



**UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**
Wydział Chemii

Katedra Chemii Nieorganicznej i Koordynacyjnej

**Nanowarstwy ditlenku tytanu
o zróżnicowanej strukturze i morfologii, jako biozgodne
oraz aktywne biologicznie i fotokatalitycznie powłoki
na podłożach tytanowych i ze stopu Ti6Al4V**

dr Aleksandra Radtke

Autoreferat

Załącznik nr 3
do wniosku o nadanie tytułu doktora habilitowanego w dziedzinie nauk chemicznych

Toruń 2019

Spis treści

1. Dane osobowe.....	3
2. Posiadane tytuły i stopnie naukowe.....	3
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu.....	3
4. Osiągnięcie wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r. poz. 1789, Dz. U. 2018 r., poz. 1669) stanowiące podstawę postępowania habilitacyjnego.....	4
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.....	4
4.2. Publikacje i inne prace składające się na osiągnięcie naukowe.....	4
4.3. Cel naukowy badań i omówienie najważniejszych wyników.....	8
4.3.1. Wprowadzenie.....	8
4.3.2. Cel pracy.....	12
4.3.3. Uzyskane wyniki.....	13
4.3.4. Podsumowanie uzyskanych wyników.....	53
4.3.5. Literatura.....	56
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych w oparciu o publikacje (PA1-PA8) i patenty (PP1-PP3).....	63
5.1. Publikacje (PA) i patenty (PP) związane z pozostałymi osiągnięciami naukowo-badawczymi	74
6. Tabelaiczne podsumowanie dorobku naukowego.....	75

1. Dane osobowe

Imię i nazwisko: **Aleksandra Anna Radtke**

2. Posiadane tytuły i stopnie naukowe

Rok

2007 **Doktor nauk chemicznych**
Rozprawa doktorska zatytułowana "Synteza, charakterystyka strukturalna i spektroskopowa oraz badania nad termiczną stabilnością jedno- i wielordzeniowych kompleksów Zr(IV) z ligandami O-donorowymi"
Promotor: Prof. dr hab. Antoni Grodzicki

2003 **Magister chemii**
Praca magisterska zatytułowana "Badania strukturalne dihydratów typu $\text{Rb}[\text{MnCl}_3(\text{H}_2\text{O})_2]$ i $\text{Rb}_2[\text{MnCl}_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ metodami spektroskopii rentgenowskiej i oscylacyjnej"
Promotor: Prof. dr hab. Antoni Grodzicki

2001 **Licencjat chemii**
Praca licencjacka zatytułowana "Doświadczenia z pogranicza chemii i biologii"
Promotor: Dr Aleksander Kazubski

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu

Czas zatrudnienia	Stanowisko i miejsce zatrudnienia
2009 - obecnie	Adiunkt Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Chemii ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń
2006-2009	Asystent Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Chemii ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

oraz:

2016 - obecnie	Prezes Zarządu spółki spin-off Nano-implant Sp. z o.o. ul. Gagarina 5/102, 87-100 Toruń
2017-2018	Broker Innowacji UMK w Toruniu Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

4. Osiągnięcie wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r. poz. 1789; Dz. U. 2018 poz. 1669) stanowiące podstawę postępowania habilitacyjnego.

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Nanowarstwy ditlenku tytanu o zróżnicowanej strukturze i morfologii, jako biozgodne oraz aktywne biologicznie i fotokatalitycznie powłoki na podłożach tytanowych i ze stopu Ti6Al4V

4.2. Publikacje i inne prace składające się na osiągnięcie naukowe

Na osiągnięcie naukowe zatytułowane **Nanowarstwy ditlenku tytanu o zróżnicowanej strukturze i morfologii, jako biozgodne oraz aktywne biologicznie i fotokatalitycznie powłoki na podłożach tytanowych i ze stopu Ti6Al4V** składa się:

- 12 publikacji (HA1-HA12)
- 2 rozdziały w monografiach (HM1, HM2)

Lp.

HA1	<p>Radtko A., Topolski A., Jędrzejewski T., Sadowska B., Więckowska-Szakiel M., Szubka M., Talik E., Nielsen L.P., Piszczek P.</p> <p>„Studies on the bioactivity and photocatalytic properties of titania nanotube coatings produced with the use of the low potential anodization of Ti6Al4V alloy surface” <i>Nanomaterials</i>, 7 (2017) 197</p> <p><i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu procedury syntezy nanorurek TiO₂, przeprowadzeniu syntezy, dokonaniu charakterystyki strukturalnej, spektroskopowej i morfologicznej uzyskanych układów, przeprowadzeniu badań aktywności fotokatalitycznej, interpretacji wyników badań strukturalnych i badań nad aktywnością fotokatalityczną, interpretacji wyników badań aktywności biologicznej, napisaniu całości manuskryptu i odpowiedzi na recenzje, pozyskanie środków na badania oraz na sfinansowanie APC.</i></p> <p><i>Mój udział procentowy szacuję na 70%.</i></p> <p>IF = 3.504; Punkcja MNiSW = 35</p>
HA2	<p>Radtko A., Ehlert M., Bartmański M., T. Jędrzejewski,</p> <p>“The morphology, structure, mechanical properties and biocompatibility of nanotubular titania coatings before and after autoclaving process” <i>Journal of Clinical Medicine</i>, 8 (2019) 272</p> <p><i>Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu procedury kontroli wpływu procesu autoklawowania na strukturę i morfologię nanorurek TiO₂, dokonaniu charakterystyki strukturalnej, spektroskopowej i morfologicznej uzyskanych układów przed i po autoklawowaniu, interpretacji wyników badań strukturalnych, spektroskopowych, morfologicznych, a także badań nad zwilżalnością, napisaniu całości manuskryptu i odpowiedzi na recenzje, pozyskaniu środków na badania oraz na sfinansowanie APC.</i></p> <p><i>Mój udział procentowy szacuję na 80%.</i></p> <p>IF = 5.583; Punkcja MNiSW = 15</p>
HA3	<p>Radtko A., Piszczek P., Topolski A., Lewandowska Ż., Talik E., Hald Andersen I., Nielsen L.P., Heikkilä M., Leskelä M</p> <p>“The structure and the photocatalytic activity of titania nanotube and</p>

nanofiber coatings" *Applied Surface Science*, 368 (2016) 165-172

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu procedury syntezy nanorurek i nanowłókien TiO₂, przeprowadzeniu syntezy nanowłókien, dokonaniu charakterystyki spektroskopowej uzyskanych układów, przeprowadzeniu badań aktywności fotokatalitycznej, interpretacji wyników badań strukturalnych i badań nad aktywnością fotokatalityczną, napisaniu całości manuskryptu i odpowiedzi na recenzje, pozyskaniu środków na badania oraz na sfinansowanie APC.

Mój udział procentowy szacuję na 75%.

IF = 3.387; Punktacja MNiSW = 35

Radtke A., Bal M., Jędrzejewski T.

HA4 "Novel titania nanocoatings produced by the anodic anodization with the use of the cyclically changing potential; their photocatalytic activity and biocompatibility" *Nanomaterials* 8 (2018) 712

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu procedury syntezy nanomateriałów TiO₂ metodą elektrochemiczną z zastosowaniem cyklicznie zmieniającego się potencjału, dokonaniu charakterystyki strukturalnej, spektroskopowej i morfologicznej uzyskanych układów, przeprowadzeniu badań aktywności fotokatalitycznej, interpretacji wyników badań strukturalnych i badań nad aktywnością fotokatalityczną, napisaniu całości manuskryptu i odpowiedzi na recenzje, pozyskaniu środków na badania oraz na sfinansowanie APC.

Mój udział procentowy szacuję na 85%.

IF = 3.504; Punktacja MNiSW = 35

Radtke A., Topolski A., Jędrzejewski T., Kozak W., Sadowska B., Wieckowska-Szakiel M., Piszczek, P.

HA5 "Bioactivity Studies on Titania Coatings and the Estimation of Their Usefulness in the Modification of Implant Surfaces" *Nanomaterials*, 7 (2017) 90

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu procedury syntezy nanowłókien i nanoprętów TiO₂, przeprowadzeniu syntezy, dokonaniu charakterystyki spektroskopowej uzyskanych układów, przeprowadzeniu badań aktywności fotokatalitycznej, interpretacji wyników badań strukturalnych i badań nad aktywnością fotokatalityczną, interpretacji wyników badań aktywności biologicznej, napisaniu całości manuskryptu i odpowiedzi na recenzje, pozyskaniu środków na badania oraz na sfinansowanie APC.

Mój udział procentowy szacuję na 75%.

IF = 3.504; Punktacja MNiSW = 35

Radtke A.

HA6 "Photocatalytic activity of nanostructured titania films obtained by electrochemical, chemical, and thermal oxidation of Ti6Al4V alloy – comparative analysis" *Catalysts*, 9 (2019) 279

Mój udział procentowy – 100%

IF = 3.465; Punktacja MNiSW = 30

Piszczek P., Lewandowska Ż., Radtke A., Jędrzejewski T., Kozak W., Sadowska B., Szubka M., Talik E., Fiori F.

HA7 „Biocompatibility of Titania Nanotube Coatings Enriched with Silver Nanograins by Chemical Vapor Deposition" *Nanomaterials*, 7 (2017) 274

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu charakterystyki strukturalnej i spektroskopowej uzyskanych układów niemodyfikowanych nanorurek TiO₂ i układów modyfikowanych srebrem interpretacji wyników badań strukturalnych, morfologicznych, udziale redagowaniu manuskryptu i odpowiedzi na recenzje, pozyskaniu środków na badania oraz na sfinansowanie APC.

Mój udział procentowy szacuję na 51%.

IF = 3.504; Punktacja MNiSW = 35

HA8

Radtke A., Grodzicka M., Ehlert M., Muzioł T., Szkodo M., Bartmański M., Piszczek P.

„Studies on silver ions releasing processes and mechanical properties of surface-modified titanium alloy implants” *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (2018) 3962

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w zaplanowaniu procedury syntezy nanorurek TiO₂ wzbogaconych o ziarna srebra uzyskane metodą CVD, dokonaniu charakterystyki strukturalnej i spektroskopowej uzyskanych układów, interpretacji wyników badań strukturalnych i morfologicznych uzyskanych układów, interpretacji badań nad zwilżalnością, przeważającym udziale przy napisaniu całości manuskryptu i odpowiedzi na recenzje, pozyskanie środków na badania oraz na sfinansowanie APC.

Mój udział procentowy szacuję na 80%.

IF = 3.687; Punkcja MNiSW = 30

HA9

Radtke A., Grodzicka M., Ehlert M., Jędrzejewski T., Wypij M., Golińska P.

“To be microbiodical and not to be cytotoxic at the same time...” - silver nanoparticles in their main role on the surface of titanium alloy implants *Journal of Clinical Medicine*, 8 (2019) 334

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu procedury syntezy nanorurek TiO₂ wzbogaconych ściśle zdefiniowaną ilością ziaren srebra, dokonaniu charakterystyki strukturalnej i spektroskopowej uzyskanych układów, interpretacji wyników badań strukturalnych, spektroskopowych, badań nad zwilżalnością, badań nad morfologią powierzchni, napisaniu całości manuskryptu i odpowiedzi na recenzje, pozyskanie środków na badania oraz na sfinansowanie APC.

Mój udział procentowy szacuję na 70%.

IF = 5.583; Punkcja MNiSW = 15

HA10

Radtke A., Jędrzejewski T., Kozak W., Sadowska B., Więckowska-Szakiel M., Talik E., Mäkelä M., Leskelä M., Piszczek P.

„Optimization of the silver clusters PEALD process on the surface of 1-D titania coatings” *Nanomaterials*, 7 (2017) 193

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu procedury syntezy nanorurek TiO₂ wzbogaconych ściśle zdefiniowaną ilością ziaren srebra, o ściśle zdefiniowanym rozmiarze i kształcie, z użyciem metody PEALD, przeprowadzenie syntezy warstw TiO₂ na stopie tytanowym, wzbogacenie układów nanoziarnami srebra (pobyt stażowy), dokonaniu charakterystyki strukturalnej, spektroskopowej i morfologicznej uzyskanych układów, interpretacji wyników badań strukturalnych, spektroskopowych, napisaniu całości manuskryptu i odpowiedzi na recenzje, pozyskanie środków na badania oraz na sfinansowanie APC.

Mój udział procentowy szacuję na 70%.

IF = 3.504; Punkcja MNiSW = 35

HA11

Radtke A., Ehlert M., Jędrzejewski T., Sadowska B., Więckowska-Szakiel M., Holopainen J., Ritala M., Leskela M., Bartmański M., Szkodo M., Piszczek P.

“Titania Nanotubes/Hydroxyapatite Nanocomposites Produced with the Use of the Atomic Layer Deposition Technique: Estimation of Bioactivity and Nanomechanical Properties” *Nanomaterials*, 9 (2019) 123

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu procedury syntezy nanorurek TiO₂ wzbogaconych ściśle zdefiniowaną ilością nanokrystalicznego hydroksyapatytu, z użyciem metody PEALD, zoptymalizowaniu parametrów procesów dla celów użycia nanorurek TiO₂ jako substratu; udziale we wzbogaceniu układów hydroksyapatytem (pobyt stażowy), dokonaniu charakterystyki strukturalnej, spektroskopowej i morfologicznej uzyskanych układów, interpretacji wyników badań

strukturalnych, spektroskopowych, napisaniu całości manuskryptu i odpowiedzi na recenzje, pozyskanie środków na badania oraz na sfinansowanie APC.

Mój udział procentowy szacuję na 65%.

IF = 3.504; Punktacja MNIŚW = 35

Radtke A.

HA12 "Photocatalytic Activity of Titania Nanotube Coatings Enriched With Nanohydroxyapatite" *Biomed J Sci & Tech Res* **2019** 15(3). BJSTR. MS.ID.002711.

Mój udział procentowy – 100%

Punktacja MNIŚW = 5

Radtke A.

HM1 "1D Titania Nanoarchitecture as Bioactive and Photoactive Coatings for Modern Implants: A Review",

Ed. Janus M., *Application of Titanium Dioxide*, InTech, Croatia 2017, ISBN 978-953-51-3429-9, online ISBN 978-953-51-3430-5, Chapter 5, p. 73-102.

Mój udział procentowy – 100%

Punktacja MNIŚW = 5

Piszczek P., **Radtke A.**

HM2 "Silver Nanoparticles Fabricated Using Chemical Vapor Deposition and Atomic Layer Deposition Techniques: Properties, Applications and Perspectives: Review",

Ed. Seehra M.S., Bristow A.D., *Noble and Precious Metals*, InTech, London UK 2018, ISBN 978-1-78923-292-9, online ISBN 978-1-78923-293-6, Chapter 9, p. 187-213.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literaturowego na temat układów nanoziaren srebra na zróżnicowanej nanoarchitekturze ditlenku tytanu, przy wykorzystaniu metody PEALD, współpracy przy pisaniu manuskryptu i odpowiedzi na recenzje, pozyskaniu środków na sfinansowaniu APC.

Mój udział procentowy szacuję na 40%.

Punktacja MNIŚW = 5

Podsumowanie cyklu publikacji i prac składających się na osiągnięcie naukowe

Autorstwo główne i korespondencyjne w publikacjach z bazy JCR – 10

Współautorstwo w publikacjach z bazy JCR – 1

Autorstwo główne i korespondencyjne w publikacjach spoza bazy JCR - 1

Autorstwo główne i korespondencyjne rozdziału do książki – 1

Współautorstwo rozdziału do książki – 1

Sumaryczny IF publikacji składających się na osiągnięcie naukowe – 42,724

Sumaryczna liczba punktów za publikacje składające się na osiągnięcie naukowe – 350

4.3. Cel naukowy badań i omówienie najważniejszych wyników

4.3.1. Wprowadzenie

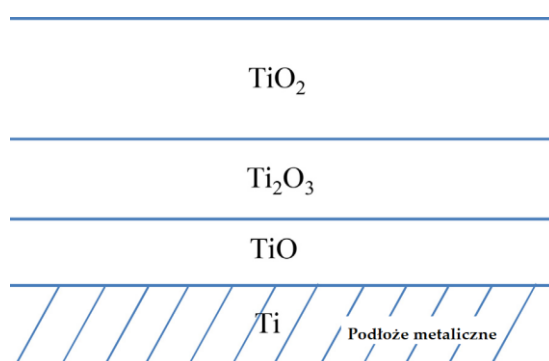
Dzisiejsza nauka wymaga od badaczy interdyscyplinarności i umiejętności holistycznego spojrzenia na napływające z różnych kierunków informacje i dane. I choć wciąż mamy ściśle zdefiniowane dziedziny nauki, w których kształcą się studenci, powstają nowe rozprawy doktorskie, a doktorzy się habilitują, to coraz trudniej jest utrzymać się w ramach ściśle określonej dziedziny. Patrząc jednak na patrona toruńskiej uczelni - Mikołaja Kopernika - renesansowego polihistora, astronoma, matematyka, prawnika, lekarza i ekonomistę, czy też Marię Skłodowską-Curie, dwukrotną noblistkę z nauk przyrodniczych, fizyczkę i chemiczkę, posiadającą także dyplom ukończenia studiów matematycznych, łatwo zauważyć, że wspomniana interdyscyplinarność jest motorem rozwoju badań, dzięki czemu uzyskiwane wyniki nabierają szerszego wymiaru i stają się bardziej uniwersalne i aplikacyjne. Ten szerszy wymiar starałam się nadać swoim badaniom, które prowadzę od kilku lat, jako chemik nieorganik – prac nad wytwarzaniem, charakterystyką strukturalną i właściwościami nanowarstw ditlenku tytanu o zróżnicowanej nanoarchitekturze. Gdybym ograniczyła się w swoich pracach tylko do użycia technik analitycznych i instrumentalnych dostępnych chemikowi, tematyka moich badań okazałaby się stosunkowo banalna i szybko zdecydowałabym się na jej modyfikację. Jednak moja ciekawość świata i związane z tym zróżnicowane zainteresowania znalazły odzwierciedlenie w chęci szukania zależności pomiędzy budową strukturalną, morfologią, zwilżalnością ditlenku tytanu, a jego aktywnością biologiczną i właściwościami mechanicznymi. Jest to tematyka zupełnie inna od wcześniej przeze mnie realizowanych prac badawczych. W ramach pracy magisterskiej zajmowałam się syntezą i charakterystyką spektroskopową krystalicznych hydratów, dzięki czemu nabrałam doświadczenia w badaniu związków chemicznych przy udziale zmiennotemperaturowej analizy w podczerwieni (VT-IR). Problematyka wykorzystania wielordzeniowych okso-kompleksów cyrkonu(IV), jako potencjalnych prekursorów ditlenku cyrkonu w procesach chemicznego osadzania z fazy gazowej (CVD) była tematem mojej pracy doktorskiej. Dzięki niej nauczyłam się optymalizować warunki syntezy związków kompleksowych, a także posiadałam wiedzę związaną z otrzymywaniem i charakteryzowaniem strukturalnym i morfologicznym nanowarstw. Moje późniejsze badania dotyczyły syntezy wielordzeniowych okso-kompleksów tytanu(IV), ich wykorzystania do wytwarzania nanofilmów ditlenku tytanu metodą CVD oraz oceny ich potencjalnej aktywności fotokatalitycznej. I tak naprawdę prace związane z charakterystyką otrzymywanych warstw TiO_2 i zgłębienie wiedzy literaturowej na temat ogromnego potencjału aplikacyjnego tego związku, doprowadziły do tego, że wspomniany, prosty z chemicznego punktu widzenia, układ tlenkowy – TiO_2 – nabrał w moich pracach nieco innego wymiaru. Wymiaru innowacyjnego biomateriału, który dzięki odpowiednim właściwościom fizykochemicznym, mechanicznym i odpowiedniej aktywności biologicznej i fotokatalitycznej, może posłużyć nowoczesnej inżynierii biomedycznej i implantologii.

Współczesna cywilizacja wymusza na człowieku zmiany sposobu jego życia, co nie zawsze jest dla niego korzystne. Mam tu na myśli siedzący tryb życia, ciągły pośpiech, stres, a także brak dbałości o elementarną higienę życia. Jedną z konsekwencji zachodzących zmian cywilizacyjnych są zmiany chorobowe lub zwyrodnieniowe, którym ulegają nasze kości i stawy. Powoduje to, że schorzenia układu kostno-stawowo-mięśniowego stają się

poważnym wyzwaniem dla współczesnej medycyny. Najczęściej stosowanym sposobem rozwiązania tego problemu staje się szerokie wykorzystanie implantów, których celem jest odtworzenie naturalnej funkcji lub estetyki uszkodzonego organu. Z tego względu nowoczesna medycyna coraz śmielej sięga po tego typu wyroby medyczne stosując je w ortopedii, stomatologii, chirurgii szczękowo-twarzowej, laryngologii, jak również w kardiochirurgii, neurochirurgii, czy urologii. Jednym z ważniejszych zagadnień przed, którym stajemy projektując i produkując współczesne implanty jest wybór odpowiednich dla ich konstrukcji materiałów. W tym celu pomocna okazuje się szeroka i interdyscyplinarna wiedza na temat nowoczesnych materiałów i nanomateriałów, a także metod ich wytwarzania. Należy pamiętać, że wprowadzenie obcego ciała, jakim jest implant, do wnętrza żywego organizmu, wiąże się z uruchomieniem procesów obronnych, zmierzających do jego usunięcia lub neutralizacji. Zatem, aby wszczep został zaakceptowany przez organizm i spełnił swoją rolę, materiały użyte do jego konstrukcji muszą podlegać ścisłym uwarunkowaniom i normom. Powinny one charakteryzować się biotolerancją i biofunkcjonalnością, bowiem ich zadaniem jest zastąpienie tkanki/organu, bądź pełnienie jego funkcji. I tu dochodzę do definicji biomateriału, którą uważam za stosowne przytoczyć. Według European Society for Biomaterials biomateriałem nazywamy każdą substancję inną niż lek, albo kombinację naturalnych lub syntetycznych substancji, która może być użyta w dowolnym okresie, a której zadaniem jest uzupełnienie lub zastąpienie tkanek narządu, albo jego części lub spełnienie ich funkcji [1]. Podstawowe cechy użytkowe tego typu materiału obejmują odpowiedni zespół właściwości zapewniających bezpieczną i niezawodną współpracę układu implant-tkanka-płyn ustrojowy oraz zgodność odpowiednich właściwości półprzewodnikowych, piezoelektrycznych i magnetycznych [2]. Wymienione wyżej czynniki powinny zminimalizować rozwój procesów korozyjnych i biodegradacyjnych, a w konsekwencji także toksykologicznych, alergicznych, pirogennych i kancerogennych reakcji organizmu [3]. Biomateriały, z których wytwarzane są implanty, a które będą funkcjonować w układzie kostno-mięśniowym podlegają bardzo dużym obciążeniom i naprężeniom. Dlatego muszą one charakteryzować się wysokimi parametrami wytrzymałościowymi. Wprowadzenie implantu do układu tkanek powoduje także jego odkształcenia i przemieszczenia, a to oznacza, że pod uwagę należy wziąć również właściwości sprężyste biomateriału. Owa sprężystość biomateriału, którą opisuje moduł Younga, powinna być możliwie dokładnie bliska wartości tego parametru kości. Powstaje wtedy pożądana relacja sztywności na styku implant-kość, zmniejszająca ryzyko wystąpienia negatywnej przebudowy struktury kości, tzw. remodelingu, czyli powstawania bezodkształceniowej strefy w rejonie implantu [4,5]. W chwili obecnej nie ma materiału, który w sposób zadawalający spełniałby wszystkie wymagania stawiane implantom. Producenci wyrobów medycznych prześcigają się w innowacyjnych rozwiązaniach, ale wciąż konieczne jest znalezienie kompromisu pomiędzy własnościami technologicznymi, a funkcjonalnymi wytwarzanych wyrobów medycznych. Postęp w implantologii, który obserwujemy w ostatnich latach wiąże się z poszukiwaniem nowych i lepszych materiałów oraz z optymalizacją procesów ich produkcji. Wyniki dotychczasowych prac wykazały, że pomimo ogromnego zainteresowania materiałami ceramicznymi, materiałami bazującymi na węglu, polimerami oraz hydrożelami, do konstrukcji większości implantów zastępujących twardą tkankę (implanty stawów biodrowych, stawów kolanowych, płytki kostne, śruby do stabilizacji złamań) stosowany jest tytan i jego stopy [6-9]. Wynika to ze specyficznych właściwości tytanu, głównie jego wytrzymałości mechanicznej, bierności chemicznej, odporności korozyjnej, jak również odpowiedniej bioinertności.

Tytan kojarzony jest głównie z wysoką wytrzymałością mechaniczną w stosunku do swojego niskiego ciężaru; jego gęstość wynosząca $4,51 \text{ g/cm}^3$ jest zdecydowanie niższa niż gęstość stali [10]. Moduł Younga, czyli wielkość określająca jego sprężystość na ściskanie i rozciąganie wynosi 105-120 GPa [11]. Stopy tytanu to układy o szerszym spektrum właściwości fizykochemicznych oraz mechanicznych niż czysty metal, a co za tym idzie, o większym potencjale aplikacyjnym. Do dnia dzisiejszego opracowano szereg stopów o różnym składzie i zróżnicowanych właściwościach, zawsze jednak posiadających wysoki stosunek wytrzymałości do gęstości i dobrą odporność korozyjną w większości agresywnych środowisk. Wśród nich znaleźć można lekkie, superwytrzymałe stopy do zastosowania w technikach wojskowych i lotniczych, stopy o odporności korozyjnej nieosiągalnej dla innych metalicznych materiałów konstrukcyjnych, do zastosowania np. w transporcie morskim. Kolejną grupę stanowią stopy o obniżonej sztywności i module sprężystości oraz o dobrej odporności korozyjnej w środowisku płynów ustrojowych, służące do wytwarzania implantów kostnych [12]. Stopem tytanu, którego właściwości mechaniczne są odpowiednie dla tego typu implantów i który jest najczęściej stosowany w ortopedii, chirurgii szczękowo-twarzowej i chirurgii kręgosłupa jest Ti6Al4V, zawierający wg normy ISO5832/3 5.5% mas. glinu i 3.5% mas. wanadu [13]. Do produkcji implantów kostnych stosuje się również inne stopy tytanu, np. Ti6Al7Nb, Ti13Nb13Zr i Ti12Mo6Zr [14,15].

Z chemicznego punktu widzenia zarówno tytan, jak i jego stopy reagują z kwasem siarkowym(VI), fluorowodorowym, chlorowodorowym, stężonym azotowym(V) i gorącymi zasadami. Równocześnie materiały te są odporne na czynniki atmosferyczne oraz na korozję w wielu bardzo zróżnicowanych środowiskach chemicznych [16]. Ta odporność jest wynikiem spontanicznego tworzenia się na powierzchni podłoży tytanowych cienkiej, pasywnej warstwy tlenków tytanu, uniemożliwiającej bezpośrednią styczność metalu ze środowiskiem [17]. Jednocześnie warstwa ta jest odpowiedzialna za biologiczną obojętność i biotolerancję medycznych wyrobów tytanowych. Natywny, amorficzny film TiO_2 tworzący się na powierzchni tytanu ma zazwyczaj grubość około 1-8 nm [18]. Grubość tego filmu, który ma strukturę wielowarstwową (co potwierdza analiza widm rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronowej (XPS)) zwiększa się wraz z adsorpcją tlenu. Zgodnie z przedstawionym na Rysunku 1 schematem warstwy pasywnej, jej powierzchnię tworzy warstwa tlenkowa o stosunku molowym O:Ti = 2:1, który zmienia się do 1.5:1 i 1:1, gdy przesuwamy się w głąb tej warstwy [18].



Rysunek 1. Schematyczny obraz wielowarstwowego filmu tlenków tytanu tworzącego się na powierzchni podłoża z tytanu i jego stopów [18].

Właściwości tworzącej się spontanicznie warstwy nie są do końca zdefiniowane, gdyż łatwo może ona ulegać plastycznym odkształceniom i przypadkowej kontaminacji. Z tego względu nie zawsze jest w stanie sprostać potrzebom biomedycznym.

Analizując stan dotychczasowych badań nad doбором składu chemicznego i fazowego implantów z tytanu lub jego stopów można zauważyć, że osiągnięto pewien pułap możliwości wpływania na właściwości użytkowe wyrobów medycznych produkowanych z wyżej wymienionych materiałów. Jednym ze sposobów rozwiązania tego problemu jest modyfikacja ich powierzchni, polegająca na wytwarzaniu powłok poprawiających ich odporność na korozję, odporność na zużycie przez tarcie, a także zwiększających ich biointegralność. Z uwagi na to, że tytan i jego stopy, to biomateriały stosowane głównie do wyrobu implantów kostnych, istotne znaczenie ma poprawa przebiegu procesów łączenia ich powierzchni z kością. W tym celu nadaje się powłokom odpowiednią architekturę, strukturę i skład chemiczny zapewniając rozwijającym się komórkom osteoblastów jak najlepsze zakotwiczenie na ich powierzchni i warunki do ich rozwoju [19-21]. Kolejnym ważnym wymogiem, który jest stawiany projektowanym implantom jest ich „wyposażenie” w składniki pozwalające na zwalczanie pojawiających się stanów zapalnych zarówno bezpośrednio po wprowadzeniu wszczepu do organizmu, jak i po dłuższym okresie jego użytkowania [22,23]. Problem ten, jak dotąd nie został rozwiązany, a o jego wadze świadczy fakt, że większość niepowodzeń w stosowaniu implantów tytanowych np. w stomatologii, wymuszających ich usunięcie, wynika z powodu pojawienia się *peri-implantitis*, czyli stanu zapalnego tkanek wokół implantu [24,25]. Owa reakcja zapalna wokół wszczepu jest wynikiem występowania patogennej mikroflory, a także indywidualnej reakcji systemu immunologicznego organizmu na czynniki chorobotwórcze [25]. Chcąc zapewnić wszczepom zdolność do aktywnego zwalczania stanów zapalnych należy, albo zmodyfikować ich powierzchnię tak, aby adhezja bakterii była zminimalizowana, albo wzbogacić ją składnikami o działaniu przeciwdrobnoustrojowym.

Z uwagi na to, że naturalną właściwością tytanu i jego stopów jest tworzenie pasywnej warstwy tlenków tytanu, **w swoich badaniach skupiłam się na projektowaniu i wytwarzaniu zintegrowanych z powierzchnią podłoża nanopowłok bazujących na TiO_2 , zapewniających jej zarówno wysoką biointegrację, jak i przeciwwzapalność.** Istotnym elementem moich badań było określenie wpływu struktury i morfologii powierzchni wytwarzanych nanopowłok, jak również ich zwilżalności i właściwości mechanicznych na wspomniane wyżej właściwości biologiczne. Pomimo intensywnych badań prowadzonych w ostatnich latach nad tym zagadnieniem, w dalszym ciągu wymaga ono wyjaśnienia i opracowania powłok optymalnych dla aplikacji implantologicznych. Ważnym zagadnieniem, którym się zajęłam było opracowanie metod wytwarzania powłok nanokompozytowych, w których warstwa TiO_2 została wzbogacona składnikami, nadającymi jej właściwości przeciwwzapalne, tj. nanocząstkami srebra oraz nanokryształami hydroksyapatytu. Wykorzystując swoje doświadczenie w prowadzeniu procesów wytwarzania nanocząstek oraz warstw tlenkowych z fazy gazowej, do wzbogacania powłok TiO_2 nanocząstkami srebra i nanokryształami hydroksyapatytu zastosowałam metodę chemicznego osadzania z fazy gazowej (CVD) i metodę osadzania warstw atomowych (ALD). Wspomniane techniki nie są szeroko stosowane w wytwarzaniu biomateriałów. Znajdują one zastosowanie przede wszystkim w mikroelektronice, optoelektronice i optyce [26,27] Z tego względu istotnym było zoptymalizowanie warunków prowadzenia tych procesów i ocena bioaktywności otrzymywanych powłok. Rozwiązanie tego zagadnienia

może mieć istotne znaczenie dla potencjalnego wdrożenia opracowanych powłok do konstrukcji implantów nowej generacji przeznaczonych dla ortopedii, chirurgii szczękowo-twarzowej, stomatologii, a także chirurgii kręgosłupa.

4.3.2. Cel pracy

Głównym celem mojej pracy było zaprojektowanie oraz wytworzenie nanopowłok bazujących na TiO_2 , zintegrowanych z powierzchnią podłoża tytanowego lub ze stopu Ti6Al4V . Projektowane powłoki miały zapewnić podłożom zarówno właściwości sprzyjające biointegracji z komórkami kości, jak i odpowiednią aktywność przeciwdrobnoustrojową, poprzez wykazywanie optymalnych właściwości fizykochemicznych i mechanicznych.

Aby ten cel osiągnąć konieczne było:

1. Opracowanie i zoptymalizowanie metod modyfikacji powierzchni podłoża z tytanu i stopu Ti6Al4V poprzez wytwarzanie nanopowłok bazujących na ditlenku tytanu, o ściśle zdefiniowanej strukturze i architekturze, metodami elektrochemicznego, chemicznego i termicznego utleniania.
2. Określenie struktury, morfologii powierzchni, właściwości fizykochemicznych i mechanicznych otrzymanych powłok TiO_2 oraz ich wpływu na biogodność i aktywności przeciwwzapalną wytwarzanych warstw.
3. Opracowanie i zoptymalizowanie metod wzbogacania wytworzonych nanopowłok ditlenku tytanu nanocząstkami srebra (AgNPs), jako czynnika o silnych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, przy wykorzystaniu technik osadzania z fazy gazowej, tj. chemicznego osadzania z fazy gazowej (CVD) i osadzania warstw atomowych (ALD). Określenie właściwości fizykochemicznych, mechanicznych oraz aktywności biologicznej wytworzonych nanokompozytów typu $\text{TiO}_2/\text{AgNPs}$.
4. Opracowanie i zoptymalizowanie metod wzbogacania wytworzonych nanopowłok ditlenku tytanu nanokrystalicznym hydroksyapatytem (HA) wykorzystując do tego celu technikę osadzania warstw atomowych (ALD). Określenie właściwości fizykochemicznych, mechanicznych oraz aktywności biologicznej wytwarzanych nanokompozytów typu TiO_2/HA .
5. Ocena aktywności fotokatalitycznej powłok TiO_2 o zróżnicowanej strukturze i morfologii powierzchni, a także warstw nanokompozytowych typu TiO_2/HA , w oparciu o analizę procesów degradacji wzorca zanieczyszczeń rozpuszczalnych w wodzie (błękitu metylenowego) oraz organicznego wzorca zanieczyszczeń o wysokiej lotności (acetonu).

4.3.3. Uzyskane wyniki

Analiza wyników dotychczasowych badań nad procesami łączenia się implantów z kością (zjawisko osteointegracji) wskazuje, że ich przebieg zależy od porowatości i chropowatości powierzchni podłoża. Zarówno mikro-, jak i nanoporowatość podłoża, a także jego wysoka energia powierzchniowa wpływają na przyspieszenie wstępnej adsorpcji białek regulując w ten sposób przebieg interakcji komórkowych na powierzchni implantu [28]. Aby spełnić powyższe warunki powierzchnie wszczepów z tytanu oraz jego stopów poddaje się modyfikacji z wykorzystaniem metod mechanicznych, fizycznych lub chemicznych [29]. Wymienione wyżej techniki stosuje się nie tylko w celu poprawy właściwości biointegracyjnych powierzchni implantów, ale również zwiększenia przewodności kostnej, poprawy odporności korozyjnej, a także pozbycia się zanieczyszczeń.

Głównym zadaniem **mechanicznej modyfikacji** powierzchni podłoża jest uzyskanie jej określonej topografii, oczyszczenie z zanieczyszczeń oraz nadanie jej odpowiedniej szorstkości, a tym samym zwiększenie powierzchni aktywnej. Najczęściej stosowanymi technikami są: obróbka ze skrawaniem, ścieranie, polerowanie i piaskowanie. Wyniki dotychczasowych badań wykazały, że obróbka ze skrawaniem prowadzi zwykle do zaniku ziarnistości krystalicznej i zwiększenia twardości powierzchni. Z kolei zastosowanie metody piaskowania (obróbka strumieniowo-ścierna polegająca na traktowaniu podłoża strumieniem sprężonego powietrza zawierającego ścierniwo) umożliwia zwiększenie chropowatości podłoża, ale jednocześnie może powodować zanieczyszczenie jego powierzchni [30,31].

Spośród **metod fizycznych** najczęściej wykorzystywanych do modyfikacji powierzchniowej implantów metalowych, w tym tytanowych należy wymienić: fizyczne osadzanie z fazy gazowej (PVD), natryskiwanie termiczne (termiczny spray), implantację jonową lub obróbkę plazmową z wyładowaniem jarzeniowym. Modyfikacje te polegają na działaniu na powierzchnię implantu energią termiczną, kinetyczną lub elektryczną. Prowadzą one do poprawy odporności implantu na korozję i zużycie [32,33].

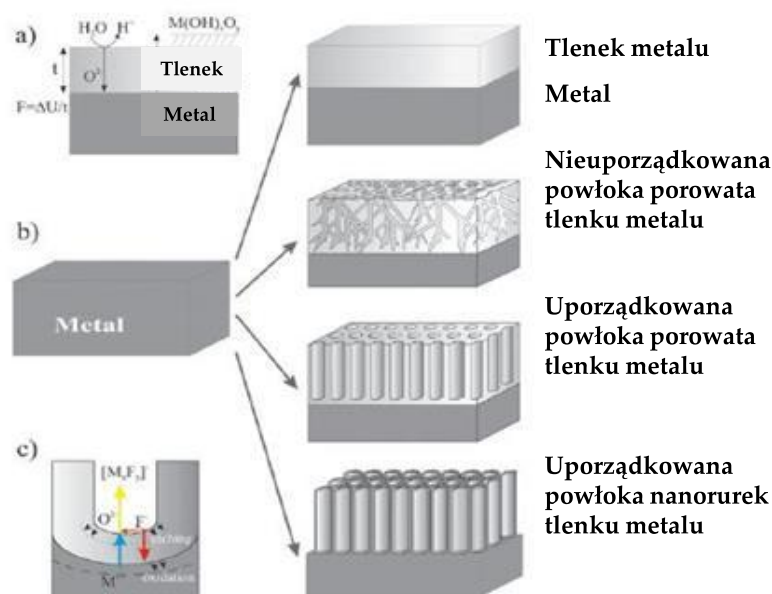
Jednak to **metody chemiczne** stwarzają najwięcej możliwości dopasowania właściwości powierzchni do jej zakładanych zastosowań. Wśród nich najważniejszymi są: techniki stricte chemiczne (działanie na powierzchnię tytanu lub jego stopu kwasem, zasadą lub nadtlenkiem wodoru – mające na celu usunięcie zgorzeliny tlenkowej i zanieczyszczeń), elektrochemiczne (np. anodowe utlenianie – prowadzące do powstania specyficznej topografii powierzchni), metody zol-żel (podnoszące biokompatybilność warstwy powierzchniowej), chemiczne osadzanie z fazy gazowej (prowadzące do polepszenia właściwości mechanicznych i antykorozyjnych) oraz metody biochemiczne (wykorzystujące osadzanie innych układów, np. hydroksyapatytu lub białek) [34,35]. W swoich badaniach skupiłam się na modyfikacji powierzchni podłoży tytanowych i stopu Ti6Al4V metodami: (a) elektrochemicznego utleniania [H1-H4, HM1], (b) bezpośredniego utleniania powierzchni podłoża natlenkiem wodoru [HA3, HA5, HM1] oraz (c) utleniania termicznego [HA5, HM1].

Możliwość wytwarzania powłok bazujących na ditlenku tytanu, o kontrolowanej nanoarchitekturze, np. nanorurek, nanosłupków, nanokropek, nanoporów, nanokoronek spowodowała, że najwięcej czasu poświęciłam wykorzystaniu metody elektrochemicznego utleniania powierzchni podłoży z tytanu i jego stopów, tj. anodowania. Proces ten przebiega w roztworach elektrolitów przy oddziaływaniu pola elektrycznego

(anodę stanowi tytanowe podłoże, a katodę płytka platynowa). Tworzenie się powłoki ditlenku tytanu o określonej architekturze jest wynikiem procesów samoorganizacji i często jest nazywane „wzrostem warstwy”. Tymczasem podczas procesów anodyzacji następuje wytrawianie tworzącej się warstwy tlenku metalu przy jednoczesnym tworzeniu nanowarstwy o wysoce uporządkowanej architekturze [36]. Sposób otrzymywania porowatych warstw tlenkowych na podłożu z tytanu lub jego stopów, przy wykorzystaniu metody elektrochemicznego utleniania, został po raz pierwszy opisany w 1999 roku przez Zwillinga i in. [37]. Do anodowania tytanu wykorzystano elektrolit, którego głównym składnikiem był kwas chromowy z dodatkiem lub bez kwasu fluorowodorowego, o stężeniu $9.5 \cdot 10^{-2}$ M. Stwierdzono, że w przypadku braku jonów fluorkowych w roztworze elektrolitu, otrzymana warstwa tlenkowa była jednolita i zwarta (Rysunek 2a) [38]. Tymczasem dodatek jonów F^- do roztworu elektrolitu prowadził do tworzenia się warstwy porowatej w wyniku działania dwóch konkurencyjnych procesów chemicznych, tj. elektrochemicznego wzrostu warstwy tlenkowej oraz jej chemicznego roztrawiania. Jony fluorkowe mogą migrować w głąb wytwarzanej warstwy TiO_2 (konkurując z jonami O^{2-}) i powodować jej miejscowe roztrawianie poprzez tworzenie rozpuszczalnych kompleksów $[TiF_6]^{2-}$ (Rysunek 2c). Dobierając odpowiednie warunki procesu anodowania możemy otrzymać cztery podstawowe typy warstw tlenkowych, o różnej morfologii powierzchni (Rysunek 2b). To, jaki rodzaj powłoki otrzymamy, zależy od składu stosowanego w procesie anodowania elektrolitu oraz przyłożonego napięcia prądu elektrycznego. Analiza danych literaturowych wskazuje, że właściwości biointegracyjne jednolitej warstwy TiO_2 oraz warstwy zawierającej nieuporządkowane pory są wyraźnie słabsze od powłok złożonych z nanorurek TiO_2 [39]. Stosunkowo najmniej poznane są właściwości biointegracyjne warstw zawierających uporządkowane nanopory. Natomiast chemia nanorurek ditlenku tytanu wzbogaca się o nowe publikacje w postępie geometrycznym, co świadczy o o szerokich możliwościach stosowania tego typu materiałów i wciąż istniejącej potrzebie ich badania. Z tego względu w swoich pracach najwięcej czasu poświęciłam powłokom złożonym z uporządkowanych nanoporów oraz nanorurek ditlenku tytanu.

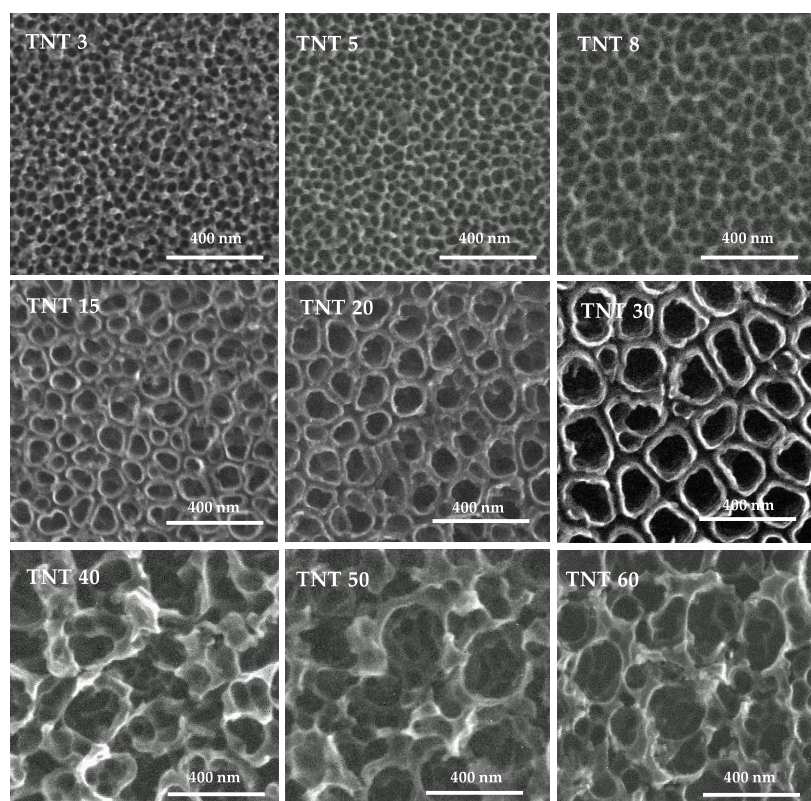
Głównymi czynnikami, które mają bezpośredni wpływ na procesy anodowania są: (a) warunki prądowe, (b) rodzaj i stężenie elektrolitu, (c) temperatura i (d) skład chemiczny podłoża [40]. Uwzględniając wymienione wyżej czynniki Grimes i Mor wyróżnili cztery rodzaje metod wytwarzania warstw nanorurek ditlenku tytanu (TNT), tj. powłok TNT I, II, III i IV generacji [41]. Z uwagi na możliwość bardzo precyzyjnej kontroli struktury i morfologii powłok TNT I i III generacji, badania swoje prowadziłam stosując wspomniane dwa rodzaje powłok.

Powłoki TNT I generacji, to warstwy nanorurek TiO_2 otrzymywane przy wykorzystaniu wodnych elektrolitów zawierających w swoim składzie kwas fluorowodorowy (lub jego sole) w ilości 0.1-1 %wag. oraz opcjonalnie inny silny kwas, taki jak HNO_3 , H_2SO_4 , $H_2Cr_2O_7$, H_3PO_4 o stężeniu nie przekraczającym 1 M [42]. Do tej grupy zalicza się również nanorurki otrzymywane przy zastosowaniu roztworu elektrolitu zawierającego kwas octowy z dodatkiem 0.2 %wag. wody oraz 0.5 %wag. NH_4F [43]. Czas anodyzacji warstw I generacji wynosi od kilku minut do około 2 godzin, długość otrzymanych nanorurek nie przekracza zwykle 0.5 μm , a ich średnica nie jest większa od 150 nm przy grubości ścianek 10-30 nm [44].



Rysunek 2. Schemat procesów zachodzących podczas anodyzacji: a) migracja jonów przez barierową warstwę tlenkową, b) podstawowe możliwe typy morfologii warstwy tlenkowej: (1) jednolita warstwa tlenkowa, (2) warstwa zawierająca nieuporządkowane pory, (3) warstwa zawierająca uporządkowane nanopory, (4) warstwa złożona z uporządkowanych nanorurek TiO_2 , c) procesy zachodzące podczas formowania nanorurek TiO_2 [38]

W swoich badaniach, jako elektrolit stosowałam 0.3% wodny roztwór kwasu fluorowodorowego. Jednolite warstwy złożone z rozseparowanych nanorurek otrzymywałam po 20 minutach prowadzenia procesu anodowania powierzchni tytanu lub jego stopu Ti6Al4V w temperaturze pokojowej (RT) i w zakresie napięć (U) od 12 do 30V (Rysunek 3) [45, HA1, HM1]. Zachowując te same warunki anodowania (0.3 % HF, 20 min, RT), ale stosując napięcia poniżej 12V wytwarzałam powłoki tlenkowe złożone z uporządkowanych nanoporów (Rysunek 3). Natomiast prowadząc proces anodowania z użyciem napięć wyższych niż 30 V otrzymywałam powłoki tlenkowe o strukturze gąbczastej (Rysunek 3). Analiza obrazów ze skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) powłok otrzymywanych w zakresie $U = 40\text{-}60\text{V}$ wykazała, że wewnątrz niejednorodnych form rurkowych o średnicach 110-260 nm stanowiły uporządkowane nanopory, których średnice były podobne do tych, tworzących się przy stosowaniu napięcia w przedziale 3-10V [HA2]. W tym miejscu uważam za stosowne wprowadzenie nomenklatury TNT, którą posługiwać się będę w niniejszym autoreferacie, a która będzie zgodna z nomenklaturą występującą w cytowanych publikacjach stanowiących osiągnięcie naukowe. Zakładam, że wszystkie układy, które wytworzyłam w procesie elektrochemicznego utleniania nazywane będą TNT_U , gdzie U oznacza wartość potencjału zastosowanego w procesie anodowania. Mimo, że skrót TNT odnosi się w literaturze zazwyczaj do nanorurek ditlenku tytanu (titania nanotubes), w prezentowanym autoreferacie (podobnie, jak we wszystkich swoich publikacjach) będę w ten sposób opisywała warstwy **nanoporowate** ($\text{TNT}_3\text{-TNT}_{10}$), warstwy **nanorurek** ($\text{TNT}_{12}\text{-TNT}_{30}$) oraz powłoki **gąbczaste** ($\text{TNT}_{40}\text{-TNT}_{60}$). W Tabeli 1 znajdują się dane dotyczące tejsze nomenklatury wraz z informacją o średnicach porów, nanorurek oraz o wielkościach charakteryzujących powłoki gąbczaste.



Rysunek 3. Obrazy SEM przedstawiające morfologię warstw powstałych w procesie anodowego utleniania stopu Ti6Al4V (TNTU), stosując napięcie $U = 3-60V$ [H1, H2, H3]

Tabela 1. Oznaczenia powłok wytwarzanych metodami anodowania powierzchni podłoża tytanowych i stopu Ti6Al4V.

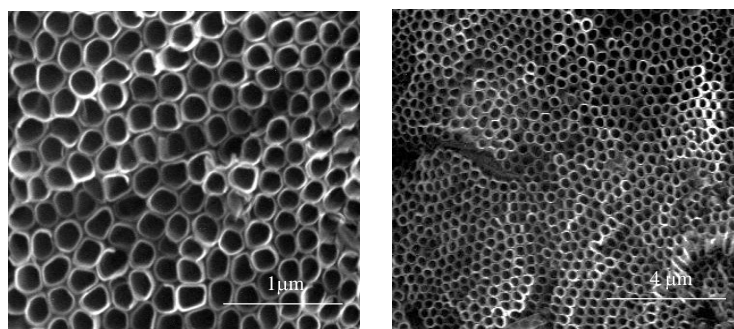
Oznaczenie powłoki	Charakter powłoki TiO ₂	Potencjał (V)	Średnice (nm)
TNT3	Uporządkowane nanopory	3	14 ±1
TNT4		4	19 ±4
TNT5		5	21 ±4
TNT6		6	25 ±4
TNT8		8	29 ±4
TNT10		10	38 ±7
TNT12	Uporządkowane nanorurki	12	41 ±4
TNT15		15	51 ± 9
TNT18		18	65 ± 5
TNT20		20	78 ±12
TNT30		30	120 ± 30
TNT40		Układy gąbczaste	40
TNT50	50		254 ± 15 (32 ± 22)
TNT60	60		260 ± 20 (56 ± 24)

Badania strukturalne powłok tlenkowych wytwarzanych poprzez anodowanie powierzchni podłoży z tytanu (warunki: elektrolit - 0.3% HF, $t = 20$ min, RT, $U = 3-30V$) wykazały, że nanoporowata powłoka wytwarzana przy użyciu napięcia 6V (TNT6) zawierała nanoziarna formy krystalicznej TiO₂ – rutylu [HA3]. Potwierdzeniem była analiza danych

dyfrakcji rentgenowskiej z zastosowaniem stałego kąta padania (GIXRD) (obecność sygnału przy $2\theta = 44^\circ$ [46]) oraz wysokorozdzielczej transmisyjnej mikroskopii elektronowej (HRTEM; obecność uporządkowanych płaszczyzn sieciowych z odległością międzypłaszczyznową $d = 0.24$ nm, korespondująca z wartością odpowiednią dla fazy rutyłu [47]). Dodatkowym potwierdzeniem obecności ziaren rutyłu było pojawienie się pasm przy 447 i 618 cm^{-1} na widmie Ramana, które przypisałam drganiom Ti-O i O-Ti-O rutyłu [HA3]. Z kolei warstwa TNT15 okazała się być układem amorficznym zawierającym ziarna TiO_2 anatazu. Nie udało się tego dowieść przy użyciu metody GIXRD, ale potwierdzeniem obecności krystalitów anatazu było uzyskanie obrazu HRTEM z widocznymi uporządkowanymi płaszczyznami sieciowymi o odległości międzypłaszczyznowej $d = 0.33$ nm, odpowiadającej wartości dla struktury anatazu [48]. Dodatkowo na widmie Ramana tego układu pojawiały się pasma przy 516 i 640 cm^{-1} , które przypisałam drganiom Ti-O i O-Ti-O anatazu [HA3]. Wyniki badań GIXRD oraz Ramana wykazały, że pozostałe warstwy są amorficzne.

We wszystkich przypadkach powłok tlenkowych wytwarzanych poprzez anodowanie powierzchni podłoży ze stopu Ti6Al4V, w warunkach: elektrolit - 0.3% HF, $t = 30$ min, RT, $U = 3-60$ V) badania strukturalne z wykorzystaniem metod dyfrakcji rentgenowskiej (GIXRD) oraz spektroskopii Ramana potwierdziły amorficzność wytwarzanych powłok. Natomiast zastosowanie metod spektroskopii odbicia rozproszonego w podczerwieni (DRIFT) i rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronów (XPS) potwierdziło tworzenie się warstw ditlenku tytanu [H1,H2,H3].

Powłoki TNT III generacji wytwarzane są z użyciem elektrolitów zawierających w swoim składzie polarne związki organiczne (np. formamid, N-metyloformamid, dimetylosulfotlenek, glikol etylenowy, glikol dietylenowy, glicerol, metanol) oraz źródło jonów fluoru (np. HF – zazwyczaj 1-6%, NH_4F – do ok. 0.6 %, czwartorzędowe sole amoniowe zawierające jony fluoru) [41,49]. Oprócz wyżej wymienionych związków roztwór elektrolitu może/powinien zawierać od 1 do 5 %wag. wody, a w przypadku niektórych elektrolitów (opartych m.in. na glicerolu lub metanolu) zawartość ta może być większa i wynosić od 25 do 50 %wag. [50]. Warstwy uporządkowanych nanorurek otrzymuje się w szerokim zakresie napięć, tj. od ok. 10 do ponad 100 V oraz w szerokim zakresie czasów prowadzenia procesu – od kilku minut do około 100 h (Rysunek 4). Obecność wody w elektrolicie ogranicza proces chemicznego roztwarzania górnej powierzchni nanorurek. Zmieniając skład elektrolitu, a także czas i napięcie anodowania możliwe jest otrzymanie nanorurek w bardzo szerokim zakresie długości (od kilku μm do nawet 1000 μm), średnic (do kilkuset nm) oraz grubości ścianek (do około 50 nm) [49,50]. W swoich badaniach, jako elektrolit stosowałam roztwór glikolu etylenowego z dodatkiem wody (0.3, 1 i 2%) oraz 0.2 M kwasu fluorowodorowego. Proces anodowania prowadziłam w czasie od 2 do 4h [HA4]. Badania strukturalne z wykorzystaniem metod spektroskopii odbicia rozproszonego w podczerwieni (DRIFT) oraz spektroskopii Ramana potwierdziły tworzenie się warstw ditlenku tytanu oraz ich amorficzność.



Rysunek 4. Obrazy SEM powłok złożonych z nanorurek III generacji ($U=30V$, $t=2h$, $H_2O_2 = 1\%$) [HA4].

Istotnym parametrem opisującym powierzchnię wytwarzanych warstw złożonych z uporządkowanych nanoporów i nanorurek jest ich średnica. Analiza danych literaturowych oraz wyniki moich prac wyraźnie wskazują na wpływ średnicy nanorurek/nanoporów na właściwości mechaniczne powłok TNT, ich zwilżalność, aktywność fotokatalityczną czy też bioaktywność [HA1,HA2,HA3,38,43]. Czynnikiem pozwalającym na precyzyjną kontrolę wymiarów powstających nanoporów/nanorurek jest wartość przyłożonego napięcia. Wpływa on znacząco zarówno na przekroczenie bariery dyfuzyjnej, migrację jonów w warstwie tlenku oraz szybkość rozpuszczania się powstających tlenków na skutek tworzenia się kompleksu $[TiF_6]^{2-}$ [51]. Przy określonym potencjale ustala się stan równowagi między procesami tworzenia się tlenku w wyniku utleniania metalicznego podłoża oraz chemicznego trawienia. W rezultacie otrzymujemy warstwy o średnicy nanoporów/nanorurek zależnej od przyłożonego napięcia [45, HA1]. Początkowo wzrost potencjału w zakresie 3-10 V powoduje liniowy wzrost średnicy nanoporów od ok. 14 do ok. 38 nm (Tabela 1). Zastosowanie wyższych potencjałów ($U = 12-30V$) wpływa na szybszy wzrost średnicy nanorurek (41-120 nm), a pojawiająca się zmiana trendu wiąże się z przejściem z formy nanoporowatej do rozseparowanych nanorurek [45, HA1].

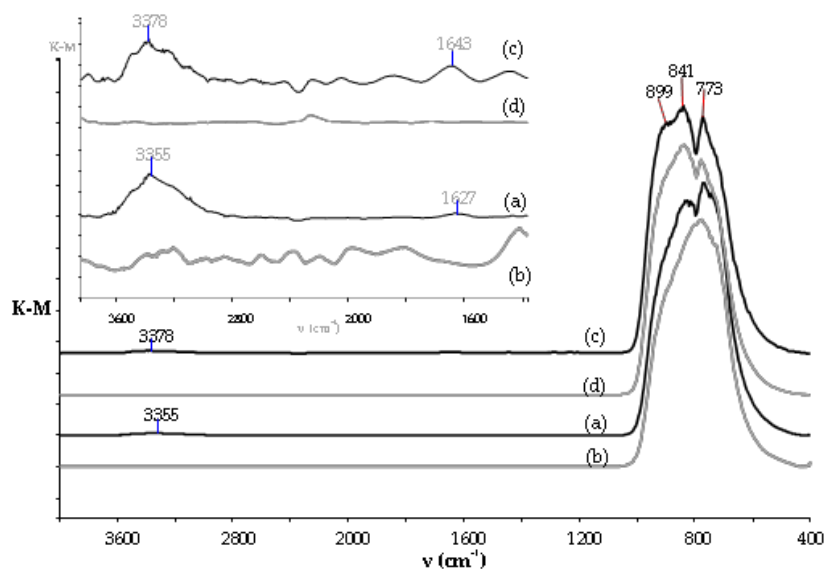
Jednym z ważniejszych celów mojej pracy było określenie wpływu morfologii wytwarzanych powłok tlenkowych na ich zwilżalność i wartość swobodnej energii powierzchniowej [HA1,HA2]. Warstwy złożone z uporządkowanych nanoporów wykazywały właściwości hydrofobowe, a kąt zwilżania dla wody, w zależności od średnicy nanoporów zmieniał się od około 60° (TNT3) do blisko 90° (TNT5, TNT6) i ponownie malał do ok. 55° (TNT10) [HA1]. Wartości swobodnej energii powierzchniowej wyznaczone metodą Owena-Wendta [52] wynosiły dla układów nanoporowatych odpowiednio 42.5-48.6 mJ/cm^2 . Natomiast powierzchnie warstw złożonych z uporządkowanych nanorurek ditlenku tytanu wykazywały charakter hydrofilowy, który zwiększał się wraz ze zwiększaniem się średnicy nanorurek, np. wartość kąta zwilżania dla powłok TNT30 była już mniejsza niż 20° [HA2]. Tak duża różnica w zwilżalności nanorurek i układów nanoporowatych wynika z możliwości penetrowania przez molekuly wody wnętrza nanorurek. Dla nanorurek o większej średnicy penetracja wody do wnętrza rurek jest ułatwiona i tym samym bardziej skuteczna [HA1]. Zmiana średnicy nanorurek ma swoje odzwierciedlenie także w wartościach swobodnej energii powierzchniowej. Uzyskane wyniki wskazują, że choć nieznacznie, ale jednak zauważalnie, wraz ze wzrostem średnicy nanorurek wzrasta wartość swobodnej energii powierzchniowej (z 47.6 (mJ/cm^2) dla TNT20 do 53.7 (mJ/cm^2) dla TNT60)

co należy rozumieć jako zwiększenie sił przyciągania między cząsteczkami znajdującymi się w warstwie powierzchniowej i w objętości materiału [HA2, 53].

Właściwości mechaniczne wytworzonych przeze mnie nanoporowatych, nanorurkowych oraz gąbczastych powłok określiłam w oparciu o analizę wyników badań nanoindentacji (pozwalającej wyznaczyć takie własności, jak nanotwardość i moduł Younga) oraz badań adhezji metodą nanoscratch testu [HA2]. Ogólnie należy stwierdzić, że twardość stopu tytanowego zmodyfikowanego powierzchniowo warstwą nanoporowatą lub warstwą nanorurek jest większa od twardości czystego stopu. Wartość tego parametru rośnie wraz ze wzrostem średnicy porów/nanorurek, a maleje dla układów gąbczastych (wartości twardości układów Ti6Al4V/TNTU wynoszą odpowiednio: Ti6Al4V – 6,18 GPa (próba referencyjna); Ti6Al4V/TNT5 – 7.42 GPa, Ti6Al4V/TNT15 – 16.23 GPa, Ti6Al4V/TNT30 – 16.81 GPa, Ti6Al4V/TNT40 – 9.42 GPa, Ti6Al4V/TNT50 – 9.56 GPa, Ti6Al4V/TNT60 – 14.32 GPa) [HA2]. Zmiany wartości modułu Younga (E) przebiegają w podobny sposób, to znaczy wartość E dla stopu tytanowego zmodyfikowanego powierzchniowo warstwą nanoporowatą lub warstwą nanorurek jest większa od jego wartości wyznaczonej dla czystego stopu. Również i w tym przypadku wartość E zwiększa się wraz ze wzrostem średnicy porów/nanorurek, a maleje dla układów gąbczastych [HA2]. Jak już wspomniałam widoczne obniżenie wartości twardości i modułu Younga dla warstw TNT40-60 jest związane ze zmianami ich morfologii powierzchni (Tabela 1, Rysunek 3).

Z uwagi na możliwe wykorzystanie powłok TNT do konstrukcji wyrobów medycznych, ważnym kierunkiem moich prac było określenie wpływu procesów sterylizacji na ich strukturę i morfologię, a także właściwości mechaniczne oraz biologiczne [HA2]. Spośród stosowanych metod sterylizacji, proces autoklawowania jest najszerzej stosowany zarówno w szpitalach, klinikach, jak i prywatnych gabinetach lekarskich [54]. Dlatego zdecydowałam się na zbadanie odporności wytwarzanych warstw o architekturze nanoporowatej, nanorurkowej i nanogąbczastej na działanie nasyconej pary wodnej o temperaturze 121°C i ciśnieniu 120 kPa. Badając to zagadnienie zwróciłam uwagę, że niektóre z powłok TiO₂ wytwarzanych metodą anodowania po zakończeniu sterylizacji zmieniały swoją barwę, co sugerowało zmiany morfologii ich powierzchni. Analiza obrazów SEM pokazała, że architektura powierzchni warstw nanoporowatych (np. TNT5, TNT10) po autoklawowaniu pozostawała nie zmieniona [HA2]. Natomiast autoklawowanie powłok nanorurkowych i gąbczastych (TNT20-TNT60) prowadziło do całkowitego zniszczenia ich architektury. Na powierzchni tworzyły się krystality, które zamykały nanorurki od góry, tworząc ściśle upakowaną zwartą warstwę powierzchniową [HA2]. Zmiany morfologii zachodzące podczas autoklawowania obserwowano już wcześniej, jednak brak jest doniesień tłumaczących to zjawisko, jak i informacji o sposobach zmierzających do jego zapobiegnięciu [54-57]. Poszukując wyjaśnienia obserwowanych zmian przeprowadziłam szczegółową analizę widm Ramana i IR DRIFT powłok wytwarzanych na powierzchni podłoża Ti6Al4V w zakresie napięć 5-60V. Interpretując uzyskane wyniki zwróciłam uwagę na obecność śladowych ilości wody chemisorbowanej na powierzchni powłok TNT20-60 (Rysunek 5). Sugeruje to, że obecność tej wody może być przyczyną degradacji nanoarchitektury rurkowej w warunkach prowadzenia autoklawowania. Z tego względu zdecydowałam się na zastosowanie dodatkowej procedury suszenia, polegającej na zanurzeniu układów Ti6Al4V/TNT (potraktowanych wcześniej strumieniem argonu) w acetonie, a następnie ich powolnym wygrzewaniu w temperaturze 121°C. Opracowana procedura doprowadziła

do usunięcia pozostałości wody z powierzchni badanych powłok (potwierdzeniem są widma IR DRIFT; Rysunek 5) i ustabilizowania nanorurkowej architektury, która poddana procesowi sterylizacji nie ulegała zmianie. Badania spektroskopowe wykazały, że autoklawowanie warstw TNT20-60 (poddanych wyłącznie standardowemu procesowi suszenia) prowadziło nie tylko do zniszczenia architektury powierzchni, ale i przekształceniu amorficznych nanorurek w układy polikrystaliczne. Analiza widm Ramana wymienionych wyżej próbek wykazała obecność słabych pasm przy 450 i 611 cm^{-1} oraz przy 399, 516, i 639 cm^{-1} , co wskazuje na tworzenie się nanoziaren rutylu lub mieszaniny rutyl/anataz. Konsekwencją opisywanych wyżej zmian w trakcie autoklawowania, wynikających z nieuwzględnienia działania destrukcyjnego wody zaadsorbowanej we wnętrzu nanorurek, o średnicach większych niż 78 nm, była zmiana ich właściwości hydrofilowych na hydrofobowe. Potwierdzeniem są wartości kąta zwilżania powierzchni powłok poddanych standardowemu suszeniu argonem i sterylizacji z użyciem autoklawowania, które wynoszą 119° dla TNT20, 129° dla TNT40 oraz 90° dla TNT60 [HA2]. Właściwość ta ma bezpośredni wpływ na zdolność warstwy do adhezji i proliferacji komórek na swojej powierzchni, co zaprezentuję w dalszej części autoreferatu.



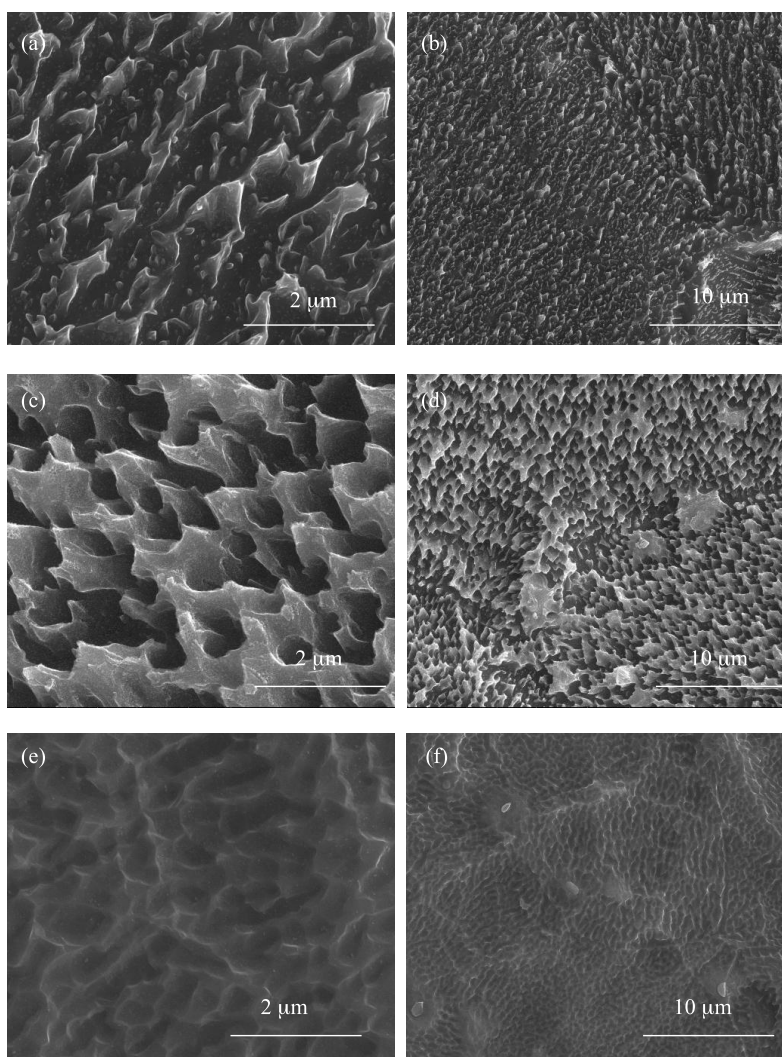
Rysunek 5. Widma IR DRIFT (a) Ti6Al4V/TNT20/Ar, (b) Ti6Al4V/TNT20/Ac, (c) Ti6Al4V/TNT50/Ar, (d) Ti6Al4V/TNT50/Ac; Ar – suszone standardowo argonem, Ac – zanurzone w acetonie i suszone przez 1h w temp. 121°C [HA2].

Jednocześnie wraz ze zmianami struktury i morfologii powierzchni zmianom uległy właściwości mechaniczne układów poddanych autoklawowaniu [HA2]. Obserwowane obniżenie twardości (rzędu 5-10 GPa) oraz modułu Younga (o 60-170 GPa) przypisałam homogenizacji powierzchni i zanikowi uporządkowanej architektury nanorurek [HA2]. Analizowałam także zmiany adhezji powłok ditlenku tytanu po procesie autoklawowania (scratch test). Okazało się, że proces parowej sterylizacji wpłynął na obniżenie adhezji warstw do podłoża, na co bezpośredni wpływ mogło mieć zwiększenie szorstkości powłok [HA2]. Wpływ efektu zwiększenia szorstkości warstwy na obniżenie jej adhezji do podłoża obserwowali również w swoich pracach Cedillo-Gonzalez i współpracownicy [58]. Zmiany struktury i morfologii powierzchni powłok TNT, które zachodzą w trakcie procesu autoklawowania oraz wiążące się z tym zmiany ich zwilżalności i właściwości

mechanicznych, mają szczególne znaczenie w przypadku sterylizacji parowej wszelkiego rodzaju wyrobów medycznych z tytanu i stopu Ti6Al4V zmodyfikowanych powierzchniowo.

Przedstawione dotychczas wyniki moich prac dotyczyły powłok ditlenku tytanu wytwarzanych metodą anodowania powierzchni podłoża z tytanu lub stopu Ti6Al4V z użyciem potencjału o stałej wartości. Analizując dane literaturowe zwróciłam uwagę na prace Schmuki'ego i współpracowników dotyczące wytwarzania powłok TNT z użyciem cyklicznie zmieniającego się potencjału podczas procesu anodowania stopu tytanowego [59,60]. Zastosowanie tej metody pozwoliło na uzyskanie powłok TNT III generacji złożonych z nanorurek typu „łodyga bambusa” lub „nanokoronek”. Prowadząc proces anodowania i zmieniając w sposób cykliczny potencjały $U_1 = 120V$ i $U_2 = 40V$, wytwarzano powłoki złożone z nanorurek o gładkich ściankach wewnętrznych, jednak na zewnątrz odseparowanych od siebie zgrubieniami. Taka modyfikacja prowadziła do utrzymywania równych odległości między nanorurkami i jednocześnie wzmocniła mechanicznie wytwarzane warstwy [59,60]. Kontrolowane rozpuszczanie gładkich fragmentów nanorurek „bambusowych” wytworzonych według wyżej opisanej procedury i pozostawienie poprzecznych elementów, doprowadziło do wytworzenia warstw złożonych z pierścieni w kształcie plastrów miodu, ułożonych warstwami jedne nad drugimi, które nazwano powłokami nanokoronkowymi [59,60]. Opierając się na wynikach prac Schmuki'ego zdecydowałam się na wytwarzanie powłok TNT III generacji metodą dwuetapową z cyklicznie zmieniającym się potencjałem, modyfikując ją poprzez zastosowanie niższych wartości potencjałów, tj. $U_1 = 30V$ i $U_2 = 10V$ (pierwszy etap: 6 cykli zmian po 5 minut) i $U_3 = 30V$ i $U_4 = 0V$ (drugi etap: 6 cykli zmian trwających odpowiednio 50 sekund i 10 minut) [HA4]. Jako elektrolitu użyłam roztworu glikolu etylenowego z dodatkiem 0.2M kwasu fluorowodorowego i różnych ilości wody (0.3, 1, and 2 %wag.) [HA4]. W rezultacie uzyskałam trzy różne pod względem morfologii powłoki [HA4]. Dwie z nich wykazały niespotykaną dotąd morfologię przypominającą „zęby rekina”, stąd układy te nazwałam nanozębami TiO₂ (Rysunek 6 a-d), jedna zaś okazała się materiałem porowatym (Rysunek 6 e,f). Badania strukturalne wykazały, że powyższe układy były amorficzne, czego potwierdzeniem była analiza widm Ramana i GIXRD. Morfologicznie układy te różniły się między sobą, a jedynym parametrem zmiennym w trakcie ich wytwarzania była zawartość wody w elektrolicie III generacji [HA4]. Rozważania dotyczące wpływu zawartości wody w elektrolicie na morfologię powstałych układów tlenkowych to stosunkowo trudny temat, często dość pobieżnie traktowany w dotychczasowej literaturze. Dotychczasowe wyniki wskazują, że woda zawarta w elektrolicie przyspiesza proces rozpuszczania górnej warstwy tlenkowej ograniczając maksymalną wysokość badanych nanorurek. Tłumaczyć można to faktem, że wraz ze wzrostem zawartości wody w elektrolicie zwiększa się jego przewodnictwo i tym samym rośnie szybkość dyfuzji jonów H⁺ i F⁻ kontrolujących proces rozpuszczania zewnętrznej warstwy tlenku [61]. Ponadto obniżeniu ulega lepkość elektrolitu [62]. Zawartość wody wpływa także na średnicę nanorurek, zatem dobierając odpowiednią jej ilość w elektrolicie i optymalizując potencjał (parameter mający bezpośredni wpływ na średnicę nanorurek), możliwe jest uzyskanie nanorurek TiO₂ o naprawdę dużych średnicach, rzędu 600nm [63]. W przypadku prowadzonych przeze mnie procesów anodowego utleniania, w których zawartość wody w elektrolicie była kontrolowana a potencjał był cyklicznie zmieniany, doprowadziłam do zakłócenia równowagi między tworzeniem się ditlenku tytanu na powierzchni granicznej tlenek/podłoże, a chemicznym

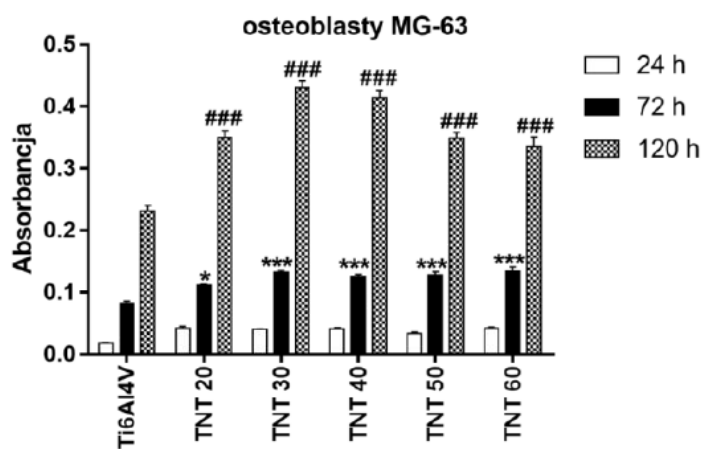
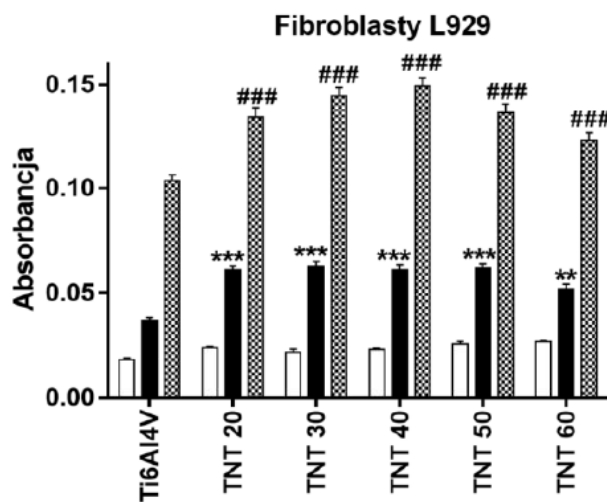
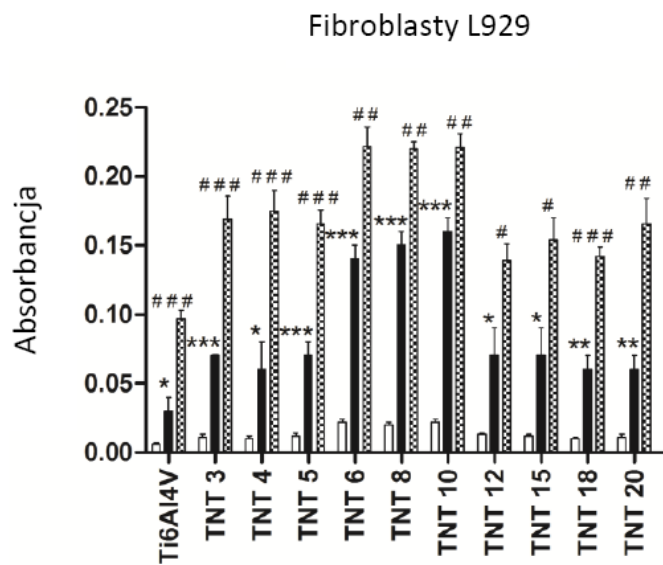
rozpuszczaniem TiO_2 w warstwie zewnętrznej. W przypadku bardzo niskiej zawartości wody w elektrolicie (0.3 %wag.) i cyklicznej zmiany potencjału, warunki samoorganizującego się tworzenia nanorurek były zaburzone. W rezultacie powstawały powłoki tlenku tytanu złożone z rozproszonych „zębów” [HA4]. Zastosowanie roztworu elektrolitu o wyższej zawartości procentowej wody – 2 %wag. doprowadziło do utworzenia warstwy złożonej z gęsto upakowanych „zębów”. Jak pokazało obrazowanie SEM „zęby” te układają się w architekturę niedokończonych „rurek”. Widoczne są regularnie występujące na powierzchni warstwy otwory o średnicach 300–500 nm. Prawdopodobnie zmieniający się cyklicznie potencjał nie pozwolił na prawidłowy, regularny wzrost architektury rurek. W miarę optymalne warunki dla omawianego sposobu utleniania anodowego uzyskałam przez dodanie 1 %wag. wody do roztworu elektrolitu. W powyższych warunkach równowaga między tworzeniem TiO_2 na powierzchni granicznej tlenek/podłoże i jego rozpuszczaniem w warstwie zewnętrznej wydaje się być osiągnięta. W rezultacie powstają wstążki/taśmy, które połączone ze sobą pokrywają równomiernie całą powierzchnię podłoża (Rysunek 6) [HA4].



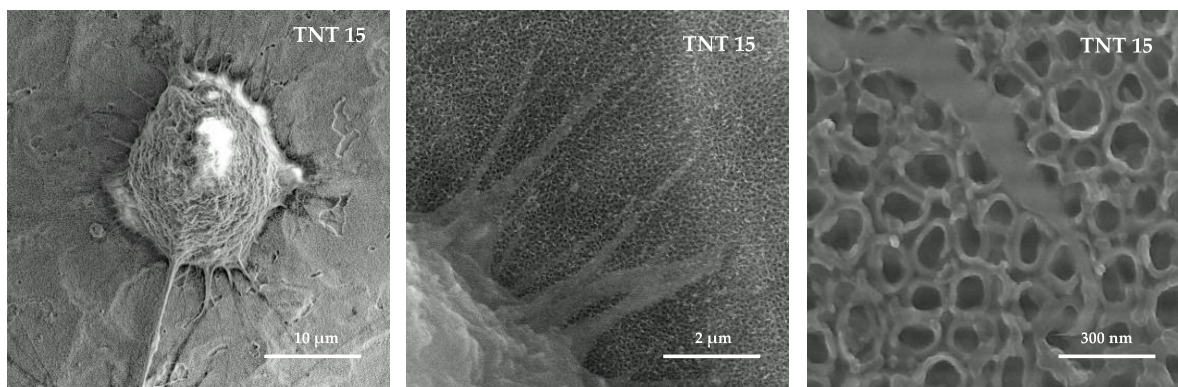
Rysunek 6. Powłoki TiO_2 o morfologii nanozębów (a-d) i warstwa TiO_2 porowata (e,f) [HA4].

Potencjalne wykorzystanie nanopowłok ditlenku tytanu wytwarzanych metodą anodowania podłoży z tytanu i stopu Ti6Al4V do modyfikacji powierzchni implantów kostnych, wymagało oceny ich aktywności biologicznej. Celem tych badań było znalezienie układu, który wykazując odpowiednie właściwości biointegracyjne będzie jednocześnie aktywnie uczestniczył w zwalczaniu stanów zapalnych, mogących występować tuż po jego wszczępieniu oraz w dalszej eksploatacji. Kombinacja tych dwóch ważnych właściwości – biointegralności i przeciwwzapalności jest niezwykle pożądana dla dzisiejszej implantologii, bowiem z jednej strony implant powinien uczestniczyć w procesach rekonstrukcji kości, zaś z drugiej przeciwdziałać tworzeniu się biofilmu bakteryjnego, który mógłby wywołać proces zapalny w tkankach wokół implantu.

Szeroko stosowanym sposobem oceny przebiegu procesów adhezji i proliferacji komórek na powierzchni wytwarzanych powłok jest przeprowadzenie testu MTT [64]. Jego celem jest określenie ewentualnego działania cytotoksycznego zmodyfikowanej powierzchni podłoża, na linie komórkowe które nanosi się na analizowane powłoki (test ten zalecany jest jako referencyjny przez międzynarodowe organizacje normotwórcze). Do powyższych badań stosowane były najczęściej komórki mysich fibroblastów linii L929, a dla wybranych powłok komórki ludzkich osteoblastów linii M63 [HA1,HA2,HA4,45]. Oceny adhezji żywych komórek i ich zdolności do rozmnażania się na powierzchni badanych powłok ditlenku tytanu dokonywałam w oparciu o analizy pomiarów przeprowadzonych po 24 godzinach, 72 godzinach i 5 dniach. Otrzymane wyniki wykazały, że modyfikacja powierzchni stopu Ti6Al4V metodą anodowania wpłynęła korzystnie na przebieg procesów adhezji i proliferacji zarówno komórek fibroblastów, jak i osteoblastów (Rysunek 7) [HA1,HA2]. Ponadto stwierdziłam, że przebieg powyższych procesów na powierzchni warstw utworzonych przez uporządkowane nanopory TiO₂ wskazywał na ich lepszą biointegralność w porównaniu do warstw utworzonych przez uporządkowane nanorurki, a także warstw o morfologii gąbczastej (Rysunek 7) [HA1,HA2]. Analiza obrazów SEM potwierdziła zakotwiczenie komórek poprzez filopodia na powierzchni powłok TNT już po 24 godzinach, co świadczy o optymalnej topografii podłoża (Rysunek 8) [HA1,HA2]. Filopodia są uważane za jedno z najważniejszych sensorów komórkowych, zbierających informacje o tym, czy dana powierzchnia jest odpowiednia do przylegania i proliferacji komórek, do ich interakcji i migracji do miejsca przeznaczenia [65,66]. Tworzenie się filopodiów jest zatem dowodem na biointegracyjne właściwości badanych warstw.



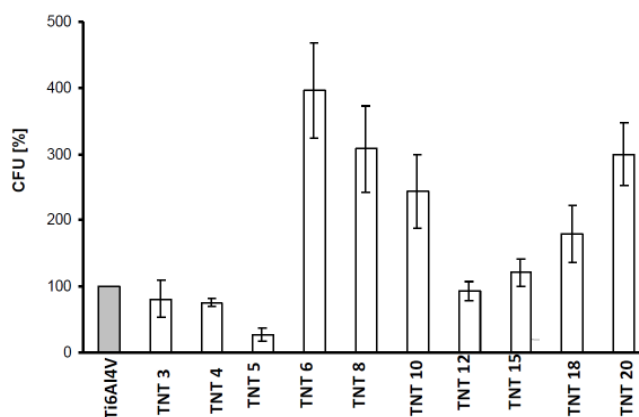
Rysunek 7. Wykresy przedstawiające adhezję i proliferację komórek fibroblastów i osteoblastów warstw nanoporowatych, nanorurkowych i nanogąbczastych TNT



Rysunek 8. Obrazy SEM przedstawiające adhezję fibroblasta do powierzchni TNT15 i wnikanie filopodiów do wnętrza nanorurek.

Spośród układów otrzymanych w wyniku procesu elektrochemicznego utleniania stopu Ti6Al4V z zastosowaniem cyklicznie zmieniającego się potencjału, najlepsze właściwości biontegracyjne wykazywał materiał porowaty. Obrazowanie SEM pokazujące sposób wiązania się fibroblastów z powierzchnią materiału wykazało wręcz nierozróżnialność materiału biologicznego i chemicznie wytworzonej warstwy TiO₂ [HA4]. To podobieństwo morfologiczne, wręcz biomimetyka tych układów, może stanowić podstawę potencjału aplikacyjnego materiału.

Aktywność przeciwzapalna implantu ściśle wiąże się z jego właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi. Z tego względu w ramach prowadzonych przeze mnie prac dokonałam oceny aktywności wytwarzanych powłok ditlenku tytanu przeciwko tworzeniu się biofilmu bakteryjnego *Staphylococcus Aureus* ATCC 29213 (*S. aureus*, gronkowiec złocisty), przy użyciu metody płytkowej oraz metody barwienia fluorescencyjnego LIVE/DEAD. Spośród analizowanych układów najwyższe działanie hamujące tworzenie się biofilmu *S. aureus* ATCC 29213 wykazywały układy nanoporowate wytworzone przy potencjale $U = 3-5V$, szczególnie powłoka TNT5 (Rysunek 9) [HA1]. Działanie to przypisałam hydrofobowym właściwościom nanoporowatych warstw, z których najwyższą hydrofobowość wykazywała powłoka TNT5 [HA1].

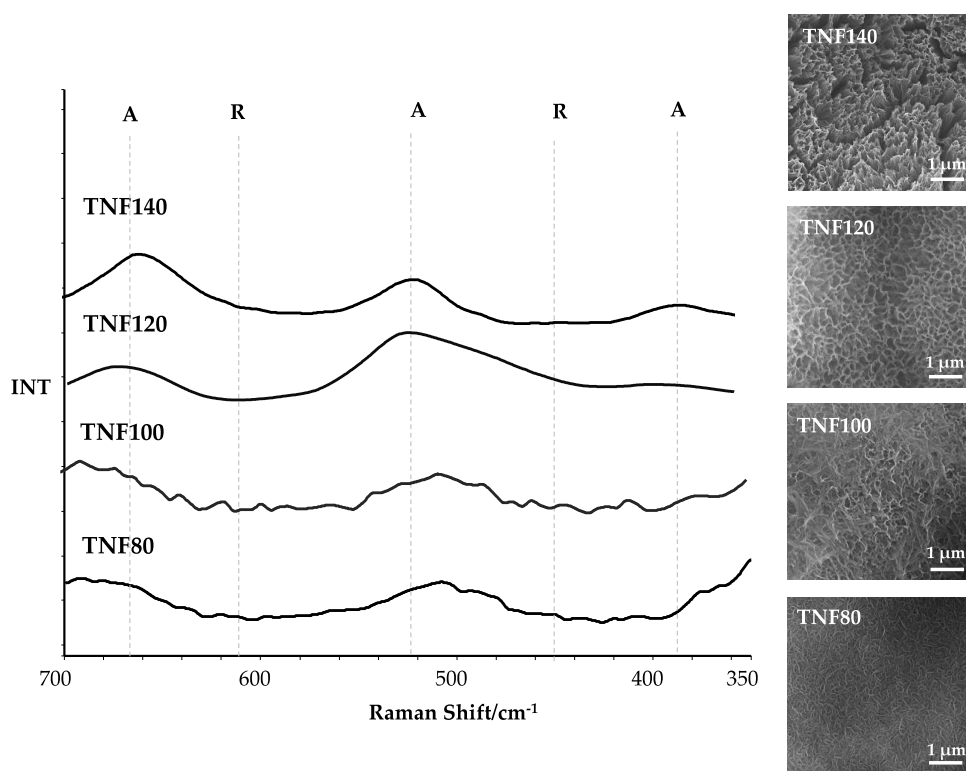


Rysunek 9. Ilość komórek szczepu bakteryjnego *S. aureus*/biofilm bakteryjny na powierzchni stopu Ti6Al4V oraz TNT3-20.

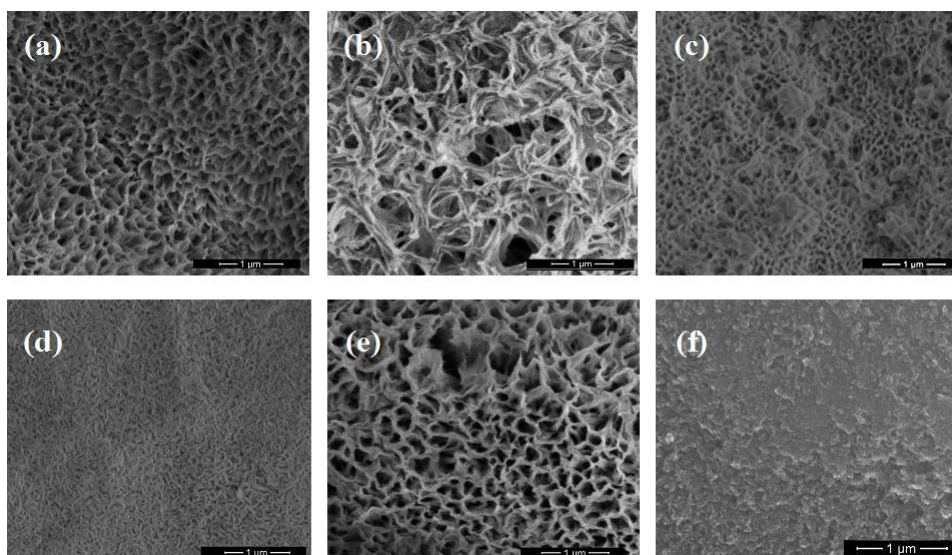
Dla warstw TNT12-TNT20, złożonych z uporządkowanych nanorurek, zauważyć można było rosnącą liczbę komórek bakteryjnych wraz ze wzrostem średnicy nanorurek oraz ich hydrofilowości [HA1]. Potwierdza to, że hydrofilowy charakter warstw nanorurek sprzyja adhezji i namnażaniu się na nich bakterii. Stymulujący efekt tworzenia się biofilmu bakteryjnego, który odnotowałam dla próbek TNT6-TNT10 nie jest do końca zrozumiałą i wymaga dodatkowych wyjaśnień. Zwiększona adhezja bakterii do powierzchni nanorurkowych i nanoporowatych jest uważana przez Pucketta za wynik ich chropowatości i amorficzności [67]. Moje badania wykazały, że powłoki TNT6-TNT10 były amorficzne, co w połączeniu z ich wysoką chropowatością powierzchni [HA1] może prowadzić do znacznego zwiększenia ich wrażliwości na przyłączenie bakterii. Puckett i in. zwrócili także uwagę na dość niejednoznaczną rolę jonów fluorkowych, które są obecne, z racji wykorzystania kwasu fluorowodorowego do wytwarzania powłok TNT [67]. Według nich obecny na powierzchni powłoki TNT fluor może zwiększać adhezję bakterii. Z drugiej strony wcześniejsze badania potwierdziły działanie przeciwbakteryjne spowodowane obecnością fluoru [68,69]. Wyniki badań XPS warstw TNT3-TNT20 potwierdziły, że powłoki TNT utworzone podczas procesów anodowania zawierają jony fluoru, a największe stężenie fluoru obserwowałam dla próbek TNT5 [HA1]. Może to być czynnik, który dodatkowo zwiększa przeciwbakteryjną aktywność tej powłoki. Badania prowadzone przez Ercana [70], Pucketta [67], Huo [71] oraz Kummera [55] wskazują, że istnieje zależność pomiędzy średnicą nanorurek/nanoporów budujących warstwę zewnętrzną tytanu lub stopu poddanego procesowi elektrochemicznego utleniania, a zdolnością komórek bakteryjnych do przylegania do tej warstwy. U pierwszego z nich wzrost średnicy nanorurek powodował spadek ilości komórek bakteryjnych (*S. aureus* i *S. epidermidis*), które przylegały do warstwy nanorurek [70]. Nanorurki o średnicy 80 nm wykazywały zdecydowanie wyższą aktywność przeciw tworzeniu się biofilmu bakteryjnego, aniżeli te o średnicy 20 nm [70]. Ale już w pracy Kummera warstwa złożona z nanorurek o średnicy 20 nm okazała się być lepszą powłoką przeciwbakteryjną niż warstwa nanorurek o średnicy 40 nm [55]. Przeprowadzone przeze mnie badania pokazują, że pod uwagę należy wziąć nie tylko średnicę nanorurek, ale także ewentualne różnice w hydrofilowości, chropowatości i składzie chemicznym (np. obecność śladowych ilości jonów fluoru) [HA1,HA3].

Opisane wyżej wyniki dotyczące zastosowania elektrochemicznego utleniania do modyfikacji powierzchni podłoży tytanowych oraz stopu Ti6Al4V, wykazały że metoda ta umożliwia wytwarzanie głównie amorficznych powłok TiO₂ o zróżnicowanej nanoarchitekturze, pozwalając na kontrolę ich właściwości fizykochemicznych, mechanicznych oraz aktywności biologicznej [H1-H4]. Kolejny etap moich prac związany był z wykorzystaniem chemicznego utleniania tytanu i stopu Ti6Al4V za pomocą 30% roztworu nadtlenu wodoru [HA3,HA5,HA6]. Zastosowanie tej metody pozwoliło na wytworzenie warstw ditlenku tytanu o nanowłóknistej architekturze (TNF) (Rysunek 10) [HA6]. Zaletą tej techniki była możliwość kontroli struktury krystalicznej wytwarzanych powłok poprzez zastosowanie odpowiedniej temperatury procesu (T = 80, 100, 120, 140°C). Analiza widm Ramana wykazała, że w temperaturach 80 i 100 °C otrzymywałam amorficzne powłoki TNF, a w temperaturze 140°C uzyskiwałam nanowłóknistą warstwę anatazu (Rysunek 10) [HA6]. Dodając do roztworu utleniającego prostych substancji nieorganicznych, takich jak np. HCl, NaCl, Na₂SO₄, CaCl₂ i KCl, miałam możliwość wpływu na strukturę warstw TNF [HA3,HA5]. Obrazowanie SEM włóknistych powierzchni próbek powstałych w wyniku chemicznego utleniania powierzchni podłoża tytanowego wykazało

ściśły związek między składem mieszaniny utleniającej i czasem procesu, a morfologią utworzonych powłoki. Jednolite warstwy bez pęknięć i przerw uzyskałam stosując roztwór H_2O_2 lub mieszaniny utleniające zawierające dodatki, takie jak: HCl , $NaCl$, $CaCl_2$ i Na_2SO_4 (Rysunek 11 (a), (b), (c), (d), (e)) i prowadząc proces przez 72 h [HA3]. Zastosowanie mieszaniny H_2O_2/KCl doprowadziło do wytworzenia warstwy o niewłóknistej morfologii, ale z gęstym upakowaniem ziarnem TiO_2 (Rysunek 11 (f)). Wyniki badań SEM-EDS (elektronowa mikroskopia skaningowa sprzężona z energo-dyspersyjną mikrosondą elektronową) potwierdziły, że ditlenek tytanu jest głównym produktem procesów utleniania. Wykazały one również, że żadna z powłok TNF otrzymanych przy użyciu mieszaniny utleniającej z dodatkiem soli sodowych nie zawierała atomów sodu. Natomiast badania powłoki TiO_2 wytworzonej przy użyciu mieszaniny utleniającej $H_2O_2/CaCl_2$ dowiodły obecności atomów wapnia w strukturze utworzonego materiału, których zawartość rosła wraz z wydłużaniem czasu utleniania [HA5]. Wykorzystując metodę dyfrakcji rentgenowskiej (GIXRD) określiłam struktury krystaliczne wytwarzanych warstw TNF. Analiza tych danych pozwoliła ustalić, że stosowanie mieszaniny utleniającej $H_2O_2/CaCl_2$ prowadziło do otrzymania powłok amorficznych, zaś H_2O_2/HCl - nanowłókien TiO_2 anatazu. Badania GIXRD powłok wytwarzanych przy zastosowaniu H_2O_2 oraz mieszanin $H_2O_2/NaCl$ i H_2O_2/Na_2SO_4 wykazały obecność w ich strukturze mieszaniny tytanianów, uwodnionego ditlenku tytanu oraz ditlenku tytanu w postaci amorficznej i krystalicznej [HA3].

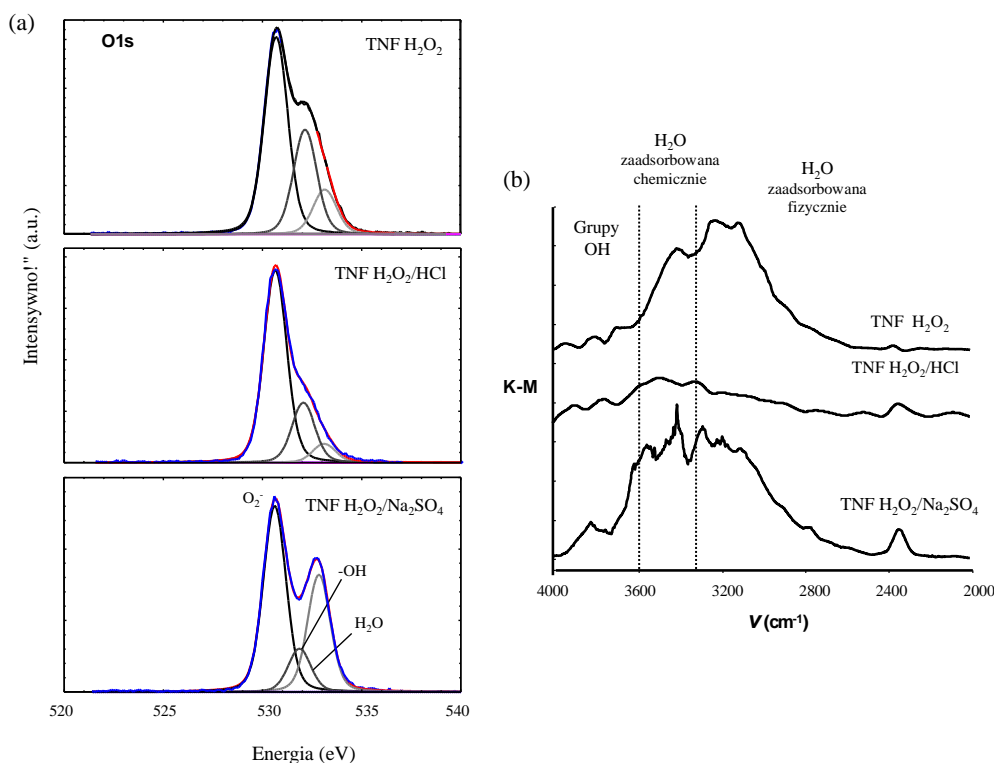


Rysunek 10. Widma Ramana i obrazy SEM nanowłókien wytworzonych w temperaturach: 80, 100, 120 i 140 °C, z użyciem H_2O_2 [HA6]



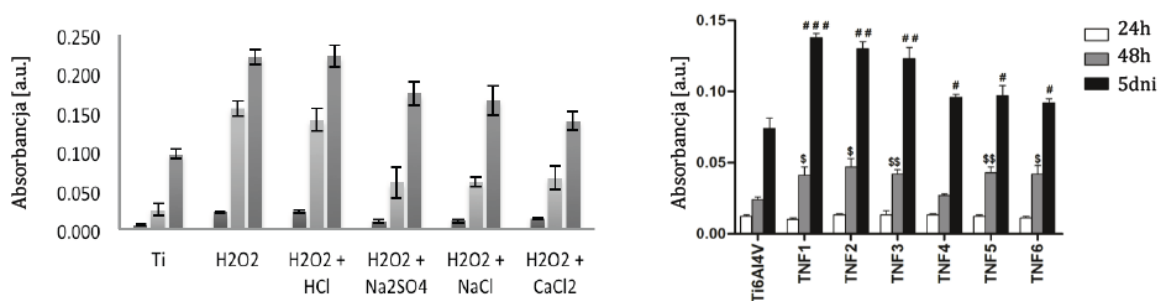
Rysunek 11. Obrazy SEM nanowłókien otrzymanych podczas utleniania chemicznego ($T = 80^{\circ}\text{C}$; $t = 72\text{h}$) przy użyciu (a) H_2O_2 , (b) $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HCl}$, (c) $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NaCl}$, (d) $\text{H}_2\text{O}_2/\text{CaCl}_2$, (e) $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Na}_2\text{SO}_4$, (f) $\text{H}_2\text{O}_2/\text{KCl}$ [HA3].

Tworzenie się nanokryształów anatazu przy zastosowaniu mieszaniny $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HCl}$ potwierdziłam analizując widma Ramana wytwarzanych powłok TNF [HA3]. Dowiodły one również amorficzności warstw TNF otrzymywanych przy zastosowaniu $\text{H}_2\text{O}_2/\text{CaCl}_2$ oraz potwierdziły obecność tytanianów w strukturze warstw otrzymywanych przy zastosowaniu H_2O_2 , $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NaCl}$ i $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Na}_2\text{SO}_4$. Na widmach powyższych układów widoczne były także dodatkowe bardzo słabe pasma sugerujące obecność anatazu lub mieszaniny anatazu-rutyl w ich strukturze [HA3]. Zastosowanie rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronowej (XPS) pozwoliło ustalić, że tylko powłoki TNF wytwarzane z mieszaniny $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HCl}$ są powłokami czystego ditlenku tytanu (Rysunek 12(a)) [HA3]. W pozostałych badanych przypadkach analiza danych XPS wskazała na tworzenie się warstwy hydratu ditlenku tytanu lub tytanianów. W przeciwieństwie do danych EDS analiza ta wykazała również obecność atomów sodu (2,91%) na powierzchni powłoki TNF otrzymywanej przy zastosowaniu $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Na}_2\text{SO}_4$, co dodatkowo może potwierdzać tworzenie się tytanianów [HA3,72]. Obecność grup $-\text{OH}$ i cząsteczek H_2O na powierzchni powłok została poza wynikami XPS potwierdzona dodatkowo metodą IR DRIFT. Analiza tych widm pozwoliła przypisać pasma przy $2800\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$ i $3300\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$, odpowiednio drganiom rozciągającym zaadsorbowanych fizycznie i związanych chemicznie cząsteczek wody [HA3,73,74]. Pasma pojawiające się powyżej 3600 cm^{-1} przypisałam powierzchniowym grupom $-\text{OH}$ (Rysunek 14(b)) [HA3]. Amorficzne powłoki TNF uzyskałam także na powierzchni stopu tytanowego Ti6Al4V poddanego działaniu H_2O_2 oraz $\text{H}_2\text{O}_2/\text{CaCl}_2$ w temperaturach 80 i 100°C prowadząc ten proces przez 8 i 12 h [HA5].



Rysunek 12. Widma XPS i DRIFT nanowłókien TiO₂ [HA3].

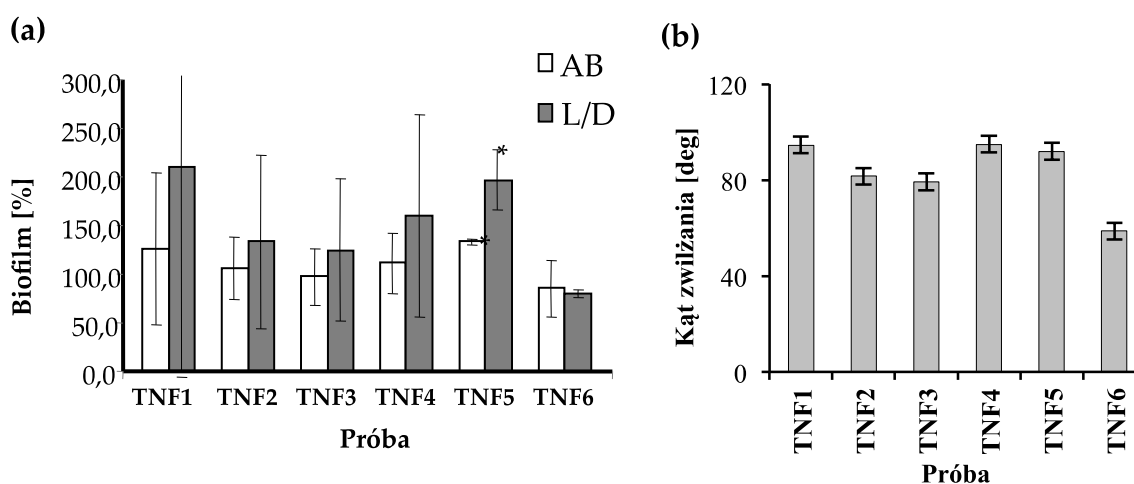
Aktywność biologiczną wytwarzanych warstw TNF oceniłam na podstawie badań biointegracyjnych i mikrobiologicznych. Wyniki przeprowadzonych testów z udziałem komórek fibroblastów linii L929 wykazały, że w przypadku powłok TNF wytwarzanych przy zastosowaniu H₂O₂ oraz H₂O₂/HCl, ich adhezja i proliferacja wzrosła ponad dwukrotnie w porównaniu do próby referencyjnej, którą stanowił tytan (Rysunek 13a) [HM1]. Natomiast najslabiej zadziałała amorficzna powłoka TNF, którą wytworzyłam z użyciem H₂O₂/CaCl₂. Układy wytworzone na stopie Ti6Al4V z użyciem tylko H₂O₂ i H₂O₂/CaCl₂ jako mieszaniny utleniającej charakteryzowały się również wysoką biogodnością warstw (Rysunek 13b) [HA5].



Rysunek 13. Wyniki testu MTT z użyciem nanowłókien na tytanie i na stopie Ti6Al4V [HM1,HA5]

Analiza wyników badań nad mikrobiobójczością powyższych powłok nanowłókien na podłożach Ti6Al4V wskazuje na niewielką aktywność przeciw bakteriom *S. aureus*. Jedynie warstwy TNF otrzymane z mieszaniny H₂O₂/CaCl₂ wykazały działanie hamujące tworzenie biofilmu wyżej wymienionego szczepu bakteryjnego (próbą referencyjną jest Ti6Al4V, dla którego procent tworzenia biofilmu wynosi 100). Potwierdzają to wyniki badań przeprowadzonych z wykorzystaniem testów Alamar Blue i Live/Dead (Rysunek 14(a)). Aktywność mikrobiobójcza powłok TNF koreluje ze zmianami wartości kąta zwilżania (Rysunek 14(b)). Dane z Rysunku 14b wskazują jednoznacznie na charakter hydrofobowy badanych warstw TNF. Jedynie w przypadku powłoki wytwarzanej z użyciem mieszaniny H₂O₂/CaCl₂ kąt zwilżania był bliski 65 (wzrost charakteru hydrofilowego), co wpłynęło na najwyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową [HA5].

Zastosowanie metody chemicznej do modyfikacji powierzchni podłoży tytanowych i stopu Ti6Al4V poprzez ich utlenianie nadtlenkiem wodoru w temperaturze 80-100°C doprowadziło do otrzymania amorficznych powłok TiO₂ charakteryzujących się nanowłóknistą architekturą powierzchni. Krystaliczne formy TNF uzyskałam stosując wyższe temperatury procesu utleniania: w 120°C uzyskałam warstwę amorficzną zawierającą ziarna anatazu, a w 140°C anataz (Rysunek 10) [HA6]. Dodatek wymienionych wcześniej związków nieorganicznych do roztworu utleniającego skutkowało wytworzeniem powłok TNF o strukturze anatazu, mieszaniny anatazu/rutyli, tytanianów lub zhydratowanego TiO₂. O ile otrzymane warstwy wykazywały dobre właściwości biointegracyjne, to ich aktywność w zwalczaniu biofilmu bakteryjnego nie była najlepsza. Zatem opisana wyżej metoda modyfikacji powierzchni tytanu i stopu Ti6Al4V nie spełniła moich oczekiwań i założonego kierunku badań.



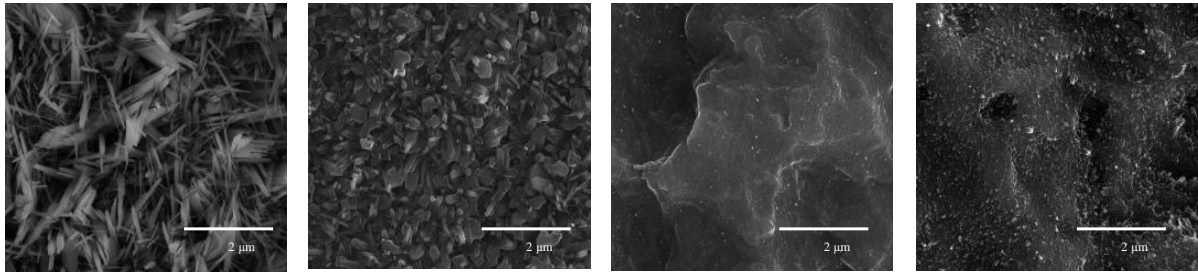
Rysunek 14. Aktywność mikrobiobójcza (a) i zwilżalność (b) powłok TNF otrzymanych w wyniku utleniania z użyciem H₂O₂ (TNF1-TNF3) i H₂O₂/CaCl₂ (TNF4-TNF6) [HA5]

Interesującą metodą z punktu widzenia aplikacyjnego, która zwróciła moją uwagę było utlenianie termiczne [HA5,HA6,HM1]. W technice tej wykorzystuje się śladowe ilości tlenu zawarte w gazie obojętnym (stosowałam argon), które w zakresie temperatur 500-900°C prowadzą do wytworzenia warstwy nanoprętów TiO₂ (TNW) na powierzchni tytanu lub jego stopów [75-77]. Z geometrycznego punktu widzenia ten rodzaj architektury oferuje

wyjątkowe właściwości (np. elastyczność i odporność na zmęczenie), wynikające z kontrolowanego kierunku wzrostu. Czasami do opisu morfologii nanoprętów w literaturze używa się nazwy „nanowłókna” zwłaszcza, gdy nanopręty są bardzo długie i nie monokrystaliczne. Aby jednak uzyskać morfologię nanoprętów, niezbędne jest zapewnienie wzrostu nanokryształów wzdłuż jednego zdefiniowanego kierunku. To wymaganie jest wypełnione samoistnie w przypadku niektórych kryształów, z powodu silnych anizotropowych właściwości ich struktur krystalicznych. Na przykład kryształy wurcytu mają naturalnie szybki wzrost wzdłuż kierunku [0001] i z tego powodu nanopręty są jedną z preferowanych morfologii podczas ich wzrostu. W przypadku ditlenku tytanu, anizotropowość jest mniej oczywista i tworzenie się nanoprętów wymaga dodatkowego działania wspierającego utworzenie nanotopografii 1D [78]. Wśród tych dodatkowych działań wspierających wzrost nanoprętów należy wymienić funkcjonalizację powierzchni, wprowadzanie dyslokacji i stosowanie katalizatorów. Bardziej szczegółowe strategie kontroli morfologii kryształów podane są w artykułach przeglądowych [79-82].

Wystawienie czystego tytanu na działanie argonu, zawierającego śladowe ilości tlenu, przy przepływie gazu obojętnego 200 cm³/min przez 8 h w temperaturze 600°C, prowadziło do utworzenia warstwy nanoprętów ditlenku tytanu o strukturze rutylu [82]. Należy podkreślić tutaj wpływ szybkości przepływu argonu na morfologię nanostrukturalnego TiO₂. Zwiększenie prędkości przepływu z 200 cm³/min do 1000 cm³/min powoduje zanik nanoprętów. Efekt degradacji morfologii nanoprętów potęgowany jest dodatkowo przez wzrost temperatury. Wyższa szybkość przepływu gazu i wyższa temperatura sprzyjają wzrostowi nie nanoprętów, lecz płytek i kryształów ditlenku tytanu. Ta sama procedura utleniania termicznego stopu Ti6Al4V w obecności argonu, zarówno przy niskim, jak i wysokim natężeniu przepływu, daje takie same wyniki – nanopręty ditlenku tytanu. Optymalna temperatura utleniania stopu Ti6Al4V w celu uzyskania nanoprętów TiO₂ wynosiła 700°C [75-77]. W temperaturze 800°C uzyskano mieszaninę nanoprętów i dobrze wykształconych morfologicznie kryształów, zaś w temperaturze 900°C powstawały jedynie połączone ze sobą płytki i wielościennie kryształy [76,77]. Wpływ wysokiej temperatury na powstawanie równoosiowo rosnących kryształów wskazuje, że wzrost jednowymiarowy w temperaturze niższej jest konsekwencją anizotropii z preferencyjnym wzrostem na niektórych powierzchniach kryształów. W wyższych temperaturach anizotropia maleje, a promowany jest wzrost na innej powierzchni, co w konsekwencji prowadzi do tworzenia się wielościennych kryształów [76,77].

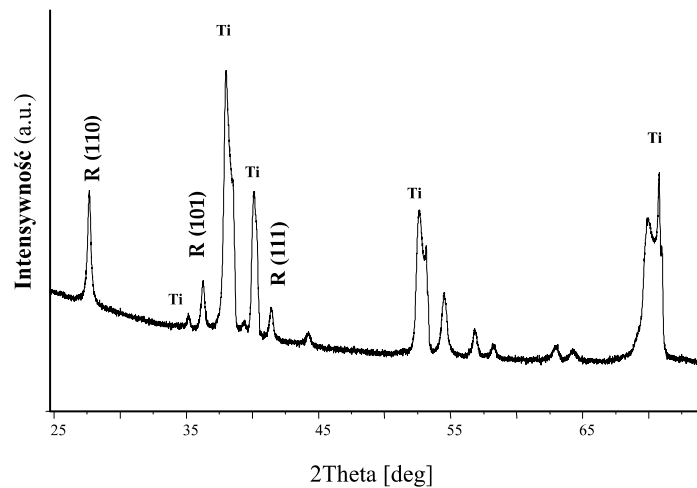
Biorąc pod uwagę wyniki dotychczasowych prac nad przebiegiem procesu termicznego utleniania zdecydowałam się na jego modyfikację. Zastosowałam niższe natężenia przepływu argonu (30 cm³/min) oraz niższe temperatury (475-550°C). W powyższych warunkach otrzymywałam powłoki złożone z dobrze kierunkowo zorientowanych nanoprętów (Rysunek 15(a)) [HA5]. Powyżej tej temperatury, tj. przy 600°C, utrzymując ten sam przepływ gazu, otrzymałam wielościennie kryształy (Rysunek 15(b)). Dodanie par H₂O₂ do gazu nośnego spowodowało, że tworzenie nanoprętów praktycznie zostało zahamowane (Rysunek 15(c)). Wydłużenie czasu procesu utleniania termicznego z 2h do 6h wpłynęło nieznacznie na poprawę tworzenia się nanoprętów oraz wielościennych kryształów (Rysunek 15d). Nie udało się jednak uzyskać układów podobnych do tych otrzymanych w obecności czystego argonu [HA5, HM1].



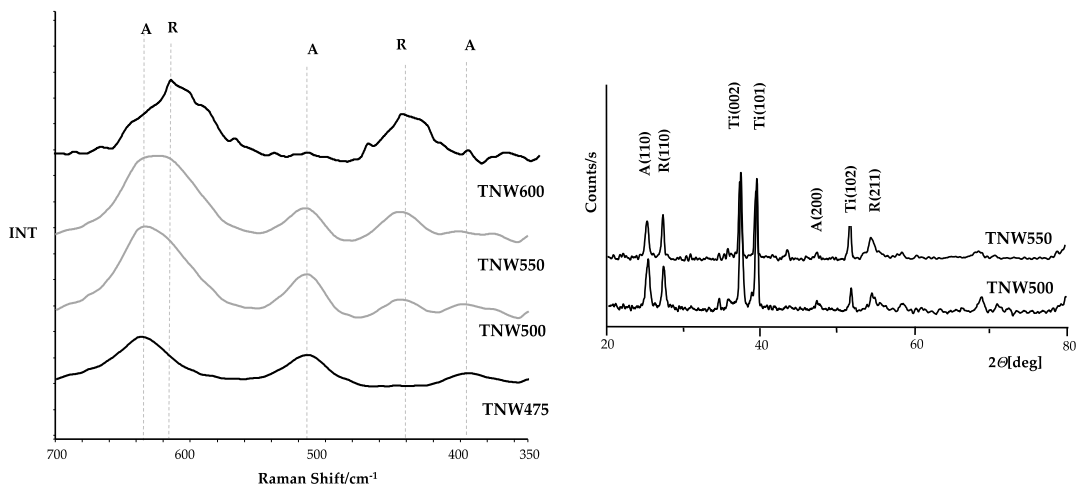
Rysunek 15. Obrazy SEM powierzchni nanoprętów oraz wielościennych kryształów otrzymywanych podczas termicznego utleniania Ti6Al4V bez udziału par H₂O₂ (a,b) oraz z ich udziałem (c,d)

Różnice w morfologii nanoprętów TiO₂ są konsekwencją mechanizmu termicznego utleniania Ti6Al4V, który opiera się na modelu Deal-Grove'a [83]. Zgodnie z tym mechanizmem, we wczesnych stadiach utleniania, początkowa warstwa tlenku powstaje w reakcji bezpośredniego utleniania powierzchni. Gdy jednak warstwa tlenku staje się grubsza, skala czasowa procesu dyfuzji utleniacza przez tę warstwę przewyższa skalę reakcji utleniania na granicy faz TiO₂/Ti i wzrost nanoprętów staje się zależny od procesu dyfuzji utleniacza przez warstwę tlenkową.

Analiza danych GIXRD podłoża Ti6Al4V utlenianego termicznie przez 6 godzin, w obecności czystego argonu (30 cm³/min) i w temperaturze 500°C, potwierdziła tworzenie się rutylu (Rysunek 16) [HA5]. Skrócenie czasu procesu do 90 minut spowodowało, że warstwy TNW otrzymane w temperaturze 475°C wykazywały strukturę anatazu. Powłokę TNW, którą tworzyły nanopręty czystego rutylu otrzymałam w temperaturze 600°C, natomiast w zakresie 500-550°C mieszaninę anataz/rytul. Dowodzą tego widma Ramana i GIXRD (Rysunek 17) [HA6].



Rysunek 16. Widmo GIXRD warstwy nanoprętów TiO₂ (T = 500°C, t = 6h, Ar - 30 cm³/min)



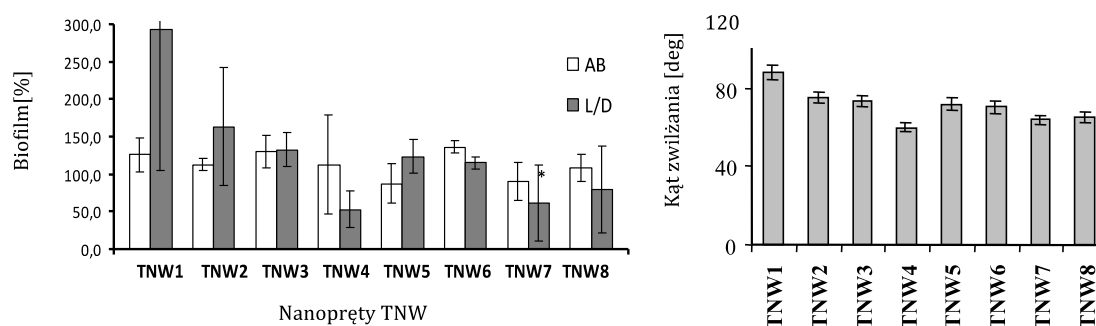
Rysunek 17. Widma Ramana i GIXRD dla nanoprętów otrzymanych przez utlenianie powierzchni Ti6Al4V w temperaturze 475, 500, 550 i 600°C [HA6]

Analiza widm Ramana próbek nanoprętów uzyskanych w procesie termicznego utleniania stopu tytanu z użyciem mieszaniny Ar/H₂O₂, ujawniła obecność słabych lub bardzo słabych pasm przy 325, 520 i 640 cm⁻¹ (słabe pasmo przy 640 cm⁻¹ pokrywa się z silnym pasmem przy 612 cm⁻¹ postaci rutylu), co wskazywać by mogło na obecność rozproszonych ziaren anatazu. Obecność anatazu w strukturze nanoprętów można wytłumaczyć niepełnym przejściem fazowym anataz-rutyl w zakresie temperatury 475–500°C. Jednak intensywność pasm przypisanych formie rutylu wskazuje, że jest to forma dominująca [HA5].

Kształt nanoprętów ditlenku tytanu opisywany jest jako przypominający igłopodobne krystaliczne włókna hydroksyapatytu i kolagenu znajdujące się w kości. Taka architektura podłoża może zapewniać komórkom odpowiednią żywotność i funkcjonalność. Badania adhezji i proliferacji osteoblastów przeprowadzone przez Tan i współpracowników wykazały, że osteoblasty są w stanie przylegać i rozprzestrzeniać się na powłoce nanoprętów, a po 14 dniach tworzyć sieć międzykomórkową [84]. Wyniki moich badań nad adhezją i proliferacją fibroblastów na powierzchni wytwarzanych warstw nanoprętów wykazały, że procesy te przebiegają efektywniej na ich powierzchni, niż na próbce referencyjnej, którą był stop Ti6Al4V [HA5].

Wyniki badań mikrobiologicznych nad tworzeniem się biofilmu gronkowca złocistego (*S. aureus*) na próbkach nanoprętów przedstawiłam na Rysunku 18(a). Ogólny wniosek z badań jest taki, że powierzchnia nanoprętów nie hamuje rozwoju biofilmu bakteryjnego. Najlepsze działanie przeciwbakteryjne wykazywały warstwy TNW4, TNW7 i TNW8. Jednocześnie należy zwrócić uwagę, że powierzchnie wszystkich analizowanych powłok TNW wykazują charakter hydrofobowy (Rysunek 18(b)). Spośród nich powłoki TNW4, TNW7 i TNW8 charakteryzują się najmniejszymi wartościami kątów zwilżania (60–70°), co koreluje z wykazywaną przez nie aktywnością przeciwbakteryjną [HA5].

Podobnie jak w przypadku powłok nanowłóknistych (TNF), warstwy nanoprętów (TNW) stwarzały odpowiednie warunki do adhezji i proliferacji komórek fibroblastów [HA5]. Jednak ich aktywność w zwalczaniu biofilmu bakteryjnego nie była zadowalająca. Zatem metoda termicznego utleniania metalicznych podłoży także nie spełniła moich oczekiwań i nie doprowadziła do uzyskania optymalnej pod względem aktywności biologicznej warstwy.



Rysunek 18. (a) Wyniki badań mikrobiologicznych (stopień hamowania biofilmu bakteryjnego) dla nanoprętów TNW, (b) zwilżalność nanoprętów TNW [HA5].

Podsumowując, spośród trzech zastosowanych metod modyfikacji powierzchni tytanu i stopu Ti6Al4V, mogących służyć do konstrukcji implantów kostnych, najbardziej odpowiednią jest metoda elektrochemicznego utleniania. Pozwoliła ona otrzymać powłoki TNT o wysokiej biogodności i optymalnych właściwościach mechanicznych. Wśród nich znalazły się i takie, które ze względu na nanoarchitekturę powierzchni, wykazują odpowiednią aktywność przeciwdrobnoustrojową. Kulkarni i współpracownicy dowiedli, że poza wspomnianą nanoarchitekturą powierzchni nanorurek TiO₂, także ich wzbogacenie, w przeciwdrobnoustrojowe nanocząstki np. srebra lub cynku lub funkcjonalizowanie środkami przeciwzapalnymi, powinno wpłynąć na zwiększenie ich aktywności przeciwbakteryjnej [30]. Zgodnie z powyższym zdecydowałam się na przeprowadzenie badań nad wzbogacaniem powłok ditlenku tytanu, wytwarzanych metodą anodowania powierzchni tytanowych i stopu Ti6Al4V, nanocząstkami srebra i nanokryształami hydroksyapatytu, jako czynnikami wspomagającymi ich aktywność mikrobiobójczą.

Spośród wielu metod stosowanych do wytwarzania nanocząstek, w swoich badaniach zdecydowałam się na użycie metod chemicznego osadzania z fazy gazowej (CVD) oraz osadzanie warstw atomowych (ALD). Na wybór ten wpłynęło posiadane przez mnie doświadczenie w stosowaniu metod CVD do wytwarzania nanowarstw ditlenku cyrkonu i ditlenku tytanu [85-91], a także praktyczna znajomość metod ALD. W przypadku tej ostatniej metody wykorzystałam doświadczenie, nabyte podczas krótkoterminowych staży podoktorskich (w ramach grantu UMK dla Młodych Pracowników oraz w ramach STSM – Short Term Scientific Mission w projekcie COST HERALD) w grupie badawczej Prof. Markku Leskela w *Centre of Excellence in ALD* na Uniwersytecie w Helsinkach. Grupa ta specjalizuje się w optymalizowaniu procesów wytwarzania cienkich powłok o grubości atomowej/molekularnej z użyciem metody ALD. Wymienione wyżej metody używane są głównie do wytwarzania metalicznych lub niemetalicznych warstw ciągłych przeznaczonych np. dla elektroniki, optyki i optoelektroniki [26,27]. Stosunkowo niewiele jest doniesień literaturowych na temat ich wykorzystania dla celów wytwarzania bioaktywnych nanomateriałów. Zauważyłam, że dobierając odpowiedni prekursor, a także warunki prowadzenia procesu osadzania z fazy gazowej, możliwe jest wytwarzanie nanopowłok złożonych ze zdyspergowanych nanocząstek o kontrolowanej wielkości, kształcie i strukturze. Z tego względu zdecydowałam się na zbadanie możliwości wykorzystania obu wspomnianych wyżej metod do wzbogacania wytwarzanych

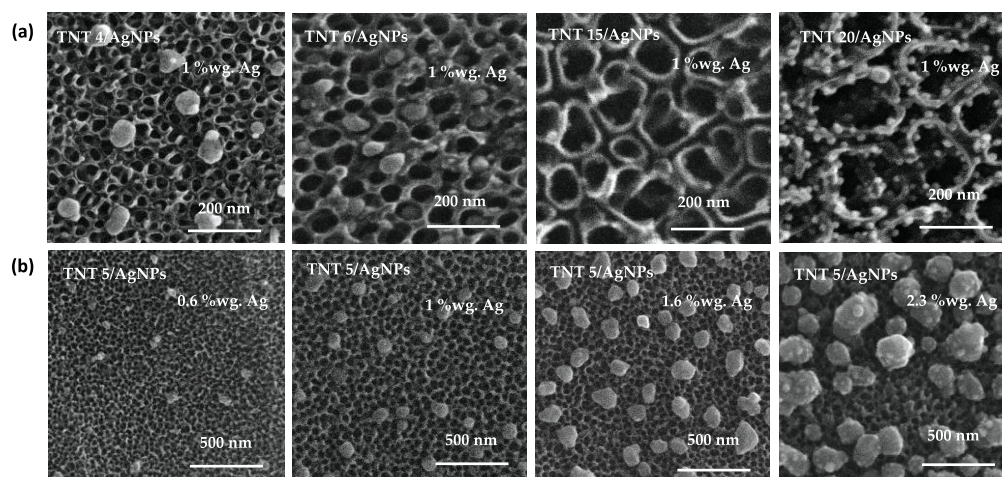
nanoporowatych i nanorurkowych powłok ditlenku tytanu nanocząstkami o sprawdzonych wcześniej właściwościach przeciwdrobnoustrojowych.

Srebro i jego nanocząstki należą do najstarszych i najlepiej sprawdzonych w praktyce środków mikrobiobójczych, które stosowane są w medycynie, farmacji, kosmetologii, przemyśle włókienniczym, a także w budownictwie [HM2]. Wyjątkowe właściwości fizykochemiczne nanocząstek, które wynikają z dużego stosunku powierzchni do objętości, mają bezpośredni wpływ na efekt ich silnego działania przeciwdrobnoustrojowego przy zachowaniu niewielkiego stężenia. To powoduje, że od wielu lat prowadzone są prace nad użyciem nanocząstek srebra (AgNPs) w implantologii. Pomimo intensywnych badań, mechanizm biobójczego działania AgNPs nie został w pełni wyjaśniony [HM2]. Efekt ich wielokierunkowego działania na drobnoustroje polega na: (a) niszczeniu błony komórkowej bakterii w wyniku bezpośredniego kontaktu z powierzchnią (oddziaływania z grupami tiolowymi), (b) bakteriobójczego działania jonów srebra uwalnianych w wyniku utleniania AgNPs w środowisku płynów ustrojowych (jony te przenikając przez błonę komórkową bakterii zaburzają produkcję ATP i replikację DNA) oraz (c) generowania przez AgNPs wolnych rodników tlenkowych, o niekorzystnym działaniu na DNA i błonę komórkową [HM2]. Do końca nie został również poznany wpływ nanocząstek srebra na komórki organizmu ludzkiego. Analiza danych literaturowych wskazuje, że przekroczenie stężenie srebra 10 mg/dm^3 staje się niebezpieczne dla zdrowia człowieka [HM2]. Niemniej jednak olbrzymia skuteczność nanocząstek srebra w zwalczaniu bakterii, grzybów oraz wirusów czyni AgNPs atrakcyjnym środkiem, który wzbogacając powierzchnię implantu może znacząco zredukować tworzenie się biofilmu bakteryjnego. Aby wykorzystać metodę CVD do wzbogacania nanocząstkami srebra powierzchni warstw wytwarzanych w wyniku anodowania podłoży tytanowych i ze stopu Ti6Al4V, koniecznym było dokonanie wyboru odpowiedniego prekursora AgNPs. Należało wybrać związek srebra(I), którego termiczny rozkład w trakcie procesów CVD będzie prowadził do osadzania rozproszonych nanocząstek srebra, bez zanieczyszczania powłoki produktami jego termicznego rozkładu [HM2]. Ważnym aspektem przy wyborze prekursora była również jego tania i nieskomplikowana synteza. Kolejnym problemem był dobór temperatury osadzania i wzrostu AgNPs, w której nie następowałoby zniszczenie nanoporowatej i nanorurkowej architektury powierzchni powłoki. Opierając się na pracach badawczych prowadzonych w Katedrze Chemii Nieorganicznej i Koordynacyjnej Wydziału Chemii UMK w Toruniu nad prekursorami CVD metalicznego srebra [92-95], w swoich pracach używałam początkowo pentafluoropropionianu Ag(I) o wzorze: $[\text{Ag}(\text{OOC}\text{C}_2\text{F}_5)]$ (jako podłoże stosowałam tytan) [HA7], a następnie trihydratu tego związku o wzorze: $[\text{Ag}_5(\text{OOC}\text{C}_2\text{F}_5)_5(\text{H}_2\text{O})_3]$ (jako podłoże stosowałam stop Ti6Al4V) [HA8,HA9]. Temperatury osadzania wynosiły odpowiednio 290°C dla $[\text{Ag}(\text{OOC}\text{C}_2\text{F}_5)]$ i 280°C dla $[\text{Ag}_5(\text{OOC}\text{C}_2\text{F}_5)_5(\text{H}_2\text{O})_3]$ i były niższe od temperatury prowadzącej do destrukcji architektury powłok ditlenku tytanu. Wcześniejsze badania udowodniły, że do temperatury 300°C wytwarzane powłoki zachowywały swoją amorficzność, a morfologia ich powierzchni nie ulegała zmianie [HA7]. Powyżej tej temperatury obserwowałam przemianę fazową amorficznego TiO_2 do anatazu, co łączyło się ze zniszczeniem architektury rurkowej i tworzeniem nanokrystalitów anatazu. Ilość osadzanego srebra na powierzchni wytwarzanych powłok kontrolowałam masą użytego prekursora CVD. Otrzymane wyniki wskazywały na uzyskanie powłok Ti/TNT + 1-1.5 %wag. AgNPs [HA7] i Ti6Al4V/TNT + 0.6-2.3 %wag. AgNPs [HA8,HA9]. Tworzenie się nanocząstek metalicznego srebra potwierdzono metodą GI XRD; linie 38.1° (111), 44.6° (200), 64.7° (220), 64.7° (220) [HA7].

Analizując obrazy SEM zwróciłam uwagę na wyraźny wpływ średnicy nanoporów/nanorurek na wielkość AgNPs i na sposób ich rozmieszczenia na badanych powłokach. Osadzając około 1% wag. sferycznych nanocząstek srebra na Ti/TNT4 (średnica nanoporów 15-20 nm), uzyskiwałam AgNPs o średnicy ok. 45-65 nm, zlokalizowane wyłącznie na powierzchni nanoporów (Rysunek 19a) [HA7, HM2]. Ta sama zawartość procentowa AgNPs na układzie Ti/TNT6 (średnica nanoporów 25-40 nm) skutkowałą zmniejszeniem ich średnicy do 30-45 nm i zlokalizowaniem ich we wnętrzu nanorurek (Rysunek 19a) [HA7, HM2]. Dla powłoki złożonej z nanorurek o średnicy 60-70 nm nanoziarna srebra miały średnicę mniejszą niż 15 nm i były zlokalizowane wewnątrz nanorurek i na ich górnych krawędziach. Zwiększenie stężenia AgNPs na powierzchni układu Ti/TNT wpłynęło na wzrost gęstości upakowania nanocząstek, nie powodując zmian ich średnic [HA7, HM2]. Cząstki o podobnej wielkości i sposobie ich rozmieszczenia wytwarzałam również na powierzchni Ti6Al4V/TNT stosując metodę CVD [HA8]. Wpływ ilości użytego w procesie CVD prekursora na stężenie AgNPs oraz ich średnicę zestawiałam w Tabeli 2, a różnice w gęstości upakowania nanocząstek srebra na powierzchni nanoporowatej warstwy TNT5 przedstawiłam na Rysunku 19b [HA9].

Tabela 2. Wpływ ilości użytego w procesie CVD prekursora na %wag. AgNPs i ich średnicę [HA9]

Masa prekursora [mg]	Ti6Al4V/AgNPs		Ti6Al4V/TNT5/AgNPs	
	wt.%	d (nm)	wt.%	d (nm)
5	0.9	18 ± 8	0.6	38 ± 14
10	1.1	45 ± 15	1.0	43 ± 10
20	1.3	68 ± 32	1.6	57 ± 24
50	2.3	53 ± 18	2.3	115 ± 49



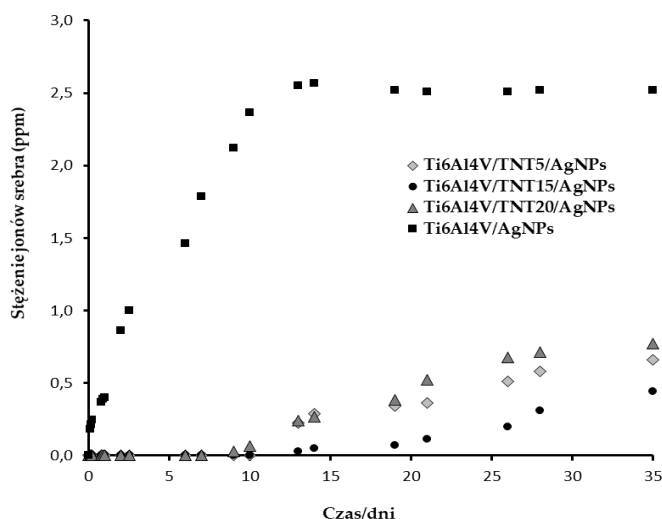
Rysunek 19. Obrazy SEM (a) nanocząstek srebra na układach nanoporowatych i nanorurkach oraz (b) nanocząstek srebra na TNT5, przy wykorzystaniu różnych ilości prekursora.

Badania zwilżalności wytwarzanych warstw nanokompozytowych wykazały zmianę hydrofilowego charakteru układów Ti6Al4V/TNT na hydrofobowy po wzbogaceniu ich nanocząstkami srebra [HA2, HA8]. Zmiany wartości kąta zwilżania wody oraz swobodnej energii powierzchniowej (SEP) zilustrowałam danymi przedstawionymi w Tabeli 3 [HA2, HA8].

Tabela 3. Zmiany wartości kąta zwilżania wody oraz swobodnej energii powierzchniowej (SEP) dla Ti6Al4V, Ti6Al4V/TNT15 oraz tych samych podłoży wzbogaconych nanocząstkami srebra.

	Ti6Al4V	Ti6Al4V/TNT15	Ti6Al4V/AgNPs	Ti6Al4V/TNT15/AgNPs
Kąt zwilżania (°)	108.3	>10	139.1	120.5
SEP (mJ/m ²)	45.37	>72.30	15.09	28.46

Z punktu widzenia oceny właściwości przeciwdrobnoustrojowych badanych układów istotnym było określenie szybkości uwalniania jonów srebra z ich powierzchni w środowisku płynów ustrojowych. W tym celu próbki Ti6Al4V/TNT/AgNPs o różnej średnicy AgNPs i sposobie ich rozmieszczenia na powierzchni warstw TNT zostały zanurzone w buforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS), a obecność uwolnionych jonów srebra badano metodą spektrometrii mas sprzężonej z plazmą wzbudzaną indukcyjnie (ICP MS) [HA7,HA8,HA9]. Szczegółowe badania prowadzone przez 5 tygodni dla układów Ti6Al4V/TNT/AgNPs wykazały, że w ciągu pierwszych 7 dni uwalnianie jonów srebra jest zahamowane (Rysunek 20). Jednak po uwzględnieniu wyników badań aktywności mikrobiobójczej tych układów po 24h należy raczej przyjąć, że stężenie uwalnianych jonów srebra w trakcie tych pierwszych dni było poniżej czułości użytej aparatury [HA9]. W tym samym czasie (tj. po 7 dniach) stężenie jonów Ag⁺ uwalnianych z powierzchni Ti6Al4V/AgNPs osiągnęło wartość około 1.5 mg/dm³, a po 14-stu wartość maksymalną, tj. około 2.5 mg/dm³ i ustabilizowało się na poziomie 2.4-2.5 mg/dm³ (Rysunek 20). Po 14 dniach odnotowano również wzrost stężenia jonów srebra uwalnianych z Ti6Al4V/TNT/AgNPs [HA9]. Otrzymane wyniki wskazują, że stężenie uwalnianych jonów Ag⁺ osiąga wartość maksymalną rzędu 0.5-0.8 mg/dm³. Należy podkreślić, że stężenie to było dużo mniejsze od uznawanego w literaturze za toksyczne dla komórek ssaków [96,97]. Maksymalną wartość stężenia jonów Ag⁺ uwalnianych w roztworze PBS, zależną od sposobu rozmieszczenia AgNPs na powierzchni powłoki TiO₂, stwierdziłam po 5 tygodniach. Sugeruje to przeciwdrobnoustrojową skuteczność układów Ti6Al4V/TNT/AgNPs, którą można wykorzystać przy konstrukcji implantów kostnych o wydłużonym czasie aktywności przeciwpalnej.



Rysunek 20. Zmiany stężenia jonów srebra uwalnianych z powierzchni układów Ti6Al4V/TNTU/AgNPs (dla U = 5, 10 i 15V) oraz Ti6Al4V/AgNPs w czasie.

Ważnym elementem badań układów wzbogaconych nanocząstkami srebra były badania ich właściwości mechanicznych. Biorąc pod uwagę wyniki wcześniejszych badań twardości układów Ti6Al4V/TNT stwierdziłam, że po wzbogaceniu produkowanych powłok przez AgNPs zarówno twardość, jak i moduł Younga powłoki Ti6Al4V/TNT5 wzrosła, a w przypadku powłoki Ti6Al4V/TNT15 zmniejszyła się (Tabela 4). W obydwu przypadkach szorstkość warstwy powierzchniowej wzrastała.

Tabela 4. Właściwości mechaniczne (twardość i moduł Younga) oraz szorstkość układów Ti6Al4V/TNT5 i Ti6Al4V/TNT15 oraz tych samych układów wzbogaconych nanocząstkami srebra [HA8]

	Ti6Al4V/TNT5	Ti6Al4V/TNT15	Ti6Al4V/TNT5/AgNPs	Ti6Al4V/TNT15/AgNPs
Twardość (GPa)	7.42	16.23	9.86	13.60
Moduł Younga (GPa)	229.7	350.6	253.9	287.0
Szorstkość (μm)	0.137	0.075	0.181	0.082

Munirathinam i Neelakantan opisali [98], że szorstkość ma znaczący wpływ na moduł sprężystości nanorurek i tak też jest i w przypadku układów, które badałam. Biorąc pod uwagę, że stosowana podczas procesu CVD temperatura nie powodowała zmiany strukturalnej amorficznych powłok TNT, obserwowany znaczny wzrost szorstkości układu Ti6Al4V/TNT5/AgNPs można wyjaśnić osadzaniem się nanocząstek srebra na nanoporowatej powierzchni TiO_2 . Natomiast w przypadku Ti6Al4V/TNT15/AgNPs, gdy powłokę TNT tworzą uprządkowane nanorurki o większej średnicy (51 ± 9 nm) a nanocząstki srebra osadzają się głównie w ich wnętrzu, nastąpiło tylko nieznaczne zwiększenie się szorstkości powłoki (Tabela 4) [HA8].

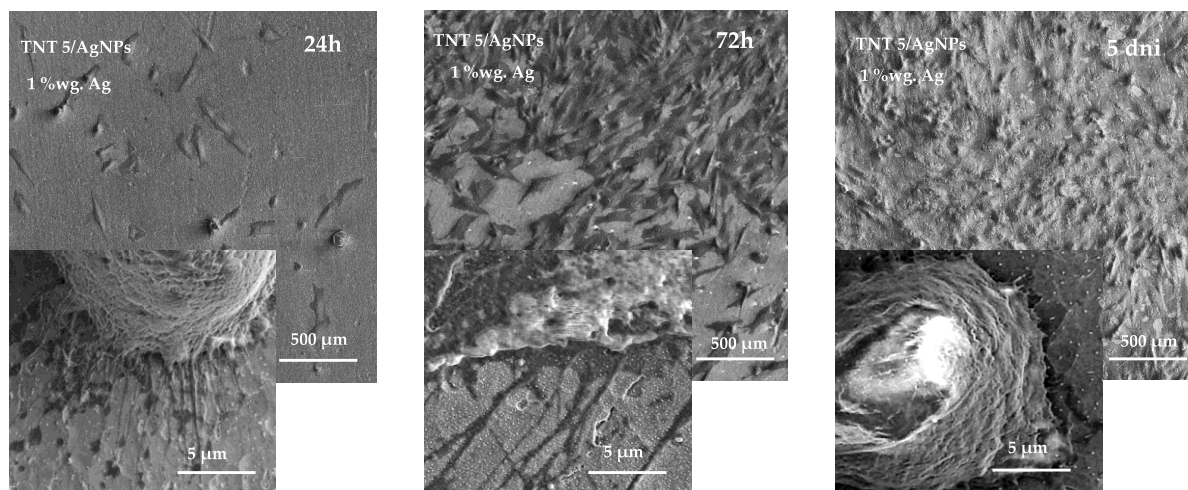
Do oceny przeciwdrobnoustrojowej aktywności warstw TNT wytwarzanych zarówno na powierzchni tytanu, jak i stopu Ti6Al4V wzbogaconych nanocząstkami srebra, użyto szczepu bakteryjnego *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ATCC 29213 szczep referencyjny i *S. aureus* H9 szczep kliniczny). Metodologia badań oparta była o pomiar Live/Dead, oraz barwienie Alamar Blue w celu sprawdzenia aktywności metabolicznej komórek drobnoustrojów. Otrzymane wyniki wskazują na hamujący wpływ nanoporowatego układu Ti/TNT4, na którego powierzchni osadzono AgNPs o średnicach 45-65 nm [HA7]. Efekt ten można przypisać synergicznemu działaniu zarówno srebra, jak i nanoporów, gdyż działanie hamujące tworzenie się biofilmu bakteryjnego zaobserwowałam również we wcześniejszych pracach dotyczących warstwy TNT4 [HA1]. Słabe działanie hamujące zaobserwowałam również dla powłok TNT18 wzbogaconych o AgNPs o średnicy mniejszej niż 15 nm. Pod względem biointegracyjnym układy Ti/TNT/Ag zostały zbadane w oparciu o analizę adhezji i proliferacji fibroblastów z użyciem testu MTT i obrazowania SEM, a także w oparciu o wpływ badanych nanopowłok na produkcję prostaglandyny E_2 (PGE_2) oraz czynnika martwicy nowotworów α (ang. tumor necrosis factor α ; $\text{TNF-}\alpha$) przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (ang. peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) izolowane od szczura, z użyciem testów immunoenzymatycznych ELISA [HA7]. Uzyskane wyniki wykazały, że wszystkie badane powłoki wraz z wydłużeniem czasu inkubacji stymulowały komórki do produkcji większych ilości obu mediatorów zapalenia. W porównaniu do komórek hodowanych na powierzchni podłoża tytanowych stanowiących próby referencyjne, większe ilości PGE_2 były uwalniane przez komórki rosnące na powłokach TNT wzbogaconych AgNPs. Ponadto oznaczenia poziomu $\text{TNF-}\alpha$ wykazały, że warstwy te

pobudzają komórki do wydzielania większych ilości tej cytokiny w porównaniu do podłoży referencyjnych. Oznacza to, że badane powłoki stymulowały jednojądrzaste komórki krwi obwodowej, do których należą głównie limfocyty i monocyty, do wydzielania znacznych ilości PGE₂ i TNF- α . Jest to zjawisko świadczące o dużej biokompatybilności warstwy TNT/AgNPs ze względu na fakt, iż cytokiny i prostaglandyny należą do czynników uczestniczących w interakcjach komórkowych, które mają także istotne znaczenie dla rozwoju macierzy pozakomórkowej. Stanowi ona przestrzeń między komórkami, w której dochodzi do magazynowania czynników wzrostu oraz cytokin, co ma istotne znaczenie w prawidłowym przebiegu gojenia się ran i innych procesów naprawczych. Dodatkowo, prostaglandyna E₂ jest zaangażowana w procesy kościotwórcze, m.in. poprzez stymulację syntezy czynników wzrostu (np. β 1, który stymuluje różnicowanie się osteoblastów). Czynnik martwicy nowotworów α stanowi z kolei cytokinę która może pośrednio indukować proces gojenia się ran poprzez aktywację makrofagów [HA7].

Prowadząc badania nad układami typu Ti6Al4V/TNT/AgNPs starałam się określić minimalne stężenie AgNPs, które zapewniłoby wspomnianym układom odpowiednio wysoką skuteczność przeciwbakteryjną, przy jednoczesnym braku cytotoksyczności i zachowaniu właściwości biointegacyjnych [HA9]. Badania przeprowadziłam dla nanoporowatych warstw Ti6Al4V/TNT5, które wzbogaciłam odpowiednio 0.6, 1.0, 1.6, 2.3 %wag. AgNPs. (Rysunek 21). O wyborze warstwy TNT5 zdecydowała jej dobra biogodność [HA1] oraz lokalizacja AgNPs wyłącznie na powierzchni nanoporowatego podłoża, podobnie jak w przypadku stopu Ti6Al4V. Różnicę pomiędzy wyżej wymienionymi układami stanowiły: (a) morfologia podłoża, (b) wielkość nanocząstek srebra, (c) szorstkość powierzchni oraz (d) ich aktywność biologiczna. Aktywność mikrobiobójczą warstw powierzchniowych oceniono po 24 godzinach oraz 14 i 28 dniach uwalniania jonów srebra do roztworu PBS. Niezależnie od stężenia nanocząstek srebra na powierzchni nanoporowatych warstw TiO₂ obserwowałam zahamowanie wzrostu bakterii *E. coli* i *S. aureus* oraz grzybów *C. albicans*, o 99% w porównaniu do próby referencyjnej Ti6Al4V [HA1]. Otrzymane wyniki wykazały jednoznacznie, że powierzchnia stopu Ti6Al4V zmodyfikowana za pomocą TNT5 i wzbogacona różnymi ilościami nanocząstek srebra okazała się wyjątkowo biobójcza wobec badanych szczepów bakterii i grzybów w porównaniu ze stopem tytanu nie wzbogaconym srebrem.

Poziom biointegracji badanych próbek określono za pomocą testu MTT i analizy obrazów SEM. Otrzymane wyniki badań po 24 i 72 godzinach oraz 5 dniach nie wykazały znaczących różnic w adhezji i proliferacji osteoblastów MG-63 między referencyjnymi warstwami Ti6Al4V i Ti6Al4V/AgNPs. Natomiast układy Ti6Al4V/AgNPs indukowały niewielki spadek proliferacji fibroblastów L929, zwłaszcza po 5 dniach inkubacji dla wszystkich badanych stężeń nanosrebra. Uzyskane wyniki są zbieżne z wynikami innych autorów, którzy wykazali, że osadzone na tytanie srebro zmniejsza proliferację fibroblastów o 20% w porównaniu z próbkami kontrolnymi tytanu [99,100], nie wykazując cytotoksycznego wpływu na komórki osteoblastów. Wyniki testów MTT dla układów Ti6Al4V/TNT5/AgNPs ujawniły, że szybkość proliferacji komórek fibroblastów L929 była wyższa po 5 dniach inkubacji niż na Ti6Al4V, niezależnie od stężenia AgNPs. W przypadku osteoblastów MG-63 po 5 dniach inkubacji obserwowano spadek poziomu proliferacji w porównaniu ze stopem Ti6Al4V, chociaż ich żywotność wynosiła ponad 70% niezależnie od stężenia AgNPs. Zgodnie z normą ISO 10993-1:2018 [101] (Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 1: Ocena i testowanie w ramach procesu zarządzania ryzykiem), jeśli

żywołność komórek spadnie poniżej 70% próby referencyjnej, materiał wykazuje potencjalną cytotoksyczność. Zatem uzyskane wyniki udowodniły, że niezależnie od stężenia AgNPs osadzonych na powierzchni warstwy TNT5, wytworzone układy Ti6Al4V/TNT5/AgNPs wykazywały dobre właściwości biointegracyjne. Dla wszystkich TNT/AgNPs obserwowano wzrost proliferacji fibroblastów L929 i osteoblastów MG-63 w czasie, co potwierdzają nie tylko wyniki testu MTT ale także analiza porównawcza obrazów SEM [HA9]. O dobrych właściwościach biointegracyjnych badanych układów świadczy wyraźny efekt wrastania w nanoporowate podłoże filopodiów zarówno komórek fibroblastów, jak i osteoblastów (Rysunek 21).



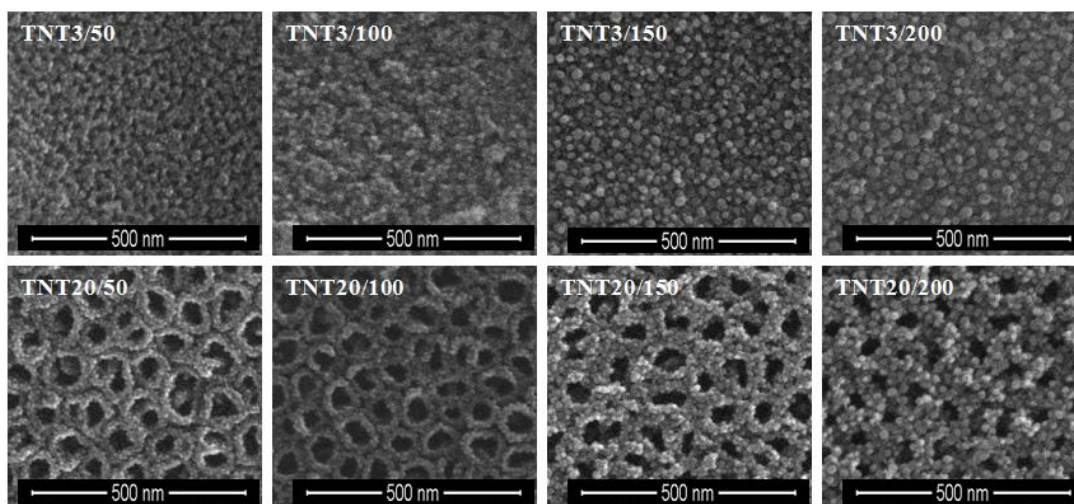
Rysunek 21. Obrazy SEM przedstawiające adhezję (po 24h) i proliferację (po 72h i po 5 dniach) komórek osteoblastów (duże obrazy) i fibroblastów (małe obrazy) [HA9].

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że zastosowanie metody CVD do wzbogacania nanocząstkami srebra nanoporowatych powłok ditlenku tytanu może stanowić odpowiednią metodę wytwarzania długoterminowo działającej powierzchni przeciwdrobnoustrojowej. Otrzymywane w ten sposób biomateriały mogą z powodzeniem rozwiązać problemy związane z tworzeniem się infekcji okołowszczepowej stosowanych obecnie implantów kostnych. Spośród badanych układów wysoką aktywność biobójczą i najbardziej optymalne właściwości biointegracyjne wykazywały podłoża ze stopu Ti6Al4V, których powierzchnia została zmodyfikowana wytworzeniem amorficznej, nanoporowatej powłoki TNT5 i wzbogacona następnie 0.6 %wag. AgNPs (Ti6Al4V/TNT5/AgNPs) [HA9]. Otrzymany w ten sposób biomateriał posiada pożądane właściwości biologiczne, których szkodliwość wynikająca z potencjalnej cytotoksyczności w stosunku do komórek eukaryotycznych została obniżona, poprzez zminimalizowanie liczby nanocząstek srebra.

Alternatywą do opisanego wcześniej chemicznego osadzania z fazy gazowej było użycie do wzbogacania badanych układów Ti6Al4V/TNT techniki osadzania warstw atomowych (ALD). Metoda ta jest stosowana głównie do wytwarzania ciągłych warstw metalicznych lub tlenkowych znajdujących zastosowanie między innymi w mikroelektronice, fotowoltaice, czy też optyce. W przeciwieństwie do CVD charakteryzuje się ona sekwencyjnością procesu oraz samoograniczoną szybkością wzrostu warstwy. Wspomniana wyżej sekwencyjność polega na naprzemiennym wprowadzaniu do komory reaktora dwóch związków chemicznych (stosowanych jako prekursorów), przy czym dawka każdego z prekursorów jest

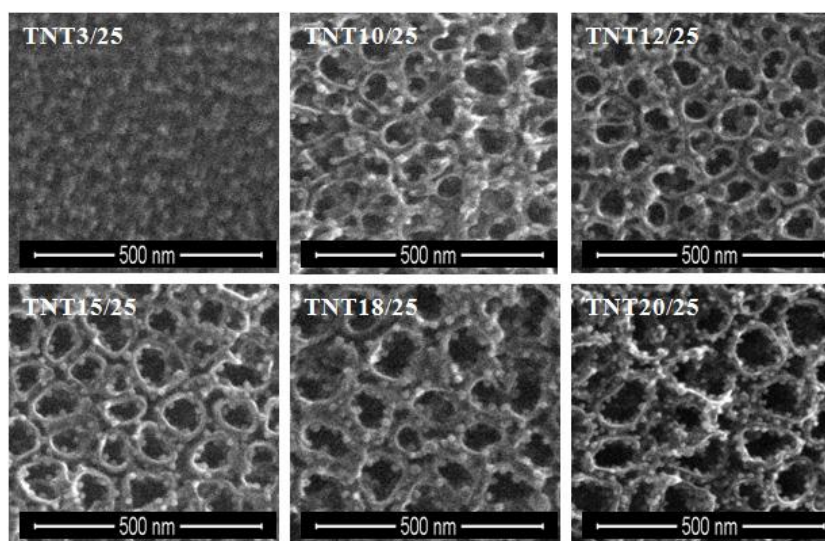
oddzielona od kolejnej „przepłukaniem” komory obojętnym gazem (np. argonem lub azotem) [102, HM2]. Taki sposób wprowadzania prekursorów powoduje, że oba reagenty spotykają się ze sobą jedynie na powierzchni podłoża (substratu), a zachodząca między nimi reakcja chemiczna przebiega wyłącznie na substracie i prowadzi do utworzenia monowarstwy wytwarzanego materiału. Pozwala to na osiągnięcie jednorodności osadzonych warstw oraz na uniknięcie reakcji między prekursorami w fazie gazowej, przed ich dotarciem na podłoże. Powierzchnia substratu zostaje całkowicie pokryta (nasycona) cząsteczkami danego prekursora i każda dodatkowa jego dawka nie powoduje powstania kolejnej monowarstwy. Efekt nasycenia jest zapewniony poprzez dużą reaktywność prekursorów i powoduje, że szybkość wzrostu warstwy wytwarzanego materiału staje się proporcjonalny do liczby cykli (tj. liczby naprzemiennego wprowadzania prekursorów do komory reaktora), nie zależy zaś od ilości wprowadzanego do komory prekursora – jest to tzw. samoograniczenie szybkości wzrostu warstw [103, HM2]. W wyniku reakcji powierzchniowych powstaje w jednym cyklu ALD przy występowaniu efektu nasycenia jedna monowarstwa. W większości prowadzonych procesów ALD wzrost jednolitego filmu na podłożu rozpoczyna się już po pierwszych kilku cyklach. Jednak w przypadku osadzania metali szlachetnych obserwuje się tzw. opóźnienie procesu zarodkowania [104, HM2]. Z powodu różnicy energii powierzchniowej między metalem a podłożem, proces ALD metali szlachetnych zwykle rozpoczyna się od tworzenia wyodrębnionych wysp atomowych na powierzchni. Liczba powstających nanocząstek rośnie wraz z liczbą cykli, nanocząstki łączą się ze sobą (proces koalescencji nanocząstek), co prowadzi do utworzenia ciągłej warstwy. Właśnie ten brak jednolitego zarodkowania na powierzchni substratu uwarunkowany niewielką liczbą cykli wykorzystałam do wytwarzania zdyspergowanych nanocząstek srebra [HA10, HM2]. Procedura ta nie jest powszechnie stosowana i należy wyraźnie zaznaczyć, że uzyskiwanie AgNPs zamiast ciągłej warstwy metalicznej jak dotąd uważane było za niepowodzenie prowadzenia procesu ALD.

W swoich pracach zastosowałam technikę PEALD, tj. procesu ALD wspomaganego plazmą (plasma enhanced atomic layer deposition). Zdyspergowane nanocząstki były osadzane na powierzchni nanoporowatych i nanorurkowych warstw TiO_2 wytwarzanych metodą anodowania przy zastosowaniu potencjałów $U = 3\text{--}20\text{ V}$. Jako prekursorów ALD metalicznego srebra użyłam związku kompleksowego srebra(I) – $[\text{Ag}(\text{fod})(\text{PEt}_3)]$ (fod – 2,2-dimetylo-6,6,7,7,8,8,8-heptafluorooctano-3,5-dionian) oraz wodoru. Znaną już procedurę otrzymywania filmu srebra metodą ALD zmodyfikowałam poprzez ograniczenie liczby cykli do 25, 50, 100, 150 i 200 (standardowo stosuje się 500, 1000 i więcej cykli) [HA10, 105]. Otrzymane przeze mnie wyniki pokazały, że w przypadku powłok nanoporowatych użycie 50-200 cykli osadzania prowadzi w dalszym ciągu do utworzenia warstw złożonych z gęsto upakowanych nanoziaren srebra (analiza widm XPS potwierdziła obecność AgNPs na powierzchni warstw TNT) (Rysunek 22) [HA10]. Obrazy SEM przedstawione na Rysunku 22 na wskazują, że o ile na powierzchni nanoporowatych warstw TNT (TNT3) tworzy się jednolita warstwa metalicznego srebra złożona z gęsto upakowanych ziaren, to w przypadku warstw TNT złożonych z rozseparowanych nanorurek (TNT20), ściśle upakowane ziarna metalu pokrywają górne krawędzie rurek oraz powierzchnie ich ścianek. Wraz ze wzrostem liczby cykli rośnie wypełnienie wnętrza nanorurek [HA10].



Rysunek 22. Obrazy SEM AgNPs osadzanych na powierzchni połok TiO₂ z użyciem metody ALD i liczby cykli 50,100,150 i 200 [HA10].

Zmniejszenie liczby cykli do 25, a tym samym skrócenie czasu trwania procesu ALD do kilkunastu minut, pozwoliło uzyskać zdyspergowane nanocząstki srebra o średnicy 8.5 ± 0.7 nm [HA10]. Dotyczyło to głównie warstw TNT złożonych z rozseparowanych nanorurek o średnicach większych niż 40 nm (TNT12-TNT20). Warstwy TiO₂ złożone z uporządkowanych nanoporów o średnicy mniejszej niż 20 nm nawet przy zastosowaniu 25 cykli osadzania były pokrywane gęsto upakowanymi ziarnami srebra (Rysunek 23).



Rysunek 23. Obrazy SEM AgNPs osadzanych na powierzchni połok TiO₂ z użyciem metody ALD i liczby cykli 25

Oceny bioaktywności dokonałam dla warstw TNT złożonych z nanoporów/nanorurek wzbogaconych nanocząstkami srebra (AgNPs) utworzonych w ciągu 25 cykli procesu ALD. Analiza wyników testów MTT wykazała, że wszystkie analizowane próbki wpływały na zwiększenie proliferacji komórek fibroblastów, mierzonej po 72h, w porównaniu do próby referencyjnej, którą był stop Ti6Al4V. Jakkolwiek zauważyłam, że powłoki TNT złożone z nanoporów (np. TNT3) indukowały silniejszą proliferację komórek w porównaniu z nanorurkami o większej średnicy (np. TNT20). Sugeruje to, że na adhezję i wzrost komórek

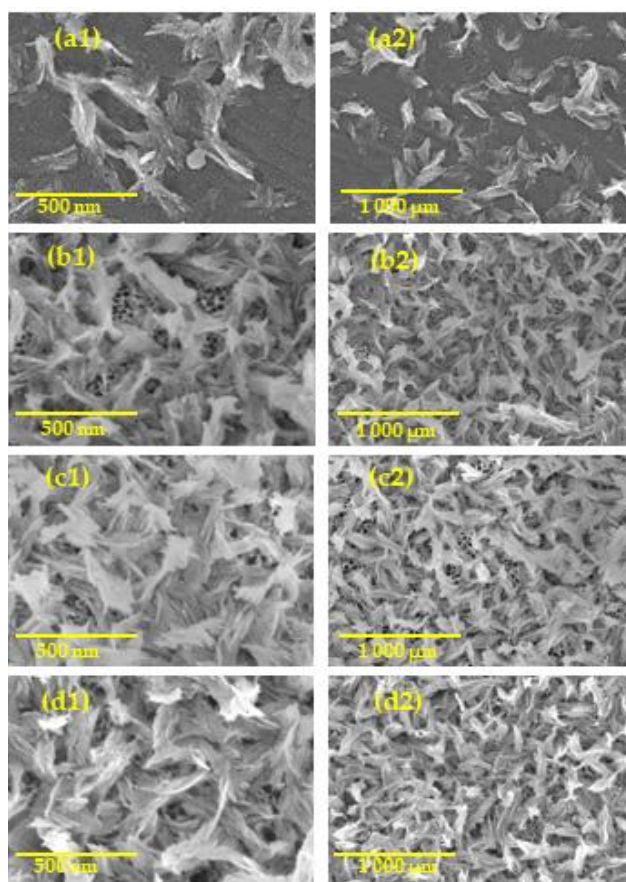
fibroblastów główny wpływ może mieć średnica porów/rurek TiO_2 . Wyniki badań prowadzonych przez Lan'a i współpracowników wskazują, że nanorurki TiO_2 wzbogacone AgNPs wykazują monotonicznie rosnący trend w proliferacji linii komórkowej ludzkich fibroblastów MRC-5 wraz ze zmniejszaniem się średnicy nanorurek [106]. Tworzenie się luk/wgłębień na powierzchni podłoża o średnicy 15–25 nm ułatwia kumulowanie się białka adhezyjnego (integryny), co skutkuje jej optymalną aktywacją, która jest niezbędna dla prawidłowego przebiegu procesu adhezji i wzrostu komórek. Zatem warstwa nanoporowata o najmniejszej średnicy porów (jak na przykład powłok TNT3 lub TNT5), wzbogacona AgNPs, posiadała najwięcej miejsc aktywnych do przyłączania się komórek fibroblastów, a tym samym wspomagała skutecznie adhezję i proliferację komórek [107].

Właściwości mikrobiobójcze badanych powłok oceniłam na podstawie wyników testów Alamar Blue i LiveDead z użyciem referencyjnego szczepu bakteryjnego gronkowca złocistego: *S. aureus* ATCC 29213. W przeprowadzonych badaniach wykorzystałam dwa rodzaje kontaktu mikrobiologicznego z powierzchnią powłoki: (1) miejscowe działanie bakterii na analizowany materiał, o ograniczonym kontakcie z powierzchnią materiału oraz (2) działanie zawiesiny jonów srebra w roztworze PBS wydzielonych z układów nanokompozytowych – pełen kontakt bakterii z płytką badaną i jej otoczeniem [HA10]. Biorąc pod uwagę kontakt miejscowy/bezpośredni z bakteriami szczepu *S. aureus* tylko układ TNT3/25, którego powierzchnia pokryta była gęsto upakowanymi nanocząstkami srebra wykazał działanie hamujące w tworzeniu się filmu bakteryjnego na badanych układach. Z kolei metoda z wykorzystaniem zawiesiny jonów srebra, uwalnianych z analizowanych próbek pokazała, że wszystkie badane próbki wykazały inhibicję tworzenia biofilmu bakteryjnego.

Ważnym kierunkiem moich badań było wykorzystanie metody ALD do wzbogacenia powłok TNT hydroksyapatytem (HA) [HA11]. Modyfikowanie powierzchni tytanowych implantów za pomocą HA to temat od kilkunastu lat cieszący się niesłabnącym zainteresowaniem. Jednak słabe właściwości mechaniczne warstwy HA i łatwość jej rozwarstwiania się szczególnie od podłoża metalicznego (szczególnie tytanowego) powoduje, że rozwiązania tego typu mają ograniczony zakres zastosowań [108]. Mając kontakt z zespołem badawczym na Uniwersytecie w Helsinkach, który opracował procedurę wytwarzania ALD warstw hydroksyapatytowych [109,110] postanowiłam wykorzystać tę metodę w celu wzbogacenia warstw TiO_2 złożonych z uporządkowanych nanoporów lub nanorurek nanokryształami hydroksyapatytu. Wysłałam z założenia, że zmieniając średnicę nanoporów/nanorurek i wykorzystując możliwości metody ALD będę mogła utworzyć powłoki nanokompozytowe typu TNT/HA o odpowiednich właściwościach mechanicznych, trwale połączone z podłożem i wykazujące odpowiednią bioaktywność. W powłokach tego typu nanoporowata lub nanorurkowa warstwa TNT miała stanowić łącznik pomiędzy podłożem metalowym, a nanokryształiczną warstwą hydroksyapatytową. Jako podłoża wykorzystałam stop Ti6Al4V zmodyfikowany powierzchniowo amorficzną warstwą TiO_2 wytwarzaną metodą anodowania stosując napięcia: 5, 10, 12, 15, 18 i 30 V [HA11]. Średnice nanoporów wynosiły 20-40 nm, a nanorurek 50-120 nm (Tabela 1). Zgodnie z procedurą stosowaną w Helsinkach w pierwszym etapie zmodyfikowane powierzchniowo zostały wzbogacone cienką warstwą CaCO_3 przy użyciu metody ALD. Jako prekursor CaCO_3 zastosowałam kompleks $[\text{Ca}(\text{thd})_2]$ (thd - 2,2,6,6-tetrametylo-3,5-heptanodionian) oraz O_3 . Proces ALD prowadziłam stosując 1000, 500 i 100 cykli. Po zoptymalizowaniu procedury wytwarzałam na powierzchni badanych powłok TiO_2 5 nm warstwy CaCO_3 stosując 100 cykli osadzania. Następnie utworzone układy $\text{Ti6Al4V/TNT/CaCO}_3$ poddałam procedurze

konwersji do Ti6Al4V/TNT/HA poprzez reakcję CaCO_3 z $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ w 1M NH_3 w temperaturze 95°C . Analiza GIXRD dowiodła, że wytworzony układ na powierzchni badanych próbek to krystaliczny hydroksyapatyt, natomiast analiza EDS wykazała obecność Ca i P w warstwie powierzchniowej próbki oraz pozwoliła określić stosunek Ca/P [HA11]. Obrazowanie przy użyciu skaningowej mikroskopii elektronowej pozwoliło stwierdzić, że w przypadku układów nanoporowatych i nanorurkowych warstwa znajdującego się na nich hydroksyapatytu, składająca się z nanokryształów, jest zdecydowanie gęściej upakowana, niż w przypadku czystego podłoża ze stopu tytanowego (Rysunek 24). Ponadto gęstość upakowania nanokryształów HA zauważalnie wzrastała wraz ze wzrostem średnicy nanorurek.

Hydrofilowość otrzymanych układów Ti6Al4V/TNT/HA oceniałam na podstawie pomiarów kąta zwilżania. W przeciwieństwie do opisanych wcześniej układów wzbogaconych AgNPs, tworzenie rozproszonych nanokryształów HA na powierzchni próbki Ti6Al4V zwiększyło hydrofilowość warstwy powierzchniowej. Kąt zwilżania zmniejszył się ze 108° dla próby referencyjnej Ti6Al4V do 57° dla układu Ti6Al4V/HA. W przypadku układów Ti6Al4V/TNT/HA hydrofilowość rosła, a wartości kąta zwilżania zmieniały się w zakresie $32\text{--}16^\circ$, w zależności od średnicy nanoporów/nanorurek ditlenku tytanu [HA11]. Wartości swobodnej energii powierzchniowej (SEP) wyznaczone metodą Owens-Wendta (stosowano wodę i diiodometan), zmieniały się w zakresie $65.8\text{--}71.8\text{ mJ/m}^2$ dla układów Ti6Al4V/TNT/HA i były wyraźnie większe od wartości SEP wyznaczonej dla próbek referencyjnych Ti6Al4V i Ti6Al4V/HA (45.4 i 44.6 mJ/m^2) [HA11].



Rysunek 24. Obrazy SEM powłok (a1), (a2)—Ti6Al4V/HA; (b1), (b2)—Ti6Al4V/TNT5/HA, and (c1), (c2)—Ti6Al4V/TNT12/HA, (d1), (d2)—Ti6Al4V/TNT30/HA.

Osadzanie hydroksyapatytu na powierzchni stopu Ti6Al4V praktycznie nie zmieniło jego chropowatości powierzchni. Natomiast hydroksyapatyt osadzony na warstwach nanorurek spowodował kilkukrotny wzrost szorstkości. Wyniki nanoindentacji również podkreślają wyraźne różnice między nanokrystalicznymi powłokami HA osadzonymi na powierzchni warstw TNT wytwarzanych przy różnych potencjałach. Powłoki hydroksyapatytu wykazują niejednorodną morfologię ze względu na odmienną architekturę nanorurkowych warstw, na których tworzy się powłoka HA. Wytwarzanie nanokryształów hydroksyapatytu na podłożu Ti6Al4V/TNT5 powodowało znaczny spadek modułu sprężystości i nanotwardości w porównaniu z niezmodyfikowanym substratem Ti6Al4V [HA11]. Efekt ten jest pożądany w przypadku zastosowania tego materiału do modyfikacji powierzchni implantów długoterminowych, ponieważ zmniejsza on istotną różnicę we właściwościach mechanicznych implantu i kości, a w konsekwencji obniża możliwość wystąpienia ryzyka efektu ekranowania naprężeń [49]. Osadzanie powłoki HA na powierzchni TNT5 zwiększyło wartość ilorazów H/E i H^3/E^2 (H = twardość, E = moduł Younga) w porównaniu z próbą referencyjną Ti6Al4V/TNT. Pierwszy z ilorazów (H/E) charakteryzuje odporność materiału na odkształcenie sprężyste, a drugi (H^3/E^2) umożliwia oszacowanie zdolności materiału do odkształcenia plastycznego. Otrzymany wynik wskazuje jednoznacznie, że powłoka nanokompozytowa TNT5/HA wykazuje dobre właściwości trybologiczne i nadaje się do zastosowań medycznych. W przypadku warstwy TNT15 sytuacja uległa odwróceniu, tj. osadzanie hydroksyapatytu zmniejszyło wartości tych ilorazów odpowiednio o 7% i 33%. Test na zarysowanie nanokompozytów TNT/HA nie dał informacji o adhezji nanokryształów HA do TNT. Obliczone siły krytyczne były raczej związane z utratą adhezji całej nanopowłoki TNT/HA w stosunku do substratu Ti6Al4V, a nie z utratą adhezji HA do nanorurek diltenu tytanu [HA11].

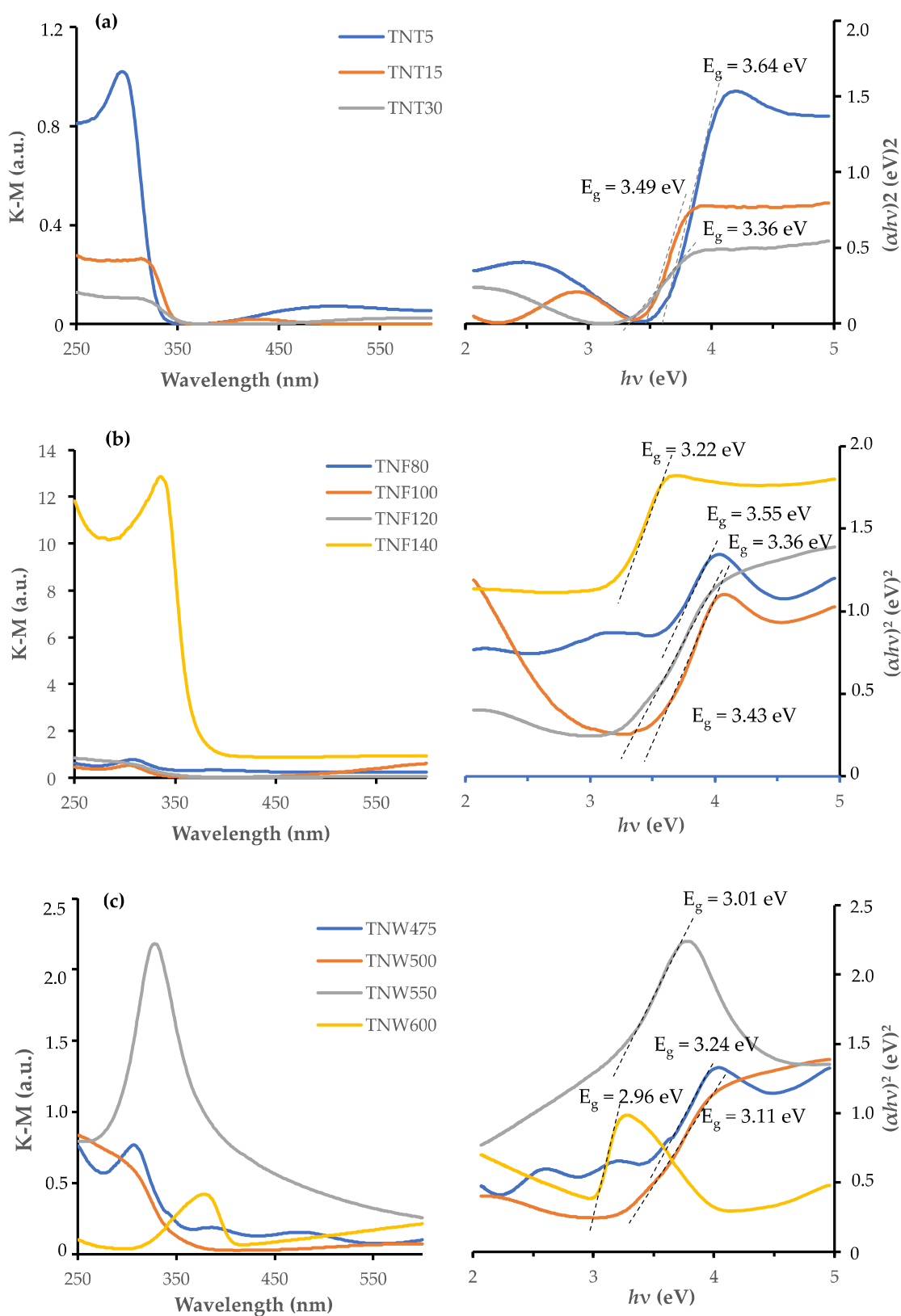
Badania mające na celu określenie stopnia adhezji i proliferacji fibroblastów na powierzchni układów Ti6Al4V/HA oraz Ti6Al4V/TNT/HA wykazały, że dla wszystkich badanych układów wzbogaconych HA proliferacja była na wyższym poziomie, aniżeli dla czystego stopu tytanowego [HA11]. Najwyższą biointegrację wykazywały powłoki TNT5/HA oraz TNT10/HA, zaś pozostałe układy nanokompozytowe TNT/HA charakteryzowały się biointegracją na poziomie nieco wyższym od układu Ti6Al4V/HA [HA11].

Wszystkie próbki zmodyfikowane za pomocą HA powodowały znaczne zahamowanie kolonizacji gronkowca złocistego i zahamowanie tworzenia się biofilmu bakteryjnego w porównaniu z referencyjną próbką Ti6Al4V, niezależnie od zastosowanego szczepu *S. aureus*. Średni procent inhibicji tworzenia się biofilmu, w porównaniu z kontrolnym biofilmem tworzącym się na niemodyfikowanym stopie tytanu uważanym za 100%, osiągnął zakres od $32.1 \pm 5.1\%$ do $51.3 \pm 8.7\%$ i od $25.7 \pm 33.0\%$ do $60.5 \pm 6.2\%$ odpowiednio dla *S. aureus* ATCC 29213 i *S. aureus* H9 [HA11]. Najślabszy pod tym względem był stop tytanu pokryty tylko hydroksyapatytem (Ti6Al4V/HA), jednak dodatkowa nanostrukturalna modyfikacja powierzchni Ti6Al4V w postaci nanoporów i nanorurek wzbogaconych w hydroksyapatyt (Ti6Al4V/TNT/HA) zwiększyła ich aktywność przeciw tworzeniu się biofilmu. Ti6Al4V/TNT5/ HA, jak i Ti6Al4V/TNT12/HA wykazały najwyższą aktywność przeciwbakteryjną wobec szczepu *S. aureus* ATCC 29213, osiągając odpowiednio 47.0 ± 15.3 i $51.3 \pm 8.7\%$ hamowania biofilmu. Spośród wszystkich powierzchni zmodyfikowanych zarówno przez nanorurki, jak i hydroksyapatyt, wpływ Ti6Al4V/TNT18/HA na wspomniany szczep był najślabszy; układ ten osiągnął $39.9 \pm 13.3\%$ hamowania biofilmu [HA11].

Podsumowując wyniki przeprowadzonych badań należy stwierdzić że warstwa TNT5/HA wykazywała najlepsze warunki do adhezji i proliferacji komórek fibroblastów w porównaniu z innymi badanymi układami. Wynikało to prawdopodobnie z wysokiej chropowatości powierzchni. Ponadto warstwa TNT5/HA charakteryzowała się jednocześnie dobrą aktywnością przeciwbakteryjną. Pod względem właściwości mechanicznych wykazywała ona odpowiedni wskaźnik sprężystości i odporności na odkształcenia plastyczne, co sugeruje jej optymalne właściwości trybologiczne do zastosowań medycznych [HA11].

Ocena aktywności fotokatalitycznej wytworzonych nanopowłok TiO_2 o zróżnicowanej strukturze i architekturze, to kolejnym kierunek realizowanych przeze mnie badań. W swoich pracach skupiłam się na porównaniu powyższych właściwości materiałów o różnej strukturze i morfologii powierzchni wytwarzanych różnymi metodami. Z uwagi na to, że nanopowłoki bazujące na ditlenku tytanu mogą wykazywać właściwości półprzewodnikowe istotnym było oszacowanie zmian wartości energii pasma wzbronionego, tj. wielkości przerwy energetycznej (energy band gap (E_{BG})) badanych powłok w zależności od ich morfologii powierzchni i struktury. Badania te prowadziłam w oparciu o analizę widm spektroskopii w nadfiolecie i świetle widzialnym metodą rozproszonego odbicia (UV-VIS-DRS) otrzymanych warstw TiO_2 [HA6]. Biorąc pod uwagę, że współczynnik absorpcji (α) jest proporcjonalny do funkcji Kubelka – Munka, energię pasma wzbronionego wyznaczałam z zależności $(\alpha h\nu)^2 = f(h\nu)$. Rysunek 25 przedstawia widma UV-VIS-DRS zarejestrowane dla TNT (a), TNF (b) i TNW (c), jak również wykresy $(\alpha h\nu)^2 = f(h\nu)$, które wykorzystałam do obliczenia energii pasma wzbronionego (E_{BG}). Otrzymane wyniki przedstawiłam w Tabeli 5 [HA6].

W przypadku amorficznych powłok złożonych z nanoporów lub nanorurek ditlenku tytanu, wartości E_{BG} zmniejszały się wraz ze wzrostem średnic z 3.64 eV dla TNT5 do 3.36 eV dla TNT30 (Tabela 5) [HA6]. Kierunek obserwowanych zmian był zgodny z danymi literaturowymi [111,112]. Jednocześnie analiza danych przedstawionych w Tabeli 5, wykazała, że wartości E_{BG} wyznaczone dla powłok TNT40, TNT50 i TNT60 są wyższe niż dla TNT30 i podobne do wyznaczonych dla warstw TNT5-TNT15. Wyjaśnieniem może być złożony charakter powłok TNT40, TNT50 i TNT60 polegający na tym, że wewnątrz rurek o średnicach 110-260 nm (Tabela 1) tworzą nanopory o średnicach 10-56 nm, podobnych do tych, które tworzyły warstwy TNT5-TNT15 (Rysunek 3) [HA2]. Podobnie wysokie wartości E_{BG} , tj. 3.55 i 3.43 eV, obserwowałam dla amorficznych powłok nanowłókien TNF80 i TNF100. W przypadku warstwy TNF120, w której strukturze potwierdziłam obecność krystalitów anatazu, wartość energii pasma wzbronionego zmniejszyła się do 3.36 eV. Natomiast dla warstwy nanowłókien o strukturze anatazu (TNF 140) wyznaczona wartość E_{BG} wynosiła 3.22 eV i była bliska wartości literaturowej dla anatazu (3.2 eV) [HA6,113]. Wartości energii pasma wzbronionego warstw złożonych z nanopętów ditlenku tytanu, wytworzonych w wyniku procesu termicznego utleniania Ti6Al4V o strukturze odpowiednio: anatazu (TNW475), anatazu/rutyłu (TNW500, TNW550) i rutyłu (TNW600), wynosiły odpowiednio: 3.24, 3.11, 3.01 i 2.96 eV [HA6]. Zmiany wielkości przerwy energetycznej E_{BG} w tych przypadkach odpowiadają danym literaturowym dla krystalicznych form anatazu i rutyłu [114,115]. W związku z powyższym należało oczekiwać zróżnicowanej aktywności fotokatalitycznej warstw TiO_2 o różnej strukturze i architekturze powierzchni.



Rysunek 25. Widma UV-VIS-DRS zarejestrowane dla badanych warstw TNT (a), TNF (b) i TNW (c) - lewa strona; wykresy zależności $(\alpha hv)^2 = f(hv)$ pozwalające na oszacowanie wielkości przerwy energetycznej - prawa strona.

Tabela 5. Wyznaczone wartości energii pasma wzbronionego (E_{BG}) dla warstw TNT, TNW i TNF [HA6]

Powłoki TNT	E_g [eV]	Powłoki TNF	E_g [eV]	Powłoki TNW	E_g [eV]
TNT5	3.64	TNF80	3.55	TNW475	3.24
TNT10	3.59	TNF100	3.43	TNW500	3.11
TNT15	3.49	TNF120	3.32	TNW550	3.01
TNT20	3.42	TNF140	3.22	TNW600	2.96
TNT30	3.36				
TNT40	3.34				
TNT50	3.44				
TNT60	3.56				

Aktywność fotokatalityczna powłok była badana w oparciu o analizę procesów degradacji dwóch wzorców zanieczyszczeń organicznych indukowanych promieniowaniem UV, tj. błękitu metylenowego (BM), jako wzorca rozpuszczalnego w wodzie oraz acetonu (A) – jako wzorca o wysokiej lotności [HA3,HA5,HA6]. Procedura pomiaru w przypadku degradacji błękitu metylenowego polegała na śledzeniu zmian absorbancji roztworu BM przy długości fali α – 664 nm, w czasie naświetlania próbek promieniowaniem ultrafioletowym. Natomiast oceniając aktywność fotokatalityczną warstw TiO_2 w procesie degradacji acetonu wykorzystywałam metodologię opracowaną w Tribology Centre (Danish Technological Institute, Aarhus), którą poznałam podczas wizyt stażowych typu STSM (Short Term Scientific Mission) w ramach projektów COST: NAMABIO i NEWGEN. Procedura pomiaru polegała na degradacji acetonu na powierzchni powłok TiO_2 i monitorowaniu zmian stężenia tworzącego się dwutlenku węgla [HA5]. Badaniom poddałam wszystkie rodzaje układów wytwarzanych i opisanych wcześniej, to jest.: TNT uzyskiwane w procesie elektrochemicznego utleniania stopu tytanowego, TNF uzyskane podczas chemicznego utleniania $Ti6Al4V$ oraz TNW wytworzone podczas termicznego utleniania podłoża ze stopu $Ti6Al4V$ [HA6]. Interpretując uzyskane dane stwierdziłam, że zależność stężenia reagenta od czasu układa się wykładniczo w przypadku procesu degradacji błękitu metylenowego, natomiast dla procesu fotokatalitycznej degradacji acetonu zależność ta jest liniowa w całym badanym zakresie. Ponieważ zależało mi na ilościowym opisie procesów degradacji wzorców zanieczyszczeń organicznych zastosowałam metodologię Langmuira-Hinshelwooda [116], wg której ogólna szybkość reakcji może być wyrażona jako:

$$r = dc/dt = k_{obs}Kc/(1 + Kc) \quad (1)$$

gdzie c jest stężeniem reagenta (BM lub acetonu), t jest czasem pomiaru stężenia, k_{obs} jest obserwowaną stałą szybkości, a K opisuje stałą adsorpcji reagenta.

Niskie wartości c i K umożliwiają uproszczenie równania (1) do następującej postaci:

$$dc/dt = k_{obs}Kc = k_{obs}c \quad (2)$$

Biorąc pod uwagę liniową zależności stężenia od czasu, która występuje dla procesu fotokatalitycznej degradacji acetonu zasadnym wydało mi się dokonanie założenia, że jego

stężenie jest prawie stałe ze względu na jego stosunkowo wysokie stężenie początkowe w stosunku do monitorowanej w czasie ilości CO₂ wytwarzanego podczas procesu fotodegradacji. Stężenie c w równaniu (2) jest dla procesu degradacji acetonu stałe i może być włączone w wartość stałej obserwowalnej. Równanie (2) można więc odpowiednio dla błękitu metylenowego i acetonu przekształcić do zależności:

$$dc/dt = k_{\text{obs}}^{\text{MB}}c \quad (3a)$$

$$dc/dt = k_{\text{obs}}^A \quad (3b)$$

W rezultacie zależności stężenia od czasu dla obydwu procesów fotokatalitycznej degradacji opisują następujące równania:

$$c_t = c_0 \exp(-k_{\text{obs}}^{\text{MB}}t) + \text{const.} \quad (4a)$$

$$c_t = k_{\text{obs}}^A t + \text{const.} \quad (4b)$$

gdzie c_t oznacza stężenie reagenta po czasie t ; c_0 to początkowe stężenie BM, $k_{\text{obs}}^{\text{MB}}$ to obserwowalna stała szybkości pseudo-pierwszego rzędu dla procesu degradacji MB, a k_{obs}^A to obserwowalna stała szybkości pseudo-zerowego rzędu dla procesu degradacji acetonu [HA6].

Zastosowanie dwóch różnych podejść kinetycznych do badanych reakcji było wymuszone zauważonymi różnicami w kierunkach zmian absorbancji w funkcji czasu dla obydwu reagentów. W przypadku prowadzenia badań z zastosowaniem błękitu metylenowego, dla którego obserwowałam wykładniczy spadek stężenia barwnika w czasie, zastosowałam równanie wykładnicze (4a). Taka procedura dla procesu degradacji acetonu byłaby formą nadużycia, stąd też dla tego reagenta zastosowałam równanie liniowe (4b) [HA6]. W Tabeli 6 przedstawiam uzyskane wartości obserwowalnych stałych szybkości dla przebadanych układów.

Tabela 6. Wartości obserwowalnych stałych szybkości dla TNT, TNF i TNW

Nanomateriał	$10^2 k_{\text{obs}}^A$ [ppm·min ⁻¹] dla degradacji A	$10^5 k_{\text{obs}}^{\text{MB}}$ [min ⁻¹] dla degradacji BM
TNT5	3.33 ± 0.03	13.7 ± 3.5
TNT10	5.48 ± 0.03	20.8 ± 6.3
TNT15	7.98 ± 0.06	11.3 ± 2.4
TNT20	22.1 ± 0.1	12.2 ± 1.6
TNT30	29.2 ± 0.3	12.2 ± 3.1
TNT40	35.2 ± 0.3	14.4 ± 4.4
TNT50	22.2 ± 0.1	7.41 ± 1.8
TNT60	8.27 ± 0.08	13.1 ± 7.2
TNF80	17.6 ± 0.1	28.9 ± 1.6
TNF100	26.8 ± 0.1	33.2 ± 2.6
TNF120	61.5 ± 0.5	51.6 ± 6.8
TNF140	67.5 ± 0.3	62.0 ± 8.9
TNW475	16.6 ± 0.1	77 ± 17
TNW500	52.4 ± 0.1	58 ± 11
TNW550	8.00 ± 0.08	40.3 ± 7.4
TNW600	3.33 ± 0.03	31.4 ± 4.6

Wyniki przedstawione w Tabeli 6 wskazują na szybszy przebieg obu procesów fotodegradacji, gdy jako fotokatalizatorów użyłam warstw złożonych z nanoprętów lub nanowłókien ditlenku tytanu, co wynika z faktu, że wymienione powłoki tworzą krystaliczne formy ditlenku tytanu. Wśród TNF najwyższą aktywnością fotokatalityczną charakteryzowała się warstwa TNF140 (anataz), nieco mniejszą TNF120 (forma amorficzna z krystalitami anatazu) [HA6]. Natomiast w przypadku nanoprętów najsilniejsze działanie fotokatalityczne w degradacji acetonu miała warstwa TNW500 (mieszanina anataz/rutyl), a dla błękitu metylenowego nanofilm TNW475 (anataz) [HA6]. Najsłabiej fotokatalitycznie w obydwu przypadkach zachowywała się warstwa TNW600 (rutyl). Uzyskane wyniki zgodne są z ogólnym kierunkiem zmian aktywności fotokatalitycznej zależnych od formy krystalicznej ditlenku tytanu [117]. Efekt fotokatalityczny spowodowany przez nanorurki ditlenku tytanu jest wyraźnie słabszy, co należy wiązać z ich amorficznością. Dla powłok TNT daje się zauważyć wyraźny związek pomiędzy zmianami wartości energii pasma wzbronionego (E_{BG}) nanorurek (Tabela 5), a wartościami stałej szybkości reakcji rozkładu acetonu (Tabela 6). Wraz ze zmniejszaniem się tej wartości od 3.64 eV (TNT5) do 3.36 eV (TNT30) i wzrostem średnicy porów/rurek obserwowałam wzrost stałej szybkości procesu degradacji. Wysoką aktywność fotokatalityczną obserwowałam również dla warstwy TNT40, mimo zauważalnego wzrostu wielkości przerwy energetycznej. W przypadku TNT50 i TNT60, dla których wartość E_{BG} rośnie ponownie zwiększa się do 3.44, 3.56 eV obserwowałam wyraźne obniżenie aktywności fotokatalitycznej w opisywanym wyżej procesie, co należałoby wiązać z ich gąbczastą architekturą [HA6]. Patrząc na zależności z Tabeli 6 opisujące stałe szybkości dla procesu degradacji błękitu metylenowego na powierzchniach TNT nie daje się zauważyć żadnej zależności między stałą szybkości a wartością E_{BG} .

Ogólnie należy zauważyć, że amorficzne powłoki TNT wykazują wyraźnie lepsze właściwości fotokatalityczne w przypadku degradacji acetonu, tj. małych cząsteczek mających bezpośredni kontakt z powierzchnią nanoporów/nanorurek TiO_2 . W przypadku procesów rozkładu wodnego roztworu MB indukowanych promieniowaniem UV takich zależności nie obserwowałam. Sugeruje to, że niewielkie cząsteczki organiczne, takie jak aceton, są doskonałym reagentem do testowania podatności nanoarchitektury powierzchni na adsorpcję i aktywność fotokatalityczną, ponieważ ich rozmiary niwelują dodatkowe czynniki zakłócające ocenę aktywności [HA6].

Na fotoaktywność TNF wyraźny wpływ mają przejścia fazowe zachodzące w trakcie ich wytwarzania i tworzenie się krystalicznych form ditlenku tytanu [HA5]. Przykładem są wyniki prac nad fotokatalitycznymi właściwościami nanowłókien otrzymywanych w wyniku chemicznego utleniania powierzchni tytanu z użyciem mieszaniny H_2O_2 i prostych związków nieorganicznych (Tabela 7).

Tabela 7. Wartości obserwowalnych stałych szybkości dla procesu degradacji błękitu metylenowego k_{obs}^{BM} i acetonu k_{obs}^A przy wykorzystaniu powłok nanowłókien wytworzonych w procesie chemicznego utleniania $Ti6Al4V$ z użyciem H_2O_2 oraz mieszanin H_2O_2/HCl , $H_2O_2/NaCl$ i H_2O_2/Na_2SO_4 [HA5].

Reagent utleniający	$10^3 k_{obs}^{MB} (\text{min}^{-1})$	$10^3 k_{obs}^A (\text{min}^{-1})$
H_2O_2/Na_2SO_4	8.18 ± 0.10	2.40 ± 0.01
H_2O_2	6.70 ± 0.32	1.35 ± 0.01
H_2O_2/HCl	2.53 ± 0.07	2.13 ± 0.01
$H_2O_2/NaCl$	9.36 ± 0.32	1.40 ± 0.01

Najwyższą szybkość procesu degradacji obserwowałam dla TNF otrzymanych w wyniku chemicznego utleniania tytanu z użyciem mieszaniny $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Na}_2\text{SO}_4$, w których 33% całkowitej ilości powierzchniowych atomów tlenu stanowił tlen zaadsorbowanej wody, co potwierdziły wyniki XPS [HA3]. Nieco wolniejszy przebieg degradacji acetonu obserwowałam dla warstw TNF $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HCl}$ i TNF H_2O_2 , dla których % atomowy O1s (H_2O) wynosił odpowiednio 7 i 13 %at. Najwyższą szybkość procesu degradacji indukowanej promieniowaniem UV obserwowałam dla TNF otrzymanych w wyniku chemicznego utleniania tytanu z użyciem mieszaniny $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Na}_2\text{SO}_4$, w których 33% całkowitej ilości powierzchniowych atomów tlenu stanowił tlen zaadsorbowanej wody (dane XPS [HA3]). Jednocześnie zauważyłam, że anatazowa warstwa TNF $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HCl}$ jest bardziej aktywna od amorficznej powłoki TNF H_2O_2 . W rozważaniach kinetycznych dotyczących degradacji BM należy uwzględnić również efekty elektrostatyczne. BM jest cząsteczką kationową o ładunku dodatnim umieszczonym na atomie siarki znajdującym się w centralnej części molekuly [118]. Zatem jego adsorpcja jest preferowana na powierzchni ditlenku tytanu o pH wyższym niż pzc (punkt ładunku zerowego) [118]. pzc zmienia się dla różnych odmian ditlenku tytanu, ale jego wartość oscyluje na ogół wokół pH 5,5-6 [119]. Nanowłókna wytwarzane w obecności mieszaniny $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HCl}$ mają charakter bardziej kwasowy niż te wytwarzane bez dodatku HCl i znacznie bardziej kwasowy niż te wytwarzane w obecności mieszaniny $\text{H}_2\text{O}_2/\text{sole sodowe}$ [HA3]. Ich właściwości dobrze korelują z otrzymanymi przeze mnie wynikami badań - najwyższe wartości stałej szybkości w procesie degradacji błękitu metylenowego obserwowałam dla TNF $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NaCl}$ i TNF $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Na}_2\text{SO}_4$, a najniższe odpowiednio dla warstw TNF $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HCl}$ i TNF H_2O_2 . Jak widać wspomniane efekty kulombowskie mają silne przełożenie na adsorpcję molekuł BM na powierzchni nanowłóknistej architektury TiO_2 , a poprzez to na szybkość ich degradacji. Efekty te przeważają nawet nad efektem strukturalnym, co potwierdzają niższe niż dla innych układów wartości stałej szybkości wyznaczonej dla TNF $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HCl}$ posiadającego strukturę anatazu [HA3].

Analiza uzyskanych wyników dla warstw TiO_2 zróżnicowanych pod względem nanoarchitektury wskazuje, że na ich aktywność fotokatalityczną wpływa nie tylko struktura, ale również morfologia, powierzchnia właściwa, zwilżalność i efekty oddziaływań kulombowskich. Współdziałanie poszczególnych efektów generuje odpowiedź fotokatalityczną nanowarstw TiO_2 , co należy brać pod uwagę optymalizując procesy ich wytwarzania [HA3, HA5, HA6]. Chciałabym zwrócić jednocześnie uwagę na brak prostych zależności pomiędzy aktywnością fotokatalityczną wytwarzanych powłok TiO_2 , a ich właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi, których to zależności się spodziewałam. Uwagę jednak zwraca fakt, że amorficzne powłoki TNT wykazujące słabsze właściwości fotokatalityczne są bardziej biobójcze, aniżeli powłoki TNF i TNW wykazujące silniejszą aktywność fotokatalityczną.

Wyniki prowadzonych w ostatnich latach badań zwracają uwagę na rolę, jaką może odgrywać hydroksyapatyt w nanokompozycie typu TNT/HA [120-122]. Zauważono, że w powyższym układzie pełni on rolę przezroczystej lub półprzezroczystej warstwy przepuszczającej promieniowanie UV-Vis, które następnie dociera do prawdziwego fotokatalizatora, jakim jest TiO_2 [120]. Nonami i współpracownicy, traktując warstwę proszku TiO_2 (o grubości około 0.3 μm) roztworem zawierającym jony fosforanowe przez okres 1 godziny ($T = 37^\circ\text{C}$) wytwarzali warstwę apatytową o grubości 0.7 μm , składającą się z kryształów HA w kształcie płytek [121]. Zwrócili oni uwagę, że uzyskany w ten sposób

kompozyt adsorbował zanieczyszczenia, a naświetlanie powyższego układu promieniowaniem UV-Vis prowadziło do ich rozkładu. Badania bioceramicznych membran kompozytowych typu Ag-TiO₂/HA/Al₂O₃ przeprowadzone przez Ma i współpracowników [122] wykazały, że HA skutecznie adsorbował bakterie szczepu *Escherichia coli*, podczas gdy domieszkowany srebrem TiO₂ był odpowiedzialny za fotokatalityczną degradację bakterii. Badania kompozytu N-TiO₂ modyfikowanego HA przy użyciu mokrej metody chemicznej pozwoliły ocenić jego aktywność fotokatalityczną w rozkładzie gazowego acetonu przy naświetlaniu promieniowaniem widzialnym [123]. Najlepszą aktywność fotokatalityczną wykazywały próbki o 10% zawartości HA w badanym układzie, co może wynikać z synergizmu zdolności HA do adsorpcji i aktywności fotokatalitycznej TiO₂ przejawiającej się wytwarzaniem rodników tlenowych, ich dyfuzji i reakcji z zaadsorbowanymi cząsteczkami acetonu. Poza rolę hydroksyapatytu jako indywiduum adsorpcyjnego doniesienia literaturowe wzmiankują, że związek ten bierze także udział w procesie fotokatalitycznym jako rzeczywisty fotokatalizator. Jego aktywność przypisywana jest generowaniu aktywnych anionowych rodników ponadtlenkowych (O₂⁻) mających swoje źródło w powierzchniowych grupach PO₄³⁻ [124]. Mohamed i współpracownicy [125] badali aktywność fotokatalityczną kompozytów Pd-TiO₂-HA, w procesie indukowanej światłem widzialnym, fotokatalitycznej degradacji cyjanów. Wykazali oni, że wakanty powstałe na powierzchni wzbudzonej grupy PO₄³⁻, pozwalają na tworzenie się O₂, które są w stanie zaatakować cząsteczki organiczne zaadsorbowane na HA. Zhang i in. [126] wskazali na wpływ wewnętrznej polaryzacji HA, promującej separację fotogenerowanych elektronów i dziur, na zwiększenie wydajności fotokatalitycznej nanocząstek TiO₂, wzbogaconych warstwą spolaryzowanego HA.

Biorąc pod uwagę wyniki badań nad rolą, jaką pełni HA w układzie TNT/HA zdecydowałam się ocenić aktywność fotokatalityczną wytwarzanych układów Ti6Al4V/TNT/HA [HA12]. W tym miejscu należy zauważyć, że zastosowana metoda ALD prowadziła do pokrycia warstw TNT cienkim filmem złożonym z nanokryształów HA, a nie jednolitą warstwą, jak w przypadku omawianych wcześniej doniesień literaturowych. Otrzymane wyniki wykazały, że dla każdej pary, tj. Ti6Al4V/TNT i Ti6Al4V/TNT/HA degradacja błękitu metylenowego zachodziła szybciej, gdy warstwy nanorurek TiO₂ wzbogacone były nanokryształami hydroksyapatytu. Podobny efekt (jednak wyraźnie słabszy) obserwowałam dla układów Ti6Al4V i Ti6Al4V/HA [HA12]. Badając wpływ utworzenia warstwy nanokryształów HA na wartość energii pasma wzbronionego (E_{BG}) powłok TNT/HA zauważyłam, że w przypadku powłoki nanoporowatej TNT5 wartość E_{BG} wzrosła odpowiednio z 3.64 eV do 3.76 eV, natomiast dla warstw złożonych z nanorurek, np. TNT15 i TNT20 wartość tego parametru praktycznie nie ulegała zmianie (TNT15 E_{BG} = 3.49 eV, TNT15/HA E_{BG} = 3.47 eV, TNT20 E_{BG} = 3.42 eV, TNT20/HA E_{BG} = 3.45 eV). Wśród badanych nanokompozytów, najwyższą aktywność fotokatalityczną wykazywał układ Ti6Al4V/TNT30/HA, tj. zawierający warstwę TNT złożoną z nanorurek o średnicy, ok. 140 nm, nie w pełni pokrytej nanokryształami HA [HA12]. W tym przypadku większa średnica nanorurek pozwoliła rozтворowi barwnika dotrzeć w sposób nieutrudniony do wnętrza warstwy, zwiększając tym samym wydajność procesu rozkładu. Dla pozostałych próbek Ti6Al4V/TNT/HA aktywność fotokatalityczna jest zbliżona. Wzrost średniej szybkości procesów degradacji BM dla warstw TNT/HA w porównaniu do czystych TNT mieści się w zakresie od 6,70% (dla TNT10/HA) - do 35,5% (dla TNT30/HA), natomiast stopień degradacji BM wzrasta w zakresie od 3,90% (dla pary TNT10/HA i TNT) do 24,4% (dla pary TNT30/HA i TNT30) [HA12]. Taki znaczący wzrost aktywności fotokatalitycznej TNT/HA

(zwłaszcza w przypadku próbki TNT30/HA) można przypisać podwójnej roli, jaką nanokryształy hydroksyapatytu odgrywały w nanokompozycie: (a) jako materiału adsorpcyjnego na powierzchni kompozytów, pozwalającego na przechodzenie przez niego promieniowania UV i docieranie do TiO_2 , a także (b) jako prawdziwego fotokatalizatora, który generuje aktywne anionowe rodniki ponadtlenkowe (O_2^-) na powierzchni grup PO_4^{3-} pod wpływem promieniowania UV [HA12, 120,124,125].

Również i w tym przypadku otrzymane wyniki nie wskazują na istnienie prostych zależności pomiędzy aktywnością fotokatalityczną wytwarzanych powłok TNT/HA, a ich właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi. Jednak i tutaj daje się zauważyć wspomniana wcześniej zależność, zgodnie z którą powłoka o słabszej aktywności fotokatalitycznej (TNT5/HA) wykazuje lepsze właściwości do proliferacji fibroblastów oraz dobre właściwości biobójcze [HA11].

4.3.4. Podsumowanie wyników przeprowadzonych badań

Podsumowując, badania własne pozwoliły mi opracować metodę modyfikacji powierzchni podłoża z tytanu oraz stopu Ti6Al4V , która może zostać wykorzystana do produkcji nowej generacji implantów kostnych. Wspomniana wyżej modyfikacja polega na wytworzeniu na powierzchni podłoża cienkiej warstwy amorficznego ditlenku tytanu metodą elektrochemicznego utleniania, zgodnie z opracowanymi przeze mnie procedurami. Wyboru dokonałam spośród trzech technik: utleniania anodowego, chemicznego utleniania z użyciem nadtlenu wodoru oraz utleniania termicznego. Dzięki temu możliwe stało się zaprojektowanie oraz wytworzenie zintegrowanych z powierzchnią podłoża powłok bazujących na TiO_2 , optymalnych pod względem właściwości fizykochemicznych i mechanicznych, które zapewnią tym podłożom odpowiednie właściwości sprzyjające biointegracji, jak i aktywność przeciwdrobnoustrojową.

W trakcie swoich prac wykazałam, że w wyniku 20/30 minutowych procesów anodowania podłoża tytanowych i stopu Ti6Al4V i przy zastosowaniu potencjałów 3-60V otrzymuje się amorficzne warstwy TiO_2 (TNT I generacji) o architekturze nanoporowatej, nanorurkowej i nanogąbczastej. Dokonałam charakterystyki wyżej wymienionych powłok pod kątem ich właściwości fizykochemicznych i mechanicznych. Dowiodłam, że proces anodowania wpływa na zwiększenie twardości i modułu Younga oraz zwiększenie hydrofilowości w stosunku do wyjściowych parametrów podłoża. Wykorzystując cyklicznie zmieniający się potencjał podczas procesu anodowania oraz optymalizując ilość wody w elektrolicie III generacji wytworzyłam nową nanoarchitekturę TiO_2 , tzw. nanozęby oraz powłokę, której morfologia jest identyczna z morfologią komórek fibroblastów. W oparciu o wyniki testów MTT z udziałem komórek fibroblastów i osteoblastów oraz testy mikrobiologiczne dokonałam oceny właściwości biointegacyjnych i aktywności przeciwdrobnoustrojowej warstw TNT I i III generacji. Spośród analizowanych powłok najbardziej optymalny zestaw właściwości biologicznych wykazała amorficzna warstwa nanoporowata TNT5 I generacji wytworzona na stopie Ti6Al4V – wyraźnie przekraczając biointegrację wykazywaną przez niemodyfikowany stop tytanowy oraz hamując w 70% rozwój biofilmu bakteryjnego.

Na szczególną uwagę zasługują wyniki moich prac nad wyjaśnieniem zmian strukturalnych i morfologicznych powierzchni powłok TNT, które zachodzą w trakcie procesu autoklawowania. Badania spektroskopowe udowodniły, że odpowiedzialnymi za powyższe zmiany są cząsteczki wody zaadsorbowane na powierzchni i we wnętrzu nanorurek TiO_2 . Opracowałam procedurę dodatkowego suszenia powłok TNT12-TNT60, zabezpieczającą je przed zniszczeniem nanoarchitektury rurkowej oraz tworzeniem się ściśle upakowanej, zwartej warstwy powierzchniowej, o odmiennej zwilżalności i właściwościach mechanicznych. Dowiodłam, że w przypadku warstw nanoporowatych wspomniane zmiany nie zachodzą i standardowa procedura suszenia wytwarzanych powłok strumieniem gazu obojętnego jest całkowicie wystarczająca przed procesem autoklawowania. Wyniki moich badań mają szczególne znaczenie w przypadku użycia metody sterylizacji parowej do wszelkiego rodzaju wyrobów medycznych z tytanu i stopu Ti6Al4V zmodyfikowanych powierzchniowo warstwą nanorurek TiO_2 .

Zoptymalizowałam proces wzbogacania nanoporowatych i nanorurkowych powłok TiO_2 za pomocą nanocząstek srebra i nanokryształów hydroksyapatytu, przy użyciu technik chemicznego osadzania z fazy gazowej (CVD) oraz wzrostu warstwy atomowej (ALD), które nie są powszechnie stosowane do wytwarzania powłok biomedycznych. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że zastosowanie metody CVD do wzbogacania nanocząstkami srebra nanoporowatych powłok ditlenku tytanu może stanowić obiecującą strategię wytwarzania długoterminowo działającej powierzchni przeciwdrobnoustrojowej. Otrzymywane w ten sposób biomateriały mogą z powodzeniem rozwiązać problemy związane z tworzeniem się infekcji okołowszczepowej stosowanych obecnie implantów kostnych. Wśród badanych układów $\text{Ti6Al4V/TNT5/AgNPs}$, ten który zawierał najmniejszą ilość nanocząstek srebra, tj. 0.6 %wag., charakteryzował się wysoką aktywnością biobójczą i najbardziej optymalnymi właściwościami biointegracyjnymi. Powłoka o tym składzie może być brana pod uwagę jako biomateriał posiadający pożądane właściwości biologiczne, którego szkodliwość wynikająca z potencjalnej cytotoksyczności w stosunku do komórek eukaryotycznych została obniżona, poprzez zminimalizowanie liczby nanocząstek srebra. Wykazałam również, że możliwe jest zastosowanie metody ALD do wytwarzania nanocząstek srebra na powierzchni warstw złożonych z nanoporów i nanorurek TiO_2 . Stosując minimalną ilość cykli osadzania (25) uzyskałam warstwy nanokompozytowe TNT/AgNPs, w których nanocząstki o średnicach ok. 8 nm zlokalizowane były głównie na górnych krawędziach nanoporów i nanorurek. Spośród badanych powłok najbardziej optymalną aktywność biologiczną wykazywała warstwa TNT3/AgNPs. Należy jednak podkreślić, że mimo wysokiej aktywności biobójczej warstw nanokompozytowych TNT/AgNPs wytwarzanych metodą ALD i mimo ich optymalnej biozgodności, aby móc myśleć o ich praktycznym zastosowaniu należałoby przeprowadzić testy *in vivo*. Dane literaturowe wskazują, że AgNPs, których średnice są mniejsze od 20 nm są potencjalnie cytotoksyczne dla komórek eukaryotycznych. Biorąc to pod uwagę, w przypadku nanocząstek srebra osadzanych opracowaną metodą ALD istnieje duże prawdopodobieństwo, że 8 nm cząstki będą działać cytotoksycznie nie tylko na komórki bakteryjne ale też na komórki zwierzęce/ludzkie.

Na szczególną uwagę zasługują wyniki badań nad procedurą wytwarzania nanokryształów hydroksyapatytu na warstwach nanoporowatych i nanorurkowych, wykorzystując w jednym z etapów procesu metodą ALD. Warstwy TNT potraktowałam

jako łącznik kryształów HA z powierzchnią stopu tytanowego i uzyskałam w ten sposób układy Ti6Al4V/TNT/HA, które charakteryzowały się zarówno optymalnymi właściwościami mechanicznymi, jak i wysoką biogodnością oraz aktywnością mikrobiobójczą. Należy podkreślić, że również i w tym przypadku amorficzna nanoporowata powłoka TNT5 była najbardziej odpowiednia jako łącznik nanokryształów hydroksyapatytu z podłożem Ti6Al4V.

Analizując fotoindukowaną promieniowaniem UV degradację acetonu i błękitu metylenowego na powierzchni powłok TiO₂ stwierdziłam, że objętościowo małe cząsteczki acetonu są bardziej odpowiednim reagentem do testowania podatności nanoarchitektury powierzchni na adsorpcję wzorców zanieczyszczeń i aktywność fotokatalityczną. Wykazałam, że aktywność wytworzonych powłok TiO₂ o zróżnicowanej strukturze i morfologii, uzyskanych trzema różnymi metodami utleniania powierzchni stopu Ti6Al4V maleje w szeregu TNW>TNF>TNT. Najmniej aktywne są amorficzne nanoporowate powłoki TNT, które jednocześnie pod względem mikrobiobójczości działały najsilniej.

4.3.5. Literatura

- [1] Williams D.F., Definitions in biomaterials. *Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials*, Chester, England, March 3-5, 1986, Vol. 4, Elsevier, Amsterdam, **1987**.
- [2] Błażewicz S., Stoch L., *Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna*, Tom 4: Biomateriały; 1. Wydawnictwo EXIT; **2000**.
- [3] Marciniak J., *Biomateriały*, Wyd. Politechniki Śląskiej, Gliwice **2002**
- [4] Albert K., Characterization of wear in composite material orthopaedic implants. 2. The implant/ bone interface; *Bio-Med Mater-Eng*, **1994**, 199-211.
- [5] Turner C. H., Three Rules for Bone Adaptation to Mechanical Stimuli, *Bone* **1998** Vol. 23, No. 5: 399–407.
- [6] Guilemot F., Prima F., Latta L., Bareille R., ; Gordin D., Gloriant T., Porté-Durrieu M., Ansel D., Baquey Ch., Design of new titanium alloys for orthopaedic applications, *Medical and Biological Engineering and Computing*, **2004**, 42, 1, 137-141.
- [7] Oldani C., Dominguez A., Titanium as a Biomaterial for Implants, *Recent Advances in Arthroplasty*, Samo Fokter (Ed.), ISBN: 978-953-307-990-5, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-arthroplasty/titanium-as-a-biomaterial-for-implants>
- [8] De Viteri, V. S., Fuentes E., Titanium and Titanium Alloys as Biomaterials. *Tribology - Fundamentals and Advancements*, Jurgen Gegner (Ed.), **2013**, 155-181, InTech, Available from:
- [9] Geetha, M., Singh, A. K., Asokamani, R. & Gogia, A. K. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants - A review. *Prog. Mater. Sci.* **2009**, 54, 397–425.
- [10] Banerjee, D., Williams, J. C., Perspectives on titanium science and technology. *Acta Mater.* **2013**, 61, 844–879.
- [11] Khorasani, A. M., Goldberg, M., Doeven, E. H., & Littlefair, G., Titanium in Biomedical Applications—Properties and Fabrication: A Review. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, **2015**, 5(8), 593–619
- [12] Long, M., Rack, H. J., Titanium alloys in total joint replacement materials science perspective. *Biomaterials*, **1998**, 19, 1621–1639.
- [13] Eisenbarth, E., Velten, D., Muller, M., Thull, R. & Breme, J. Biocompatibility of beta-stabilizing elements of titanium alloys. *Biomaterials*, **2004**, 25, 5705–5713.
- [14] Secchi, V., Franchi, S., Santi, M., Vladescu, A., Braic, M., Skála, T., Battocchio, C., Biocompatible Materials Based on Self-Assembling Peptides on Ti25Nb10Zr Alloy: Molecular Structure and Organization Investigated by Synchrotron Radiation Induced Techniques. *Nanomaterials*, **2018**, 8(3), 148.
- [15] Niinomi, M.; Nakai, M.; Hieda, J. Development of new metallic alloys for biomedical applications. *Acta Biomater.* **2012**, 8, 3888–3903
- [16] Lütjering, G., Williams, J. C. *Titanium*, Springer Science & Business Media, Jun 29, **2013**.
- [17] Donachie, M. J., *Titanium: A Technical Guide*, ASM International, **2000**.
- [18] Yan, S., Song, G.-L., Li, Z., Wang, H., Zheng, D., Cao, F., Zhou, L., A state-of-the-art review on passivation and biofouling of Ti and its alloys in marine environments. *Journal of Materials Science & Technology*, **2018**, 34(3), 421–435
- [19] Bosshardt, D. D., Chappuis, V., Buser, D. Osseointegration of titanium, titanium alloy and zirconia dental implants: current knowledge and open questions. *Periodontology* **2000**, **2016**, 73(1), 22–40

- [20] Goia, T. S., Violin, K. B., Yoshimoto, M., Bressiani, J.C., Almeida Bressiani, A. H., Osseointegration of Titanium Alloy Macroporous Implants Obtained by PM with Addition of Gelatin, *Advances in Science and Technology*, **2010**, 76, 259-263.
- [21] Danza, M., Zollino, I., Candotto, V., Cura, F., Carinci, F., Titanium alloys (AoN) and their involvement in osseointegration, *Dental research journal*, **2012**, 9(Suppl 2), S207–S210
- [22] Damiani, L., Eales, M. G., Nobbs, A. H., Su, B., Tsimbouri, P. M., Salmeron-Sanchez, M., & Dalby, M. J., Impact of surface topography and coating on osteogenesis and bacterial attachment on titanium implants. *Journal of Tissue Engineering*, **2018**, 9, 204173141879069.
- [23] Sun, H., Zhang, Y., Dou, L., Song, X., Sun, C., Surface modification of pure titanium to improve its anti-inflammatory function. *European Journal of Inflammation*, **2015** 13(3), 204–208.
- [24] Renvert, S., Quirynen M., Risk indicators for peri-implantitis. A narrative review, *Clin Oral Implants Res.*, **2015** 26 Suppl 11, 15-44.
- [25] Jańczuk Z. (red.) Choroby przyzębia. Zapobieganie, diagnostyka i leczenie. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, **2005**
- [26] Pierson, H.O., *Handbook of Chemical Vapor Deposition: Principles, Technology and Applications*, Noyes Publications, USA, **2010**
- [27] Fischer, R. A., Allendorf, M. D., *Precursor Chemistry of Advanced Materials: CVD, ALD and Nanoparticles*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2005**
- [28] Staruch, R., Griffin, M., Butler, P., Nanoscale surface modifications of orthopaedic implants: state of the art and perspectives. *Open Orthop J* **2016**, 10, 920–938.
- [29] Civantos, A., Martínez-Campos, E., Ramos, V., Titanium coatings and surface modifications: toward clinically useful bioactive implants. *ACS Biomater Sci Eng* **2017**; 3(7), 1245–1261.
- [30] M. Kulkarni, A. Mazare, P. Schmuki, A. Iglič, Biomaterial surface modification of titanium and titanium alloys for medical applications, *Nanomedicine*, **2014**, 111–136.
- [31] Orsini G, Assenza B, Scarano A, Piattelli M, Piattelli A.. Surface analysis of machined versus sandblasted and acid-etched titanium implants, *Int J Oral Maxillofac Implants*. **2000**, 15, 779-84.
- [32] Rautray, T. R., Narayanan, R., Kwon, T.-Y., Kim, K.-H., Surface modification of titanium and titanium alloys by ion implantation, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **2010**, 93B(2), 581–591
- [33] Mehta, R, Panda, S, Nanda, S., Implant surface modification and osseointegration – past, present and future. *J Oral Heal Community Dent* **2014**, 8, 113–118
- [34] A.A. John, S.K. Jaganathan, E. Supriyanto, A. Manikandan, Surface modification of titanium and its alloys for the enhancement of osseointegration in orthopaedics, *Curr Sci*. **2016**, 111, 1003-1015
- [35] Lewandowska, M., Włodkowska, M., Olkowski, R., Roguska, A., Polak, B., Pisarek, M., Kurzydłowski, K. J., *Chemical Surface Modifications of Titanium Implants. Macromolecular Symposia*, **2007**, 253(1), 115–121.
- [36] Roy, P., Berger, S., Schmuki, P., TiO₂ Nanotubes: Synthesis and Applications. *Angewandte Chemie International Edition*, **2011**, 50(13), 2904–2939.
- [37] Zwilling, V., Aucouturier, M., Darque-Ceretti, E., Anodic oxidation of titanium and TA6V alloy in chromic media. An electrochemical approach. *Electrochim Acta*. **1999**, 45(6), 921–929
- [38] Ghicov A., Schmuki P., Self-ordering electrochemistry: a review on growth and functionality of TiO₂ nanotubes and self-aligned MO_x structures, *Chem. Comm.*, **2009**, 2791-2808

- [39] Park, J., Bauer, S., Schlegel, K. A., Neukam, F. W., von der Mark, K., Schmuki, P. TiO₂ Nanotube Surfaces: 15 nm-An Optimal Length Scale of Surface Topography for Cell Adhesion and Differentiation. *Small*, **2009**, 5(6), 666–671.
- [40] Wierzchoń T., Czarnowska E., Krupa D., Inżynieria powierzchni w wytwarzaniu biomateriałów tytanowych. Oficyna wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa, **2004**
- [41] Grimes, C. A., Mor, G. K., *TiO₂ Nanotube Arrays*. Springer Science+Business Media, **2009**
- [42] Mor, G.K. Varghese, O.K. Paulose, M. Shankar, K. Grimes, C. A., A review on highly ordered, vertically oriented TiO₂ nanotube arrays: Fabrication, material properties, and solar energy applications, *Sol. Energy Mater. Sol. Cells*. **2006**, 90, 2011–2075.
- [43] Macak, J. M., Tsuchiya, H., Schmuki, P., High-Aspect-Ratio TiO₂ Nanotubes by Anodization of Titanium. *Angewandte Chemie International Edition*, **2005**, 44(14), 2100–2102
- [44] Regonini, D., Satka, A., Jaroenworarluck, A., Allsopp, D.W.E., Bowen, C.R., Stevens, R., Factors influencing surface morphology of anodized TiO₂ nanotubes, *Electrochim. Acta*. **2012**, 74, 244–253.
- [45] Lewandowska Ż., Piszczek P., Radtke A., Jędrzejewski T., Kozak W., Sadowska B., The Evaluation of the Impact of Titania Nanotube Covers Morphology and Crystal Phase on Their Biological Properties. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **2015**, 26, 163
- [46] Yang, B. Ng, C.K. Fung, M.K. Ling, C.C. Djurišić, A.B. Fung, S., Annealing study of titanium oxide nanotube arrays, *Materials Chemistry and Physics*, **2011**, 130 1227-1231.
- [47] Lin, J., Wang, B., Sproul, W.D., Ou, Y., Dahan, I., Anatase and rutile TiO₂ films deposited by arc-free deep oscillation magnetron sputtering, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2013, 46, 084008.
- [48] K. Thamaphat, P. Limsuwan, B. Ngotawornchai, Phase Characterization of TiO₂ Powder by XRD and TEM, *Kasetsart J. Nat. Sci.*, **2008**, 42, 357-361.
- [49] Ruan, C. Paulose, M. Varghese, O.K. Mor, G.K. Grimes, C. A., Fabrication of highly ordered TiO₂ nanotube arrays using an organic electrolyte., *J. Phys. Chem. B.*, **2005**, 109, 15754– 15759.
- [50] Ye, Y., Liu, Y., Guo, T., Effect of H₂O content in electrolyte on synthesis and field emission property of anodized TiO₂ nanotubes, *Surf. Coatings Technol.* **2014**, 245, 28–33.
- [51] Hurlen, T., Gulbrandsen, E., Growth of anodic films on noble metals. *Electrochim. Acta*, **1994**, 39, 2169-2174
- [52] Yuan, Y.; Lee, T.R., Chapter 1 Contact Angle and Wetting Properties. In *Surface Science Techniques*, Springer Series in Surface Sciences; Bracco, G., Holst, B., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, **2013**; 3–34.
- [53] Comyn J., Contact angles and adhesive bonding, *International Journal of Adhesion and Adhesives*, **1992**, 12, 145–149
- [54] Park, J. H., Olivares-Navarrete, R., Baier, R. E., Meyer, A. E., Tannenbaum, R., Boyan, B. D., Schwartz, Z., Effect of cleaning and sterilization on titanium implant surface properties and cellular response. *Acta Biomaterialia*, **2012**, 8(5), 1966–1975
- [55] Kummer, K. M., Taylor, E. N., Durmas, N. G., Tarquinio, K. M., Ercan, B., Webster, T. J., Effects of different sterilization techniques and varying anodized TiO₂ nanotube dimensions on bacteria growth., *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **2013**, 101B(5), 677–688
- [56] Vezeau, P.J., Koorbusch, G.F., Draughn, R.A., Keller, J.C., Effects of multiple sterilization on surface characteristics and in vitro biologic responses to titanium; *J Oral Maxillofac Surg*. **1996**, 54(6), 738-46.

- [57] Nair, P. D. (1995). Currently Practised Sterilization Methods-Some Inadvertent Consequences, *Journal of Biomaterials Applications*, **1995**, 10(2), 121–135
- [58] Cedillo-Gonzalez, E. I., Montorosi, M., Mugoni, C., Montorosi, M., Siligardi, C., Improvement of the adhesion between TiO₂ nanofilm and glass substrate by roughness modifications. *Phys. Procedia* **2013**, 40, 19–29
- [59] Albu, S. , Kim, D. and Schmuki, P. (2008), Growth of Aligned TiO₂ Bamboo-Type Nanotubes and Highly Ordered Nanolace. *Angewandte Chemie International Edition*, **2008**, 47, 1916-1919
- [60] Kim, D., Ghicov, A., Albu, S., P., Schmuki, P., Bamboo-Type TiO₂ Nanotubes: Improved Conversion Efficiency in Dye-Sensitized Solar Cells, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 16454.
- [61] Macak, J.M.; Tsuchiya, H.; Ghicov, A.; Yasuda, K.; Hahn, R.; Bauer, S.; Schmuki, P., TiO₂ nanotubes: Self-organized electrochemical formation, properties and applications. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2007**, 11, 3–18
- [62] Zhu, W.; Liu, X.; Liu, H.; Tong, D.; Yang, J.; Peng, J. An efficient approach to control the morphology and the adhesion properties of anodized TiO₂ nanotube arrays for improved photoconversion efficiency, *Electrochim. Acta* **2011**, 56, 2618–2626
- [63] Yin, H.; Liu, H.; Shen, W.Z., The large diameter and fast growth of self-organized TiO₂ nanotube arrays achieved via electrochemical anodization. *Nanotechnology* **2010**, 21, 035601
- [64] Bodhak, S., Bose, S., Kinsel, W. C., Bandyopadhyay, A., Investigation of In Vitro Bone Cell Adhesion and Proliferation on Ti Using Direct Current Stimulation. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, **2012**, 32, 8, 2163–2168.
- [65] Dalby, M.J.; Riehle, M.O.; Johnstone, H.; Affrossman, S.; Curtis, A.S. Investigating the limits of filopodial sensing: A brief report using SEM to image the interaction between 10 nm high nano-topography and fibroblast filopodia. *Cell Biol. Int.* **2004**, 28, 229–236
- [66] Riehle, M.; Dalby, M.J.; Johnstone, H.; McIntosh, A.; Affrossman, S. Cell behaviour of rat calvaria bone cells on surfaces with random nanometric features. *Mater. Sci. Eng. C* **2003**, 23, 337–340
- [67] Puckett, S. D., Taylor, E., Raimondo, T., Webster, T. J., The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment. *Biomaterials*, **2010**, 31 (4), 706–713
- [68] Yoshinari, M.; Oda, Y.; Kato, T.; Okuda, K. Influence of surface modifications to titanium on antibacterial activity in vitro. *Biomaterials* **2001**, 22, 2043–2048.
- [69] Raulio, M.; Jarn, M.; Ahola, J.; Peltonen, J.; Rosenholm, J.B.; Tervakangas, S. Microbe repelling coated stainless steel analysed by field emission scanning electron microscopy and physicochemical methods. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 35, 751–760.
- [70] Ercan, B., Taylor, E., Alpaslan, E., & Webster, T. J., Diameter of titanium nanotubes influences anti-bacterial efficacy. *Nanotechnology*, **2011**, 22 (29), 295102
- [71] Huo, K., Zhang, X., Wang, H., Zhao, L., Liu, X., & Chu, P. K., Osteogenic activity and antibacterial effects on titanium surfaces modified with Zn-incorporated nanotube arrays. *Biomaterials*, **2013**, 34 (13), 3467–3478
- [72] Qian, L., Du, Z.-L., Yang, S.-Y., & Jin, Z.-S., Raman study of titania nanotube by soft chemical process. *Journal of Molecular Structure*, **2005**, 749(1-3), 103–107
- [73] Ye, L., Liu, J., Jiang, Z., Peng, T., & Zan, L., The pure shape effect with a removing facet effect of single-crystalline anatase TiO₂ (101) for photocatalytic application. *Nanoscale*, **2013**, 5(19), 9391
- [74] Nakamoto, K., *Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds*, Part A, 5ed., John Wiley & Sons. Inc., New York **1997**.

- [75] Lee, H., Dregia, S., Akbar, S., Alhoshan, M., Growth of 1-D TiO₂ nanowires on Ti and Ti alloys by oxidation. *Journal of Nanomaterials*. **2010** 7 Article ID 503186
- [76] Dinan, B., Akbar, S., One dimensional oxide nanostructures by gas-phase reaction. *Functional Nanomaterials Letters*. **2009**; 2, 87-94
- [77] Huo, K., Zhang, X., Fu, J., Synthesis and field emission properties of rutile TiO₂ nanowires arrays grown directly on a Ti metal self-source substrate. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **2009**; 9, 3341-3346
- [78] Thoppey, N.M., Bochinski, J.R., Clarke, L.I., Gorga, R.E., Edge electrospinning for high through-put production of quality nanofibers, *Nanotechnology*. **2011**, 22, Article ID 345301
- [79] Lee, J.C., Park, K.S., Kim, T.G., Choi, H.J., Sung, Y.M., Controlled growth of high-quality TiO₂ nanowires on sapphire and silica. *Nanotechnology*. **2006**; 17, 4317-4321
- [80] Amin, S.S., Nicholls, A.W., Xu, T.T., A facile approach to synthesize single crystalline rutile TiO₂ one-dimensional nanostructures. *Nanotechnology*. **2007**; 18, 445609
- [81] Fujihara, K., Kumar, A., Jose, R., Ramakrishna, S., Spray deposition of electrospun TiO₂ nanorods for dye-sensitized solar. *Nanotechnology*. **2007**; 18, 365709
- [82] Kisumi, T., Tsujiko, A., Murakoshi, K., Nakato, Y., Crystal-face and illumination intensity dependences of the quantum efficiency of photoelectrochemical etching, in relation to those of water photooxidation, at *n*-TiO₂ (rutile) semiconductor electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **2003**; 545, 99-107
- [83] Deal, B. E. and Grove, A. S., General Relationship for the Thermal Oxidation of Silicon; *Journal of Applied Physics*, **1965**, 36, 3770
- [84] Tan, A.W., Ismail, R., Chua, K.H., Ahmad, R., Akbar, S.A., Pinguan-Murphy, B., Osteogenic potential of in-situ TiO₂ nanowire surfaces formed by thermal oxidation of titanium alloy surface. *Applied Surface Science*. **2014**, 320, 161-170
- [85] Piszczek P., Grodzicki A., Richert M., Radtke A., Characteristic of thermal properties of multinuclear Ti(IV) and Zr(IV) carboxylate derivatives using thermal analysis and variable temperature MS and IR methods. *Materials Science-Poland*, **2005**, 23, 663-670.
- [86] Piszczek P., Radtke A., Grodzicki A., Wojtczak A., Chojnacki J., The new type of Zr₆O₄(OH)₄ Cluster Core: Crystal Structure and Spectral Characterization of [Zr₆O₄(OH)₄(OOCR)₁₂] (R = Bu^t, C(CH₃)₂Et). *Polyhedron*, **2007**, 26, 679-685
- [87] Piszczek P., Radtke A., Wojtczak A., Muzioł T., Chojnacki J., Synthesis, structure characterization and thermal properties of [Zr₆(μ₃-O₄)(μ₃-OH)₄(OOCCH₂^tBu)₉(μ₂-OH)₃]₂. *Polyhedron*, **2008**, 28, 279-285
- [88] Piszczek P., Richert M., Radtke A., Muzioł T., Wojtczak A., Synthesis of titanium dioxide nanocrystalline layers using hexaprismatic shaped μ-oxo Ti(IV) alkoxo carboxylates as precursors. *Polyhedron*, **2009**, 28, 3872-3880
- [89] Radtke A., Piszczek P., Muzioł T., Wojtczak A., Grodzicki A., Synthesis, Structural Characterization, and Thermal Properties of Zirconium(IV) β - ketodiester Complexes. *Structural Chemistry*, **2010**, 21, 367-375
- [90] Piszczek P., Radtke A., Muzioł T., Richert M., Chojnacki J., The conversion of multinuclear μ-oxo titanium(IV) species in the reaction of Ti(OiBu)₄ with branched organic acids; results of structural and spectroscopic studies. *Dalton Trans.*, **2012**, 41, 8261-8269; doi:10.1039/C2DT12338J.
- [91] Piszczek P., Muchewicz Ż., Radtke A., Gryglas M., Dahm H., Różycki H., CVD of TiO₂ and TiO₂/Ag antimicrobial layers: Deposition from the hexanuclear μ-oxo Ti(IV) complex as a precursor, and the characterization. *Surf. Coat. Technol.*, **2013**, 222, 38-43
- [92] Szłyk, E., Piszczek, P., Grodzicki, A., Chaberski, M., Goliński, A., Szatkowski, J.,

- Błaszczyk, T., CVD of Ag(I) complexes with tertiary phosphines and perfluorinated carboxylates – A new class of silver precursors, *Chemical Vapor Deposition*, **2001**, 7, 1-6
- [93] Szłyk, E., Piszczek, P., Chaberski, M., Goliński, A., Studies of thermal decomposition process of Ag(I) perfluorinated carboxylates with temperature variable IR and MS, *Polyhedron*, **2001**, 20, 2853-2861
- [94] Piszczek, P., Szłyk, E., Chaberski, M., Taeschner, C., Leonhard, A., Bała, W., Bartkiewicz, K., Characterization of silver trimethylacetate complexes with tertiary phosphines as a chemical vapor deposition precursors of silver films, *Chemical Vapor Deposition*, **2005**, 11, 53-59
- [95] Szymańska, I., Piszczek, P., Szczęsny, R., Szłyk, E., Thermal and MS studies of silver(I) 2,2-dimethylbutyrate complexes with tertiary phosphines and their application for CVD of silver films, *Polyhedron*, **2007**, 26, 2440-2448
- [96] Beer, C., Foldbjerg, R., Hayashi, Y., Sutherland, D.S., Autrup, H., Toxicity of silver nanoparticles – Nanoparticle or silver ion? *Toxicol. Lett.* **2012**, 208, 286–292
- [97] Kim, S., Choi, J.E., Choi, J., Chung, K.H., Park, K., Yi, J., Ryu, D.Y., Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxico. In Vitro* **2009**, 23, 1076–1084
- [98] Munirathinam, B., Neelakantan, L., Role of crystallinity on the nanomechanical and electrochemical properties of TiO₂ nanotubes, *J. Electroanal. Chem.* **2016**, 770, 73–83
- [99] Kheur, S., Singh, N., Bodas, D., Rauch, J.Y., Jambhekar, S., Kheur, M., Rajwade, J., Nanoscale silver depositions inhibit microbial colonization and improve biocompatibility of titanium abutments. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2017**, 159, 151–158
- [100] Ewald, A., Glückermann, S.K., Thull, R., Gbureck, U., Antimicrobial titanium/silver PVD coatings on titanium. *Biomed. Eng. Online* **2006**, 5, 22
- [101] ISO 10993-1:2018 Standards. Biological Evaluation of Medical Devices—Part 1: Evaluation and Testing Within a Risk Management Process. (dostęp on line z dnia 10 stycznia 2019: <https://www.iso.org/standard/68936.html>).
- [102] Leskelä M., Ritala, M., Atomic Layer Deposition Chemistry: Recent Developments and Future Challenges, *Angewandte Chemie International Edition*, **2003**, 42, 43, 5548-5554
- [103] Johnson, R.W., Hultqvist, A., Bent, S.F., A brief review of atomic layer deposition: from fundamentals to applications, *Materials Today*, **2014**, 17, 5, 236-246.
- [104] Weber, M. J., Atomic layer deposition of noble metal nanoparticles Eindhoven: Technische Universiteit Eindhoven, 2014, DOI: 10.6100/IR776263
- [105] Kariniemi, M., Niinistö, J., Hatanpää, T., Kemell, M., Sajavaara, T., Ritala, M., Leskelä, M., Plasma-enhanced atomic layer deposition of silver thin films, *Chemistry of Materials*, **2011**, 23, 2901-2907
- [106] Lan, M.-Y., Liu, C.-P., Huang, H.-H., Lee, S.-W., Both Enhanced Biocompatibility and Antibacterial Activity in Ag-Decorated TiO₂ Nanotubes. *PLoS ONE* **2013**, 8, e75364.
- [107] Takagi, J., Petre, B.M., Walz, T., Springer, T.A., Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* **2002**, 110, 599–611.
- [108] Kumari, R., Majumdar, J.D., Microstructure and surface mechanical properties of plasma spray deposited and post spray heat treated hydroxyapatite (HA) based composite coating on titanium alloy (Ti-6Al-4V) substrate. *Mater. Charact.* **2017**, 131, 12–20
- [109] Avila, I.; Pantchev, K.; Holopainen, J.; Ritala, M.; Tuukkanen, J. Adhesion and mechanical properties of nanocrystalline hydroxyapatite coating obtained by conversion of atomic layer deposited calcium carbonate on titanium substrate. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*

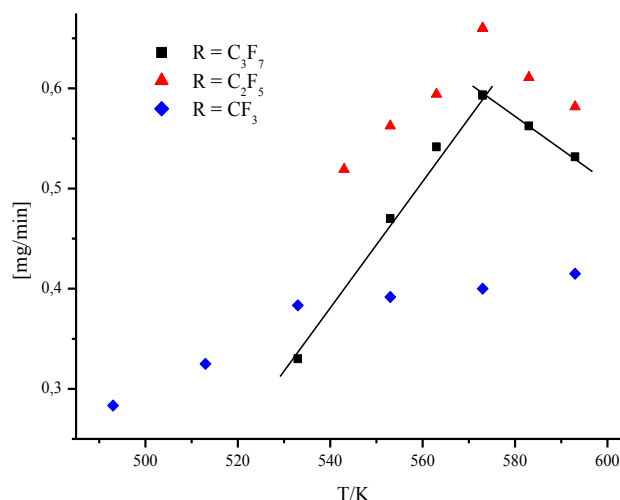
2018, 29, 111

- [110] Holopainen, J., Kauppinen, K., Mizohata, K.; Santala, E., Mikkola, E., Heikkilä, M.; Kokkonen, H., Leskelä, M.; Lehenkari, P., Tuukkanen, J., Preparation and bioactive properties of nanocrystalline hydroxyapatite thin films obtained by conversion of atomic layer deposited calcium carbonate. *Biointerphases* **2014**, 9, 031008
- [111] Padiyan, D.P., Raja, D.H., Synthesis of Various Generations Titania Nanotube Arrays by Electrochemical Anodization for H₂ Production. *Energy Procedia* **2012**, 22, 88–100.
- [112] Liu, Z., Zhang, Q., Qin, L.-C., Reduction in the electronic band gap of titanium oxide nanotubes. *Solid State Commun.* **2007**, 141, 168–171
- [113] Dette, C., Pérez-Osorio, M.A., Kley, C.S., Punke, P., Patrick, C.E., Jacobson, P., Kern, K., TiO₂ Anatase with a Bandgap in the Visible Region. *Nano Lett.* **2014**, 14, 6533–6538.
- [114] Scanlon, D.O., Dunnill, C.W., Buckeridge, J., Shevlin, S.A., Logsdail, A.J., Woodley, S.M., Sokol, A.A., Band alignment of rutile and anatase TiO₂. *Nat. Mater.* **2013**, 12, 798–801.
- [115] Hanaor, D.A.H., Sorrell, C.C., Review of the anatase to rutile phase transformation. *J. Mater. Sci.* **2010**, 46, 855–874.
- [116] Kumar, K.V., Porkodi, K., Rocha, F., Langmuir–Hinshelwood kinetics—A theoretical study. *Catal. Commun.* **2008**, 9, 82–84
- [117] Chiarello, G. L., Di Paola, A., Palmisano, L., & Selli, E., Effect of titanium dioxide crystalline structure on the photocatalytic production of hydrogen. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2011, (3), 355–360
- [118] Houas, A., Lachheb, H., Ksibi, M., Elaloui, E., Guillard, Ch., Herrmann, J.-M., Photocatalytic degradation pathway of methylene blue in water *Appl. Catal. B: Environment.*, **2001**, 31, 145-157.
- [119] M. Kosmulski, The significance of the difference in the point of zero charge between rutile and anatase, *Adv. Coll. Interface Sci.*, **2002**, 99, 255-264.
- [120] Thi Truc, L.N., Hong, S., No, K., Evaluation of the Role of Hydroxyapatite in TiO₂/Hydroxyapatite Photocatalytic Materials, In book: *Photocatalysts: Applications and Attributes*, InTechOpen, November 2018
- [121] Nonami, T., Hase, H., Funakoshi, K., Apatite-coated titanium dioxide photocatalyst for air purification, *Catalysis Today*, **2004**, 96, 113-118
- [122] Ma, N., Fan, X., Quan, X., Zhang, Y., Ag–TiO₂/HAp/Al₂O₃ bioceramic composite membrane: Fabrication, characterization and bactericidal activity, *Journal of Membrane Science*, **2009**, 336, 109-117
- [123] Liu, Y., Yang, Q., Wei, J.H., Xiong, R., Pan, C.X., Shi, J., Synthesis and photocatalytic activity of hydroxyapatite modified nitrogen-doped TiO₂, *Materials Chemistry and Physics*, **2011**, 129, 654-659
- [124] Reddy, M.P., Venugopal, A., Subrahmanyam, M., Hydroxyapatite photocatalytic degradation of calmagite (an azo dye) in aqueous suspension, *Applied Catalysis B: Environmental*, **2007**, 69, 3-4, 164-170
- [125] Mohamed, R.M., Baeissa, E.S., Preparation and characterisation of Pd–TiO₂–hydroxyapatite nanoparticles for the photocatalytic degradation of cyanide under visible light. *Applied Catalysis A: General*, **2013**, 464-465, 218-224
- [126] Zhang, X., Yates, M.Z., Enhanced photocatalytic activity of TiO₂ nanoparticles supported on electrically polarized hydroxyapatite, *ACS Applied Materials & Interfaces*, **2018**, 10, 20, 17232-17239

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych w oparciu o publikacje (PA1-PA8) i patenty (PP1-PP3)

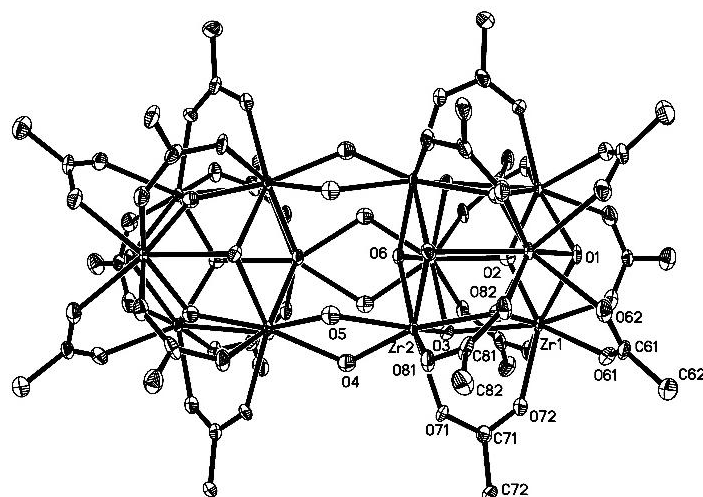
Po obronie rozprawy doktorskiej w 2007 roku wzięłam udział w pracach badawczych związanych z realizacją projektu finansowanego przez KBN (N204 116 31/2635) kierowanego przez prof. dr hab. Antoniego Grodzickiego, pt. *Otrzymywanie, struktura i badanie właściwości fizykochemicznych nanometrycznych warstw typu MO_2/M^0 ($M = Ti(IV), Zr(IV), M^0 = Ag, Cu$ i Pd). W trakcie realizacji tego projektu zajmowałam się syntezą wielordzeniowych μ -okso-kompleksów $Ti(IV)$ i $Zr(IV)$, określaniem ich właściwości termicznych i możliwości zastosowania jako prekursorów tlenków $Ti(IV)$ i $Zr(IV)$ w metodzie chemicznego osadzania z fazy gazowej (CVD). Najczęściej stosowanymi ówczesznie prekursorami CVD TiO_2 i ZrO_2 były wysoce lotne alkoholany $Ti(IV)$ i $Zr(IV)$. Z punktu widzenia prowadzenia procesów CVD szczególnie niekorzystną cechą tych związków była łatwość, z jaką ulegały reakcjom hydrolizy w obecności nawet śladowych ilości wilgoci. Powodowało to, że związki te były trudne do przechowywania i przenoszenia, a także wymagały zastosowania specjalnych technik wprowadzania do reaktora CVD. Jednym z celów przeprowadzonych prac było zredukowanie wysokiej reaktywności alkoholów tytanu(IV) i cyrkonu(IV) w stosunku do czynników nukleofilowych, poprzez podstawienie ligandów alkoholowych przez dwudonorowe ligandy mostkujące, np. β -diketoniany, ketoestry, czy karboksylany.*

Prowadzone przeze mnie badania dotyczyły syntezy kompleksów karboksylanowych $Zr(IV)$, których rdzeń tworzą szkielety $\{Zr_6O_4(OH)_4\}$. Związki te otrzymywałam w wyniku reakcji alkoholów $Zr(IV)$ z kwasami organicznymi, przy zachowaniu stosunku molowego 1:2. Stosując kwasy trimetylooctowy i 2,2-dimetylobutanowy otrzymałam połączenia typu $[Zr_6O_4(OH)_4(OOCR')_{12}]$ ($R' = ^iBu, C(Me)_2Et$). Strukturę tych kompleksów ustaliłam na podstawie badań dyfrakcji rentgenowskiej pojedynczego kryształu i spektroskopowych (IR, NMR) [PA1]. Otrzymane związki ulegały termicznemu rozkładowi w zakresie temperatury 300-350°C, ale jak wykazała analiza zmiennie-temperaturowych widm IR w fazie gazowej (VT-IR) ich termoliza nie przebiegała z utworzeniem lotnych połączeń $Zr-OOCR'$ lub $Zr-OR$, co wykluczało ich zastosowanie jako prekursorów w procesach CVD. Dlatego kontynuując badania nad lotnymi prekursorami CVD ZrO_2 przeprowadziłam reakcje alkoholów $Zr(IV)$ ($[Zr(OR)_4]$; $R = ^iPr, ^nBu$), z pefluorowanymi kwasami organicznymi ($R'COOH$; $R' = CF_3, C_2F_5, C_3F_7$). Bez względu na stosunek molowy alkoholu do kwasu (1:1; 1:2), tworzyły się sześciordzeniowe połączenia $Zr(IV)$ z ligandami alkoholowymi i karboksylanowymi o wzorze sumarycznym: $[Zr_6O_4(OH)_4(OR)_6(OOCR')_6]$. Budowę strukturalną otrzymanych związków zaproponowałam w oparciu o analizę widm IR, ^{13}C NMR w ciele stałym oraz spektrometrii mas z jonizacją strumieniem elektronów (MS-EI), bowiem nie udało się otrzymać monokryształów odpowiednich do pomiarów krystalograficznych. Ważnym etapem przeprowadzonych badań było określenie temperatury parowania (T_v) otrzymanych kompleksów $Zr(IV)$. Parametr ten wyznaczyłam w oparciu o zależności ubytku masy prekursora, w określonym czasie, od temperatury. Wyniki badań lotności związków $[Zr_6O_4(OH)_4(O^iPr)_6(OOCR')_6]$ ($R' = CF_3, C_2F_5, C_3F_7$) wykazały, że pochodne kwasów $R'COOH$, gdzie $R' = C_2F_5$ i C_3F_7 , posiadają właściwości odpowiednie dla ich wykorzystania w metodzie CVD (Rysunek 26) [PP1].



Rysunek 26. Wyniki badań wpływu temperatury na szybkość odparowania okso-kompleksów $[\text{Zr}_6\text{O}_4(\text{OH})_4(\text{O}^i\text{Pr})_6(\text{OOCR}')_6]$ ($\text{R}' = \text{CF}_3, \text{C}_2\text{F}_5, \text{C}_3\text{F}_7$) [PP1].

Kolejną grupę związków Zr(IV) otrzymałam w wyniku stechiometrycznych reakcji alkoholanów cyrkonu(IV) ($\text{Zr}(\text{OR})_4$; $\text{R} = \text{Pr}^i, \text{C}(\text{Me})_2\text{Et}, \text{Bu}$) z 1,3-(dikarboksylano-tertbutylo)-acetonem, $[\text{Bu}^t\text{OOCCH}_2\text{-C}(\text{O})\text{CH}_2\text{COOBu}^t]$ oraz 1,3-(dikarboksylano-metylo)-acetonem. Wyizolowałam związki kompleksowe o wzorach ogólnych: $\text{Zr}\{[(\text{OCOCBu}^t\text{CHC}(\text{O})\text{CCH}_2(\text{COOCBu}^t))]_4\}$, $\text{Zr}\{[(\text{OCOBu}^t\text{-CHC}(\text{O})\text{CCH}_2(\text{COOBu}^t))]_3(\text{OR})\}$ ($\text{R} = \text{Pr}^i, \text{C}(\text{Me})_2\text{Et}, \text{Bu}$), $\text{Zr}\{[(\text{OCOMe-CHC}(\text{O})\text{CCH}_2(\text{COOMe}))_4]\}$ i $\text{Zr}\{[(\text{OCOMe-CHC}(\text{O})\text{CCH}_2(\text{COOMe}))_3(\text{OR})]\}$ ($\text{R} = \text{Pr}^i, \text{C}(\text{Me})_2\text{Et}, \text{Bu}$). Strukturę krystaliczną otrzymanych związków potwierdziłam za pomocą badań dyfrakcji rentgenowskiej oraz metodami spektroskopowymi (NMR, IR) [PP2]. Badania VT-IR i MS-EI udowodniły, że w trakcie termolizy wymienionych związków lotne produkty rozkładu tworzą się poniżej 200°C, jednak ich termiczna stabilność była na tyle wysoka, że warstwy ZrO_2 nie tworzyły się w trakcie procesu CVD. Poszukując związków Zr(IV) o odpowiedniej lotności przeprowadziłam reakcje $\text{Zr}(\text{OR})_4$ ($\text{R} = {}^i\text{Pr}, {}^i\text{Bu}$) z β -diketodiestrami dtbacdc = 1,3-(dikarboksylano-tertbutylo)-acetonem i dmacdc = 1,3-(dikarboksylano-metylo)-acetonem. Prowadząc syntezę z czterokrotnym nadmiarem ketoestru otrzymałam kompleks $[\text{Zr}(\text{dtbacdc})_4]$, natomiast dwukrotny nadmiar ketoestru prowadził do otrzymania kompleksów $[\text{Zr}(\text{dmacdc})_3(\text{O}^i\text{Pr})_2]$ i $[\text{Zr}(\text{dtbacdc})_3(\text{O}^i\text{Pr})_2]$ [PA2, PP3]. Krystaliczną strukturę pierwszego z tych związków rozwiązałam w oparciu o pomiary rentgenowskiej dyfrakcji pojedynczego kryształu, a pozostałych dwu - metodami spektroskopii IR, ^{13}C NMR oraz MS-EI. Niestety badania VT-IR wykazały, że związki te w trakcie termolizy nie tworzą lotnych połączeń cyrkon-ligand, co wykluczało ich wykorzystanie jako prekursorów CVD. Prowadząc reakcję $\text{Zr}(\text{O}^i\text{Pr})_4$ z kwasem 3,3-dimetylobutanowym w stosunku molowym 1:2 wyizolowałam kryształy kompleksu $[\text{Zr}_6(\mu_3\text{-O})_4(\mu_3\text{-OH})_4(\text{OOCCH}_2^t\text{Bu})_9(\mu_2\text{-OH})_3]_2$, którego strukturę tworzyły dwa klasteru $\{\text{Zr}_6(\mu_3\text{-O})_4(\mu_3\text{-OH})_4\}$, stabilizowane dziewięcioma ligandami karboksylanowymi i połączone trzema mostkami hydroksylowymi (Rysunek 27) [PA3].

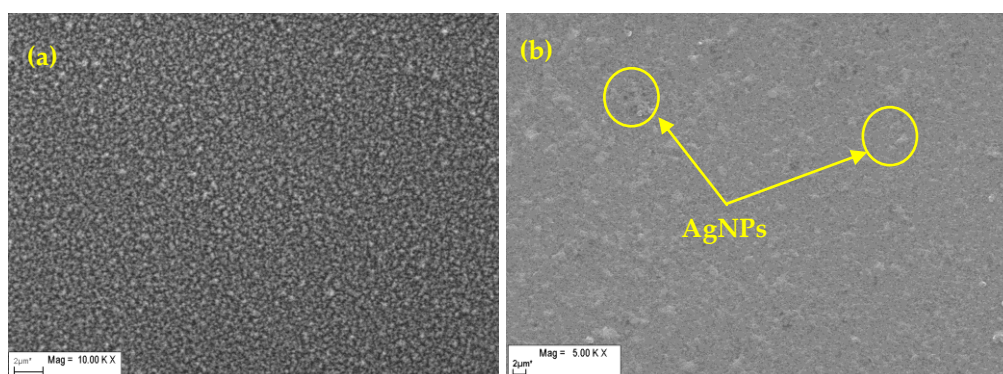


Rysunek 27. Struktura kompleksu $[Zr_6(\mu_3-O)_4(\mu_3-OH)_4(OOCCH_2^tBu)_9(\mu_2-OH)_3]_2 [PA3]$

Badając przebieg syntezy tego związku, zwróciłam uwagę, że przetrzymując zbyt długo (2-3 tygodnie) jego kryształy w roztworze macierzystym doprowadzam do ich przemian strukturalnych. Ponowne badania wyizolowanych po tym czasie kryształów wskazywały na tworzenie się wcześniej otrzymanego kompleksu $[Zr_6O_4(OH)_4(OOCR')_{12}]$.

Niezależnie od prac nad syntezą i charakterystyką strukturalną wielordzeniowych okso-kompleksów Zr(IV) prowadziłam również badania nad wielordzeniowymi okso-kompleksami tytanu(IV). Także i w tych przypadkach synteza związków opierała się na reakcjach alkoholów tytanu(IV) z kwasami organicznymi. Zachowując stosunek molowy Ti(IV) : kwas organiczny jak 1:1 otrzymywałam heksardzeniowe okso-kompleksy Ti(IV) $[Ti_6O_6(OR)_6(OOC^tBu)_6]$ ($R = ^iBu, ^tBu$). W oparciu o analizę widm VT-IR w fazie stałej i gazowej, a także MS-EI określiłam mechanizm termicznego rozkładu tych związków. Ustaliłam, że w trakcie ogrzewania krystalicznych proszków $[Ti_6O_6(OR)_6(OOC^tBu)_6]$ ($R = ^iBu, ^tBu$) w fazie gazowej pojawiają się termicznie stabilne połączenia $[OTi(OR)_2]$ oraz $[Ti(OR)_4]$, które w procesach CVD mogą stanowić źródło ditlenku tytanu [PA4]. W oparciu o wyniki wcześniejszych prac wyznaczyłam optymalne warunki prowadzenia procesu CVD i przeprowadziłam serię eksperymentów związanych z wytwarzaniem nanowarstw TiO_2 o różnej strukturze krystalicznej i grubości. Z uwagi na to, że wytworzone okso-kompleksy tytanu(IV) okazały się dobrymi prekursorami CVD ditlenku tytanu zastosowałam je wraz z perfluorowanymi okso-kompleksami cyrkonu(IV) do wytwarzania warstw typu $MO_2/AgNPs$, gdzie $M = Ti(IV)$ lub $Zr(IV)$. Celem poznania procesów przebiegających w fazie gazowej przeprowadziłam badania termicznego rozkładu równowagowych mieszanin typu $[Ti_6O_6(O^iBu)_6(OOC^tBu)_6]/[Ag(OOCC_2F_5)]$ oraz $[Zr_6O_4(OH)_4(O^iPr)_6(OOCC_2F_5)_6]/[Ag(OOCC_2F_5)]$, z zastosowaniem zmiennie-temperaturowej spektroskopii w podczerwieni (VT-IR) i spektrometrii mas (MS-EI). W eksperymentach CVD wykorzystywałam mieszaniny prekursorów o stosunku molowym 3:1 i 1:1. Procesy osadzania prowadziłam w zakresie 350-500°C, stosując argon jako gaz nośny. Głównym problemem, jaki musiałam rozwiązać był dobór temperatury osadzania. Różnice w temperaturach tworzenia warstw TiO_2 i metalicznego srebra powodowały, że morfologia i skład warstw domieszkowanych zmieniał się wraz ze wzrostem temperatury. W zakresie temperatury 350-440°C otrzymywałam warstwy tworzone głównie przez amorficzny ditlenek tytanu i rozproszone

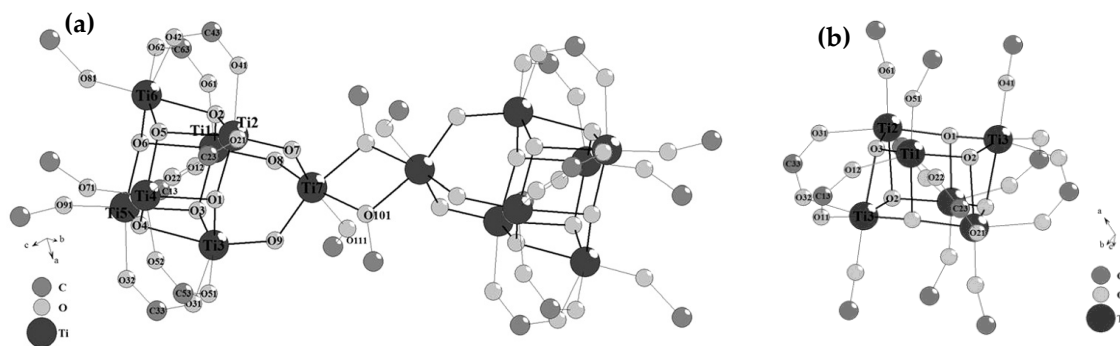
ziarna metalu. Różnice w morfologii powierzchni warstw TiO_2 oraz $\text{TiO}_2/\text{AgNPs}$ otrzymanych w powyższych warunkach przedstawiono na Rysunku 28.



Rysunek 28. Obrazy SEM warstw (a) TiO_2 i (b) $\text{TiO}_2/\text{AgNPs}$ ($T_D = 300^\circ\text{C}$) otrzymanych metodą CVD z wykorzystaniem odpowiednio $[\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{O}^i\text{Bu})_6(\text{OOC}^i\text{Bu})_6]$ oraz mieszaniny $[\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{O}^i\text{Bu})_6(\text{OOC}^i\text{Bu})_6]/[\text{Ag}_2(\text{OOC}^i\text{C}_2\text{F}_5)_2]_n$, w stosunku molowym 1:1, jako prekursorów [PA4].

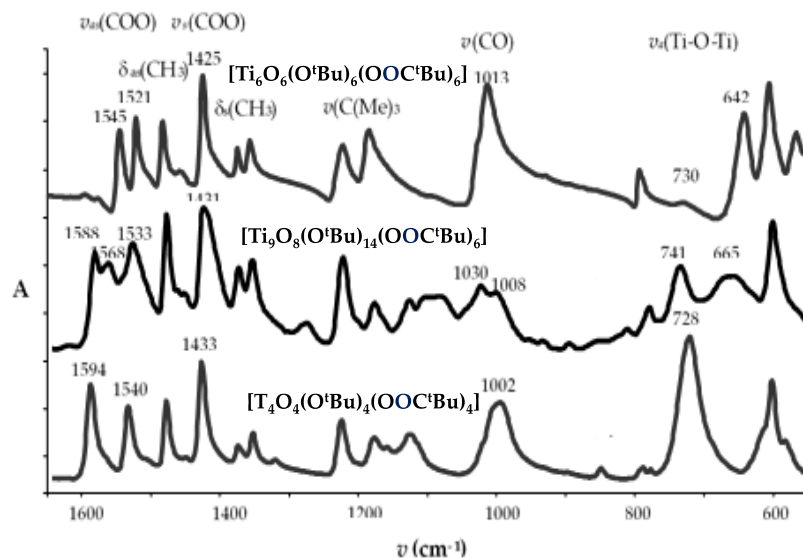
Zbyt wielkie różnice w termicznych właściwościach prekursorów $[\text{Zr}_6\text{O}_4(\text{OH})_4(\text{O}^i\text{Pr})_6(\text{OOC}^i\text{C}_2\text{F}_5)_6]$ i $[\text{Ag}_2(\text{OOC}^i\text{C}_2\text{F}_5)_2]$ oraz przypuszczalnie zachodzące reakcje w fazie gazowej pomiędzy produktami rozkładu stosowanych związków spowodowały, że nie obserwowałam tworzenia się warstw mieszanych typu $\text{ZrO}_2/\text{AgNPs}$.

Prowadząc badania nad syntezą okso-kompleksów tytanu(IV) zwróciłam uwagę na przemiany strukturalne, którym ulegały one w trakcie syntezy. Efekt ten zauważyłam wcześniej badając kompleks $[\text{Zr}_6(\mu_3\text{-O})_4(\mu_3\text{-OH})_4(\text{OOCCH}_2^i\text{Bu})_9(\mu_2\text{-OH})_3]_2$. To przyczyniło się do mojego zainteresowania tym zagadnieniem i powzięcia decyzji o przeprowadzeniu bardziej szczegółowych badań. Dokładne poznanie mechanizmu tych reakcji ma ogromne znaczenie w procesie syntezy nowych materiałów, w których struktura rdzeni $\{\text{Ti}_a(\mu\text{-O})_b\}$ musi być precyzyjnie kontrolowana. Zauważyłam, że prowadząc bardzo ostrożnie proces krystalizacji możliwe było wyodrębnienie kryształów metastabilnych układów pośrednich, których struktura po dłuższym czasie ulegała przekształceniu do strukturalnie stabilnych kompleksów o wzorach ogólnych $[\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{OR})_6(\text{OOC}^i\text{Bu})_6]$ ($R = ^i\text{Pr}, ^i\text{Bu}, ^t\text{Bu}$), oraz $[\text{Ti}_4\text{O}_4(\text{O}^i\text{Bu})_4(\text{OOC}^i\text{Bu})_4]$. Przykładem tego może być okso-kompleks $[\text{Ti}_7\text{O}_9(\text{O}^i\text{Bu})_4(\text{HO}^i\text{Bu})(\text{OOCMe}_2\text{Et})_6]_2$, którego pomarańczowe kryształy wyizolowałam po 5 dniach powolnego odparowywania mieszaniny reakcyjnej: $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Bu})_4$ i HOOCMe_2Et (1:1), toluen, w atmosferze argonu i w temperaturze pokojowej. Badania dyfrakcji rentgenowskiej pojedynczego kryształu wykazały, że struktura tego związku składała się z dimerycznych rdzeni $\{\text{Ti}_6\text{O}_6\}$ połączonych mostkami $\{[\text{Ti}_2(\mu\text{-O})_6(\text{HO}^i\text{Bu})_2(\mu\text{-O}^i\text{Bu})_2]\}$ (Rysunek 29(a)). Po kolejnych 7 dniach barwa kryształów zmieniła się na pomarańczowo-brązową, a po ich wyizolowaniu i badaniach strukturalnych okazały się one heksardzeniowym kompleksem $[\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{O}^i\text{Bu})_6(\text{OOC}(\text{Me})_2\text{Et})_6]$ (Rysunek 29(b)) [PA5]. Struktura tego związku była podobna do wcześniej zsyntezowanych heksardzeniowych okso-kompleksów w wyniku reakcji (1:1) $\text{Ti}(\text{OR})_4$ ($R = ^i\text{Pr}, ^n\text{Bu}, \text{Si}(\text{Me})_3$) z różnymi kwasami organicznymi.



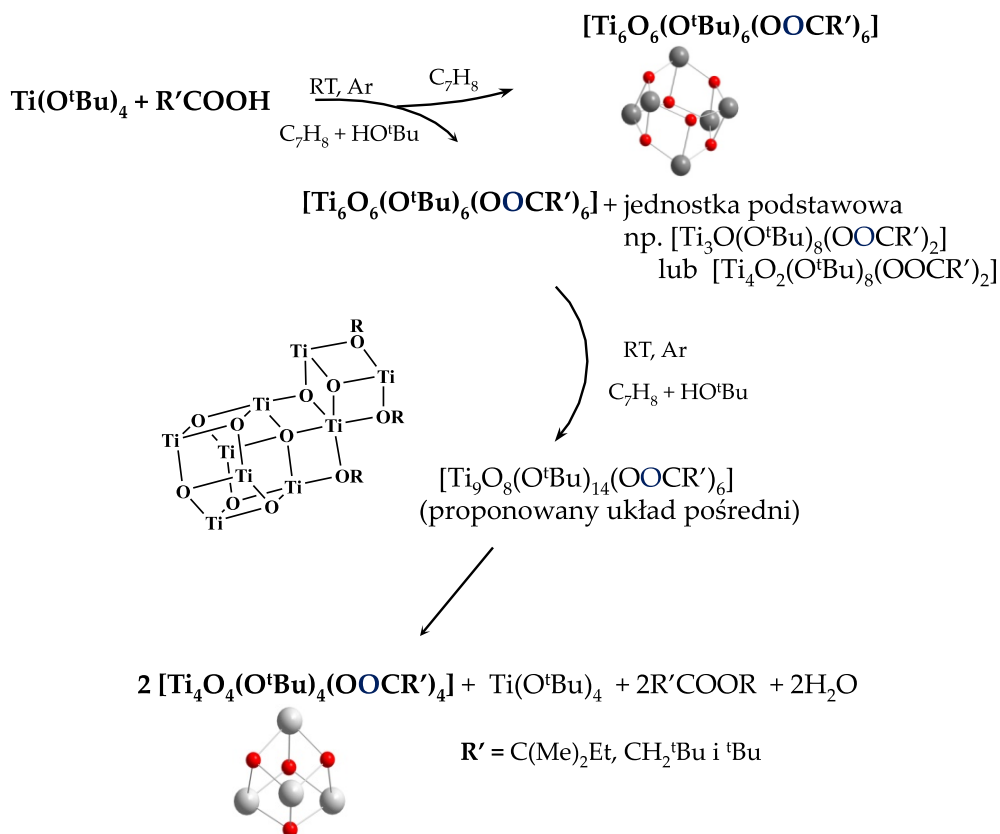
Rysunek 29. Struktury kompleksów (a) $[\text{Ti}_7\text{O}_9(\text{O}^t\text{Bu})_4(\text{HO}^t\text{Bu})(\text{OOCMeEt})_6]_2$, wyizolowanego po 5 dniach z mieszaniny reakcyjnej: $\text{Ti}(\text{O}^t\text{Bu})_4$ i HOOCMeEt (1:1), toluen i (b) $[\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{O}^t\text{Bu})_6(\text{OOC}(\text{Me})_2\text{Et})_6]$ wyizolowany po 7 dniach z tego samego roztworu macierzystego [PA5].

Jednak dopiero badania przebiegu reakcji tert-butanolanu tytanu(IV) ($\text{Ti}(\text{O}^t\text{Bu})_4$) z wybranymi rozgałęzionymi kwasami karboksylowymi (HOOCR' ; $\text{R}' = \text{C}(\text{Me})_2\text{Et}$, CH_2^tBu i ^tBu), przy zachowaniu stosunku molowego $\text{Ti} : \text{OOCR}' - 1:1$ w temperaturze pokojowej i w atmosferze argonu, pozwoliły mi zaproponować mechanizm przemian strukturalnych tworzącego się w pierwszym etapie kompleksu $[\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{O}^t\text{Bu})_6(\text{OOCR}')_6]$ do $[\text{Ti}_4\text{O}_4(\text{O}^t\text{Bu})_4(\text{OOCR}')_4]$ [PA6]. Wyniki tych badań wykazały, że istotne znaczenie dla poznania przebiegu tych reakcji miał rodzaj zastosowanego rozpuszczalnika. Stosując mieszaninę toluenu i tert-butanolu (1:1 obj.) po 2-3 dniach wyizolowano bezbarwne kryształy, które okazały się być heksardzeniowymi okso-kompleksami $[\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{O}^t\text{Bu})_6(\text{OOCR}')_6]$ ($\text{R}' = \text{C}(\text{Me})_2\text{Et}$, CH_2^tBu i ^tBu). Powtórzenie badań rentgenowskich po kolejnych 3 dniach ujawniło utworzenie się kompleksów tetrardzeniowych $[\text{Ti}_4\text{O}_4(\text{O}^t\text{Bu})_4(\text{OOCR}')_4]$. Uzyskany wynik sugerował, że w przeciągu tych trzech dni dochodzi do przemiany strukturalnej heksardzeniowych okso-kompleksów. Aby prześledzić ten proces zdecydowałam się na przeprowadzenie badań widm IR izolowanych kryształów z mieszaniny reakcyjnej co 2 godziny. Otrzymane wyniki wykazały, że produkt pośredni tworzył się po 6 godzinach od momentu utworzenia się kryształów formy heksardzeniowej, a po kolejnych 48 h przekształcał się w kompleks tetrardzeniowy (Rysunek 30). Wyizolowany z mieszaniny reakcyjnej produkt pośredni był na tyle stabilny, aby określić jego strukturę na podstawie badań spektroskopii IR, NMR oraz MS-EI. Nie udało się jednak tego zrobić metodą dyfrakcji rentgenowskiej pojedynczego kryształu. W oparciu o doniesienia literaturowe i dane spektralne zaproponowałam wzór ogólny okso-kompleksu pośredniego jako $[\text{Ti}_9\text{O}_8(\text{O}^t\text{Bu})_{14}(\text{OOC}^t\text{Bu})_6]$ [PA6]. Powtórzenie reakcji pomiędzy $\text{Ti}(\text{O}^t\text{Bu})_4$ z $^t\text{BuCOOH}$ w środowisku bezwodnego toluenu wykazało, że tworzyły się wyłącznie strukturalnie stabilne kompleksy heksardzeniowe, których struktura nie podlegała dalszym zmianom.



Rysunek 30. Widma IR krystalicznych produktów reakcji $\text{Ti}(\text{O}^t\text{Bu})_4$ $^t\text{BuCOOH}$ (rozpuszczalnik – mieszanina C_7H_8 i $^t\text{BuOH}$); $[\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{O}^t\text{Bu})_6(\text{OOC}^t\text{Bu})_6]$ (7), $[\text{Ti}_9\text{O}_8(\text{O}^t\text{Bu})_{14}(\text{OOC}^t\text{Bu})_6]$ (5), $[\text{Ti}_4\text{O}_4(\text{O}^t\text{Bu})_4(\text{OOC}^t\text{Bu})_4]$ (6) [PA6].

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań spektroskopowych postanowiłam zaproponować potencjalny mechanizm przemian strukturalnych, które odnotowałam podczas reakcji $\text{Ti}(\text{O}^t\text{Bu})_4$ z kwasami organicznymi ($\text{R}'\text{COOH}$; $\text{R}' = \text{C}(\text{Me})_2\text{Et}$, CH_2^tBu , i ^tBu) w stosunku molowym 1:1 (Rysunek 31). Zrozumienie tych procesów jest szczególnie ważne w przypadku produkcji materiałów hybrydowych opartych na tytanowych szkieletach o dobrze zdefiniowanej strukturze. Opierając się na mechanizmach reakcji hydrolizy i kondensacji oraz reakcjach towarzyszących tworzeniu się wielordzeniowych okso-kompleksów tytanu(IV) zaproponowanych przez Schubert'a [U. Schubert, *J. Mater. Chem.*, 2005, 15, 3701] założyłam, że tworzenie się kompleksów złożonych z większych rdzeni $\{\text{Ti}_n\text{O}_m\}$ jest wynikiem łączenia się mniejszych jednostek podstawowych typu $[\text{Ti}_3\text{O}(\text{O}^t\text{Bu})_8(\text{OOCR}')_2]$ lub $[\text{Ti}_4\text{O}_2(\text{O}^t\text{Bu})_8(\text{OOCR}')_2]$, powstających w pierwszym etapie reakcji alkoholany tytanu z kwasami organicznymi. Procesy łączenia się tych jednostek prowadzą do utworzenia układów heksardzeniowych w opisywanym przeze mnie przypadku okso-kompleksów $[\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{O}^t\text{Bu})_6(\text{OOCR}')_6]$ ($\text{R}' = \text{C}(\text{Me})_2\text{Et}$, CH_2^tBu i ^tBu), co potwierdziły badania rentgenostrukturalne i spektroskopowe. W środowisku toluenu reakcja $\text{Ti}(\text{O}^t\text{Bu})_4$ z $^t\text{BuCOOH}$ prowadziła do wykrystalizowania strukturalnie stabilnego związku $[\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{O}^t\text{Bu})_6(\text{OOCR}')_6]$, natomiast w mieszaninie 1:1 toluen/tert-butanol powyższy kompleks był strukturalnie niestabilny. Tworzył się metastabilny kompleks pośredni $[\text{Ti}_9\text{O}_8(\text{O}^t\text{Bu})_{14}(\text{O}_2\text{C}^t\text{Bu})_6]$, którego strukturę zaproponowałam na podstawie analizy danych spektroskopowych. W kolejnym etapie tej reakcji następuje przekształcenie się kompleksu pośredniego w strukturalnie stabilny tetrardzeniowy okso-kompleks $[\text{Ti}_4\text{O}_4(\text{O}^t\text{Bu})_4(\text{OOCR}')_4]$ [PA6].

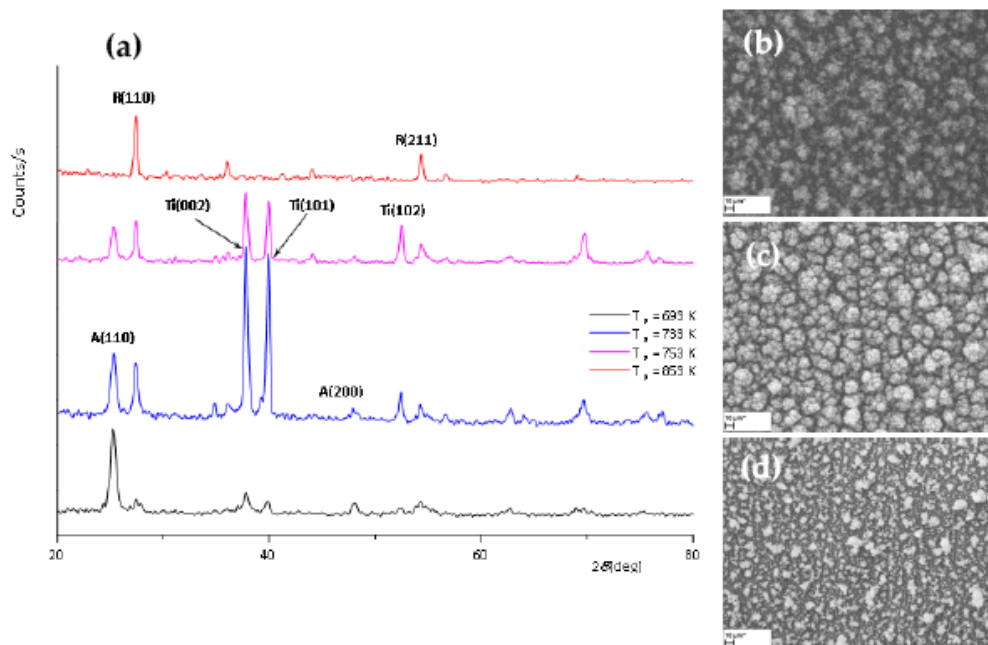


Rysunek 31. Proponowany mechanizm przekształcenia struktury $[\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{O}^t\text{Bu})_6(\text{OOCR}')_6]$ do $[\text{Ti}_4\text{O}_4(\text{O}^t\text{Bu})_4(\text{OOCR}')_4]$ ($\text{R}' = \text{C}(\text{Me})_2\text{Et}, \text{CH}_2^t\text{Bu}, \text{ and } ^t\text{Bu}$) poprzez metastabilny kompleks pośredni [PA6].

Tematyka prowadzonych badań nad syntezą okso-kompleksów cyrkonu(IV) i tytanu(IV) oraz ich wykorzystaniem do wytwarzania nanowarstw ZrO_2 i TiO_2 metodą CVD doprowadziła mnie do zainteresowania się oceną aktywności fotokatalitycznej tych materiałów oraz możliwościami wykorzystania w wykorzystania. Przeprowadzone prace, uzyskane wyniki, a także zapotrzebowanie na bioaktywne powłoki tlenków wymienionych wyżej metali doprowadziły do wyodrębnienia tematyki stanowiącej podstawę wszczętego postępowania habilitacyjnego.

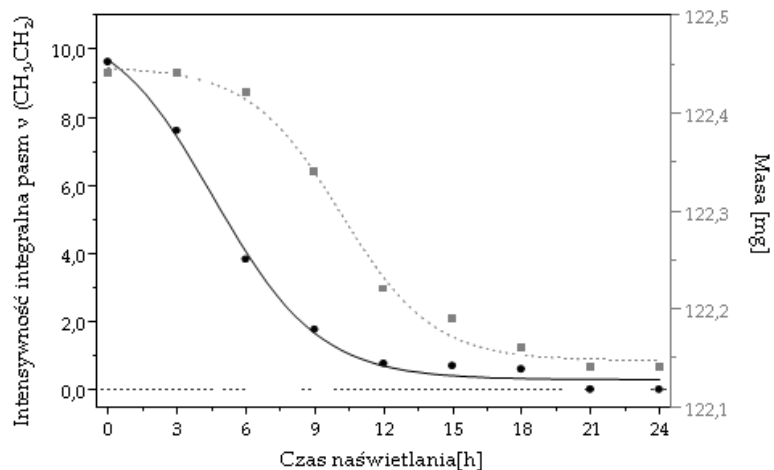
Przegląd literatury, którego dokonałam po doktoracie wskazywał na ogromne zainteresowanie badaniami aktywności fotokatalitycznej głównie ditlenku tytanu oraz możliwościami jego wykorzystania w fotowoltaice i optoelektronice. Wynika to z półprzewodnikowych właściwości ditlenku tytanu, które zależą od jego struktury krystalicznej oraz morfologii powierzchni wytwarzanych powłok. Istotą przewodnictwa elektrycznego warstw TiO_2 są zaburzenia w jego stechiometrii związane z tworzeniem się wakantów tlenowych lub nadmiarowych jonów metalu. Badania przewodnictwa właściwego wytwarzanych przeze mnie warstw ditlenku tytanu metodą CVD (jako prekursorzy TiO_2 CVD stosowano zsyntetyzowane wielordzeniowe okso-kompleksy Ti(IV)) wykazały, że wynosiło ono około 1 S dla nanopowłok anataz/rutyl (40/60%) na podłożach krzemowych. Ponadto powłoki te wykazywały właściwości fotoluminescencyjne. Wymienione wyżej czynniki spowodowały, że rozpocząłam prace związane z badaniami aktywności fotokatalitycznej nanokrystalicznych powłok ditlenku tytanu o zdefiniowanej

strukturze, która zależy od rodzaju prekursora zastosowanego w procesie CVD oraz od temperatury osadzania. Na Rysunku 32 przedstawiłam zmiany struktury i morfologii powłok TiO_2 w zależności od temperatury osadzania z wykorzystaniem $[\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{O}^i\text{Bu})_6(\text{OO}^t\text{Bu})_6(\text{H}_2\text{O})_2]$, jako prekursora [PA7].



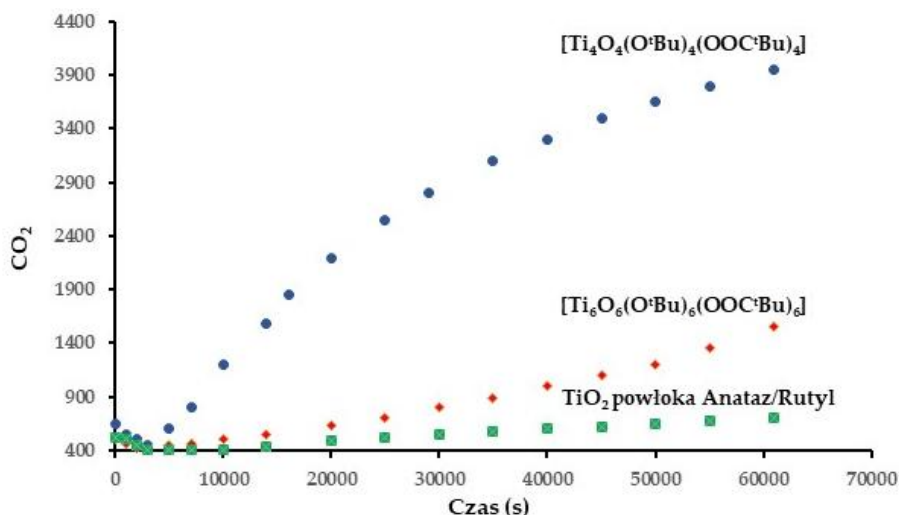
Rysunek 32. Widmo GIXRD nanokrystalicznych warstw TiO_2 wytwarzanych na powierzchni Si(111) metodą CVD z użyciem $[\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{O}^i\text{Bu})_6(\text{O}^t\text{C}^i\text{Bu})_6(\text{H}_2\text{O})_2]$ jako prekursora (a), obrazy SEM nanokrystalicznych warstw anatazu (b), mieszanki anataz/rutyl (c) i rutylu (d) [PA7].

Aktywność fotokatalityczną wytwarzanych powłok o różnej strukturze oceniłam wykorzystując proces degradacji kwasu stearynowego osadzonego na ich powierzchni w trakcie naświetlania promieniowaniem UV. Efekt fotokatalitycznej degradacji badałam, jako zmianę intensywności integralnej pasma $\nu(\text{CH}_3, \text{CH}_2)$ w widmach IR w funkcji czasu naświetlania (Rysunek 33). Otrzymane wyniki wykazały dobre właściwości fotokatalityczne powłoki ditlenku tytanu, którego strukturę stanowiło 48.6% anatazu i 51.4% rutylu [PA7].



Rysunek 33. Zmiany intensywności integralnej pasma $\nu(\text{CH}_3, \text{CH}_2)$ w trakcie fotodegradacji kwasu stearynowego osadzonego na powierzchni warstwy anataz/rutył (ok. 48.6/51.4%) w trakcie naświetlania promieniowaniem UV [PA7].

Mój pobyt w Tribology Center (Danish Technological Institute, Aarhus), w ramach staży STSM (Short Term Scientific Mission) w projektach COST: NAMABIO i NEWGEN pozwolił mi zapoznać się z techniką i dokonać pomiarów aktywności fotokatalitycznej warstw TiO_2 w procesie degradacji acetonu. Otrzymane wyniki potwierdziły dobrą aktywność powłok złożonych w 48.6% z anatazu i w 51.4% z rutyłu. W ramach tych prac przeprowadziłam również badania aktywności fotokatalitycznej krystalicznych proszków okso-kompleksów $[\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{O}^t\text{Bu})_6(\text{OOC}^t\text{Bu})_6]$ i $[\text{Ti}_4\text{O}_4(\text{O}^t\text{Bu})_4(\text{OOC}^t\text{Bu})_4]$. Otrzymane wyniki były zaskakujące, gdyż wykazały, że aktywność fotokatalityczna wielordzeniowych okso-kompleksów tytanu(IV) była wyraźnie większa niż nanokrystalicznych powłok TiO_2 (Rysunek 34).



Rysunek 34. Zmiany stężenia CO_2 w funkcji czasu, jako głównego produktu fotodegradacji acetonu na powierzchni nanokrystalicznej powłoki TiO_2 o strukturze anataz/rutył oraz okso-kompleksów $[\text{Ti}_6\text{O}_6(\text{O}^t\text{Bu})_6(\text{OOC}^t\text{Bu})_6]$ i $[\text{Ti}_4\text{O}_4(\text{O}^t\text{Bu})_4(\text{OOC}^t\text{Bu})_4]$ w trakcie ich naświetlania promieniowaniem UV.

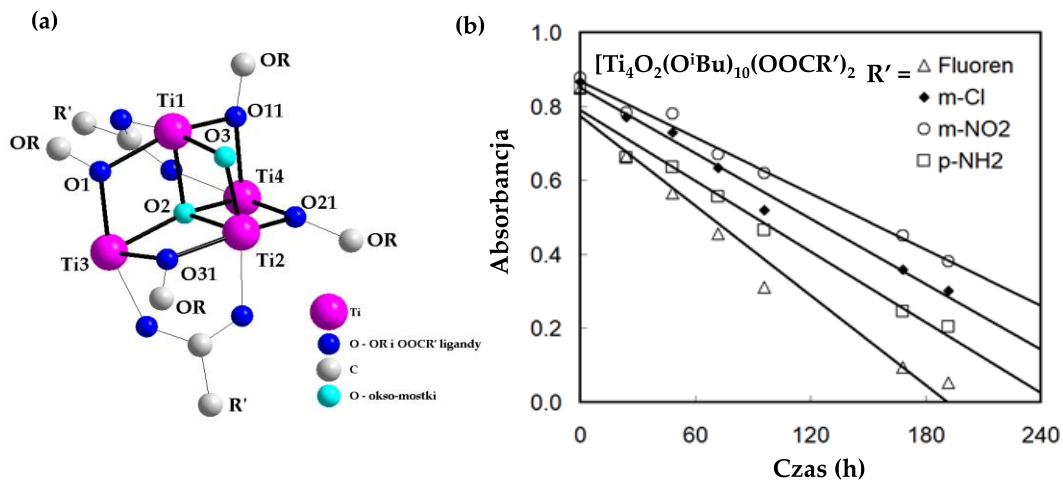
Badania zwilżalności, które przeprowadziłam dla nanokrystalicznych warstw ditlenku tytanu oraz krystalicznych proszków wyżej wymienionych kompleksów wykazały, że badane materiały posiadały właściwości hydrofobowe. Prowadzone równoległe badania

mikrobiologiczne wykazały, że właściwości przeciwbakteryjne nanokrystalicznych warstw TiO₂ wytwarzanych metodą CVD wyraźnie zależały od ich struktury krystalicznej (Tabela 8) [PA7].

Tabela 8. Aktywność mikrobiologiczną nanokrystalicznych warstw TiO₂ wytwarzanych metodą CVD z wykorzystaniem [Ti₆O₆(OⁱBu)₆(OOCⁱBu)₆(H₂O)₂] jako prekursora (T_D - temperatura osadzania, % -śmiertelność bakterii) [PA7].

T _D [°C]	Struktura nanowarstwy TiO ₂	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538
420	anataz	47,44±1,93%	100 ± 0 %
440	anataz/rutyl (>5%)	100 ± 0 %	92,08 ± 4,80 %
460	anataz/rutyl (51.4%)	94,58 ± 0,97 %	50,84 ± 20,03 %
480	anataz/rutyl (66.6%)	94,11 ± 1,61 %	64,29 ± 1,40%
500	rutyl	67,52±3,43 %	100 ± 0 %

Wyniki moich prac nad aktywnością fotokatalityczną okso-kompleksów tytanu(IV) stały się inspiracją do dalszych badań nad tym zagadnieniem w Katedrze Chemii Nieorganicznej i Koordynacyjnej Wydziału Chemii UMK w Toruniu i prowadzono je dalej. Ich rezultatem było opracowanie metody wywarzania polimerowo-nieorganicznych kompozytów, w których napełniaczem nieorganicznym były nanokryształy okso-kompleksów Ti(IV). W pracach tych nadzorowałam badania aktywności fotokatalitycznej wytwarzanych materiałów. Jako kompleksu wprowadzanego do matrycy polimerowej użyto [Ti₄O₂(OⁱBu)₁₀(OOCR')₂] (R' = -C₁₃H₉ (Fluoren), *m*-PhCl, *m*-PhNO₂, and *p*-PhNH₂; Rysunek 35(a)) [PA8]. Badania aktywności fotokatalitycznej wykazały, że najlepsze rezultaty otrzymano dla materiałów kompozytowych z udziałem [Ti₄O₂(OⁱBu)₁₀(OOC₁₃H₉)₂] i [Ti₄O₂(OⁱBu)₁₀(OOCNH₂)] (Rysunek 35(b)). Równoległe przeprowadzone badania mikrobiologiczne wykazały, że najlepsze właściwości wykazywał kompozyt polimer/[Ti₄O₂(OⁱBu)₁₀(OOCNH₂)].



Rysunek 35. Struktura rdzenia kompleksów $[\text{Ti}_4\text{O}_2(\text{O}^i\text{Bu})_{10}(\text{OOCR}')_2]$ ($\text{R}' = -\text{C}_{13}\text{H}_9$ (fluoren), $m\text{-PhCl}$, $m\text{-PhNO}_2$, and $p\text{-PhNH}_2$) (a), zmiany absorbancji roztworu MB w funkcji czasu dla kompozytu PMMA/ $[\text{Ti}_4\text{O}_2(\text{O}^i\text{Bu})_{10}(\text{OOCR}')_2]$ (b). $[\text{MB}] = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$, powierzchnia folii PMMA = 0,64 cm², T = RT., l = 1 cm. Przedstawione wartości są po korekcie testu ślepego [PA8].

5.1. Publikacje (PA) i patenty (PP) związane z pozostałymi osiągnięciami naukowo-badawczymi

PA1. Piszczek P., **Radtke A.**, Grodzicki A., Wojtczak A., Chojnacki J., The new type of $Zr_6O_4(OH)_4$ Cluster Core: Crystal Structure and Spectral Characterization of $[Zr_6O_4(OH)_4(OOCR)_{12}]$ (R = Bu^t, C(CH₃)₂Et). *Polyhedron*, **2007**, 26, 679-685

PP1. Piotr Piszczek, Antoni Grodzicki, **Aleksandra Radtke**, „Nowe perfluorokarboksylanowe pochodne izopropanolanu cyrkonu(IV) oraz sposób ich wytwarzania”, zgłoszenie patentowe, P 378613, 30.12. 2005, BUP 14/07 09.07.2007, WUP 06/09 30.06.2009, Patent B1 Nr 202315 z **2009**.

PP2. Piotr Piszczek, **Aleksandra Radtke**, Antoni Grodzicki, „Nowe poli-bis-(di-karboksylano tert-butylo-etyleno)-okso-cyrkon(IV) i poli-bis-(di-karboksylano-metylo-etyleno)-okso-cyrkon(IV) oraz sposób ich wytwarzania”, P. 385170, 14.05.2008, Patent B1 Nr PL212338, 28.09.2012.

PA2. **Radtke A.**, Piszczek P., Muzioł T., Wojtczak A., Grodzicki A., Synthesis, Structural Characterization, and Thermal Properties of Zirconium(IV) β - ketodiester Complexes. *Structural Chemistry*, **2010**, 21, 367-375

PP3. Piotr Piszczek, Antoni Grodzicki, **Aleksandra Radtke**, „Tetra(1,3-(dikarboksylano-tertbutylo)-acetonian)cyrkonu(IV) oraz sposób jego wytwarzania”, zgłoszenie patentowe, P 379892, 08.06. **2006**, BUP 25/07 10.12.2007, WUP 08/11 31.08.2011, Patent B1 Nr 209365 z **2011**

PA3. Piszczek P., **Radtke A.**, Wojtczak A., Muzioł T., Chojnacki J., Synthesis, structure characterization and thermal properties of $[Zr_6(\mu_3-O_4)(\mu_3-OH)_4(OOCCH_2^tBu)_9(\mu_2-OH)_3]_2$. *Polyhedron*, 2009, 28, 279-285

PA4. Piszczek P., Richert M., **Radtke A.**, Muzioł T., Wojtczak A., Synthesis of titanium dioxide nanocrystalline layers using hexaprismatic shaped μ -oxo Ti(IV) alkoxo carboxylates as precursors. *Polyhedron*, **2009**, 28, 3872-3880

PA5. Piszczek P., **Radtke A.**, Muzioł T., Richert M., Chojnacki J., The conversion of multinuclear μ -oxo titanium(IV) species in the reaction of $Ti(OiBu)_4$ with branched organic acids; results of structural and spectroscopic studies. *Dalton Trans.*, **2012**, 41, 8261-8269

PA6. **Radtke A.**, Piszczek P., Muzioł T., Wojtczak A., The Structural Conversion of Multinuclear μ -Oxo Titanium(IV) Complexes. *Inorg. Chem.* **2014**, 53, 10803-10810

PA7. Piszczek P., Muchewicz Ż., **Radtke A.**, Gryglas M., Dahm H., Różycki H., CVD of TiO_2 and TiO_2/Ag antimicrobial layers: Deposition from the hexanuclear μ -oxo Ti(IV) complex as a precursor, and the characterization. *Surf. Coat. Techn.*, **2013**, 222, 38-43

PA8. Janek M., **Radtke A.**, Muzioł T., Jerzykiewicz M., Piszczek P., Tetranuclear Oxo-titanium Clusters with Different Carboxylate Aromatic Ligands: Optical Properties, DFT Calculations, and Polymer Composites Photoactivity. *Materials*, **2018**, 11, 1661

6. Tabelaryczne podsumowanie dorobku naukowego¹

Osiągnięcie	Przed uzyskaniem stopnia doktora	Po uzyskaniu stopnia doktora	Razem
Czasopisma z IF wyróżnione w Journal Citation Reports	2	19	21
Czasopisma bez IF wyróżnione w Journal Citation Reports	-	-	-
Razem publikacje wyróżnione w JCR	2	19	21
Publikacje w recenzowanym czasopiśmie krajowym lub zagranicznym	-	1	1
Razem publikacje	2	20	22
Rozdział w monografii	-	3	3
Patenty UP RP	-	5	5
IMPACT FACTOR	2,327	64.376	66.703
Liczba punktów MNiSW	30	725	755
Liczba cytowań według bazy Web of Science Core Collection	146		
Liczba cytowań (bez autocytowań) według bazy Web of Science Core Collection	114		
Indeks Hirscha według bazy Web of Science Core Collection	8		
Autorstwo i współautorstwo wykładów, komunikatów konferencyjnych oraz posterów	9	41	50
Corresponding author	-	12	12
First author	-	14	14
Projekty badawcze (kierownik)	-	2	2
Projekty badawcze (główny wykonawca)	-	1	1
Recenzowanie artykułów w czasopismach zagranicznych	-	11	11

¹ Zestawienie osiągnięć w pracy naukowo-badawczej opracowałam w oparciu o bibliometrię przygotowaną przez Bibliotekę Główną UMK w dniu 15.04.2019 r.