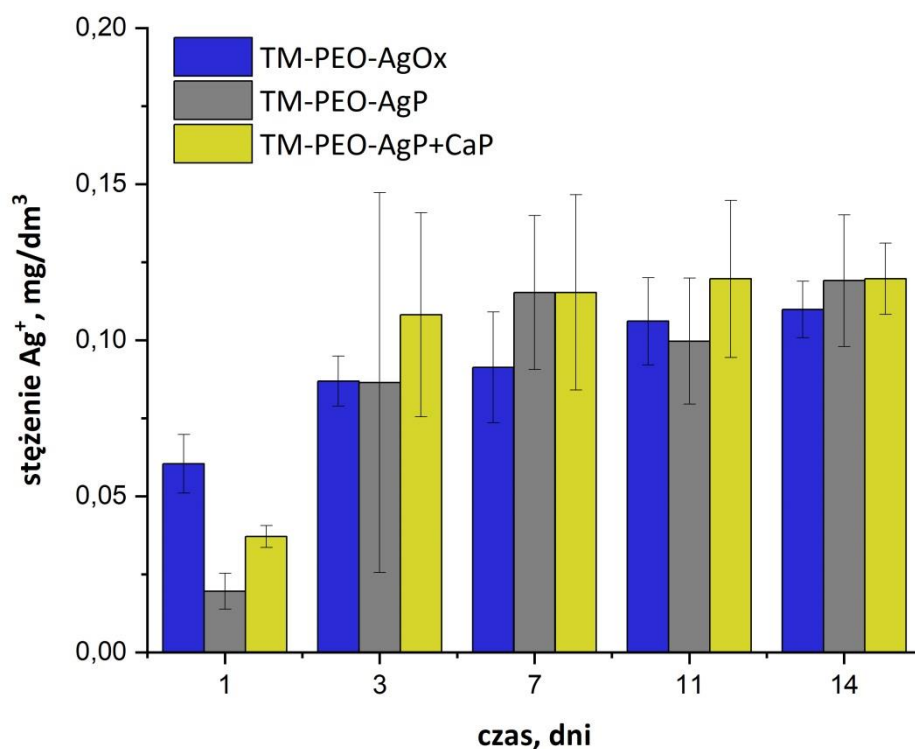
W celu określenia stężenia uwalnianych Zn^{2+} , Cu^{2+} , a także Ag^+ przeprowadzono długoterminowe badania zanurzeniowe modyfikowanych powierzchni stopu Ti-15Mo. Poszczególne stężenia określono po czasie 24 h, 3 dni, 7 dni, 11 dni oraz 14 dni. Wybrano punkty czasowe korespondujące z typowymi punktami czasowymi badań biologicznych *in vitro*. Na **rys. 27-29** zaprezentowano zależność zmian stężenia uwolnionych jonów cynku, miedzi lub srebra od czasu immersji próbki w roztworze, a także od rodzaju próbki.



Rysunek 27. Zależność stężenia uwolnionych jonów Zn²⁺ od czasu immersji w roztworze Ringera dla próbek TM-PEO-ZnOx, TM-PEO-ZnP oraz TM-PEO-ZnP+CaP



Rysunek 28. Zależność stężenia uwolnionych jonów Cu^{2+} od czasu immersji w roztworze Ringera dla próbek TM-PEO-CuOx, TM-PEO-CuP oraz TM-PEO-CuP+CaP



Rysunek 29. Zależność stężenia uwolnionych jonów Ag^+ od czasu immersji w roztworze Ringera dla próbek TM-PEO-AgOx, TM-PEO-AgP oraz TM-PEO-AgP+CaP

Porównując wszystkie trzy wykresy, dostrzec można znaczną różnicę pomiędzy stężeniem uwolnionego cynku, które było największe, następnie miedzi, a najmniejszym uwolnionym stężeniem jonów charakteryzują się warstwy wzbogacone w związki srebra. Największe ilości uwolnionego cynku można odnotować w przypadku próbki TM-PEO-ZnP+CaP zanurzonej na 14 dni w roztworze Ringera – stężenie Zn^{2+} wynosiło $5,03 \pm 0,03 \text{ mg/dm}^3$. Porównując ten wynik z pozostałymi badanymi powierzchniami, można zauważyć bardzo duże różnice pomiędzy rodzajem poszczególnych próbek, ponieważ stężenie jonów Zn^{2+} w roztworze zebrany po 14 dniach immersji próbki TM-PEO-ZnP wynosiło $1,05 \pm 0,11 \text{ mg/dm}^3$, a w przypadku próbki TM-PEO-ZnOx jedynie $0,47 \pm 0,05 \text{ mg/dm}^3$.

Stąd wywnioskować można, że szczególnie duża ilość jonów Zn^{2+} uwolniła się z warstw otrzymanych na drodze PEO w kąpielach zawierających zawiesiny fosforanów cynku i wapnia. Może to być spowodowane mechanizmem wbudowania tlenków/fosforanów w strukturę warstwy tlenkowej podczas procesu PEO lub też ilością wbudowanych związków danego pierwiastka w zależności od źródła ich pochodzenia w kąpeli. Podobną zależność

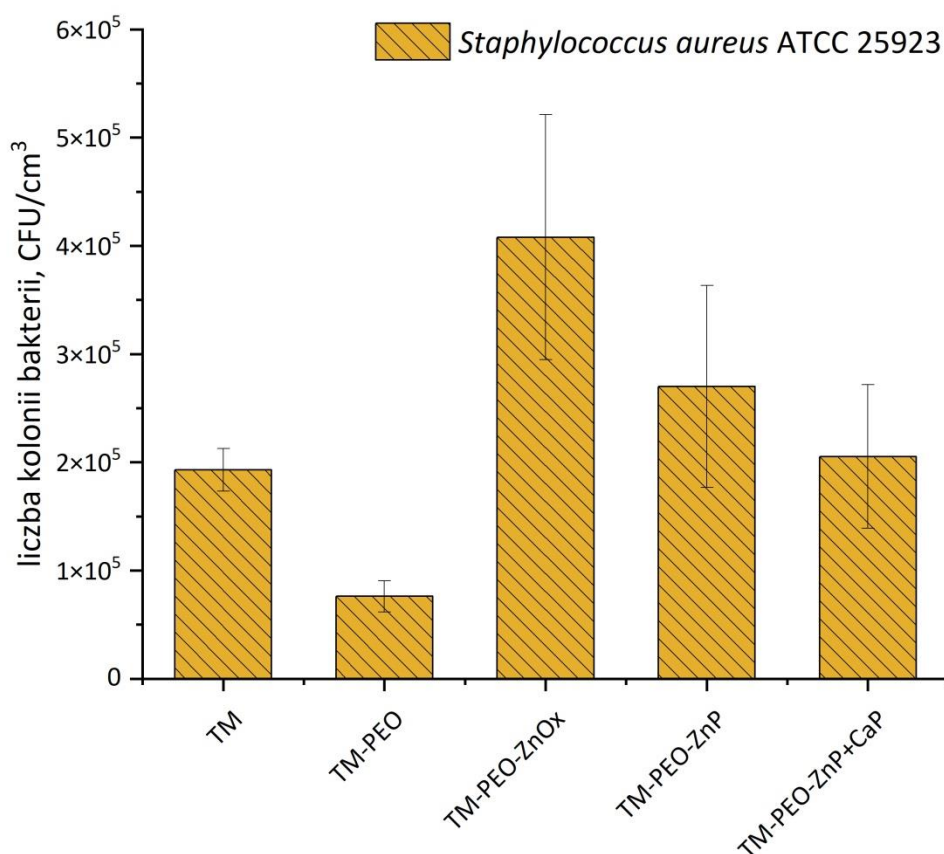
zaobserwowano dla profilu uwalnianych jonów miedzi, gdzie najwyższe stężenie Cu^{2+} wynoszące $2,68 \pm 0,02 \text{ mg/dm}^3$ odnotowano w przypadku 14-dniowej immersji próbki TM-PEO-CuP. W przypadku próbek wzbogaconych o związki miedzi, nie można zaobserwować tak dużej różnicy pomiędzy stężeniem jonów Cu^{2+} oznaczonym w roztworach po immersji próbek TM-PEO-CuP i TM-PEO-CuP+CaP w porównaniu do TM-PEO-CuOx. Diametralną różnicę można było zaobserwować po upływie 24 h immersji, gdzie w przypadku TM-PEO-CuP+CaP stężenie jonów Cu^{2+} wynosiło $0,49 \pm 0,04 \text{ mg/dm}^3$, dla TM-PEO-CuP, odpowiednio $0,42 \pm 0,07 \text{ mg/dm}^3$, natomiast w przypadku próbki TM-PEO-CuOx znacznie mniej, ponieważ tylko $0,05 \pm 0,01 \text{ mg/dm}^3$.

Rozważając wyniki analiz ICP uzyskanych dla roztworów Ringera zebranych po długotrwałym zanurzeniu próbek zawierających związki srebra, zauważyć można, że ilości uwolnionych jonów Ag^+ są znacząco niższe niż w przypadku poprzednich dwóch omawianych przypadków. Stężenie jonów Ag^+ po 14 dniach immersji próbki TM-PEO-AgOx wynosiło $0,11 \pm 0,01 \text{ mg/dm}^3$, w przypadku TM-PEO-AgP było to $0,12 \pm 0,02 \text{ mg/dm}^3$, a dla TM-PEO-AgP+CaP wynosiło $0,12 \pm 0,01 \text{ mg/dm}^3$. Wszystkie trzy badane próbki zawierające srebro były ostatecznie podobne względem oznaczonego stężenia uwolnionych jonów Ag^+ . Może to wiązać się z bardziej równomiernym mechanizmem wbudowywania Ag_2O czy Ag_3PO_4 w powstającą podczas procesu PEO warstwę tlenkową lub też z znacznie mniejszym stopniem reakcji związków srebra znajdujących się w warstwie z otaczającym go roztworem Ringera. Biorąc pod uwagę reaktywność cynku, miedzi i srebra oraz porównując szlachetność wspomnianych pierwiastków, możliwym jest, że związki cynku w znacznie większym stopniu zostaną wyplukane ze struktury implantu i przejdą w formę jonową do roztworu niż ma to miejsce w przypadku związków miedzi czy srebra.

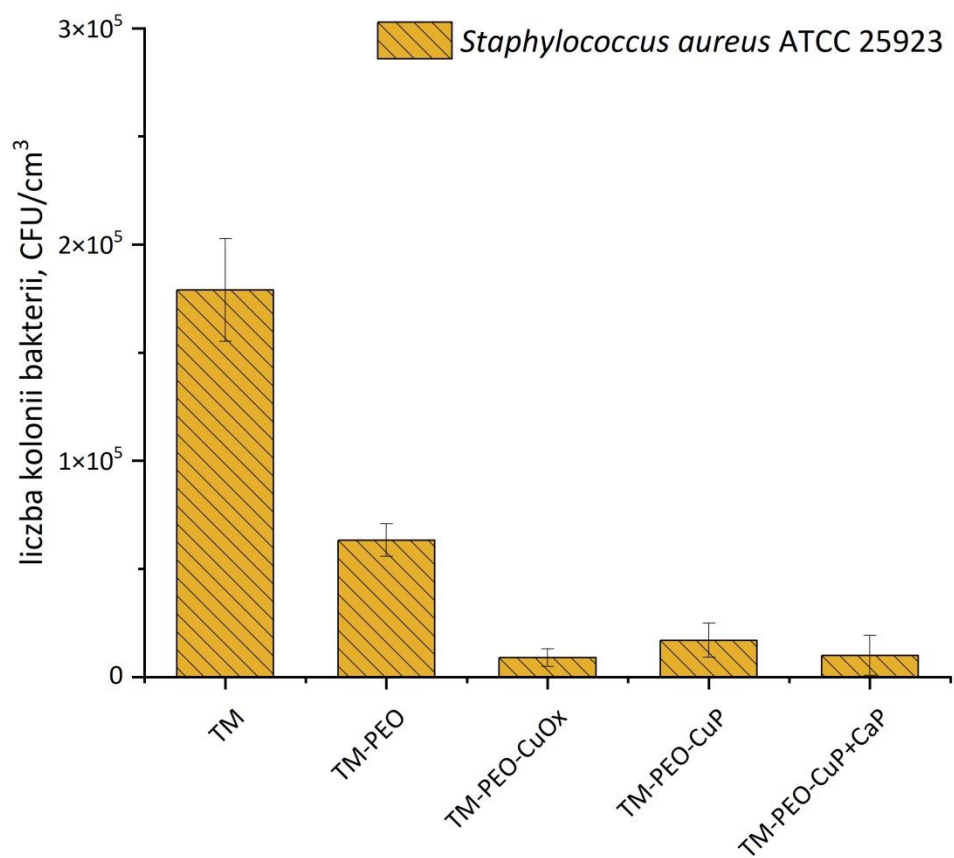
4.6. Właściwości bakteriostatyczne

W celu określenia właściwości bakteriostatycznych otrzymanych powłok tlenkowych przeprowadzono badania mikrobiologiczne z wykorzystaniem dwóch różnych szczepów mikroorganizmów. W ramach eksperymentu zbadano adhezję bakterii *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 oraz *Escherichia coli* ATCC 25922. *S. aureus* stanowi przedstawiciela bakterii Gram-dodatnich, natomiast *E. coli* Gram-ujemnych.

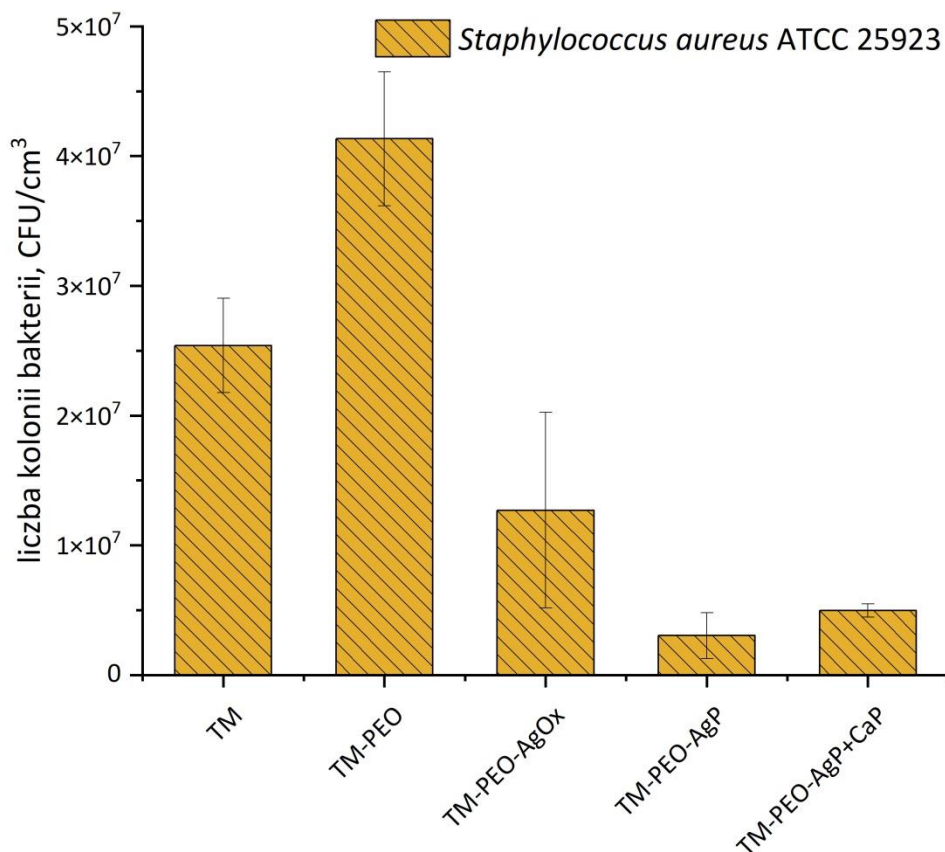
Na **rys. 30-32** przedstawiono wyniki przeprowadzonych badań mikrobiologicznych z wykorzystaniem szczepu *S. aureus* ATCC 25923. Właściwości bakteriostatyczne badanych powierzchni zostały wyrażone jako liczba kolonii mikroorganizmów, które pomyślnie uległy adhezji na badanych powierzchniach po 4 h inkubacji próbek z zawiesinami patogenów o znanym stężeniu.



Rysunek 30. Adhezja bakterii szczepu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 na powierzchni próbek TM, TM-PEO, TM-PEO-ZnOx, TM-PEO-ZnP oraz TM-PEO-ZnP+CaP



Rysunek 31. Adhezja bakterii szczepu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 na powierzchni próbek TM, TM-PEO, TM-PEO-CuOx, TM-PEO-CuP oraz TM-PEO-CuP+CaP



Rysunek 32. Adhezja bakterii szczepu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 na powierzchni próbek TM, TM-PEO, TM-PEO-AgOx, TM-PEO-AgP oraz TM-PEO-AgP+CaP

Na **rys. 30** przedstawiono wyniki badań adhezji bakterii na niemodyfikowanej powierzchni stopu TM oraz powierzchniach po procesie PEO: TM-PEO, TM-PEO-ZnOx, TM-PEO-ZnP i TM-PEO-ZnP+CaP. W przypadku bakterii szczepu *S. aureus* ATCC 25923 zaobserwowano zwiększoną ilość kolonii bakteryjnych przylegających do powierzchni zawierających cynk w porównaniu z powierzchniami będącymi odniesieniem (TM oraz TM-PEO). Z wszystkich powierzchni zmodyfikowanych związkami cynku, TM-PEO-ZnOx charakteryzowała się najniższą liczbą zliczonych bakterii, tj. $4,6 \cdot 10^5$ CFU./cm³.

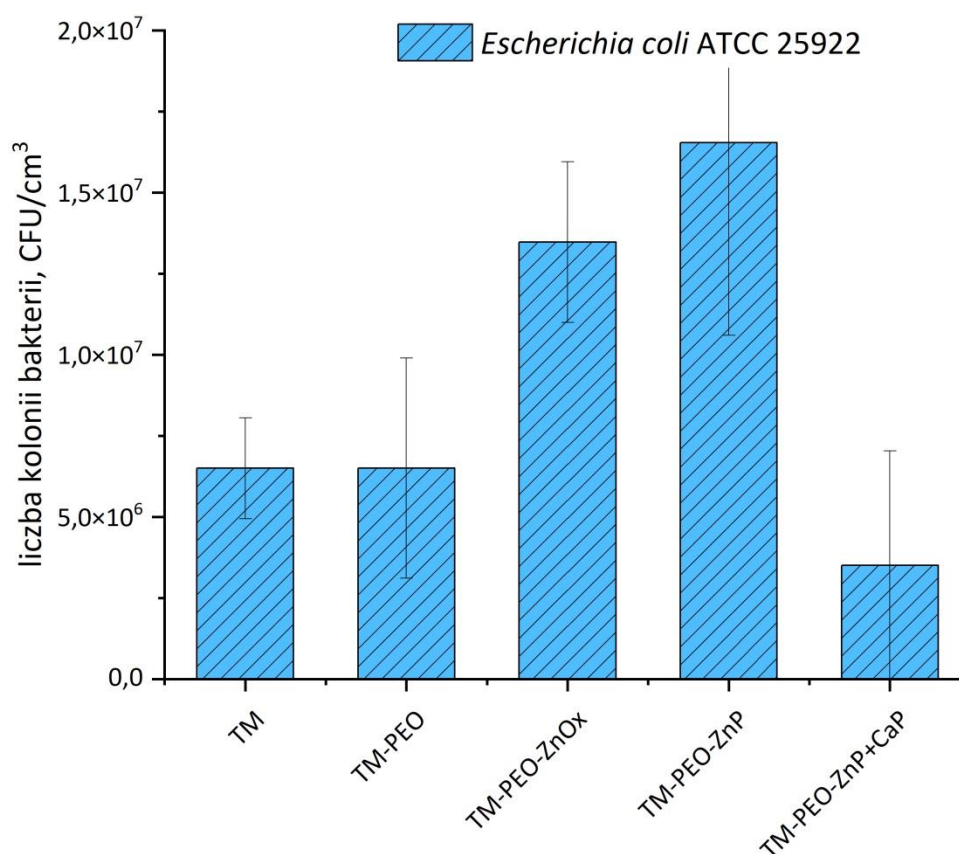
Wyniki takie wskazują na brak bakteriostatycznego oddziaływania związków cynku na organizmy szczepu *S. aureus*. Z danych literaturowych także wywnioskować można, że cynk w porównaniu do miedzi czy srebra wykazuje najłagodniejsze działanie antybakteryjne. Pomimo analogicznego mechanizmu wytwarzania reaktywnych form tlenu, stanowi on najmniej agresywny środek antybakteryjny. Zaletami wprowadzenia w strukturę biomateriału cynku

niewątpliwie jest poprawa biogodności materiału implantacyjnego z środowiskiem tkankowym organizmu. Jest to konsekwencją właściwości, jakie wykazuje cynk. Pierwiastek ten wspiera procesy samo naprawcze organizmu, a także wzmacnia jego odporność, co jest szczególnie istotne podczas osteogenezy. Uwolnione z powierzchni biomateriału jony cynku wspomagają także hemokompatybilność implantu oraz zwiększają żywotność komórek [164].

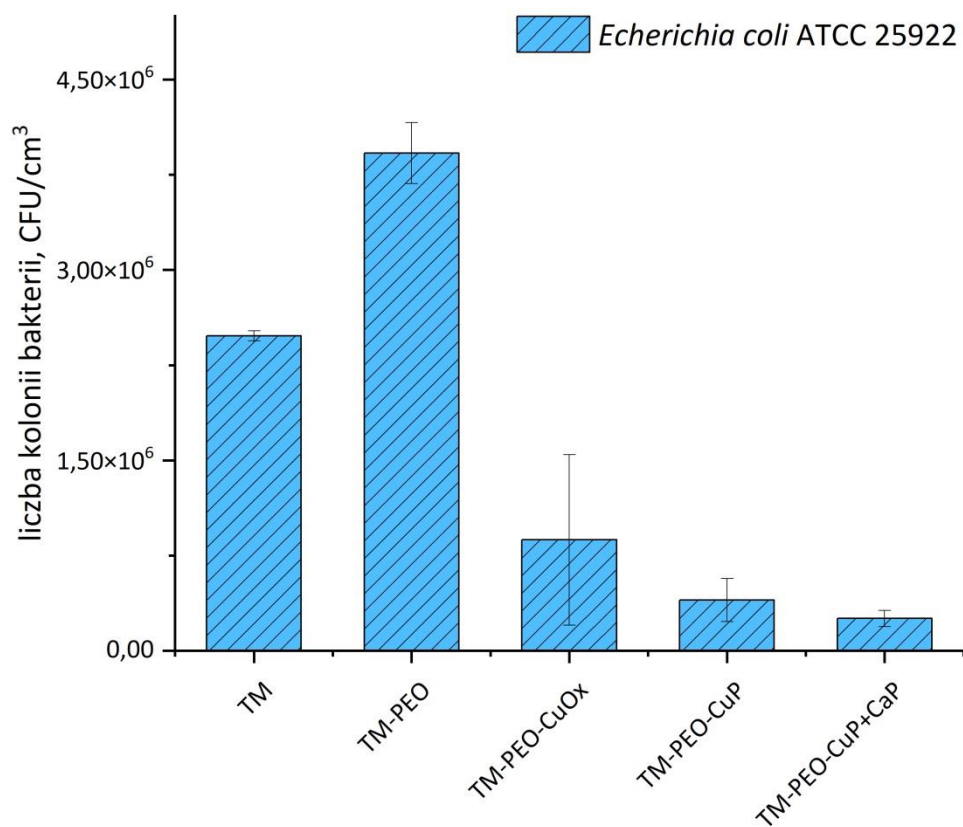
Całkowicie inne wyniki zaobserwowano w przypadku próbek stopu Ti-15Mo wzbogaconych o związki miedzi (**rys. 31**) i srebra (**rys. 32**). W przypadku badań przeprowadzonych na próbkach utlenionych anodowo w zawiesinach związków miedzi (**rys. 31**) wynika, że wszystkie powierzchnie poddane obróbce PEO wykazywały mniejszą adhezję *S. aureus* niż referencyjna powierzchnia Ti-15Mo. Najmniejszą liczbę bakterii zaobserwowano na powierzchni TM-PEO-CuOx, tj. $9,0 \cdot 10^3$ CFU/cm³. Dla porównania, liczba kolonii *S. aureus* zliczonych na referencyjnej wyszlifowanej powierzchni Ti-15Mo wynosiła $1,8 \cdot 10^5$ CFU/cm³. Wynik ten potwierdził pomyślnie wprowadzenie cząstek zawierających związki miedzi do powłoki tlenkowej Ti-15Mo, a także skuteczne działanie antybakteryjne miedzi przeciwko *S. aureus*.

Na podstawie analizy wyników zaprezentowanych na **rys. 32**, również można z łatwością zauważyć pozytywny wpływ na zwiększenie właściwości antybakteryjnych powierzchni biomateriału na skutek obecności w warstwie tlenkowej związków srebra. Choć srebro stanowi najsilniejszy czynnik antybakteryjny spośród trzech rozpatrywanych pierwiastków, nie można stwierdzić, że jego działanie charakteryzuje się dominującą przewagą w porównaniu przykładowo do działania miedzi. Najniższą ilość zliczonych komórek bakterii *S. aureus* zaobserwowano na powierzchni TM-PEO-AgP i wynosiła ona $5,0 \cdot 10^6$ CFU/cm³. Jest to zdecydowanie większa liczba niż $9,0 \cdot 10^3$ CFU/cm³ odnotowana dla próbki TM-PEO-CuOx, jednak należy uwzględnić metodykę prowadzenia badań z wykorzystaniem mikroorganizmów żywych. Badania przeprowadzone na próbkach zawierających cynk, miedź czy srebro były osobnymi eksperymentami i nieprawidłowym byłoby zestawianie ze sobą wszystkich wyników równolegle. To, czemu należy się przyjrzeć i przeprowadzić porównanie, to wyniki otrzymane dla powierzchni odniesienia (TM oraz TM-PEO), kontroli (TSB) oraz dla powierzchni zmodyfikowanych funkcjonalnymi związkami cynku/miedzi/srebra. Rozpatrując wyniki badań adhezji w taki sposób, najważniejszą informacją jest różnica pomiędzy ilością

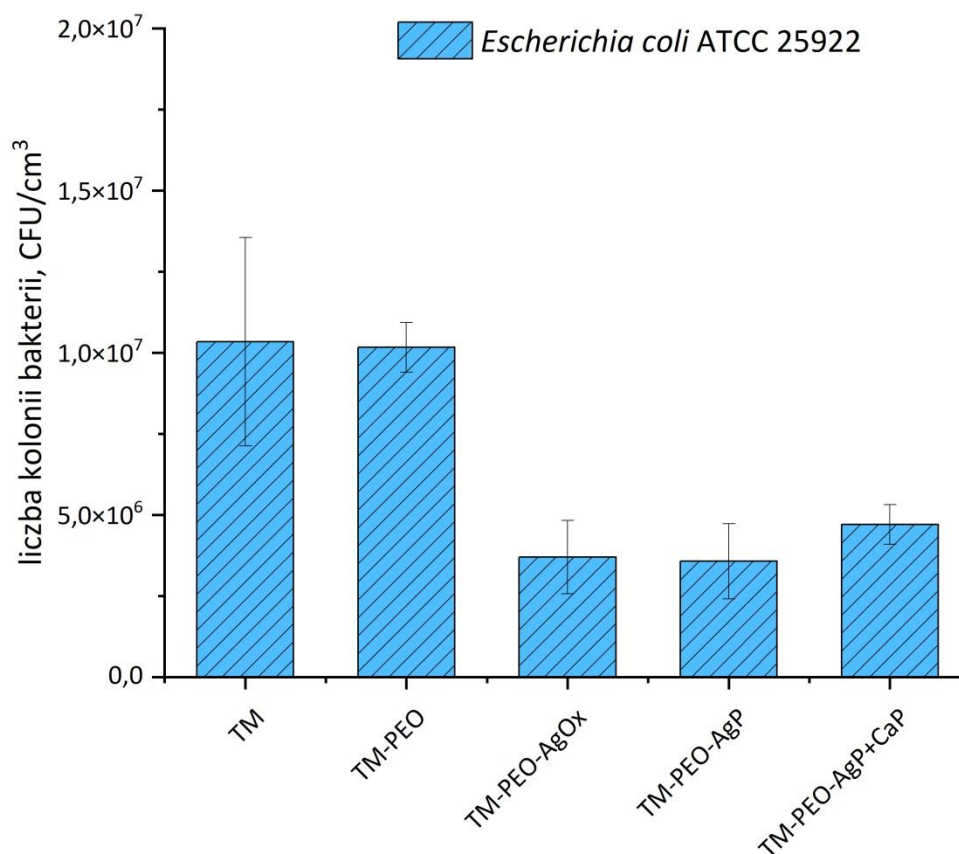
kolonii bakterii *S. aureus* zliczonych na powierzchni TM – $2,5 \cdot 10^7$ CFU/cm³, TM-PEO – $4,1 \cdot 10^7$ CFU/cm³ oraz próbkami zawierającymi związki srebra, spośród których najniższą ilość zaobserwowano w przypadku TM-PEO-AgP – $5,0 \cdot 10^6$ CFU/cm³. W próbce kontrolnej TSB zanotowano $7,0 \cdot 10^8$ CFU/cm³. Dziesięciokrotnie, a nawet stukrotnie mniejsza ilość zaadherowanych i zliczonych kolonii bakteryjnych dowodzi skuteczności srebra w hamowaniu adhezji bakterii na powierzchni biomateriału. Różnice pomiędzy ilością zliczonych kolonii *S. aureus* na analogicznych wyszlifowanych powierzchniach TM w obrębie różnych eksperymentów wynikają ze specyfiki eksperymentów biologicznych i faktu, że badania mikrobiologiczne prowadzone są z wykorzystaniem mikroorganizmów żywych, które namnażają się w bardzo szybkim tempie, dążąc do utworzenia grubego i odpornego biofilmu.



Rysunek 33. Adhezja bakterii szczepu *Escherichia coli* ATCC 25922 na powierzchni próbek TM, TM-PEO, TM-PEO-ZnOx, TM-PEO-ZnP oraz TM-PEO-ZnP+CaP



Rysunek 34. Adhezja bakterii szczepu *Escherichia coli* ATCC 25922 na powierzchni próbek TM, TM-PEO, TM-PEO-CuOx, TM-PEO-CuP oraz TM-PEO-CuP+CaP



Rysunek 35. Adhezja bakterii szczepu *Escherichia coli* ATCC 25922 na powierzchni próbek TM, TM-PEO, TM-PEO-AgOx, TM-PEO-AgP oraz TM-PEO-AgP+CaP.

Podobne wnioski można wyciągnąć z wyników badań przeprowadzonych z użyciem bakterii szczepu *Escherichia coli* ATCC 25922. Wyniki przedstawione na **rys. 33** potwierdzają, że i w tym przypadku powierzchnie zmodyfikowane związkami cynku wykazywały większą skłonność do adherowania komórek *E. coli* oraz do ich późniejszej proliferacji. Jedynie powierzchnia TM-PEO-ZnP+CaP wykazała zbliżoną adhezję w porównaniu do TM i TM-PEO. Liczba zliczonych kolonii bakteryjnych *E. Coli* wynosiła kolejno: $1,4 \cdot 10^7$ CFU/cm³ w przypadku powierzchni TM-PEO-ZnOx, $1,7 \cdot 10^7$ CFU/cm³ dla próbki TM-PEO-ZnP oraz $3,5 \cdot 10^6$ CFU/cm³ dla powierzchni TM-PEO-ZnP+CaP. W próbce kontrolnej TSB zliczono $7,4 \cdot 10^8$ CFU/cm³ kolonii *E. coli*.

Powłoki tlenkowe zawierające związki Cu również wykazały silniejsze właściwości bakteriostatyczne niż niepoddany obróbce powierzchniowej stop Ti-15Mo. Tym razem najmniejszą liczbę kolonii bakteryjnych zaobserwowano na powierzchni

TM-PEO-CuP+CaP, tj. $2,6 \cdot 10^5$ CFU/cm³. Wynik ten był znacząco niższy od liczby kolonii *E. coli* zanotowanej na powierzchni odniesienia Ti-15Mo, tj. $2,5 \cdot 10^6$ CFU/cm³. Zarówno w przypadku adhezji *S. aureus*, jak i *E. coli*, liczba mikroorganizmów zliczona w pożywce TSB stanowiącej próbę kontrolną była znacznie wyższa i wynosiła odpowiednio $1,1 \cdot 10^7$ CFU/cm³ dla *S. aureus* oraz $3,5 \cdot 10^8$ CFU/cm³ dla *E. coli*. Redukcja liczby namnożonych kolonii bakteryjnych o 2-3 rzędy wielkości stanowi znaczną różnicę i powód, dla którego można wnioskować o właściwościach bakteriostatycznych powłok zawierających związki miedzi.

Największe różnice pomiędzy ilością zliczonych kolonii *E. coli* znów odnotowano w przypadku powierzchni wzbogaconych srebrem, co widoczne jest w zestawieniu TM – $1,0 \cdot 10^7$ CFU/cm³ oraz TM-PEO-AgOx – $3,7 \cdot 10^6$ CFU/cm³.

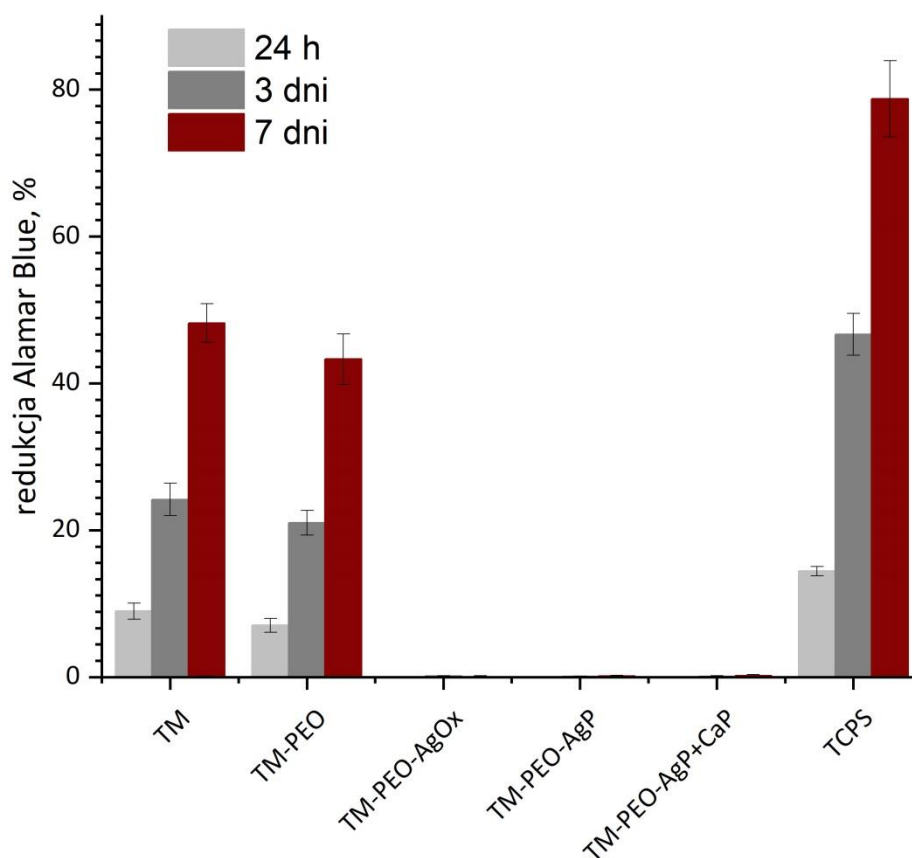
Wyniki adhezji bakteryjnej potwierdziły, że miedź i srebro indukują działanie antybakteryjne zarówno przeciwko Gram-dodatnim, jak i Gram-ujemnym bakteriom, podczas gdy związki cynku wykazały znikome działanie bakteriostatyczne w porównaniu do powierzchni odniesienia. Zarówno Gram-dodatnia bakteria *S. aureus* jak i Gram-ujemna *E. coli* to przykłady powszechnych patogenów związanych z zapaleniem tkanki kostnej. Jak wspomniano wcześniej, badania dotyczące alternatywnych środków przeciwbakteryjnych są niezwykle interesujące ze względu na liczne i trudne wyzwania stojące przed leczeniem bakteryjnych stanów zapalnych oraz narastającą odpornością bakterii na działanie antybiotyków. Podczas procesu implantacji ryzyko infekcji bakteryjnej jest szczególnie wysokie ze względu na zwiększoną podatność organizmu ludzkiego na atak szkodliwych patogenów. Ryzyko to stanowi nieodłączny element związany z zabiegami chirurgicznymi [165,166]. W związku z powyższym, zapobieganie oraz profilaktyka zakażeń bakteryjnych ma kluczowe znaczenie w rozwoju inżynierii biomedycznej ze względu na znaczne niebezpieczeństwo wystąpienia infekcji i przewlekłych stanów chorobowych kości oraz problematyczną antybiotykoterapię.

4.7. Cytokompatybilność

Ostatnimi badaniami przeprowadzonymi w ramach niniejszej pracy doktorskiej były badania cytokompatybilności utworzonych warstw tlenkowych na powierzchni stopu Ti-15Mo. W badaniach zastosowano komórki osteoblastopodobne linii MG-63, których żywotność została określona za pomocą testu metabolicznego redukcji barwnika Alamar Blue.

Wspomniane w poprzednim rozdziale powierzchnie TM-PEO-AgOx, TM-PEO-AgP oraz TM-PEO-AgP+CaP wykazywały najsilniejsze działanie bakteriostatyczne wobec mikroorganizmów szczepów *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 oraz *Escherichia coli* ATCC 25922. Chociaż dodatek srebra skutkuje w korzystnym podwyższeniu właściwości antybakteryjnych powierzchni stopu Ti-15Mo, sytuacja jest diametralnie inna w przypadku proliferacji komórek osteoblastopodobnych linii MG-63. Wykres zilustrowany na **rys. 36** przedstawia żywotność komórek linii MG-63 wyrażoną jako procent redukcji barwnika Alamar Blue po inkubacji 24-godzinnej, 3-dniowej oraz 7-dniowej próbek TM, TM-PEO oraz TM-PEO-AgOx, TM-PEO-AgP i TM-PEO-AgP+CaP.

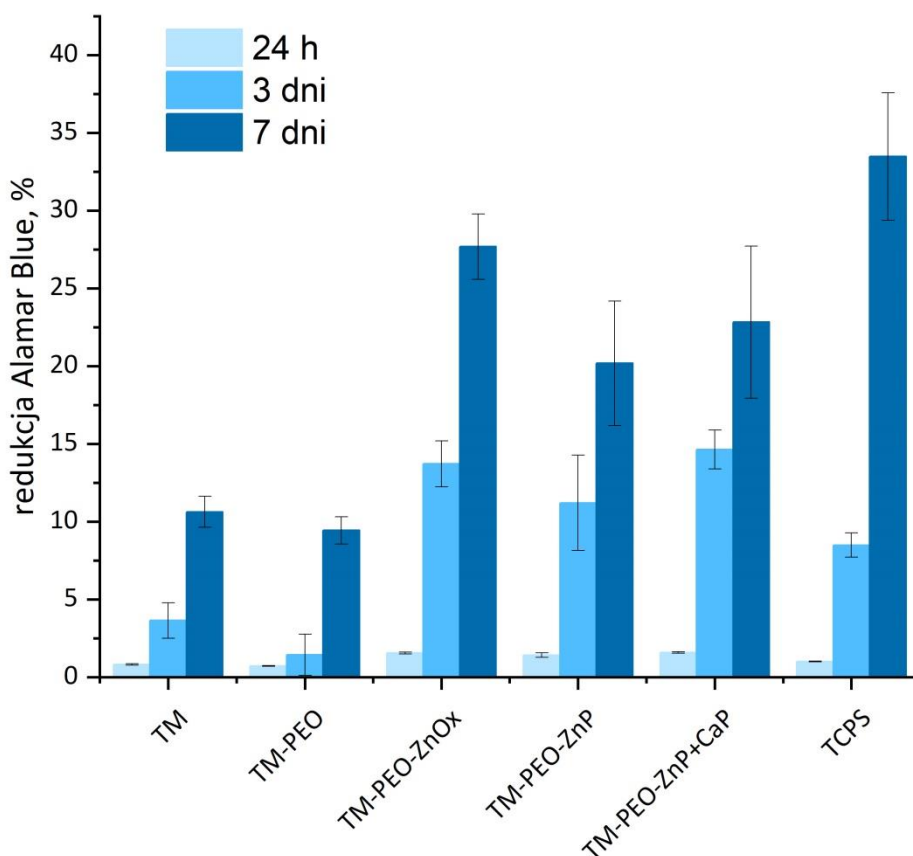
Z łatwością zauważyć można, że dodatek srebra skutkowało w całkowitej inhibicji wzrostu komórek osteoblastopodobnych. Wykres przedstawiony na **rys. 36** wyraźnie obrazuje całkowity brak adhezji komórek żywych linii MG-63 na powierzchniach wzbogaconych o srebro i jego związki. Komórki kościotwórcze nie adherowały do wspomnianych powierzchni ani nie rozwinęły zarówno po 24 h inkubacji, jak i po 3 czy 7 dniach, co świadczy o zbyt silnym cytotoksycznym wpływie srebra oraz jego związków na proliferację komórek żywych [167], w tym przypadku komórek linii MG-63. Przyczyną toksyczności jest oddziaływanie jonów Ag^+ na poszczególne związki organiczne znajdujące się w każdej żywej komórce, m.in. kwasy nukleinowe, enzymy czy inne składniki komórki zawierające siarkę i grupy tiolowe [168,169].



Rysunek 36. Żywotność komórek linii MG-63 na powierzchniach stopu Ti-15Mo zmodyfikowanych związkami srebra. Żywotność wyrażona jako procent redukcji wskaźnika Alamar Blue. Dla każdej badanej grupy p-wartość <0,05

Analizując powierzchnie zawierające w swoim składzie cynk, można zauważyć, że procent redukcji Alamar Blue na powierzchniach TM-PEO-ZnO, TM-PEO-ZnP oraz TM-PEO-ZnP+CaP był dwukrotnie większy niż na powierzchniach odniesienia (TM oraz TM-PEO). Świadczy to o znacznie większej żywotności komórek na powierzchni próbek wzbogaconych o związki cynku. Po 7 dniach inkubacji komórki linii MG-63 wykazały dobrą żywotność oraz proliferację na każdej ze zmodyfikowanej za pomocą procesu PEO powierzchni stopu Ti-15Mo. Najlepszą cytokompatybilnością charakteryzowała się powierzchnia TM-PEO-ZnO, gdzie po 7 dniach inkubacji komórek żywych odnotowano 27,68% redukcji barwnika Alamar Blue. Wynik ten warto porównać z próbką referencyjną (TCPS), gdzie po 7 dniach inkubacji zaobserwowano 33,47% redukcji barwnika – różnica pomiędzy obojgiem pomiarów wynosiła jedynie 5,79%.

Ponadto zarówno powierzchnia TM-PEO-ZnP jak i TM-PEO-ZnP+CaP, charakteryzowała się zwiększoną w stosunku do TM oraz TM-PEO żywotnością komórek osteoblastopodobnych. W przypadku TM-PEO-ZnP barwnik Alamar Blue po 7 dniach uległ redukcji w 20,18%, a dla TM-PEO-ZnP+CaP – 22,82%. Dla porównania, żywotność komórek na powierzchni warstwy tlenkowej niezawierającej związków cynku (TM-PEO) była znacząco niższa – po 7 dniach inkubacji barwnik został zredukowany w zaledwie 9,44%.

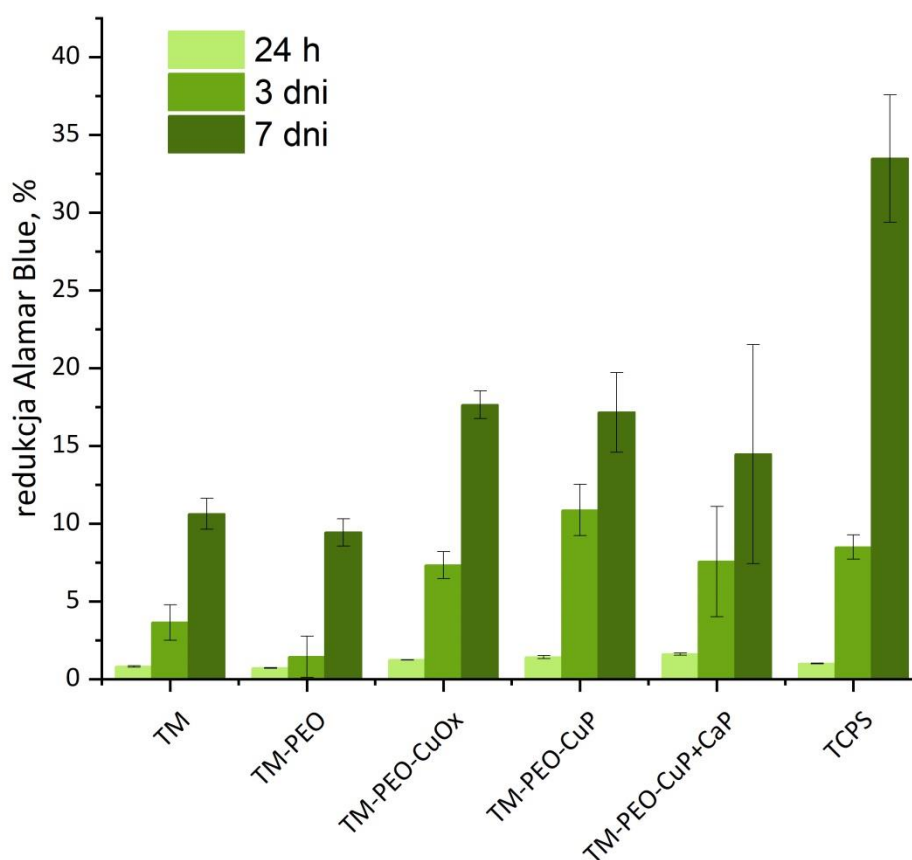


Rysunek 37. Żywotność komórek linii MG-63 na powierzchniach stopu Ti-15Mo zmodyfikowanych związkami cynku. Żywotność wyrażona jako procent redukcji wskaźnika Alamar Blue. Dla każdej badanej grupy p-wartość <0,05

Analogiczne wnioski można spostrzec dla badań przeprowadzonych z udziałem powierzchni wzbogaconych o związki miedzi z tą różnicą, że obecność związków miedzi w warstwach tlenkowych skutkowało w mniejszej cytokompatybilności utworzonych powłok niż w przypadku badanych powierzchni z cynkiem. Najwyższa żywotność komórek linii

MG-63 została zaobserwowana po 7 dniach inkubacji na powierzchni TM-PEO-CuO, gdzie Alamar Blue został zredukowany w 17,64%. Bardzo zbliżonymi wynikami charakteryzowały się pozostałe dwie badane powierzchnie zawierające miedź, tj. TM-PEO-CuP – 17,15% oraz TM-PEO-CuP+CaP – 14,47%. Wyniki te są zgodne z informacjami świadczącymi o korzystnym wpływie miedzi oraz jej związków na procesy kościotwórcze oraz proliferację komórek żywych.

Porównując żywotność komórek linii MG-63 powierzchni wzbogaconych związkami cynku z tymi modyfikowanymi związkami miedzi, zauważyć można, że dodatek cynku znacznie lepiej wpływa na żywotność i proliferację komórek osteoblastopodobnych. Interesująca jest prawdopodobna korelacja pomiędzy większym stężeniem uwolnionych jonów Zn^{2+} niż Cu^{2+} a tak znaczną różnicą w cytokompatybilności omawianych powierzchni. W rozdziale przedstawione wyniki analiz ICP dowodzą, że w tych samych warunkach prowadzenia badań zanurzeniowych stężenie uwolnionych jonów cynku jest nawet dwukrotnie większe niż jonów miedzi uwolnionych z warstwy tlenkowej w tym samym czasie. Biorąc pod uwagę stymulujący wpływ cynku oraz miedzi na adhezję i proliferację komórek żywych czy osteointegrację, większe stężenie uwalnianych jonów cynku może skutkować w relatywnie większej cytokompatybilności badanych powierzchni stopu.



Rysunek 38. Żywotność komórek linii MG-63 na powierzchniach stopu Ti-15Mo zmodyfikowanych związkami miedzi. Żywotność wyrażona jako procent redukcji wskaźnika Alamar Blue. Dla każdej badanej grupy p-wartość <0,05

Uzyskane wyniki badań dowodzą, że obecność w warstwach tlenkowych cynku i miedzi oraz ich związków pozytywnie wpływa na adhezję, rozwój oraz proliferację komórek osteoblastopodobnych linii MG-63. Stanowi to potwierdzenie wspomnianych już w rozdziale 1.7 właściwości związków tych pierwiastków wspomagających procesy kościotwórcze. Całkowicie antagonistyczne właściwości wykazały powłoki wzbogacone w związki srebra. Pomimo bardzo dobrych właściwości antybakteryjnych srebra, jego toksyczne oddziaływanie na żywe komórki było nieselektywne i, w efekcie, również cytotoksyczne. Ciekawą obserwacją jest porównanie właściwości antybakteryjnych z właściwościami cytozgodnymi powłok zawierających cynk lub miedź. Warstwy tlenkowe powstałe w PEO z zastosowaniem zawiesin zawierających cynk charakteryzowały się najlepszą cytokompatybilnością, ale

z drugiej strony ich działanie przeciwbakteryjne było najśłabsze. Natomiast dodatek miedzi spowodował wzrost zarówno właściwości antybakteryjnych (w porównaniu z TM oraz TM-PEO), jak i znacznie lepszą cytokompatybilność. Porównując wpływ wspomnianych trzech rodzajów dodatków na właściwości bakteriostatyczne oraz cytokompatybilne, powłoki tlenkowe wzbogacone o związki miedzi charakteryzują się najlepszymi właściwościami.

Badania cytokompatybilności z wykorzystaniem komórek osteoblastopodobnych linii MG-63 wykonano na Wydziale Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie.

5. Podsumowanie

W ramach niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono szereg badań – od doboru najbardziej korzystnych warunków prądowych podczas plazmowego utleniania elektrochemicznego stopów tytanu, poprzez określenie właściwości fizykochemicznych otrzymanych warstw tlenkowych, aż po zbadanie wpływu wbudowania związków cynku, miedzi oraz srebra na właściwości antybakteryjne i cytokompatybilne. Na podstawie przedstawionych wyników można stwierdzić, że warstwy tlenkowe z dodatkiem wspomnianych pierwiastków stanowią innowacyjny kierunek rozwoju biomateriałów implantacyjnych. Efekty procesu PEO takie jak: zwiększona porowatość, chropowatość i hydrofilowość modyfikowanych powierzchni wspierają ich bioaktywność i zwiększają prawdopodobieństwo prawidłowego oraz relatywnie łatwiejszego przebiegu osteointegracji. Jedną z najważniejszych zalet procesu PEO jest możliwość wprowadzenia wybranych pierwiastków w strukturę powstającej warstwy tlenkowej w celu nadania lub ulepszenia cech takich jak bioaktywność czy właściwości przeciwbakteryjne. Utlenianie anodowe powierzchni stopu Ti-15Mo przy użyciu zawiesin zawierających cynk, miedź lub srebro doprowadziło do powstania warstw tlenkowych o rozwiniętej powierzchni i porowatości. Stanowi to niewątpliwie korzystny efekt przeprowadzonych doświadczeń, ponieważ podobieństwo struktury i powierzchni implantu z tkanką kostną prowadzi do lepszej biointegralności materiału z żywą tkanką twardą.

W wyniku przeprowadzonych badań zauważyć można, że zarówno dodatek związków cynku, miedzi jak i srebra na bazie roztworu 0,1 M $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_2)_2$ skutkuje w powstaniu regularnie porowatych warstw tlenkowych na powierzchni stopów tytanu: Ti-6Al-4V, Ti-15Mo, Ti-13Nb-13Zr oraz Ti-36Nb-3Zr-2Ta. Pierwsze główne różnice pomiędzy powstałymi powłokami można było zaobserwować w stopniu wbudowania się poszczególnych związków cynku, miedzi lub srebra w porowate warstwy tlenkowe. Obecność związków cynku, choć niewidocznych na obrazach SEM, udowodniono zarówno za pomocą spektroskopii Ramana jak i badań zanurzeniowych w roztworze Ringera, gdzie w następnych krokach z pomocą techniki ICP-OES wykazano pomyślne wbudowanie się jonów i związków cynku w strukturę warstw tlenkowych. Warstwy powstałe na powierzchni próbek TM-PEO-ZnOx, TM-PEO-ZnP oraz TM-PEO-ZnP+CaP charakteryzowały się także największą grubością, co wynika

z najmniej agresywnego przebiegu procesu PEO. Łagodniejszy wzrost napięcia podczas powstawania zaporowej warstwy tlenkowej skutkuje w jej stopniowym wzrastaniu i uszczelnianiu, co również zapobiega powstawaniu defektów w jej strukturze. Kolejnym sukcesem, który udało się osiągnąć, to zwiększona cytozgodność warstw wzbogaconych w związki cynku w porównaniu z powłokami zawierającymi związki miedzi czy srebra. Natomiast warstwy zawierające związki cynku silnie wyróżniają się na tle innych badanych pod kątem właściwości bakteriostatycznych oraz bakteriobójczych. Analizując wyniki przeprowadzonych badań mikrobiologicznych, nie zauważa się znaczącego wpływu cynku na proces adhezji czy zahamowania wzrostu komórek bakterii *Staphylococcus aureus* 25923 oraz *Escherichia coli* 25922.

Odmienne mechanizmy można zaobserwować w przypadku warstw tlenkowych wzbogaconych związkami srebra. Choć dodatek srebra do kąpieli anodowej i obecność jego związków w zmodyfikowanych powierzchniach stopu Ti-15Mo poskutkowało w przejawieniu właściwości antybakteryjnych, jednocześnie spowodowało to całkowite zahamowanie wzrostu komórek osteoblastopodobnych linii MG-63. Silne działanie srebra charakteryzujące się skuteczną apoptozą komórek bakteryjnych wykazuje również działanie cytotoksyczne, co obniża atrakcyjność związków srebra jako dodatek do implantów kostnych. Z innej perspektywy można spojrzeć na stopy Ti-15Mo modyfikowane związkami miedzi, które wykazały zarówno dobre właściwości fizykochemiczne, skuteczne działanie przeciwbakteryjne wobec bakterii Gram-dodatnich *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 jak i *Escherichia coli* ATCC 25922. Ponadto próbki wzbogacone związkami miedzi zaprezentowały również właściwości sprzyjające rozwojowi i proliferacji komórek osteoblastopodobnych linii MG-63. Podobnie jak w przypadku cynku, miedź także wykazuje właściwości bioaktywne, proliferacyjne i wspomagające wzrost tkanek żywych, co potwierdzają przeprowadzone badania. Jednak w odróżnieniu od cynku, obecność miedzi w porowatych warstwach tlenkowych na powierzchni stopu Ti-15Mo wpływa znacznie silniej na zahamowanie adhezji bakterii, co jest kluczowym aspektem podczas pierwszych chwil i dni procesu implantacji.

Interesującym kierunkiem rozwoju przedstawionych badań może być plazmowe utlenianie elektrochemiczne powierzchni stopów tytanu w zawiesinach będących mieszaninami zarówno pierwiastków o działaniu bioaktywnym (wapń, fosfor, krzem), jak i tych o właściwościach antybakteryjnych. Wartym zbadania może być połączenie związków

cynku, które wykazały dobre właściwości cytokompatybilne ze związkami srebra, które wykazują najsilniejsze działanie przeciwbakteryjne. W niniejszej pracy powłoki tlenkowe wzbogacone w związki srebra nie wykazały najlepszych właściwości bakteriostatycznych, przykładowo porównując je ze związkami miedzi, choć wiadomym jest, że srebro jest najskuteczniejszym środkiem antybakteryjnym. Stąd istotnym jest zbadanie szerszego spektrum związków srebra, jak również przeanalizowanie przebiegu procesu PEO w kąpielach zawierających związki srebra. Podczas badań przeprowadzonych w ramach pracy powierzchnia stopu Ti-15Mo najtrudniej ulegała plazmowemu utlenianiu w zawiesinach zawierających srebro. W roztworach z zawieszonymi cząstkami związków srebra odnotowano największą wartość oporu elektrycznego, a same kąpiele wykazywały relatywnie krótszy czas przydatności do użycia niż kąpiele zawierające cynk czy miedź. Istotnym przełomem mogłoby być dokładne zbadanie mechanizmu jonizacji i wbudowywania srebra w strukturę powłok tlenkowych na drodze procesu PEO.

6. Literatura

- [1] S. Kalsi, J. Singh, S.S. Sehgal, N.K. Sharma, Biomaterials for tissue engineered bone Scaffolds: A review, *Mater. Today Proc.* (2021). <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2021.04.273>.
- [2] A. Wubneh, E. Tsekoura, C. Ayranci, H. Uludağ, Current State of Fabrication Technologies and Materials for Bone Tissue Engineering, *Acta Biomater.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.031>.
- [3] R.P. Verma, Titanium based biomaterial for bone implants: A mini review, *Mater. Today Proc.* 26 (2020) 3148–3151. <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2020.02.649>.
- [4] A. Sharma, J.N. Waddell, K.C. Li, L. A Sharma, D.J. Prior, W.J. Duncan, Is titanium–zirconium alloy a better alternative to pure titanium for oral implant? Composition, mechanical properties, and microstructure analysis, *Saudi Dent. J.* (2020). <https://doi.org/10.1016/J.SDENTJ.2020.08.009>.
- [5] J. Josse, F. Velard, S.C. Gangloff, Staphylococcus aureus vs. Osteoblast: Relationship and Consequences in Osteomyelitis, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 0 (2015) 85. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2015.00085>.
- [6] J. Marciniak, *Biomateriały w stomatologii*, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice, 2008.
- [7] T. Padrão, C.C. Coelho, P. Costa, N. Alegrete, F.J. Monteiro, S.R. Sousa, Combining local antibiotic delivery with heparinized nanohydroxyapatite/collagen bone substitute: A novel strategy for osteomyelitis treatment, *Mater. Sci. Eng. C.* 119 (2021) 111329. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2020.111329>.
- [8] K. LW, W. JC, W. Y, Evolution of implantable and insertable drug delivery systems, *J. Control. Release.* 181 (2014) 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2014.02.006>.
- [9] S. Ghosh, S. Ghosh, P.C. Sil, Role of nanostructures in improvising oral medicine, *Toxicol. Reports.* 6 (2019) 358–368. <https://doi.org/10.1016/J.TOXREP.2019.04.004>.

- [10] L. Wang, X. Guo, J. Chen, Z. Zhen, B. Cao, W. Wan, Y. Dou, H. Pan, F. Xu, Z. Zhang, J. Wang, D. Li, Q. Guo, Q. Jiang, Y. Du, J. Yu, B.C. Heng, Q. Han, Z. Ge, Key considerations on the development of biodegradable biomaterials for clinical translation of medical devices: With cartilage repair products as an example, *Bioact. Mater.* (2021). <https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2021.07.031>.
- [11] X. Yu, X. Tang, S. V. Gohil, C.T. Laurencin, *Biomaterials for Bone Regenerative Engineering*, *Adv. Healthc. Mater.* 4 (2015) 1268–1285. <https://doi.org/10.1002/ADHM.201400760>.
- [12] L. Wang, G.H. Nancollas, Calcium Orthophosphates: Crystallization and Dissolution, *Chem. Rev.* 108 (2008) 4628–4669. <https://doi.org/10.1021/CR0782574>.
- [13] L.L. Hench, J.M. Polak, Third-generation biomedical materials, *Science* (80-). 295 (2002). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1067404>.
- [14] S. Jackson Irudhayam, V. Hariram, Dental implant biomaterials, design and importance of FEA – A brief review, *Mater. Today Proc.* (2021). <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2021.02.205>.
- [15] R. Pugliese, B. Beltrami, S. Regondi, C. Lunetta, Polymeric biomaterials for 3D printing in medicine: An overview, *Ann. 3D Print. Med.* 2 (2021) 100011. <https://doi.org/10.1016/J.STLM.2021.100011>.
- [16] S. Jin, X. Xia, J. Huang, C. Yuan, Y. Zuo, Y. Li, J. Li, Recent advances in PLGA-based biomaterials for bone tissue regeneration, *Acta Biomater.* 127 (2021) 56–79. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2021.03.067>.
- [17] J. Gosk, M. Urban, K. Ratajczak, R. Wiącek, R. Rutowski, Zastosowanie syntetycznych polimerów ulegających biodegradacji w rekonstrukcjach nerwów obwodowych, (n.d.).
- [18] B. M, E.-A. SF, A. M, L. CT, Structural and human cellular assessment of a novel microsphere-based tissue engineered scaffold for bone repair, *Biomaterials.* 24 (2003) 597–609. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00374-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00374-5).
- [19] F. He, Y. Tian, X. Fang, Y. Xu, J. Ye, Porous calcium phosphate composite bioceramic beads, *Ceram. Int.* 44 (2018) 13430–13433. <https://doi.org/10.1016/J.CERAMINT.2018.04.109>.

- [20] D. Shekhawat, A. Singh, M.K. Banerjee, T. Singh, A. Patnaik, Bioceramic composites for orthopaedic applications: A comprehensive review of mechanical, biological, and microstructural properties, *Ceram. Int.* 47 (2021) 3013–3030. <https://doi.org/10.1016/J.CERAMINT.2020.09.214>.
- [21] B. Świczko-Żurek, *Biomateriały*, Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk, 2009.
- [22] S. Pina, R.L. Reis, J.M. Oliveira, Ceramic biomaterials for tissue engineering, *Fundam. Biomater. Ceram.* (2018) 95–116. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102203-0.00004-4>.
- [23] F. Chen, Y.R. Wu, J.M. Wu, H. Zhu, S. Chen, S. Bin Hua, Z.X. He, C.Y. Liu, J. Xiao, Y.S. Shi, Preparation and characterization of ZrO₂-Al₂O₃ bioceramics by stereolithography technology for dental restorations, *Addit. Manuf.* 44 (2021) 102055. <https://doi.org/10.1016/J.ADDMA.2021.102055>.
- [24] H. Wang, S. Zhu, L. Wang, Y. Feng, X. Ma, S. Guan, Formation mechanism of Ca-deficient hydroxyapatite coating on Mg–Zn–Ca alloy for orthopaedic implant, *Appl. Surf. Sci.* 307 (2014) 92–100. <https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2014.03.172>.
- [25] R.Z. LeGeros, J.P. LeGeros, Calcium Phosphate Bioceramics: Past, Present and Future, *Key Eng. Mater.* 240–242 (2003) 3–10. <https://doi.org/10.4028/WWW.SCIENTIFIC.NET/KEM.240-242.3>.
- [26] L.L. Hench, Bioactive Glasses and Glass-Ceramics, *Mater. Sci. Forum.* 293 (1999) 37–64. <https://doi.org/10.4028/WWW.SCIENTIFIC.NET/MSF.293.37>.
- [27] Y. Su, C. Luo, Z. Zhang, H. Hermawan, D. Zhu, J. Huang, Y. Liang, G. Li, L. Ren, Bioinspired surface functionalization of metallic biomaterials, (2017). <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.08.035>.
- [28] M. Niinomi, M. Nakai, J. Hieda, Development of new metallic alloys for biomedical applications, *Acta Biomater.* 8 (2012) 3888–3903. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2012.06.037>.
- [29] M. Kaur, K. Singh, Review on titanium and titanium based alloys as biomaterials for orthopaedic applications, *Mater. Sci. Eng. C.* 102 (2019) 844–862. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.04.064>.
- [30] Y. Bai, Y. Deng, Y. Zheng, Y. Li, R. Zhang, Y. Lv, Q. Zhao, S. Wei, Characterization, corrosion behavior, cellular response and in vivo bone tissue compatibility of

- titanium–niobium alloy with low Young’s modulus, *Mater. Sci. Eng. C*. 59 (2016) 565–576. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2015.10.062>.
- [31] T. Maity, Balci, C. Gammer, E. Ivanov, J. Eckert, K.G. Prashanth, High pressure torsion induced lowering of Young’s modulus in high strength TNZT alloy for bio-implant applications, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 108 (2020) 103839. <https://doi.org/10.1016/J.JMBBM.2020.103839>.
- [32] S. Prasad, M. Ehrensberger, M.P. Gibson, H. Kim, E.A. Monaco, Biomaterial properties of titanium in dentistry, *J. Oral Biosci.* 57 (2015) 192–199. <https://doi.org/10.1016/J.JOB.2015.08.001>.
- [33] M. Pourbaix, *Atlas of Electrochemical Equilibria in Aqueous Solutions*, Second Eng, National Association of Corrossion Engineers, Houston, Texas, USA, 1974.
- [34] J. Quinn, R. McFadden, C.W. Chan, L. Carson, Titanium for Orthopedic Applications: An Overview of Surface Modification to Improve Biocompatibility and Prevent Bacterial Biofilm Formation, *IScience*. 23 (2020) 101745. <https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2020.101745>.
- [35] N.S. Allen, N. Mahdjoub, V. Vishnyakov, P.J. Kelly, R.J. Kriek, The effect of crystalline phase (anatase, brookite and rutile) and size on the photocatalytic activity of calcined polymorphic titanium dioxide (TiO₂), *Polym. Degrad. Stab.* 150 (2018) 31–36. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMDEGRADSTAB.2018.02.008>.
- [36] M. Mohamad, B.U. Haq, R. Ahmed, A. Shaari, N. Ali, R. Hussain, A density functional study of structural, electronic and optical properties of titanium dioxide: Characterization of rutile, anatase and brookite polymorphs, *Mater. Sci. Semicond. Process.* 31 (2015) 405–414. <https://doi.org/10.1016/J.MSSP.2014.12.027>.
- [37] G.X. Tang, R.J. Zhang, Y.N. Yan, Z.X. Zhu, Preparation of porous anatase titania film, *Mater. Lett.* 58 (2004) 1857–1860. <https://doi.org/10.1016/J.MATLET.2003.11.016>.
- [38] A. Krzakała, A. Kazek-Kęsik, W. Simka, Application of plasma electrolytic oxidation to bioactive surface formation on titanium and its alloys, *RSC Adv.* 3 (2013) 19725–19743. <https://doi.org/10.1039/c3ra43465f>.
- [39] K. Gupta, R.F. Laubscher, Sustainable machining of titanium alloys: A critical review:, <https://doi.org/10.1177/0954405416634278>. 231 (2016) 2543–2560. <https://doi.org/10.1177/0954405416634278>.

- [40] C.N. Elias, D.J. Fernandes, C.R.S. Resende, J. Roestel, Mechanical properties, surface morphology and stability of a modified commercially pure high strength titanium alloy for dental implants, *Dent. Mater.* 31 (2015) e1–e13. <https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2014.10.002>.
- [41] A. Krzakała, A. Kazek-Kęsik, W. Simka, Application of plasma electrolytic oxidation to bioactive surface formation on titanium and its alloys, *RSC Adv.* 3 (2013) 19725–19743. <https://doi.org/10.1039/c3ra43465f>.
- [42] H. Krawiec, V. Vignal, J. Loch, P. Erasmus-Vignal, Influence of plastic deformation on the microstructure and corrosion behaviour of Ti–10Mo–4Zr and Ti–6Al–4V alloys in the Ringer’s solution at 37°C, *Corros. Sci. C* (2015) 160–170. <https://doi.org/10.1016/J.CORSCI.2015.04.006>.
- [43] D. Teker, F. Muhaffel, M. Menekse, N.G. Karaguler, M. Baydogan, H. Cimenoglu, Characteristics of multi-layer coating formed on commercially pure titanium for biomedical applications, *Mater. Sci. Eng. C.* 48 (2015) 579–585. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2014.12.058>.
- [44] T. Lai, J.L. Xu, X. Cao, L.Z. Bao, J.M. Luo, Y.Z. Huang, Bioactive CaTiO₃ film prepared on the biomedical porous Ti–15Mo alloy by one-step hydrothermal treatment, *J. Mater. Res. Technol.* 14 (2021) 202–209. <https://doi.org/10.1016/J.JMRT.2021.06.065>.
- [45] M.F. López, J.A. Jiménez, A. Gutiérrez, Corrosion study of surface-modified vanadium-free titanium alloys, *Electrochim. Acta.* 48 (2003) 1395–1401. [https://doi.org/10.1016/S0013-4686\(03\)00006-9](https://doi.org/10.1016/S0013-4686(03)00006-9).
- [46] K. Leśniak-Ziółkowska, A. Kazek-Kęsik, K. Rokosz, S. Raaen, A. Stolarczyk, M. Krok-Borkowicz, E. Pamuła, M. Gołda-Cępa, M. Brzychczy-Włoch, W. Simka, Electrochemical modification of the Ti-15Mo alloy surface in solutions containing ZnO and Zn₃(PO₄)₂ particles, *Mater. Sci. Eng. C.* 115 (2020) 111098. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111098>.
- [47] M. FELLAH, N. HEZIL, D. LEILA, M. ABDUL SAMAD, R. DJELLABI, S. KOSMAN, A. MONTAGNE, A. IOST, A. OBROSOV, S. WEISS, Effect of sintering temperature on structure and tribological properties of nanostructured Ti–15Mo alloy for biomedical applications, *Trans. Nonferrous Met. Soc. China.* 29 (2019) 2310–2320. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(19\)65137-X](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(19)65137-X).

- [48] X. Zhao, M. Niinomi, M. Nakai, J. Hieda, Beta type Ti–Mo alloys with changeable Young’s modulus for spinal fixation applications, *Acta Biomater.* 8 (2012) 1990–1997. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2012.02.004>.
- [49] P. Sochacka, A. Miklaszewski, M. Jurczyk, Development of β -type Ti-x at. % Mo alloys by mechanical alloying and powder metallurgy: Phase evolution and mechanical properties ($10 \leq x \leq 35$), *J. Alloys Compd.* 776 (2019) 370–378. <https://doi.org/10.1016/J.JALLCOM.2018.10.217>.
- [50] P.A.B. Kuroda, M.A.R. Buzalaf, C.R. Grandini, D.R.N. Correa, W.F. Zambuzzi, M.L. Lourenço, C.J.C. Fernandes, Development of Ti-15Zr-Mo alloys for applying as implantable biomedical devices, *J. Alloys Compd.* 749 (2018) 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2018.03.308>.
- [51] A. Panigrahi, M. Bönisch, T. Waitz, E. Schafner, M. Calin, J. Eckert, W. Skrotzki, M. Zehetbauer, Phase transformations and mechanical properties of biocompatible Ti–16.1Nb processed by severe plastic deformation, *J. Alloys Compd.* 628 (2015) 434–441. <https://doi.org/10.1016/J.JALLCOM.2014.12.159>.
- [52] N.T.C. Oliveira, A.C. Guastaldi, Electrochemical stability and corrosion resistance of Ti–Mo alloys for biomedical applications, *Acta Biomater.* 5 (2009) 399–405. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.07.010>.
- [53] E.D. Gonzalez, N.K. Fukumasu, C.R.M. Afonso, P.A.P. Nascente, Impact of Zr content on the nanostructure, mechanical, and tribological behaviors of β -Ti-Nb-Zr ternary alloy coatings, *Thin Solid Films.* 721 (2021) 138565. <https://doi.org/10.1016/J.TSF.2021.138565>.
- [54] P. Kumar, G.S. Mahobia, S. Mandal, V. Singh, K. Chattopadhyay, Enhanced corrosion resistance of the surface modified Ti-13Nb-13Zr alloy by ultrasonic shot peening, *Corros. Sci.* 189 (2021) 109597. <https://doi.org/10.1016/J.CORSCI.2021.109597>.
- [55] I. Cvijović-Alagić, Z. Cvijović, J. Bajat, M. Rakin, Composition and processing effects on the electrochemical characteristics of biomedical titanium alloys, *Corros. Sci.* 83 (2014) 245–254. <https://doi.org/10.1016/J.CORSCI.2014.02.017>.
- [56] K. Ozaltın, A. Panigrahi, W. Chrominski, A.G. Bulutsuz, M. Kulczyk, M.J. Zehetbauer, M. Lewandowska, Microstructure and Texture Evolutions of Biomedical Ti-13Nb-13Zr Alloy Processed by Hydrostatic Extrusion, *Metall. Mater. Trans. A* 2017 4811. 48

- (2017) 5747–5755. <https://doi.org/10.1007/S11661-017-4278-4>.
- [57] B.D. Ratner, T.A. Horbett, Evaluation of Blood–Materials Interactions, *Biomater. Sci. An Introd. to Mater.* Third Ed. (2013) 617–634. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00055-3>.
- [58] M. Geetha, A.K. Singh, A.K. Gogia, R. Asokamani, Effect of thermomechanical processing on evolution of various phases in Ti–Nb–Zr alloys, *J. Alloys Compd.* 384 (2004) 131–144. <https://doi.org/10.1016/J.JALLCOM.2004.04.113>.
- [59] J. Michalska, M. Sowa, M. Piotrowska, M. Widziółek, G. Tylko, G. Dercz, R.P. Socha, A.M. Osyczka, W. Simka, Incorporation of Ca ions into anodic oxide coatings on the Ti-13Nb-13Zr alloy by plasma electrolytic oxidation, *Mater. Sci. Eng. C.* 104 (2019) 109957. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.109957>.
- [60] M. Semlitsch, H. Weber, R. Steger, 15 Jahre Erfahrung mit Ti-6Al-7Nb-Legierung für Gelenkprothesen - Fifteen Years of Experience with a Ti-6Al-7Nb Alloy for Joint Replacements, 40 (1995) 347–355. <https://doi.org/10.1515/BMTE.1995.40.12.347>.
- [61] M. Fellah, M. Labaiz, O. Assala, L. Dekhil, A. Taleb, H. Rezag, A. Iost, Tribological behavior of Ti-6Al-4V and Ti-6Al-7Nb Alloys for Total Hip Prosthesis, *Adv. Tribol.* 2014 (2014). <https://doi.org/10.1155/2014/451387>.
- [62] A. Kajzer, O. Grzeszczuk, W. Kajzer, K. Nowińska, M. Kaczmarek, M. Tarnowski, T. Wierzchoń, Properties of Ti-6Al-7Nb titanium alloy nitrocarburized under glow discharge conditions, *Acta Bioeng. Biomech. Orig. Pap.* 19 (2017). <https://doi.org/10.5277/ABB-00892-2017-03>.
- [63] X. Liu, P.K. Chu, C. Ding, Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications, *Mater. Sci. Eng. R Reports.* 47 (2004) 49–121. <https://doi.org/10.1016/J.MSER.2004.11.001>.
- [64] M. Sowa, M. Parafiniuk, C.M.S. Mouzêlo, A. Kazek-Kęsik, I.S. Zhidkov, A.I. Kukharenko, S.O. Cholakh, E.Z. Kurmaev, W. Simka, DC plasma electrolytic oxidation treatment of gum metal for dental implants, *Electrochim. Acta.* 302 (2019) 10–20. <https://doi.org/10.1016/J.ELECTACTA.2019.02.024>.

- [65] K.M. Golasiński, R. Detsch, M. Szklarska, B. Łosiewicz, M. Zubko, S. Mackiewicz, E.A. Pieczyńska, A.R. Boccaccini, Evaluation of mechanical properties, in vitro corrosion resistance and biocompatibility of Gum Metal in the context of implant applications, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 115 (2021) 104289. <https://doi.org/10.1016/J.JMBBM.2020.104289>.
- [66] M.S. Zafar, I. Farooq, M. Awais, S. Najeeb, Z. Khurshid, S. Zohaib, Bioactive Surface Coatings for Enhancing Osseointegration of Dental Implants, *Biomed. Ther. Clin. Appl. Bioact. Glas.* (2019) 313–329. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102196-5.00011-2>.
- [67] A.R. Rafieerad, M.R. Ashra, R. Mahmoodian, A.R. Bushroa, Surface characterization and corrosion behavior of calcium phosphate-base composite layer on titanium and its alloys via plasma electrolytic oxidation: A review paper, *Mater. Sci. Eng. C* 57 (2015) 397–413. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2015.07.058>.
- [68] X. Zhang, Y. Wu, Y. Lv, Y. Yu, Z. Dong, Formation mechanism, corrosion behaviour and biological property of hydroxyapatite/TiO₂ coatings fabricated by plasma electrolytic oxidation, *Surf. Coatings Technol.* 386 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2020.125483>.
- [69] Y.C. Chai, A. Carlier, J. Bolander, S.J. Roberts, L. Geris, J. Schrooten, H. Van Oosterwyck, F.P. Luyten, Current views on calcium phosphate osteogenicity and the translation into effective bone regeneration strategies, *Acta Biomater.* 8 (2012) 3876–3887. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.07.002>.
- [70] P. Habibovic, J.E. Barralet, Bioinorganics and biomaterials: Bone repair, *Acta Biomater.* 7 (2011) 3013–3026. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.03.027>.
- [71] J. Jeong, J.H. Kim, J.H. Shim, N.S. Hwang, C.Y. Heo, Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration, *Biomater. Res.* 23 (2019) 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0149-3>.
- [72] B. An, Z. Li, X. Diao, H. Xin, Q. Zhang, X. Jia, Y. Wu, K. Li, Y. Guo, In vitro and in vivo studies of ultrafine-grain Ti as dental implant material processed by ECAP, *Mater. Sci. Eng. C* 67 (2016) 34–41. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2016.04.105>.
- [73] Y. Zhang, S.E. Chen, J. Shao, J.J.J.P. Van Den Beucken, Combinatorial Surface Roughness Effects on Osteoclastogenesis and Osteogenesis, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 10 (2018) 36652–36663.

- https://doi.org/10.1021/ACSAMI.8B10992/SUPPL_FILE/AM8B10992_SI_001.PDF.
- [74] W. Khang, S. Feldman, C.E. Hawley, J. Gunsolley, A Multi-Center Study Comparing Dual Acid-Etched and Machined-Surfaced Implants in Various Bone Qualities, *J. Periodontol.* 72 (2001) 1384–1390. <https://doi.org/10.1902/JOP.2001.72.10.1384>.
- [75] A.B. Faia-Torres, S. Guimond-Lischer, M. Rottmar, M. Charnley, T. Goren, K. Maniura-Weber, N.D. Spencer, R.L. Reis, M. Textor, N.M. Neves, Differential regulation of osteogenic differentiation of stem cells on surface roughness gradients, *Biomaterials.* 35 (2014) 9023–9032. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2014.07.015>.
- [76] A. Krzakała, A. Kazek-Kęsik, W. Simka, Application of plasma electrolytic oxidation to bioactive surface formation on titanium and its alloys, *RSC Adv.* 3 (2013) 19725–19743. <https://doi.org/10.1039/c3ra43465f>.
- [77] M. Aliofkhazraei, D.D. Macdonald, E. Matykina, E. V. Parfenov, V.S. Egorkin, J.A. Curran, S.C. Troughton, S.L. Sinebryukhov, S. V. Gnednikov, T. Lampke, F. Simchen, H.F. Nabavi, Review of plasma electrolytic oxidation of titanium substrates: Mechanism, properties, applications and limitations, *Appl. Surf. Sci. Adv.* 5 (2021) 100121. <https://doi.org/10.1016/J.APSADV.2021.100121>.
- [78] A.L. Yerokhin, X. Nie, A. Leyland, A. Matthews, S.J. Dowey, Plasma electrolysis for surface engineering, *Surf. Coatings Technol.* 122 (1999) 73–93. [https://doi.org/10.1016/S0257-8972\(99\)00441-7](https://doi.org/10.1016/S0257-8972(99)00441-7).
- [79] R.O. Hussein, X. Nie, D.O. Northwood, A. Yerokhin, A. Matthews, Spectroscopic study of electrolytic plasma and discharging behaviour during the plasma electrolytic oxidation (PEO) process, *J. Phys. D. Appl. Phys.* 43 (2010) 105203. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/43/10/105203>.
- [80] Y. Han, S.H. Hong, K.W. Xu, Porous nanocrystalline titania films by plasma electrolytic oxidation, *Surf. Coatings Technol.* 154 (2002) 314–318. [https://doi.org/10.1016/S0257-8972\(02\)00036-1](https://doi.org/10.1016/S0257-8972(02)00036-1).
- [81] P. Kern, O. Zinger, Purified titanium oxide with novel morphologies upon spark anodization of Ti alloys in mixed H₂SO₄/H₃PO₄ electrolytes, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 80A (2007) 283–296. <https://doi.org/10.1002/JBM.A.30921>.

- [82] V.S. Rudnev, M.A. Medkov, I. V. Lukiyanchuk, N.I. Steblevskaya, K.N. Kilin, M. V. Belobeletskaya, Ta-containing coatings formed on titanium and stainless steel by plasma electrolytic oxidation and/or extraction pyrolysis, *Surf. Coatings Technol.* 258 (2014) 1232–1238. <https://doi.org/10.1016/J.SURFCOAT.2014.06.057>.
- [83] W. Ping, W. Ting, P. Hao, G.X. Yang, Effect of NaAlO₂ concentrations on the properties of micro-arc oxidation coatings on pure titanium, *Mater. Lett.* 170 (2016) 171–174. <https://doi.org/10.1016/J.MATLET.2016.02.024>.
- [84] M. Kaseem, H.C. Choe, Simultaneous improvement of corrosion resistance and bioactivity of a titanium alloy via wet and dry plasma treatments, *J. Alloys Compd.* 851 (2021) 156840. <https://doi.org/10.1016/J.JALLCOM.2020.156840>.
- [85] B. Roh, D.D. Macdonald, Passivity of titanium: part II, the defect structure of the anodic oxide film, *J. Solid State Electrochem.* 2019 237. 23 (2019) 1967–1979. <https://doi.org/10.1007/S10008-019-04254-0>.
- [86] S.A. Adeleke, S. Ramesh, A.R. Bushroa, Y.C. Ching, I. Sopyan, M.A. Maleque, S. Krishnasamy, H. Chandran, H. Misran, U. Sutharsini, The properties of hydroxyapatite ceramic coatings produced by plasma electrolytic oxidation, *Ceram. Int.* 44 (2018) 1802–1811. <https://doi.org/10.1016/J.CERAMINT.2017.10.114>.
- [87] D. Guldiren, S. Aydın, Antimicrobial property of silver, silver-zinc and silver-copper incorporated soda lime glass prepared by ion exchange, *Mater. Sci. Eng. C.* 78 (2017) 826–832. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2017.04.134>.
- [88] M.E. Olson, A.R. Horswill, Staphylococcus aureus Osteomyelitis: Bad to the Bone, *Cell Host Microbe.* 13 (2013) 629–631. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2013.05.015>.
- [89] Y. Li, L. Liu, P. Wan, Z. Zhai, Z. Mao, Z. Ouyang, D. Yu, Q. Sun, L. Tan, L. Ren, Z. Zhu, Y. Hao, X. Qu, K. Yang, K. Dai, Biodegradable Mg-Cu alloy implants with antibacterial activity for the treatment of osteomyelitis: In vitro and in vivo evaluations, *Biomaterials.* 106 (2016) 250–263. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2016.08.031>.
- [90] F.C. da Silva, P.L. Fernandes Rodrigues, T. Santos Dantas Araújo, M. Sousa Santos, J.M. de Oliveira, L. Pereira Rosa, G.P. de Oliveira Santos, B.P. de Araújo, V.S. Bagnato, Fluorescence spectroscopy of Candida albicans biofilms in bone cavities treated with photodynamic therapy using blue LED (450 nm) and curcumin, *Photodiagnosis*

- Photodyn. Ther. 26 (2019) 366–370. <https://doi.org/10.1016/J.PDPDT.2019.05.002>.
- [91] W.-H. Song, H.S. Ryu, S.-H. Hong, Antibacterial properties of Ag (or Pt)-containing calcium phosphate coatings formed by micro-arc oxidation, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 88A (2009) 246–254. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31877>.
- [92] C. Saint-Pastou Terrier, P. Gasque, Bone responses in health and infectious diseases: A focus on osteoblasts, *J. Infect.* 75 (2017) 281–292. <https://doi.org/10.1016/J.JINF.2017.07.007>.
- [93] S. Ferraris, S. Spriano, Antibacterial titanium surfaces for medical implants, *Mater. Sci. Eng. C*. 61 (2016) 965–978. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2015.12.062>.
- [94] C.R. Arciola, D. Campoccia, P. Speziale, L. Montanaro, J.W. Costerton, Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials, *Biomaterials*. 33 (2012) 5967–5982. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2012.05.031>.
- [95] J. Josse, C. Guillaume, C. Bour, F. Lemaire, C. Mongaret, F. Draux, F. Velard, S.C. Gangloff, Impact of the Maturation of Human Primary Bone-Forming Cells on Their Behavior in Acute or Persistent Staphylococcus aureus Infection Models, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6 (2016) 64. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2016.00064>.
- [96] G. Virella, *Mikrobiologia i choroby zakaźne*, (2000) 62–64.
- [97] W.F. Oliveira, P.M.S. Silva, R.C.S. Silva, G.M.M. Silva, G. Machado, L.C.B.B. Coelho, M.T.S. Correia, Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis infections on implants, *J. Hosp. Infect.* 98 (2018) 111–117. <https://doi.org/10.1016/J.JHIN.2017.11.008>.
- [98] J.J. Aguilera-Correa, M. Gisbert-Garzarán, A. Mediero, R.A. Carias-Cálix, C. Jiménez-Jiménez, J. Esteban, M. Vallet-Regí, Arabic gum plus colistin coated moxifloxacin-loaded nanoparticles for the treatment of bone infection caused by Escherichia coli, *Acta Biomater.* 137 (2022) 218–237. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2021.10.014>.
- [99] W.C. Reygaert, *Antimicrobial Mechanisms of Escherichia coli*, Michigan, 2017. <https://doi.org/10.5772/63146>.
- [100] A. Hamzaoui, R. Salem, M. Koubaa, M. Zrig, H. Mnif, A. Abid, M. Golli, S. Mahjoub, Escherichia coli osteomyelitis of the ischium in an adult, *Orthop. Traumatol. Surg. Res.* 95 (2009) 636–638. <https://doi.org/10.1016/J.OTSR.2009.09.010>.

- [101] S.B. Shin, Y.J. Choi, J. Lee, B.G. Kwak, Y.H. Kim, K.S. Ha, J.H. Kang, Emphysematous Osteomyelitis due to *Escherichia coli*, *Infect. Chemother.* 49 (2017) 151. <https://doi.org/10.3947/IC.2017.49.2.151>.
- [102] Y. Farrokhi, B. Al-shibli, D.F.J. Al-hameedawi, Z. Neshati, A. Makhdoumi, *Escherichia coli* enhances the virulence factors of *Candida albicans*, the cause of vulvovaginal candidiasis, in a dual bacterial/fungal biofilm, *Res. Microbiol.* 172 (2021) 103849. <https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2021.103849>.
- [103] T. Luu, G. Reid, B. Lavery, *Escherichia coli* associated hematogenous sternoclavicular joint osteomyelitis: A rare condition with a rare causative pathogen, *IDCases.* 27 (2022) e01381. <https://doi.org/10.1016/J.IDCR.2022.E01381>.
- [104] F.C. da Silva, P.L. Fernandes Rodrigues, T. Santos Dantas Araújo, M. Sousa Santos, J.M. de Oliveira, L. Pereira Rosa, G.P. de Oliveira Santos, B.P. de Araújo, V.S. Bagnato, Fluorescence spectroscopy of *Candida albicans* biofilms in bone cavities treated with photodynamic therapy using blue LED (450 nm) and curcumin, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 26 (2019) 366–370. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.05.002>.
- [105] J.B. Epstein, A. Ransier, R. Lunn, E. Chin, J.J. Jacobson, N. Le, D. Reece, Prophylaxis of candidiasis in patients with leukemia and bone marrow transplants, *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology.* 81 (1996) 291–296. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(96\)80328-3](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(96)80328-3).
- [106] H. Hato, K. Ichiro Sakata, J. Sato, A. Hasebe, Y. Yamazaki, Y. Kitagawa, Factor associated with oral candidiasis caused by co-infection of *Candida albicans* and *Candida glabrata*: A retrospective study, *J. Dent. Sci.* (2021). <https://doi.org/10.1016/J.JDS.2021.10.020>.
- [107] S.Y. Lu, Oral Candidosis: Pathophysiology and Best Practice for Diagnosis, Classification, and Successful Management, *J. Fungi* 2021, Vol. 7, Page 555. 7 (2021) 555. <https://doi.org/10.3390/JOF7070555>.
- [108] S. Patil, R.S. Rao, B. Majumdar, S. Anil, Clinical appearance of oral *Candida* infection and therapeutic strategies, *Front. Microbiol.* 6 (2015) 1391. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.01391/BIBTEX>.
- [109] M. Schlund, G. Raoul, J. Ferri, R. Nicot, Mandibular Osteomyelitis Following Implant Placement, *J. Oral Maxillofac. Surg.* 75 (2017) 2560.e1-2560.e7.

- <https://doi.org/10.1016/J.JOMS.2017.07.169>.
- [110] H.S. Shin, B.C. Kim, H.J. Lim, S.Y. Jo, J. Lee, Chronic osteomyelitis induced by the placement of dental implants on cemento-osseous dysplasia, *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 57 (2019) 268–270. <https://doi.org/10.1016/J.BJOMS.2019.01.014>.
- [111] H. Hu, W. Zhang, Y. Qiao, X. Jiang, X. Liu, C. Ding, Antibacterial activity and increased bone marrow stem cell functions of Zn-incorporated TiO₂ coatings on titanium, *Acta Biomater.* 8 (2012) 904–915. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2011.09.031>.
- [112] M.A. Kohanski, D.J. Dwyer, J.J. Collins, How antibiotics kill bacteria: from targets to networks, *Nat. Rev. Microbiol.* 2010 86. 8 (2010) 423–435. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2333>.
- [113] Amoxicillin Dosage Guide + Max Dose, Adjustments - Drugs.com, (n.d.). <https://www.drugs.com/dosage/amoxicillin.html> (accessed March 8, 2022).
- [114] S. Ghosh, S. Ghosh, P.C. Sil, Role of nanostructures in improvising oral medicine, *Toxicol. Reports.* 6 (2019) 358–368. <https://doi.org/10.1016/J.TOXREP.2019.04.004>.
- [115] A.M. Wagner, M.P. Gran, N.A. Peppas, Designing the new generation of intelligent biocompatible carriers for protein and peptide delivery, *Acta Pharm. Sin. B.* 8 (2018) 147–164. <https://doi.org/10.1016/J.APSB.2018.01.013>.
- [116] L.W. Kleiner, J.C. Wright, Y. Wang, Evolution of implantable and insertable drug delivery systems, *J. Control. Release.* 181 (2014) 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2014.02.006>.
- [117] C. Ubeda, E.G. Pamer, Antibiotics, microbiota, and immune defense, *Trends Immunol.* 33 (2012) 459–466. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.05.003>.
- [118] V. Bajoria, A. Szczelkun, T. Dinse, F.J. van Overveld, G.T. Rijkers, The Impact of Gut Microbiota on the Immune Response to Vaccination, *Compr. Gut Microbiota.* (2022) 145–160. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819265-8.00051-6>.
- [119] A. Schumann, S. Nutten, D. Donnicola, E.M. Comelli, R. Mansourian, C. Cherbut, I. Cortesy-Theulaz, C. Garcia-Rodenas, Neonatal antibiotic treatment alters gastrointestinal tract developmental gene expression and intestinal barrier transcriptome, *Physiol. Genomics.* 23 (2005) 235–245. https://doi.org/10.1152/PHYSIOLGENOMICS.00057.2005/SUPPL_FILE/SUPPLEMENTARY_DATA_S2.PDF.

- [120] Y.C. Ju, D.A. Antonopoulos, A. Kalra, A. Tonelli, W.T. Khalife, T.M. Schmidt, V.B. Young, Decreased Diversity of the Fecal Microbiome in Recurrent *Clostridium difficile*—Associated Diarrhea, *J. Infect. Dis.* 197 (2008) 435–438. <https://doi.org/10.1086/525047>.
- [121] Y.C. Lin, Y.C. Chen, C.H. Kuo, Y.H. Chang, H.Y. Huang, W.J. Yeh, T.Y. Wu, M.Y. Huang, C.H. Hung, Antibiotic exposure and asthma development in children with allergic rhinitis, *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 53 (2020) 803–811. <https://doi.org/10.1016/J.JMII.2019.02.003>.
- [122] P.S. Stewart, J.W. Costerton, Antibiotic resistance of bacteria in biofilms, *Lancet.* 358 (2001) 135–138. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05321-1).
- [123] A.G. Mathew, R. Cissell, S. Liamthong, Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: A United States perspective of livestock production, *Foodborne Pathog. Dis.* 4 (2007) 115–133. <https://doi.org/10.1089/fpd.2006.0066>.
- [124] C.A. Moxon, S. Paulus, Beta-lactamases in Enterobacteriaceae infections in children, *J. Infect.* 72 (2016) S41–S49. <https://doi.org/10.1016/J.JINF.2016.04.021>.
- [125] S. Esposito, G. Biasucci, A. Pasini, B. Predieri, G. Vergine, A. Crisafi, C. Malaventura, L. Casadio, M. Sella, L. Pierantoni, C. Gatti, L. Paglialonga, C. Sodini, C. La Scola, L. Bernardi, G. Autore, G.D. Canto, A. Argentiero, S. Cantatore, M. Ceccoli, A. De Fanti, A. Suppiej, M. Lanari, N. Principi, A. Pession, L. Iughetti, Antibiotic Resistance in Paediatric Febrile Urinary Tract Infections, *J. Glob. Antimicrob. Resist.* (2021). <https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2021.11.003>.
- [126] J.M. Munita, C.A. Arias, Mechanisms of Antibiotic Resistance, *Microbiol. Spectr.* 4 (2016) 464–472. <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.VMBF-0016-2015>.
- [127] I. Major, S. Lastakchi, M. Dalton, C. McConville, Implantable drug delivery systems, *Eng. Drug Deliv. Syst.* (2020) 111–146. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102548-2.00005-6>.
- [128] Z. Zhang, O. Ortiz, R. Goyal, J. Kohn, Biodegradable Polymers, *Princ. Tissue Eng. Fourth Ed.* (2013) 441–473. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398358-9.00023-9>.
- [129] N.D. Chantarasak, R.H. Milner, A comparison of scar quality in wounds closed under tension with PGA (Dexon) and Polydioxanone (PDS), *Br. J. Plast. Surg.* 42 (1989) 687–691. [https://doi.org/10.1016/0007-1226\(89\)90082-9](https://doi.org/10.1016/0007-1226(89)90082-9).

- [130] H. Tsuji, Y. Ikada, Stereocomplex formation between enantiomeric poly(lactic acid)s. XI. Mechanical properties and morphology of solution-cast films, *Polymer (Guildf)*. 40 (1999) 6699–6708. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(99\)00004-X](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(99)00004-X).
- [131] K. Fu, D.W. Pack, A.M. Klibanov, R. Langer, Visual Evidence of Acidic Environment Within Degrading Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) Microspheres, *Pharm. Res.* 2000 171. 17 (2000) 100–106. <https://doi.org/10.1023/A:1007582911958>.
- [132] L.W. Kleiner, J.C. Wright, Y. Wang, Evolution of implantable and insertable drug delivery systems, *J. Control. Release.* 181 (2014) 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2014.02.006>.
- [133] D. Guldiren, S. Aydın, Antimicrobial property of silver, silver-zinc and silver-copper incorporated soda lime glass prepared by ion exchange, *Mater. Sci. Eng. C.* 78 (2017) 826–832. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.134>.
- [134] M. Qi, Y. Liu, S. Shi, Y. Xian, Q. Liu, H. Yan, Y. Zhang, Y. Yuan, Inhibition mechanism of high voltage prick electrostatic field (HVPEF) on *Staphylococcus aureus* through ROS-mediated oxidative stress, *LWT.* 155 (2022) 112990. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.112990>.
- [135] S. Ferraris, S. Spriano, Antibacterial titanium surfaces for medical implants, *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 61 (2016) 965–978. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2015.12.062>.
- [136] J. Jalab, W. Abdelwahed, A. Kitaz, R. Al-Kayali, Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of *Acacia cyanophylla* and its antibacterial activity, *Heliyon.* 7 (2021) e08033. <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2021.E08033>.
- [137] X. Chen, H.J. Schluesener, Nanosilver: A nanoparticle in medical application, *Toxicol. Lett.* 176 (2008) 1–12. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2007.10.004>.
- [138] C. Liao, Y. Li, S.C. Tjong, Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/IJMS20020449>.
- [139] K. Leśniak-Ziółkowska, A. Kazek-Kęsik, K. Rokosz, S. Raaen, A. Stolarczyk, M. Krok-Borkowicz, E. Pamuła, W. Simka, Plasma electrolytic oxidation as an effective tool for production of copper incorporated bacteriostatic coatings on Ti-15Mo alloy, *Appl. Surf. Sci.* 563 (2021) 150284. <https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2021.150284>.

- [140] I. Burghardt, F. Lüthen, C. Prinz, B. Kreikemeyer, C. Zietz, H.G. Neumann, J. Rychly, A dual function of copper in designing regenerative implants, *Biomaterials*. 44 (2015) 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.12.022>.
- [141] J. Lu, A. Holmgren, New Roles for Copper Metabolism in Cell Proliferation, Signaling, and Disease, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 717–721. <https://doi.org/10.1074/JBC.R800055200>.
- [142] B.E. Kim, T. Nevitt, D.J. Thiele, Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation, *Nat. Chem. Biol.* 2008 43. 4 (2008) 176–185. <https://doi.org/10.1038/nchembio.72>.
- [143] X. He, G. Zhang, H. Zhang, R. Hang, X. Huang, X. Yao, X. Zhang, Cu and Si co-doped microporous TiO₂ coating for osseointegration by the coordinated stimulus action, *Appl. Surf. Sci.* 503 (2020) 144072. <https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2019.144072>.
- [144] C. Bergemann, S. Zaatreh, K. Wegner, K. Arndt, A. Podbielski, R. Bader, C. Prinz, U. Lembke, J.B. Nebe, Copper as an alternative antimicrobial coating for implants - An in vitro study, *World J. Transplant.* 7 (2017) 193. <https://doi.org/10.5500/WJT.V7.I3.193>.
- [145] K. Leśniak-Ziółkowska, A. Kazek-Kęsik, K. Rokosz, S. Raaen, A. Stolarczyk, M. Krok-Borkowicz, E. Pamuła, M. Gołda-Cępa, M. Brzychczy-Włoch, W. Simka, Electrochemical modification of the Ti-15Mo alloy surface in solutions containing ZnO and Zn₃(PO₄)₂ particles, *Mater. Sci. Eng. C.* 115 (2020) 111098. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2020.111098>.
- [146] H. Storrie, S.I. Stupp, Cellular response to zinc-containing organoapatite: An in vitro study of proliferation, alkaline phosphatase activity and biomineralization, *Biomaterials*. 26 (2005) 5492–5499. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2005.01.043>.
- [147] W.H. Song, S.R. Hyun, S.H. Hong, Antibacterial properties of Ag (or Pt)-containing calcium phosphate coatings formed by micro-arc oxidation, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 88A (2009) 246–254. <https://doi.org/10.1002/JBM.A.31877>.
- [148] K. Rokosz, T. Hryniewicz, Ł. Dudek, A. Schütz, J. Heeg, M. Wienecke, Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy Mapping of Porous Coatings Obtained on Titanium by Plasma Electrolytic Oxidation in a Solution Containing Concentrated Phosphoric Acid with Copper Nitrate, *Adv. Mater. Sci.* 16 (2016) 15–25. <https://doi.org/10.1515/ADMS->

2016-0013.

- [149] M. Polak, A. Ohl, M. Quaas, G. Lukowski, F. Lüthen, K.-D. Weltmann, K. Schröder, Oxygen and Water Plasma-Immersion Ion Implantation of Copper into Titanium for Antibacterial Surfaces of Medical Implants, *Adv. Eng. Mater.* 12 (2010) B511–B518. <https://doi.org/10.1002/ADEM.200980048>.
- [150] H. Hu, W. Zhang, Y. Qiao, X. Jiang, X. Liu, C. Ding, Antibacterial activity and increased bone marrow stem cell functions of Zn-incorporated TiO₂ coatings on titanium, *Acta Biomater.* 8 (2012) 904–915. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2011.09.031>.
- [151] K. Rokosz, T. Hryniewicz, K. Pietrzak, W. Malorny, SEM and EDS Characterization of Porous Coatings Obtained On Titanium by Plasma Electrolytic Oxidation in Electrolyte Containing Concentrated Phosphoric Acid with Zinc Nitrate, *Adv. Mater. Sci.* 17 (2017) 41–54. <https://doi.org/10.1515/ADMS-2017-0010>.
- [152] K. Babaei, A. Fattah-alhosseini, R. Chaharmahali, A review on plasma electrolytic oxidation (PEO) of niobium: Mechanism, properties and applications, *Surfaces and Interfaces.* 21 (2020) 100719. <https://doi.org/10.1016/J.SURFIN.2020.100719>.
- [153] Z. Yu, A. Du, C. Wang, R. Ma, Y. Fan, X. Zhao, X. Cao, Incorporation mechanism of ZnO nanoparticles in PEO coating on 1060 Al alloy, *Surf. Coatings Technol.* 412 (2021) 127068. <https://doi.org/10.1016/J.SURFCOAT.2021.127068>.
- [154] J. Supniewski, *Preparatyka nieorganiczna*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, 1953.
- [155] O. Hollricher, W. Ibach, High-resolution optical and confocal microscopy, *Springer Ser. Opt. Sci.* 158 (2010) 1–20. https://doi.org/10.1007/978-3-642-12522-5_1.
- [156] Y.J. Guan, Y. Xia, G. Li, Growth mechanism and corrosion behavior of ceramic coatings on aluminum produced by autocontrol AC pulse PEO, *Surf. Coatings Technol.* 202 (2008) 4602–4612. <https://doi.org/10.1016/J.SURFCOAT.2008.03.031>.
- [157] A. Fattah-alhosseini, M. Molaei, N. Attarzadeh, K. Babaei, F. Attarzadeh, On the enhanced antibacterial activity of plasma electrolytic oxidation (PEO) coatings that incorporate particles: A review, *Ceram. Int.* 46 (2020) 20587–20607. <https://doi.org/10.1016/J.CERAMINT.2020.05.206>.
- [158] R. Liu, J. Wu, W. Xue, Y. Qu, C. Yang, B. Wang, X. Wu, Discharge behaviors during plasma electrolytic oxidation on aluminum alloy, *Mater. Chem. Phys.* 148 (2014) 284–

292. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2014.07.045>.
- [159] A. Santos-Coquillat, M. Mohedano, E. Martinez-Campos, R. Arrabal, A. Pardo, E. Matykina, Bioactive multi-elemental PEO-coatings on titanium for dental implant applications, *Mater. Sci. Eng. C.* 97 (2019) 738–752. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2018.12.097>.
- [160] E. Rompen, O. Domken, M. Degidi, A.E.P. Pontes, A. Piattelli, The effect of material characteristics, of surface topography and of implant components and connections on soft tissue integration: A literature review, *Clin. Oral Implants Res.* 17 (2006) 55–67. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01367.x>.
- [161] A.M.B. Silva, J.M.M. Oliveira, R.N. Correia, M.H.V. Fernandes, Structure and Degradation Behaviour of Calcium Phosphate Glasses, *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 18 (2011) 192021. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/18/19/192021>.
- [162] B. Tiwari, A. Dixit, G. Kothiyal, M. Pandey, S. Deb, PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF PHOSPHATE GLASSES CONTAINING TITANIUM, Undefined. (2007).
- [163] A.K. Yadav, P. Singh, A review of the structures of oxide glasses by Raman spectroscopy, *RSC Adv.* 5 (2015) 67583–67609. <https://doi.org/10.1039/C5RA13043C>.
- [164] S. Shrestha, S. Yeon Lee, D. Shrestha, R. Kandel, Y.J. Yoo, H.J. Tae, B. Kumar Shrestha, C. Hee Park, C. Sang Kim, Micro/nanometer-sized porous structure of zinc phosphate incorporated $\text{Ti}(\text{HPO}_4)_2$ hydrate bioceramic induces osteogenic gene expression and enhances osteoporotic bone regeneration, *Chem. Eng. J.* 450 (2022) 138360. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2022.138360>.
- [165] G. Huang, X. Song, Y. Chen, F. Lin, Y. Huang, F. Li, Z. Guo, Q. Yao, X. Chen, Study of the effect of chemical composition on the surface wettability of three-dimensional graphene foams, *Chinese Chem. Lett.* 31 (2020) 1839–1842. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2020.02.053>.
- [166] X. He, G. Zhang, H. Zhang, R. Hang, X. Huang, X. Yao, X. Zhang, Cu and Si co-doped microporous TiO_2 coating for osseointegration by the coordinated stimulus action, *Appl. Surf. Sci.* 503 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.144072>.
- [167] J.P. Kaiser, M. Roesslein, L. Diener, A. Wichser, B. Nowack, P. Wick, Cytotoxic effects of nanosilver are highly dependent on the chloride concentration and the presence of

- organic compounds in the cell culture media, *J. Nanobiotechnology*. 15 (2017) 1–11. <https://doi.org/10.1186/S12951-016-0244-3/TABLES/2>.
- [168] C. Greulich, D. Braun, A. Peetsch, J. Diendorf, B. Siebers, M. Epple, M. Köller, The toxic effect of silver ions and silver nanoparticles towards bacteria and human cells occurs in the same concentration range, *RSC Adv.* 2 (2012) 6981–6987. <https://doi.org/10.1039/C2RA20684F>.
- [169] S.M. Hoheisel, S. Diamond, D. Mount, Comparison of nanosilver and ionic silver toxicity in *Daphnia magna* and *Pimephales promelas*, *Environ. Toxicol. Chem.* 31 (2012) 2557–2563. <https://doi.org/10.1002/ETC.1978>.
- [170] K. Gomi, B. Lowenberg, G. Shapiro, J.E. Davies, Resorption of sintered synthetic hydroxyapatite by osteoclasts in vitro, *Biomaterials*. 14 (1993) 91–96. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(93\)90216-O](https://doi.org/10.1016/0142-9612(93)90216-O).
- [171] F. Barrère, T.A. Mahmood, K. de Groot, C.A. van Blitterswijk, Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions, *Mater. Sci. Eng. R Reports*. 59 (2008) 38–71. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2007.12.001>.

Wykaz dorobku naukowego doktoranta

Pozycje związane bezpośrednio z niniejszą rozprawą doktorancką

I. Publikacje:

1. **Katarzyna Leśniak-Ziółkowska**, Alicja Kazek-Kęsik, Krzysztof Rokosz, Steinar Raaen, Agnieszka Stolarczyk, Małgorzata Krok-Borkowicz, Elżbieta Pamuła, Monika Gołda-Cępa, Monika Brzychczy-Włoch, Wojciech Simka

Electrochemical modification of the Ti-15Mo alloy surface in solutions containing ZnO and Zn₃(PO₄)₂ particles

Materials Science and Engineering: C 115 (2020) 111098; IF = 7,328; MNiSW = 140
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111098>

2. **Katarzyna Leśniak-Ziółkowska**, Alicja Kazek-Kęsik, Krzysztof Rokosz, Steinar Raaen, Agnieszka Stolarczyk, Małgorzata Krok-Borkowicz, Elżbieta Pamuła, Wojciech Simka
Plasma electrolytic oxidation as an effective tool for production of copper incorporated bacteriostatic coatings on Ti-15Mo alloy

Applied Surface Science 563 (2021) 150284; IF = 7,392; MEN = 140
<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2021.150284>

II. Patenty:

1. Wojciech Simka, Alicja Kazek-Kęsik, **Katarzyna Leśniak**

Sposób otrzymywania porowatych powłok antybakteryjnych na powierzchni tytanu i jego stopów

Numer patentu: PL239584

Data ogłoszenia patentu: 27.01.2022

2. Wojciech Simka, Alicja Kazek-Kęsik, **Katarzyna Leśniak**

Sposób otrzymywania porowatych powłok antybakteryjnych na powierzchni tytanu i jego stopów

Numer patentu: PL239585

Data ogłoszenia patentu: 27.01.2022

3. Wojciech Simka, Alicja Kazek-Kęsik, **Katarzyna Leśniak**

The formation method of porous antibacterial coatings on titanium and titanium alloys surface

Numer patentu: EP20460020

Data ogłoszenia patentu: 16.08.2023

III. Wystąpienia na konferencjach naukowych:

1. 28th Annual Conference „*Biomaterials in Medicine and Veterinary Medicine*”
prezentacja ustna; 10-13.10.2019 Rytro

Katarzyna Leśniak, Alicja Kazek-Kęsik, Krzysztof Rokosz, Monika Brzychczy-Włoch,
Wojciech Simka

Bacteriostatic layers formed on Ti-15Mo alloy surface

2. “*Graduate student symposium on advantageous electrochemistry 2020*”
prezentacja ustna; 10-11.09.2020 platforma Zoom, Warszawa

Katarzyna Leśniak-Ziółkowska, Alicja Kazek-Kęsik, Wojciech Simka

Plasma electrolytic oxidation of Ti alloy in suspensions containing particles with antibacterial properties

3. “*XXVIth International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics of the Bioelectrochemical Society*”

poster; 09-13.05.2021 platforma Zoom, Cluj-Napoca

Katarzyna Leśniak-Ziółkowska, Kasjana Brodacz, Alicja Kazek-Kęsik, Wojciech Simka

Bacteriostatic properties of Mg-containing oxide coatings formed on Ti surface via plasma electrolytic oxidation

4. “*6th International Symposium on Surface Imaging/Spectroscopy at the Solid/Liquid Interface*”

poster (3rd award); 06-09.05.2021 platforma Microsoft Teams, Kraków

Katarzyna Leśniak-Ziółkowska, Agata Blacha-Grzechnik, Mateusz Dulski, Alicja Kazek-Kęsik, Wojciech Simka

Electrochemical properties of Ti-15Mo alloy surface treated via plasma electrolytic oxidation (PEO) process in suspensions containing Ag

Pozostałe pozycje niezwiązane bezpośrednio z tematyką niniejszej rozprawy doktorskiej

I. Publikacje:

1. Alicja Kazek-Kęsik, **Katarzyna Leśniak**, Ivan S. Zhidkov, Danila M. Korotin, Andrey I. Kukharenko, Seif O. Cholakh, Izabela Kalemba-Rec, Katarzyna Suchanek, Ernst Z. Kurmaev, Wojciech Simka
Influence of Alkali Treatment on Anodized Titanium Alloys in Wollastonite Suspension
Metals 7 (2017) 322; IF = 1,984; MNiSW = 30
<https://doi.org/10.3390/met7090322>
2. Alicja Kazek-Kęsik, **Katarzyna Leśniak**, Beata Urszula Orzechowska, Marek Drab, Agnieszka Wiśniewska, Wojciech Simka
Alkali Treatment of Anodized Titanium Alloys Affects Cytocompatibility
Metals 8 (2018) 29; IF = 1,984; MNiSW = 30
<https://doi.org/10.3390/met8010029>
4. **Katarzyna Leśniak**, Joanna Płonka, Monika Śmiga-Matuszowicz, Monika Brzychczy-Włoch, Alicja Kazek-Kęsik
Functionalization of PEO layer formed on Ti-15Mo for biomedical application
Journal of Biomedical Materials Research - Part B 108 (2020) 1568;
IF = 3,221; MEN = 140
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.34504>
5. **Katarzyna Leśniak-Ziółkowska**, Monika Śmiga-Matuszowicz, Agata Blacha-Grzechnik, Sebastian Student, Monika Brzychczy-Włoch, Małgorzata Krok-Borkowicz, Elżbieta Pamuła, Wojciech Simka, Alicja Kazek-Kęsik
Antibacterial and cytocompatible coatings based on poly(adipic anhydride) for a Ti alloy surface
Bioactive Materials 5 (2020) 709; IF = 8,724; MEN = 200
<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.04.020>

6. Viktoriia Korniienko, Oleksandr Oleshko, Yevheniia Husak, Volodymyr Deineka, Viktoriia Holubnycha, Oleg Mishchenko, Alicja Kazek-Kęsik, Agata Jakóbi-Kolon, Roman Pshenychnyi, **Katarzyna Leśniak-Ziółkowska**, Oksana Kalinkevich, Aleksei Kalinkevich, Marcin Pisarek, Wojciech Simka, Maksym Pogorielov
Formation of a Bacteriostatic Surface on ZrNb Alloy via Anodization in a Solution Containing Cu Nanoparticles
Materials 13(18) (2020) 3913; IF = 3,057; MEN = 140
<https://doi.org/10.3390/ma13183913>
7. Dorota Babilas, Jakub Muszyński, Andrzej Milewski, **Katarzyna Leśniak-Ziółkowska**, Piotr Dydo
Electrodialysis enhanced with disodium EDTA as an innovative method for separating Cu(II) ions from zinc salts in wastewater
Chemical Engineering Journal 408 (2021) 127908; IF = 16,744; MEN = 200
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.127908>
8. Alexandr Myakinin, Amanzhol Turlybekuly, Alexander Pogrebnyak, Adam Mirek, Mikhael Bechelany, Iryna Liubchak Oleksandr Oleshko, Yevheniia Husak, Viktoriia Korniienko, **Katarzyna Leśniak-Ziółkowska**, Dmitry Dogadkin, Rafał Banasiuk, Roman Moskalenko, Maksym Pogorielov, Wojciech Simka
In vitro evaluation of electrochemically bioactivated Ti6Al4V 3D porous scaffolds
Materials Science and Engineering: C 121 (2021) 111870; IF = 8,457; MEN = 140
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.111870>
9. Mateusz Dulski, Robert Gawecki, Sławomir Sułowicz, Michał Cichomski, Alicja Kazek-Kęsik, Marta Wala, **Katarzyna Leśniak-Ziółkowska**, Wojciech Simka, Anna Mrozek-Wilczkiewicz, Magdalena Gawęda, Maciej Sitarz, Karolina Dudek
Key Properties of a Bioactive Ag-SiO₂/TiO₂ Coating on NiTi Shape Memory Alloy as Necessary at the Development of a New Class of Biomedical Materials
International Journal of Molecular Sciences 22(2) (2021) 507
IF = 5,600; MEN = 140
<https://doi.org/10.3390/ijms22020507>

10. Marta Wala, Magdalena Szewczyk, **Katarzyna Leśniak-Ziółkowska**, Alicja Kazek-Kęsik, Wojciech Simka
Preparation of NiCuGO composite and investigation of its electrocatalytic properties in methanol oxidation
Electrochimica Acta 425 (2022) 140743
IF = 7,336; MEN = 100
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2022.140743>
11. Vladlens Grebnevs, **Katarzyna Leśniak-Ziółkowska**, Marta Wala, Mateusz Dulski, Şahin Altundal, Aleksandrs Dutovs, Līga Avotiņa, Donāts Erts, Roman Viter, Arturs Vīksna, Wojciech Simka
Modification of physicochemical properties and bioactivity of oxide coatings formed on Ti substrates via plasma electrolytic oxidation in crystalline and amorphous calcium phosphate particle suspensions
Applied Surface Science 598 (2022) 153793; IF = 7,392; MEN = 140
<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2022.153793>
12. **Katarzyna Leśniak-Ziółkowska**, Kasjana Brodacz, Dorota Babilas, Mateusz Dulski, Agata Blacha-Grzechnik, Xiaopeng Lu, Alicja Kazek-Kęsik, Wojciech Simka
Fungistatic and bacteriostatic Mg-enriched oxide coatings on titanium formed via plasma electrolytic oxidation
Applied Surface Science 615 (2023) 156285; IF = 7,392; MEN = 140
<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2022.156285>

II. Wystąpienia na konferencjach naukowych:

1. XVIII Międzynarodowa Studencka Sesja Naukowa „*Materiały i technologie XXI wieku*” – prezentacja ustna (I nagroda); 19.05.2016 Katowice
2. V Ogólnopolska konferencja naukowa „*Pomiędzy naukami – zjazd chemików i fizyków*” – prezentacja ustna; 16.09.2016 Chorzów
3. XXVII Konferencja „*Antykorozja*” – prezentacja ustna; 20-22.03.2019 Ustroń-Jaszowiec
Katarzyna Leśniak, Alicja Kazek-Kęsik, Joanna Płonka, Wojciech Simka
Warstwy hybrydowe otrzymane na powierzchni stopu tytanu

4. III Seminarium Ogólnoakademickie „*Metody fizykochemiczne w badaniach naukowych*” – prezentacja ustna (wyróżnienie); 17.04.2019 Sosnowiec
5. XIX Międzynarodowa Polskiego Towarzystwa Galwanotechnicznego oraz Sieci Badawczej Łukasiewicz „*Innowacyjność i rozwój w galwanotechnice*” – prezentacja ustna; 01.10.2021 Warszawa