Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki

Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej

Katedra Technologii Chemicznej i Analityki Środowiskowej

ROZPRAWA DOKTORSKA

Kompozytowe powłoki polimerowo-ceramiczne zawierające nanocząstki srebra na stopie Ti-6Al-4V

mgr inż. Wioletta Florkiewicz

Promotor Prof. dr hab. inż. Agnieszka Sobczak-Kupiec

> Promotor pomocniczy Dr inż. Ewa Olejnik

Kraków 2023

Składam serdeczne podziękowania Promotorom pracy Pani Profesor dr hab. inż. Agnieszce Sobczak-Kupiec oraz Pani Dr inż. Ewie Olejnik za wsparcie oraz za wyjątkowo życzliwą atmosferę sprzyjającą realizacji pracy naukowej.

Podziękowania składam Panu Profesorowi dr hab. inż. Zbigniewowi Wzorkowi za stały patronat i życzliwość.

Osobne podziękowania składam ludziom, dzięki którym praca stawała się przyjemnością: Dr inż. Dagmarze Malinie oraz Dr inż. Klaudii Pluta za zapewnianie wsparcia oraz uśmiechu każdego dnia.

Spis treści

I.	WPROWADZENIE W TEMATYKĘ PRACY	10
II.	CEL I ZAKRES PRACY	11
III	. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	13
1.	Biomateriały metaliczne - wprowadzenie	13
1	.1. Stale austenityczne	14
1	.2. Stopy kobaltu	16
1	.3. Tytan - wprowadzenie	17
	1.3.1. Stopy tytanu	18
2.	Biomateriały tytanowe	20
2	.1. Modyfikacja powierzchni tytanu i jego stopów - wstęp	26
	2.1.1. Fosforany wapnia w medycynie	27
	2.1.1.1. Hydroksyapatyt	31
	2.1.1.2. Hydroksyapatyt o strukturze nanometrycznej	34
	2.1.1.3. Podstawienia jonowe w sieci krystalicznej hydroksyapatytu	35
	2.1.1.4. Powłoki hydroksyapatytowe	37
	2.1.2. Powłoki polimerowe	40
3.	Nanocząstki srebra w medycynie	44
3	.1. Nanocząstki srebra jako komponenty biomateriałów	50
3	.2. Powłoki polimerowe zawierające nanocząstki srebra oraz powłoki antyadhezyjne	52
3	.3. Kompozyty i powłoki polimerowo-ceramiczne modyfikowane AgNPs	56

IV. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA60
4. Metody badań60
4.1. Otrzymywanie ekstraktów oraz naparów roślinnych60
4.2. Charakterystyka roślinnych ekstraktów oraz naparów61
4.2.1. Ocena aktywności antyoksydacyjnej metodą redukcji rodnika DPPH61
4.2.2. Całkowita zawartość polifenoli metodą Folina-Ciocalteu62
4.2.3. Ocena cytotoksyczności63
4.2.4. Ocena właściwości prozapalnych64
4.3. Otrzymywanie i charakterystyka nanocząstek Ag65
4.3.1. Otrzymywanie nanocząstek srebra65
4.3.2. Otrzymywanie i charakterystyka nanocząstek srebra
4.3.3. Spektroskopia korelacji fotonów67
4.3.4. Skaningowa mikroskopia elektronowa68
4.3.5. Dyfrakcja rentgenowska XRD68
4.3.6. Ocena cytotoksyczności oraz właściwości prozapalnych nanocząstek Ag69
4.3.7. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa nanocząstek Ag69
4.4. Otrzymywanie i charakterystyka hydroksyapatytu70
4.4.1. Otrzymywanie fosforanu wapnia70
4.4.2. Analiza składu fazowego fosforanów wapnia70
4.4.3. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera
4.4.4. Spektrometria emisyjna ze wzbudzeniem w plazmie indukowanej72
4.4.5. Skaningowa mikroskopia elektronowa73

.6. Analiza powierzchni właściwej fosforanów wapnia metodą BET	73
Otrzymywanie i charakterystyka matryc polimerowych oraz materiałów polime	erowo-
ceramicznych	73
.1. Sedymentacja	75
.2. Kinetyka pęcznienia	76
Otrzymywanie i charakterystyka powłok ceramiczno-polimerowych	76
.1 Analiza spektroskopowa w podczerwieni powłok ceramiczno-polimerowych	77
.2. Pomiar chropowatości powłok	77
.3. Charakterystyka morfologii powłok	78
.4. Badania przyczepności powłok metodą odrywową	78
.5. Mikroskopia konfokalna	79
.6. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa powłok	80
.7. Adhezja komórek bakteryjnych	81
Vyniki i dyskusja	81
Charakterystyka roślinnych ekstraktów oraz naparów	81
.1. Ocena aktywności antyoksydacyjnej oraz całkowita zawartość polifenoli	81
.2. Ocena cytotoksyczności	86
.3. Ocena właściwości prozapalnych naparów oraz ekstraktów	88
Charakterystyka nanocząstek srebra	91
.1. Spektrofotometryczna charakterystyka zawiesin AgNPs	91
.2. Stabilność AgNPs w płynach symulujących środowisko organizmu ludzkieg	;o100
.3. Spektroskopia korelacji fotonów	107

5.2.4. Analiza XRD oraz morfologia nanocząstek srebra109
5.2.5. Ocena cytotoksyczności AgNPs112
5.2.6. Ocena właściwości prozapalnych AgNPs114
5.2.7. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa nanocząstek Ag116
5.3. Charakterystyka fosforanów wapnia118
5.3.1. Wydajność syntez hydroksyapatytu118
5.3.2. Analiza składu fazowego fosforanów wapnia119
5.3.3. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera125
5.3.4. Skaningowa mikroskopia elektronowa131
5.3.5. Spektrometria emisyjna ze wzbudzeniem w plazmie indukowanej137
5.3.6. Analiza powierzchni właściwej fosforanów wapnia metodą BET139
5.4. Otrzymywanie i charakterystyka matryc polimerowych oraz materiałów polimerowo-
ceramicznych143
5.4.1. Kinetyka pęcznienia143
5.4.2. Charakterystyka morfologii matryc polimerowych147
5.4.3. Szybkość sedymentacji HAp148
5.5. Otrzymywanie i charakterystyka powłok ceramiczno - polimerowych153
5.5.1 Analiza spektroskopowa w podczerwieni powłok polimerowo- ceramicznych.155
5.5.2. Charakterystyka morfologii powłok159
5.5.3. Pomiary mikrogeometrii powierzchni powłok164
5.5.4. Badania przyczepności powłok metodą odrywową (Pull-Off)166
5.5.5. Mikroskopia konfokalna168

5.5.6. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa powłok	169
5.5.7. Ocena adhezji komórek bakterii	171
V. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	174
VI. STRESZCZENIE	178
VII. DOROBEK NAUKOWY	180

Alfabetyczny wykaz skrótów

AgNPs - nanocząstki srebra

ALP - fosfataza alkaliczna

APTES - (3-aminopropylo)trietoksysilan

BCC - struktura regularna centrowana przestrzennie

BCP - ceramika dwufazowa

BMP-2 - białko morfogenetyczne kości-2

BMSC - komórki zrębowe szpiku kostnego BMSC

BSA - albumina surowicy bydlęcej, frakcja V

CNT - nanorurki węglowe

COLLI - kolagenu typu I

CP Ti - tytan komercyjnej czystości

CPs - fosforany wapnia

DCPA - Wodorofosforan wapnia, monetyt

DCPD - Wodorofosforan wapnia dwuwodny, bruszyt

DLS - metoda dynamicznego rozpraszania światła

EPS - polimery zewnątrzkomórkowe

FCC - strutura regularna ściennie centrowana

FWHM - Szerokość połówkowa, szerokość w połowie wysokości

GPTMS - 3-glicydoksypropylotrimetoksysilan

GVHD - choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi

HAp, HA - Sześcioortofosforan(V) diwodorotlenku dziesięciowapnia, hydroksyapatyt

HCP - struktura heksagonalna gęsto upakowana

HSA - ludzka albumina

HUVEC - ludzkie komórki śródbłonka żyły pępowinowej

ICP-OES - Spektrometria atomowa emisyjna z indukcyjnie sprzężoną plazmą

IPN - sieć wzajemnie przenikających się łańcuchów

LBL - nanoszenie warstwa po warstwie

MBC - minimalne stężenie bakteriobójcze

MCPM - Diwodorofosforanu(V) wapnia jednowodny

MgHA - hydroksyapatyt podstawiony jonami Mg

MIC - Minimalne stężenie hamujące

mikro-CT - mikrotomografia komputerowa

MSCs - mezenchymalne komórki macierzyste

nHA - nanostrukturalny hydroksyapatyt

NPs - nanocząstki

OCN - osteokalcyna

OCP - 5-hydrat diwodoro-szecioortofosforanu(V) ośmiowapnia

PAA - poli(kwas akrylowy)

PBS - roztwór soli fizjologicznej buforowanej fosforanami

PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy

PCS - spektroskopia korelacji fotonów

PDMS - polidimetylosiloksan

PE- polietylen

PEG - poliglikol etylenowy

PEGDA - diakrylan poli(glikolu etylenowego)

PLA- polikwas mlekowy

PMMA - poli(metakrylan metylu)

PMOXA - poli(2-metylo-2-oksazolina)

PP - polipropylen

PVP - poliwinylopirolidon

QAC - czwartorzędowe związki amoniowe

RSA - zdolność wygaszania wolnych rodników

SA - alginian sodu

SBF - płyn symulującym płyn ustrojowy

SPR - powierzchniowy rezonans plazmonowy

TEOS - tetraetoksysilan

Ti-6Al-4V ELI - stop Ti-6Al-4V o obniżonej zawartości pierwiastków międzywęzłowych

TLR - receptory Toll-podobne

TPC - całkowita zawartość polifenoli

TPU - termoplastyczny poliuretan

Trp - tryptofan

TTCP - fosforan czterowapniowy

ZnHA - hydroksyapatyt podstawiony jonami Zn

 α -TCP - α -fosforan trójwapniowy

 β -TCP - β -fosforan trójwapniowy

I. WPROWADZENIE W TEMATYKĘ PRACY

Nanotechnologia stanowi dziedzinę nauki dostarczającą innowacyjnych rozwiązań na wielu płaszczyznach życia, również takich, które mogą bezpośrednio wpływać na poprawę jego komfortu. Jednym z ważniejszych zastosowań nanostruktur jest ich aplikacja w medycynie. Od lat obserwuje się rozwój systemów dostarczania leków oraz układów o działaniu antybakteryjnym opartych na nanostrukturach. Nanocząstki o działaniu antybakteryjnym potencjalnie mogą stanowić alternatywę dla antybiotyków, bądź wspomagać ich działanie w zwalczaniu drobnoustrojów, co w kontekście rosnącej lekooporności różnego rodzaju bakterii, może okazać się trudnym wyzwaniem.

Na ataki drobnoustrojów szczególnie narażone są osoby o odporności obniżonej na skutek chorób przewlekłych, jak i pacjenci po zabiegach chirurgicznych podlegający hospitalizacji. Ci ostatni są dodatkowo narażeni na tzw. zakażenia wewnątrzszpitalne, często bakteriami wykazującymi lekooporność, czy nawet wielolekooporność, do których może dochodzić również podczas zabiegów chirurgicznych, na przykład podczas implantacji. Z tego właśnie powodu, wiele grup badawczych skupia się obecnie na wytwarzaniu wielofunkcyjnych biomateriałów, które poza wspieraniem regeneracji tkanek, mogą wykazywać dodatkowe właściwości antybakteryjne.

Wyzwanie, z jakim w tym zakresie mierzy się świat nauki, jak i interdyscyplinarność i złożoność zagadnienia stanowiły motywację do podjęcia tematyki niniejszej rozprawy doktorskiej, w której skupiono się na nadaniu powierzchni szeroko stosowanego w medycynie stopu tytanu Ti-6Al-4V dodatkowej funkcjonalności w postaci aktywności przeciwdrobnoustrojowej, wykorzystując możliwości jakie oferuje nanostrukturalne srebro.

II. CEL I ZAKRES PRACY

Cel pracy obejmował opracowanie metody otrzymania oraz charakterystykę powłok polimerowo-ceramicznych nanoszonych na stop Ti-6Al-4V zawierających fosforan wapnia hydroksyapatyt oraz nanocząstki srebra, dedykowanych do zastosowań w inżynierii tkankowej. W tym celu określony został wpływ składu powłok polimerowo-ceramicznych na ich strukturę oraz biozgodność.

Pracę oparto na następujących celach szczegółowych:

- otrzymanie wodnych ekstraktów oraz naparów z liści świeżego karczocha zwyczajnego (*Cynara scolymus*), suszonych liści czystka (*Cistus incanus*) oraz ziaren ostropestu plamistego (*Silybum marianum*) oraz ocenę ich zdolności wygaszania wolnych rodników,
- otrzymanie z zastosowaniem wyselekcjonowanych wodnych ekstraktów i naparów roślinnych nanocząstek srebra oraz ocenę ich cytotoksyczności oraz potencjału bakteriobójczego
- otrzymanie i charakterystykę hydroksyapatytu oraz zastosowanie go jako składnika powłok polimerowo-ceramicznych,
- opracowanie i dobór składu powłok polimerowo-ceramicznych zawierających nanocząstki srebra,
- przeprowadzenie badań pozwalających określić biozgodność materiałów oraz ich aktywność przeciwbakteryjną.

Prace laboratoryjne przeprowadzone w ramach niniejszego tematu skupiły się na trzech głównych ścieżkach badawczych: otrzymywaniu nanocząstek srebra, syntezie hydroksyapatytu (HAp), otrzymywaniu powłok polimerowo-ceramicznych opartych na związkach polimerowych, HAp i nanocząstkach srebra, a finalnie analizie właściwości fizykochemicznych, strukturalnych oraz biologicznych otrzymanych materiałów powłokowych.

-11-

W niniejszej pracy postanowiono podjąć badania nad materiałami polimerowoceramicznymi zawierającymi nanocząstki srebra zastosowanymi jako powłoki na stopie Ti-6Al-4V. Zaprezentowane podejście stanowi nową ścieżkę w badaniach dotyczących modyfikacji powierzchni implantów metalowych, gdyż w większości uwaga świata nauki skupia się na materiałach wspomagających procesy regeneracji tkanek, nie aktywności antybakteryjnej materiałów. Postawiono więc następującą tezę:

Modyfikacja powierzchni stopu tytanu Ti-6Al-4V przez naniesienie powłok polimerowoceramicznych zawierających nanocząstki srebra powoduje zwiększenie biozgodności oraz nadanie aktywności antybakteryjnej implantom.

Celem naukowym pracy było dokonanie charakterystyki fizykochemicznej materiału podłoża z naniesioną powłoką oraz ocena jej biozgodności oraz aktywności przeciwbakteryjnej. Z kolei celem użytkowym - opracowanie składu oraz metody otrzymywania powłoki polimerowo-ceramicznej o pożądanych właściwościach.

III.CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Biomateriały metaliczne - wprowadzenie

Pierwsze historyczne ślady świadczące o zastosowaniu metali jako materiałów wszczepialnych związane są z kulturami starożytnego Egiptu oraz Chin, gdzie w roli implatów wykorzystywano elementy wykonane z żelaza oraz złota. Nieustający rozwój nauk materiałowych jak i biologicznych warunkował ciągłe doskonalenie biomateriałów, a co za tym idzie coraz częstsze ich stosowanie [1-3]. Nieustający wzrost zapotrzebowania na tą klasę biomateriałów związany jest przede wszystkim z możliwością ich zastosowania w naprawie złamań kości długich. Niemniej jednak są one również stosowane do wytwarzania płytek zespalających i stabilizujących, igieł śródszpikowych, stentów naczyniowych oraz w praktyce dentystycznej i ortodontycznej [4]. Główne obszary zastosowania biomateriałów metalicznych



Rysunek 1. Główne obszary zastosowania biomateriałów metalicznych [5].

1.1. Stale austenityczne

Pierwszymi materiałami metalowymi dedykowanymi do stosowania w leczeniu złamań kości u człowieka były srebro oraz tzw. stal wanadowa Shermana, z których wytwarzano druty, płytki i śruby zespalające [6]. Materiały te były kłopotliwe z punktu widzenia niewystarczających właściwości mechanicznych. Rozwiązanie tego problemu nadeszło w 1931 roku, kiedy po raz pierwszy do produkcji implantów zastosowano stal nierdzewną. Odporność na korozję, wytrzymałość i biokompatybilność stali nierdzewnej sprawiły, że implanty wykonane z tego materiału są szeroko stosowane również współcześnie. Pierwszą stalą nierdzewną zastosowaną do wytwarzania implantów była stal 18-8 (typ 302 według współczesnej klasyfikacji), która następnie została wyparta przez stal 316 cechującą się lepszą odpornością na korozję wżerową, ze względu na dodatek molibdenu. W latach 50. XX wieku zawartość węgla w stali 316 zmniejszono z 0.08% do 0.03%, w celu zwiększenia jej odporności na korozję w słonej wodzie, a materiał o tak zmienionym składzie stał się znany jako stal 316L [7,8]. Poza żelazem, chrom jest głównym składnikiem stali nierdzewnej i to właśnie odpowiednio wysoka zawartość tego pierwiastka zapewnia dodatni potencjał korozyjny stali typu 316L oraz odporność na korozję w warunkach utleniających, z kolej obecność niklu odporność na korozję naprężeniową. Stabilna struktura stali austenityczna 316L uzyskiwana jest poprzez przesycenie materiału w zakresie temperatur 1000-1100°C, a odpowiednia wytrzymałość na rozciąganie dzięki zastosowaniu obróbki plastycznej na zimno bądź przez zwiększenie zawartości azotu w stali [9].

Niewątpliwą wadą stali typu 316L jest ich niższa odporność na korozję elektrochemiczną w środowisku płynów ustrojowych w porównaniu do np. stopów tytanu, które wykazują w takich warunkach większą tendencję do samopasywacji. W konsekwencji równoczesny wpływ środowiska organizmu oraz naprężeń rozciągających i ściskających naraża stalowy implant na niszczenie na skutek korozji naprężeniowej. Z tego powodu szybsze niszczenie implantów stalowych obserwuje się w przypadku wszczepów poddawanym dużym obciążeniem np. stosowanych w ortopedii oraz traumatologii, niż tych wykorzystywanych

-14-

w kardiochirurgii [10-12]. Skalę zjawiska korozji implantów wykonanych ze stali nierdzewnej po wieloletnim użytkowaniu przedstawiono na rysunku 2.



Rysunek 2. Skorodowane stalowe endoprotezy stawu biodrowego z trzpieniami Charnleya (a) i Mullera (b) oraz płytki piersiowo-lędźwiowe zastosowane do zespolenia kręgosłupa (c) [13,14].

Zastosowanie stali nierdzewnych typu 316L do wytwarzania długotrwałych implantów, poza niewystarczającą odpornością na korozję, w przypadku implantów poddawanych obciążeniom, jest również limitowane poprzez zbyt niską odporność zmęczeniową. Liczne badania wykazują, że wytrzymałość zmęczeniowa stali typu 316L jest niższa w roztworach symulujących środowisko ludzkiego organizmu niż w powietrzu atmosferycznym i zwykle wnosi około 200-300 MPa, podczas gdy maksymalne naprężenie rozciągające w trzonie kości udowej w ciele obliczane metodą elementów skończonych wynosi około 200 MPa [15,16]. Co więcej, powstawanie pęknięć zmęczeniowych jest związane z obecnością wżerów stanowiących preferencyjne miejsca ich inicjacji [17]. Poza niewystarczającą wytrzymałością zmęczeniową oraz odpornością na korozję, stale 316L cechuje również niedostateczna odporność na zużycie ścierne. Z uwagi na wymienione niedogodności związane z długoterminowym użytkowaniem implantów stalowych, stale nierdzewne 316L zostały zastąpione bardziej odpornymi na korozję i zmęczenie materiałami metalicznymi, w tym stalą

nierdzewną o wysokiej zawartości azotu (np. Orthinox) oraz stopami kobaltu i stopami tytanu. Niemniej, ze względu na relatywnie niski koszt stali nierdzewnych, materiały te nadal są stosowane do wytwarzania implantów tymczasowych, takich jak gwoździe i śruby śródszpikowe oraz wewnętrzne stabilizatory złamań [13,18,19].

1.2. Stopy kobaltu

Stopy na bazie kobaltu po raz pierwszy zostały zastosowane do produkcji implantów w latach 30. XX wieku [20]. Stop Co-Cr-Mo, nazwany Vitallium, początkowo był stosowany jako odlewany stop dentystyczny stanowiący tańszą alternatywę dla ówcześnie stosowanych złotych implantów, a w latach 40. został po raz pierwszy użyty do produkcji implantów ortopedycznych. Stopy Co-Cr-Mo wykazują, w porównaniu do stali nierdzewnych, lepszą odporność na korozję w środowisku zawierającym chlorki, co związane jest ze sponatanicznym tworzeniem się pasywnej warstwy tlenkowej Cr₂O₃ na ich powierzchni. W konsekwencji, w warunkach *in vivo* biomedyczne stopy kobaltu są znacznie mniej toksyczne niż czysty kobalt oraz nikiel i mogą być stosowane jako implanty długotrwałe [21].

Stop Co-28Cr-6Mo (ASTM F75) jest stopem odlewanym, którego głównym atrybutem, poza dobrą odpornością na korozję, jest odporność na zużycie, wynikająca z obecności bogatych w chrom węglików Cr₂₃C₆. Stop Co-20Cr-15W-10Ni (ASTM F90) jest stopem kutym, zawierającycm wolfram oraz nikiel wpływające na poprawę skrawalności. W stanie wyżarzonym właściwości mechaniczne stopu są zbliżone do właściwości stopu Co-28Cr-6Mo. Znaczną poprawę właściwości mechanicznych stopu Co-20Cr-15W-10Ni uzyskuje się stosując przeróbkę plastyczną na zimno [22]. Stop Co-35Ni-20Cr-10Mo (ASTM F562-13) również jest stopem kutym. Zastosowanie obróbki plastycznej na zimno oraz starzenie stopu pozwalają osiągnąć wytrzymałość na rozciąganie rzędu 1600 MPa zachowując jednocześnie możliwosć osiągniecia wydłużenia na poziomie 8% [23].

Implanty Co-Cr-Mo wytwarzane są poprzez oldewanie oraz jako implanty kute. Stopy odlewane cechują się lepszą niż stopy kute odpornością na zużycie oraz korozję wżerową i szczelinową, jednak pod względem wytrzymałości zmęczeniowej przeważają stopy kute [15].

-16-

Lepsze właściwości mechaniczne stopów kobaltu w porównaniu do stali nierdzewnych wynikają ze struktur krystalograficznych kobaltu wykazujących gęste upakowanie: heksagonalnej gęsto upakowanej (HCP, ang. *hexagonal close-packed*) oraz regularnej ściennie centrowanej (FCC, ang. *face-centered cubic*), obecności wolframu oraz molibdenu, które wpływają na umocnienie roztworu stałego, jak i tworzenie węglików. Stopy kobaltu cechują się również lepszą w porównaniu do stali nierdzewnych odpornością zmęczeniową [24]. Mimo wielu zalet stopów kobaltu, ze względu na długoterminowy charakter tej grupy wszczepów, pacjenci posiadający implanty stawów biodrowych oraz kolanowych wykonane ze stopów kobaltu narażeni są na działanie produktów zużycia ciernego, mogących uwalniać chrom oraz kobalt do krwi przez płyn maziowy [25]. Obawy związane z podwyższonym poziomem jonów metali w surowicy krwi są zwiazane zarówno z niekorzystnymi reakcjami miejscowymi na otaczające tkanki, jak i ich potencjalnym działaniem teratogennym [24-26].

1.3. Tytan - wprowadzenie

Tytan jest dziewiątym pod względem obfitości najczęściej występującym metalem w skorupie ziemskiej i stanowi około 0.57% jej masy [27]. Metal ten występuje w dwóch odmianach alotropowych: niskotemperaturowej α , krystalizującej w układzie HCP o stałych sieciowych a=0.295 nm i c=0.468 nm oraz wysokotemperaturowej odmianie β , krystalizującej w układzie regularnym przestrzennie centrowanym (BCC, ang. *body-centered cubic*) o stałej sieciowej a=0.328 nm. Temperatura przemiany alotropowej czystego tytanu wynosi 882.5°C, a na jej wartość wpływa obecność zanieczyszczeń [28,29].

Pierwsza komercyjna metoda pozyskiwania czystego tytanu, polegająca na redukcji czterochlorku tytanu TiCl⁴ metalicznym magnezem, została opracowana w 1946 r., przez W. J. Krolla i do dziś jest stosowana do wytwarzania tytanu technicznego [30,31]. Zgodnie z normą ASTM B265-15 wyróżnia się cztery gatunki tytanu technicznego (komercyjnej czystości, CP Ti, ang. *commercial purity*), których skład oraz właściwości przedstawia Tabela 1.

Gatunek		1	2	3	4
Wydłużenie względne A [%]		>24	>20	>18	>15
Umowna granica plastyczności R02[M	>138	>275	>380	>483	
Wytrzymałość na rozciąganie R _m [MPa	a]	>240	>345	>450	>550
	Ν	< 0.03	< 0.03	< 0.05	< 0.05
	С	<0.10	< 0.10	<0.10	<0.10
Zawartość [% masowe]	Н	<0.15	< 0.15	<0.15	<0.15
	Fe	<0.2	<0.2	<0.2	<0.3
	0	<0.18	< 0.25	< 0.35	< 0.40

Tabela 1. Skład oraz właściwości gatunków tytanu technicznego [32].

CP Ti charakteryzuje się mniejszą wytrzymałością w porównaniu do stopów tytanu. Na skalę przemysłową jest produkowany w postaci rur, blach, odlewów oraz prętów, które mogą być przerabiane plastycznie zarówno na zimno, jak i na gorąco w zakresie temperatur 750÷1000°C. CP Ti nie podlega obróbce cieplnej. CP Ti cechują doskonała odporność na korozję i pełzanie przy jednoczesnej niższej, w porównaniu do stopów tytanu, cenie [33].

1.3.1. Stopy tytanu

Podziału stopów tytanu najczęściej dokonuje się bazując na kryterium strukturalnym w stanie równowagi np. po normalizowaniu. Rozważając taki warunek można wyróżnić trzy grupy stopów tytanu:

- jednofazowe α oraz pseudo α ,
- dwufazowe (α+β) martenzytyczne i przejściowe
- jednofazowe β oraz pseudo β [30,34-36].

Do pierwiastków stopowych stabilizujących fazę α zalicza się Al, Ga, Ge, C, oraz O. Z kolei stabilizatorami fazy β , obniżającymi temperaturę przemiany $\alpha \rightarrow \beta$, są pierwiastki izomorficzne z fazą β (V, Mo, Nb, Ta) oraz sprzyjające przemianie eutektoidalnej (Cu, Si, Cr, Co, Mn, Ni, Fe) [15]. Poza wymienionymi pierwiastkami do stopów Ti wprowadza się również tzw. pierwiastki neutralne takie jak Sn, Zr, Ge, Hf oraz Th, które nie stabilizują faz α i β , ale spowalniają niekorzystne przemiany fazowe prowadzące do powstawania przejściowej kruchej fazy ω [37].

Stopy jednofazowe α cechują się dobrymi właściwościami odlewniczymi, spawalnością oraz wytrzymałością na pełzanie, która uzyskiwana jest na drodze umocnienia roztworowego poprzez dodatek Al, Sn i/lub Zn. Stopy tego typu charakteryzują się lepszą odpornością na pełzanie od stopów β , oraz nie wykazują progu kruchości, wobec czego są materiałami odpowiednimi zarówno do stosowania w wysokich temperaturach, jak i w warunkach kriogenicznych [29,38]. Stopy pseudo α , np. Ti-8Al-1V-1Mo i Ti-6Al-2Nb-1Ta-0.8Mo, w swojej strukturze zawierają niewielką ilość fazy β , wynoszącą po normalizowaniu 2-6%. Dodatek stabilizatorów fazy β powoduje zwiększenie żarowytrzymałości stopów pseudo α , zachowując jedocześnie odporność na pełzanie typową dla stopów α . Stopy α oraz pseudo α nie znalazły szerszego zastosowania w produkcji implantów narażonych na działanie obciążeń, ze względu na niewystarczające właściwości mechaniczne, natomiast do produkcji implantów, od których wymagana jest odporność na korozję, preferowany jest CP Ti, ze względu na niższą cenę [15,37,39].

Stopy dwufazowe (α + β) otrzymywane są poprzez wprowadzenie odpowiednich ilości pierwiastków stabilizujących fazy α oraz β i w temperaturze pokojowej zawierają 10-50% fazy β . Ich właściwości wytrzymałościowe zależne są zarówno od udziału jak i rodzaju pierwiastków stopowych. Własności wytrzymałościowe wzrastają wraz ze wzrostem udziału fazy β osiągając maksimum dla jej zawartości wynoszącej 50% (rysunek 3).



Rysunek 3. Wpływ zawartości pierwiastków stabilizujących fazę β na wytrzymałość stopów Ti (stan wyżarzony) [37].

2. Biomateriały tytanowe

Pierwsze doniesienia o możliwości zastosowania CP Ti w medycynie pojawiły się w 1940 roku, kiedy jego doskonała biozgodność z tkanką kostną została potwierdzona na modelu zwierzęcym [40]. Kolejne prace badawcze dotyczące biozgodności tytanu, zarówno wobec tkanki kostnej jak i tkanek miękkich zwierząt, zostały przedstawione w latach 50. XX wieku [41]. Rozwój przemysłowy prowadzący do wielkoskalowej produkcji tytanu dał możliwość przeprowadzenia wielu badań długoterminowych na zwierzętach, a w konsekwencji również na ocenę kliniczną implantów tytanowych [42,43].

Dalszy rozwój biomateriałów tytanowych, wymuszony niedostatecznie dobrymi właściwościami mechanicznymi CP Ti nastąpił, kiedy do wytwarzania stabilizatorów kości zaproponowano wykorzystywany ówcześnie w lotnictwie stop Ti–6Al–4V, który do dziś jest szeroko stosowany do produkcji implantów [44]. Od tego czasu prowadzone są liczne badania mające na celu otrzymanie stopów typu (α + β) niezawierających wanadu oraz glinu, jak również typu β , cechujących się obniżoną wartością modułu Younga, w celu poprawy nie tylko biokompatybilności, ale również zgodności mechanicznej implantów [45].

Tytan i stopy tytanu ze względu na kombinację właściwości takich jak biokompatybilność, odporność na działanie płynów ustrojowych i wytrzymałość na rozciąganie są najczęściej

stosowanymi w implantologii metalami [46]. Do wytwarzania implantów dentystycznych najczęściej wykorzystuje się CP Ti, podczas gdy w ortopedii dominuje stop Ti-6Al-4V oraz stop Ti-6Al-4V ELI (ang. *extra low interstitials*) o zmniejszonej zawartości pierwiastków międzywęzłowych [47]. Tytan oraz jego stopy ze względu na wytrzymałość właściwą (stosunek wytrzymałości do gęstości) stanowią dobrą alternatywę dla implantów wykonanych z pozostałych biometali. Podstawowe właściwości mechaniczne wybranych stopów tytanu oraz pozostałych materiałów metalicznych o przeznaczeniu biomedycznym przedstawiono w tabeli 2.

Stopy tytanu charakteryzują się relatywnie niskim, w porównaniu do stali czy stopów kobaltu, modułem sprężystości Younga, co ma znaczący wpływ na proces regeneracji kości wokół implantu (rysunek 4). Wartość modułu Younga jest szczególnie ważna w przypadku implantów poddawanych obciążeniom. Niedopasowanie pomiędzy modułem biomateriału, a jego wielkością charakteryzującą otaczającą tkankę kostną może prowadzić do zjawiska tzw. ekranowania naprężeń. Zjawisko to polega na przenoszeniu obciążeń przez sztywniejszy element (implant), co skutkuje redukcją naprężeń w kości podczas aktywności ruchowej pacjenta [48]. Ekranowanie naprężeń jest zjawiskiem niepożądanym, które wymusza dopasowanie się kości do nowych warunków i może prowadzić do przebudowy tkanki, skutkującej spadkiem jej gęstości i zmniejszeniem grubości kory kostnej w obszarach odciążonych, podczas gdy inne jej części będą stawać się regionami koncentracji naprężeń, gdzie będzie postępować miejscowy przyrost grubości warstwy korowej. W efekcie może to prowadzić do obluzowania implantu i konieczności powtórnej operacji, a nawet skutkować złamaniem kości [49,50].

Materiał	Umowna granica plastyczności R0.2 [MPa]	Wytrzymałość na rozciąganie R๓ [MPa]	Moduł Younga E [GPa]	Typ struktury
Ti-6Al-4V (w)	825-869	895-930	110-114	
Ti-6Al-4V ELI (w)	795-875	960-965	100-110	
Ti-6Al-7Nb (w)	880-950	900-1050	114	
Ti-15Sn-4Nb-2Ta-0.2Pd (w)	860	790	89	α+β
Ti-15Sn-4Nb-2Ta-0.2Pd (s)	1020	1109	103	
Ti-15Zr-4Nb-4Ta-0.2Pd (w)	715	693	94	
Ti-15Zr-4Nb-4Ta-0.2Pd (s)	919	806	99	
Ti-13Nb-13Zr (s)	973-1037	836-908	79-84	
Ti-15Mo (w)	874	544	78	
Ti-12Mo-6Zr-2Fe (w)	1060-1100	1000-1060	74-85	β
Ti-15Mo-2.8Nb-0.2Si (s)	979-999	945-987	83	
Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr (s)	911	864	80	
Ti-35.5Nb-7.3Zr-5.7Ta (s)	800	830	55-66	
316L (ASTM F138) (w)	190	490	210	
Stop Co F563 (w)	280	600	230	
Stop Co F90 (w)	450-650	950-1220	210	

Tabela 2. Właściwości mechaniczne stopów tytanu oraz pozostałych materiałów metalicznych dedykowanych dla biomedycyny [15,39].

w- wyżarzanie, s- starzenie

Innym ważnym czynnikiem wpływającym na prawidłowe funkcjonowanie wszczepu w organizmie jest zachowanie powierzchni biomateriału podczas kontaktu z płynami ustrojowymi. Rozważając procesy zachodzące na powierzchni metali w środowisku tkankowym należy wziąć pod uwagę zarówno agresywność tego środowiska, jak i możliwość ich nasilenia na skutek tarcia, co prowadzić może do uwalniania jonów metali do środowiska tkankowego wpływając na metabolizm komórek [51]. Jony metali w kontakcie z tkankami pacjenta mogą wywoływać ich miejscowe uszkodzenie i reakcje zapalne, jak na przykład stopniowa osteoliza otaczających wszczep tkanek, a także powodować konsekwencje ogólnoustrojowe, takie jak nadwrażliwość na metal. Osteoliza wpływa negatywnie na fiksację Implantu z kością, prowadząc do nieprawidłowego przenoszenia obciążenia podczas ruchu, skutkującego uszkodzeniem implantu oraz koniecznością przeprowadzenia operacji korekcyjnych [52]. Powierzchnia tytanu w środowisku zawierającym tlen natychmiast pasywuje tworząc warstwę rutylu i anastazu. Stężenie tlenu w warstwie pasywnej maleje w kierunku granicy faz tlenek/metal, od TiO₂ na powierzchni materiału, do Ti₂O₃ i TiO przy granicy faz. W środowisku tkankowym warstwa tlenkowa na powierzchni może być dodatkowo uwodniona. Zarówno CP Ti jak i stopy Ti nie wykazują potencjału przebicia lub potencjału wżerowego w zakresie istotnych klinicznie kombinacji potencjału i pH [53].



Rysunek 4. Zdjęcia rentgenowskie kości piszczelowej po 24 tygodniach od implantacji prętów Ti-23Nb-0.7Ta-2Zr (a) i stali nierdzewnej SUS316L (b) . Czerwoną strzałką wskazano miejsce dotknięte atrofią, białymi - obszary formowania kości [48].

W przypadku stopu Ti-6Al-4V skład warstwy tlenków na powierzchni materiału jest praktycznie taki sam, jak w przypadku CP Ti, ale dodatkowo zawiera ona niewielką ilość Al₂O₃ [54]. Poziom zawartości metali będących głównymi składnikami tego stopu w płynach ustrojowych pacjentów poddanych zabiegom implantacji, zarówno wszczepów ortopedycznych, jak i stomatologicznych, ze względu na szkodliwy charakter jonów tych metali, wielokrotnie był przedmiotem badań. Patton i in. wyznaczyli poziom zawartości metali we krwi pacjentów poddanych zabiegom gwoździowania śródszpikowego z zastosowaniem gwoździ piszczelowych wykonanych ze stopu Ti-6Al-4V (TriGen) oraz gwoździami ze stali (Russell-Taylor). We krwi pacjentów posiadających implanty stalowe zaobserwowano 2.5krotny wzrost stężenia jonów chromu w porównaniu do grupy kontrolnej, podczas gdy u pacjentów posiadających implanty tytanowe zaobserwowano jedynie nieznaczny wzrost stężenia jonów Ti. Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w poziomach Mo, Al oraz V między grupą kontrolną i grupą pacjentów poddanych wszczepieniu gwoździ śródszpikowych TriGen, przy czym mediany poziomu wanadu w obydwu grupach były poniżej poziomu wykrywalności. Szczegółowe wyniki przedstawiono w Tabeli 3 [55].

Tabela 3. Mediana stężeń jonów (μg/L) w surowicy (rozstęp międzykwartylowy: Q₁; Q₃) dla grupy kontrolnej, pacjentów z gwoździami ze stali nierdzewnej oraz grupy z gwoździami wykonanymi ze stopu Ti-6Al-4V [55].

Grupa kontrolna			Gwoździe stalowe			p-wartość	
	Q 1	mediana	Q3	Q1	mediana	Q3	pwartose
Cr	0.04	0.04	0.04	0.04	0.10	0.22	0.005
Мо	0.04	0.88	1.26	0.35	0.75	1.25	0.6
	Grupa kontrolna		Gwoździe tytanowe			n-wartość	
	Q1	mediana	Q3	Q1	mediana	Q3	p wartoote
Ti	2.73	4.70	6.10	3.38	6.45	7.65	0.04
Al	0.50	2.20	3.45	0.73	2.55	4.05	0.4
V	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.038	0.7

Uwalnianie jonów z implantów metalicznych do płynów ustrojowych może prowadzić do akumulacji jonów w tkankach różnych organów, takich jak wątroba, płuca czy nerki. Badania dotyczące tego zagadnienia przeprowadzili na modelu zwierzęcym Morais i in. [56]. Badacze dokonali oznaczenia zawartości Ti, Al oraz V w tkankach wątroby, płuc oraz nerek królików po 1 tygodniu, 4 tygodniach oraz 12 tygodniach od umieszczenia w piszczelach zwierząt implantów ortodontycznych wykonanych ze stopu Ti-6Al-4V. Badania wykazały obecność wszystkich wspomnianych pierwiastków w tkankach zwierząt. Należy jednak zauważyć, że zawartość żadnego z tych metali w poszczególnych organach królików nie osiągnęła toksycznego stężenia, które zgodnie z zaleceniami The National Academy of Sciences wynoszą odpowiednio 200 ppm w przypadku Al oraz 10 ppm w przypadku V (rysunek 5). [57].



Rysunek 5. Porównanie średnich zawartości Ti (a), Al (b) oraz V (c) w tkankach nerek, wątroby oraz płuc królików poddanych implantacji wszczepów ortodontycznych wykonanych ze stopu Ti-6Al-4V (na podstawie [56]).

Odpowiednie funkcjonowanie oraz bezpieczeństwo użytkowania implantu przez cały okres eksploatacji uwarunkowane są jego odpowiednią integracją z kością. Zjawisko bezpośredniego łączenia się (zakotwiczenia) implantu tytanowego z tkanką kostną (osteointegracja) zostało po raz pierwszy zaobserwowane w latach 70. XX wieku [58]. Na przestrzeni lat definicja ta ewoluowała, uwzględniając ocenę morfologii połączenia materiału z tkanką przy użyciu mikroskopii świetlnej. Niemniej jednak, definicję tą można uznać za niewystarczającą, ponieważ nie odnosi się ona do kompatybilności mechanicznej wszczepu. Pomyślna osteointegracja implantu wymaga jego dobrego połączenia oraz braku mikroruchów między powierzchnią biomateriału, a otaczającą tkanką kostną, co zwane jest stabilnością pierwotną implantu [59]. Należy jednak pamiętać, że wprowadzenie implantu do środowiska kostnego wywołuje określoną odpowiedź biologiczną organizmu. Liczne badania wykazały, że istotnym czynnikiem determinującym odpowiedź komórkową jest charakterystyka powierzchni implantu, która wpływa na sekwencję adsorpcji białek, adhezję płytek krwi i homeostazę, aktywację dopełniacza, stan zapalny oraz osteogenną odpowiedź komórek [60-63]. Ze względu na fakt, że Ti oraz jego stopy bardzo łatwo ulegają utlenieniu, tworząc na powierzchni zwartą warstwę tlenkową, materiały te cechują się wysoką odpornością na korozję w środowisku organizmu. Niemniej jednak, powstała warstwa tlenkowa jest biologicznie obojętna, co utrudnia interakcję implantu z tkankami [64]. Aby rozwiązać ten problem, proponowane są różne metody modyfikacji powierzchni Ti, co ma na celu poprawę biokompatybilności i bioaktywności implantów, sprzyjać regeneracji tkanki kostnej oraz poprawiać siłę wiązania i osteointegrację na granicy implant/kość [64-69].

2.1. Modyfikacja powierzchni tytanu i jego stopów - wstęp

Tytan i jego stopy odgrywają kluczową rolę w zabiegach ortopedycznych oraz stomatologicznych. Zastosowanie technologii modyfikacji ich powierzchni, pozwala nie tylko zwiększyć osteointegrację implantu, ale także potencjalnie uzyskać właściwości przeciwbakteryjne, redukując ryzyko związane z infekcjami pooperacyjnymi. Niniejszy rozdział ma na celu podsumowanie najnowszych trendów w technikach modyfikacji powierzchni tytanu i jego stopów dedykowanych dla zastosowań biomedycznych.

Techniki modyfikacji powierzchni Ti oraz jego stopów obejmują szerokie spektrum metod zarówno mechanicznych, fizycznych jak i chemicznych, z uwzględnieniem m. in. natryskiwania plazmowego, fizycznego osadzania z fazy gazowej, nakładania powłok metodą zol-żel, piaskowania, czy też anodowania. Najczęściej stosowanymi związkami do wytwarzania powłok są bioaktywne materiały ceramiczne takie jak fosforany wapnia np. hydroksyapatyt (HAp, HA) oraz bioaktywne szkła [70]. Z kolei stosowanie powłok polimerowych oraz kompozytowych na biomateriałach metalicznych, cechujących się

-26-

odpornością na korozję oraz wytrzymałością mechaniczną, pozwala na nadanie im dodatkowej biofunkcjonalności poprzez zwiększenie interakcji powierzchni implantu z tkankami pacjenta oraz promowanie biokompatybilności materiału. Warto również podkreślić, że stosowanie związków polimerowych do wytwarzania powłok zapewnia szeroki zakres możliwych modyfikacji materiału, co bez wątpienia może zwiększać spektrum ich zastosowania, a także dać możliwość dostosowania produktu do indywidualnych potrzeb pacjentów [71].

2.1.1. Fosforany wapnia w medycynie

Grupą materiałów odgrywającą ważną rolę w dziedzinie medycynie są fosforany wapnia (CPs, ang. *calcium phosphates*,) [72]. Fosforany wapnia stanowią grupę związków zawierających kationy Ca²⁺ oraz aniony ortofosforanowe (PO₄³⁻), metafosforanowe (PO₃⁻) bądź pirofosforanowe (P₂O₄⁷⁻). Dodatkowo fosforany wapnia mogą również zawierać jony hydroksylowe (OH⁻). CPs stanowią główny składnik kości ludzkich (około 60%) oraz szkliwa zębów (około 90%). W zależności od stosunku molowego Ca/P można wyróżnić rozmaite związki CPs, wykazujące różne właściwości fizykochemiczne (Tabela 4.).

MCPM jest najbardziej kwaśną i najlepiej rozpuszczalną w wodzie fazą CPs [73]. MCPM jest stosowany jako składnik samoutwardzalnych cementów CP oraz jako uszczelniacz w stomatologii [74,75]. Czysty MCPM nie jest jednak biokompatybilny z kością ze względu na swoją kwasowość i nie może być stosowany jako samodzielny substytut kości [76]. Niemniej jednak, zaproponowano szereg kompozycji cementów kompozytowych odpowiednich do zastosowań klinicznych zawierających MCPM oraz inne fosforany np. α -TCP, charakteryzujących się krótkim czasem wiązania [77].

		-		
Nazwa związku	Oznaczenie skrótowe	Wzór chemiczny	Nazwa mineralogiczna	Stosunek Ca/P
Diwodorofosforanu(V) wapnia jednowodny	MCPM	Ca(H2PO4)2 · H2O		0.5
Wodorofosforan wapnia	DCPA	CaHPO4	Monetyt	1
Wodorofosforan wapnia dwuwodny	DCPD	CaHPO4 · 2H2O	Bruszyt	-
Diwodoro- szecioortofosforanu(V) ośmiowapnia pięciowodny	OCP	CasH2(PO4)6 · 5H2O	ı	1.33
lpha-fosforan trójwapniowy	α-TCP	α -Ca $_3(PO_4)_2$	ı	1.5
β-fosforan trójwapniowy	β-TCP	β -Ca ₃ (PO ₄) ₂	ı	1.5
Sześcioortofosforan(V) diwodorotlenku dziesięciowapnia	НАр, оНАр	Ca10(PO4)6(OH)2	Hydroksyapatyt	1.67
Fosforan czterowapniowy	TTCP	$CaO \cdot Ca_3(PO_4)_2$	ı	2.0

Tabela 4. CPs w układzie CaO-P2O5-H2O istotne dla medycyny [78,79]

DCPA, zwany również monetytem, jest bezwodną formą DCPD. DCPA w przeciwieństwie do DCPD, nie występuje w zwapnieniach kostnych. Jest stosowany w cementach fosforanowowapniowych, jako źródło wapnia i fosforanów w żywności np., płatkach śniadaniowych. Badania *in vitro* ukierunkowane na ocenę zgodności biologicznej DCPA oraz DCPD wskazują, że DCPA zapewnia aktywną resorpcję osteoklastów, a także indukuje wyższy poziom ekspresji genów osteogennych w komórkach szpiku kostnego niż DCPD [80]. Z kolei porównawcze badania *in vivo* przeprowadzone na królikach wykazały, że ubytki kostne wypełnione DCPA w porównaniu do wszczepów autologicznych (granule kostne) po ośmiu tygodniach od zaimplantowania nie wykazywały różnic w objętości zmineralizowanej tkanki w przypadku obydwu wszczepów [81]. Dodatkowo, DCPA, w przeciwieństwie do TCP i DCPD, nie ulega przemianie fazowej w HA w środowisku fizjologicznym [82].

DCPD, zwany również bruszytem, jest związkiem biokompatybilnym oraz biodegradowalnym. Cechuje się również osteokonduktywnością i w zależności od pH może być przekształcony w DCPA (pH<6), OCP (pH ~6 - 7) lub CDHA (pH>7). Struktura DCPD złożona jest z cząsteczek wody łączących łańcuchy CaHPO4 za pomocą wiązań wodorowych. Cementy fosforanowo-wapniowe oparte na DCPD ulegają szybszej degradacji w porównaniu do tych zawierających HA [73]. Niemniej jednak, gdy w środowisku tkankowym duże ilości DCPD są przekształcane w CDHA, można zaobserwować silną odpowiedź zapalną ze względu na duże ilości kwasu, które są uwalniane podczas tej reakcji [83].

OCP uznawany jest za fosforan będący prekursorem biologicznych kryształów apatytu w kościach, a także zębinie oraz szkliwie zębów [84]. Badania przeprowadzone z zastosowaniem różnych modeli zwierzęcych wskazały, że OCP jest materiałem osteokonduktywnym i wpływa pozytywnie na regenerację tkanki kostnej w miejscu wszczepu [85-88]. Ułatwia również różnicowanie komórek osteoblastycznych, a także zwiększa ekspresję markerów osteogennych, w tym kolagenu typu I i fosfatazy alkalicznej [89-91]. Dodatkowo, syntetyczny OCP może ulegać konwersji do HA zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* [88,92]. W procesie konwersji OCP do HA dochodzi do wymiany jonowej z otaczającym środowiskiem tkankowym, co wpływa na promowanie różnicowania komórek

-29-

osteoblastycznych oraz regenerację kości. Co ciekawe, konwersja OCP do HA może zachodzić bez zmiany jego pierwotnej morfologii nawet *in vivo* [93]. Ze względu na korzystny wpływ OCP na proces regeneracji tkanki kostnej stał się on materiałem o potencjale aplikacyjnym w produkcji implantów powlekanych oraz składnik biokompozytów [94,95].

Krystaliczny TCP - odmiany α oraz β , są produktami przemian wysokotemperaturowych i nie mogą być otrzymane poprzez bezpośrednie wytrącenie z roztworów wodnych. Fazę α -TCP zwykle wytwarza się z fazy β -TCP przez ogrzewanie w temperaturze powyżej 1125°C i szybkie schłodzenie, aby zapobiec odwrotnej przemianie fazowej [96]. Z kolei β-TCP powstaje w temperaturze 900-1100°C. Należy jednak wspomnieć, że temperatury zachodzenia przemian fazowych są zależne od czystości materiału i może mieć na nie wpływ obecność obcych jonów [97]. Fazy TCP różnią się nie tylko strukturą komórki elementarnej, ale również rozpuszczalnością. W temperaturze pokojowej obydwa polimorfy są stabilne, jednak w środowisku wodnym α -TCP charakteryzuje się większą reaktywnością i może hydrolizować do CDHA, co czyni α-TCP użytecznym składnikiem do wytwarzania samowiążących osteotransdukcyjnych cementów kostnych oraz biodegradowalnej bioceramiki [73]. Opublikowana literatura naukowa odnosząca się do klinicznych zastosowań materiałów opartych na α -TCP skupia się na wytwarzaniu cementów kostnych stosowanych w stomatologii, chirurgii twarzoczaszki, ortopedii, wertebroplastyce i kyfoplastyce oraz jako nośniki leków [98,99]. Komercyjnie dostępnymi materiałami opartymi na α -TCP są granulaty Biobase® i Arrow-Bone™ wykorzystywane m.in. do podniesienia dna zatoki, uzupełnienia luki pomiędzy zębodołem ekstrakcyjnym a implantem stomatologicznym oraz powstałych w wyniku usunięcia torbieli, a także uzupełnienia ubytków kości twarzy [100]. β-TCP można wytwarzać w temperaturach powyżej 800°C przez rozkład termiczny CDHA lub przez oddziaływanie kwasowych CPs w stanie stałym, np. DCPA, z CaO. β-TCP można również otrzymać w stosunkowo niskiej temperaturze (150°C) przez strącanie w środowisku organicznym, takim jak glikol etylenowy [101]. β-TCP jest stosowany przede wszystkim w cementach kostnych fosforanowo-wapniowych, a także w stomatologii, a w połączeniu z HA tworzy ceramikę dwufazową (*ang.* biphasic calcium phosphate, BCP) stosowaną do uzupełniania ubytków kostnych [102,103].

TTCP powstaje w układzie CaO-P₂O₅ w temperaturach przekraczających 1300°C. Najczęściej stosowane metody wytwarzania TTCP oparte są na reakcjach w stanie stałym pomiędzy węglanem wapnia i wodorofosforanem wapnia w temperaturze 1450 - 1500°C. Związek ten jest metastabilny, dlatego synteza czystego TTCP wymaga szybkiego schłodzenia, bądź atmosfery niezawierającej wilgoci, co zapobiega rozkładowi TTCP do HA, CaO, CaCO₃ oraz β-TCP [104]. TTCP stosowany jest przede wszystkim jako komponent cementów kostnych zarówno w połączeniu z HA, jak i związkami polimerowymi (np. chitozanem lub hydroksypropylometylocelulozą), a także w cementach jednoskładnikowych. Przykładami komercyjnych cementów opartych na mieszaninie TTCP (do 73% wag.) z innymi ortofosforanami wapnia są BoneSource®, Biopex®, MimixTM oraz Cementek® [105,106].

2.1.1.1. Hydroksyapatyt

Materiały hydroksyapatytowe ze względu na doskonałą biokompatybilność, właściwości osteokonduktywne i podobieństwo do nieorganicznego składnika ludzkiej kości od dekad cieszą się dużym zainteresowaniem świata nauki [107]. Są szeroko stosowane jako materiały biomedyczne, m.in. do uzupełniania ubytków kostnych, jako rusztowania (skafoldy) w inżynierii tkankowej, do wytwarzania bioaktywnych powłok, jako systemy dostarczania leków/białek/genów oraz w chromatografii jako wypełniacze kolumn do szybkiego frakcjonowania biocząsteczek [108-112]. Ze względu na liczne podstawienia jonowe w strukturze apatytów kostnych ich skład różni się od stechiometrycznego. Kości ludzkie składają się z niestechiometrycznych nanokrystalicznych apatytów z niedoskonałościami strukturalnymi spowodowanymi podstawieniami pierwiastkami takimi jak Na, Mg, Zn, Sr, K, F, Cl, Si w sieci krystalicznej HA [113]. HA jest klasyfikowany jako materiał bioaktywny, co znaczy że jest on w stanie tworzyć wiązania chemiczne z otaczającymi tkankami. Liczne prace naukowe podkreślają jego biokompatybilność, bioaktywność oraz osteokonduktywność. To właśnie te właściwości sprawiają, że jest jednym z najczęściej stosowanych materiałów nie

tylko w dziedzinach medycyny związanych z tkankami twardymi, takimi jak traumatologia, chirurgia szczękowo-twarzowa, czy stomatologia, ale także np. do otrzymywania implantów oczodołowych [114].

HA otrzymywany jest z zastosowaniem różnych technik, wśród których można wyróżnić metody suche, mokre i wysokotemperaturowe. Należy podkreślić, że w zależności od zastosowanej metody syntezy jest możliwość otrzymania produktu o różnej morfologii oraz czystości fazowej [115]. Podsumowanie stosowanych metod otrzymywania syntetycznego HA przedstawia tabela 5.

Istnieje również możliwość odzyskiwania HA z surowców pochodzenia naturalnego takich jak kości zwierzęce (wołowe, wieprzowe, rybie), muszle ostryg i małż, łuski ryb, skorupy jaj, czy też szkielety koralowców. Niewątpliwymi zaletami metod bazujących na surowcach pochodzenia naturalnego jest ich przyjazność środowisku poprzez możliwość zagospodarowania odpadów zwierzęcych [118].

Met	tody	Źródło Ca i P	Produkt
che	W stanie stałym	 β-TCP, Ca(OH)2 CaCO₃, CaHPO₄ CaCO₃,NH₄H₂PO₄ 	 HA HA 91.23% HA, 5.27% TCP, 3.50% CaO
Su	Mechanochemiczne	 Ca2P2O7, CaCO3 CaHPO4·2H2O, CaCO3, CH4N2O CaHPO4, CaO 	• HA • HA węglanowy • HA
okre	Strąceniowe	 Ca(OH)2,H3PO4 Ca(OH)2,H3PO4 Ca(NO3)2.4H20, (NH4)2HPO4 Ca(NO3)2.4H20, Na3PO4 	 HA o wielkości cząstek 0.2-1.6 μm HA o wydłużonym kształcie (~200 nm) HA o wielkości cząstek 8-20 nm HA nanopręty o długości 4.0-36.9 nm
W	Hydrotermalne	 CaCl₂,H₃PO₄ Ca(OH)₂, (NH₄)₃PO₄ CaCl₂,K₂HPO₄ Ca(NO₃)₂·4H₂0, (NH₄)₂HPO₄ 	 HA (pręciki o długości ~80 nm HA węglanowy (aglomeraty) HA (pręciki o długości 60-75 nm) HA
Wysokotemperaturowe	Piroliza Spalanie	 Ca(NO₃)₂, (NH₄)₂HPO₄ * Ca(NO₃)₂ · 4H₂0, (NH₄)₂HPO₄ ** Ca(NO₃)₂, NH₄H₂PO₄, Ca(OH)₂ ** Ca₃(PO₄)₂, Ca(NO₃)₂·4H₂0, (NH₄)₂HPO₄, Ca(NO₃)₂, 	 HA węglanowy HAp + β-TCP Hap i CaO HA (puste sfery o rozmiarze 1-4mm) HAp, β-Ca₂P₂O₇

Tabela 5. Metody syntezy HAp [116].

*paliwo: kwas cytrynowy, kwas bursztynowy; ** paliwo: mocznik

2.1.1.2. Hydroksyapatyt o strukturze nanometrycznej

Z punktu widzenia inżynierii tkankowej istotne są zagadnienia związane z cechami strukturalnymi HA oraz podstawieniami jonowymi w jego sieci krystalicznej. Wiele badań dotyczących nanostrukturalnego HA (nHA) wskazuje, że w porównaniu do HA o rozmiarach mikrometrycznych (mHA) wykazuje on w środowisku tkankowym korzystniejsze właściwości, ułatwia adhezję komórek oraz absorpcję białek, co jest bardzo istotne ze względu na fakt, że adsorpcja białek jest pierwszym etapem integracji biomateriału z tkanką po implantacji [117-120].

Badania porównawcze nad kompozytami na bazie chitozanu zawierającymi nHA oraz mHA przedstawili Lee i in. [121]. Badacze wytworzyli materiały kompozytowe polimerowoceramiczne z zastosowaniem metody liofilizacji. Materiały swoją strukturą miały odwzorowywać strukturę tkanki kostnej i stanowić jej potencjalne substytuty. Przeprowadzono badania in vitro mające na celu określenie wpływu poszczególnych materiałów na żywotność komórek osteoblastów, ale również dokonano oceny biokompatybilności materiałów in vivo. W tym celu zostały one wszczepione w szczeliny kostne w obszarze piszczeli królików. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że materiały zawierające nHA powodują wzrost żywotności komórek MC3T3-E1 (linia Z kolei komórkowa osteoblastów). badania trójwymiarowych właściwości mikrostrukturalnych kości dokonane z zastosowaniem mikrotomografii komputerowej (mikro-CT) wykazały wyższe wartości parametrów takich jak objętość oraz powierzchnia tkanki kostnej, gęstość powierzchni kości, liczba beleczek kostnych i ich średnia arytmetyczna grubość dla materiałów zawierających nHA w porównaniu do zaimplantowanych kompozytów zawierających mHA.

Interesujące badania dotyczące interakcji HA - białka przeprowadzili Li i in. [122]. W swojej pracy przedstawili efekty badań wpływu nano- oraz mikrotopografii bioceramiki HA na struktury białka morfogenetycznego kości-2 (BMP-2) oraz na komórki zrębowe szpiku kostnego (BMSC). W porównaniu z bioceramiką w skali mikronowej, bioceramika HA

-34-

o wielkości ziarna 104,6 ± 27,8 nm wykazywała zwiększoną chropowatość, hydrofilowość i lepsze właściwości mechaniczne. Efekty synergiczne tych cech powierzchni wpływały pozytywnie na konformację BMP-2, ułatwiały adhezję i rozprzestrzenianie się komórek oraz aktywowały osteogenne różnicowanie BMSC.

Ceramika HA o strukturze nanometrycznej wzbudza również zainteresowanie ze względu na potencjalną aktywność przeciwnowotworową [123-126]. W 1993 roku Aoki przypadkowo odkrył, że nanocząstki HA mogą hamować proliferację komórek Ca-9 [127]. Później wykazano, że różnego rodzaju komórki rakowe, np. ludzkie komórki wątrobiaka BEL-7402, komórki kostniakomięsaka U2OS, czy też ludzkie komórki raka żołądka SGC-7901 mogą być inhibowane przez nanocząstki HA [124,125,128]. Chen i in. wykazali, że nanocząstki HA zmniejszają ekspresję genu Bcl-2 i zwiększają ekspresję Bax, a ponadto aktywują kaspazy-3 i kaspazy-9 wywołując apoptozę komórek nowotworowych [124]. Nanometryczny HA został również zbadany od kątem aktywności antynowotworowej względem komórek linii czerniaka złośliwego. Badania te wskazały silną zależność pomiędzy proliferacją komórek nowotworowych, a rozmiarami HA, potwierdzając działanie inhibitujące nHA względem tego typu komórek nowotworowych [126,129].

2.1.1.3. Podstawienia jonowe w sieci krystalicznej hydroksyapatytu

Trendy w dziedzinie biomateriałów do regeneracji kości koncentrują się na promowaniu właściwości osteokondukcyjnych i zdolności do stymulowania procesu regeneracji kości m.in. poprzez wprowadzenie do struktury HA podstawień izomorficznych. Wzmożone zainteresowanie tego typu rozwiązaniami potwierdza rosnąca liczba publikacji naukowych w tym zakresie. W 2005 r. publikacje dotyczące podstawionego HA stanowiły mniej niż 2% wszystkich publikacji związanych z tematyką HA, w 2015 r. było to 6.3%, natomiast w roku 2019 r. - 9.5% [130]. W literaturze opisane są dwie struktury kryształów HA: jednoskośna oraz heksagonalna. W układzie jednoskośnym opisanym przez grupę przestrzenną P21/b krystalizuje hydroksyapatyt stechiometryczny. W HA biologicznym oraz

niestechiometrycznym występuje struktura heksagonalna o symetrii sieci krystalicznej opisanej grupą przestrzenną P63/m [131]. Co istotne, do podstawień w strukturze HA może dochodzić zarówno w podsieci kationowej jak i anionowej. Podstawienie jest możliwe, kiedy spełnione są warunki związane z podobieństwem rozmiarów oraz ładunków jonów, bądź zostanie spełniony warunek elektroobojętności związku [132]. Jeśli jony zostaną zaadsorbowane na powierzchni materiału lub z nim zmieszane bez wchodzenia w sieć krystaliczną, może nastąpić ich gwałtowne uwalnianie, a to z kolei wywoływać efekt cytotoksyczny. Jak wyjaśnili Li i in., podstawienia jonowe w sieci krystalicznej HA zapewniają mniejszą szybkość uwalniania podczas procesu przebudowy kości [133]. W aktualnej literaturze najczęściej badanymi kationowymi substytucjami HA są podstawienia Sr²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Na⁺, K⁺, Li⁺, Ag⁺, Fe²⁺, Mn²⁺ i Cu²⁺, natomiast anionowymi CO₃²⁻, F⁻, SiO₄⁴⁻, SeO₃²⁻ oraz SeO42-. W badaniach in vitro udowodniono, że HA podstawiony jonami Sr (SrHA) powoduje zwiększenie ekspresji fosfatazy alkalicznej (ALP), osteokalcyny (OCN) oraz kolagenu typu i (COLL I). Badania te wskazały kluczową rolę jonów Sr²⁺w procesie dojrzewania osteoblastów do osteocytów [134,135]. Równie korzystny wpływ na procesy związane z regeneracją tkanki kostnej wykazuje HA podstawiony jonami Mg (MgHA). Badania wykazały, że wpływa on na adhezję, proliferację i różnicowanie komórek macierzystych w kierunku osteoblastów, a także zwiększa ekspresję markerów związanych z osteogenezą (ALP, Runx2, COLL I, OCN) [136-138]. Ponadto udowodniono, że MgHA wykazuje aktywność przeciwdrobnoustrojową hamując tworzenie biofilmu [139,140]. Podobne właściwości wykazuje HA podstawiony jonami Zn (ZnHA). Zgodnie z wynikami przedstawionymi przez Park i in., wspomaga on różnicowanie osteogenne mezynchemalnych komórek macierzystych poprzez aktywację szlaku sygnałowego cAMP-PKA-CREB [141]. Z kolei badania przeprowadzone przez Thian i in. wykazały działanie przeciwdrobnoustrojowe ZnHA względem bakterii S. aureus [142]. Równie obiecujące właściwości wspomagające regenerację tkanki kostnej wykazuje HA podstawiony pierwiastkami jednowartościowymi takimi jak Li, Na oraz Ag [143-146]. Aktywność biologiczną poszczególnych substytucji anionowych oraz kationowych w sieci krystalicznej HA podsumowuje rysunek 6.


Rysunek 6. Podsumowanie wpływu niektórych jonów substytucyjnych na właściwości biologiczne HA [147].

2.1.1.4. Powłoki hydroksyapatytowe

HA stosowany jest również do wytwarzania powłok na biomateriałach metalicznych w celu zwiększenia ich biofunkcjonalności. Powłoki HA można wytwarzać przy użyciu kilku technik, takich jak: osadzanie elektrochemiczne bądź elektroforetyczne (EPD), metody zol-żel, napylanie plazmowe, osadzanie biomimetyczne i hydrotermalne, fizyczne (PVD) oraz chemiczne (CVD) osadzanie z fazy gazowej, powlekanie obrotowe oraz zanurzeniowe [148-157]. Należy jednak pamiętać, że pomimo dostępności wielu technik stosowanych do wytwarzania powłok HA na biomateriałach metalicznych przedstawiono, że każda z nich posiada pewne wady. Pozytywne oraz negatywne aspekty stosowania poszczególnych technik osadzania powłok HA przedstawiono w tabeli 6.

Metoda	Zalety	Wady
	niskie temperatury	• wysoka temperatura spiekania
	nakładania powłok	powłoki po jej osadzeniu
	• wytwarzanie powłok	
Zol-żel	o wysokiej czystości	
	 możliwość wytwarzania 	
	powłok na powierzchniach	
	o złożonym kształcie	
	niskie koszty metody	• wysoka temperatura spiekania
	• szybki proces nakładania	powłoki po jej osadzeniu
Powlekanie	 możliwość powlekania 	
zanurzeniowe	złożonych powierzchni	
	• wysoka jednorodność	
	powierzchni powłok	
	niskie koszty metody	 słaba adhezja powłoki do
Osedannis	 pozwala powlekać złożone 	metalicznego podłoża
olalitica di ami anno a	podłoża	
elektrochemiczne	• wysoka jednorodność	
	powierzchni powłok	
	• pozwala powlekać złożone	• pękanie powłoki podczas
Osadzanie	podłoża	osadzania
elektroforetyczne	 wysoka jednorodność 	 wymaga wysokich temperatur
	powierzchni powłok	spiekania
	niskie temperatury	• długi czas trwania procesu
	wytwarzania powłok	osadzania powłoki
	 pozwala powlekać złożone 	• wymaga utrzymania stałego pH
Powlekanie	podłoża	
biomimetyczne	 możliwość inkorporacji 	
	substancji aktywnych	
	biologicznie np. czynników	
	wzrostu	
Natryskiwanio	 proces stosowany 	• wymaga kosztownej aparatury
nlazmowe	komercyjnie	 niejednorodna gęstość powłoki
plazillowe	• niskie koszty metody	

Tabela 6. Techniki wytwarzania powłok HA oraz ich charakterystyka [70,79,110,120,158-160].

	• szybki proces osadzania	• przemiany fazowe i rozrost
		ziaren HA na skutek działania
		wysokich temperatur
	wszechstronność metody -	 wymaga wstępnej obróbki
Ocadzania	możliwość wytwarzania	powierzchni
lasorom	powłok gęstych, porowatych,	 proces jest kosztowny
impulsourum	krystalicznych lub	• metoda nie jest odpowiednia do
impulsowyin	amorficznych	pokrywania skomplikowanych
		powierzchni
	jednorodność powłoki	• proces jest kosztowny
Dracourania	 możliwość wytwarzania 	• metoda wymaga stosowania
izostatuszno na	gęstych powłok	wysokiej temperatury
		• metoda nie jest odpowiednia do
gorąco		pokrywania skomplikowanych
		powierzchni

Najczęściej stosowanymi metodami mającymi na celu naprawę zdefektowanej tkanki kostnej są przeszczepy allogeniczne, autogeniczne oraz oparte na materiałach syntetycznych (HA lub innych substancjach biokompatybilnych) [161-166]. Ze względu na chemiczne podobieństwo HA do mineralnego składnika kości oraz osteokonduktywność, cieszy się on szczególnym zainteresowaniem w kontekście wytwarzania powłok na implantach. Badania wykazują, że komórki osteoblastów mogą z łatwością wchodzić w interakcję z materiałami pokrytymi HA, co skutkuje tworzeniem osteoidów, a tym samym prowadzi do chemicznego oraz biologicznego oddziaływania między implantem a kością [167,168]. Wpływ nanostrukturalnych powłok HA na zdolność osteogenną porowatych materiałów Ti w swoich badaniach przedstawili Lu i in. [169]. Badacze skupili się na ocenie właściwości osteoindukcyjnych oraz zdolności do osteointegracji technicznego Ti pokrytego elektrochemicznie HA o różnej morfologii: nanopłytek, nanopręcików oraz nanoigieł. Badania wykazały, że powłoki o morfologii nanopłytek wspomagają rozprzestrzenianie się komórek BMSCs o wielokątnym kształcie oraz wydłużonych lamellipodiach na ich powierzchni. Co więcej wykazano również, że w porównaniu do materiału Ti po obróbce kwasowo-zasadowej,

materiał powlekany wykazywał zdolność do osteoindukcji, promował wrastanie kości oraz wpływał na wyższy procent powierzchni nowo utworzonej kości na styku kość-implant jak i w wewnętrznych porach implantów.

Próby wytworzenia biomimetycznego wszczepu kostnego o porowatej strukturze analogicznej do kości beleczkowej i bioaktywnej nanostrukturalnej powierzchni o potencjale osteoindukcyjnym zostały podjęte przez Wang i in. [170]. Autorzy wytworzyli porowaty materiał BCP oraz dokonali modyfikacji jego powierzchni poprzez równomierne osadzenie warstwy nHA. Badacze w swojej pracy ocenili wpływ takich rusztowań na różnicowanie osteogenne mysich BMSC oraz osteoinduktywność w warunkach *in vivo*. W porównaniu z substratem BCP, rusztowania BCP pokryte nHA sprzyjały adhezji komórek i promowały różnicowanie osteogenne BMSC, o czym świadczyły zwiększona ekspresja genów osteogennych i zwiększona produkcja osteokalcyny. Co więcej, rusztowanie BCP pokryte nHA nie tylko zachowywało integralność, ale także indukowało ektopowe tworzenie kości po wszczepieniu do mięśnia grzbietowego królika *in vivo* przez 90 dni, podczas gdy substrat BCP uległ wyraźnej biodegradacji, która doprowadziła do ciężkiego stanu zapalnego oraz braku oznak osteogenezy.

Należy jednak wspomnieć, że pomimo wielu zalet powłok HA, ich stosowanie związane jest również z kilkoma ograniczeniami, które przede wszystkim odnoszą się do wytrzymałości mechanicznej powłok na obciążenia fizjologiczne przy jednoczesnym zachowaniu integralności struktury. Należy również zwrócić uwagę na krystaliczność osadzonej powłoki, gdyż wraz z obniżeniem krystaliczności HA wzrasta jej rozpuszczalność [70,160,171,172].

2.1.2. Powłoki polimerowe

Powłoki polimerowe wykazują wyjątkowy potencjał aplikacyjny w różnych zastosowaniach biomedycznych ze względu na możliwość ich modyfikacji w szerokim zakresie, nadając powierzchni materiału dodatkową funkcjonalność. Celem takich modyfikacji jest przede wszystkim spełnienie określonych wymagań stawianych materiałom, poprzez

-40-

dostosowanie ich działania do określonych zastosowań biomedycznych. Modyfikacje powłok polimerowych pozwalają na wspomaganie proliferacji komórek, wzrostu tkanek, a także umożliwiają dostarczanie różnego rodzaju biomolekuł takich jak czynniki wzrostu, związki o działaniu przeciwdrobnoustrojowym oraz leki [173]. Ze względu na tak znaczne możliwości funkcjonalizowania biopowłok, mogą one odgrywać kluczową rolę w opracowywaniu biomateriałów nowej generacji. Powłoki polimerowe mogą być wytwarzane z zastosowaniem różnych metod, takich jak np. nanoszenie warstwa po warstwie (LBL, *ang*. Layer by layer), metodą Langmuir-Blodgett, powlekanie plazmowe, czy też zanurzeniowe oraz obrotowe, jak i poprzez wytwarzanie szczotek polimerowych czy powłok hydrożelowych [173-175].

Powlekanie implantów metolowych pozwala na dostosowanie zwilżalności powierzchni, nadanie jej dodatkowej bioaktywności oraz zapobieganie procesowi korozji. Powłoki pseudopeptydowe zwiększające bioaktywność, odporność na korozję oraz nadające właściwości przeciwporostowe stali 316L wytworzyli Liu i in. [176]. Zastosowali oni poli(2metylo-2-oksazolinę) (PMOXA) do wytworzenia powłoki z polimeru bionicznego przez osadzanie elektrochemiczne na powierzchni stentu naczyniowego wykonanego ze stali 316L. Wyniki wykazały, że wytworzone powłoki posiadały doskonałe właściwości przeciwporostowe oraz cechowała je biokompatybilność. Badania udowodniły, że powłoki te wspomagały proliferację oraz migrację ludzkich komórek śródbłonka żyły pępowinowej (HUVEC).

Gehlen i in. [177] w swojej pracy zaproponowali szybką jednoetapową metodę wytwarzania "kleju komórkowego" na powierzchni polidimetylosiloksanu (PDMS). W tej metodzie wykorzystano oddziaływania hydrofobowe do przyłączenia peptydów kotwiczących z sekwencją peptydową adhezyjną do komórki (glicyno-arginina-glicyno-asparaginian-seryna; GRGDS) do powierzchni PDMS przez zanurzenie podłoży w roztworze peptydu kotwiczącego (rysunek 7). Zbadano wydajność wiązania, przyczepność komórek fibroblastów i komórek śródbłonka stwierdzając, że zaproponowana metoda może być wykorzystywana do szybkiej funkcjonalizacji również powierzchni o złożonej geometrii.

-41-



Rysunek 7. Metoda wytwarzania powłok na PDMS z zastosowaniem peptydu kotwiczącego [177].

Inne interesujące badania zwiększające funkcjonalność PDMS przedstawili Xue i in. wytwarzając powłokę złożoną z kwasu hialuronowego i polidopaminy, która wykazywała hemokompatybilność, redukując adhezję płytek krwi [178].

Sposób modyfikacji powierzchni polipropylenu (PP), materiału szeroko stosowanego w medycynie, za pomocą powłok hydrożelowych wykazujących aktywność biologiczną oraz hydrofilowość złożonych z poliwinylopirolidonu (PVP) oraz diakrylanu poli(glikolu etylenowego) (PEGDA) zaprezentowali Jang i in. [179]. Wytworzone przez naukowców powłoki hybrydowe, w porównaniu do powłok PVP, wykazywały siedmiokrotnie wyższe naprężenie rozciągające w punkcie zerwania i 54-krotnie wyższą siłę adhezji.

Materiał powłoki	Metoda	Podłoże	Cechy
poli(2-metylo-2-oksazolina)	osadzanie elektrochemiczne	stal 316L	bioaktywność, właściwości przeciwporostowe, zapobiega zakrzepicy
poli(tetrafluoroetylen)	plazmowe utlenianie elektrolityczne	stop Mg-Mn-Ce	odporność na korozję, bioaktywność
poli(metakrylan metylu)	polimeryzacja rodnikowa	Ti	bioaktywna proteza hybrydowa
poli(metakrylan metylu)/ poli(chlorek diallilodimetyloamoniowy)	powlekanie obrotowe	polistyren	powłoka antybakteryjna
PVP/PEGDA	sieciowanie termiczne	polipropylen	hydrofilowość, bioaktywność
polilaktyd	powlekanie zanurzeniowe	PDMS	dostarczanie leku
PCL	PEO oraz powlekanie zanurzeniowe	śruba ze stopu Mg	zdolność kościotwórcza i osteogeneza
polidiacetylen	obróbka plazmą tlenową	chirurgiczna siatka przepuklinowa (PP)	nośnik leku o przedłużonym uwalnianiu
polidiacetylen/kwas hialuronowy	metoda nanoszenia kropli	PDMS	implant hemokompatybilny

Kim i in. [180] w swoich badaniach zaproponowali metodę wytwarzania jednorodnych powłok PCL na śrubach wykonanych ze stopu Mg. W celu zwiększenia adhezji pomiędzy stopem a powłoką, przeprowadzono plazmowe utlenianie elektrolityczne (PEO) substratu, a następnie powlekano go metodą zanurzeniową. Otrzymane w ten sposób powlekane śruby wszczepiono w kość udową szczura stwierdzając tworzenie wokół wszczepu grubej i gęstej tkanki kostnej.

Poza polimerami wymienionymi powyżej, również inne biopolimery, takie jak polikwas mlekowy (PLA), polietylen (PE) i niektóre polimery pochodzenia naturalnego np. kolagen i chitozan również stosowane są do wytwarzania powłok na materiałach dedykowanych medycynie. Zestawienie przykładowych metod wytwarzania powłok polimerowych do zastosowań biomedycznych na różnego rodzaju substratach przedstawiono w tabeli 7.

3. Nanocząstki srebra w medycynie

Czynnikami bakteriobójczymi stosowanymi w leczeniu różnego rodzaju infekcji bakteryjnych są antybiotyki. I choć cieszą się one niesłabnącą popularnością to aktualnie coraz częściej podnoszony jest temat wzrostu oporności patogenów bakteryjnych na ich działanie, tzw. antybiotykooporność. Za kluczowe czynniki odpowiadające za wzrost lekooporności bakterii, w tym również wzrost udziału drobnoustrojów opornych wielolekowo, uznaje się przede wszystkim nadmierne i nieprawidłowe stosowanie antybiotyków zarówno w medycynie, jak i weterynarii oraz produkcji roślinnej [181]. Według danych podawanych przez Najwyższą Izbę Kontroli w roku 2017 liczba osób zakażonych bakteriami lekoopornymi wzrosła o 23.5% względem roku poprzedzającego. Z kolei zgodnie z raportem Europejskiego Centrum Zapobiegania i Kontroli Chorób w 2020 roku najczęściej zgłaszanymi przypadkami zakażeń lekoopornymi patogenami bakteryjnymi były te wywołane przez *E. coli* (39.4% wszystkich zgłoszonych przypadków), następnie *S. aureus* (22.1%), *K. pneumoniae* (11.9%), *E. faecalis* (8.8%) i *P. aeruginosa* (6,1%) [182].

Antybiotykooporność staje się problemem globalnym, wpływającym negatywnie nie tylko zdrowie publiczne, ale również gospodarkę [183]. Zjawisko to niesie za sobą wzrost kosztów leczenia pacjentów w związku z utrudnioną diagnostyką oraz koniecznością ich dłuższej hospitalizacji. Szacuje się, że roczne koszty opieki zdrowotnej wynikające z tych zjawisk w Unii Europejskiej wynoszą około 1.5 mld euro [184]. Uwzględniając powyższe argumenty zasadne staje się poszukiwanie alternatywnych lub wspomagających antybiotykoterapię sposobów zwalczania patogenów bakteryjnych. Jednym z możliwych rozwiązań jest stosowanie nanomateriałów o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, takich jak np. nanocząstki srebra (AgNPs) [185-188].

Materiały nanometryczne budzą szerokie zainteresowanie nie tylko ze względu na potencjalne zastosowanie w dziedzinie medycyny, ale również energetyki, uzdatnianiu wody, czy też katalizie [189-191]. Nanomateriały otrzymywane są z zastosowaniem szerokiej gamy metod, jednak niektóre wymagają użycia toksycznych substancji. Dlatego też istnieje fundamentalna potrzeba opracowania przyjaznych dla środowiska, nietoksycznych i bezpiecznych metod przygotowania nanomateriałów z wykorzystaniem zrównoważonych technologii. Z tego powodu szerokim zainteresowaniem cieszą się metody otrzymywania materiałów nanostrukturalnych oparte na surowcach roślinnych, czy też bakteriach, grzybach oraz algach [192-195]. Wśród wspomnianych metod na szczególną uwagę zasługuje zastosowanie metabolitów roślinnych do wytwarzania nanocząsteczek. Takie podejście zapewnia łatwą, jednoetapową, niedrogą i przyjazną dla środowiska metodę uzyskiwania struktur nanometrycznych, eliminującą stosowanie niebezpiecznych rozpuszczalników i czasochłonną hodowlę grzybów, czy też glonów [196]. Dodatkowo, niektóre związki pochodzenia roślinnego, takie jak enzymy, flawonoidy oraz terpenoidy, cechuje zdolność zarówno do redukcji jonów metali, jak również do stabilizowania otrzymanych nanocząstek, co pozwala na obniżenie kosztów ich wytwarzania ze względu na brak konieczności stosowania dodatkowych czynników stabilizujących [197]. Metody bazujące na wykorzystaniu produktów roślinnych są najczęściej stosowane do otrzymywania nanocząstek złota oraz

-45-

srebra [196]. W tym celu wykorzystuje się zarówno naziemne części roślin, takie jak łodygi, liście, owoce oraz kwiaty, jak i korzenie oraz nasiona (tabela 8.) [198].

	Roślina	Kształt AgNPs	Rozmiar AgNPs [nm]	Aktywność względem wskazanego typu komórek	Źródło lit.
	Figa czerwonolistna		81.37	E. coli, S. typhi, B. cereus	[199]
	Herbata chińska		30	S. aureus, K. pneumonia	[200]
liście	Meksykański wiciokrzew	Kuliste	86 - 100	B. cereus, K. pneumoniae, E. aerogenes, M. phaseolina, A. alternate	[201]
	Brezylka nadobna		9	B. cereus, B. subtilis, S. aureus, C. rubrum, E. coli, P. aeruginosa, S. typhimurium, K. pneumoniae, C. albicans, C. glabrata	[202]
	Kasztanowiec zwyczajny		50 ± 5	S. aureus, S. epidermidis, L. monocytogenes, C. renale, M. luteus, B. subtilis, B. cereus, E. faecalis, P. aeruginosa	[203]
	Liście ryżu		16.5	R. solani	[204]
	Zielona herbata		15 - 33	S. aureus, Klebsiella sp.	[205]
-	Gmelina		34 - 40	E. coli, P. aeruginosa, S. aureus	[206]
	Ciecierzyca pospolita		6 -10	B. subtilis, S. aureus	[207]
	Czosnek dęty	struktura pręta	50 - 57	S. aureus, E. faecalis, E. coli and, S. typhi	[208]

Tabela 8. Zastosowanie surowców roślinnych do otrzymywania AgNPs o działaniuprzeciwdrobnoustrojowym.

	Parocjowiec Jacquemonta	kryształy o płaskim kształcie	56 - 87	linie komórek rakowych (HCCLM3, HEPG2, MDA-MB 231, MCF-7)	[209]
	Pistacja właściwa	nieregularny kształt	~20	b.d.	[210]
	Daktylowiec leśny		40 - 50	P. acnes, S. epidermidis	[211]
а	Senna tora		55 - 65	S.aureus	[212]
nasion	Czarnuszka siewna		10 -12	b.d.	[213]
	Szałwia hiszpańska	kuliste	7	E. coli, S. aureus	[214]
	Awokado właściwe		10 - 55	E. coli	[215]
	Ketmia konopiowata		7 - 11	Linie komórkowe ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuc (A549)	[216]
	Palma areka		17.5 ± 0.5	E. coli, K. oxytoca, S. aureus	[217]
ty	Katarantus różowy		30	E. coli, S. aureus	[218]
wia	Peregrina		50.07	E. coli, B. subtilis	[219]
k	Piżmian jadalny		5.5 - 31.9	B. subtilis	[220]
	Malina himalajska		13.85 - 34.30	E. faecalis, E. coli, S. aureus, K. pneumoniae	[221]
korzenie	Różeniec, witania ospała	kuliste	37 - 42	komórki nowotworu wątrobowo-komórkowego HepG2	[222]
	Gółka		28 ± 2	S. aureus	[223]
	Rabarbar dłoniasty		121 ± 2	S. aureus, P. aeruginosa	[224]
	Poziomkówka indyjska		20.5	S. typhi, E. coli, M. canis, A. alternata	[225]

Srebro jest dobrze znanym środkiem przeciwdrobnoustrojowym, stosowanym klinicznie na długo przed odkryciem penicyliny. Również obecnie istnieje wiele produktów przeciwbakteryjnych dostępnych na rynku, w tym opatrunków na rany, kremów oraz toników, zawierających w swoim składzie srebro [226]. AgNPs wykazują aktywność zarówno względem bakterii Gram-ujemnych, takich jak pałeczka okrężnicy (*E. coli*), pałeczka zapalenia płuc (*K. Pneumoniae*), jak i Gram-dodatnich np. laseczka woskowa (*B. cereus*), gronkowiec złocisty (*S. aureus*) i wielu innych. Najdokładniej udokumentowane możliwe mechanizmy działania przeciwdrobnoustrojowego AgNPs względem różnych szczepów bakteryjnych przedstawia tabela 9.

Bakteria	Mechanizm działania	Literatura	
E coli	Wzrost przepuszczalności błony komórkowej,	[227 221]	
E. COII	zakłócanie działania łańcucha oddechowego	[227-231]	
E. faecalis	<i>E. faecalis</i> Zmiany w ścianie komórkowej i cytoplazmie		
K. pneumoniae	Wzrost przepuszczalności błony komórkowej	[228,234,235]	
D garuginoga	Wzrost przepuszczalności błony komórkowej,	[236-238]	
F. ueruginosu	zakłócanie działania łańcucha oddechowego		
S aurano	Nieodwracalne uszkodzenie komórek	[239-241]	
<i>5. uureus</i>	bakteryjnych		
	Zahamowanie replikacji bakteryjnego DNA,		
S midarmidic	uszkodzenie błon cytoplazmatycznych bakterii,	[2/2 2/2]	
5. epidermidis	modyfikacja wewnątrzkomórkowych	[242,243]	
	poziomów ATP		
P. mirabilis	<i>P. mirabilis</i> Zmiany w ścianie komórkowej i cytoplazmie		
	Zahamowanie replikacji bakteryjnego DNA,		
S tambi	uszkodzenie błon cytoplazmatycznych bakterii,	[245 246]	
5. турт	" modyfikacja wewnątrzkomórkowych		
	poziomów ATP		

Tabela 9. Mechanizmy działania AgNPs na patogeny bakteryjne.

AgNPs wykazują wielopoziomowe działanie względem patogenów bakteryjnych wpływając na ich strukturę komórkową oraz procesy metaboliczne, w tym dezaktywację

enzymów bakteryjnych, rozrywanie ściany komórkowej i zwiększanie przepuszczalności komórek. AgNPs mogą również oddziaływać z DNA lub generować reaktywne formy tlenu, które uszkadzają biomakromolekuły (rysunek 8) [188].

Na aktywność przeciwdrobnoustrojową AgNPs wpływa nie tylko zastosowana dawka, ale również kształt oraz rozmiar nanocząstek [247]. Właściwości przeciwbakteryjne AgNPs o różnej wielkości oraz kształcie metodą dyfuzyjno-krążkową (metodą Kirby-Bauera) względem bakterii *E. coli* oraz *P. augeriosa* zbadali Raza i in. [248]. Autorzy porównali aktywność antybakteryjną zawiesin sferycznych NPs o średnicy od 15 do 90 nm z AgNPs o kształcie trójkątnym. Zauważono, że kuliste AgNPs o najmniejszych średnicach wykazywały silniejsze działanie przeciwbakteryjne przeciwko obu szczepom bakterii w porównaniu do AgNPs o większych średnicach. Niemniej jednak, badania przeprowadzone przez Dong i in. oraz Morones i in. wskazywały na silniejsze właściwości bakteriobójcze NPs trójkątnych w porównaniu do NPs sferycznych [245,249].



Rysunek 8. Różne mechanizmy oddziaływania AgNPs na komórki bakteryjne [230].

Wykazano również, że te działania AgNPs wzmacniają, addytywnie lub synergistycznie, działanie przeciwbakteryjne antybiotyków względem wielu gatunków bakterii, w tym szczepom opornym na antybiotyki, jak również wykazują synergistyczne działanie przeciwgrzybicze ze środkami przeciwgrzybiczymi. Taka synergia może znacznie zmniejszyć zapotrzebowanie na wysokie dawki antybiotyków, a tym samym zminimalizować skutki uboczne ich działania [250-254].

3.1. Nanocząstki srebra jako komponenty biomateriałów

Ze względu na aktywność przeciwdrobnoustrojową, podejmowane są próby stosowania AgNPs jako aktywnych komponentów różnego rodzaju biomateriałów, również powłokowych, w celu zapobiegania potencjalnym infekcjom związanym z zabiegiem implantacji. Wprowadzenie AgNPs do tego typu układów pozwala na ich kontrolowane uwalnianie zapewniając jednocześnie działanie przeciwbakteryjne [255,256].

Zakażenie bakteryjne różnych powierzchni wyrobów medycznych oraz opatrunków stanowi poważny problemem stwarzający zagrożenie zarówno dla poprawności działania wyrobu jak i zdrowia pacjenta. Szczególnie niebezpieczna jest adhezja bakterii do powierzchni i tworzenie przez nie biofilmu - skomplikowanej struktury biologicznej składającej się z wielu gatunków bakterii, a nawet grzybów osadzonych w polimerach zewnątrzkomórkowych (EPS, ang. extracellular polymeric substances). Formowanie biofilmu jest bardzo niebezpieczne dla pacjenta, gdyż w jego strukturach bakterie wykazują zwiększoną oporność na konwencjonalne terapie antybiotykowe poprzez szereg mechanizmów pośrednich i bezpośrednich, które obejmują oporność zarówno na wrodzoną jak i adaptacyjną odpowiedź immunologiczną gospodarza, sekwestrację antybiotyków w peryplazmie bakteryjnej, zmniejszoną bakteryjną aktywnością metaboliczną oraz rozwój lekoopornych komórek przetrwałych [257]. Dlatego wysoce pożądane jest projektowanie powierzchni antybakteryjnych, zmniejszających adhezję bakterii i/lub działających antybakteryjnie w celu zapobiegania tworzeniu się biofilmu. Niemniej jednak ważne jest, aby uwalnianie AgNPs z takich powierzchni następowało w sposób kontrolowany, zapewniając długotrwałe działanie antybakteryjne jednocześnie nie wywołując cytotoksyczności materiału względem tkanek. Z tego powodu coraz większą uwagę poświęca się powłokom polimerowym modyfikowanym AgNPs tworząc powłokowe materiały nanokompozytowe. Takie rozwiązanie pozwala nie tylko na kontrolowane uwalnianie AgNPs, ale również zapobiega ich agregacji. Co więcej, materiały polimerowe mogą również istotnie wpływać na adhezję komórek bakteryjnych [258,259]. Połączenie polimerów bakteriobójczych i nanosrebra wzmacnia działanie bakteriobójcze materiału, chociaż aktywność bakteriobójcza polimerów jest na ogół znacznie niższa niż nanosrebra [260,261]. Również dlatego, połączenie nanosrebra z matrycą polimerową może stanowić rozwiązanie pozwalające na wytworzenie wielofunkcyjnych powłok obiecujace kompozytowych do zastosowań biomedycznych. Z jednej strony polimery mogą stabilizować i dyspergować nanosrebro. Z drugiej strony, dzięki silniejszym niż polimery właściwościom

-51-

bakteriobójczym, nanosrebro może odgrywać główną rolę w krótkotrwałym działaniu antybakteryjnym powłok kompozytowych, a po jego wyczerpaniu dominujące działanie mogą mieć polimery bakteriobójcze.

W ciągu ostatnich lat zostały wyróżnione trzy klasy materiałów i powłok o działaniu antybakteryjnym (rysunek 9). Pierwszą z nich są materiały i powłoki oparte na polimerach hydrofilowych limitujących adhezję bakterii, jak np. poliglikol etylenowy (PEG) oksazoliny, czy chlorowane polimery plazmowe (rysunek 9a). Choć wymienione materiały mogą zapobiegać kolonizacji bakterii na ich powierzchni, to nie wykazują działania bakteriobójczego. Druga to materiały, które w kontakcie z bakteriami są zdolne do ich zabijania, jak np. czwartorzędowe związki amoniowe (QAC) szczepione powierzchniowo (rysunek 9b). Aby minimalizować ryzyko infekcji, opracowano trzecią klasę materiałów, czyli takie, które uwalniają środki przeciwbakteryjne, np. antybiotyki oraz AgNPs (rysunek 9c) [262].



Rysunek 9. Klasy powłok antybakteryjnych: (a) zapobiegające adhezji bakterii; b) działające bakteriobójczo w kontakcie z patogenem; (c) uwalniające środki przeciwbakteryjne [262].

3.2. Powłoki polimerowe zawierające nanocząstki srebra oraz powłoki antyadhezyjne

Materiały polimerowe są dobrymi kandydatami do tworzenia powłok kompozytowych z nanosrebrem ze względu na możliwość projektowania ich struktury, elastyczność i różne dostępne metody immobilizacji związków aktywnych w takich strukturach. Polimerowe składniki w powłokach antybakteryjnych pełnią różne funkcje chemiczne i fizyczne [259]. Po pierwsze, mogą działać jako stabilizatory w otrzymywaniu nanosrebra i zapobiegać agregacji AgNPs w roztworach. Pełnią one również funkcję nośników dla nanosrebra, które jest dodawane bezpośrednio lub syntetyzowane *in situ* w antybakteryjnych powłokach kompozytowych. Polimery zawierające przeciwdrobnoustrojowe grupy funkcyjne są stosowane w celu zwiększenia skuteczności niektórych istniejących środków przeciwdrobnoustrojowych, zminimalizowania problemów środowiskowych związanych z konwencjonalnymi środkami przeciwdrobnoustrojowymi i przedłużenia żywotności tych środków [263].

Inną funkcją biologiczną jaką polimery mogą zapewnić w antybakteryjnych powłokach, jest przeciwdziałanie adhezji bakterii, która jest pierwszym etapem tworzenia biofilmu. Wykazano, że połączenie AgNPs i polimerów antyadhezyjnych iest iedna z najskuteczniejszych strategii wytwarzania powłoki powierzchniowej o silnym działaniu przeciwbakteryjnym. Najszerzej omawianym polimerem antyadhezyjnym stosowanym w powłokach kompozytowych typu polimer/AgNPs jest PEG [264]. PEG jest najszerzej stosowanym polimerem do zastosowań przeciwporostowych, dlatego często określany jest jako "złoty standard" w tej dziedzinie [265]. Mechanizm odpychania komórek bakteryjnych przez PEG został zaproponowany przez Jeon i in. Badacze takie właściwości polimeru przypisali siłom elektrostatycznym działającym odpychająco na białka bakteryjne [266]. Z kolei według Benčina i in. dokładny mechanizm odpychania przeciwbakteryjnego PEG wciąż nie jest w pełni wyjaśniony [245]. Badania wskazują na różne parametry, które mogą odgrywać zasadniczą rolę w przeciwdziałaniu adhezji białek, w tym gęstość szczepienia PEG, długości łańcucha polimeru i zwilżalność powierzchni [267]. Ali-Ani i in. wykazali zmniejszenie adhezji poprzez dostosowanie gęstości szczepienia łańcuchów PEG. W tym badaniu podłoża krzemowe szczepione (3-aminopropylo)trietoksysilanem (APTES) zastosowano do kowalencyjnego przyłączenia łańcuchów PEG o różnych gęstościach. Te zmodyfikowane PEG powierzchnie wykazywały mniejszą przyczepność bakterii niż powierzchnie Si i APTES, wnioskując, że redukcję przypisuje się hydrofilowości kowalencyjnie

-53-

szczepionego PEG [245]. Z kolei Shi i in. przedstawili badania dotyczące materiałów przeznaczonych na opatrunki odporne na infekcje opartych na elektroprzędzonych nanowłóknach z termoplastycznego poliuretanu (TPU) z nanorurkami węglowymi (CNT) szczepionymi PEG. Chociaż CNT wykazują dobre właściwości bakteriobójcze, mogą być toksyczne dla komórek ludzkich. Przeprowadzone badania wykazały, że PEG może nie tylko skutecznie zmniejszać toksyczność CNT wobec komórek ludzkich, ale także redukować adhezje bakterii. Nanowłókna TPU-g-PEG/CNT wykazywały doskonała hemokompatybilność, w tym redukcję adhezji czerwonych krwinek i niższe wskaźniki hemolizy. Co ważne, tak przygotowane nanowłókna miały lepsze właściwości przeciwbakteryjne ze względu na bakteryjną oporność PEG i bakteriobójcze działanie CNT [268]. Z kolei Ho i in. opracowali powłokę polimerową zawierającą AgNPs. Nanocząstki zostały wytworzone in situ i osadzone w matrycy polimerowej dodatkowo modyfikowanej powierzchniowo PEG, która miała za zadanie działać antyadhezyjnie, uwalniać nanosrebro oraz działać przeciwdrobnoustrojowo w kontakcie z patogenem [264]. Przeprowadzone badana pokazały, że otrzymana powłoka jednocześnie wykazuje działanie bakteriobójcze poprzez uwalnianie jonów Ag⁺ z matrycy, a także hamuje kolonizację powierzchni materiału przez bakterie, co przypisano oddziaływaniu z najbardziej zewnętrznymi łańcuchami PEG. W literaturze opisywane są również powłoki zawierające nanocząstki Ag oparte na innych polimerach (tabela 10).

W literaturze opisywane są również powłoki antyadhezyjne oparte na polimerach takich jak białka, na przykład albuminy [269-271]. Ludzka albumina (HSA, ang. *human serum albumin*) to główne białko surowicy krwi, stanowiące ponad 50% wszystkich białek obecnych w krwiobiegu i składające się z 585 aminokwasów, w tym z tryptofanu, metioniny, cystyny, kwasów asparaginowego oraz glutaminowego, lizyny i argininy [272]. Albumina służy jako białko transportowe dla różnych związków endo- oraz egzogennych, takich jak kwasy tłuszczowe, aminokwasy, hormony, farmaceutyki, oraz jony metali. Ponadto HSA jest również biomarkerem wielu chorób takich jak reumatoidalne zapalenie stawów, niedokrwienie, ostra choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (GVHD, ang. *graft versus host disease*) oraz chorób

-54-

wymagających monitorowania kontroli glikemii [273]. Model struktury BSA pokazujący domeny oraz miejsca wiązania przedstawiono na rysunku 10.

Materiał powłoki	Podłoże	Bakteria	Źródło
Tetraetoksysilan (TEOS),	szkło	Lactobacillus	[274]
	skóra tilapii	plunturum	
Polipirol, polidopamina	nilowej	S. aureus	[275]
Polidopamina, chitozan	cewnik moczowy,	S. aureus	[276]
	tytan		
Polidopamina	PLLA	S. aureus	[277]
Polidopamina	tytan	S. aureus	[278]
poli(metakrylan metylu) (PMMA)	szkło	E. coli	[279]
Chitozan,		S. aureus.	
3-glicydoksypropylotrimetoksysilan	Ti-6Al-4V	E coli	[280]
(GPTMS), tetraetoksysilan (TEOS)		L. con	
Chitozan/Eudragit E 100	tytan	b. d.	[281]
jonowy silseskwioksany	szkło	S. aureus	[282]
Fibroina	tytan	S. aureus	[283]
Chitozan	tytan	S. aureus	[284]
Polidopamina	tytan	S. mutans, P. gingivalis	[285]

Tabela 10. Zestawienie typów powłok typu polimer/AgNPs.

Działanie BSA opiera się na zwiększaniu ujemnej energii powierzchniowej i zwiększaniu hydrofilności powierzchni biomateriału, dzięki czemu albumina działa jak białko antyadhezyjne i zapobiega tworzeniu się biofilmu. Z punktu widzenia medycyny, implanty pokryte powłokami antyadhezyjnymi mogą zatem wspomagać zapobieganie infekcjom pooperacyjnym. Badania przeprowadzone z zastosowaniem białek osocza oraz białek tkanki łącznej jako powłok na PMMA wykazały, że białka takie jak fibrynogen, laminina i fibronektyna sprzyjają przyleganiu bakterii do PMMA, podczas gdy albumina prawie całkowicie redukuje przyczepność *Staphylococcus aureus* i innych koagulazo-ujemnych szczepów *Staphylococcus* [286]. Zmniejszona adhezja komórek bakteryjnych została również udowodniona w przypadku powlekanych ludzką albuminą polietylenowych cewników wewnątrznaczyniowych [287]. Liczne prace naukowe potwierdzają również zmniejszoną adhezję innych szczepów bakteryjnych takich jak *Staphylococcus epidermidis* oraz *Pseudomonas aeruginosa* do implantów tytanowych pokrytych albuminą.



Rysunek 10. Model struktury BSA [288].

3.3. Kompozyty i powłoki polimerowo-ceramiczne modyfikowane AgNPs

W pracach naukowych opisywane są również różnego rodzaju materiały kompozytowe polimerowo-ceramiczne dedykowane potencjalnym zastosowaniom w medycynie regeneracyjnej kości zawierające dodatkowo AgNPs. Celem prac nad takimi wielokomponentowymi układami jest wytworzenie produktu wspierającego regenerację tkanki kostnej przy jednoczesnym zapobieganiu potencjalnym infekcjom. Correia i in. opisali

otrzymywania trójwymiarowych skafoldów sposób o działaniu antybakteryjnym dedykowanym do zastosowań w regeneracji tkanki kostnej [289]. Rusztowania składające się z TCP, alginianu sodu (SA) oraz AgNPs zostały wytworzone z zastosowaniem techniki druku 3D (rysunek 11). Badacze w swojej pracy potwierdzili aktywność przeciwdrobnoustrojową względem szczepu S. aureus wytworzonych w ten sposób rusztowań oraz zdolność do adhezji, migracji w głąb materiału, oraz proliferacji komórek osteoblastów. Również Zhang i in. otrzymali trójwymiarowe skafoldy oparte na TCP za pomocą technik drukowania 3D. Kompozyty te zawierały, poza fazą ceramiczną, tlenek grafenu oraz AgNPs. Modyfikacja skafoldu nastąpiła poprzez immersję w roztworze nanocząstek. Otrzymane w ten sposób materiały cechowały się nie tylko aktywnością względem bakterii E. coli, ale również wyraźnie przyspieszały różnicowanie osteogenne BMSC. Jednak należy pamiętać, że w przypadku materiałów modyfikowanych poprzez immersję może dochodzić do zbyt szybkiego uwalniania czynników aktywnych, co może powodować cytotoksyczność. Dlatego ważne jest, aby otrzymywane materiały umożliwiały kontrolowanie kinetyki uwalniania AgNPs [230,290].



Rysunek 11. Schemat produkcji skafoldów za pomocą drukarki 3D (a). Zdjęcia makroskopowe wyprodukowanych rusztowań (b). Obrazy SEM morfologii osteoblastów w obecności rusztowań (c). Jakościowa ocena mineralizacji na rusztowaniach 3D przez ludzki osteoblast poprzez barwienie czerwienią alizaryny (d).

Hybrydowe powłoki oparte na warstwowym układzie HA, AgNPs i chitozanu na podłożu Ti modyfikowanym powierzchniowo polidopaminą opracowali Li i in. [291]. Przeprowadzone przez nich badania wykazały, że zastosowana trójwarstwowa powłoka może skutecznie spowalniać uwalnianie AgNPs z powłoki hybrydowej poprzez mechanizm dyfuzji Ficka oraz cechuje się zarówno aktywnością przeciwdrobnoustrojowa względem bakterii E. coli oraz S. aureus jak i wykazuje działanie osteogenne. Z kolei Mishra i in. opracowali powłoki zawierające inny biokompatybilny związek polimerowy - poli(alkohol winylowy) (PVA) [292]. Wytworzone powłoki składały się z nanokapsułek AgNPs-PVA osadzonych w matrycy chitozanowej zawierającej lek przeciwzapalny - naproksen. Zsyntetyzowane nanohybrydy zastosowano jako powłoki na Τi, którego powierzchnie zmodyfikowano (3-

aminopropylo)trietoksysilanem (APTES). Otrzymane w ten sposób materiały wykazywały dwojakie działanie: doskonale hamowały tworzenie biofilmu i powodowały przedłużone uwalnianie leku. Testy biokompatybilności obejmujące ocenę adhezji komórek do podłoża oraz różnicowanie komórek osteoblastów wykazały skuteczność opracowanych powłok jako materiału do zastosowań ortopedycznych. Interesujace badania dotyczące wielokomponentowych antybakteryjnych powłok kompozytowych zawierających czynniki wzrostu zaprezentowali Xie i in. [293]. W celu nadania powierzchni implantów Ti właściwości przeciwdrobnoustrojowych oraz osteoindukcyjnych badacze otrzymali powłoki HA zawierające BMP, AgNPs oraz chitozan za pomocą techniki osadzania elektrochemicznego. W procesie nanoszenia powłok chitozan spełniał rolę czynnika stabilizującego AgNPs. Następnie na powłokach HA/AgNPs/chitozan zaadsorbowano BPM z roztworu zawierającego heparynę oraz czynnik wzrostu. W rezultacie BPM zostały unieruchomione na powłokach przez oddziaływanie elektrostatyczne między chitozanem, heparyną oraz białkami. Badania kinetyki uwalniania białek z materiałów wykazały, że BPM są uwalniane z materiału stopniowo: pierwszego dnia nastąpiło uwolnienie 10% BPM, z kolei dwudziestego piątego dnia było to 56%. Z kolei wyniki testów antybakteryjnych wskazały, że powłoki cechowały się aktywnością przeciwdrobnoustrojową zarówno względem S. epidermidis, jak i E. coli.

IV.CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

4. Metody badań

4.1. Otrzymywanie ekstraktów oraz naparów roślinnych

Surowce roślinne wykorzystywane w procesie otrzymywania AgNPs jako potencjalne czynniki redukujące jony Ag i/lub stabilizujące uzyskane nanostruktury stanowiły ekstrakty oraz napary z:

- A. liści świeżego karczocha zwyczajnego (Cynara scolymus),
- B. suszonych liści czystka (Cistus incanus, Astron),
- C. ziaren ostropestu plamistego (Silybum marianum, Medfuture).

Poszczególne etapy procesu niezbędne do otrzymania ekstraktów i naparów roślinnych oraz nanocząstek Ag przedstawia rysunek 12. Przygotowanie surowców roślinnych A-C obejmowało mycie, suszenie oraz cięcie w młynku nożowym świeżego karczocha, suszu liści czystka oraz ziarna ostropestu.



Rysunek 12. Etapy procesu otrzymania ekstraktów i naparów roślinnych oraz nanocząstek Ag.

W celu uzyskania wodnych ekstraktów i naparów użyto 10 g przygotowanych surowców A-C i 150 mL wody destylowanej. Ekstrakcję prowadzono w aparacie Soxhleta przez 10 godzin. W celu przygotowania naparów roślinnych 10 g poszczególnych surowców zanurzono w 150 mL gorącej wody destylowanej (80°C ± 3°C) na 30 min. Po upływie wyznaczonego czasu roztwory ochłodzono oraz przefiltrowano. Tak przygotowane ekstrakty oraz napary roślinne przechowywano w temperaturze 4°C i po upływie 24 godzin zastosowano w procesie otrzymywania zawiesin AgNPs.

4.2. Charakterystyka roślinnych ekstraktów oraz naparów

Przygotowane wodne ekstrakty oraz napary poddano ocenie aktywności przeciwutleniającej stosując metodę redukcji rodnika DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl) oraz metodę Folin-Ciocalteu (F-C).

4.2.1. Ocena aktywności antyoksydacyjnej metodą redukcji rodnika DPPH

Ocena aktywności antyoksydacyjnej metodą redukcji rodnika DPPH opiera się na określeniu skuteczności antyoksydantów w dezaktywacji stabilnego wolnego rodnika DPPH (rysunek 13). Kiedy wolny elektron na atomie azotu tworzącym mostek azotowy zostanie sparowany przez atom wodoru, silne pasmo absorpcji rodnika DPPH przy długości fali λ =517 nm zanika proporcjonalnie do zawartości antyutleniacza. Na skutek redukcji wolnego rodnika DPPH powstaje 2,2-difenylo-1-pikrylo-hydrazyna, co skutkuje zmianą zabarwienia roztworu z ciemnofioletowej na żółtą [294,295].

W celu przeprowadzenia pomiaru, przygotowano etanolowy roztwór DPPH poprzez rozpuszczenie 19.71 mg DPPH w 100 mL etanolu (96%). Tak przygotowany roztwór został następnie rozcieńczony etanolem do uzyskania absorbancji około 0.9. Próbkę kontrolną przygotowano przez dodanie do kuwety 2 mL rozcieńczonego roztworu etanolu DPPH i 60 µl etanolu (96%), a następnie wykonano pomiar absorbancji (A₀). Badane próbki przygotowano

-61-





2,2-difenylo-1-pikrylo-hydrazyna

Rysunek 13. Mechanizm reakcji 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH) z przeciwutleniaczem (AH).

poprzez dodanie 2 mL rozcieńczonego roztworu DPPH i 60 µL naparu lub ekstraktu. Pomiaru absorbancji dokonano po 10 min przy λ =517 nm w temperaturze pokojowej za pomocą spektrofotometru UV-Vis Evolution 220 (Thermo Scientific) o rozdzielczości 1 nm w kuwetach kwarcowych o długość drogi optycznej 10 mm. Dla każdej próbki pomiar przeprowadzono trzykrotnie i obliczono wartość średnią absorbancji (Asr.). Tak otrzymane wyniki oznaczenia zdolności wygaszania wolnych rodników (RSA, ang. *radical scavenging activity*) wyrażono jako procent inhibicji i obliczono zgodnie z poniższym równaniem (1):

$$RSA = \frac{A_0 - A_{Sr}}{A_0} \ 100\% \ [\% \ inhibicji]$$
(1)

4.2.2. Całkowita zawartość polifenoli metodą Folina-Ciocalteu

Metoda Folin-Ciocalteu, jest metodą kolorymetryczną oznaczania całkowitej zawartości polifenoli (TPC, ang. *total polyphenol content*) w próbce i opiera się na pomiarze absorbancji kompleksu powstałego na skutek redukcji odczynnika F-C. Odczynnik ten stanowi mieszaninę wolframianu sodu (Na₂WO₄), molibdenianu sodu (Na₂MoO₄), siarczanu litu (Li₂SO₄), wody bromowej i kwasów: HCl oraz H₃PO₄. Przyjmuje się, że podczas reakcji dochodzić może do redukcji jonów Mo(VI) do Mo(V), co skutkuje powstaniem niebieskiej barwy, pochodzącej od kompleksu [PMoW₁₁O₄₀]⁴⁻, której intensywność wzrasta proporcjonalnie do ilości polifenoli w próbce, co umożliwia pomiar spektrofotometryczny (λ = 765 nm) [296].

Jako standard do pomiaru absorbancji zastosowano kwas galusowy, a zawartość polifenoli w próbkach wyrażono jako równoważniki kwasu galusowego (GAE, mg·g⁻¹). Jako roztwór roboczy zastosowano wodny roztwór kwasu galusowego o stężeniu 5 mg·mL⁻¹, który wykorzystano do przygotowania roztworów kalibracyjnych o stężeniu od 0.05 mg·mL⁻¹ do 0.5 mg·mL⁻¹. Próbki do pomiarów zostały przygotowane poprzez dodanie do kuwety 20 µL roztworów kalibracyjnych, 1.58 mL wody destylowanej i 100 µl odczynnika F-C. Następnie po 3 min dodano 300 µL nasyconego roztworu węglanu sodu. Wzorce termostatowano w temperaturze 40°C przez 30 min. Badane próbki przygotowano w sposób identyczny, zastępując roztwory kalibracyjne odpowiednim ekstraktem bądź naparem. Pomiary prowadzono przy λ =765 nm w trzech powtórzeniach wobec próby ślepej niezawierającej kwasu galusowego.

4.2.3. Ocena cytotoksyczności

Biorąc pod uwagę potencjalne zastosowania biomedyczne wytwarzanych naparów oraz ekstraktów, niezbędne jest dokonanie oceny ich toksyczności na poziomie *in vitro*. Ocena aktywności metabolicznej mysich fibroblastów w kontakcie z wybranymi naparami została przeprowadzona zgodnie z międzynarodowym protokołem przedstawionym w normie ISO 10993-5:2009 dedykowanym ocenie cytotoksyczności wyrobów przeznaczonych do zastosowań medycznych. Przedmiot badań stanowiły ekstrakty oraz napary roślinne w zakresie stężeń od 0.003% do 100%. Podstawę testu MTT stanowi określenie aktywności mitochondrialnej komórek poprzez pomiar absorbancji fioletowego formazanu (λ = 570 nm). Do redukcji soli tetrazolowej (MTT, bromku 3-[4,5-dimetylotiazolo-2-yl]-2,5-difenylu) dochodzi pod wpływem działania enzymów mitochondrialnych, a zatem aktywność metaboliczna komórek może być określana na podstawie ilości przetworzonej soli.

Jako komórki docelowe w testach wykorzystano mysie fibroblasty L929 (NCTC klon 929: CCL 1). Przed wykonaniem testu MTT oceniono żywotność komórek stosując metodę wykluczenia z błękitem trypanu. Zawiesinę komórkową o gęstości 2 × 10^5 komórek/mL rozprowadzono w objętości 100 µL/dołek na sterylną 96-dołkową płytkę do hodowli

-63-

komórkowej. W celu uniknięcia wpływu parowania pożywki na żywotność komórek, 100 μL pożywki rozprowadzono do studzienek i inkubowano przez 24 godziny (37°C, 5% CO₂). Następnie przygotowano serie rozcieńczeń ekstraktów oraz naparów w zakresie stężeń 100%-0.003%, po czym przeprowadzono inkubację komórek ze 100 μL roztworów testowych w pożywce do hodowli komórkowej w standardowych warunkach przez 24 godziny. Kontrolę pozytywną (PC) żywotności komórek przeprowadzono stosując zawiesinę komórek w samej pożywce wzrostowej zamiast ekstraktu/naparu roślinnego. Po 24 godzinach pożywkę zastąpiono świeżą i do każdej studzienki dodano 20 μL roztworu MTT. Po 4-godzinnym okresie inkubacji (37°C, 5% CO₂) płytki odwirowano (1400 obr./min, 10 min), supernatanty usunięto, a przechowywany wewnątrzkomórkowo formazan MTT rozpuszczono w 100 μl izopropanolu. Absorbancję mierzono przy referencyjnej długości fali 570 nm za pomocą spektrofotometru Victor2.

4.2.4. Ocena właściwości prozapalnych

W celu określenia, czy badane próbki wywołują efekt zapalny na poziomie *in vitro*, zastosowano linię komórkową THP1-XBlue[™] ludzkich monocytów w pożywce RPMI-1640. Aktywacja komórek THP1-XBlue[™] poprzez jeden z receptorów Toll-podobnych (TLR, ang. *tool-like receptor*) indukuje transkrypcję czynnika jądrowego NF-κB, a następnie uwalnianie embrionalnej fosfatazy alkalicznej SEAP. Ten pierwszy może być wykryty w hodowli komórkowej przy użyciu odczynnika Quanti-Blue[™]. Test umożliwia ilościowe określenie indukcji jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-κB w monocytach, a zatem sprawdzenie, czy testowane materiały lub substancje wywołują miejscowe stany zapalne.

Podobnie jak w przypadku komórek L929, żywotność monocytów oceniano metodą barwienia błękitem trypanu. Zawiesinę komórkową doprowadzono do gęstości 2 × 10^5 komórek/mL. Następnie do studzienek 96-dołkowej płytki hodowlanej wprowadzono po 180 μ L zawiesiny komórkowej. Do wybranych studzienek wprowadzono 20 μ L badanych próbek o odpowiednich stężeniach w zakresie od 0.003% do 100% i inkubowano w standardowych warunkach przez 24 godziny. Jako kontrolę ujemną zastosowano nietraktowaną hodowlę

komórkową, natomiast hodowla monocytów potraktowana lipopolisacharydem *E. coli* (LPS) O55:B5 w końcowym stężeniu 1 μg/mL służyła jako kontrola pozytywna (PC). Następnie poszczególne supernatanty (20 μL) przeniesiono do odpowiednich studzienek płytki zawierającej odczynnik detekcyjny Quanti-Blue (180 μL/studzienkę) i inkubowano przez 3 godziny. Pomiar absorbancji przeprowadzono przy długości fali 620 nm przy użyciu czytnika multidetekcyjnego Spectramax®.

4.3. Otrzymywanie i charakterystyka nanocząstek Ag

4.3.1. Otrzymywanie nanocząstek srebra

Jako źródła jonów srebra w procesie przygotowania nanocząstek Ag użyto roztworów AgNO₃. Jako potencjalne czynniki redukujące Ag⁺ i/lub stabilizujące AgNPs zastosowano ekstrakty i napary roślinne (rysunek 14). w celu przeprowadzenia redukcji Ag⁺ do 5 mL, 10 mL i 15 mL naparów oraz ekstraktów wkroplono odpowiednio 45 mL, 40 mL i 35 mL przygotowanych roztworów AgNO₃. Proces prowadzono w warunkach ciągłego mieszania. Wszystkie przygotowane w ten sposób zawiesiny zawierały 500 ppm Ag⁺ (Metoda 1). Redukcję Ag⁺ do AgNPs potwierdziły zmiany barwy roztworów z bezbarwnej na herbacianą. Otrzymane zawiesiny AgNPs przechowywano w temperaturze 4°C. Jednocześnie, w celu oceny wpływu dodatkowego środka stabilizującego na tworzenie oraz stabilność AgNPs, do identycznych układów wprowadzono również poliwinylopirolidon (PVP, MW 8000) (Metoda 2). Stabilizator wprowadzono do naparów oraz ekstraktów przed rozpoczęciem wkraplania. Każdy przygotowany w ten sposób układ zawierał 500 ppm Ag⁺ w 3% roztworze PVP.



Rysunek 14. Schemat zaproponowanych metod otrzymywania nanocząstek Ag.

4.3.2. Otrzymywanie i charakterystyka nanocząstek srebra

W celu potwierdzenia tworzenia AgNPs zgodnie z zaproponowanymi metodami oraz oceny stabilności przygotowanych zawiesin wykorzystano analizę spektralną UV-Vis w zakresie długości fali od 300 nm do 750 nm. Położenie maksimum pasma absorpcji jest silnie zależne od kształtu i wielkości nanocząstek Ag. Tworzenie AgNPs monitorowano rejestrując widma UV-Vis dla maksimum powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR, ang. *surface plasmon resonance*) obserwowanego jako intensywne pasmo absorpcji w zakresie długości fal od 380 nm do 450 nm. Położenie maksimum pasma ekstynkcji jest zależne zarówno od wielkości nanocząstek, jak i ich kształtu. Z kolei szerokość połówkowa pasma jest związana z rozmiarem uzyskanych AgNPs - węższe pasma oznaczają mniejszy rozmiar uzyskanych NPs.

W celu potwierdzenia redukcji jonów Ag zgodnie z zaproponowanymi metodami oraz ocenę stabilności w czasie wytworzonych nanostruktur prowadzono pomiary spektrofotometryczne w zakresie długości fal od 300 nm do 750 nm. Pomiarów dokonywano w temperaturze pokojowej za pomocą spektrofotometru Evolution 220. Dodatkowo określono stabilność otrzymanych AgNPs w roztworach symulujących środowisko organizmu ludzkiego takich jak płyn Ringera, sztuczna ślina oraz płynie symulującym płyn ustrojowy (SBF, ang. *simulated body fluid*).

4.3.3. Spektroskopia korelacji fotonów

Średni rozmiar i rozkład wielkości otrzymanych nanocząstek Ag wyznaczono metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS, ang. *dynamic light scattering*) przy użyciu aparatu Zetasizer Nano ZS Malvern Panalytical. Urządzenie wykorzystuje laser He-Ne o mocy 4-mW i długości fali 633 nm. Spektroskopia DLS opiera się na pomiarze rozproszenia wstecznego padającej wiązki, co oznacza, że wiązka nie musi przenikać przez całą próbkę, co pozwala na wyeliminowanie efektu tzw. wielokrotnego rozpraszania. Metoda DLS, znana również jako spektroskopia korelacji fotonów (PCS, ang. *photon correlation spectroscopy*) lub quasi-elastyczne rozpraszanie światła, to technika, która przede wszystkim mierzy ruchy Browna cząsteczek w roztworze zachodzące w wyniku ich bombardowania cząsteczkami rozpuszczalnika i wiąże ten ruch z rozmiarem cząstek. W związku z tym, że są one w ciągłym ruchu intensywność światła rozproszonego ulega zmianom w czasie - sygnał zmienia się wolniej dla dużych cząstek, a dla mniejszych - szybciej. Zmiany intensywności światła rozproszonego rejestrowane są przez detektor i ulegają przekształceniu przy wykorzystaniu równania Stokesa-Einsteina (równanie 2.) pozwalającego na wyznaczenie średnicy hydrodynamicznej cząstek (R_H):

$$R_{\rm H} = \frac{kT}{3\pi\eta D} \tag{2}$$

k - stała Boltzmanna [J/K],

- η lepkość rozcieńczalnika [Pa·s]
- T temperatura bezwzględna [K],
- D współczynnik dyfuzji [m²/s].

Przeprowadzony pomiar pozwala na otrzymanie rozkładu wielkości cząstek, tj. procentowego udziału cząstek określonych rozmiarach. Podstawowy wykres rozkładu dotyczy intensywności światła rozproszonego, jednak w wyniku odpowiednich przekształceń bazując na teorii Mie, można uzyskać rozkład zależny od objętości cząstek lub uwzględniający liczbę cząstek.

4.3.4. Skaningowa mikroskopia elektronowa

Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) jest powszechnie stosowanym narzędziem pozwalającym na dokonanie charakterystyki morfologii różnego rodzaju materiałów, w tym również o wymiarach nanometrycznych. Niniejsza technika oparta jest na przemiataniu powierzchni materiału silnie zogniskowaną wiązką elektronów wytwarzaną przez układ elektrooptyczny mikroskopu. Generowanie obrazu możliwe jest dzięki emisji elektronów wtórnych (SE), wstecznie rozproszonych (BSE) bądź promieniowaniu rentgenowskiemu, powstających na skutek oddziaływania między elektronami padającymi, a elektronami atomów próbki. Skaningowy mikroskop elektronowy został zastosowany w celu określenia zarówno kształtu, jak i rozmiaru otrzymanych nanostruktur. Charakterystyki morfologii otrzymanych AgNPs dokonano za pomocą mikroskopu Mikroskop SEM Zeiss Ultra Plus (Carl Zeiss, Oberkochen, Niemcy) wyposażonego w systemem do mikroanalizy dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego EDS Quantax 400 V. W celu dokonania pomiarów próbki otrzymanych zawiesin AgNPs zostały naniesione na podłoże krzemowe i odparowane w temperaturze pokojowej.

4.3.5. Dyfrakcja rentgenowska XRD

Aby określić strukturę krystalograficzną badanych nanocząstek, wykorzystano dyfraktometr XRD-Philips X'Pert wyposażony w monochromator grafitowy PW 1752/00 Cu K_{α} (λ = 0,15418 nm) z filtrem Ni (40 kV i 30 mA). Pomiar prowadzono w zakresie kątów odbicia braggowskiego 2 θ od 35° do 90° w temperaturze pokojowej. Próbki do badań przygotowano poprzez odparowanie zawiesin nanocząstek w temperaturze 25°C i umieszczenie uzyskanego suchego osadu na płytce pomiarowej. Otrzymane dyfraktogramy przyporządkowano do odpowiednich struktur krystalograficznych z zastosowaniem bazy ICDD® (ang. *International Centre for Diffraction Data*®).

4.3.6. Ocena cytotoksyczności oraz właściwości prozapalnych nanocząstek Ag

Podobnie jak ekstrakty i napary roślinne, otrzymane suspensje nanocząstek srebra poddano ocenie cytotoksyczności oraz właściwości prozapalnych stosując procedury analogiczne do przedstawionych w podrozdziałach 4.2.3. Ocena cytotoksyczności oraz 4.2.4. Ocena właściwości prozapalnych. Badaniom poddano próbki o stężeniach w zakresie 500-0.015 ppm Ag.

4.3.7. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa nanocząstek Ag

Aktywność przeciwdrobnoustrojową otrzymanych nanocząstek Ag testowano zgodnie z protokołem przedstawionym w normie ISO 20776-1 (Oznaczanie wrażliwości drobnoustrojów i ocena przydatności gotowych testów do oznaczania wrażliwości na leki przeciwbakteryjne - Część 1: Oznaczanie aktywności leków przeciwbakteryjnych wobec szybko rosnących tlenowych bakterii wywołujących choroby zakaźne referencyjną metoda in vitro mikrorozcieńczeń w podłożu płynnym). Metodę mikrorozcieńczeń w podłożu płynnym opisaną w normie zastosowano do określenia najmniejszych stężeń hamujących wzrost bakterii (MIC, ang. minimal inhibitory concentration) oraz minimalnych stężeń bakteriobójczych (MBC, ang. minimal bactericidal concentration) dla otrzymanych nanocząstek. W studzienkach, w których stężenie AgNPs było mniejsze od wartości MIC, obserwowano zmętnienie podłoża spowodowane wzrostem bakterii. Z kolei MBC określało najmniejszą wartość stężenia AgNPs uniemożliwiające tworzenie kolonii. Wartości MIC i MBC określono dla dwóch szczepów bakterii, Staphylococcus aureus (ATTC 6338) i Staphylococcus epidermidis (ATCC 12228). Przed rozpoczęciem eksperymentu szczepy bakteryjne zawieszone w bulionie Muellera-Hintona doprowadzono do stężenia 1x10⁶ CFU/mL. Przygotowano również serię rozcieńczeń zawiesin nanocząstek srebra w bulionie Muellera-Hintona, aby uzyskać stężenia robocze w zakresie 256-0.125 µg/mL. Następnie 50 µL każdego każdej z rozcieńczonych zawiesin AgNPs zdyspergowano na płytkach do mikrorozcieńczeń. Do każdego dołka płytki dodano równą objętość inokulum, uzyskując końcowe stężenie szczepów bakteryjnych 5x10⁵ CFU/mL. Przygotowaną płytkę inkubowano w temperaturze 37°C w warunkach tlenowych.

4.4. Otrzymywanie i charakterystyka hydroksyapatytu

4.4.1. Otrzymywanie fosforanu wapnia

Syntezę HAp przeprowadzono zgodnie z jednym wariantów tzw. metody mokrej, stosując jako substraty Ca(NO₃)₂·4H₂O oraz NH₄H₂PO₄ o stężeniach wynoszących odpowiednio 0.5 mol/L oraz 0.3 mol/L. Do naczynia reakcyjnego odmierzono 500 mL uprzednio przygotowanego roztworu zawierającego jony wapnia oraz 30 mL wody amoniakalnej o stężeniu 25%, w celu uzyskania zasadowego środowiska reakcji. Do przygotowanej w ten sposób mieszaniny wkraplano z prędkością 3 mL/min roztwór fosforanu. Po zakończeniu wkraplania otrzymane zawiesiny mieszano dodatkowo przez 2 godziny po czym pozostawiono na 24 godziny w celu tzw. dojrzewania osadu. Następnie otrzymany fosforan wapnia przemywano aż do uzyskania obojętnego pH popłuczyn, po czym przesączono i wysuszono.

W celu określenia wpływu modyfikatorów na strukturę otrzymanych fosforanów do układów reakcyjnych wprowadzono dodatkowo poli(winylopirolidon) oraz etanoloaminę. Ich stężenia w układach reakcyjnych wynosiły 3%, 6% oraz 9%. Reakcje prowadzono w temperaturze 40°C oraz temperaturze wrzenia. Otrzymane produkty poddano suszeniu z wykorzystaniem:

- lifilizatora Alpha 1-2 LD plus (-55°C, 48 godzin),
- suszarki laboratoryjnej (104°C, 3 godziny),
- pieca komorowego Nabertherm (600°C, 1 godzina).

4.4.2. Analiza składu fazowego fosforanów wapnia

W celu określenia składu fazowego otrzymanych materiałów, fosforany poddano analizie metodą dyfrakcji rentgenowskiej za pomocą dyfraktometru Philips X'Pert w zakresie kątów 2θ od 10° do 60°. Analizę przeprowadzono z użyciem bazy ICDD® (ang. *International Centre for Diffraction Data*). Ponadto, na podstawie dyfraktogramów oraz wyznaczonych szerokości połówkowych refleksów (FWHM, ang. *fullwidth at half maximum*), obliczono wielkość powstałych krystalitów fosforanowych. W obliczeniach zastosowano metodę Debye'a-Scherrera, opisującą zależność pomiędzy wielkością krystalitów, a poszerzeniem maksimów dyfrakcyjnych (równanie 3.):

$$B_k = \frac{K\lambda}{D_{hkl} \cdot \cos\theta} \tag{3}$$

Bk- szerokość refleksu zależna od wielkości krystalitów [rad]

K- stała związana z kształtem (najczęściej przyjmuje wartość 0.89)

- λ długość fali promieniowania [Å]
- D wielkość krystalitów w kierunku prostopadłym do (hkl) [Å]
- θ kąt Bragga [°]

Dodatkowo, na podstawie uzyskanych dyfraktogramów wyznaczono stopień krystaliczności DOC (and. *degree of crystallinity*). Do obliczenia DOC wykorzystano zależność (4):

$$DOC = \frac{A_c}{A_c + A_a} \cdot 100\% \tag{4}$$

gdzie A_c to powierzchnia pików krystalicznych na dyfraktogramie, natomiast A_a to powierzchnia odpowiadająca amorficznym obszarom dyfraktogramu [297]. Do wyznaczenia wielkości odpowiednich powierzchni zastosowano oprogramowanie Origin 2019b.

4.4.3. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera

Spektroskopia w podczerwieni jest metodą używaną do badania struktury związków chemicznych. Jest to technika opierającą się na badaniu absorbcji promieniowania podczerwonego przez związki chemiczne. Absorbcja promieniowa elektromagnetycznego przez molekuły zmienia ich energię rotacyjną i oscylacyjną. Widmo jest otrzymywane w wyniku absorpcji promieniowana podczerwonego o określonej energii w sposób selektywny przez konkretne grupy funkcyjne. A zatem położenie pasm absorpcyjnych na widmie FTIR odpowiada częstości wibracji konkretnych grup funkcyjnych w związku. Z kolei intensywność pasm jest proporcjonalna do energii pochłoniętego promieniowania. Na skutek absorbcji promieniowana może dochodzić do zmiany długości wiązań czy kątów między wiązaniami, czyli powstawania drgań rozciągających i zginających. Drgania można również podzielić uwzględniając ruch względem płaszczyzn (drgania w płaszczyźnie i poza płaszczyzną) oraz symetrię (drgania symetryczne i antysymetryczne). Tak więc analiza FTIR pozwala zarówno na identyfikację ugrupowań obecnych w badanym związku, jak również na przeprowadzenie analizy ilościowej na podstawie intensywności pasm.

Widma FTIR próbek wytworzonych fosforanów otrzymano z wykorzystaniem spektrometru ATR-FTIR Thermo Scientific Nicolet iS5 wyposażonego w przystawkę odbiciową iD7 ATR (kryształ diamentowy) metodą osłabionego całkowitego odbicia (ang. *Attenuated Total Reflectance*) w zakresie spektralnym od 4000 cm⁻¹ do 400 cm⁻¹.

4.4.4. Spektrometria emisyjna ze wzbudzeniem w plazmie indukowanej

W celu przeprowadzenia analizy ilościowej składu pierwiastkowego przygotowanych proszków zastosowano spektrometrię emisyjną ze wzbudzeniem w plazmie indukowanej (ICP-OES, ang. *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*). Na podstawie otrzymanych wyników wyznaczono stosunek molowy Ca/P w fosforanach. Analizę przeprowadzono z zastosowaniem spektrometru ICP-OES iCAP 6000 firmy Thermo Scientific wyposażonego w system optyczny Echelle z detektorem półprzewodnikowym CID86 z wstrzykiwaniem ładunku, pracującym w zakresie 166 - 847 nm oraz półprzewodnikowy generator plazmy.
4.4.5. Skaningowa mikroskopia elektronowa

W celu określenia wpływu warunków prowadzenia procesu otrzymywania proszków ceramicznych na kształt oraz wielkość uzyskanych cząstek dokonano obrazowania ich struktury za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego. Obrazowanie struktury uzyskanych fosforanów przeprowadzono stosując mikroskop SEM Zeiss Ultra Plus wyposażony w systemem do mikroanalizy dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego EDS Quantax 400 V.

4.4.6. Analiza powierzchni właściwej fosforanów wapnia metodą BET

Powierzchnia właściwa badanych proszków fosforanów oraz całkowita powierzchnia oraz rozmiar porów zostały wyznaczone metodą niskotemperaturowej adsorpcji/desorpcji azotu z wykorzystaniem analizatora ASAP 2020, Micromeritics. Przed rozpoczęciem pomiarów materiały zostały poddane odgazowaniu w temperaturze 100°C przez 4 godziny, po czym przeprowadzano proces adsorpcji azotu w temperaturze -196°C. Powierzchnię właściwą badanych proszków wyznaczono w oparciu o model izotermy adsorpcji wielowarstwowej BET (Brunauera-Emmetta-Tellera). Całkowita powierzchnia oraz rozmiar porów zostały wyznaczone w oparciu o równanie izotermy adsorpcji BJH (Barreta-Joynera- Halendy).

4.5. Otrzymywanie i charakterystyka matryc polimerowych oraz materiałów polimerowo-ceramicznych

Badania wstępne stanowiły podstawę do określenia składu powłok polimerowoceramicznych i polegały na opracowaniu układów spełniających funkcję ośrodka rozpraszającego dla wprowadzanej fazy ceramicznej. Badania miały na celu określenie szybkości sedymentacji fazy ceramicznej w proponowanych układach polimerowych oraz określenie zdolności do pęcznienia w środowisku symulowanych płynów ustrojowych. W procesie otrzymywania matryc polimerowych (Tabela 11.) wykorzystano czynnik sieciujący

w postaci diakrylanu poli(glikolu etylenowego) (PEGDA, Mn=575) fotoinicjator, który

stanowił 2-hydroksy-2-metylopropiofenon oraz poli(glikol etylenowy) (MW=6000). Do procesu sieciowania stosowano lampę z zakresu UV EMITA VP 60 (180 W).

Seria I - zmienna zawartość czynnika sieciującego PEGDA					
Próbka	Stężenie PEG [%]	Objętość PEG [mL]	Czynnik sieciujący [mL]	Fotoinicjator [µL]	
G5		- 5 mL -	0.5	20	
G6	_		0.6		
G7	20		0.7		
G8	30		0.8		
G9	_		0.9		
G10			1.0		
Seria II - zmienna zawartość polimeru (PEG)					
Próbka	Stężenie PEG [%]	Objętość PEG [mL]	PEGDA [mL]	Fotoinicjator [µL]	
GV6	15	_			
GV7	20				
GV8	25	5 mL	0.9	20	
GV9	30	_			
GV10	35				
Seria III - zmienna zawartość fotoinicjatora					
Próbka	Stężenie PEG [%]	Objętość roztworu PEG [mL]	Fotoinicjator [µL]	Czynnik sieciujący [mL]	
G9			10		
G91	_		15		
G92	30	5 mL	20	0.9	
G93	—		25		
G94			30		

Tabela 11. Skład kompozycji zastosowanych do otrzymywania materiałów polimerowych.

Proces prowadzono na szalkach Petriego. Do wytypowanych matryc wprowadzono następnie fazę ceramiczną o najkorzystniejszych właściwościach wytypowaną na postawie wyników etapu 5.3. pracy dotyczącego charakterystyki fosforanów wapnia. Metoda otrzymywania materiałów kompozytowych była analogiczna do procesu wytwarzania matryc polimerowych. Fazę ceramiczną wprowadzano do matrycy polimerowej w ilości 2.5% [m/V] w odniesieniu do objętości użytego roztworu PEG. Przed przystąpieniem do procesu fotopolimeryzacji, mieszaniny o zdefiniowanych powyżej składach poddawano homogenizacji z zastosowaniem homogenizatora Polytron PT 2500E przez 5 minut.

4.5.1. Sedymentacja

W procesie przygotowania materiału polimerowo-ceramicznego odpowiedniego do zastosowania jako materiał powłokowy zasadniczy wpływ na uzyskanie jednorodnej powłoki ma stabilność układu stanowiącego napełniacz zdyspergowany w fazie polimerowej. Zbyt szybka sedymentacja fazy stałej może uniemożliwić uzyskanie powłoki o jednorodnej strukturze. Dlatego też przeprowadzono badania szybkości opadania fazy ceramicznej w zaproponowanych układach polimerowych. Stabilność układów badano z zastosowaniem urządzenia MultiScan MS20 Data Physics Instruments. Metoda pomiaru aparatu opiera się na rejestracji przez fotodetektor transmisji promieniowania o długości fali λ = 870 nm przechodzącego przez próbkę. W pomiarze rozproszenia wstecznego źródłem światła jest dioda LED umiejscowiona pod kątem 45° względem detektora emitująca światło o takiej samej długości fali. Pomiar umożliwia przede wszystkim rejestrację szybkości opadania cząstek w zawiesinie (szybkość sedymentacji) oraz dostarcza informacji o jednorodności fazy zawieszonej. z jego pomocą można również wyznaczać stabilność temperaturową emulsji. Intensywność transmisji i odbicia wstecznego bezpośrednio zależy od liczby, wielkości i typu rozproszonych cząstek. Dlatego intensywność światła zmienia się podczas destabilizacji dyspersji, gdy na przykład cząstki znikają z drogi światła z powodu sedymentacji lub tworzą aglomeraty. Aparat pozwala śledzić te zmiany, naświetlając próbkę wielokrotnie przez określony czas, podczas którego skanowana jest cała wysokość naczynia pomiarowego zawierającego próbkę, dzięki czemu wykrywane są również lokalne zmiany.

4.5.2. Kinetyka pęcznienia

Zmienność składu i struktury materiałów może powodować znaczną różnicę w szybkości wchłaniania ciekłego medium, np. płynów ustrojowych przez materiały oparte na układach hydrożelowych. Dlatego też zdolność pęcznienia otrzymanych kompozytów badano w symulowanym płynie ustrojowym (SBF, ang. *simulated body fluid*). W celu zbadania wpływu składu materiałów na kinetykę pęcznienia wysuszone krążki materiałów kompozytowych o średnicy około 1 cm zanurzono na określony czas w roztworze SBF w temperaturze 36.6°C, po czym ważono na wadze analitycznej. Zdolność pęcznienia kompozytów inkubowanych w SBF obliczono według równania (5):

$$S_{t} = \frac{m_{1} - m_{0}}{m_{0}}$$
(5)

gdzie:

mo - początkowa masa próbki [g]

m1 - masa próbki po określonym czasie zanurzenia [g]

Kinetykę pęcznienia kompozytów badano za pomocą modelu Voigta (równanie 6.):

$$S_{t} = S_{e} \left[1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \right]$$
(6)

gdzie:

St - pęcznienie w czasie t [%]

Se - pęcznienie równowagowe (parametr mocy) [%]

t - czas [min]

τ - parametr szybkości [min] (czas potrzebny do osiągnięcia przez próbkę 0.63 całkowitej zdolności pęcznienia)

4.6. Otrzymywanie i charakterystyka powłok ceramiczno-polimerowych

W celu przygotowania powłok do roztworu PEG (30%) dodawano kolejno: nanocząstki, fazę ceramiczną oraz czynnik sieciujący PEGDA. Podczas dodawania kolejnych składników

mieszaninę poddawano homogenizacji z zastosowaniem homogenizatora Polytron PT 2500E. Jako ostatni do układu wprowadzano fotoinicjator. 200 μL przygotowanej w taki sposób mieszaniny nanoszono na płytki ze stopu tytanu Ti-6Al-4V ELI o wymiarach 2.0 cm x 2.5 cm za pomocą pipety i równomiernie rozprowadzono na całej powierzchni płytki, a następnie umieszczono je w polu promieniowania lampy UV EMITA VP 60 (180 W) na 4 minuty w celu przeprowadzenia fotosieciowania powłok. Przed naniesieniem powłok płytki zostały poddane wytrawianiu przez 5 minut w roztworze kwasu fluorowodorowego o stężeniu 1% w celu rozwinięcia powierzchni, na którą nanoszono materiał powłokowy, a następnie przemyte pięciokrotnie kolejno etanolem (96%) oraz wodą destylowaną, następnie oczyszczone przez sonikację w acetonie oraz wodzie destylowanej i finalnie osuszone w suszarce laboratoryjnej (105°C).

4.6.1 Analiza spektroskopowa w podczerwieni powłok ceramicznopolimerowych

Wytypowane materiały ceramiczno-polimerowe poddano analizie z wykorzystaniem spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni ATR-FTIR. Badania przeprowadzono w celu weryfikacji skuteczności fotosieciowania poprzez identyfikację poszczególnych pasm absorpcji w widmach analizowanych materiałów, ze szczególnym uwzględnieniem tych, pochodzących od czynnika sieciującego.

4.6.2. Pomiar chropowatości powłok

Na procesy regeneracji uszkodzonych tkanek istotny wpływ ma struktura powierzchni materiału. Odpowiedni kontakt materiału z sąsiednimi tkankami wpływa na adhezję i odżywienie komórek, co sprzyja ich kolonizacji, proliferacji i różnicowaniu się, dlatego też wytworzone powłoki scharakteryzowano pod kątem ich mikrogeometrii. Analizy dokonano za pomocą profilometru Form Talysurf Series wyposażonego w stykowy czujnik, który

-77-

podczas pomiaru porusza się wzdłuż badanej powierzchni. W trakcie pomiaru czujnik rejestruje wysokość powierzchni, co pozwala na uzyskanie informacji o jej mikrogeometrii.

Badania obejmowały pomiar 2D w celu wyznaczenia Ra (średniego odchylenia arytmetycznego profilu chropowatości powierzchni) i Rz (maksymalna wysokość profilu) na odcinku pomiarowym 4 mm (filtr Gaussa dla odległości elementarnej lr = odcięcie = 0,8 mm) oraz stereometryczne pomiary 3D powierzchni próbki pokrywające losowy obszar pomiarowy 1 × 1 mm.

4.6.3. Charakterystyka morfologii powłok

Obserwacji powierzchni wytworzonych powłok dokonano z zastosowanie skaningowego mikroskopu elektronowego. W celu przygotowania materiałów do analizy mikroskopowej próbki naniesiono na dwustronną taśmę węglową i umieszczono na podłożu miedzianym. Następnie próbki poddano napylaniu złotem, aby uzyskać na ich powierzchni warstwę przewodzącą prąd elektryczny. Obrazowanie i analizę cech morfologicznych kompozytów, a także skład chemiczny materiałów, badano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego S-4700 Hitachi (Thermo Noran) wyposażonego w detektor EDS. Mikroskopia elektronowa została również wykorzystana w celu scharakteryzowania powierzchni materiałów poddanych inkubacji w płynach symulujących środowisko organizmu ludzkiego.

4.6.4. Badania przyczepności powłok metodą odrywową

Badania przyczepności powłok do podłoża przeprowadzono za pomocą automatycznego testera przyczepności PosiTest ATA20A z elektronicznie kontrolowaną pompą hydrauliczną. PosiTest ATA20A to automatyczny tester przyczepności, który jest wykorzystywany do mierzenia siły przyczepności powłok do różnych powierzchni. Tester działa na zasadzie przytwierdzenia stempla pomiarowego do powłoki za pomocą kleju, a następnie mierzenia siły, która jest wymagana do oderwania powłoki od powierzchni. Tester ten może być stosowany do monitorowania jakości i trwałości różnych rodzajów powłok, w tym farb, lakierów oraz powłok antykorozyjnych. Tester spełnia wymagania norm międzynarodowych, takich jak ASTM D4541/D7234, ISO 4624/16276-1, czy AS/NZS 1580.408.5. W badaniach zastosowano stemple pomiarowe średnicy 10 mm oraz dwuskładnikowy klej epoksydowy. W celu przeprowadzenia pomiarów na powierzchnie stykowe grzybków pomiarowych naniesiono warstwę kleju, a następnie stemple przytwierdzono do badanych powłok zapewniając obciążenie statyczne i pozostawiono na dwie doby w celu odpowiedniego związania z badanym podłożem.

4.6.5. Mikroskopia konfokalna

Mikroskopia konfokalna jest techniką stosowaną w badaniach biologicznych, dzięki której możliwe jest uzyskanie wysoce szczegółowych obrazów struktur wewnątrz komórek i tkanek, co jest kluczowe dla zrozumienia procesów biologicznych na poziomie komórkowym. Pozwala ona również na obserwowanie zmian w morfologii oraz funkcjonowaniu organelli komórek eksponowanych na przykład na działanie potencjalnych biomateriałów poprzez stosowanie związków selektywnie barwiących poszczególne organelle komórkowe.

W obrazowaniu konfokalnym zastosowano linię komórkową mysich fibroblastów L929, która jest rutynowo stosowana i zalecana jako linia standardowa w kontaktowym teście cytotoksyczności. Hodowlę komórek prowadzono w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂ oraz wilgotności >90% w butelkach hodowlanych na podłożu RPMI-1640 (Cytogen) uzupełnionym antybiotykami - penicyliną (100 U/mL) i streptomycyną (100 µg/mL) oraz dezaktywowaną surowicą bydlęcą (10% wag.).

200 µL przygotowanej w ten sposób zawiesiny komórek (2 × 10⁵ komórek/mL) wprowadzono do studzienek 12-dołkowej płytki hodowlanej, a następnie inkubowano przez 24 godziny (w standardowych warunkach) w celu adhezji do powierzchni naczynia i odtworzenia pojedynczych warstw komórek. Płytki stopu Ti (10 mm x 10 mm) pokryte powłokami zostały umieszczone na wysianych komórkach, a następnie inkubowane przez 48 godzin (37°C, 5% CO₂). Po tym czasie materiały usunięto ze studzienek, po czym komórki przemyto pięciokrotnie za pomocą PBS, a następnie utrwalono metanolem (99.6%). Następnie

-79-

jądra komórkowe przez wybarwiano odczynnikiem DAPI ((4`, 6-diamidyno-2-fenyloindol) przez 10 minut oraz kolejno przez 5 minut wybarwiano błony komórkowe znacznikiem fluorescencyjnym DiOC6 (0.5 g/mL roztwór jodku 3,3'-diheksyloksakarbyliny). Monowarstwy przemyto 5 razy roztworem PBS. Obrazowanie mikroskopowe wykonano za pomocą mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP8. Do wzbudzenia fluorescencji DAPI i DIOC użyto laserów o długości fali 405 nm i 488 nm, a emisje znaczników DAPI i DIOC zostały zarejestrowane przez detektory lampy fotomultiplikacyjnej (PMT) w zakresie 410-480 nm i 495-580 nm.

4.6.6. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa powłok

Aktywność przeciwdrobnoustrojową otrzymanych powłok badano wobec dwóch szczepów bakteryjnych z rodzaju Staphylococcus stosując test oparty na enzymatycznej redukcji soli tetrazolowej MTT. W badaniach wykorzystano bakterie S. aureus (ATCC 25923) i S. epidermidis (ATCC 12228). Chociaż badania dotyczące enzymatycznej redukcji soli tetrazoliowych zostały po raz pierwszy zastosowane w badaniach nad komórkami eukariotycznymi, ten typ testów jest obecnie również stosowany do oceny żywotności komórek drobnoustrojów, mimo że mechanizm redukcji MTT przez bakterie jest wciąż słabo poznany [298]. Szczepy bakterii S. aureus i S. epidermidis hodowano w bulionie tryptonowosojowym (TSB) w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Zawiesiny bakteryjne odwirowano (3000 obr./min przez 15 min) i ponownie zawieszono w pożywce TSA. Gęstość bakterii mierzono za pomocą nefelometru. Wartości OD zawiesin bakterii doprowadzono do 2.0 i rozcieńczono pożywką TSA do uzyskania 1 x 107 CFU/mL. Materiały z naniesionymi powłokami inkubowano w płytkach 12-studzienkowych zawierających po 200 µL zawiesin bakteryjnych poszczególnych szczepów przez 24 godziny (37°C, 5% CO₂), zastępując co 12 godzin zawiesinę bakteryjną porcją świeżej. Następnie płytki 12-dołkowe opłukano roztworem PBS usuwając nieadherentne bakterie, po czym do dołków wprowadzono po 1 mL roztworu MTT i płytki inkubowano przez 4 godziny (37°C, 5% CO₂). Następnie dokonano pomiarów absorbancji przy referencyjnej długości fali 570 nm, stosując spektrofotometryczny czytnik płytek Victor2.

4.6.7. Adhezja komórek bakteryjnych

Pierwszym etapem formowania się biofilmu bakteryjnego jest adhezja komórek bakteryjnych. Aby ocenić zdolność do adhezji komórek bakteryjnych szczepów *S. aureus* i *S. epidermidis* badane materiały poddano inkubacji przez 24 godziny w płytkach 12-dołkowych zawierających po 200 μL zawiesin bakteryjnych poszczególnych szczepów, przy czym zawiesiny zastępowano świeżymi co 12 godzin w celu sprawdzenia skuteczności materiałów w przypadku ciężkich infekcji bakteryjnych. Po 24 godzinach próbki utrwalano 4% paraformaldehydem przez 30 minut. Bakterie nieadherentne usunięto roztworem PBS, a pozostałe bakterie barwiono przez 30 minut oranżem akrydyny. Wybarwione próbki umieszczono na szkiełkach ze środkiem zamykającym (Leica CV Ultra) i dokonano obrazowania biofilmu za pomocą konfokalnej mikroskopii laserowej.

5. Wyniki i dyskusja

5.1. Charakterystyka roślinnych ekstraktów oraz naparów

5.1.1. Ocena aktywności antyoksydacyjnej oraz całkowita zawartość polifenoli

Na rysunku 15. przedstawiono wyniki oznaczeń aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów oraz naparów z suszonych liści czystka szarego (*Cistus incanus*), karczocha zwyczajnego (*Cynara scolymus*) oraz ziaren ostropestu plamistego (*Silybum marianum*) za pomocą metody DPPH oraz wyniki oznaczenia całkowitej zawartości polifenoli (TPC) metodą Folina-Ciocâlteu (F-C). Wyniki oznaczenia zdolności antyoksydacyjnych zostały wyrażone jako % inhibicji, z kolei całkowitą zawartość polifenoli przedstawiono jako ekwiwalent kwasu

galusowego na gram surowca. Wszystkie przebadane próby wykazywały aktywność przeciwutleniającą. Uzyskane wartości dla nierozcieńczonych ekstraktów oraz naparów, w przeliczeniu na % inhibicji, mieściły się w przedziale od $26.2 \pm 2.3\%$ inhibicji do $90.0 \pm 0.6\%$ inhibicji, przy czym najwyższa spośród wartości dotyczyła naparu z suszonych liści czystka szarego. Z kolei najwyższe wartości % inhibicji spośród wszystkich badanych próbek wykazywały ekstrakty oraz napary z ziaren ostropestu plamistego, których wyznaczenie wymagało przygotowania 5-krotnych rozcieńczeń. Otrzymane wyniki nie wykazały jednoznacznego wpływu metody ekstrakcji na wartości uzyskanych wyników w przypadku dwóch spośród stosowanych surowców. Wyraźna różnica pomiędzy wartościami RSA naparu oraz ekstraktu obserwowana jest tylko w przypadku suszu liści czystka szarego. Takie zjawisko może być spowodowane wysoką zawartością termolabilnych związków o działaniu antyoksydacyjnym, co wpływa na wyższe wartości RSA naparu przygotowywanego w temperaturze początkowej wody wynoszącej 80°C względem ekstraktu przygotowanego w 12-godzinnym procesie ekstrakcji w temperaturze wrzenia ekstrahenta. Działanie przeciwutleniające naparów oraz ekstraktów wodnych C. incanus metodą opartą na redukcji rodnika DPPH zostało przebadane przez wiele zespołów badawczych. Wyniki otrzymane przez Bernacką i in. wskazują na wartości RSA naparu w przedziale od 24.09 ± 1.4 do 30.90 ± 5.31% inhibicji [299]. Napary otrzymano z C. incanus w procesie trwającym 15 min z zastosowaniem wody w temperaturze wrzenia. W badaniach własnych wartość ta była znacznie wyższa (90.0 ± 0.6% inhibicji), co może wskazywać, że korzystniejsze warunki do otrzymania naparu o silniejszej aktywności przeciwoksydacyjnej zapewnia stosowanie niższej temperatury ehstrahenta (80°C).

Zależność rodzaj ekstrakcji - wartość RSA nie jest obserwowana w przypadku pozostałych surowców, gdzie wartości RSA naparów i ekstraktów są na podobnym poziomie. Jednakże, w przypadku ekstraktu i naparu z ziaren ostropestu plamistego, wartości RSA są ok. 5 razy wyższe niż w przypadku karczocha zwyczajnego. Świadczyć to może, że ziarna ostropestu plamistego są surowcem, którego zarówno ekstrakcja, jak i parzenie dostarczają równie wysokich ilości związków antyoksydacyjnych.

-82-



Rysunek 15. Wyniki pomiarów potencjału przeciwutleniającego (RSA) metodą DPPH wyrażone jako % inhibicji. Próbki oznaczone * zostały 5-krotnie rozcieńczone.

Na rysunku 16. przedstawiono wyniki oznaczenia całkowitej zawartości polifenoli w naparach oraz ekstraktach oznaczonych metodą F-C i otrzymanych z zastosowaniem wody jako czynnika ekstrahującego. Wszystkie produkty poddane analizie cechowały się obecnością polifenoli. Najniższą zawartość związków polifenolowych (12.6 ± 1.0 mg GAE/g surowca) stwierdzono w przypadku ekstraktu z liści czystka. Z drugiej jednak strony, napar otrzymany z tego surowca cechował się najwyższą wartością TPC spośród badanych próbek. Może to potwierdzać teorię, że długotrwała ekstrakcja *C. incanus* prowadzi to obniżenia jego własności antyoksydacyjnych na skutek rozpadu związków przeciwutleniających nietrwałych termicznie. Wartości TPC w granicach od 57.3±9.4 mg GAE/g surowca do 78.3±6.1 mg GAE/g surowca zostały uzyskane dla pozostałych naparów oraz ekstraktów.



Rysunek 16. Wyniki oznaczenia całkowitej zawartości polifenoli metodą F-C.

Degradacja termiczna jest najczęstszą przyczyną rozkładu polifenoli. Dodatkowo, temperatura ekstrakcji może mieć również wpływ na rodzaj ekstrahowanych polifenoli. Warto podkreślić, że poszczególne surowce wykorzystane do produkcji naparów i ekstraktów cechują się różnym profilem antyoksydacyjnym wynikającym z różnej zawartości poszczególnych związków w surowcach, a co za tym idzie skład otrzymanych naparów oraz ekstraktów jest różny. W związku z czym należy się spodziewać zróżnicowanej stabilności termicznej poszczególnych badanych produktów roślinnych.

W przypadku czystka, analiza składu polifenolowego roztworu wodnego ekstraktu przeprowadzona przez Barrajõn-Catalá i in. wykazała, że jego wyraźna aktywność przeciwutleniająca opiera się na trzech głównych grupach związków: flawonoidach, pochodnych kwasów fenolowych i garbnikach. W wodnym ekstrakcie z *C. incanus* zidentyfikowano dziewięć flawonoidów, w tym cztery flawanole i pięć pochodnych flawonoli, takich jak rutyna, mirycytryna i kwercetyna. Zawartość garbników była znikoma - zidentyfikowano jedynie kwas galusowy i heksahydroksydifenoiloglukozę [300]. Badania dotyczące stabilności rutyny oraz kwercetyny przeprowadził Buchner i in. [301] Zgodnie

z wynikami otrzymanymi przez naukowców, stężenie obydwu flawonoidów malało wraz z czasem ekstrakcji przeprowadzonej w temperaturze 100°C z zastosowaniem wody jako czynnika ekstrahującego. Badania dotyczące stabilności różnych polifenoli w trakcie procesów ekstrakcji wskazują, że różne grupy związków cechuje różna stabilność podczas procesu. Dla przykładu, badania przeprowadzone przez Ross i in. wykazały, że zawartość katechin i epikatechin w ekstraktach z winogron zmniejsza się wraz ze wzrostem temperatury ogrzewania, podczas gdy zawartość gallokatechiny i kwasu galusowego wzrasta. Z kolei antocyjanów wykazały wzrost wydajności ekstrakcji badania dotyczące stabilności w początkowym czasie w zakresie temperatur wynoszącym 20 - 45°C. Jednak już w temperaturze powyżej 45°C zaobserwowano spadek ich zawartości w ekstrakcie. Interesujące badania zostały przeprowadzone przez Vergara-Salinas i in. [302] Badacze w swojej pracy określili wpływ temperatury na skład ekstraktu z tymianku. Badania wykazały, że w zależności od stosowanej temperatury ekstrakcji skład otrzymanych ekstraktów różnił się, mimo stosowania tego samego surowca. Stężenie kwasu hydroksyfenylopropionowego wzrosło niemal trzykrotnie, gdy temperatura ekstrakcji wynosiła 200°C, podczas gdy optymalna temperatura dla kwasów hydroksycynamonowych, flawonów i flawonoli wynosiła 100°C. Dodatkowo, wyższe temperatury ekstrakcji wpływały na mniejszą różnorodność typów ekstrahowanych polifenoli.

Brakuje również konsensusu w kwestii korelacji wartości TPC z aktywnością przeciwutleniającą. Niektórzy badacze wskazują, że jej brak ma związek z różnorodnością struktur polifenoli oraz ich zmiennością, co wpływa na zdolności antyoksydacyjne. Benavente-García i in. badali flawonoidy pozyskiwane ze skórek cytrusów i ustalili, że na wzrost zdolności przeciwutleniającej flawonoidów wpływają struktura orto-dihydroksy (katecholowa) w pierścieniu B (rysunek 17A), wiązanie podwójne 2,3 w koniugacji z 4-oksofunkcyjną grupą karbonylową w pierścieniu C (rysunek 17B) oraz dodatkowa obecność grup OH w pierścieniu A na pozycjach 3 i 5 (rysunek 17C) [303].

-85-



Rysunek 17. Struktura orto-dihydroksy (katecholu) w pierścieniu B (A); wiązanie podwójne 2,3 w koniugacji z 4-oksofunkcyjną grupą karbonylową w pierścieniu C (B); grupy hydroksylowe w pozycjach 3 i 5 (C).

Warto również zaznaczyć, że za aktywność antyoksydacyjną ekstraktów mogą również odpowiadać inne związki o działaniu przeciwutleniającym takie jak witaminy, (np. witamina C oraz witamina E), polisacharydy i peptydy, które również mogą być pozyskiwane podczas procesu [304-306].

5.1.2. Ocena cytotoksyczności

Biorąc pod uwagę, że podjęta tematyka badawcza pracy skupia się na materiałach, które mogą być potencjalnie stosowane jako biomateriały, istotne jest zagadnienie związane z bezpieczeństwem ich użytkowania w środowisku tkankowym. W tym celu została zastosowana metoda oceny cytotoksyczności podczas bezpośredniego kontaktu - MTT, która jest obecnie najczęściej stosowanym do oceny działania cytotoksycznego testem i jest zalecana jako metoda referencyjna przez międzynarodowe organizacje normotwórcze. Badania dotyczące cytotoksyczności przygotowanych naparów oraz ekstraktów roślinnych przeprowadzono zgodnie z zaleceniami normy ISO 10993-5 *Biologiczna ocena wyrobów medycznych - Część 5: Badania cytotoksyczności in vitro*, która ma status normy zharmonizowanej z dyrektywami 93/42/EWG i 90/385/EWG dotyczącymi wyrobów medycznych i aktywnych wyrobów medycznych do implantacji. Zgodnie z wytycznymi normy, materiał

o zastosowaniu medycznym uważa się za cytotoksyczny, gdy żywotność fibroblastów L929 poddanych działaniu badanych substancji przez 24 godziny zostanie obniżona o więcej niż 30%. Metoda MTT jest techniką kolorymetryczną opartą na pomiarze absorbancji zredukowanej soli tetrazolowej przez aktywne metabolicznie komórki.

Ocenie cytotoksyczności poddano wybrane napary oraz ekstrakty wytypowane na podstawie wyników badań przedstawionych w podrozdziałach 5.2.1 oraz 5.2.2., w których poddano ocenie zdolność poszczególnych naparów oraz ekstraktów do redukcji jonów srebra oraz stabilizacji otrzymanych nanostruktur w środowisku o zmiennym pH. Wyniki badań cytotoksyczności uzyskane w teście MTT przedstawiono na rysunku 18.

Przeprowadzone testy cytotoksyczności wykazały, że napar z karczocha w stężeniach 100% i 50% wykazuje silną aktywność cytotoksyczną, prowadzącą do znacznego zmniejszenia żywotności komórek mysich fibroblastów L929 odpowiednio do 13.1 ± 1.3% i 41.6 ± 1.5%. Jednakże napar o stężeniu 25% względem naparu uzyskanego bezpośrednio w procesie, nie wywołuje efektu cytotoksycznego - żywotność komórek poddanych jego działaniu pozostaje na poziomie bezpiecznym biologicznie i wynosi 82.3 ± 6.7%. Kolejne testowane rozcieńczenia nie wpływają istotnie na żywotność komórek, która wynosi od $80.1 \pm 2,1\%$ do $91.2 \pm 6.0\%$. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że w procesie otrzymywania nanocząstek należy użyć naparu z karczocha o stężeniu 25% lub niższym względem otrzymanego, aby wyeliminować potencjalny efekt cytotoksyczny zawiesin nanostruktur wynikający z zastosowania zbyt stężonego naparu. W przypadku ekstraktu oraz naparu z czystka, uzyskane wyniki wykazały, że obydwa badane produkty w stężeniach w zakresie od 0.39% do 100%, wykazują działanie cytotoksyczne, prowadzące do zmniejszenia żywotności fibroblastów w porównaniu z komórkami hodowanymi w pożywce o więcej niż 30%. Warto zauważyć, że w przypadku zarówno naparu, jak i ekstraktu efekt ten jest obserwowany w takim samym zakresie stężeń, co może sugerować, że w obydwu procesach dochodzi do izolacji związku lub związków, wpływających negatywnie na żywotność traktowanych komórek, bądź też jest to efekt działania produktów powstających na skutek rozpadu termicznego związków będących składnikami ekstraktu.

-87-



Rysunek 18. Przeżywalność komórek mysich fibroblastów L929 traktowanych naparem z karczocha (A), naparem (B) oraz ekstraktem (C) z czystka. Wykresy przedstawiają wartości średnie ± SD (n=6).

5.1.3. Ocena właściwości prozapalnych naparów oraz ekstraktów

Interakcja materiałów przeznaczonych do zastosowań biomedycznych z komórkami immunologicznymi może prowadzić do aktywacji monocytów, a w konsekwencji do miejscowego zapalenia, uszkodzenia tkanek, a nawet skutków ogólnoustrojowych. Z tego względu kluczowe jest wykrycie potencjalnego efektu prozapalnego, wywołanego możliwym oddziaływaniem materiału na otoczenie tkankowe. Do oceny aktywności prozapalnej przygotowanych naparów oraz ekstraktów wykorzystano test immunokompatybilności z zastosowaniem linii komórkowej ludzkiej monocytów THP1-XBlue[™]. Aktywacja komórek THP1-XBlue[™] za pośrednictwem receptorów typu Toll prowadzi do transkrypcji czynnika jądrowego NF-κB, a następnie do uwolnienia enzymu związanej z alkaliczną fosfatazą, który jest wykrywany w hodowli komórkowej przy użyciu testu Quanti-Blue[™]. Kontrolę pozytywną w teście stanowiły komórki wzbudzone endotoksyną - lipopolisacharydem bakterii *E. coli* (1 µg/mL), z kolei kontrolę negatywną - nietraktowana hodowla komórkowa.

Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono na rysunku 19. W przypadku naparu z karczocha w zakresie stężeń od 25% do 0.39% zaobserwowano nieznaczne wzbudzenie w porównaniu do nietraktowanej hodowli komórkowej. Efektu tego nie obserwowano w przypadku ekstraktu oraz naparu z czystka dla zakresu stężeń bezpiecznych dla komórek L929 na poziomie *in vitro*. Nieznaczna aktywacja monocytów obserwowana dla ekstraktu z karczocha może być związana z obecnością polisacharydów, takich jak inulina, która jest nierozpuszczalnym cukrem złożonym z łańcuchów polimerowych β (2-1)polifruktofuranozylo- α -D-glukozy. Rośliny z rodziny *Compositae*, w tym karczochy, wytwarzają inulinę jako węglowodan magazynujący, który może oddziaływać z monocytami indukując wewnątrzkomórkową ekspresję TNF- α w monocytach [307].



Rysunek 19. Wyniki badań immunogenności przeprowadzonych dla naparu z karczocha (A), naparu z czystka (B) oraz ekstraktu z czystka (C). Dane przedstawiono jako wartość średnią ± SD (n=6).

5.2. Charakterystyka nanocząstek srebra

5.2.1. Spektrofotometryczna charakterystyka zawiesin AgNPs

Obecność nanocząstek w uzyskanych zawiesinach potwierdzano wykorzystując instrumentalną metodę spektrofotometrii absorpcyjnej UV-Vis w zakresie długości fali 300-750 nm w temperaturze pokojowej z zastosowaniem spektrofotometru Evolution 220. Pomiary prowadzono z użyciem kuwet o długości drogi optycznej 10 mm.

Miniaturyzacja rozmiarów metali do skali nanometrycznej skutkuje pojawieniem się barw w roztworach ich koloidów, związanych ze zjawiskiem oscylacji plazmonów powierzchniowych (SPR, ang. *Surface plasmon resonance*) - w przypadku nanocząstek Ag obserwuje się charakterystyczny herbaciany kolor. Zgodnie z teorią Mie, położenie maksimum absorpcji (λ_{max}) jest zależne od rodzaju nanocząstek oraz ich wielkości [308]. w przypadku nanocząstek srebra λ_{max} mieści się w przedziale od 380 nm do 460 nm. Zjawisko występowania plazmonu powierzchniowego może być stosowane do oceny wielkości cząstek oraz ich tendencji do tworzenia się agregatów.

Analiza w zakresie UV-Vis suspensji nanosrebra potwierdziła powyższe założenia teoretyczne. Nanosuspensje srebra absorbowały promieniowanie elektromagnetyczne o długości fali od około 380 nm do 460 nm. Widma absorpcyjne UV-Vis nanocząstek srebra otrzymanych w wyniku redukcji AgNO₃ z zastosowaniem 5 mL, 10 mL i 15 mL naparów i ekstraktów z karczocha przedstawiono na rysunku 20.

Zarówno w przypadku nanocząstek otrzymywanych z zastosowaniem naparu, jak i tych przygotowanych z użyciem ekstraktu z karczocha, obserwowane było powstawanie pasma absorbcji w charakterystycznym dla AgNPs zakresie długości fali. Obserwacja widm w czasie pozwoliła dodatkowo zauważyć nieznaczne przesuwanie się położeń maksimów absorbancji wraz z upływem czasu w kierunku fal dłuższych (ang. *red-shift*, przesunięcie ku czerwieni), co spowodowane jest wzrostem rozmiarów otrzymanych nanostruktur. Warto również zauważyć, że pasma absorbcji w charakterystycznym dla AgNPs obszarze są widoczne już po

2 godzinach i pozostają wyraźnie zauważalne aż do 2 miesięcy od momentu otrzymania nanostruktur. Co ważne, analiza spektralna w zakresie UV-Vis wykazała, że zarówno wodny napar, jak i ekstrakt mają zdolność redukcji Ag⁺ do Ag⁰ oraz stabilizację powstałych nanostruktur, co prowadzi do wniosku, że zaproponowane metody otrzymywania naparu i ekstraktu pozwalają na uzyskanie produktów zawierających związki fitochemiczne mające charakter zarówno przeciwutleniający, jak i stabilizujący w odniesieniu do AgNPs.

Dosi i in. przeanalizowali wartość odżywczą głowy karczocha i wykazali, że 100 g świeżej główki kwiatostanów karczocha zawiera około 3 g białka [309]. Białka, poza ich właściwościami odżywczymi, znane są również jako doskonałe czynniki stabilizujące nanocząstki srebra, co jest spowodowane ich silnym powinowactwem do metali [310].

Równolegle przeprowadzono badania mające na celu określenie wpływu dodatku polimerowego stabilizatora (PVP) na proces otrzymywania nanostruktur Ag. Widma UV-Vis otrzymanych nanostruktur przedstawia rysunek 21. Zastosowanie dodatkowego stabilizatora zdaje się spowalniać tworzenie nanostruktur srebra. Na widmach 21A, 21D oraz 21E brak jest charakterystycznego pasma absorbcji w przypadku pomiaru wykonanego po 2 godzinach. Dodatkowo, widma próbek nanosuspensji otrzymanych z zastosowaniem największej ilości naparu oraz ekstraktu z karczocha nie wykazują symetrycznego oraz ostrego pasma absorbcji typowego dla nanocząstek również w pomiarze wykonanym po 2 dniach.



Rysunek 20. Widma UV-Vis nanocząstek Ag otrzymanych z zastosowaniem 5 mL(A), 10 mL (C), 15 mL (E) naparu z karczocha oraz 5 mL(B), 10 mL (D), 15 mL (F) ekstraktu z karczocha.

Ponadto, widma niektórych otrzymanych nanosuspensji mają charakter bimodalny, co najwyraźniej widać na rysunku 21E. Otrzymane wyniki sugerują, że dodatek polimerowego stabilizatora wpływa na tworzenie się nanocząstek o zróżnicowanej wielkości, a dodatkowo wydłuża czas ich formowania.



Rysunek 21. Widma UV-Vis AgNPs otrzymanych z zastosowaniem 5 mL(A), 10 mL (C), 15 mL (E) naparu z karczocha oraz 5 mL (B), 10 mL (D), 15 mL (F) ekstraktu z karczocha w obecności polimerowego stabilizatora (PVP).



Rysunek 22. Widma UV-Vis nanocząstek Ag otrzymanych z zastosowaniem 5 mL(A), 10 mL (C), 15 mL (E) naparu z czystka oraz 5 mL(B), 10 mL (D), 15 mL (F) ekstraktu z czystka.



Rysunek 23. Widma UV-Vis nanocząstek Ag otrzymanych z zastosowaniem 5 mL(A), 10 mL (C), 15 mL (E) naparu z czystka oraz 5 mL(B), 10 mL (D), 15 mL (F) ekstraktu z czysta w obecności polimerowego stabilizatora (PVP).

Na rysunku 22. przedstawiono widma nanocząstek uzyskanych z zastosowaniem naparu oraz ekstraktu z czystka w ilości 5 mL, 10 mL oraz 15 mL. Podobnie jak w przypadku poprzedniego surowca roślinnego pasmo absorbcji odpowiednie dla AgNPs jest obserwowalne już po 2 godzinach. Niemniej jednak, rejestrowane widma nie cechują się symetrią - również w przypadku nanosuspensji otrzymanych z zastosowaniem 5 mL roztworów fitochemikaliów, co może sugerować, że otrzymane nanocząstki cechuje zróżnicowana wielkość. Dodatkowo, zmienność kształtu pasm widm rejestrowanych po różnym czasie od otrzymania AgNPs wskazuje na nieprzerwanie zachodzące procesy związane np. z tworzeniem aglomeratów, a co za tym idzie - brak możliwości przewidzenia właściwości otrzymanych AgNPs w czasie. Niemniej, zarówno napar, jak i ekstrakt z czystka wykazują właściwości pozwalające na otrzymanie nanostruktur srebra. Również w przypadku zastosowania dodatkowego polimerowego stabilizatora obserwowane są podobne efekty związane z niejednorodnym rozkładem wielkości otrzymanych nanocząstek (rysunek 23).

Na rysunku 24. przedstawiono widma zarejestrowane dla suspensji przygotowanych z użyciem ekstraktu oraz naparu z ostropestu. Co ciekawe, obydwa roztwory pomimo, że cechowały się znaczącymi zdolnościami antyoksydacyjnymi, nie wykazały zdolności do stabilizowania nanostruktur Ag.



Rysunek 24. Widma UV-Vis otrzymane w próbie otrzymania AgNPs z zastosowaniem 5 mL(A), 10 mL (C), 15 mL (E) naparu z ostropestu oraz 5 mL(B), 10 mL (D), 15 mL (F) ekstraktu z ostropestu.

Podczas pomiarów widm absorbcji nie zaobserwowano wyraźnych i ostrych pasm charakterystycznych dla nanocząstek Ag, co wskazuje na fakt, że zastosowanie zarówno

naparu, jak i ekstraktu w roli stabilizatorów nie pozwala na uzyskanie nanostruktur. Co więcej, również dodatek polimerowego stabilizatora nie sprzyja ich formowaniu (rysunek 25).



Rysunek 25. Widma UV-Vis otrzymane w próbie otrzymania AgNPs z zastosowaniem 5 mL(A), 10 mL (C), 15 mL (E) naparu z ostropestu oraz 5 mL(B), 10 mL (D), 15 mL (F) ekstraktu z ostropestu w obecności polimerowego stabilizatora (PVP).

Pozwala to wyciągnąć wnioski, że fitochemikalia pozyskane z zastosowanego surowca roślinnego w postaci ziaren ostropestu, pomimo silnych właściwości antyoksydacyjnych, nie pozwalają na uzyskanie nanocząstek Ag. Również w tym przypadku wyraźne i ostre piki w zakresie długości fali 380 - 460 nm nie zostały zarejestrowane.

5.2.2. Stabilność AgNPs w płynach symulujących środowisko organizmu ludzkiego

Po 4 dniach próbki otrzymane z zastosowaniem 5 mL wodnych naparów oraz ekstraktów z karczocha oraz naparu z czystka poddano analizie stabilności w warunkach symulujących środowisko organizmu ludzkiego. W tym celu zawiesinę nanocząstek wprowadzono do sztucznej śliny, płynu Ringera oraz roztworu soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS, ang. *phosphate buffer saline*) w stosunku objętościowym wynoszącym 1: 10. Widma spektralne UV-Vis nanocząstek otrzymanych z zastosowaniem 5 mL naparu oraz ekstraktu z karczocha inkubowane w sztucznej ślinie, płynie Ringera oraz roztworze PBS przedstawiono na rysunku 26. Skład poszczególnych płynów oraz ich wartości pH przedstawia tabela 12.

	Roztwór	Sztuczna ślina	Płyn Ringera	PBS
	pН	5.23	6.32	7.34
Składniki	NaCl	+	+	+
	KCl	+	+	+
	CaCl ₂	+	+	+
	NaH ₂ PO ₄	+	-	-
	Na ₂ S	+	-	-
	$CO(NH_2)_2$	+	-	-
	NaHCO ₃	-	-	+
	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	-	-	+
	MgCl ₂ · 6H ₂ O	-	-	+
	HCl	-	-	+
	Na ₂ SO ₄	-	-	+
	Tris	-	-	+
	NaHCO ₃	-	-	+

Tabela 12. Skład roztworów symulujących płyny ustrojowe.

Poszczególne płyny różnią się wartościami pH. Roztworem o najniższym pH jest sztuczna ślina mająca symulować środowisko jamy ustnej. Płyn Ringera jest rodzajem płynu infuzyjnego izotonicznym w stosunku do ludzkiej krwi. PBS - buforowana fosforanem sól fizjologiczna - jest roztworem o fizjologicznym pH, nietoksycznym dla większości komórek i dlatego jest powszechnie stosowany w badaniach biologicznych i biofarmaceutycznych oraz jako podłoże do kriokonserwacji.

Celem zaproponowanego eksperymentu było określenie zachowania otrzymanych zawiesin nanocząstek w sztucznych płynach symulujących środowisko organizmu ludzkiego, ale również sprawdzenie ich stabilności w zależności od pH płynu w jakim się znajdują.

Zarówno w przypadku AgNPs otrzymywanych z zastosowaniem naparu, jak i tych otrzymanych z użyciem ekstraktu z karczocha obserwowane są różnice w intensywności kolejnych pasm UV-Vis rejestrowanych w interwałach czasowych podczas tygodniowego pomiaru. Rysunek 26. przedstawia widma UV-Vis nanocząstek Ag otrzymanych z zastosowaniem 5 mL naparu oraz 5 mL ekstraktu z karczocha rejestrowane w trakcie inkubacji w płynach symulujących środowisko organizmu ludzkiego. Na widmach widać, że intensywność pasm absorbcji w zakresie charakterystycznym dla AgNPs jest zmienna w czasie i zależna od płynu w jakim inkubowane są nanocząstki, a tym samym od pH środowiska. Na widmach AgNPs inkubowanych w roztworze sztucznej śliny o pH=5.23 po 7 dniach charakterystyczne pasmo absorbcji cechuje się niską intensywnością (rysunek 26A), bądź w ogóle nie jest obserwowalne (rysunek 26B) w przypadku AgNPs zawieszonych w roztworze Ringera o pH=6.32 pasma te są widoczne dla obydwu zawiesin również po 7 dniach od rozpoczęcia eksperymentu. Najbardziej intensywne pasma w zakresie charakterystycznym dla nanocząstek Ag po 7 dniach zostały zarejestrowane dla AgNPs inkubowanych w płynie PBS, charakteryzującym się najwyższą wartością pH wynoszącą 7.34. Na podstawie przeprowadzonych badań można wyciągnąć wnioski, że zauważalny jest wpływ pH środowiska inkubacyjnego na stabilność nanocząstek Ag - środowisko bardziej kwasowe (sztuczna ślina) wpływa na ich szybsze rozpuszczanie, natomiast wykazują one większą stabilność w płynach o neutralnym pH (roztwór PBS).

-101-



Rysunek 26. Widma UV-Vis nanocząstek Ag otrzymanych z zastosowaniem 5 mL naparu z karczocha inkubowane w sztucznej ślinie (A), roztworze Ringera (C) oraz płynie PBS (E) oraz nanocząstek Ag przygotowanych z użyciem 5 mL ekstraktu z karczocha inkubowane w sztucznej ślinie (B), roztworze Ringera (D) oraz płynie PBS (F).

Podczas pomiarów zaobserwowano również przesunięcia pasm absorbcji AgNPs w czasie inkubacji (tabela 13). Największe przesunięcie położenia maksimum absorbcji AgNPs ($\Delta\lambda_{max}$) nastąpiło w trakcie procesu inkubacji w roztworze sztucznej śliny - dla AgNPS otrzymanych z zastosowaniem 5 mL naparu z karczocha wyniosło ono 26 nm, natomiast dla AgNPs uzyskanych z użyciem ekstraktu - 27 nm. Z kolei najmniejsze przesunięcia obserwowane były w przypadku AgNPs inkubowanych w roztworze PBS i wynosiły odpowiednio 16 nm oraz 17 nm. Powyższe obserwacje potwierdzają wcześniejsze wnioski - rozpuszczanie nanocząstek Ag uzyskanych z zastosowaniem naparu oraz ekstraktu z karczocha jest zależne od pH medium w jakim się znajdują, a ich najszybsze rozpuszczanie zachodzi w sztucznej ślinie. Co ciekawe w pierwszych godzinach inkubacji nanocząstek, poza przesunięciami λ_{max} ku fioletowi (ang. *blue-shift*) obserwuje się również wzrost intensywności pasm absorbcji. Takie zjawisko może być spowodowane powolnym rozpuszczaniem się większych nanocząstek, przez co zmniejsza się ich rozmiar, co prowadzi do wzrostu intensywności pasm w obszarze fal krótszych.

Na rysunku 27. przedstawiono widma UV-Vis nanocząstek Ag otrzymanych z zastosowaniem 5 mL naparu z liści czystka rejestrowane w trakcie inkubacji w płynach symulujących środowisko organizmu ludzkiego. Również w tym przypadku zaobserwowano przesunięcia $\lambda_{\max w}$ trakcie trwania inkubacji w sztucznej ślinie, roztworze Ringera oraz płynie PBS (tabela 14).

Niemniej jednak, silne pasma absorbcji są obecne również na widmach rejestrowanych po 7 dniach. Najwyraźniej zmiany związane zarówno z położeniem maksimum pasm, jak i ich intensywnością są widoczne na widmach AgNPs inkubowanych w sztucznej ślinie. W pierwszych dniach inkubacji zauważalny jest efekt wzrostu absorbancji podobny jak omówiony wcześniej, jednak w przypadku AgNPs otrzymanych z zastosowaniem czystka jest on obserwowany aż przez 2 dni w przypadku inkubacji w sztucznej ślinie oraz przez cały czas trwania pomiarów widm AgNPs w roztworze Ringera oraz płynie PBS, choć w tych dwóch przypadkach efekt ten jest zdecydowanie słabszy. Przesunięcie maksimum absorbcji podczas inkubacji AgNPs w sztucznej ślinie wynosi aż 42 nm i jest największym przesunięciem obserwowanym w całym eksperymencie.

		Karczoch			
		Wodny napar		Wodny ekstrakt	
	Czas	Położenie	Maksium	Położenie	Maksium
		maksimum	absorbancji	maksimum	absorbancji
		absorbancji [nm]	[a.u.]	absorbancji [nm]	[a.u.]
ślina	1 godzina	429	0.5209	417	0.6007
	4 godziny	420	0.6037	416	0.6297
	8 godzin	413	0.6081	409	0.6622
na	2 dni	408	0.5052	397	0.3946
ncz	3 dni	410	0.4447	397	0.2036
Szt	4 dni	407	0.2934	390	0.1867
	7 dni	403	0.3977	-	-
	$\Delta\lambda_{\max}$	26 nm		27 nm	
wór Ringera	1 godzina	430	0.5473	420	0.7671
	4 godziny	416	0.6197	417	0.8196
	8 godzin	416	0.6688	416	0.7786
	2 dni	412	0.4953	412	0.4010
	3 dni	412	0.4589	404	0.1408
koz	4 dni	412	0.4251	401	0.1208
Ц	7 dni	411	0.3711	400	0.0815
	$\Delta\lambda_{\max}$	19 nm		20 nm	
	1 godzina	428	0.5579	420	0.7671
	4 godziny	415	0.6607	420	0.8178
PBS	8 godzin	413	0.6904	417	0.8196
	2 dni	413	0.6382	417	0.7786
	3 dni	412	0.5339	416	0.2281
	4 dni	412	0.4869	403	0.1208
	7 dni	412	0.4446	403	0.0815
	$\Delta\lambda_{\max}$	16 r	1m	17	nm

Tabela 13. Wartości maksimów absorbancji zawiesin AgNPs otrzymanych z zastosowaniem naparu oraz ekstraktu z karczocha oraz ich położenie w trakcie inkubacji nanocząstek w płynach symulujących ludzki organizm.



Rysunek 27. Widma UV-Vis nanocząstek Ag otrzymanych z zastosowaniem 5 mL naparu z liści czystka inkubowane w sztucznej ślinie (A), roztworze Ringera (B) oraz płynie PBS (C).

Z drugiej strony, inkubacja przeprowadzona z zastosowaniem roztworu Ringera oraz płynu PBS skutkuje przesunięciem maksimum jedynie o 6 nm, a dodatkowo intensywność pasm absorbcji nieustannie rośnie wraz z kolejnymi pomiarami. Z kolei AgNPs inkubowane w sztucznej ślinie wykazują efekt wzrostu intensywności pasma absorbcji przez 2 dni, po czym ich intensywność zaczyna się obniżać, czemu towarzyszy efekt silnego przesunięcia ku fioletowi. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że nanocząstki Ag uzyskane z zastosowaniem wodnego naparu z czystka cechują się większą stabilnością w roztworze Ringera oraz płynie SBF w porównaniu z AgNPs otrzymanymi z zastosowaniem naparu oraz ekstraktu z karczocha. Z drugiej strony przesunięcie ku fioletowi o 42 nm obserwowane w przypadku AgNPs inkubowanych w sztucznej ślinie świadczy o ich szybszym rozpuszczaniu w medium o bardziej kwaśnym pH.

Tabela 14. Wartości maksimów absorbancji zawiesin AgNPs otrzymanych z zastosowaniem naparu z czystka oraz ich położenie w trakcie inkubacji nanocząstek w płynach symulujących ludzki organizm.

Czas		Czystek		
		Wodny napar		
		Położenie maksimum absorbancji [nm]	Maksium absorbancji [a.u.]	
Sztuczna ślina	1 godzina	444	1.6175	
	4 godziny	441	1.6224	
	8 godzin	441	1.6798	
	2 dni	442	1.7135	
	3 dni	431	1.6935	
	4 dni	418	1.3624	
	7 dni	402	1.1756	
	$\Delta\lambda_{max}$	42 nm		
Roztwór Ringera	1 godzina	437	1.5084	
	4 godziny	442	1.5154	
	8 godzin	431	1.5704	
	2 dni	433	1.6064	
	3 dni	431	1.6639	
	4 dni	430	1.6826	
	7 dni	431	1.6881	
	$\Delta\lambda_{\max}$	6 nm	l	
	1 godzina	437	1.5084	
	4 godziny	442	1.5154	
	8 godzin	431	1.5704	
	2 dni	433	1.6064	
	3 dni	431	1.6639	
	4 dni	430	1.6826	
	7 dni	431	1.6881	
	$\Delta\lambda_{\max}$	6nn	n	

5.2.3. Spektroskopia korelacji fotonów (dynamiczne rozproszenie światła)

Średni rozmiar nanocząstek oraz rozkład wielkości w zawiesinie określono przy użyciu metody dynamicznego rozproszenia światła umożliwiającą pomiar średnicy hydrodynamicznej nanocząstek w roztworze. Histogramy rozkładu uśrednionej intensywności oraz objętości AgNPs i ich średnie średnice przedstawiono na rysunku 28.



Rysunek 28. Średni rozmiar i rozkład wielkości nanocząstek uzyskanych z zastosowaniem 5 mL naparu z karczocha (A, B); naparu z czystka (C, D) oraz ekstraktu z czystka (E, F) w zależności od objętości cząstek oraz intensywności rozproszonego światła.

Średni rozmiar nanocząstek Ag był zależny od surowca użytego jako reduktora jonów srebra. Średnia średnica nanocząstek (dśr.) wynosiła 71 nm dla AgNP przygotowanych

z użyciem ekstraktu z czystka i 69 nm dla nanocząstek Ag uzyskanych z zastosowaniem naparu. Zawiesiny AgNPs otrzymane z użyciem 5 mL ekstraktu (rysunek 28 E, F) wykazywały bimodalny rozkład średnicy hydrodynamicznej na histogramach przedstawiających zależność intensywność- średnia średnica AgNPs o maksimach dla wartości 110 nm oraz 20 nm. Taki rozkład sugeruje utworzenie się nanocząstek Ag o różnych średnicach hydrodynamicznych. Z kolei rozkład wielkości cząstek mieścił się w zakresie od 10 nm do 350 nm. Również w przypadku AgNPs otrzymanych z zastosowaniem 5 mL naparu z karczocha otrzymany histogram przedstawiający zależność intensywności rozproszonego światła od średnicy NPs cechuje się rozkładem bimodalnym, jednak maksima przesunięte są w kierunku mniejszych wartości wynoszących około 10 nm oraz 100 nm. Z kolei rozkład wielkości cząstek mieścił się w zakresie od 15 nm do 250 nm. Histogram przedstawiający zależność intensywność- średnia średnica AgNPs uzyskanych z użyciem wodnego naparu z czystka ma charakter monomodalny. Średnie średnice AgNPs otrzymanych z zastosowaniem wodnego naparu oraz ekstraktu z czystka wynoszą odpowiednio 69 nm i 71 nm. Mniejszą wartość średniej średnicy nanocząstek uzyskano w przypadku AgNPs stabilizowanych wodnym naparem z karczocha i wynosiła ona 41 nm. Obserwowany był również węższy rozkład wielkości cząstek, mieszczący się w zakresie od około 5 nm do 100 nm na histogramie przedstawiającym zależność objętości cząstek od ich średnicy hydrodymanicznej.

Warto zaznaczyć, że proponowana technika pomiarowa choć pozwala na pomiar wielkości cząstek aż do wielkości 1-2 nm, to ze względu na brak frakcjonowania zawiesiny na pomiar mogą mieć wpływ zarówno aglomeraty, jak również molekuły znajdujące się na powierzchni cząstek, gdyż pomiar z zastosowaniem techniki DLS odnosi się do średnicy hydrodynamicznej cząstek.
5.2.4. Analiza XRD oraz morfologia nanocząstek srebra

Rysunek 29. przedstawia dyfraktogramy rentgenowskie XRD nanocząstek Ag otrzymanych z zastosowaniem 5 mL naparu z karczocha (31A), naparu z czystka (31B) oraz ekstraktu z czystka (31C).



Rysunek 29. Dyfraktogramy rentgenowskie XRD nanocząstek Ag otrzymanych z zastosowaniem 5 mL naparu z karczocha (A), 5 mL naparu z czystka (B) oraz 5 mL ekstraktu z czystka (C).

Dyfraktogramy przedstawiają refleksy Bragga odpowiadające płaszczyznom krystalograficznych (111), (200), (220) oraz (311). Zgodnie z danymi z bazy ICDD® (nr 04-0783) refleksy te zostały przypisane regularnej sieci płasko centrowanej srebra (fcc), a obliczony parametr sieci wynosił a = 4,0862 Å. Analiza XRD potwierdziła krystaliczny charakter przygotowanych AgNPs. Warto jednak zwrócić uwagę, że intensywność pików na dyfraktogramie AgNPs przygotowanych z zastosowaniem naparu z karczocha była nieco mniejsza niż w przypadku pozostałych próbek.

Stopień krystaliczności (DOC) próbek obliczono za pomocą programu OriginPro 2023 według następującego wzoru (równanie 7.):

$$DOC = \frac{P_c}{P_c + P_a} \tag{7}$$

gdzie P_c odpowiada obszarom frakcji krystalicznej, z kolei P_a obszarom amorficznym. Uzyskane wyniki wykazały różnice w krystaliczności pomiędzy próbkami. Stopień krystaliczności AgNPs uzyskanych z zastosowaniem naparu oraz ekstraktu z czystka wynosił odpowiednio 17% oraz 15%. Najniższy stopień krystaliczności wynoszący 11% zaobserwowano w przypadku próbki AgNPs otrzymanej poprzez redukcję jonów srebra naparem z karczocha.

Otrzymane zawiesiny nanocząstek poddano również obrazowaniu z zastosowaniem skaningowego mikroskopu elektronowego. Mikrofotografie AgNPs przedstawiono na rysunku 32. Dodatkowo, przeprowadzono pomiar rozkładu wielkości nanocząstek Ag z zastosowaniem oprogramowania ImageJ.

Jak widać na rysunku 30. otrzymane nanocząstki cechowały się sferycznym lub zbliżonym do sferycznego kształtem. Ponadto zaobserwowano różnice w ich wielkości. Przedstawione mikrofotografie SEM ujawniły niejednorodność średnic uzyskanych AgNPs, co pozostaje w zgodzie z wynikami uzyskanymi techniką DLS. Za pomocą obrazowania SEM oraz analizy dystrybucji wielkości nanocząstek wykazano, że zarówno zakres średnic AgNPs uzyskanych z zastosowaniem naparu z karczocha, jak i naparu z czystka mieści się w zakresie od 10 nm do 70 nm. Niemniej jednak, w przypadku drugiej zawiesiny, przeważa liczba zliczeń odnosząca się do nanocząstek o średnicy 40 nm i większych. Analiza rozkładu wielkości AgNPs uzyskanych z zastosowaniem ekstraktu z czystka wykazała, że przedział ich średnic mieści się w zakresie od 40 nm do 120 nm. Wielkość nanocząstek, zgodnie z doniesieniami literaturowymi, może być ważnym czynnikiem decydującym o ich właściwościach antybakteryjnych oraz cytotoksyczności, co z puntu widzenia tematyki pracy jest ważnym aspektem.



Rysunek 30. Mikrofotografie SEM przedstawiające nanocząstki Ag uzyskane z zastosowaniem 5 mL: naparu z karczocha (A); naparu z czystka (B) oraz ekstraktu z czystka (C).

Badania nad wpływem wielkości nanocząstek na żywotność linii komórkowej L929 przeprowadzili Park i in. [311]. Autorzy wykazali, że AgNPs o średnicy 20 nm wpływały na zmniejszanie aktywności metabolicznej komórek L929 bardziej, niż większe nanocząstki (80 i 113 nm). Z kolei Korshed i in. wykazali zależność aktywności przeciwbakteryjnej AgNPs generowanych laserowo od ich wielkości [312]. Wyniki przedstawione przez autorów wykazały, że przeciwbakteryjne działanie nanocząstek Ag wytwarzanych laserowo jest odwrotnie proporcjonalne do wielkości cząstek. Wśród frakcji AgNPs o średnich rozmiarach w zakresie 19-47 nm, nanocząstki o średnicy 19 nm wykazywały najsilniejszy efekt bakteriobójczy względem bakterii *E. coli.* Również Dong i in. wskazali na zależność pomiędzy rozmiarami AgNPs a wartościami najmniejszych stężeń hamujących wzrost bakterii oraz minimalnych stężeń bakteriobójczych, wskazując, że mniejsze nanocząstki są skuteczniejszymi czynnikami bójczymi względem bakterii *Vibrio Natriegens*.

5.2.5. Ocena cytotoksyczności AgNPs

W celu dokonania oceny biozgodności otrzymanych nanostruktur srebra poddano je charakterystyce z zastosowaniem testu MTT, a uzyskane wyniki badań cytotoksyczności przedstawiono na rysunku 31. W tym celu przygotowano serię rozcieńczeń zawiesin AgNPs w zakresie od 500 ppm do 0.015 ppm w odniesieniu do wyjściowego stężenia Ag⁺.

Przeprowadzone badania dowiodły istnienia związku między cytotoksycznością, a stężeniem zawiesiny nanocząstek. Na rysunku 31A przedstawiono wyniki testu MTT nanocząstek Ag przygotowanych z zastosowaniem 5 mL naparu z karczocha. W badaniach wykazano, że zawiesiny AgNPs w zakresie stężeń 500 ppm- 3.9 ppm wykazują silną cytotoksyczność względem fibroblastów linii L929. Jednak AgNPs stosowane w stężeniach poniżej 4 ppm nie wywoływały efektu cytotoksycznego w stosunku do linii komórkowej L929. Zakres bezpiecznych stężeń naparu z karczocha w porównaniu do otrzymanych z jego zastosowaniem nanocząstek był szerszy i wnosił aż 25%, stąd można wnioskować, że obserwowana cytotoksyczność badanej zawiesiny AgNPs o wyższych stężeniach nie była



Rysunek 31. Przeżywalność komórek mysich fibroblastów L929 w obecności AgNPs uzyskanych z zastosowaniem 5 mL naparu z karczocha (A), 5 mL naparu (B) oraz 5 mL ekstraktu (C) z czystka. Wykresy przedstawiają wartości średnie ± SD (n=6).

związana z zastosowanym naparem, ale cytotoksycznością indukowaną przez same nanocząstki.

W przypadku AgNPs otrzymanych z zastosowaniem naparu oraz ekstraktu z czystka zakresy stężeń o działaniu cytotoksycznym wynoszą odpowiednio 15.63 ppm - 500 ppm oraz 31.25 ppm - 500 ppm. Co ciekawe, w przypadku naparu i ekstraktu z liści czystka zakres stężeń o działaniu cytotoksycznym był znacznie szerszy- akceptowalną przeżywalność komórek (70% zgodnie z normą ISO) osiągnięto dopiero dla roztworów rozcieńczonych do 0.2%.

Warto podkreślić, że napar i ekstrakt z liści czystka w zakresie stężeń od 0.39% do 1.56% wywołują działanie cytotoksyczne, podczas gdy odpowiadające im stężenia AgNPs pozostają bezpieczne. Efekt ten może być wynikiem utleniania niektórych związków pochodzenia roślinnego podczas redukcji jonów Ag do AgNPs, co prowadzi do powstawania mniej toksycznych lub nietoksycznych produktów.

5.2.6. Ocena właściwości prozapalnych AgNPs

Kolejnym etapem badań mającym na celu umożliwienie oceny biozgodności otrzymanych nanocząstek było przeprowadzenie badań *in vitro* stosując linię monocytów THP-1XBlueTM. Badanie to dało możliwość oceny działania prozapalnego otrzymanych zawiesin, poprzez pomiar indukcji NF- κ B. Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku 32. Poziom aktywności monocytów traktowanych poszczególnymi zawiesinami AgNPs przygotowanych z zastosowaniem naparu oraz ekstraktu z czystka nie wykazywały potencjału prozapalnego w stosunku do monocytów ludzkich. Dla porównania, monocyty traktowane standardową endotoksyną bakterii Gram-ujemnych (LPS *E. coli*) znacząco indukowały aktywację monocytów THP1-XBlueTM w porównaniu z nietraktowanymi hodowlami komórkowymi.

Nieznaczne przekroczenie tej wartości obserwuje się w przypadku nanocząstek Ag przygotowanych z użyciem naparu z karczocha, co może być efektem oddziaływania samego naparu, gdyż podobny efekt zaobserwowano w badaniach dotyczących właściwości prozapalnych naparów oraz ekstraktów (5.1.3. Ocena właściwości prozapalnych naparów oraz ekstraktów). Niemniej, istnieją również badania wskazujące na indukcję czynnika

transkrypcyjnego przez zawiesiny biogenicznych nanocząstek Ag o stężeniu od 10 µg/mL do 100 µg/mL [313]. Z drugiej jednak strony w przypadku nanocząstek Ag uzyskanych z zastosowaniem naparu oraz ekstraktu z czystka efekt aktywacji czynnika transkrypcyjnego nie był obserwowany. Rozbieżności między uzyskanymi wynikami, a doniesieniami literaturowymi mogą wynikać z zastosowania różnych czynników redukujących w procesie



Rysunek 32. Wyniki testu immunogenności AgNPs uzyskanych z zastosowaniem 5 mL naparu z karczocha (A), 5 mL naparu (B) oraz 5 mL ekstraktu (C) z czystka. Wykresy przedstawiają wartości średnie ± SD (n=6) zestawione z kontrolą ujemną NC (komórki nietraktowane AgNPs) oraz kontrolą pozytywną PC (komórki traktowane LPS *E. coli*). Dane przedstawiono jako wartość średnią ± SD (n=6).

pozyskiwania nanocząstek. Przeciwzapalne właściwości *C. incanus* zostały wielokrotnie udokumentowane w licznych badaniach. Wyniki uzyskane przez Zhu i in. wskazały, że kwas galusowy- składnik ekstraktu *C. incanus,* wykazuje działanie przeciwzapalne poprzez hamowanie szlaku NF-κB we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego [314].

Jako że uzyskane nanosuspensje stanowią mieszaninę fitochemikaliów oraz nanostrukturalnego Ag, nie można jednoznacznie stwierdzić prozapalnego działania AgNPs i przeciwnie - nie można go jednoznacznie wykluczyć, gdyż potencjalny efekt prozapalny jednego komponentu może być inhibitowany przez działanie drugiego. Można natomiast wnioskować, że wszystkie uzyskane nanosuspensje nie wykazują znacznego efektu prozapalnego względem ludzkich komórek monocytów.

5.2.7. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa nanocząstek Ag

Pomiaru aktywności przeciwdrobnoustrojowej nanocząstek Ag wobec szczepów bakteryjnych dokonano zgodnie z międzynarodowym standardowym protokołem ISO 20776-1. Procedury mikrorozcieńczeń w bulionie opisane w tej części normy ISO służą do wyznaczania minimalnych stężeń hamujących (MIC) definiowanych jako najniższe stężenie środka przeciwbakteryjnego, które zapobiega pojawieniu się widocznego wzrostu mikroorganizmu. Ponadto, tą samą procedurę zastosowano do określenia minimalnych stężeń bakteriobójczych (MBC). Eksperyment wykazał, że otrzymane nanocząstki wykazują działanie antybakteryjne względem szczepów *S. aureus* ATCC 25923 i *S. epidermidis* (tabela 15).

Najmniejsze wartości MIC oraz MBC wykazywały nanocząstki wytworzone z zastosowaniem naparu z karczocha. Z kolei najmniejszą aktywność przeciwdrobnoustrojową obserwowano w przypadku AgNPs otrzymanych przy użyciu ekstraktu z czystka. Można tutaj zaobserwować zależność pomiędzy rozmiarem nanocząstek oraz ich właściwościami antybakteryjnymi. Zgodnie z wynikami przedstawionymi w rozdziale *5.2.4. Analiza XRD oraz morfologia nanocząstek srebra,* to właśnie AgNPs wytworzone z użyciem naparu z karczocha cechowały się najmniejszymi rozmiarami, a te otrzymane z zastosowaniem ekstraktu z czystka- największymi. Może to potwierdzać zależność

-116-

właściwości antybakteryjnych od wielkości nanocząstek. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, w kolejnych etapach prac badawczych zdecydowano się stosować AgNPs otrzymane z zastosowaniem 5 mL naparu z karczocha.

Tabela 15. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa wyrażona odpowiednio jako minimalne stężenie hamujące (MIC) i minimalne stężenie bakteriobójcze MBC, oceniane metodą mikrorozcieńczeń (zgodnie z ISO 20776-1/2) w stosunku do szczepów *S. aureus* ATCC 25923 i *S. epidermidis* ATCC 12228.

Próbka AgNPs	S. aureus	ATCC 25923	S. epidermidis ATCC 12228	
	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)
Karczoch-napar	0.5	64	1	64
Czystek-ekstrakt	>256	>256	32	128
Czystek-napar	2	128	16	128

5.3. Charakterystyka fosforanów wapnia

5.3.1. Wydajność syntez hydroksyapatytu

Serię badań mającą na celu przedstawienie charakterystyki fosforanowych proszków ceramicznych rozpoczęto od badań wstępnych mających na celu określenie wpływu dodatków w postaci PVP oraz etanoloaminy na wydajność reakcji HAp. Na rysunku 33. przedstawiono procentową względną wydajność syntez przedstawioną w odniesieniu do HAp otrzymanego w temperaturze 40°C bez użycia dodatkowych stabilizatorów. Względną wydajność obliczono zgodnie z równaniem:

$$W = \frac{U_s}{U_w} \times 100\%$$

W - procentowa względna wydajność syntezy

Us - uzysk reakcji syntezy z zastosowaniem stabilizatora

Uw - uzysk reakcji syntezy bez stosowania stabilizatora



Rysunek 33. Wydajność reakcji syntez HAp otrzymanego w temperaturze 40°C w obecności stabilizatorów w odniesieniu do reakcji w środowisku wodnym.

Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić, że zarówno stosowanie polimerowego stabilizatora (PVP), jak i etanoloaminy wpływa na wydajność reakcji syntezy ceramiki. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że wprowadzenie do układu reakcyjnego polimerowego stabilizatora o stężeniu 9% prowadziło do obniżenia wydajności reakcji względem reakcji odniesienia o 63%, podczas gdy dodatek etanoloaminy o takim samym stężeniu prowadzi do obniżenia wydajności reakcji o 70%. Obniżenie wydajności reakcji syntezy ceramiki może mieć związek ze zwiększającą się wraz ze stężeniem dodatków lepkością środowiska reakcyjnego, co w rezultacie może utrudniać nukleację krystalitów oraz opóźniać rozrost ziaren. W związku z niską wydajnością reakcji syntezy HAp w obecności stabilizatorów o największym stężeniu w dalszej części pracy skupiono się na charakterystyce fosforanów otrzymanych z zastosowaniem dodatków w ilości 3% oraz 6%.

5.3.2. Analiza składu fazowego fosforanów wapnia

Na rysunku 34. przedstawiono dyfraktogramy XRD ceramiki fosforanowej otrzymanej bez zastosowania stabilizatorów, suszonych w liofilizatorze (L), piecu komorowym (P) oraz suszarce laboratoryjnej (S). Na podstawie porównania pozycji refleksów braggowskich na dyfraktogramach (rys. 34) do standardu ICDD 9-432 można stwierdzić, że w zsyntetyzowanych materiałach bez względu na proces suszenia maksima dyfrakcyjne dla poszczególnych próbek występują w tych samych położeniach kątowych, a co za tym idzie - we wszystkich próbkach występuje tylko jedna faza krystaliczna - hydroksyapatyt (HAp)

Na dyfraktogramach można zaobserwować, że intensywność refleksów zmienia się zależnie od zastosowanej techniki suszenia. Piki o największej intensywności obserwuje się w przypadku proszku suszonego w piecu komorowym, z kolei najmniejsza intensywność refleksów odpowiada materiałom liofilizowanym. Większa intensywność refleksów jest związana z wyższą krystalicznością otrzymanych produktów, na którą wpływa temperatura suszenia, bądź dodatkowej obróbki termicznej np. kalcynacji. Wraz ze wzrostem temperatury procesu obserwuje się wzrost intensywności refleksów braggowskich [315].



Rysunek 34. Dyfraktogramy XRD próbek HAp otrzymanych w temperaturze 40°C bez użycia dodatkowych stabilizatorów.

Na rysunku 35. Przedstawiono dyfraktogramy XRD ceramiki fosforanowej otrzymanej w środowisku zawierającym dodatkowe stabilizatory - PVP (3%) oraz etanoloaminę (3%), suszonych w liofilizatorze (L), piecu komorowym (P) oraz suszarce laboratoryjnej (S). Podobnie jak w przypadku próbki otrzymanej bez stosowania modyfikatorów, zaobserwowano zależność intensywności pików od metody suszenia - dyfraktogramy materiałów suszonych w piecu komorowym cechowały się największą intensywnością refleksów, z kolei liofilizowanych - najmniejszą. Na podstawie dyfraktogramów można

również stwierdzić, że próbki otrzymane z zastosowaniem stabilizatorów wykazywały większą intensywność refleksów niż materiały otrzymane bez ich zastosowania (rysunek 34.). Dodatkowo stwierdzono, że pomiędzy próbkami suszonymi w ten sam sposób, ale otrzymanymi z zastosowaniem różnych stabilizatorów również zauważalna jest różnica w intensywności pików - dyfraktogramy fosforanów otrzymanych w środowisku zawierającym PVP (3%) wykazywały większą intensywność refleksów.



Rysunek 35. Dyfraktogramy XRD próbek HAp otrzymanych w temperaturze 40°C z zastosowaniem dodatkowych stabilizatorów: PVP 3% (A) oraz etanoloaminy 3% (B).

Rysunek 36. przedstawia dyfraktogramy XRD materiałów ceramicznych otrzymanych w środowisku zawierającym dodatkowe stabilizatory - PVP (6%) oraz etanoloaminę (6%), suszonych w liofilizatorze (L), piecu komorowym (P) oraz suszarce laboratoryjnej (S). Analiza fazowa wykazała, że również w tym przypadku wszystkie otrzymane materiały były jednofazowe, a próbki syntezowane w środowisku etanoloaminy wykazywały mniejszą intensywność refleksów w porównaniu do materiałów otrzymywanych w środowisku PVP o stężeniu 6%. Dodatkowo, materiały otrzymywane z zastosowaniem stabilizatorów o tym stężeniu wykazywały mniejszą intensywność refleksów w porównaniu do ceramiki wytworzonej w środowisku zawierającym mniejsze stężenie stabilizatorów.



Rysunek 36. Dyfraktogramy XRD próbek HAp otrzymanych w temperaturze 40°C z zastosowaniem dodatkowych stabilizatorów: PVP 6% (A) oraz etanoloaminy 6% (B).

W przypadku materiałów otrzymywanych w temperaturze wrzenia wody wpływ stabilizatorów na intensywność pików nie jest widoczny (rysunek 37). Refleksy na wszystkich

dyfraktogramach cechują się wysoką intensywnością oraz wyraźnym rozdziałem, co jest charakterystyczne dla materiałów o wysokim stopniu krystaliczności.



Rysunek 37. Dyfraktogramy XRD próbek HAp otrzymanych w temperaturze 100°C z zastosowaniem dodatkowych stabilizatorów: PVP 3% (A) oraz etanoloaminy 3% (B).

W celu przeprowadzenia dokładnej analizy dyfraktogramów dla poszczególnych materiałów wyznaczono ich stopień krystaliczności DOC oraz przeanalizowano intensywność dwóch refleksów odpowiadającym płaszczyznom krystalograficznym (211) oraz (112) (tabela 16). Bazując na wartościach DOC obliczonych na podstawie poszczególnych dyfraktogramów potwierdzono, że stopień krystaliczności otrzymanych materiałów zależy zarówno od metody suszenia, jak również od stosowanego stabilizatora oraz jego stężenia. Najwyższe stopnie krystaliczności zaobserwowano w przypadku próbek suszonych w piecu komorowym, a ich wartości mieściły się w zakresie od 85.05% do 88.80%. Z kolei DOC próbek liofilizowanych we wszystkich wariantach syntezy wykazywał najmniejsze wartości i wynosiły one od 51.46% do 65.94%.

Stabilizator	Metoda suszenia	DOC [%]	I (211)	I (112)	Wielkość krystalitów [nm]
Duals at all iline to m/and	L	54.13	393	242	33.1 ± 3.2
Brak stabilizatorow,	S	67.96	536	334	36.8 ± 2.1
40°C	Р	85.05	740	388	38.2 ± 4.0
	L	65.94	575	320	21.2 ± 2.5
PVP 3%, 40°C	S	69.43	603	386	24.4 ± 2.3
	Р	88.80	818	500	28.7 ± 1.9
	L	62.37	472	279	21.3 ± 4.2
PVP 6%, 40°C	S	67.16	546	347	24.6 ± 3.1
	Р	87.44	779	454	29.1 ± 2.9
DUD 20/ 1000C	L	84.92	813	431	34.3 ± 3.6
PVP 3%, 100°C	Р	88.56	856	507	34.5 ± 4.5
Eter ale arrive 20/	L	54.13	446	274	23.6 ± 3.1
$40^{\circ}C$	S	67.96	538	335	25.6 ± 2.8
40°C	Р	85.15	787	467	29.1 ± 2.6
Eter al acomina (9/	L	51.46	439	255	26.8 ± 2.2
Etanoloamina 6%, 40°C	S	65.37	491	267	27.7 ± 3.2
	Р	88.44	760	370	31.7 ± 4.1
Etanoloamina 3%,	L	86.68	813	488	34.7 ± 4.5
100°C	Р	88.78	825	490	35.1 ± 4.2

Tabela 16. Stopień krystaliczności, wielkość krystalitów oraz intensywność refleksów odpowiadających płaszczyznom (211) i (112) otrzymanych materiałów fosforanowych.

Warto również zauważyć, że DOC materiałów uzyskanych w środowisku zawierającym stabilizatory o stężeniu 3% w porównaniu do fosforanów uzyskanych w środowisku zawierającym stabilizatory o stężeniu 6% wykazywało wyższe wartości. Podobną tendencję oddają wartości intensywności refleksów braggowskich zestawionych w tabeli 16. Na podstawie przedstawionych wyników można wnioskować, że materiały uzyskane w środowisku zawierającym stabilizatory o stężeniu 3% wykazują wyższy stopień krystaliczności. Jednak zastosowanie wyższego stężenia może wpływać znacząco zarówno na wydajność reakcji syntezy, jak i krystaliczność produktów, obniżając jej wartość. Może to potwierdzać tezę, że po przekroczeniu granicznej wartości stężenia stabilizatora nukleacja oraz

krystalizacja ziaren fosforanu jest utrudniona, co skutkuje zarówno obniżeniem krystaliczności produktu, jak i wydajności reakcji syntezy HAp. Po wyznaczeniu szerokości połówkowych i wartości katów Θ dla wszystkich analizowanych próbek obliczono również średnie wielkości krystalitów. Obliczone wartości mieściły się w zakresie od 21.2 ± 2.5 nm do 38.2 ± 4.0 nm. Największe średnie średnice krystalitów obserwowano w przypadku materiałów uzyskanych na drodze syntezy bez dodatków organicznych oraz w przypadku próbek otrzymanych w temperaturze wrzenia w układzie reakcyjnym zawierającym stabilizatory o stężeniu 3%. Pośród próbek otrzymanych z zastosowaniem tego samego rodzaju stabilizatora, ale różniących się sposobem suszenia produktu widoczne jest, że największymi rozmiarami krystalitów cechują się materiały suszone w piecu komorowym. Jednak ze względu na fakt, że metoda oparta na równaniu Debye'a-Scherrera bazuje na zależności pomiędzy poszerzeniem profilu linii dyfrakcyjnych, a wielkością krystalitów i zawiera jako składową stałą K związaną z kształtem, to w przypadku krystalitów innych niż sferyczne, rzeczywista wielkość krystalitów może znacząco różnić się od obliczonej. Dlatego też w dalszej części pracy zweryfikowano wyliczenia opierając się na metodzie obrazowania z zastosowaniem skaningowego mikroskopu elektronowego.

5.3.3. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera

Widma ATR-FTIR hydroksyapatytu niemodyfikowanego oraz proszków otrzymanych z zastosowaniem modyfikatorów zaprezentowano na rysunkach 38 - 41. Analiza absorpcyjnych widm w podczerwieni wszystkich proszków potwierdziła występowanie charakterystycznych dla HAp grup funkcyjnych. Zestawienie wszystkich charakterystycznych pasm widocznych na widmach FTIR proszków HAp prezentuje tabela 17.

Cząsteczki hydroksyapatytu zawierają w swojej strukturze grupy fosforanowe oraz hydroksylowe, które są aktywne w zakresie widma podczerwieni, dzięki czemu możliwa jest ich detekcja [316]. Jony fosforanowe, podobnie jak wszystkie jony lub cząsteczki o geometrii tetraedralnej, wykazują cztery rodzaje drgań wibracyjnych: v₁, v₂, v₃ i v₄. Symetryczne rozciąganie, asymetryczne rozciąganie, symetryczne zginanie i asymetryczne zginanie to cztery podstawowe mody wibracyjne grup fosforanowych. Za obecność pików przy 1087 cm⁻¹ i 1026 cm⁻¹ odpowiadają asymetryczne drgania rozciągające (v₃) grupy fosforanowej, a pasmo przy liczbie falowej 962 cm⁻¹ jest związane z symetrycznymi drganiami rozciągającymi (v₁) grupy PO₄³⁻. Pasma odpowiadające drganiom zginającym v₄ występują przy liczbach falowych 563 cm⁻¹ i 599 cm⁻¹, podczas gdy drgania zginające v₂ zostały zauważone przy liczbie falowej 473 cm⁻¹.

Grupa funkcyjna	ınkcyjna Typ drgania	
O-H	v₅ rozciągające	3570
CO3 ²⁻	v₃ rozciągające (typ B)	1455
CO ₃ 2-	v₃ rozciągające (typ B)	1410
PO4 ³⁻ (P-O)	v₃ potrójnie zdegenerowane asymetryczne rozciągające	1090
PO4 ³⁻ (P-O)	v ³ potrójnie zdegenerowane asymetryczne rozciągające	1025
PO4 ³⁻ (P-O)	v1 niezdegenerowane symetryczne rozciągające	962
OH-	δ libracyjne	630
PO4 ³⁻ (O-P-O)	v4 potrójnie zdegenerowane zginające	600
PO4 ³⁻ (O-P-O)	v4 potrójnie zdegenerowane zginające	563
PO ₄ ³⁻ (O-P-O)	v2 podwójnie zdegenerowane zginające	473

Tabela 17. Zestawienie wszystkich charakterystycznych pasm widocznych na widmie FTIR proszków HAp.

Drugą grupą wykazująca aktywność w zakresie widma średniej podczerwieni jest grupa hydroksylowa, co można potwierdzić na podstawie pasm o niskiej intensywności w pobliżu liczb falowych 630 cm⁻¹ i 3550 cm⁻¹. Dodatkowo, w strukturze sieci krystalicznej HAp mogą występować dwa rodzaje podstawień jonów fosforanowych węglanowymi zwane podstawieniami typu A oraz B. Metoda spektroskopii w podczerwieni umożliwia obserwację obydwu typów podstawień bazując na różnicy położeń pasm, które im odpowiadają. Podstawienie grup węglanowych w miejsce jonów OH⁻ (typ A) identyfikowalne jest dzięki występowaniu pasm drgań węglanowych przy liczbach falowych wynoszących 1545 cm⁻¹ oraz 1450 cm⁻¹. Z kolei występowanie podstawień typu B obserwuje się w przy liczbach falowych wynoszących 1455 cm⁻¹, 1410 cm⁻¹ oraz 875 cm⁻¹ [317]. Obecność grup CO₃^{2–} w strukturze HAp może być skutkiem podstawienia grup PO₄^{3–} przez grupy węglanowe wewnątrz sieci krystalicznej (typ B) lub substytucją grup OH⁻ przez grupy CO₃^{2–} na powierzchni materiału (typ A). W otrzymanych materiałach zidentyfikowano pasma o relatywnie niewielkiej intensywności położone przy długościach fali wynoszących 1455 cm⁻¹, 1410 cm⁻¹ oraz 875 cm⁻¹, co pokazuje, że w strukturze otrzymanych fosforanów dochodzi do podstawień grup PO₄^{3–} grupami CO₃^{2–}, co odpowiada substytucjom typu B. Podstawienia tego rodzaju są typowe dla HAp otrzymywanego na drodze precypitacji w środowisku o zasadowym pH [318].



Rysunek 38. Widma FTIR proszków ceramicznych otrzymanych w temperaturze 40°C w niemodyfikowanym środowisku reakcyjnym.

Na otrzymanych widmach fosforanów nie zaobserwowano pasm mogących sugerować wpływ obecności modyfikatorów w układzie reakcyjnym na skład otrzymanych proszków - wszystkie zaobserwowane pasma zostały przypisane do grup funkcyjnych obecnych w hydroksyapatycie (tabela 17). Z drugiej strony, intensywność pasm materiałów suszonych z zastosowaniem poszczególnych metod była zmienna. Pasma o największej intensywności zaobserwowano w przypadku materiałów poddanych suszeniu w piecu komorowym, najniższą- liofilizowanych. Różnice te nie były widoczne w przypadku materiałów otrzymanych podczas syntezy w temperaturze wrzenia wody.

Zgodnie z badaniami przeprowadzonymi przez Hossain i in. intensywność pasm na widmach IR wzrasta wraz z temperaturą obróbki termicznej hydroksyapatytu, a zależność między intensywnością pików, a temperaturą jest liniowo skorelowana. Grupa badawcza przeprowadziła kompleksową analizę położenia oraz intensywności pasm odpowiadającym asymetrycznemu i symetrycznemu rozciąganiu w tetraedralnych grupach fosforanowych oraz drganiom zginającym grup fosforanowych i modów grup OH⁻ na podstawie spektrów FTIR proszków HAp otrzymanych na drodze mokrej syntezy, a następnie spiekanych w zakresie temperatur od 300°C do 1100°C. Mimo że widma FTIR wykazały identyczne położenie pasm w całym zakresie liczb falowych, to widoczne były różnice związane z intensywnością oraz rozdzieleniem poszczególnych pasm. Obserwowano stopniowy wzrost intensywności pasm położonych przy liczbach falowych wynoszących 563 cm⁻¹, 599 cm⁻¹, 630 cm⁻¹, 962 cm⁻¹, 1026 cm⁻¹ i 1087 cm⁻¹ wraz ze wzrostem temperatury spiekania. Naukowcy udowodnili tym samym, że istnieje wyraźna korelacja między intensywnością pików a temperaturą spiekania, co zostało potwierdzone wysokim współczynnikiem regresji liniowej. Ponadto, zaobserwowano rozdzielenie pików o wartościach liczb falowych wynoszących 962 cm⁻¹ i 1087 cm⁻¹, gdy temperatura spiekania przekraczała 700 °C [316]. Wpływ temperatury kalcynacji na właściwości naturalnego hydroksyapatytu pochodzącego z odpadów kości kurzych zbadali Bee i in [319]. Z zastosowaniem technik XRD oraz FTIR wykazali, że podwyższanie temperatury kalcynacji prowadzi do wzrostu intensywności pasm transmitancji, a zatem krystaliczności produktu, a jednocześnie obniża się zawartość CO₃²⁻ w sieci krystalicznej HAp.

-128-





-129-





-130-

5.3.4. Skaningowa mikroskopia elektronowa

W celu oceny geometrii oraz wielkości uzyskanych proszków ceramicznych przeprowadzona została ich charakterystyka mikroskopowa z zastosowaniem skaningowej mikroskopii elektronowej. Uzyskane mikrofotografie przedstawiono na rysunkach 41-45. Poszczególne materiały wykazywały różne cechy morfologiczne. Fosforany suszone w piecu komorowym cechowały się kształtem zbliżonym do sferycznego oraz wykazywały tendencję do tworzenia aglomeratów. Efekt ten jest widoczny zarówno w przypadku materiałów otrzymanych z zastosowaniem stabilizatorów, jak również fosforanów syntezowanych bez ich użycia.

Materiały otrzymane w środowisku zawierającym PVP o stężeniu 3% oraz 6% suszone w suszarce laboratoryjnej z wymuszonym obiegiem powietrza oraz liofilizowane wykazywały tendencję do tworzenia kryształów o wydłużonych kształtach. Podobny efekt uzyskany został w przypadku materiałów syntezowanych bez użycia modyfikatorów i suszonych w liofilizatorze. Te ostatnie cechowały się większymi średnimi długościami wynoszącymi 275 ± 63 nm. Syntetyczny HAp otrzymany w układzie reakcyjnym zawierającym PVP o stężeniu 3% również charakteryzował się wydłużonym kształtem kryształów, jednak w tym przypadku ich średnia długość wynosiła 144 ± 34 nm. Otrzymana ceramika nie tworzyła również relatywnie dużych aglomeratów. Z kolei w mieszaninie reakcyjnej zawierającej PVP o stężeniu 9% zostały uzyskane fosforany o strukturze nanoprętów i średniej długości wynoszącej 156 ± 43 nm.

Dodatek etanoloaminy w środowisku reakcyjnym nie wpływał na morfologię otrzymanych proszków. Bez względu na zastosowaną technikę suszenia wszystkie otrzymane materiały cechowały się nieregularnym kształtem oraz tendencją do tworzenia aglomeratów.















stabilizatora, suszonych w liofilizatorze (L), suszarce laboratoryjnej z wymuszonym obiegiem powietrza (S) oraz piecu



Rysunek 45. Mikrofotografie SEM proszków HAp otrzymanych w temperaturzr 100°C z zastosowaniem etanoloaminy (6%) jako stabilizatora (wiersz górny) oraz PVP (3%, wiersz dolny) suszonych w liofilizatorze.

W celu otrzymania materiału powłokowego o jednorodnej strukturze ważne było, aby jego ceramiczny komponent był równomiernie rozproszony w polimerowej matrycy, dlatego też w dalszej części badań skupiono się na materiałach fosforanowych wykazujących mniejszą skłonność do tworzenia aglomeratów otrzymanych w środowisku reakcyjnym zawierającym PVP.

Biorąc pod uwagę, że ziarna fosforanów zbudowane są z domen krystalicznych, wielkość krystalitów wyznaczona metodą Scherrera jest mniejsza w porównaniu z wynikami uzyskanymi na podstawie obserwacji mikroskopowych. Pomiarów średniej wielkości (długości) nanostruktur oraz wyznaczenia rozkładu wielkości ziaren dokonano z zastosowaniem oprogramowania ImageJ. Analiza rozkładu wielkości cząstek ujawniła, że długość nanostruktur uzyskanych bez użycia stabilizatora mieści się w zakresie od 100 nm do 450 nm i wykazuje rozkład gaussowski. Z kolei w przypadku materiałów uzyskanych z zastosowaniem PVP (3%) wytworzone nanocząstki cechują się mniejszą długością

nieprzekraczającą 200 nm. Z kolei długość ziaren fosforanów otrzymanych w środowisku zawierającym PVP o stężeniu 6% mieści się w zakresie od 50 nm do 250 nm.

Zgodnie z doniesieniami literaturowymi morfologia ziaren ma duży wpływ na zgodność biologiczną hydroksyapatytu. Jak pokazały wyniki badań przeprowadzonych przez Huang i in. [325] kształt nanocząstek HAp ma wpływ na ich cytotoksyczność. Badacze dokonali oceny wpływu nanometrycznego HAp o strukturze nanoprętów, nanoigieł oraz nanocząstek sferycznych na komórki mięśni gładkich. Badania przez nich przeprowadzone dowiodły, że zarówno nanoigły jak i nanopręty HAp nie powodowały statystycznie istotnego (P < 0.01) wpływu na apoptozę komórek. Z kolei nanocząstki sferyczne jak i w kształcie płytek znacząco obniżały przeżywalność komórek poddanych działaniu fosforanów oraz wpływały na obniżenie gęstości komórkowej i zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia reaktywnych form tlenu, generując stres oksydacyjny. Z kolei Li i in. w swojej pracy wskazali, że nanopręty HAp wykazują potencjał jako rodzaj nowego bioaktywnego wypełniacza do naprawy ubytków kostnych. Badacze zademonstrowali, że nanometryczny HAp o strukturze podobnej do pręcików wpływa na zwiększenie produkcji kolagenu typu I, będącego pośrednim wskaźnikiem osteogenezy, ekspresję fosfatazy alkalicznej odzwierciedlającej wczesny stopień osteogenności komórek macierzystych oraz osteokalcyny i osteopontyny, które są późnymi markerami osteogennymi dla tworzenia kości [320]. Pozytywny wpływ na wspomniane parametry może mieć związek z podobieństwem nanoprętów HAp do apatytów naturalnie występujących w kościach, będących strukturami charakteryzującymi się długością w zakresie 15-200 nm i szerokością od 10 nm do 80 nm [321].

5.3.5. Spektrometria emisyjna ze wzbudzeniem w plazmie indukowanej

Syntetyczny HAp o stechiometrycznym składzie (s-HAp) cechuje się określonym stosunkiem molowym Ca/P wynoszącym 1.67. Jeżeli wartość ta jest niższa i mieści się w zakresie 1.66-1.50, to otrzymany fosforan jest tzw. hydroksyapatytem z niedoborem wapnia. Jeśli natomiast wartość ta jest wyższa niż 1.67 - HAp z nadmiarem wapnia. W celu określenia stosunku molowego Ca/P zastosowano technikę spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem

w plazmie indukowanej. Wartości molowego stosunku Ca/P poszczególnych materiałów fosforanowych przedstawiono na rysunku 46. Przeprowadzona analiza wskazała nieznaczny spadek stosunku molowego Ca/P wraz ze wzrostem zawartości PVP w środowisku reakcyjnym w porównaniu do HAp otrzymanego w środowisku niezawierającym stabilizatora. Stosunki molowe Ca/P odpowiadające poszczególnym próbkom mieściły się w zakresie od 1.677 - 1.650, co odpowiada wartościom zbliżonym do stechiometrycznej. Zgodnie z badaniami przeprowadzonymi przez Stephanova i in. wzrost lepkości roztworu może utrudniać dyfuzję jonów wapnia. Proces krystalizacji HAp w roztworach rozpoczyna się od tworzenia niestabilnych klastrów Ca9(PO4)6, które następnie agregują i przekształcają się do ACP (amorficzny fosforan wapniowy), a następnie do krystalicznego HAp. Badania spektroskopowe FTIR przeprowadzone przez Li i in. pokazały, że polimery takie jak PEG, PVA czy PEG mają zdolność do kompleksowania jonów Ca²⁺ oraz opóźniania procesu tworzenia krystalicznego HAp [322].



Rysunek 46. Stosunek molowy Ca/P w fosforanach wapniowych otrzymanych w środowisku reakcyjnym zawierającym 3%, 6% oraz 9% PVP suszonych w suszarce z wymuszonym obiegiem powietrza oraz liofilizowanych.

W przypadku poliglikolu etylenowego wielu badaczy wykazało, że może on stanowić czynnik kontrolujący strukturę fosforanów wapnia. Qiu i in. udowodnili, że fosforany o strukturze nanometrycznej można wytworzyć metodą biomimetyczną przy użyciu Ca(NO₃)₂·4H₂O i (NH₄)₃PO₄·3H₂O i PEG6000, oraz że szybkość przenoszenia jonów Ca²⁺ można zmniejszyć przez dodanie PEG podczas procesu ich krystalizacji wpływając na skład produktu końcowego reakcji syntezy, co może mieć związek z interakcją polimeru oraz jonów wapnia udowodnioną przez Li i in. [323].

Z drugiej jednak strony wpływ PVP na stosunek molowy Ca/P nie został przedstawiony w piśmiennictwie. Niemniej, uzyskane wyniki wskazują, że obecność PVP, analogicznie do PEG, w układzie reakcyjnym, skutkuje obniżaniem wartości stosunku molowego Ca/P, co może mieć związek zarówno ze wzrostem lepkości roztworu reakcyjnego, jak i kompleksowaniem jonów Ca przez PVP.

5.3.6. Analiza powierzchni właściwej fosforanów wapnia metodą BET

Celem modyfikacji powierzchni biomateriału jest stworzenie określonego środowiska chemicznego i fizycznego, które zapewnia korzystną odpowiedź komórkową w procesie regeneracji tkanki. Pierwszym etapem zachodzącym po implantacji biomateriału w organizmie człowieka jest adsorpcja białek, na którą wpływa topografia powierzchni materiału. W związku z powyższym dokonano analizy otrzymanych fosforanów pod kątem ich charakterystyki strukturalnej.

Rozkład wielkości porów oraz powierzchnia właściwa otrzymanych produktów wyznaczone zostały na podstawie izoterm adsorpcji i desorpcji N² dla fosforanów otrzymanych bez stosowania PVP w środowisku reakcyjnym, jak i dla materiałów otrzymanych w mieszaninach reakcyjnych zawierających polimer. Wartości powierzchni właściwej określonej metodą BET, średniej średnicy oraz powierzchni porów wyznaczonej metodą BJH zostały przedstawione w tabeli 18.

Jak można zauważyć, wartości powierzchni właściwej poszczególnych materiałów HAp wykazały znaczące różnice zależne od zastosowanej metody suszenia. Suszenie proszku HAp

-139-

w suszarce laboratoryjnej doprowadziło do uzyskania fosforanów o powierzchni właściwej w przedziale 31.33 m²/g - 110.80 m²/g. Znaczny spadek powierzchni właściwej materiałów otrzymanych w środowisku zawierającym PVP i suszonych w temperaturze wynoszącej 105°C może być spowodowany właściwościami strukturalnymi poszczególnych proszków. Największą wartość powierzchni właściwej otrzymano w przypadku proszku uzyskanego bez zastosowania polimerowego stabilizatora. Materiał ten, w przeciwieństwie do pozostałych proszków suszonych w 105°C, odznaczał się strukturą o nieregularnym kształcie ziaren. Z kolei najniższą powierzchnią właściwą odznaczał się materiał suszony w piecu komorowym (22.34 M²/g). Procesy zachodzące w temperaturach przekraczających 600-700°C mogą wpływać na obniżenie powierzchni właściwej fosforanów na skutek spiekania ziaren HAp powodującego zmniejszenie przestrzeni pomiędzy ziarnami, co znajduje odzwierciedlenie w przedstawionych wynikach.

Próbka	Stężenie PVP [%]	Technika suszenia	Powierzchnia właściwa [m²/g]	Całkowita powierzchnia porów [cm³/g]	Średnia średnica porów [nm]
А	-	L	54.23	41.83	15.97
В	-	S	110.80	100.90	15.67
С	-	Р	22.34	16.11	11.76
D	3	S	31.33	24.27	9.66
E	6	S	37.04	28.33	10.72
F	9	S	40.22	29.83	10.75

Tabela 18. Parametry strukturalne wyznaczone dla HAp syntetyzowanych w układach reakcyjnych zawierających PVP o stężeniu 3%, 6% i 9% oraz otrzymanych bez użycia polimeru.

Podobny trend obserwuje się w przypadku całkowitej powierzchni porów. Najwyższymi wartościami liczbowymi parametru również charakteryzuje się materiał otrzymany w środowisku niezawierającym polimeru, suszony w suszarce z wymuszonym obiegiem powietrza. Z kolei najniższa całkowita powierzchnia porów została zaobserwowana w przypadku materiału suszonego w piecu komorowym. Fosforany otrzymane

z zastosowaniem PVP o zwiększającym się stężeniu cechuje, podobnie jak w przypadku powierzchni właściwej, nieznacznie rosnąca wartość parametru mieszczącego się w zakresie od 24.27 nm do 29.83 nm. Z kolei w przypadku średniej średnicy porów wzrost zawartości polimeru w układzie reakcyjnym, nie powoduje znacznych zmian w wartości średniej średnicy porów. Wartości wyznaczonych parametrów wydają się być zależne od struktury otrzymanych materiałów. W przypadku materiałów cechujących się ziarnami o wydłużonym kształcie obserwuje się obniżenie wartości ich powierzchni właściwej w porównaniu do materiałów o strukturze nieregularnej otrzymanych na drodze syntezy bez dodatku polimerowego stabilizatora suszonych w temperaturze 105°C. Na podstawie danych literaturowych można wnioskować, że powierzchnia właściwa HAp o strukturze nanometrycznej jest zależna od morfologii materiału. Ramis i in. w swojej pracy przedstawili charakterystykę HAp o strukturze nanoprętów, długości około 50 nm i średnicy w zakresie od 5 nm do 20 nm. Pomiary powierzchni właściwej komercyjnie dostępnych nanocząstek HAp metodą BET wykazały, że cechuje je duże rozwinięcie powierzchni przekraczające 100 m²/g [324]. Z kolei Minamisawa i in. uzyskali produkt o powierzchni przekraczającej 200 m²/g stosując oddziaływanie ultradźwiękami na komercyjnie dostępne nanocząstki HAp [325]. Charakterystyki proszków HAp o zróżnicowanej geometrii dokonali również Huang i in. [326]. Badacze wyznaczyli powierzchnię właściwą materiałów o strukturze nanoprętów o długości 115 nm ± 23 nm, nanoigieł o długości 189 nm ± 27 nm oraz nanocząstek sferycznych o średnicy 56 nm ± 9 nm. Najmniejszą powierzchnią właściwą cechował się materiał o strukturze nanoprętów ($25.04 \pm 2.03 \text{ m}^2/\text{g}$), zaś największą nanocząstki sferyczne (67.03 ± 6.98 m²/g). Z kolei proszki o strukturze nanoigieł cechowała powierzchnia właściwa o powierzchni $52.46 \pm 6.61 \text{ m}^2/\text{g}.$

Krzywe adsorpcji i desorpcji nanocząstek HAp przedstawiono na rys. 46. Wszystkie zarejestrowane izotermy, poza przedstawioną na rysunku 47B, odpowiadały V typowi izotermy adsorpcji z pętlą histerezy typu H3 (wg klasyfikacji IUPAC), która przypisywana jest agregatom cząstek kształtem zbliżonym do płytek. Z kolei pętla histerezy izotermy przedstawionej na rysunku 47B zbliżona jest do pętli typu H1, która jest przypisywana

materiałom porowatym, zbudowanym z prawie jednorodnych aglomeratów sferycznych [327].



Rysunek 46. Krzywe adsorpcji i desorpcji próbek materiałów A - E przedstawionych w tabeli

18.

5.4. Otrzymywanie i charakterystyka matryc polimerowych oraz materiałów polimerowo-ceramicznych

5.4.1. Kinetyka pęcznienia

Zdolność do pęcznienia jest ważnym parametrem materiałów o potencjalnym charakterze nośnika leku. W niniejszej pracy uwagę skupiono na materiałach powłokowych o charakterze nośnika substancji aktywnej o działaniu antybakteryjnym - nanocząstek srebra. Ważnym aspektem w układach o kontrolowanym uwalnianiu substancji czynnej jest szybkość pęcznienia jego nośnika. Należy tutaj zwrócić uwagę na zależność pomiędzy zdolnością sorpcyjną, a szybkością uwalniania substancji aktywnej do otoczenia. Materiały cechujące się dużą zdolnością do pęcznienia oraz wysoką szybkością pęcznienia, zgodnie z doniesieniami literaturowymi, charakteryzuje również szybsze uwalnianie substancji aktywnej do środowiska [328,329]. W kontekście zastosowania takich układów jako materiałów powłokowych na implanty tytanowe, należy również zwrócić uwagę na fakt, że nadmierna zdolność do pęcznienia materiału może wywierać niekorzystny wpływ na otaczające tkanki.

Na strukturę oraz zdolność do pęcznienia materiału można wpływać projektując jego skład. Aby zbadać zależność struktura-pojemność sorpcyjna, przeprowadzono badania kinetyki pęcznienia matryc polimerowych oraz kompozytów zawierających fazę ceramiczną - HAp, stosując model Voigta. Model Voigta odnosi do zależności między szybkością pęcznienia, a parametrem mocy, opisującym odporność materiału na dyfuzję ciekłego medium w jego głąb. Wykresy przedstawiające zdolność sorpcyjną poszczególnych matryc polimerowych (serie badawcze I - III) od czasu inkubacji w roztworze PBS przedstawiono na rysunku 47. Z kolei parametry szybkości τ poszczególnych próbek obliczone na podstawie modelu Voigta przedstawiono w tabeli 22. Na rysunku 47 A zaprezentowano wykresy przedstawiające kinetykę pęcznienia próbek serii badawczej I. W serii tej zastosowano zmienny stosunek objętościowy roztworu PEG (30%) do objętości czynnika sieciującego (PEGDA). Na podstawie przedstawionego wykresu można zauważyć, że wraz ze wzrostem

udziału czynnika sieciującego w materiale maleje jego zdolność sorpcyjna. Różnica zdolności sorpcyjnych po 3 dniach inkubacji w roztworze PBS pomiędzy materiałami o skrajnych udziałach czynnika sieciującego wynosi około 35%. Dodatkowo, wraz ze wzrostem zawartości PEGDA w materiale zauważalne są również znaczące różnice w wartościach parametru szybkości τ . Parametr ten określa czas, który jest niezbędny do osiągnięcia przez próbkę 63% całkowitej zdolności pęcznienia, a zatem im wyższa jest jego wartość, tym sorpcja ciekłego medium następuje wolniej. W przypadku serii badawczej I, wartości parametru τ mieszczą się w zakresie od około 62 minut do 130 minut, a ich wzrost następuje wraz ze wzrostem zawartości PEGDA w materiale.



Rysunek 47. Kinetyka pęcznienia matryc polimerowych otrzymanych w serii badawczej I (A), II (B) oraz III (C).
Na rysunku 47B przedstawiono wykresy prezentujące wyniki pomiaru pęcznienia w czasie próbek matryc polimerowych serii badawczej II. W serii tej otrzymano materiały polimerowe przygotowane z zastosowaniem roztworów PEG o zmiennym stężeniu - od 10% do 30%. Podobnie jak w przypadku serii badawczej I, przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić, że wraz ze wzrostem zawartości PEG w materiale, maleje jego zdolność sorpcyjna. Po 3 dniach inkubacji zdolność sorpcyjna próbek mieści się w zakresie od około 74% do 96%. Widoczne są również znaczne równice w wartości parametru τ - podobnie jak w przypadku PEGDA, wraz ze wzrostem zawartości PEG obserwuje się wzrost parametru τ . Oznacza to, że wzrost zawartości PEG w materiale czasu potrzebnego na osiągnięcie przez materiał 63% swojej całkowitej zdolności sorpcyjnej (tabela 19).

Seria badawcza	Symbol próbki	τ [min]	
	G5	61.7	
	G6	78.2	
I	G7	98.3	
1	G8	119.1	
	G9	121.8	
	G10	129.7	
	GV6	35.5	
	GV7	55.7	
II	GV8	88.6	
	GV9	121.8	
	GV10	128.2	
	G9	120.7	
Ш	G91	127.4	
111	G92	126.1	
	G93	124.3	

Tabela 19. Wartości wyznaczonego parametru szybkości τ dla poszczególnych próbek matryc polimerowych.

Rysunek 47C przedstawia wykresy prezentujące wyniki pomiaru pęcznienia w czasie próbek matryc polimerowych serii badawczej III, w przygotowaniu której użyto zmiennych objętości fotoinicjatora. Przeprowadzone pomiary wykazały, że poszczególne próbki nie wykazują znaczących różnic zarówno rozważając ich zdolność sorpcyjną, jak i wartości parametru τ.

Analiza kinetyki pęcznienia poszczególnych materiałów wykazała, że zarówno ilość czynnika sieciującego PEGDA, jak i polimeru PEG w materiałach ma wpływ na jego oddziaływanie z ciekłym medium inkubacyjnym Na postawie uzyskanych wyników można wnioskować, że wraz ze wzrostem zawartości PEGDA, jak i PEG, maleje zdolność sorpcyjna materiału. Z kolei zwiększenie udziału fotoinicjatora w mieszaninie reakcyjnej nie wywiera wpływu na kinetykę pęcznienia próbek.

Na podstawie przeprowadzonych badań wstępnych do dalszego etapu pracy wyselekcjonowano materiały zawierające odpowiednio 20 µL fotoinicjatora, 0.9 mL PEGDA oraz 5 mL roztworu PEG o stężeniu 30% (GV9) oraz 35% (GV10). Materiały ten cechowały się porównywalnymi parametrami porównywalnymi pęcznienia, co może mieć związek z wysyceniem przestrzeni w trójwymiarowej strukturze usieciowanego PEGDA przez łańcuchy PEG i stanowienia przez nie swego rodzaju zawady utrudniającej ciekłemu medium dyfuzję w głąb materiału przez sieć wzajemnie przenikających się łańcuchów (IPN, ang. *interpenetrating polymer network*). Warto również wspomnieć, że w tego typu układach możliwe jest dodatkowo tworzenie podsieci opartej na oddziaływaniach niekowalencyjnych - wiązaniach wodorowych, pomiędzy terminalnymi grupami hydroksylowymi PEG oraz grupami karbonylowymi pochodzącymi od PEGDA. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi obecność wiązań wodorowych wpływa również na właściwości adhezyjne materiału, co z punktu widzenia materiałów dedykowanych na powłoki wydaje się być korzystne [330].

Do wytypowanych matryc polimerowych, będących ośrodkiem rozpraszającym dla fazy ceramicznej, wprowadzono następnie nanometryczny HAp o strukturze nanoprętów w ilości 2.5% [m/V] w odniesieniu do objętości użytego roztworu PEG. Na rysunku 48. przedstawiono wykresy prezentujące wyniki pomiarów pęcznienia w czasie próbek kompozytów

-146-

polimerowo-ceramicznych inkubowanych w roztworze PBS przez 5 dni. Uzyskane wyniki pokazały, że wprowadzenie do polimerowej matrycy składnika ceramicznego skutkuje obniżeniem zdolności sorpcyjnej materiału o około 10% względem materiału niezawierającego fazy ceramicznej. Wydłużeniu uległ również czas potrzebny materiałom do osiągnięcia 63% swojej całkowitej zdolności sorpcyjnej. Wynika to z faktu, że obecność nanometrycznego HAp w strukturze trójwymiarowej sieci polimeru stanowi zawadę przestrzenną i skutecznie utrudnia dyfuzję ciekłego medium w jej głąb.



Rysunek 48. Kinetyka pęcznienia kompozytów polimerowo-ceramicznych.

5.4.2. Charakterystyka morfologii matryc polimerowych

W celu dokonania oceny strukturalnych różnic w morfologii matryc polimerowych o wzrastającej zawartości PEG, dokonano ich obrazowania z zastosowaniem skaningowej mikroskopii elektronowej. Na rysunku 49. przedstawiono mikrofotografie próbek matryc polimerowych oznaczonych symbolami G7V, G8V, G9V oraz G10V. Na mikrofotografiach jest wyraźnie widoczne, że struktura polimerowych matryc jest zależna od ich składu - wraz ze wzrostem stężenia roztworu PEG użytego w procesie otrzymania matrycy, struktura materiałów wykazuje większą nieregularność. Może to mieć związek ze zwiększającym się upakowaniem liniowych łańcuchów PEG w trójwymiarowej sieci PEGDA, ale również z charakterem oddziaływań pomiędzy komponentami matrycy wynikającymi np. z tworzenia wiązań wodorowych.



Rysunek 49. Mikrofotografie powierzchni matryc polimerowych G7V (A), G8V (B), G9V (C) oraz G10V (D).

5.4.3. Szybkość sedymentacji HAp

Aby otrzymać powłoki kompozytowe o równomiernym rozkładzie fazy stałej w osnowie ważne jest aby mieszanina, z której są wytwarzane, cechowała się odpowiednią stabilnością, a ziarna ceramiki będące jej składnikiem nie ulegały szybkiej sedymentacji. W celu określenia szybkości sedymentacji cząstek HAp w roztworze wykorzystanym do wytworzenia usieciowanej polimerowej matrycy, dokonano pomiarów szybkości sedymentacji z zastosowaniem systemu Multiscan MS20. System ten pozwala na rejestrację promieniowania elektromagnetycznego rozproszonego oraz przechodzącego przez próbkę, co umożliwia pomiar szybkości opadania cząstek w zawiesinie.

Pomiary przeprowadzono w naczyniach pomiarowych o objętości 3 cm³. Przed pomiarem próbki poddawano homogenizacji z zastosowaniem homogenizatora Polytron PT 2500E przez 5 minut. Wszystkie próbki zawierały jednakową ilość fazy ceramicznej wynoszącej 2.5% [m/V] względem objętości użytego roztworu PEG.



Rysunek 50. Wyniki pomiaru rozproszenia wstecznego (A) oraz transmitancji (B) dyspersji HAp (syntezowany bez użycia stabilizatorów, suszony w piecu komorowym) w mieszaninie GV9.

Rysunek 50. przedstawia wyniki pomiaru transmitancji oraz rozproszenia wstecznego dyspersji HAp otrzymanego w wyniku syntezy bez użycia stabilizatorów i suszonego w piecu

komorowym w mieszaninie GV9. Na wykresach przedstawiono również szybkość migracji wyznaczoną na podstawie położenia frontu migracji w kolejnych pomiarach. W przypadku mieszaniny zawierającej HAp suszony w piecu komorowym szybkość opadania cząstek była relatywnie duża i wyniosła 14.47±3.39 mm/min. Tak szybka sedymentacja cząstek ma prawdopodobnie związek z tworzeniem dużych aglomeratów fosforanu na etapie syntezy, co potwierdziła analiza morfologii otrzymanych proszków. Po 30 minutach pomiaru rozproszenie wsteczne promieniowania na próbce wyniosło 2%, z kolei transmitancja wzrosła do około 70%, co świadczy o znaczącej sedymentacji fazy ceramicznej.



Rysunek 51. Wyniki pomiaru rozproszenia wstecznego (A) oraz transmitancji (B) dyspersji HAp (syntezowany bez użycia stabilizatorów, liofilizowany) w mieszaninie GV9.

Na rysunku 51. przedstawiono wyniki pomiaru transmitancji oraz rozproszenia wstecznego dyspersji HAp, otrzymanego w wyniku syntezy bez użycia stabilizatorów i liofilizowanego,

zawieszonego w mieszaninie GV9. Analiza morfologii próbki ceramiki przeprowadzona na podstawie mikrofotografii SEM wykazała, że cechował się on strukturą nanoigieł o długości w zakresie od 100 nm do 450 nm. Na podstawie pomiarów transmitancji oraz rozproszenia wstecznego próbki mieszaniny można stwierdzić, że szybkość opadania stałych cząstek w fazie ciekłej wyniosła 6.23±1.21 mm/min, a wiec zachodziła mniej gwałtowanie niż w przypadku fosforanu suszonego w piecu komorowym. Pokazuje to również, że otrzymany produkt cechował się mniejszą skłonnością do tworzenia aglomeratów na etapie syntezy.



Rysunek 52. Wyniki pomiaru rozproszenia wstecznego (A) oraz transmitancji (B) dyspersji HAp (otrzymany w mieszaninie reakcyjnej zawierającej PVP o stężeniu 3%, suszony w suszarce laboratoryjnej) w mieszaninie GV9.

Rysunek 52. prezentuje wyniki pomiaru transmitancji oraz rozproszenia wstecznego dyspersji HAp, otrzymanego w wyniku syntezy w układzie reakcyjnym zawierającym PVP o stężeniu 3%, suszonego w suszarce z wymuszonym obiegiem powietrza, zawieszonego w mieszaninie GV9. Na podstawie pomiarów transmitancji oraz rozproszenia wstecznego próbki mieszaniny można wnioskować, że otrzymana dyspersja cechowała się stabilnością -

szybkość opadania stałych cząstek w fazie ciekłej wyniosła zaledwie 0.33±0.07 mm/min, co może mieć związek z nanometryczną strukturą fosforanu (nanopręty). Analiza jednocześnie pokazała, że otrzymany fosforan nie wykazuje tendencji do aglomeracji w mieszaninie polimerowej, co sugeruje wartość transmitancji nieprzekraczająca 1% podczas trwania całego pomiaru. Podobne wyniki otrzymano w przypadku analizy próbki, w której fazę rozpraszającą dla ceramiki stanowiła mieszanina GV10 (rysunek 53). Otrzymana wartość szybkości migracji frontu w tym przypadku była porównywalna i wynosiła 0.39±0.11 mm/min.



Położenie [mm]

Rysunek 53. Wyniki pomiaru rozproszenia wstecznego (A) oraz transmitancji (B) dyspersji HAp (otrzymany w mieszaninie reakcyjnej zawierającej PVP o stężeniu 3%, suszony w suszarce laboratoryjnej) w mieszaninie GV10.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że zarówno mieszanina GV9, jak i GV10 mogą być wykorzystywane do wytwarzania stabilnych dyspersji HAp w roztworze polimerów. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że równie ważną rolę odgrywa struktura fazy ceramicznej. Fosforany tworzące aglomeraty ulegają relatywnie szybkiej sedymentacji, z kolei materiały o strukturze nanoprętów tworzą zawiesiny, w których szybkość sedymentacji cząstek jest niska. Istotne jest, aby tak dobrać parametry poszczególnych składników, w przypadku roztworów polimerów - ich kompozycję, w przypadku ceramiki- jej strukturę, aby otrzymać dyspersję cechującą się wystarczającą stabilnością umożliwiającą jej wykorzystanie w procesie nanoszenia powłok. Oczywiście, pożądana jest dyspersja, która cechuje się wysoką stabilnością - cząstki stałe w niej zawieszone nie tworzą aglomeratów, ale również nie ulegają sedymentacji.

5.5. Otrzymywanie i charakterystyka powłok ceramiczno - polimerowych

Do przygotowania powłok zawierających fazę ceramiczną zastosowano:

- kompozycję polimerową zawierającą roztwór PEG o stężeniu 30% (5 mL), 0.9 mL
 PEGDA jako czynnika sieciującego (0.9 mL) oraz fotoinicjator (20 μL),
- nanostrukturalny HAp otrzymany w układzie reakcyjnym zawierającym roztwór PVP o stężeniu 3% w ilości 2.5% [m/V] względem objętości użytego roztworu PEG,
- nanocząstki srebra (otrzymane z zastosowaniem 5 mL naparu z karczocha jako reduktora oraz czynnika stabilizującego).

Stężenie AgNPs w otrzymanych kompozycjach wynosiło 4 ppm oraz 8 ppm (w odniesieniu do stężenia jonów Ag⁺). Podczas dodawania kolejnych składników mieszaninę poddawano ciągłej homogenizacji z zastosowaniem homogenizatora Polytron PT 2500E. 200 μL przygotowanej w taki sposób mieszaniny nanoszono na płytki ze stopu tytanu Ti-6Al-4V ELI o wymiarach 2 x 2.5 cm za pomocą pipety i równomiernie rozprowadzono na całej powierzchni płytki, a następnie umieszczono je w polu promieniowania lampy UV EMITA VP 60 (180 W) na 4 minuty w celu przeprowadzenia fotosieciowania powłok. Powierzchnię płytek przygotowano poprzez wytrawianie w roztworze kwasu fluorowodorowego (1%) przez 5 minut, a następnie dokładnie przemyto oraz wysuszono. Mikrofotografie powierzchni płytek

ze stopu tytanu Ti-6Al-4V przed oraz po wytrawieniu w 1% roztworze HF przedstawiono na rysunku 54. Zastosowanie zaproponowanej procedury pozwoliło na nadanie powierzchni płytek bardziej rozwiniętej, porowatej struktury.



Rysunek 54. Mikrofotografie SEM powierzchni płytek ze stopu tytanu Ti-6Al-4V przed (A, B) oraz po wytrawieniu (C,D) w 1% roztworze HF.

5.5.1 Analiza spektroskopowa w podczerwieni powłok polimerowoceramicznych

W celu wyjaśnienia zjawisk zachodzących podczas sieciowania kompozycji, otrzymane powłoki polimerowo-ceramiczne poddano analizie z zastosowaniem spektroskopii w podczerwieni z transformatą Fouriera. Fotosieciowanie z zastosowaniem PEGDA jako czynnika sieciującego oraz 2-hydroksy-2metylopropiofenonu jako fotoinicjatora przebiega w kilku etapach. Fotoinicjator poddany ekspozycji na działanie światła UV ulega dysocjacji na wysoce reaktywne rodniki: benzoilowy oraz 2-hydroksy-2-propylowy (etap I).

W drugim etapie reakcji fotosieciowania powstałe reaktywne rodniki atakują terminalne wiązania podwójne C=C czynnika sieciującego, w wyniku czego na widmach FTIR zanikają pasma pochodzące od tego wiązania znajdujące się przy liczbach falowych 1635 cm⁻¹ oraz 1619 cm⁻¹. Na skutek ataku wolnych rodników na wiązania podwójne dochodzi do konwersji wiązań C=C do wiązań kowalencyjnych C-C i powstania usieciowanej trójwymiarowej struktury polimerowej.

$$\bigcirc \overset{O}{\overset{H}} \overset{O}{\overset{H}} \overset{H}{\overset{C}} \overset{H}{\overset{C}} \overset{O}{\overset{H}} \overset{O}{\overset{H}} \overset{O}{\overset{H}} \overset{O}{\overset{H}} \overset{O}{\overset{C}} \overset{O}{\overset{H}} \overset{O}{\overset{C}} \overset{O}{\overset{H}} \overset{O}{\overset{C}} \overset{O}{\overset{O}} \overset{O}{\overset{C}} \overset{O}{\overset{C}} \overset{O}{\overset{O}} \overset{O}{\overset$$

Widma w zakresie podstawowej podczerwieni otrzymano zarówno dla czystych składników powłoki polimerowo-ceramicznej, jak i usieciowanych powłok (rysunek 55). Piki przy 2865 cm⁻¹ i 2880cm⁻¹ we wszystkich widmach przypisuje się asymetrycznym i symetrycznym drganiom rozciągającym grup C-H. Pasmo odpowiadające liczbie falowej 1720 cm⁻¹ przypisuje się drganiom rozciągającym C=O. W otrzymanych materiałach pasmo to przesuwa się w kierunku fal dłuższych (1728 cm⁻¹). Efekt taki może być związany z powstawaniem wiązań wodorowych w układzie, co powoduje osłabienie wiązania C=O.

Takie osłabione wiązanie ma niższą częstotliwość drgań niż pierwotne podwójne wiązanie karbonylowe, co powoduje przesunięcie jego pasma transmitancji w kierunku fal dłuższych [331].



Rysunek 55. Widma FTIR składników matrycy polimerowej, hydroksyapatytu oraz usieciowanych powłok polimerowo-ceramicznych GV9P oraz GV10P.

Dodatkowo, na widmach FTIR usieciowanych powłok polimerowo-ceramicznych brak jest pasm pochodzących od wiązań podwójnych C=C nieusieciowanego PEGDA (1635 cm⁻¹, 1619 cm⁻¹, 1407 cm⁻¹, 810 cm⁻¹), co potwierdza ich konwersję do wiązań pojedynczych C-C.

W tabeli 20. przedstawiono zestawienie pasm zarejestrowanych na poszczególnych widmach FT-IR. Pasma obserwowane w zakresie falowym 2880 - 2865 cm⁻¹ odpowiadają drganiom rozciągającym grupy CH₂. Kolejno, na wszystkich widmach zarejestrowano pasma przy liczbie falowej około 1455 cm⁻¹, za które odpowiadają drgania rozciągające w grupie CH₂. Z kolei pasma widoczne przy liczbach falowych 1350 cm⁻¹, 1271 cm⁻¹, 1240 cm⁻¹ odpowiadają kolejno drganiom wachlarzowym C-O-C, rozciągającym C-O oraz C-O-H. Przy niższych długościach fali, obserwowane są również pasma odpowiadające drganiom rozciągającym wiązań C-O-C, zginającym C-H oraz skręcającym grup CH₂. Na widmach materiałów powłokowych nie uwidoczniły się pasma pochodzące od fazy ceramicznej, co jest skutkiem nakładania się pasm pochodzących od poszczególnych grup funkcyjnych fosforanu z pasmami pochodzącymi od drgań grup funkcyjnych polimerowych komponentów.

W przypadku materiałów powłokowych nie obserwuje się pasm pochodzących od wiązań podwójnych C=C przy liczbach falowych 810 cm⁻¹, 1635 cm⁻¹, 1619 cm⁻¹, 1407 cm⁻¹. Na widmach widoczne są również przesunięcia maksimów odpowiadających za drgania konkretnych wiązań. Szczególnie widoczna jest zmiana położenia maksimum odpowiadającego drganiom rozciągającym wiązań C-O-C. Przesunięcia położeń pasm na widmach IR mogą mieć wiele przyczyn, zwłaszcza w przypadku, kiedy mamy czynienia z materiałem do wielokomponentowym. Takie środowisko sprzyja wzajemnym oddziaływaniom poszczególnych grup funkcyjnych, co może powodować przesunięcia pasm. Dodatkowo, również powstawanie nowych wiązań w procesie fotopolimeryzacji może wpływać na strukturę chemiczną materiału powodując przesunięcia maksimów pasm. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że zaproponowany skład materiałów pozwalał na otrzymanie powłok polimerowo-ceramicznych o usieciowanej strukturze. Wnioski takie można wyciągnąć na podstawie braku pasm odpowiadających wiązaniu podwójnemu C=C na widmach powłok. Analizując widma spektroskopowe oraz przesunięcia położenia pasm

-157-

grupy karbonylowej C=O w kierunku fal dłuższych można również przypuszczać, że komponenty polimerowej matrycy oddziałują ze sobą poprzez wiązania wodorowe. Zaproponowaną metodę otrzymywania powłok polimerowo-ceramicznych cechuje bezodpadowy charakter, a co równie ważne pozwala ona na wytworzenie powłok w trakcie krótkiej ekspozycji na promieniowanie UV.

Tabela 20. Zestawienie pasm zarejestrowanych na widmach FTIR dla czystych składników powłoki oraz powłok polimerowo–ceramicznych zawierających AgNPs o stężeniu 4 ppm [332-334].

PEGDA	PEG	G9VP, G10VP	
2865 cm ⁻¹ rozciągające CH2	2881 cm ⁻¹ rozciągające CH2	2880 cm ⁻¹ rozciągające CH2	
1720 cm ⁻¹ rozciągające C=O	_	1728 cm ⁻¹ rozciągające C=O	
1635 cm ⁻¹ symetryczne rozciągające C=C	_	-	
1619 cm ⁻¹ asymetryczne rozciągające C=C	-	-	
1453 cm ⁻¹ rozciągające CH2	1454 cm ⁻¹ rozciągające CH2	1455 cm ⁻¹ rozciągające CH2	
1407 cm ⁻¹ zginające –CH=CH2	_	_	
1350 cm ⁻¹ , 1295 cm ⁻¹ ,	1350 cm ⁻¹	1343 cm ⁻¹	
wachlarzowe C-O-C	wachlarzowe C-O-C	wachlarzowe C-O-C	
1271 cm ⁻¹ , rozciągające C-O	1278 cm ⁻¹ rozciągające C-O	1278 cm ⁻¹ rozciągające C-O	
1240 cm ⁻¹ rozciągające C-O-H	1240 cm ⁻¹ rozciągające C-O-H	1240 cm ⁻¹ rozciągające C-O-H	
1191 cm ⁻¹ rozciągające C = o (wiązanie akrylowe)	_	_	
-	1146 cm ⁻¹ wachlarzowe CH ₂	1146 cm ⁻¹ CH ₂ wachlarzowe	
1096 cm ⁻¹ rozciągające C-O-C	1095 cm ⁻¹ rozciągające C-O-C	1100 cm ⁻¹ rozciągające C-O-C	
985 cm ⁻¹ zginające C-H	1060 cm ⁻¹ rozciągające C-O	1060 cm ⁻¹ rozciągające C-O	
950 cm ⁻¹ skręcające CH ₂	950 cm ⁻¹ skręcające CH ₂	950 cm ⁻¹ skręcające CH ₂	
810 cm ⁻¹ rozciągające –CH=CH2	_		
	840 cm ⁻¹ CH ₂ skręcające	840 cm ⁻¹ CH ₂ skręcające	

5.5.2. Charakterystyka morfologii powłok

W celu zobrazowania morfologii otrzymanych powłok wykorzystano skaningową mikroskopię elektronową. Technika ta pozwoliła na zobrazowanie mikrostruktury wytworzonych powłok, jak i na zobrazowanie zjawisk zachodzących na ich powierzchni w symulowanym środowisku organizmu ludzkiego w kontakcie z płynem SBF, roztworem Ringera oraz sztuczną śliną. Mikrofotografie powłok polimerowo-ceramicznych G9VP oraz G10VP przedstawiono na rysunkach 56. oraz 57.

Na podstawie uzyskanych mikrofotografii można stwierdzić równomierne rozmieszczenie fazy ceramicznej w powłoce G9VP (rysunek 56.), choć poza drobnymi strukturami fosforanów widoczne są również pojedyncze większe aglomeraty o średnicy około 6 µm (czerwone strzałki). Na mikrogotografii widoczne są również pory powstałe w strukturze polimerowej osnowy, oznaczone niebieskimi strzałkami. Analiza rozkładu pierwiastków na powierzchni powłoki potwierdziła równomierne rozmieszczenie komponentu ceramicznego w ośrodku polimerowym oraz obecność srebra w powłoce.

Na rysunku 57. przedstawiono mikrofotografię powierzchni powłoki G10VP oraz rozkład pierwiastków na jej powierzchni. Analiza powierzchni powłoki potwierdziła regularne rozmieszczenie zarówno fosforanu jak i nanosrebra w polimerowej osnowie. Analiza rozkładu pierwiastków na powierzchni powłoki potwierdziła równomierne rozmieszczenie komponentu ceramicznego oraz srebra w powłoce.



Rysunek 56. Mikrofotografie oraz analiza rozkładu pierwiastków na powierzchni powłoki polimerowo-ceramicznej G9VP zawierającej AgNPs stężeniu 4 ppm.

Wytworzone powłoki poddano również inkubacji w płynach symulujących środowisko organizmu ludzkiego (SBF, sztucznej ślinie oraz płynie Ringera), w celu określenia, czy na powierzchni powłok dochodzi do samoistnego tworzenia struktur apatytowych biomineralizacji. Zjawisko to sprzyja tworzeniu się wiązania powłoki z otaczającą tkanką twardą, czyli osteointegracji implantu. Mikrofotografie powłok polimerowo-ceramicznych G9VP oraz G10VP zawierających AgNPs stężeniu 4 ppm poddane 3-dniowej inkubacji w płynach symulujących środowisko organizmu przedstawiono na rysunkach 58. oraz 59. Na



Rysunek 57. Mikrofotografie oraz analiza rozkładu pierwiastków na powierzchni powłoki polimerowo-ceramicznej G10VP zawierającej AgNPs stężeniu 4 ppm.

załączonych mikrofotografiach widać, że na powierzchni materiałów doszło do precypitacji kryształów o różnych kształtach i rozmiarach. Po 3 dniach powierzchnia powłoki G9VP inkubowanej w roztworze SBF była pokryta kryształami o wydłużonym kształcie, na powierzchni których zaobserwowano drobnokrystaliczne wydzielenia. Punktowa mikroanaliza EDS wykazała, że w skład powstałych wytrąceń wchodzą Ca, P oraz Na i Cl. Kryształy o podobnym wydłużonym kształcie zaobserwowano na powierzchni materiałów

inkubowanych w roztworze sztucznej śliny oraz płynie Ringera, co pozwala stwierdzić, że obserwowanymi podłużnymi wydzieleniami są kryształy NaCl, obecnego we wszystkich płynach immersyjnych. Pozwala to również zauważyć, że drobnokrystaliczne wytrącenia zaobserwowane na powierzchni materiałów inkubowanych w SBF są zbudowane z Ca oraz P, co z kolei prowadzi do wniosku, że już po 3 dniach inkubacji próbka G9VP wykazuje wczesne oznaki biomineralizaji.



Rysunek 58. Mikrofotografie oraz widma EDS powłoki ceramiczno-polimerowej G9VP zawierającej AgNPs stężeniu 4 ppm po 3-dniowej inkubacji w roztworze SBF (A, B), sztucznej ślinie (C, D) oraz płynie Ringera (E, F).

Rysunek 59. prezentuje mikrofotografie oraz widma EDS powłoki ceramicznopolimerowej G10VP zawierającej AgNPs stężeniu 4 ppm po 3-dniowej inkubacji w roztworze SBF, sztucznej ślinie oraz płynie Ringera. W przypadku próbki inkubowanej w płynie SBF również obserwuje się kryształy o zróżnicowanej morfologii, choć ich ilość jest mniejsza w porównaniu z zaobserwowanymi na powierzchni próbki G9VP po takim samym czasie. Również w tym przypadku obserwuje się wydłużone kryształy NaCl, ale również niewielkie skupiska fosforanów o kształcie krystalitów określanym w literaturze jako kalafiorowate (zaznaczono zieloną strzałką) typowe dla HAp [335].



Rysunek 59. Mikrofotografie oraz widma EDS powłoki ceramiczno-polimerowej G10VP zawierającej AgNPs stężeniu 4 ppm po 3-dniowej inkubacji w roztworze SBF (A, B), sztucznej ślinie (C, D) oraz płynie Ringera (E, F).

W przypadku obydwu powłok już po 3 dniach immersji w symulowanym płynie ustrojowym na ich powierzchni zaobserwowano drobnokrystaliczne wydzielenia fosforanowe. Efekt taki przez wielu naukowców nazywany jest bioaktywnością materiału, a metoda oparta na immersji nazywana testem bioaktywności materiału *in vitro* [336-338].

5.5.3. Pomiary mikrogeometrii powierzchni powłok

Ważnym aspektem w ocenie materiałów dedykowanych na implanty jest ich mikrogeometria. Wynika to z faktu oddziaływania komórek z powierzchnią materiału, co prowadzi do pewnej zależność między rozmiarem pojedynczej komórki, a geometrią materiału. Wykazano, że topografia powierzchni biomateriału wpływa na szerokie spektrum odpowiedzi komórkowych, w tym kontrolę adhezji, morfologię komórek oraz apoptozę i regulację genów. Topografia powierzchni zdaje się odgrywać ważną rolę w długoterminowej adhezji, podczas gdy jej początkowe stadium jest bardziej zależne od składu materiału [339]. Pory oraz wgłębienia w materiałach wpływają na migrację komórek - komórki chętnie migrują wzdłuż nich. Zaobserwowano, że komórki wydłużają się i organizują wzdłuż wgłębień inicjując tworzenie tkanki kostnej. Co ciekawe, wytwarzając powierzchnię o odpowiednich cechach, można również ograniczyć, bądź nawet nawigować wzrostem komórek. Na przykład, ograniczając wzrost komórek i kierując go do długiej i wąskiej ścieżki, stymulowano komórki śródbłonka do tworzenia trójwymiarowej rurki kapilarnej [340]. Na podstawie dostępnych danych literaturowych można stwierdzić, że odpowiednie warunki dla odpowiedzi komórkowej osteoblastów wywołuje topografia charakteryzowana średnią wielkością parametru Ra wynoszącego około 3 µm [341].

Na rysunku 60. Przedstawiono wizualizację cech stereometrycznych oraz parametry Ra oraz Rz powierzchni płytki stopu Ti po wytrawieniu, matryc polimerowych G9V oraz G10V oraz powłok polimerowo-ceramicznych G9VP i G10VP. Mikrogeometria poszczególnych materiałów próbek wykazuje zauważalne różnice w wartościach parametrów chropowatości Ra i Rz. W wyniku wprowadzenia fazy ceramicznej do układów polimerowych, zauważalny jest wzrost wartości parametrów Ra oraz Rz dla obydwu próbek.

-164-



Rysunek 60. Wizualizacja cech stereometrycznych i parametry Ra oraz Rz powierzchni płytki stopu Ti po wytrawieniu (A), matryc polimerowych G9V (B) i G10V (C) oraz powłok polimerowo-ceramicznych G9VP (D) oraz G10VP (E).

Największą wartością średniej arytmetycznej rzędnych (Ra) profilu, cechuje się powłoka polimerowo-ceramiczna o największej zawartości PEG (G10VP), z kolei najmniejszą - płytka stopu Ti. Analogiczną tendencję zauważono analizując wyniki pomiarów średnich wysokości profili (Rz). Pomiary mikrogeometrii pozwoliły również na pokazanie zauważalnych różnic w wartościach parametrów Ra oraz Rz pomiędzy polimerowymi matrycami, a powłokami polimerowo-ceramicznymi. W przypadku tych pierwszych wartości parametru Ra nie przekraczają 2.45 µm, a wielkość Rz wynosi maksymalnie 17.21 µm. Z kolei powłoki zawierające fazę ceramiczną cechują się o około 35% wyższymi wartościami parametrówzarówno Ra, jak i Rz. Przedstawione na rysunku 60. wizualizacje mikrogeometrii powierzchni materiałów pozostają w zgodzie z mikrofotografiami uzyskanymi z zastosowaniem obrazowania mikroskopem skaningowym. Wyeksponowane zostały charakterystyczne cechy powierzchni poszczególnych próbek, co szczególnie dobrze widać w przypadku matryc polimerowych G9V oraz G10V. Analiza mikrogeometrii powłok wykazała, że dodatek fazy ceramicznej do polimerowej matrycy nie tylko wpływa na zwiększenie parametrów Ra oraz Rz, ale również zmienia strukturę powierzchni materiałów, powodując zanik charakterystycznych pasm oraz skupisk widocznych na rysunkach 49C oraz 49D. Dodatkowo, wprowadzenie fazy ceramicznej powoduje powstanie na powierzchni materiału nierówności, co może być skutkiem ekspansji przestrzeni między łańcuchami polimerowej osnowy przez ziarna HAp.

5.5.4. Badania przyczepności powłok metodą odrywową (Pull-Off)

Pomiaru przyczepności wytworzonych powłok polimerowo-ceramicznych dokonano stosując metodę odrywową zgodnie z PN-EN ISO 4624: 2004. W tej metodzie wykorzystuje się przyklejony do powłoki stempel pomiarowy, który odrywany jest przy pomocy hydraulicznego siłownika. Pomiary adhezji powłok wykonuje się w temperaturze $23 \pm 2^{\circ}$ C, przy wilgotności względnej powietrza wynoszącej $50 \pm 5\%$. Po oderwaniu stempla ocenie podlega stan powierzchni badanej powłoki oraz stempla, celem ustalenia rodzaju powstałego oderwania. Miarą adhezji powłoki do podłoża jest najmniejsze naprężenie rozciągające, niezbędne do oderwania najsłabszej powierzchni granicznej (adhezja powłok) lub najsłabszego miejsca badanego układu powłokowego (kohezja powłok). Wyniki uzyskanych pomiarów przedstawiono w tabeli 21. jako średnią z trzech pomiarów. Pomiary wykonano dla powłok zawierających AgNPs o stężeniu 4 ppm naniesionych na podłoże poddane działaniu roztworu kwasu HF (1%) oraz podłoże nietrawione. Uzyskane wyniki pomiarów naprężenia rozciągającego mieściły się w zakresie od 0.60± 0.091 MPa do 0.84± 0.042 MPa. Siła rozciągająca wykazywała większą wartość w przypadku obydwu powłok naniesionych na podłoże poddane trawieniu. Próbki różniące się składem i naniesione na podłoże przygotowane poprzez wytrawienie wykazywały niewielkie różnice wartości uzyskanych naprężeń rozciągających w teście pull-off. Poza wzrostem naprężeń wymaganych do zerwania powłoki, zmienił się również rodzaj oderwania powłoki. W przypadku powłok naniesionych na podłoże nietrawione dominuje oderwanie adhezyjne między powłoką a podłożem B/Y (60%), z kolei oderwanie powłok naniesionych na podłoże trawione roztworem kwasu HF następuję z przeważającym mechanizmem Y/B, czyli oderwaniem adhezyjnym między warstwą kleju a powłoką (60%). Wynika to z faktu, że powierzchnia wytrawiona jest silniej rozwinięta, co powoduje, że powierzchnia kontaktu adhezyjnego powłoki z podłożem o wyższej chropowatości jest większa, a to zapewnia silniejszą adhezję powłoki.

Pomiar	Próbka	Naprężenie rozciągające [MPa]	Rodzaj oderwania powłoki	Stan podłoża
1	GV9P	0.60 ± 0.091	60% B/A,	Nistraviana
2	GV10P	0.63 ± 0.102	40% Y/B	Nietrawione
3	GV9P	0.82 ± 0.097	40% B/A	Tuesdiana
4	GV10P	0.84 ± 0.042	60% Y/B	Trawlone

Tabela 21. Wyniki pomiaru naprężeń rozciągających uzyskane w teście pull-off.

Y/B- oderwanie adhezyjne między warstwą kleju a powłoką

B/A- oderwanie adhezyjne między powłoką a podłożem.

5.5.5. Mikroskopia konfokalna

Badaniom z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego poddano komórki mysich fibroblastów inkubowanych w obecności badanych materiałów. Z przeprowadzonych badań zilustrowanych na rysunku 61. wynika, że materiały powłokowe w odniesieniu do próbki odniesienia, którą stanowiła wytrawiona płytka stopu Ti, wpływały pozytywnie na morfologię komórek, powodując silne wydłużanie ich wypustek cytoplazmatycznych, tym samym indukując zdolność adhezyjną komórek. Również liczebność obserwowanych komórek jest w tym przypadku większa.



Rysunek 61. Obrazy z mikroskopii konfokalnej komórek L929 po 24-godzinnej hodowli w obecności wytrawionej płytki stopu Ti (A) oraz podłoża z powłoką G9VP o stężeniu AgNPs wynoszących 4 ppm (B) oraz 8 ppm (C) i podłoża z powłoką G10VP o stężeniu AgNPs wynoszących 4 ppm (D) oraz 8 ppm (E).

Na rysunku 61B oraz 61C przedstawiono komórki inkubowane w obecności materiału G9VP i stężeniu nanocząstek Ag wynoszących kolejno 4 ppm oraz 8 ppm. W obydwu przypadkach obserwowane są komórki o wydłużonych wypustkach cytoplazmatycznych, jednak w przypadku materiału zawierającego większe stężenie AgNPs liczebność obserwowanych komórek jest mniejsza. Analogiczną tendencję zaobserwowano na obrazach prezentujących komórki poddane działaniu płytki stopu Ti z powłoką G10VP. Choć warto zauważyć, że liczebność obserwowanych komórek w przypadku tego materiału jest mniejsza. Może to być spowodowane uwarunkowaniami strukturalnymi, takimi jak na przykład różnica w wielkości porów poszczególnych materiałów wykazana na mikrofotografiach SEM, czy też różnice w parametrach Ra oraz Rz.

Dodatkowo, rozmieszczenie utrwalonych komórek zdaje się wykazywać pewną tendencję. W obydwu przypadkach komórki rozmieszczone są w charakterystyczny sposób, co może sugerować, że na powierzchni materiału fibroblasty preferują pewne określone miejsca, którymi przykładowo mogą być zagłębienia nierówności obserwowane na rysunku 60. Niemniej, wszystkie komórki w obecności badanych materiałów wykazują zdolność do elongacji, a ich jądra emitują intensywny sygnał fluorescencyjny i nie wykazują zmian w chromatynie jądrowej. Nie zaobserwowano również kurczenia się oraz wakuolizacji komórek, czy też degradacji ich błon komórkowych na skutek oddziaływania z badanymi materiałami, które świadczyłyby o rozpoczęciu procesu apoptozy komórkowej.

5.5.6. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa powłok

Aktywność przeciwdrobnoustrojową otrzymanych powłok G9VP naniesionych na płytkę stopu Ti badano wobec dwóch szczepów bakteryjnych z rodzaju *Staphylococcus: S. aureus* (ATCC 25923) i *S. epidermidis* (ATCC 12228) stosując test oparty na enzymatycznej redukcji soli tetrazolowej MTT. Wyniki zaprezentowano na rysunku 62. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że wytworzone materiały powłokowe wpływają na żywotność zarówno bakterii gronkowca, jak i szczepu *S. epidermidis*, a efektywność ich działania zależy od zawartości AgNPs w powłoce. W przypadku obydwu szczepów obserwuje się obniżenie

ich żywotności o około 30% podczas inkubacji w obecności płytek z powłoką zawierającą AgNPs o stężeniu 4 ppm oraz o około 50% w przypadku większej zawartości AgNPs w powłoce. Nieco silniejsze działanie przeciwbakteryjne powłok obserwuje się wobec bakterii *S. epidermidis*. Bakteria ta jest drobnoustrojem, który powoduje infekcje szczególnie u osób z osłabioną odpornością. Wyróżnia się zdolnością do przylegania do powierzchni jedynie dzięki wytwarzanemu śluzowi, bez udziału receptorów. Z tego względu szczególnie predysponowani do zakażenia tym drobnoustrojem są chorzy po niedawno przebytej operacji wszczepiania sztucznych zastawek lub implantów, cewnikowani, zaintubowani oraz dializowani i dlatego też bakteria często powoduje tzw. zakażenia wewnątrzszpitalne. Leczenie zakażenia tą bakterią najczęściej opiera się na dożylnym podawaniu wankomycyny [342]. Warto jednak zaznaczyć, że wśród bakterii Gram(+) oporność na wankomycynę jest coraz częstsza, co stanowi poważny problem dla zdrowia publicznego ze względu na fakt, że to właśnie wankomycyna jest preferowanym sposobem leczenia opornych na antybiotyki organizmów Gram(+).



Rysunek 62. Przeżywalność komórek bakteryjnych *S. aureus* (A) i *S. epidermidis* (B) w obecności powłok polimerowo-ceramicznych G9VP zawierających zmienne stężenie AgNPs. Wykres prezentuje wartości średnie ± SD (n=6) . Kontrolę pozytywną stanowiła płytka Ti.

Otrzymane materiały powłokowe wykazały również aktywność przeciwdrobnoustrojową względem bakterii *S. aureus* obniżając ich przeżywalność. Zakażenie bakterią *S. aureus* bardzo często cechuje długi czas utajnienia. Podobnie jak w przypadku *S. epidermidis*, zwiększone ryzyko zakażenia dotyczy chorych po zabiegach chirurgicznych (zakażenie miejsca operowanego), z wszczepionymi implantami, a także poddawanych długotrwałej antybiotykoterapii [343]. Otrzymane wyniki pokazują, że zastosowanie powłok zawierających AgNPs może stanowić narzędzie wspomagające walkę z zakażeniem *S. epidermidis* oraz *S. aureus*. Warto podkreślić, że w trakcie trwania 24-godzinnego eksperymentu zawiesina bakteryjna została zastąpiona świeżą, w celu zasymulowania cięższego zakażenia bakteryjnego.

5.5.7. Ocena adhezji komórek bakterii

Ostatnim etapem prac badawczych mającym dać głębszy wgląd w aktywność przeciwdrobnoustrojową powłok, była ocena adhezji bakterii do wytworzonych powłok. Obrazowania struktur bakteryjnych dokonano z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego, a otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku 63. Trójwymiarowe obrazy pokazują obecność biofilmów bakteryjnych o zwartej oraz regularnej, homogenicznej strukturze zarówno w przypadku płytek stopu Ti, jak i powłoki niezawierającej AgNPs. Grubość warstwy bakteryjnej *S. usreus* sięga 30 µm w przypadku płytki niepowleczonej oraz 18 µm na powłoce niezawierającej AgNPs.



Rysunek 63. Analiza struktur bakteryjnych utworzonych na płytce ze stopu Ti oraz powłokach zawierających nanocząstki Ag.

Wywnioskować więc można, że zastosowanie powłoki opartej na układzie zawierającym roztwór PEG o stężeniu 30% ogranicza wzrost biofilmu bakteryjnego. Dodatek nanocząstek powoduje dalsze zmniejszanie grubości warstwy bakteryjnej na materiale do wartości 12 µm. Wyraźnie widoczne są również braki ciągłości struktury biofilmu uformowanego podczas inkubacji bakterii z powłokami zawierającymi AgNPs, a w niektórych przypadkach wręcz jego miejscowy brak.

Przedstawione wyniki, choć nie wskazują na stuprocentową skuteczność antybakteryjną otrzymanych materiałów, to są bardzo obiecujące z punktu widzenia ograniczania rozwoju niebezpiecznego biofilmu bakteryjnego na implantach medycznych. W organizmach żywych biofilmy definiuje się jako złożone zbiorowiska bakterii rezydujących w matrycy egzopolisacharydowej, która przylega do powierzchni. W szpitalach są one zazwyczaj przyczyną przewlekłych i związanych z procedurami chirurgicznymi infekcji. Ze względu na oporność bakterii tworzących biofilm na antybiotyki stosowanie ich jako jedynego kierunku w terapii może skutkować jej niepowodzeniem. Zarówno bakterie Gram-dodatnie, jak i Gramujemne mogą tworzyć biofilmy na wyrobach medycznych, ale najczęściej występującymi są bakterie *Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus viridans, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis* i *Pseudomonas aeruginosa*. Szacuje

się, że wśród nich to właśnie *S. aureus* i *S. epidermidis* powodują około 40-50% infekcji sztucznych zastawek serca, 50-70% infekcji cewników oraz 87% infekcji krwi. Również dwie trzecie zakażeń związanych z implantami są spowodowane przez gatunki gronkowców, przy czym większość jest wywoływana przez *S. aureus i* gronkowce koagulazoujemne [344]. Otrzymane wyniki pokazują, że dodatek AgNPs do powłok wpływa na dezintegrację biofilmu bakteryjnego oraz obniża żywotność bakterii *S. sureus* i *S. epidermidis*, co w kontekście przytoczonych danych może stanowić ważny krok w walce z zakażeniami powstającymi w procesach wszczepiania implantów.

V. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Na podstawie wyników badań uzyskanych w niniejszej pracy odnoszących się do otrzymywania oraz charakterystyki powłok polimerowo-ceramicznych na stopie Ti-6Al-4V zawierających nanocząstki srebra jako potencjalnych materiałów powłokowych o działaniu przeciwdrobnoustrojowym można sformułować następujące wnioski:

- Efektem realizacji I oraz II etapu prac badawczych było uzyskanie ekstraktów oraz naparów roślinnych oraz ich ocena jako potencjalnych nietoksycznych reduktorów oraz stabilizatorów w procesie otrzymywania stabilnych nanocząstek srebra zgodnie z zasadami zielonej chemii. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że:
 - I) zdolność antyoksydacyjna oraz zawartość związków polifenolowych jest zależna zarówno od metody ekstrakcji, jak i rodzaju roślinnego surowca,
 - II) postawiono również postulat, że wysoki potencjał przeciwutleniający ekstraktu bądź naparu nie jest gwarantem jego zdolności do stabilizacji nanostruktur,
 - III) proces pozyskiwania ekstraktu powinien być dobierany indywidualnie, rozważając zawartość antyoksydantów, związków wrażliwych na działanie wyższych temperatur oraz potencjalnych związków stabilizujących w wytypowanym surowcu roślinnym,
 - IV) otrzymane napary oraz ekstrakty roślinne mogą wykazywać zależną od stężenia cytotoksyczność względem komórek mysich fibroblastów, nie wywołują natomiast aktywacji monocytów ludzkich,
 - V) stosując wodny napar oraz ekstrakt z karczocha i czystka w procesie otrzymywania nanocząstek Ag możliwe jest uzyskanie stabilnych nanocząstek srebra,
 - VI) otrzymane nanocząstki charakteryzują się stopniem krystaliczności w zakresie od 11% do 15%, strukturą komórki elementarnej typu fcc oraz kształtem zbliżonym do sferycznego,

- VII) nanocząstki srebra uzyskane z zastosowaniem ekstraktów oraz naparów roślinnych wykazują działanie antybakteryjne względem bakterii *S. aureus* oraz *S. epidermidis,*
- VIII) nanocząstki o mniejszych średnicach wykazują silniejsze działanie przeciwdrobnoustrojowe przy zastosowaniu niższych stężeń.
- 2. W ramach trzeciego etapu prac badawczych opracowano sposób otrzymywania hydroksyapatytu o zróżnicowanej morfologii stosując zmienne warunki prowadzenia reakcji, jak również różne metody suszenia produktu. Efektem III etapu prac badawczych było:
 - I) otrzymanie nanometrycznego HAp o zróżnicowanej strukturze w tym nanoprętów o długości 156 nm ± 43 nm,
 - II) wykazanie, że stopień krystaliczności HAp zależny jest zarówno od temperatury syntezy, techniki suszenia jak i składu środowiska reakcyjnego,
 - III) udowodnienie, że zarówno dodatek polimerowego stabilizatora (PVP), jak i etanoloaminy do medium reakcyjnego wpływa na obniżenie wydajności reakcji syntezy HAp,
 - IV) wykazanie, że technika suszenia HAp ma wpływ na jego powierzchnię właściwą i możliwa jest jej adjustacja w szerokim zakresie - od 37 m²/g do 110.80 m²/g.
- W efekcie realizacji IV etapu prac badawczych opracowano matryce polimerowe cechujące się zróżnicowaną kinetyką pęcznienia. Przeprowadzone badania pozwoliły wykazać, że:
 - I) wraz ze wzrostem zawartości czynnika sieciującego w materiale maleje zdolność sorpcyjna usieciowanej matrycy,
 - II) ilość użytego fotoinicjatora nie wpływa znacząco na zdolność sorpcyjną otrzymanych materiałów,

- III) wzrost zawartości liniowego polimeru PEG w usieciowanej trójwymiarowej strukturze PEGDA powoduje obniżenie zdolności sorpcyjnej materiału i wpływa na morfologię materiału,
- IV) na szybkość sedymentacji cząstek HAp w roztworze polimerów wpływ ma struktura HAp. Nanometryczny HAp o strukturze nanoprętów tworzy stabilną dyspersję, w której cząstki opadają z szybkością 0.33±0.07 mm/min.
- 4. Na podstawie wyników badań uzyskanych w V etapie prac, który obejmował otrzymanie oraz charakterystykę materiałów powłokowych zawierających AgNPs usieciowanych na drodze fotopolimeryzacji, można wnioskować, że:
 - I) wytworzone powłoki polimerowo-ceramiczne cechują się równomiernym rozmieszczeniem fazy ceramicznej i AgNPs oraz obecnością porów na powierzchni,
 - II) otrzymane powłoki po 3 dniach inkubacji w roztworze SBF wykazują oznaki biomineralizacji - na ich powierzchni krystalizują fosforany wapniowe,
 - III) wprowadzenie do polimerowej matrycy fazy ceramicznej skutkuje wzrostem parametrów Ra oraz Rz,
 - IV) wytrawienie powierzchni stopu Ti roztworem kwasu HF o stężeniu 1% powoduje rozwinięcie powierzchni materiału, skutkujące większym naprężeniem rozciągającym niezbędnym do oderwania powłok w teście pulloff,
 - V) komórki mysich fibroblastów inkubowane z materiałami powłokowymi zawierającymi nanocząstki Ag cechowały się poprawną morfologią oraz wykazywały tendencję do elongacji wypustek cytoplazmatycznych, tym samym indukując zdolność adhezyjną komórek,
 - VI) wytworzone materiały powłokowe wpływają na obniżenie żywotności zarówno bakterii gronkowca, jak i szczepu *S. epidermidis*, a efektywność ich działania jest zależna od stężenia AgNPs,

- VII) Zastosowanie powłoki opartej na układzie zawierającym roztwór PEG o stężeniu 30% ogranicza wzrost biofilmu bakteryjnego. Dodatek nanocząstek Ag powoduje dalsze zmniejszanie grubości biofilmu bakteryjnego na materiale do wartości 12 µm.
- VIII) Materiały powłokowe zawierające nanocząstki Ag wpływają na obniżenie integralności biofilmu bakteryjnego w warunkach *in vitro*.

VI. STRESZCZENIE

W pracy postawiono hipotezę, że modyfikacja powierzchni stopu tytanu Ti-6Al-4V przez naniesienie powłok polimerowo-ceramicznych zawierających nanocząstki srebra nada powierzchni metalu lepszych właściwości biologicznych oraz dodatkowej funkcjonalności w postaci aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

Celem naukowym pracy było dokonanie charakterystyki fizykochemicznej materiału podłoża z naniesioną powłoką oraz ocena jej aktywności przeciwbakteryjnej. Celem użytkowym było opracowanie składu oraz metody otrzymywania powłoki polimerowo-ceramicznej o pożądanych właściwościach.

Obiektem badań były powłoki polimerowo-ceramiczne zawierające nanostrukturalny hydroksyapatyt oraz nanocząstki srebra wytworzone metodami wpisującymi się w nurt tzw. zielonej chemii. Metodyka badań obejmowała charakterystykę zdolności antyoksydacyjnej naparów oraz ekstraktów wykorzystanych do otrzymywania nanocząstek, charakterystykę morfologii oraz cytotoksyczności wytworzonych nanocząstek, charakterystykę fizykochemiczną hydroksyapatytu otrzymanego na drodze mokrej syntezy, ocenę zdolności sorpcyjnych materiałów polimerowych zastosowanych w późniejszym etapie prac jako osnowa powłok, charakterystykę morfologii otrzymanych powłok oraz ocenę ich właściwości biologicznych z uwzględnieniem biozgodności oraz aktywności przeciwbakteryjnej.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że otrzymane powłoki polimerowoceramiczne zawierające nanocząstki Ag nie wywołują cytotoksyczności oraz wykazują działanie antybakteryjne względem bakterii *S. aureus* oraz *S. epidermidis*. Co więcej, obrazowanie konfokalne pozwoliło również wykazać, że otrzymane materiały wpływają na dezintegrację struktury biofilmu bakteryjnego.

Abstract

It was assumed that modification of Ti-6Al-4V alloy surface by applying polymer-ceramic coatings containing silver nanoparticles would enhance the biological properties of the metal surface and provide additional functionality in the form of antimicrobial activity.

The scientific objective of the study was to perform a physicochemical characterization of the substrate material with the applied coating and evaluate its antibacterial activity. The practical objective was to develop the composition and method for obtaining a polymerceramic coating with desired properties.

The research focused on polymer-ceramic coatings containing nanostructured hydroxyapatite and silver nanoparticles synthesized using methods aligned with the principles of green chemistry. The research methodology included the characterization of the antioxidant capacity of infusions and extracts used for nanoparticle preparation, morphological and cytotoxicity characterization of the produced nanoparticles, physicochemical characterization of hydroxyapatite obtained through wet precipitation method, evaluation of the sorption capabilities of the polymer materials used as the coating matrix, morphological characterization of the obtained composite coatings, and assessment of their biological properties, including biocompatibility and antibacterial activity.

Based on the obtained results, it was found that the produced polymer-ceramic coatings containing nanoparticles did not induce cytotoxicity and exhibited antibacterial activity against *S. aureus* and *S. epidermidis* bacteria. Furthermore, confocal imaging demonstrated that the obtained materials disturbed the homogeneity of the structure of bacterial biofilms.

VII. DOROBEK NAUKOWY

- <u>W. Florkiewicz</u>, D. Malina, K. Pluta, K. Rudnicka, A. Gajewski, E. Olejnik, B. Tyliszczak, A. Sobczak-Kupiec, Assessment of cytotoxicity and immune compatibility of phytochemicalsmediated biosynthesised silver nanoparticles using Cynara scolymus, IET Nanobiotechnology. 13 (2019) 726-735. doi:10.1049/iet-nbt.2018.5357. IF=2.05
- <u>W. Florkiewicz</u>, D. Słota, A. Placek, K. Pluta, B. Tyliszczak, T.E.L. Douglas, A. Sobczak-Kupiec, Synthesis and characterization of polymer-based coatings modified with bioactive ceramic and bovine serum albumin, J. Funct. Biomater. 12 (2021). doi:10.3390/jfb12020021. IF= 4.901
- 3. <u>W. Florkiewicz</u>, K. Pluta, D. Malina, K. Rudnicka, A. Żywicka, M.D. Guigou, B. Tyliszczak, A. Sobczak-Kupiec, Investigation on green synthesis, biocompatibility, and antibacterial activity of silver nanoparticles prepared using cistus incanus, Materials (Basel). 14 (2021). doi:10.3390/ma14175028. **IF= 3.748**
- <u>Wioletta Florkiewicz</u>, Dagmara Malina, B.T. and A.S.-K. Manufacturing of Titanium and Its Alloys. In *Sustainable Production: Novel Trends in Energy, Environment and Material Systems*; Grzegorz M. Królczyk, Małgorzata Wzorek, Anna Król, Orest Kochan, Jun Su, J.K., Ed.; pp. 61-74 ISBN 9783030112738.
- K. Pluta, <u>W. Florkiewicz</u>, D. Malina, K. Rudnicka, S. Michlewska, J.B. Królczyk, A. Sobczak-Kupiec, Measurement methods for the mechanical testing and biocompatibility assessment of polymer-ceramic connective tissue replacements, Meas. J. Int. Meas. Confed. 171 (2021). doi:10.1016/j.measurement.2020.108733. IF= 5.131.
- D. Słota, <u>W. Florkiewicz</u>, A. Sobczak-Kupiec, Ceramic-polymer coatings on Ti-6Al-4V alloy modified with L-cysteine in biomedical applications, Mater. Today Commun. 25 (2020). doi:10.1016/j.mtcomm.2020.101301. IF= 3.662
- D. Słota, <u>W. Florkiewicz</u>, K. Piętak, A. Szwed, M. Włodarczyk, M. Siwińska, K. Rudnicka, A. Sobczak-Kupiec, Preparation, characterization, and biocompatibility assessment of polymer-ceramic composites loaded with Salvia officinalis extract, Materials (Basel). 14 (2021). doi:10.3390/ma14206000. IF= 3.748
- D. Słota, <u>W. Florkiewicz</u>, K. Piętak, K. Pluta, J. Sadlik, K. Miernik, A. Sobczak-Kupiec, Preparation of PVP and betaine biomaterials enriched with hydroxyapatite and its evaluation as a drug carrier for controlled release of clindamycin, Ceram. Int. 48 (2022) 35467-35473. doi:10.1016/j.ceramint.2022.08.151. IF= 5.532
- A.M. Tomala, D. Słota, <u>W. Florkiewicz</u>, K. Piętak, M. Dylag, A. Sobczak-Kupiec, Tribological Properties and Physiochemical Analysis of Polymer-Ceramic Composite Coatings for Bone Regeneration, Lubricants. 10 (2022). doi:10.3390/lubricants10040058. IF= 3.584
- 10.W.J. Stępniowski, <u>W. Florkiewicz</u>, M. Michalska-Domańska, M. Norek, T. Czujko, A comparative study of electrochemical barrier layer thinning for anodic aluminum oxide grown on technical purity aluminum, J. Electroanal. Chem. 741 (2015) 80-86. doi:10.1016/j.jelechem.2015.01.025. **IF= 4.598**
- 11.D. Słota, K. Piętak, <u>W. Florkiewicz</u>, J. Jampílek, A. Tomala, M.M. Urbaniak, A. Tomaszewska, K. Rudnicka, A. Sobczak-Kupiec, Clindamycin-Loaded Nanosized Calcium Phosphates Powders as a Carrier of Active Substances, Nanomaterials. 13 (2023). doi:10.3390/nano13091469. IF= 5.719
- 12.A. Sobczak-Kupiec, A. Drabczyk, <u>W. Florkiewicz</u>, M. Głąb, S. Kudłacik-Kramarczyk, D. Słota, A. Tomala, B. Tyliszczak, Review of the applications of biomedical compositions containing hydroxyapatite and collagen modified by bioactive components, Materials (Basel). 14 (2021). doi:10.3390/ma14092096. IF= 3.748
- 13.W.J. Stepniowski, M. Michalska-Domańska, M. Norek, E. Twardosz, <u>W. Florkiewicz</u>, W. Polkowski, D. Zasada, Z. Bojar, Anodization of cold deformed technical purity aluminum (AA1050) in oxalic acid, Surf. Coatings Technol. 258 (2014) 268-274. doi:10.1016/j.surfcoat.2014.09.013. IF= 4.865

Spis literatury

- G.M. Raghavendra, K. Varaprasad, T. Jayaramudu, Biomaterials: Design, Development and Biomedical Applications, Nanotechnol. Appl. Tissue Eng. (2015) 21-44. doi:10.1016/B978-0-323-32889-0.00002-9.
- [2] M. Saini, Implant biomaterials: A comprehensive review, World J. Clin. Cases. 3 (2015) 52. doi:10.12998/wjcc.v3.i1.52.
- [3] J. Wilson, 1. Metallic biomaterials: State of the art and new challenges, Elsevier Ltd, n.d. doi:10.1016/B978-0-08-102205-4.00001-5.
- [4] F.E. Use, Etallic mplant aterials, Society. (1998).
- T. Matsushita, Orthopaedic applications of metallic biomaterials, Met. Biomed. Devices. (2010) 329-354. doi:10.1533/9781845699246.4.329.
- [6] R.M. Greenhagen, A.R. Johnson, A. Joseph, Internal Fixation: A Historical Review, Clin. Podiatr. Med. Surg. 28 (2011) 607-618. doi:10.1016/j.cpm.2011.06.006.
- [7] A.M.L. Aalco, Stainless Steel Stainless Steel, Carbon N. Y. (2013) 304-306.
- [8] I. Peter, L. Matekovits, M. Rosso, Up-to-Date Knowledge and Outlooks for the Use of Metallic Biomaterials: Review Paper, Biomater. Regen. Med. (2018). doi:10.5772/intechopen.69970.
- [9] S.D.O. Przedmiotu, Skrypt do przedmiotu, (2011) 1-112.
- G. Manivasagam, D. Dhinasekaran, A. Rajamanickam, Biomedical Implants: Corrosion and its Prevention - A Review~!2009-12-22~!2010-01-20~!2010-05-25~!, Recent Patents Corros. Sci. 2 (2010) 40-54. doi:10.2174/1877610801002010040.
- [11] N. Eliaz, Corrosion of metallic biomaterials: A review, Materials (Basel). 12 (2019). doi:10.3390/ma12030407.
- [12] S. Virtanen, Corrosion of biomedical implant materials, Corros. Rev. 26 (2008) 147-172. doi:10.1515/corrrev.2008.147.
- [13] J. Walczak, F. Shahgaldi, F. Heatley, In vivo corrosion of 316L stainless-steel hip implants: Morphology and elemental compositions of corrosion products, Biomaterials. 19 (1998) 229-237. doi:10.1016/S0142-9612(97)00208-1.
- [14] K. Majid, T. Crowder, E. Baker, K. Baker, D. Koueiter, E. Shields, H.N. Herkowitz, Analysis of in vivo corrosion of 316L stainless steel posterior thoracolumbar plate systems: A retrieval study, J. Spinal Disord. Tech. 24 (2011) 500-505. doi:10.1097/BSD.0b013e3182064497.
- [15] Q. Chen, G.A. Thouas, Metallic implant biomaterials, Mater. Sci. Eng. R Reports. 87 (2015) 1-57. doi:10.1016/j.mser.2014.10.001.
- [16] H.F. El'Sheikh, B.J. MacDonald, M.S.J. Hashmi, Finite element simulation of the hip joint during stumbling: A comparison between static and dynamic loading, J. Mater. Process. Technol. 143-144 (2003) 249-255. doi:10.1016/S0924-0136(03)00352-2.
- [17] R. Ebara, Corrosion fatigue crack initiation behavior of stainless steels, Procedia Eng. 2 (2010) 1297-1306. doi:10.1016/j.proeng.2010.03.141.
- [18] J.R.D. (Editor), Metallic Materials, (2003) 21-47.
- [19] R. De La Garza Ramos, P.G. Passias, F. Schwab, A. Bydon, V. Lafage, D.M. Sciubba, Incidence, Risk Factors, and Mortality of Reintubation in Adult Spinal Deformity Surgery, Clin. Spine Surg. 30 (2017) E896-E900. doi:10.1097/BSD.00000000000404.
- [20] L.H.M. Antunes, C.R.P. de Lima, Cobalt-Chromium Alloys Properties and Applications ☆, Ref. Modul. Mater. Sci. Mater. Eng. (2018) 1-4. doi:10.1016/b978-0-12-803581-8.09386-3.
- [21] E.J. Evans, L.T. Thomas, alloy and its constituent metals, Biomaterials. 7 (1986) 25-29.

- [22] B. Science, Iomaterials cience, 2004.
- [23] T. Hanawa, Overview of metals and applications, Met. Biomed. Devices. (2010) 3-24. doi:10.1533/9781845699246.1.3.
- [24] S.H. Teoh, Fatigue of biomaterials: A review, Int. J. Fatigue. 22 (2000) 825-837. doi:10.1016/S0142-1123(00)00052-9.
- [25] C. Delaunay, I. Petit, I.D. Learmonth, P. Oger, P.A. Vendittoli, Metal-on-metal bearings total hip arthroplasty: The cobalt and chromium ions release concern, Orthop. Traumatol. Surg. Res. 96 (2010) 894-904. doi:10.1016/j.otsr.2010.05.008.
- [26] M.G. Zywiel, S.A. Sayeed, A.J. Johnson, T.P. Schmalzried, M.A. Mont, State of the art in hard-onhard bearings: how did we get here and what have we achieved?, Expert Rev. Med. Devices. 8 (2011) 187-207. doi:10.1586/erd.10.75.
- [27] K.J. Orians, E.A. Boyle, K.W. Bruland, Dissolved titanium in the open ocean, Nature. 348 (1990) 322-325. doi:10.1038/348322a0.
- [28] P.J. Bania, Beta titanium alloys and their role in the titanium industry, Jom. 46 (1994) 16-19. doi:10.1007/BF03220742.
- [29] R.E. Smallman, A.H.W. Ngan, Selected Alloys, Mod. Phys. Metall. (2014) 529-569. doi:10.1016/b978-0-08-098204-5.00014-6.
- [30] J.J. Noël, N. Ebrahimi, D.W. Shoesmith, Corrosion of Titanium and Titanium Alloys, Encycl. Interfacial Chem. (2018) 192-200. doi:10.1016/b978-0-12-409547-2.13834-x.
- [31] W. Kroll, The Production of Ductile Titanium, Trans. Electrochem. Soc. 78 (1940) 35. doi:10.1149/1.3071290.
- [32] ASTM F139, Standard Specification for Titanium and Titanium Alloy Strip, Sheet, and Plate, 03 (2015) 1-9. doi:10.1520/B0265-09AE01.2.
- [33] S. Zalewski, Podstawy technologii gastronomicznej, 2009.
- [34] P. Metali, J. Adamus, Wybrane problemy kształtowania blach tytanowych Some problems with forming of the titanium sheets, 4 (2008) 2-9.
- [35] M. Niinomi, C.J. Boehlert, Advances in Metallic Biomaterials, 2015. doi:10.1007/978-3-662-46836 4.
- [36] T. Hanawa, Titanium-tissue interface reaction and its control with surface treatment, Front. Bioeng. Biotechnol. 7 (2019). doi:10.3389/fbioe.2019.00170.
- [37] L.A. Dobrzańśki, Podstawy nauki o materiałach i metaoznawstwo, 2002.
- [38] T. Hryniewicz, K. Rokosz, Zastosowanie tytanu i wybranych stopów tytanu w lotnictwie, Autobusy. 8 (2016) 62-66.
- [39] L.C. Zhang, L.Y. Chen, A Review on Biomedical Titanium Alloys: Recent Progress and Prospect, Adv. Eng. Mater. 21 (2019) 1-29. doi:10.1002/adem.201801215.
- [40] H.A. Bothe, R.T., Beaton, L.E. and Davenport, Reaction of Bone to Multiple Metallic Implants, (1940) 598-602.
- [41] G.S. LEVENTHAL, Titanium, a metal for surgery., J. Bone Joint Surg. Am. 33 A (1951) 473-474. doi:10.2106/00004623-195133020-00021.
- [42] D.F. Williams, C.R.C. Press, Systemic Aspects of Biocompatibility, J. Biomed. Mater. Res. (1981) 900-901.
- [43] Development in implant alloys, Clin. Rev. Biocompat. 1 (1982) 371-473.
- [44] D.F. Williams, Titanium and titanium alloys, in: D.F. Williams (Ed.), Biocompat. Clin. Implant Mater., CRC Press, 1981: pp. 10-44.
- [45] M. Niinomi, Design and development of metallic biomaterials with biological and mechanical biocompatibility, J. Biomed. Mater. Res. Part A. 107 (2019) 944-954. doi:10.1002/jbm.a.36667.

- [46] H.J. Rack, J.I. Qazi, Titanium alloys for biomedical applications, Mater. Sci. Eng. C. 26 (2006) 1269-1277. doi:10.1016/j.msec.2005.08.032.
- [47] M. Kulkarni, A. Mazare, E. Gongadze, Perutkova, V. Kralj-Iglic, I. Milošev, P. Schmuki, A. Iglič, M. Mozetič, Titanium nanostructures for biomedical applications, Nanotechnology. 26 (2015). doi:10.1088/0957-4484/26/6/062002.
- [48] M. Niinomi, Biologically and mechanically biocompatible titanium alloys, Mater. Trans. 49 (2008) 2170-2178. doi:10.2320/matertrans.L-MRA2008828.
- [49] B. Baruwati, S.O. Simmons, R.S. Varma, B. Veronesi, "Green " Synthesized and Coated Nanosilver Alters the Membrane Permeability of Barrier (Intestinal, Brain Endothelial) Cells and Stimulates Oxidative Stress Pathways in Neurons, (2013).
- [50] Z.N.P. Śląskiej, Zeszyty Naukowe Politechniki Śląskiej. Architektura., 17 (1991).
- [51] S. V Bhat, N. Delhi, Metals, in: Biomaterials, 2002: pp. 25-38.
- [52] S.C. Mears, S.L. Kates, A Guide to Improving the Care of Patients with Fragility Fractures, Edition 2, Geriatr. Orthop. Surg. Rehabil. 6 (2015) 58-120. doi:10.1177/2151458515572697.
- [53] N. Eliaz, Degradation of implant materials, Degrad. Implant Mater. 9781461439 (2012) 1-516. doi:10.1007/978-1-4614-3942-4.
- [54] T. Hanawa, Reconstruction and Regeneration of Surface Oxide Film on Metallic Materials in Biological Environments, Corros. Rev. 21 (2003) 161-182. doi:10.1515/CORRREV.2003.21.2-3.161.
- [55] M.S. Patton, T.D.B. Lyon, G.P. Ashcroft, Levels of systemic metal ions in patients with intramedullary nails, Acta Orthop. 79 (2008) 820-825. doi:10.1080/17453670810016911.
- [56] L.S. de Morais, G.G. Serra, E.F. Albuquerque Palermo, L.R. Andrade, C.A. Müller, M.A. Meyers, C.N. Elias, Systemic levels of metallic ions released from orthodontic mini-implants, Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop. 135 (2009) 522-529. doi:10.1016/j.ajodo.2007.04.045.
- [57] National Research Council, Mineral Tolerance of Animals: Second Revised Edition, Miner. Toler. Anim. (2005). doi:10.17226/11309.
- [58] O.A. Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O, Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period, Scand J Plast Reconstr Surg Suppl. 16 (1977) 1-132.
- [59] N. Lioubavina-Hack, N.P. Lang, T. Karring, Significance of primary stability for osseointegration of dental implants, Clin. Oral Implants Res. 17 (2006) 244-250. doi:10.1111/j.1600-0501.2005.01201.x.
- [60] P. J Y, D. E, J, Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces, Clin. Oral Implants Res. (2000) 530-539.
- [61] G.B. Schneider, H. Perinpanayagam, M. Clegg, R. Zaharias, D. Seabold, J. Keller, C. Stanford, Implant surface roughness affects osteoblast gene expression, J. Dent. Res. 82 (2003) 372-376. doi:10.1177/154405910308200509.
- [62] K.S. Tan, L. Qian, R. Rosado, P.M. Flood, L.F. Cooper, The role of titanium surface topography on J774A.1 macrophage inflammatory cytokines and nitric oxide production, Biomaterials. 27 (2006) 5170-5177. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.05.002.
- [63] P. Linderbäck, N. Harmankaya, A. Askendal, S. Areva, J. Lausmaa, P. Tengvall, The effect of heator ultra violet ozone-treatment of titanium on complement deposition from human blood plasma, Biomaterials. 31 (2010) 4795-4801. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.02.060.
- [64] K. Li, C. Wang, J. Yan, Q. Zhang, B. Dang, Z. Wang, Y. Yao, K. Lin, Z. Guo, L. Bi, Y. Han, Evaluation of the osteogenesis and osseointegration of titanium alloys coated with graphene: An in vivo study, Sci. Rep. 8 (2018) 1-10. doi:10.1038/s41598-018-19742-y.
- [65] S. Crowder, E. Kasner, C.A. Hunter, D. Ph, K. Kariko, D. Ph, Three-dimensional graphene foams

promote osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, Nanoscale. 5 (2013) 4171-7176. doi:10.1039/c3nr00803g.Three-dimensional.

- [66] S. Spriano, S. Yamaguchi, F. Baino, S. Ferraris, A critical review of multifunctional titanium surfaces: New frontiers for improving osseointegration and host response, avoiding bacteria contamination, Acta Biomater. 79 (2018) 1-22. doi:10.1016/j.actbio.2018.08.013.
- [67] Q. Wang, P. Zhou, S. Liu, S. Attarilar, R.L.W. Ma, Y. Zhong, L. Wang, Multi-scale surface treatments of titanium implants for rapid osseointegration: A review, Nanomaterials. 10 (2020) 1-27. doi:10.3390/nano10061244.
- [68] S. Das, K. Dholam, S. Gurav, K. Bendale, A. Ingle, B. Mohanty, P. Chaudhari, J.R. Bellare, Accentuated osseointegration in osteogenic nanofibrous coated titanium implants, Sci. Rep. 9 (2019) 1-14. doi:10.1038/s41598-019-53884-x.
- [69] J. Shi, Y. Li, Y. Gu, S. Qiao, X. Zhang, H. Lai, Effect of titanium implants with strontium incorporation on bone apposition in animal models: A systematic review and meta-Analysis, Sci. Rep. 7 (2017) 1-10. doi:10.1038/s41598-017-15488-1.
- [70] B. Beig, U. Liaqat, M.F.K. Niazi, I. Douna, M. Zahoor, M.B.K. Niazi, Current challenges and innovative developments in hydroxyapatite-based coatings on metallic materials for bone implantation: A review, Coatings. 10 (2020) 1-29. doi:10.3390/coatings10121249.
- [71] R. Samantha, D. Almalik, 肖沉 1, 2, 孙莉 1, 2Δ, 曹杉杉 1, 2, 梁浩 1, 2, 程焱 1, 2, Tjyybjb.Ac.Cn. 3 (2019) 58-66.

http://www.tjyybjb.ac.cn/CN/article/downloadArticleFile.do?attachType=PDF&id=9987.

- [72] J. Jeong, J.H. Kim, J.H. Shim, N.S. Hwang, C.Y. Heo, Whitlockite verification.pdf, (2019) 1-11.
- [73] N. Eliaz, N. Metoki, Calcium phosphate bioceramics: A review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications, Materials (Basel). 10 (2017). doi:10.3390/ma10040334.
- [74] S. V. Dorozhkin, Calcium orthophosphates in dentistry, J. Mater. Sci. Mater. Med. 24 (2013) 1335-1363. doi:10.1007/s10856-013-4898-1.
- [75] Z. Huan, J. Chang, Novel bioactive composite bone cements based on the β-tricalcium phosphatemonocalcium phosphate monohydrate composite cement system, Acta Biomater. 5 (2009) 1253-1264. doi:10.1016/j.actbio.2008.10.006.
- S. V. Dorozhkin, Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine, Materials (Basel). 2 (2009) 399-498. doi:10.3390/ma2020399.
- [77] Q. Yang, T. Troczynski, D.M. Liu, Influence of apatite seeds on the synthesis of calcium phosphate cement, Biomaterials. 23 (2002) 2751-2760. doi:10.1016/S0142-9612(02)00010-8.
- [78] I. Lodoso-Torrecilla, R. Klein Gunnewiek, E.C. Grosfeld, R.B.M. De Vries, P. Habibović, J.A. Jansen, J.J.J.P. Van Den Beucken, Bioinorganic supplementation of calcium phosphate-based bone substitutes to improve: In vivo performance: A systematic review and meta-analysis of animal studies, Biomater. Sci. 8 (2020) 4792-4809. doi:10.1039/d0bm00599a.
- [79] and T.M. Guy Daculsi, Borhane Hakim Fellah, The Essential Role of Calcium Phosphate Bioceramics in Bone Regeneration, in: Springer, 2014: pp. 71-96. http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-53980-0.
- [80] M. Montazerolghaem, M. Karlsson Ott, H. Engqvist, H. Melhus, A.J. Rasmusson, Resorption of monetite calcium phosphate cement by mouse bone marrow derived osteoclasts, Mater. Sci. Eng. C. 52 (2015) 212-218. doi:10.1016/j.msec.2015.03.038.
- [81] J. Torres, I. Tamimi, J. Cabrejos-Azama, I. Tresguerres, M. Alkhraisat, E. López-Cabarcos, G. Hernández, F. Tamimi, Monetite granules versus particulate autologous bone in bone

regeneration, Ann. Anat. 200 (2015) 126-133. doi:10.1016/j.aanat.2015.03.008.

- [82] Z. Sheikh, Y.L. Zhang, L. Grover, G.E. Merle, F. Tamimi, J. Barralet, In vitro degradation and in vivo resorption of dicalcium phosphate cement based grafts, Acta Biomater. 26 (2015) 338-346. doi:10.1016/j.actbio.2015.08.031.
- [83] R.J. Sullivan, A. Charig, J. Blake-Haskins, Y.P. Zhang, S.M. Miller, M. Strannick, A. Gaffar, H.C. Margolis, In vivo detection of calcium from dicalcium phosphate dihydrate dentifrices in demineralized human enamel and plaque., Adv. Dent. Res. 11 (1997) 380-387. doi:10.1177/08959374970110040201.
- [84] O. Suzuki, Octacalcium phosphate (OCP)-based bone substitute materials, Jpn. Dent. Sci. Rev. 49 (2013) 58-71. doi:10.1016/j.jdsr.2013.01.001.
- [85] F. Barrère, C.M. Van Der Valk, R.A.J. Dalmeijer, C.A. Van Blitterswijk, K. De Groot, P. Layrolle, In vitro and in vivo degradation of biomimetic octacalcium phosphate and carbonate apatite coatings on titanium implants, J. Biomed. Mater. Res. - Part A. 64 (2003) 378-387. doi:10.1002/jbm.a.10291.
- [86] T. Kikawa, O. Kashimoto, H. Imaizumi, S. Kokubun, O. Suzuki, Intramembranous bone tissue response to biodegradable octacalcium phosphate implant, Acta Biomater. 5 (2009) 1756-1766. doi:10.1016/j.actbio.2008.12.008.
- [87] H. Imaizumi, M. Sakurai, O. Kashimoto, T. Kikawa, O. Suzuki, Comparative study on osteoconductivity by synthetic octacalcium phosphate and sintered hydroxyapatite in rabbit bone marrow, Calcif. Tissue Int. 78 (2006) 45-54. doi:10.1007/s00223-005-0170-0.
- [88] O. Suzuki, S. Kamakura, T. Katagiri, M. Nakamura, B. Zhao, Y. Honda, R. Kamijo, Bone formation enhanced by implanted octacalcium phosphate involving conversion into Ca-deficient hydroxyapatite, Biomaterials. 27 (2006) 2671-2681. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.12.004.
- [89] Y. Liu, P.R. Cooper, J.E. Barralet, R.M. Shelton, Influence of calcium phosphate crystal assemblies on the proliferation and osteogenic gene expression of rat bone marrow stromal cells, Biomaterials. 28 (2007) 1393-1403. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.11.019.
- [90] R.M. Shelton, Y. Liu, P.R. Cooper, U. Gbureck, M.J. German, J.E. Barralet, Bone marrow cell gene expression and tissue construct assembly using octacalcium phosphate microscaffolds, Biomaterials. 27 (2006) 2874-2881. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.12.031.
- [91] T. Anada, T. Kumagai, Y. Honda, T. Masuda, R. Kamijo, S. Kamakura, N. Yoshihara, T. Kuriyagawa, H. Shimauchi, O. Suzuki, Dose-dependent osteogenic effect of octacalcium phosphate on mouse bone marrow stromal cells, Tissue Eng. Part A. 14 (2008) 965-978. doi:10.1089/ten.tea.2007.0339.
- [92] S. Ban, J. Hasegawa, T. Jinde, Phase Transformation of Octacalcium Phosphate in vivo and in vitro, Dent. Mater. J. 11 (1992) 130-140217. doi:10.4012/dmj.11.130.
- [93] O. Suzuki, H. Imaizumi, S. Kamakura, T. Katagiri, Bone Regeneration by Synthetic Octacalcium Phosphate and its Role in Biological Mineralization, Curr. Med. Chem. 15 (2008) 305-313. doi:10.2174/092986708783497283.
- [94] M. Stefanic, K. Krnel, I. Pribosic, T. Kosmac, Rapid biomimetic deposition of octacalcium phosphate coatings on zirconia ceramics (Y-TZP) for dental implant applications, Appl. Surf. Sci. 258 (2012) 4649-4656. doi:10.1016/j.apsusc.2012.01.048.
- [95] K. Miura, K. Matsui, T. Kawai, Y. Kato, A. Matsui, O. Suzuki, S. Kamakura, S. Echigo, Octacalcium phosphate collagen composites with titanium mesh facilitate alveolar augmentation in canine mandibular bone defects, Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 41 (2012) 1161-1169. doi:10.1016/j.ijom.2012.05.020.
- [96] D. Griesiute, L. Sinusaite, A. Kizalaite, A. Antuzevics, K. Mazeika, D. Baltrunas, T. Goto, T.

Sekino, A. Kareiva, A. Zarkov, The influence of Fe3+doping on thermally induced crystallization and phase evolution of amorphous calcium phosphate, CrystEngComm. 23 (2021) 4627-4637. doi:10.1039/d1ce00371b.

- [97] D. Brazete, P.M.C. Torres, J.C.C. Abrantes, J.M.F. Ferreira, Influence of the Ca/P ratio and cooling rate on the allotropic α↔β-tricalcium phosphate phase transformations, Ceram. Int. 44 (2018) 8249-8256. doi:10.1016/j.ceramint.2018.02.005.
- [98] M. Nyan, D. Sato, H. Kihara, T. MacHida, K. Ohya, S. Kasugai, Effects of the combination with α-tricalcium phosphate and simvastatin on bone regeneration, Clin. Oral Implants Res. 20 (2009) 280-287. doi:10.1111/j.1600-0501.2008.01639.x.
- [99] R.G. Carrodeguas, S. De Aza, *α*-Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications, Acta Biomater. 7 (2011) 3536-3546. doi:10.1016/j.actbio.2011.06.019.
- [100] S. Heinemann, M. Gelinsky, H. Worch, T. Hanke, Resorbierbare Knochenersatzmaterialien : Eine Übersicht kommerziell verfügbarer Werkstoffe und neuer Forschungsansätze auf dem Gebiet der Komposite, Orthopade. 40 (2011) 761-773. doi:10.1007/s00132-011-1748-z.
- [101] J. Tao, H. Pan, H. Zhai, J. Wang, L. Li, J. Wu, W. Jiang, X. Xu, R. Tang, Controls of tricalcium phosphate single-crystal formation from its amorphous precursor by interfacial energy, Cryst. Growth Des. 9 (2009) 3154-3160. doi:10.1021/cg801130w.
- [102] B.H.B. Kuffner, A.D. Facci, D. Sachs, G. Silva, Study of the microstructure and mechanical properties of beta tricalcium phosphate-based composites with alumina addition produced by powder metallurgy, Rev. Esc. Minas. 70 (2017) 459-464. doi:10.1590/0370-44672017700082.
- [103] J.M. de Oliveira Junior, P.G. Montagner, R.C. Carrijo, E.F. Martinez, Physical characterization of biphasic bioceramic materials with different granulation sizes and their influence on bone repair and inflammation in rat calvaria, Sci. Rep. 11 (2021) 1-10. doi:10.1038/s41598-021-84033-y.
- [104] C. Moseke, U. Gbureck, Tetracalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications, Acta Biomater. 6 (2010) 3815-3823. doi:10.1016/j.actbio.2010.04.020.
- [105] Y. Jiang, Z. Yuan, J. Huang, Substituted hydroxyapatite: a recent development, Mater. Technol. 35 (2020) 785-796. doi:10.1080/10667857.2019.1664096.
- [106] K. Hurle, J.M. Oliveira, R.L. Reis, S. Pina, F. Goetz-Neunhoeffer, Ion-doped Brushite Cements for Bone Regeneration, Acta Biomater. 123 (2021) 51-71. doi:10.1016/j.actbio.2021.01.004.
- [107] K. Lin, J. Chang, Structure and properties of hydroxyapatite for biomedical applications, Elsevier Ltd., 2015. doi:10.1016/b978-1-78242-033-0.00001-8.
- [108] S. Wei, J.X. Ma, L. Xu, X.S. Gu, X.L. Ma, Biodegradable materials for bone defect repair, Mil. Med. Res. 7 (2020) 1-25. doi:10.1186/s40779-020-00280-6.
- [109] P. Nitti, S. Kunjalukkal Padmanabhan, S. Cortazzi, E. Stanca, L. Siculella, A. Licciulli, C. Demitri, Enhancing Bioactivity of Hydroxyapatite Scaffolds Using Fibrous Type I Collagen, Front. Bioeng. Biotechnol. 9 (2021) 1-10. doi:10.3389/fbioe.2021.631177.
- [110] S. Awasthi, S.K. Pandey, E. Arunan, C. Srivastava, A review on hydroxyapatite coatings for the biomedical applications: Experimental and theoretical perspectives, J. Mater. Chem. B. 9 (2021) 228-249. doi:10.1039/d0tb02407d.
- [111] Y. Wen, J. Li, H. Lin, H. Huang, K. Song, K. Duan, T. Guo, J. Weng, Improvement of drug-loading properties of hydroxyapatite particles using triethylamine as a capping agent: A novel approach, Crystals. 11 (2021) 1-16. doi:10.3390/cryst11060703.
- [112] J. Wang, B. Ni, W. Li, J. Sun, Y. Tao, L. Chen, Hydroxyapatite surface-functionalized monolithic column for selective in-tube solid phase microextraction of zoleronic acid and risedronic acid, J. Chromatogr. A. 1653 (2021) 462438. doi:10.1016/j.chroma.2021.462438.
- [113] V.S. Kattimani, S. Kondaka, K.P. Lingamaneni, Hydroxyapatite--Past, Present, and Future in

Bone Regeneration, Bone Tissue Regen. Insights. 7 (2016) BTRI.S36138. doi:10.4137/btri.s36138.

- [114] R. Rial, M. González-durruthy, Z. Liu, J.M. Ruso, Advanced materials based on nanosized hydroxyapatite, Molecules. 26 (2021) 1-22. doi:10.3390/molecules26113190.
- [115] M. Sadat-Shojai, M.T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, A. Jamshidi, Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures, Acta Biomater. 9 (2013) 7591-7621. doi:10.1016/j.actbio.2013.04.012.
- [116] N.A.S. Mohd Pu'ad, R.H. Abdul Haq, H. Mohd Noh, H.Z. Abdullah, M.I. Idris, T.C. Lee, Synthesis method of hydroxyapatite: A review, Mater. Today Proc. 29 (2019) 233-239. doi:10.1016/j.matpr.2020.05.536.
- [117] T.J. Webster, E.S. Ahn, Nanostructured biomaterials for tissue engineering bone, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 103 (2006) 275-308. doi:10.1007/10_021.
- [118] H. Liu, T.J. Webster, Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools, in: Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 2007: pp. 354-369. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.08.049.
- [119] A. Bral, M.Y. Mommaerts, In vivo biofunctionalization of titanium patient-specific implants with nano hydroxyapatite and other nano calcium phosphate coatings: A systematic review, J. Cranio-Maxillofacial Surg. 44 (2016) 400-412. doi:10.1016/j.jcms.2015.12.004.
- [120] A. Haider, S. Haider, S.S. Han, I.K. Kang, Recent advances in the synthesis, functionalization and biomedical applications of hydroxyapatite: a review, RSC Adv. 7 (2017) 7442-7458. doi:10.1039/c6ra26124h.
- [121] J.S. Lee, S.D. Baek, J. Venkatesan, I. Bhatnagar, H.K. Chang, H.T. Kim, S.K. Kim, In vivo study of chitosan-natural nano hydroxyapatite scaffolds for bone tissue regeneration, Int. J. Biol. Macromol. 67 (2014) 360-366. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.03.053.
- [122] X. Li, M. Liu, F. Chen, Y. Wang, M. Wang, X. Chen, Y. Xiao, X. Zhang, Design of hydroxyapatite bioceramics with micro-/nano-topographies to regulate the osteogenic activities of bone morphogenetic protein-2 and bone marrow stromal cells, Nanoscale. 12 (2020) 7284-7300. doi:10.1039/c9nr10561a.
- [123] Y. Hong, H. Fan, B. Li, B. Guo, M. Liu, X. Zhang, Fabrication, biological effects, and medical applications of calcium phosphate nanoceramics, Mater. Sci. Eng. R Reports. 70 (2010) 225-242. doi:10.1016/j.mser.2010.06.010.
- [124] X. Chen, C. Deng, S. Tang, M. Zhang, Mitochondria-dependent apoptosis induced by nanoscale hydroxyapatite in human gastric cancer SGC-7901 cells, Biol. Pharm. Bull. 30 (2007) 128-132. doi:10.1248/bpb.30.128.
- [125] Z. Liu, S. Tang, Z. Ai, Effects of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of human breast cancer cells (MCF-7) | Kavindra Kumar Kesari - Academia.edu, 9 (2003) 1968-1971. http://www.academia.edu/1348285/Effects_of_hydroxyapatite_nanoparticles_on_proliferation_ and_apoptosis_of_human_breast_cancer_cells_MCF-7_.
- [126] H. Wu, Z. Li, J. Tang, X. Yang, Y. Zhou, B. Guo, L. Wang, X. Zhu, C. Tu, X. Zhang, The in vitro and in vivo anti-melanoma effects of hydroxyapatite nanoparticles: Influences of material factors, Int. J. Nanomedicine. 14 (2019) 1177-1191. doi:10.2147/IJN.S184792.
- [127] S. Aoki, H.; Ohgaki, M.; Kano, Effects of Adriacin-absorbing hydroxyapatite-sol on Ca-9 cell growth, Rep. Inst. Med. Dent. Eng. 27 (1993) 39-44.
- [128] Y. Cai, Y. Liu, W. Yan, Q. Hu, J. Tao, M. Zhang, Z. Shi, R. Tang, Role of hydroxyapatite nanoparticle size in bone cell proliferation, J. Mater. Chem. 17 (2007) 3780-3787. doi:10.1039/b705129h.
- [129] E. Landi, A. Tampieri, G. Celotti, S. Sprio, Densification behaviour and mechanisms of synthetic

hydroxyapatites, J. Eur. Ceram. Soc. 20 (2000) 2377-2387. doi:10.1016/S0955-2219(00)00154-0.

- [130] V. Uskoković, Ion-doped hydroxyapatite: An impasse or the road to follow?, Ceram. Int. 46 (2020) 11443-11465. doi:10.1016/j.ceramint.2020.02.001.
- [131] D.H. Kim, K.H. Hwang, J.D. Lee, H.C. Park, S.Y. Yoon, Long and short range order structural analysis of in-situ formed biphasic calcium phosphates, Biomater. Res. 19 (2015) 1-5. doi:10.1186/s40824-015-0036-0.
- [132] K. Tõnsuaadu, K.A. Gross, L. Pluduma, M. Veiderma, A review on the thermal stability of calcium apatites, J. Therm. Anal. Calorim. 110 (2012) 647-659. doi:10.1007/s10973-011-1877-y.
- [133] P. Li, Z. Jia, Q. Wang, P. Tang, M. Wang, K. Wang, J. Fang, C. Zhao, F. Ren, X. Ge, X. Lu, A resilient and flexible chitosan/silk cryogel incorporated Ag/Sr co-doped nanoscale hydroxyapatite for osteoinductivity and antibacterial properties, J. Mater. Chem. B. 6 (2018) 7427-7438. doi:10.1039/c8tb01672k.
- [134] L. Stipniece, S. Wilson, J.M. Curran, R. Chen, K. Salma-Ancane, P.K. Sharma, B.J. Meenan, A.R. Boyd, Strontium substituted hydroxyapatite promotes direct primary human osteoblast maturation, Ceram. Int. 47 (2021) 3368-3379. doi:10.1016/j.ceramint.2020.09.182.
- [135] Z. Geng, Y. Cheng, L. Ma, Z. Li, Z. Cui, S. Zhu, Y. Liang, Y. Liu, H. Bao, X. Li, X. Yang, Nanosized strontium substituted hydroxyapatite prepared from egg shell for enhanced biological properties, J. Biomater. Appl. 32 (2018) 896-905. doi:10.1177/0885328217748124.
- [136] S. Chen, Y. He, J. gang An, Y. Zhang, Recurrence-Related Factors of Temporomandibular Joint Ankylosis: A 10-Year Experience, J. Oral Maxillofac. Surg. 77 (2019) 2512-2521. doi:10.1016/j.joms.2019.06.172.
- [137] V. Uskoković, Ion-doped hydroxyapatite: An impasse or the road to follow?, Ceram. Int. 46 (2020) 11443-11465. doi:10.1016/j.ceramint.2020.02.001.
- [138] L.Y. He, X.M. Zhang, B. Liu, Y. Tian, W.H. Ma, Effect of magnesium ion on human osteoblast activity, Brazilian J. Med. Biol. Res. 49 (2016) 1-6. doi:10.1590/1414-431X20165257.
- [139] D. Predoi, S.L. Iconaru, M.V. Predoi, M. Motelica-Heino, N. Buton, C. Megier, Obtaining and characterizing thin layers of magnesium doped hydroxyapatite by dip coating procedure, Coatings. 10 (2020). doi:10.3390/COATINGS10060510.
- [140] D. Predoi, S.L. Iconaru, M.V. Predoi, G.E. Stan, N. Buton, Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of magnesium-doped hydroxyapatite suspensions, Nanomaterials. 9 (2019) 1-20. doi:10.3390/nano9091295.
- [141] K.H. Park, Y. Choi, D.S. Yoon, K.M. Lee, D. Kim, J.W. Lee, Zinc Promotes Osteoblast Differentiation in Human Mesenchymal Stem Cells Via Activation of the cAMP-PKA-CREB Signaling Pathway, Stem Cells Dev. 27 (2018) 1125-1135. doi:10.1089/scd.2018.0023.
- [142] E.S. Thian, T. Konishi, Y. Kawanobe, P.N. Lim, C. Choong, B. Ho, M. Aizawa, Zinc-substituted hydroxyapatite: A biomaterial with enhanced bioactivity and antibacterial properties, J. Mater. Sci. Mater. Med. 24 (2013) 437-445. doi:10.1007/s10856-012-4817-x.
- [143] M. Alicka, P. Sobierajska, K. Kornicka, R.J. Wiglusz, K. Marycz, Lithium ions (Li +) and nanohydroxyapatite (nHAp) doped with Li + enhance expression of late osteogenic markers in adipose-derived stem cells. Potential theranostic application of nHAp doped with Li + and codoped with europium (III) and samarium (III) i, Mater. Sci. Eng. C. 99 (2019) 1257-1273. doi:10.1016/j.msec.2019.02.073.
- [144] J. Sang Cho, S.H. Um, D. Su Yoo, Y.C. Chung, S. Hye Chung, J.C. Lee, S.H. Rhee, Enhanced osteoconductivity of sodium-substituted hydroxyapatite by system instability, J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater. 102 (2014) 1046-1062. doi:10.1002/jbm.b.33087.
- [145] C. Shi, J. Gao, M. Wang, J. Fu, D. Wang, Y. Zhu, Ultra-trace silver-doped hydroxyapatite with

non-cytotoxicity and effective antibacterial activity, Mater. Sci. Eng. C. 55 (2015) 497-505. doi:10.1016/j.msec.2015.05.078.

- [146] Q. Yuan, A. Xu, Z. Zhang, Z. Chen, L. Wan, X. Shi, S. Lin, Z. Yuan, L. Deng, Bioactive silver doped hydroxyapatite composite coatings on metal substrates: Synthesis and characterization, Mater. Chem. Phys. 218 (2018) 130-139. doi:10.1016/j.matchemphys.2018.07.038.
- [147] A. Ressler, A. Žužić, I. Ivanišević, N. Kamboj, H. Ivanković, Ionic substituted hydroxyapatite for bone regeneration applications: A review, Open Ceram. 6 (2021). doi:10.1016/j.oceram.2021.100122.
- [148] T.T. Li, L. Ling, M.C. Lin, H.K. Peng, H.T. Ren, C.W. Lou, J.H. Lin, Recent advances in multifunctional hydroxyapatite coating by electrochemical deposition, J. Mater. Sci. 55 (2020) 6352-6374. doi:10.1007/s10853-020-04467-z.
- [149] C. Zhang, T. Uchikoshi, L. Liu, K. Iwanami-Kadowaki, M. Uezono, K. Moriyama, M. Kikuchi, Antibacterial-functionalized Ag loaded-hydroxyapatite (HAp) coatings fabricated by electrophoretic deposition (EPD) process, Mater. Lett. 297 (2021) 129955. doi:10.1016/j.matlet.2021.129955.
- [150] M. Catauro, F. Barrino, I. Blanco, S. Piccolella, S. Pacifico, Use of the sol-gel method for the preparation of coatings of titanium substrates with hydroxyapatite for biomedical application, Coatings. 10 (2020). doi:10.3390/coatings10030203.
- [151] Muazzam Nasrullah 2018, 乳鼠心肌提取 HHS Public Access, Physiol. Behav. 176 (2016) 139-148. doi:10.1016/j.surfcoat.2020.125793.Effects.
- [152] T. Kreller, F. Sahm, R. Bader, A.R. Boccaccini, A. Jonitz-Heincke, R. Detsch, Biomimetic calcium phosphate coatings for bioactivation of titanium implant surfaces: Methodological approach and in vitro evaluation of biocompatibility, Materials (Basel). 14 (2021). doi:10.3390/ma14133516.
- [153] S. Wen, X. Liu, J. Ding, Y. Liu, Z. Lan, Z. Zhang, G. Chen, Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite coating on the surface of medical magnesium alloy and its corrosion resistance, Prog. Nat. Sci. Mater. Int. 31 (2021) 324-333. doi:10.1016/j.pnsc.2020.12.013.
- [154] B.W. Stuart, G.E. Stan, Physical vapour deposited biomedical coatings, Coatings. 11 (2021) 10-12. doi:10.3390/coatings11060619.
- [155] N. Takahashi, Interface Oral Health Science 2007, 2007. doi:10.1007/978-4-431-76690-2.
- [156] S.L. Iconaru, M.V. Predoi, P. Chapon, S. Gaiaschi, K. Rokosz, S. Raaen, M. Motelica-Heino, D. Predoi, Investigation of spin coating cerium-doped hydroxyapatite thin films with antifungal properties, Coatings. 11 (2021). doi:10.3390/coatings11040464.
- [157] D.T. Substrates, R. Aravindakshan, K.K. Saju, R.A. Rajan, Investigation into Effect of Natural Shellac on the Bonding Strength of Magnesium Substituted Hydroxyapatite Coatings, (2021).
- [158] L.F. Sukhodub, G.O. Yanovska, L.B. Sukhodub, V.M. Kuznetsov, O.S. Stanislavov, Nanocomposite apatite-biopolymer materials and coatings for biomedical applications, J. Nano-Electron. Phys. 6 (2014) 1-16.
- [159] R.I.M. Asri, W.S.W. Harun, M.A. Hassan, S.A.C. Ghani, Z. Buyong, A review of hydroxyapatitebased coating techniques: Sol-gel and electrochemical depositions on biocompatible metals, J. Mech. Behav. Biomed. Mater. 57 (2016) 95-108. doi:10.1016/j.jmbbm.2015.11.031.
- [160] W.S.W. Harun, R.I.M. Asri, J. Alias, F.H. Zulkifli, K. Kadirgama, S.A.C. Ghani, J.H.M. Shariffuddin, A comprehensive review of hydroxyapatite-based coatings adhesion on metallic biomaterials, Ceram. Int. 44 (2018) 1250-1268. doi:10.1016/j.ceramint.2017.10.162.
- [161] M. Jayankura, A.P. Schulz, O. Delahaut, R. Witvrouw, L. Seefried, B. Vande Berg, G. Heynen, W. Sonnet, Percutaneous administration of allogeneic bone-forming cells for the treatment of delayed unions of fractures: a pilot study, Stem Cell Res. Ther. 12 (2021) 363. doi:10.1186/s13287-

021-02432-4.

- [162] S. Huang, L. Xu, Y. Zhang, Y. Sun, G. Li, Systemic and local administration of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes fracture healing in rats, Cell Transplant. 24 (2015) 2643-2655. doi:10.3727/096368915X687219.
- [163] C. Kiernan, C. Knuth, E. Farrell, Endochondral ossification: Recapitulating bone development for bone defect repair, in: Dev. Biol. Musculoskelet. Tissue Eng. Princ. Appl., Elsevier Inc., 2018: pp. 125-148. doi:10.1016/B978-0-12-811467-4.00006-1.
- [164] R. Noelken, T. Pausch, W. Wagner, B. Al-Nawas, Peri-implant defect grafting with autogenous bone or bone graft material in immediate implant placement in molar extraction sites –1- to 3year results of a prospective randomized study, Clin. Oral Implants Res. 31 (2020) 1138-1148. doi:10.1111/clr.13660.
- [165] R.F.B. Resende, S.C. Sartoretto, M.J. Uzeda, A.T.N.N. Alves, J.A. Calasans-Maia, A.M. Rossi, J.M. Granjeiro, M.D. Calasans-Maia, Randomized controlled clinical trial of nanostructured carbonated hydroxyapatite for alveolar bone repair, Materials (Basel). 12 (2019). doi:10.3390/ma12223645.
- [166] D.B. Raina, L.M. Matuszewski, C. Vater, J. Bolte, H. Isaksson, L. Lidgren, M. Tägil, S. Zwingenberger, A facile one-stage treatment of critical bone defects using a calcium sulfate/hydroxyapatite biomaterial providing spatiotemporal delivery of bone morphogenic protein-2 and zoledronic acid, Sci. Adv. 6 (2020) 1-12. doi:10.1126/sciadv.abc1779.
- [167] R.Z. LeGeros, Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphates, Clin. Orthop. Relat. Res. (2002) 81-98. doi:10.1097/00003086-200202000-00009.
- [168] U. Ripamonti, L.C. Roden, L.F. Renton, Osteoinductive hydroxyapatite-coated titanium implants, Biomaterials. 33 (2012) 3813-3823. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.01.050.
- [169] M. Lu, H. Chen, B. Yuan, Y. Zhou, L. Min, Z. Xiao, X. Yang, X. Zhu, C. Tu, X. Zhang, The morphological effect of nanostructured hydroxyapatite coatings on the osteoinduction and osteogenic capacity of porous titanium, Nanoscale. 12 (2020) 24085-24099. doi:10.1039/d0nr06306a.
- [170] J. Wang, M. Wang, F. Chen, Y. Wei, X. Chen, Y. Zhou, X. Yang, X. Zhu, C. Tu, X. Zhang, Nanohydroxyapatite coating promotes porous calcium phosphate ceramic-induced osteogenesis via BMP/SMAD signaling pathway, Int. J. Nanomedicine. 14 (2019) 7987-8000. doi:10.2147/IJN.S216182.
- [171] L. Sun, C.C. Berndt, K.A. Gross, A. Kucuk, Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: A review, J. Biomed. Mater. Res. 58 (2001) 570-592. doi:10.1002/jbm.1056.
- [172] M. Alizadeh-Osgouei, Y. Li, C. Wen, A comprehensive review of biodegradable synthetic polymer-ceramic composites and their manufacture for biomedical applications, Bioact. Mater. 4 (2019) 22-36. doi:10.1016/j.bioactmat.2018.11.003.
- [173] A.J. Nathanael, T.H. Oh, Biopolymer coatings for biomedical applications, Polymers (Basel). 12 (2020) 1-26. doi:10.3390/polym12123061.
- [174] S. Park, U. Han, D. Choi, J. Hong, Layer-by-layer assembled polymeric thin films as prospective drug delivery carriers: Design and applications, Biomater. Res. 22 (2018) 1-13. doi:10.1186/s40824-018-0139-5.
- [175] S.A. Hussain, B. Dey, D. Bhattacharjee, N. Mehta, Unique supramolecular assembly through Langmuir Blodgett (LB) technique, Heliyon. 4 (2018) e01038. doi:10.1016/j.heliyon.2018.e01038.
- [176] S. Liu, C. Chen, L. Chen, H. Zhu, C. Zhang, Y. Wang, Pseudopeptide polymer coating for improving biocompatibility and corrosion resistance of 316L stainless steel, RSC Adv. 5 (2015)

98456-98466. doi:10.1039/c5ra17802a.

- [177] D.B. Gehlen, L.C. De Lencastre Novaes, W. Long, A.J. Ruff, F. Jakob, T. Haraszti, Y. Chandorkar, L. Yang, P. Van Rijn, U. Schwaneberg, L. De Laporte, Rapid and Robust Coating Method to Render Polydimethylsiloxane Surfaces Cell-Adhesive, ACS Appl. Mater. Interfaces. 11 (2019) 41091-41099. doi:10.1021/acsami.9b16025.
- [178] P. Xue, Q. Li, Y. Li, L. Sun, L. Zhang, Z. Xu, Y. Kang, Surface modification of poly(dimethylsiloxane) with polydopamine and hyaluronic acid to enhance hemocompatibility for potential applications in medical implants or devices, ACS Appl. Mater. Interfaces. 9 (2017) 33632-33644. doi:10.1021/acsami.7b10260.
- [179] H. Jang, H. Choi, H. Jeong, S. Baek, S. Han, D.J. Chung, H.S. Lee, Thermally Crosslinked Biocompatible Hydrophilic Polyvinylpyrrolidone Coatings on Polypropylene with Enhanced Mechanical and Adhesion Properties, Macromol. Res. 26 (2018) 151-156. doi:10.1007/s13233-018-6031-2.
- [180] Y.K. Kim, K.B. Lee, S.Y. Kim, Y.S. Jang, J.H. Kim, M.H. Lee, Improvement of osteogenesis by a uniform PCL coating on a magnesium screw for biodegradable applications, Sci. Rep. 8 (2018) 1-11. doi:10.1038/s41598-018-31359-9.
- [181] Z.A. dzisław Markiewicz, Kwiatkowski, Bakterie, antybiotyki, lekooporność, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2021.
- [182] European Centre for Disease Prevention and Control, Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) Annual Epidemiological Report 2020, Stockholm, 2022. doi:10.1136/vr.g2500.
- [183] D. Zdrowia, Bezpieczeństwo pacjentów przy stosowaniu antybiotykoterapii w szpitalach, 2019.
- [184] B. Mazińska, W. Hryniewicz, ANTYBIOTYKOOPORNOŚĆ : PRZYCZYNY I KONSEKWENCJE, (2020) 249-257. doi:10.21307/PM-2020.59.3.18.
- [185] A. Murei, W.B. Ayinde, M.W. Gitari, A. Samie, Functionalization and antimicrobial evaluation of ampicillin, penicillin and vancomycin with Pyrenacantha grandiflora Baill and silver nanoparticles, Sci. Rep. 10 (2020) 1-14. doi:10.1038/s41598-020-68290-x.
- [186] Edward Turosa, G. Suresh Kumar Reddya, Kerriann Greenhalgha, Praveen Ramarajua, and D.V.L. Sampath C. Abeylatha, Seyoung Jangb, Sonja Dickeyc, Penicillin-Bound Polyacrylate Nanoparticles: Restoring the Activity of β-Lactam Antibiotics Against MRSA, Bioorg Med Chem Lett.
 12 (2007) 3468-3472. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf.
- [187] A.N. Brown, K. Smith, T.A. Samuels, J. Lu, S.O. Obare, M.E. Scott, Nanoparticles functionalized with ampicillin destroy multiple-antibiotic-resistant isolates of Pseudomonas aeruginosa and Enterobacter aerogenes and methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Appl. Environ. Microbiol. 78 (2012) 2768-2774. doi:10.1128/AEM.06513-11.
- [188] D.S. Ipe, P.T.S. Kumar, R.M. Love, S.M. Hamlet, Silver Nanoparticles at Biocompatible Dosage Synergistically Increases Bacterial Susceptibility to Antibiotics, Front. Microbiol. 11 (2020) 1-11. doi:10.3389/fmicb.2020.01074.
- [189] X. Bi, L. Yang, Z. Wang, Y. Zhan, S. Wang, C. Zhang, Y. Li, Y. Miao, J. Zha, Construction of a Three-Dimensional BaTiO 3 Network for Enhanced Permittivity and Energy Storage of PVDF Composites, (2021).
- [190] E.K. Tetteh, S. Rathilal, Prospects of Synthesized Magnetic TiO 2 -Based Membranes for Wastewater Treatment : A Review, (2021) 11-15.
- [191] D. Astruc, Introduction: Nanoparticles in Catalysis, Chem. Rev. 120 (2020) 461-463. doi:10.1021/acs.chemrev.8b00696.
- [192] M.A. Huq, S. Akter, Bacterial mediated rapid and facile synthesis of silver nanoparticles and their

antimicrobial efficacy against pathogenic microorganisms, Materials (Basel). 14 (2021). doi:10.3390/ma14102615.

- [193] M. Rai, S. Bonde, P. Golinska, J. Trzcińska-Wencel, A. Gade, K. Abd-Elsalam, S. Shende, S. Gaikwad, A.P. Ingle, Fusarium as a novel fungus for the synthesis of nanoparticles: Mechanism and applications, J. Fungi. 7 (2021) 1-24. doi:10.3390/jof7020139.
- [194] S. Azizi, F. Namvar, M. Mahdavi, M. Bin Ahmad, R. Mohamad, Biosynthesis of silver nanoparticles using brown marine macroalga, Sargassum muticum aqueous extract, Materials (Basel). 6 (2013) 5942-5950. doi:10.3390/ma6125942.
- [195] N. Reddy, Properties and Applications of Nanoparticles from Plant Proteins, (2021) 1-41.
- [196] R.G. Saratale, G.D. Saratale, S.K. Cho, G. Ghodake, A. Kadam, S. Kumar, S.I. Mulla, D.S. Kim, B.H. Jeon, J.S. Chang, H.S. Shin, Phyto-fabrication of silver nanoparticles by Acacia nilotica leaves: Investigating their antineoplastic, free radical scavenging potential and application in H 2 O 2 sensing, J. Taiwan Inst. Chem. Eng. 99 (2019) 239-249. doi:10.1016/j.jtice.2019.03.003.
- [197] A. Gupta, S. Pandey, J.S. Yadav, A review on recent trends in green synthesis of gold nanoparticles for tuberculosis, Adv. Pharm. Bull. 11 (2021) 10-27. doi:10.34172/apb.2021.002.
- [198] S. Ahmed, M. Ahmad, B.L. Swami, S. Ikram, A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise, J. Adv. Res. 7 (2016) 17-28. doi:10.1016/j.jare.2015.02.007.
- [199] D. Kavaz, H. Umar, S. Shehu, Synthesis, characterization, antimicrobial and antimetastatic activity of silver nanoparticles synthesized from Ficus ingens leaf, Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol. 46 (2018) S1193-S1203. doi:10.1080/21691401.2018.1536060.
- [200] S. Onitsuka, T. Hamada, H. Okamura, Preparation of antimicrobial gold and silver nanoparticles from tea leaf extracts, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 173 (2019) 242-248. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.09.055.
- [201] E. Bernardo-Mazariegos, B. Valdez-Salas, D. González-Mendoza, A. Abdelmoteleb, O. Tzintzun Camacho, C. Ceceña Duran, F. Gutiérrez-Miceli, Silver nanoparticles from Justicia spicigera and their antimicrobial potentialities in the biocontrol of foodborne bacteria and phytopathogenic fungi, Rev. Argent. Microbiol. 51 (2019) 103-109. doi:10.1016/j.ram.2018.05.002.
- [202] S. P. Vinay, N. Chandrasekhar, Green Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles using Cassia auriculata Leaves Extract and Its Efficacy as A Potential Antibacterial and Cytotoxic Effect, Adv. Mater. Lett. 10 (2019) 844-849. doi:10.5185/amlett.2019.0046.
- [203] F.Ö. Küp, S. Çoşkunçay, F. Duman, Biosynthesis of silver nanoparticles using leaf extract of Aesculus hippocastanum (horse chestnut): Evaluation of their antibacterial, antioxidant and drug release system activities, Mater. Sci. Eng. C. 107 (2020). doi:10.1016/j.msec.2019.110207.
- [204] A.J. Kora, J. Mounika, R. Jagadeeshwar, Rice leaf extract synthesized silver nanoparticles: An in vitro fungicidal evaluation against Rhizoctonia solani, the causative agent of sheath blight disease in rice, Fungal Biol. 124 (2020) 671-681. doi:10.1016/j.funbio.2020.03.012.
- [205] H.A. Widatalla, L.F. Yassin, A.A. Alrasheid, S.A. Rahman Ahmed, M.O. Widdatallah, S.H. Eltilib, A.A. Mohamed, Green synthesis of silver nanoparticles using green tea leaf extract, characterization and evaluation of antimicrobial activity, Nanoscale Adv. 4 (2022) 911-915. doi:10.1039/d1na00509j.
- [206] S. Chandrasekharan, G. Chinnasamy, S. Bhatnagar, Sustainable phyto-fabrication of silver nanoparticles using Gmelina arborea exhibit antimicrobial and biofilm inhibition activity, Sci. Rep. 12 (2022) 1-16. doi:10.1038/s41598-021-04025-w.
- [207] A. Baran, M. Fırat Baran, C. Keskin, A. Hatipoğlu, Ö. Yavuz, S. İrtegün Kandemir, M.T. Adican, R. Khalilov, A. Mammadova, E. Ahmadian, G. Rosić, D. Selakovic, A. Eftekhari, Investigation of

Antimicrobial and Cytotoxic Properties and Specification of Silver Nanoparticles (AgNPs) Derived From Cicer arietinum L. Green Leaf Extract, Front. Bioeng. Biotechnol. 10 (2022) 1-11. doi:10.3389/fbioe.2022.855136.

- [208] S. Vinodhini, B.S.M. Vithiya, T.A.A. Prasad, Green synthesis of silver nanoparticles by employing the Allium fistulosum, Tabernaemontana divaricate and Basella alba leaf extracts for antimicrobial applications, J. King Saud Univ. - Sci. 34 (2022) 101939. doi:10.1016/j.jksus.2022.101939.
- [209] S. Ali, S. Sulaiman, A. Khan, M.R. Khan, R. Khan, Green synthesized silver nanoparticles (AgNPs) from Parrotiopsis jacquemontiana (Decne) Rehder leaf extract and its biological activities, Microsc. Res. Tech. 85 (2022) 28-43. doi:10.1002/jemt.23882.
- [210] M. Khan, A.U. Khan, I.S. Moon, R. Felimban, R. Alserihi, W.F. Alsanie, M. Alam, Synthesis of biogenic silver nanoparticles from the seed coat waste of pistachio (Pistacia vera) and their effect on the growth of eggplant, Nanotechnol. Rev. 10 (2021) 1789-1800. doi:10.1515/ntrev-2021-0107.
- [211] A. Qidwai, R. Kumar, A. Dikshit, Green synthesis of silver nanoparticles by seed of phoenix sylvestris L. and their role in the management of cosmetics embarrassment, Green Chem. Lett. Rev. 11 (2018) 176-188. doi:10.1080/17518253.2018.1445301.
- [212] M.S. Nawabjohn, P. Sivaprakasam, S.K. Anandasadagopan, A.A. Begum, A.K. Pandurangan, Green Synthesis and Characterisation of Silver Nanoparticles Using Cassia tora Seed Extract and Investigation of Antibacterial Potential, Appl. Biochem. Biotechnol. 194 (2022) 464-478. doi:10.1007/s12010-021-03651-4.
- [213] K. Chand, C. Jiao, M.N. Lakhan, A.H. Shah, V. Kumar, D.E. Fouad, M.B. Chandio, A. Ali Maitlo, M. Ahmed, D. Cao, Green synthesis, characterization and photocatalytic activity of silver nanoparticles synthesized with Nigella Sativa seed extract, Chem. Phys. Lett. 763 (2021) 138218. doi:10.1016/j.cplett.2020.138218.
- [214] L. Hernández-Morales, H. Espinoza-Gómez, L.Z. Flores-López, E.L. Sotelo-Barrera, A. Núñez-Rivera, R.D. Cadena-Nava, G. Alonso-Núñez, K.A. Espinoza, Study of the green synthesis of silver nanoparticles using a natural extract of dark or white Salvia hispanica L. seeds and their antibacterial application, Elsevier B.V, 2019. doi:10.1016/j.apsusc.2019.06.031.
- [215] N.G. Girón-Vázquez, C.M. Gómez-Gutiérrez, C.A. Soto-Robles, O. Nava, E. Lugo-Medina, V.H. Castrejón-Sánchez, A.R. Vilchis-Nestor, P.A. Luque, Study of the effect of Persea americana seed in the green synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial properties, Results Phys. 13 (2019) 102142. doi:10.1016/j.rinp.2019.02.078.
- [216] H. Uğuz, A. Goyal, T. Meenpal, I.W. Selesnick, R.G. Baraniuk, N.G. Kingsbury, A. Haiter Lenin, S. Mary Vasanthi, T. Jayasree, M. Adam, E.Y.K. Ng, S.L. Oh, M.L. Heng, Y. Hagiwara, J.H. Tan, J.W.K. Tong, U.R. Acharya, G. Cappiello, S. Das, E.B. Mazomenos, K. Maharatna, G. Koulaouzidis, J. Morgan, P.E. Puddu, M.A. Goda, P. Hajas, G.D. Clifford, C. Liu, B. Moody, D. Springer, I. Silva, Q. Li, R.G. Mark, D. Kristomo, R. Hidayat, I. Soesanti, A. Kusjani, I. Grzegorczyk, M. Solinski, M. Lepek, A. Perka, J. Rosinski, J. Rymko, K. Stepien, J. Gieraltowski, A. Ghaffari, M.R. Homaeinezhad, M. Khazraee, M.M. Daevaeiha, J. Xu, L.G. Durand, P. Pibarot, S.K. Randhawa, M. Singh, J. Robinson, K. Xi, R.V. Kumar, A.C. Ferrari, H. Au, M.-M. Titirici, A. Parra Puerto, A. Kucernak, S.D.S. Fitch, N. Garcia-Araez, J. Herzig, A. Bickel, A. Eitan, N. Intrator, J. Robinson, K. Xi, R.V. Kumar, A.C. Ferrari, H. Au, M.-M. Titirici, A. Parra Puerto, A. Kucernak, S.D.S. Fitch, N. Garcia-Araez, H. Search, C. Journals, A. Contact, M. Iopscience, I.P. Address, A.M. Rahman, T.A. Manuscript, I.O.P. Publishing, A. Manuscript, A. Manuscript, C.C. By-nc-nd, A. Manuscript, C. Liu, D. Springer, G.D. Clifford, D. verma Atul, and Y.H. Lei Shao, Qing Gao, Xie, Jianzhong Fu, Meixiang Xiang, E. Kay, A. Agarwal, M. Gjoreski, A. Gradisek, B. Budna, M. Gams,

G. Poglajen, H. Li, Y. Ren, G. Zhang, R. Wang, J. Cui, W. Zhang, A.K. Dwivedi, S.A. Imtiaz, E. Rodriguez-Villegas, ce pte d M us pt, J. Phys. Energy. 2 (2020) 0-31.

- [217] S.S. Dash, J. Banerjee, S. Samanta, B. Giri, S.K. Dash, Microwave-Assisted Fabrication of Silver Nanoparticles Utilizing Seed Extract of Areca catechu with Antioxidant Potency and Evaluation of Antibacterial Efficacy Against Multidrug Resistant Pathogenic Bacterial Strains, Bionanoscience. (2022). doi:10.1007/s12668-021-00927-1.
- [218] M. Kandiah, K.N. Chandrasekaran, Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Catharanthus roseus Flower Extracts and the Determination of Their Antioxidant, Antimicrobial, and Photocatalytic Activity, J. Nanotechnol. 2021 (2021). doi:10.1155/2021/5512786.
- [219] G. Suriyakala, S. Sathiyaraj, S. Devanesan, M.S. AlSalhi, A. Rajasekar, M.K. Maruthamuthu, R. Babujanarthanam, Phytosynthesis of silver nanoparticles from Jatropha integerrima Jacq. flower extract and their possible applications as antibacterial and antioxidant agent, Saudi J. Biol. Sci. 29 (2022) 680-688. doi:10.1016/j.sjbs.2021.12.007.
- [220] S. Devanesan, M.S. Alsalhi, Green synthesis of silver nanoparticles using the flower extract of abelmoschus esculentus for cytotoxicity and antimicrobial studies, Int. J. Nanomedicine. 16 (2021) 3343-3356. doi:10.2147/IJN.S307676.
- [221] L.N. Khanal, K.R. Sharma, H. Paudyal, K. Parajuli, B. Dahal, G.C. Ganga, Y.R. Pokharel, S.K. Kalauni, Green Synthesis of Silver Nanoparticles from Root Extracts of Rubus ellipticus Sm. and Comparison of Antioxidant and Antibacterial Activity, 2022 (2022).
- [222] S. Kapoor, H. Sood, S. Saxena, O.P. Chaurasia, Green synthesis of silver nanoparticles using Rhodiola imbricata and Withania somnifera root extract and their potential catalytic, antioxidant, cytotoxic and growth-promoting activities, Bioprocess Biosyst. Eng. 45 (2022) 365-380. doi:10.1007/s00449-021-02666-9.
- [223] S. Show, C. Ghosal, B. Chattopadhyay, Root Extracts (<i>Gymnadenia orchidis</i> Lindl) Facilitated Rapid Synthesis of Fluorescent Silver Nanoparticles (Ag-NPs) for Various Biological Applications, J. Biomater. Nanobiotechnol. 08 (2017) 109-124. doi:10.4236/jbnb.2017.81008.
- [224] S. Arokiyaraj, S. Vincent, M. Saravanan, Y. Lee, Y.K. Oh, K.H. Kim, Green synthesis of silver nanoparticles using Rheum palmatum root extract and their antibacterial activity against Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa, Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol. 45 (2017) 372-379. doi:10.3109/21691401.2016.1160403.
- [225] I. Ilahi, F. Khuda, M. Umar Khayam Sahibzada, S. Alghamdi, R. Ullah, Zakiullah, A.S. Dablool, M. Alam, A. Khan, A. Ali Khan Khalil, Synthesis of silver nanoparticles using root extract of Duchesnea indica and assessment of its biological activities, Arab. J. Chem. 14 (2021) 103110. doi:10.1016/j.arabjc.2021.103110.
- [226] E. Abbasi, M. Milani, S.F. Aval, M. Kouhi, A. Akbarzadeh, H.T. Nasrabadi, P. Nikasa, S.W. Joo, Y. Hanifehpour, K. Nejati-Koshki, M. Samiei, Silver nanoparticles: Synthesis methods, bioapplications and properties, Crit. Rev. Microbiol. 42 (2016) 173-180. doi:10.3109/1040841X.2014.912200.
- [227] A. Ivask, A. Elbadawy, C. Kaweeteerawat, D. Boren, H. Fischer, Z. Ji, C.H. Chang, R. Liu, T. Tolaymat, D. Telesca, J.I. Zink, Y. Cohen, P.A. Holden, H.A. Godwin, Toxicity mechanisms in Escherichia coli vary for silver nanoparticles and differ from ionic silver, ACS Nano. 8 (2014) 374-386. doi:10.1021/nn4044047.
- [228] R. Manjumeena, D. Duraibabu, J. Sudha, P.T. Kalaichelvan, Biogenic nanosilver incorporated reverse osmosis membrane for antibacterial and antifungal activities against selected pathogenic strains: An enhanced eco-friendly water disinfection approach, J. Environ. Sci. Heal. - Part A

Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng. 49 (2014) 1125-1133. doi:10.1080/10934529.2014.897149.

- [229] D. Botelho, B.F. Leo, C. Massa, S. Sarkar, T. Tetley, K.F. Chung, S. Chen, M.P. Ryan, A. Porter, E.N. Atochina-Vasserman, J. Zhang, S. Schwander, A.J. Gow, Exposure to silver nanospheres leads to altered respiratory mechanics and delayed immune response in an in Vivo murine model, Front. Pharmacol. 9 (2018) 1-9. doi:10.3389/fphar.2018.00213.
- [230] Y. Qing, L. Cheng, R. Li, G. Liu, Y. Zhang, X. Tang, J. Wang, H. Liu, Y. Qin, Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies, Int. J. Nanomedicine. 13 (2018) 3311-3327. doi:10.2147/IJN.S165125.
- [231] P.D. Bragg, D.J. Rainnie, The effect of silver ions on the respiratory chain of Escherichia coli, Can. J. Microbiol. 20 (1974) 883-889. doi:10.1139/m74-135.
- [232] D. Wu, W. Fan, A. Kishen, J.L. Gutmann, B. Fan, Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against Enterococcus faecalis biofilm, J. Endod. 40 (2014) 285-290. doi:10.1016/j.joen.2013.08.022.
- [233] J.A. Shaik, R.K. Reddy, Review Article Prevention and Treatment of White Spot Lesions in Orthodontic Patients, Contemp. Clin. Dent. 8 (2017) 11-9. doi:10.4103/ccd.ccd.
- [234] L.A. Tamayo, P.A. Zapata, N.D. Vejar, M.I. Azócar, M.A. Gulppi, X. Zhou, G.E. Thompson, F.M. Rabagliati, M.A. Páez, Release of silver and copper nanoparticles from polyethylene nanocomposites and their penetration into Listeria monocytogenes, Mater. Sci. Eng. C. 40 (2014) 24-31. doi:10.1016/j.msec.2014.03.037.
- [235] R. Vijayan, S. Joseph, B. Mathew, Eco-friendly synthesis of silver and gold nanoparticles with enhanced antimicrobial, antioxidant, and catalytic activities, IET Nanobiotechnology. 12 (2018) 850-856. doi:10.1049/iet-nbt.2017.0311.
- [236] M.A. Biel, C. Sievert, M. Usacheva, M. Teichert, J. Balcom, Antimicrobial photodynamic therapy treatment of chronic recurrent sinusitis biofilms, Int. Forum Allergy Rhinol. 1 (2011) 329-334. doi:10.1002/alr.20089.
- [237] S.P. Dhas, S.P. John, A. Mukherjee, N. Chandrasekaran, Autocatalytic growth of biofunctionalized antibacterial silver nanoparticles, Biotechnol. Appl. Biochem. 61 (2014) 322-332. doi:10.1002/bab.1161.
- [238] C. Wang, X. Huang, W. Deng, C. Chang, R. Hang, B. Tang, A nano-silver composite based on the ion-exchange response for the intelligent antibacterial applications, Mater. Sci. Eng. C. 41 (2014) 134-141. doi:10.1016/j.msec.2014.04.044.
- [239] J.S. Kim, E. Kuk, K.N. Yu, J.H. Kim, S.J. Park, H.J. Lee, S.H. Kim, Y.K. Park, Y.H. Park, C.Y. Hwang, Y.K. Kim, Y.S. Lee, D.H. Jeong, M.H. Cho, Antimicrobial effects of silver nanoparticles, Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. 3 (2007) 95-101. doi:10.1016/j.nano.2006.12.001.
- [240] G.R. Salunke, S. Ghosh, R.J. Santosh Kumar, S. Khade, P. Vashisth, T. Kale, S. Chopade, V. Pruthi, G. Kundu, J.R. Bellare, B.A. Chopade, Rapid efficient synthesis and characterization of silver, gold, and bimetallic nanoparticles from the medicinal plant Plumbago zeylanica and their application in biofilm control, Int. J. Nanomedicine. 9 (2014) 2635-2653. doi:10.2147/IJN.S59834.
- [241] C.G. Kumar, P. Sujitha, Green synthesis of Kocuran-functionalized silver glyconanoparticles for use as antibiofilm coatings on silicone urethral catheters, Nanotechnology. 25 (2014). doi:10.1088/0957-4484/25/32/325101.
- [242] S. Shrivastava, T. Bera, S.K. Singh, G. Singh, P. Ramachandrarao, D. Dash, Characterization of antiplatelet properties of silver nanoparticles, ACS Nano. 3 (2009) 1357-1364. doi:10.1021/nn900277t.
- [243] J. Jain, S. Arora, J.M. Rajwade, P. Omray, S. Khandelwal, K.M. Paknikar, Silver Nanoparticles in Therapeutics, Mol. Pharm. 6 (2009) 1388-1401.

- [244] T.M. Muhsin, A.K. Hachim, Mycosynthesis and characterization of silver nanoparticles and their activity against some human pathogenic bacteria, World J. Microbiol. Biotechnol. 30 (2014) 2081-2090. doi:10.1007/s11274-014-1634-z.
- [245] J.R. Morones, J.L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J.B. Kouri, J.T. Ramírez, M.J. Yacaman, The bactericidal effect of silver nanoparticles, Nanotechnology. 16 (2005) 2346-2353. doi:10.1088/0957-4484/16/10/059.
- [246] D. Wei, W. Sun, W. Qian, Y. Ye, X. Ma, The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity, Carbohydr. Res. 344 (2009) 2375-2382. doi:10.1016/j.carres.2009.09.001.
- [247] A. Panáček, L. Kvítek, R. Prucek, M. Kolář, R. Večeřová, N. Pizúrová, V.K. Sharma, T. Nevěčná, R. Zbořil, Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity, J. Phys. Chem. B. 110 (2006) 16248-16253. doi:10.1021/jp063826h.
- [248] M.A. Raza, Z. Kanwal, A. Rauf, A.N. Sabri, S. Riaz, Size- and Shape-Dependent Antibacterial Studies of Silver Nanoparticles Synthesized by Wet Chemical Routes, (n.d.). doi:10.3390/nano6040074.
- [249] P. Van Dong, C.H. Ha, L.T. Binh, J. Kasbohm, Chemical synthesis and antibacterial activity of novel-shaped silver nanoparticles, Int. Nano Lett. 2 (2012) 1-9. doi:10.1186/2228-5326-2-9.
- [250] H. Deng, D. McShan, Y. Zhang, S.S. Sinha, Z. Arslan, P.C. Ray, H. Yu, Mechanistic Study of the Synergistic Antibacterial Activity of Combined Silver Nanoparticles and Common Antibiotics, Environ. Sci. Technol. 50 (2016) 8840-8848. doi:10.1021/acs.est.6b00998.
- [251] A. Panácek, M. Smékalová, M. Kilianová, R. Prucek, K. Bogdanová, R. Věcěrová, M. Kolár, M. Havrdová, G.A. Płaza, J. Chojniak, R. Zbŏril, L. Kvítek, Strong and nonspecific synergistic antibacterial efficiency of antibiotics combined with silver nanoparticles at very low concentrations showing no cytotoxic effect, Molecules. 21 (2016) 1-17. doi:10.3390/molecules21010026.
- [252] J.K. Patra, K.H. Baek, Antibacterial activity and synergistic antibacterial potential of biosynthesized silver nanoparticles against foodborne pathogenic bacteria along with its anticandidal and antioxidant effects, Front. Microbiol. 8 (2017) 1-14. doi:10.3389/fmicb.2017.00167.
- [253] A.M. Fayaz, K. Balaji, M. Girilal, R. Yadav, P.T. Kalaichelvan, R. Venketesan, Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria, Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. 6 (2010) 103-109. doi:10.1016/j.nano.2009.04.006.
- [254] R. Vazquez-Muñoz, A. Meza-Villezcas, P.G.J. Fournier, E. Soria-Castro, K. Juarez-Moreno, A.L. Gallego-Hernández, N. Bogdanchikova, R. Vazquez-Duhalt, A. Huerta-Saquero, Enhancement of antibiotics antimicrobial activity due to the silver nanoparticles impact on the cell membrane, PLoS One. 14 (2019) 1-18. doi:10.1371/journal.pone.0224904.
- [255] D.M. Eby, H.R. Luckarift, G.R. Johnson, Hybrid antimicrobial enzyme and silver nanoparticle coatings for medical Instruments, ACS Appl. Mater. Interfaces. 1 (2009) 1553-1560. doi:10.1021/am9002155.
- [256] A.R. Silva, G. Unali, Controlled silver delivery by silver-cellulose nanocomposites prepared by a one-pot green synthesis assisted by microwaves, Nanotechnology. 22 (2011). doi:10.1088/0957-4484/22/31/315605.
- [257] L.C. Powell, M.F. Pritchard, E.L. Ferguson, K.A. Powell, S.U. Patel, P.D. Rye, S.M. Sakellakou, N.J. Buurma, C.D. Brilliant, J.M. Copping, G.E. Menzies, P.D. Lewis, K.E. Hill, D.W. Thomas, Targeted disruption of the extracellular polymeric network of Pseudomonas aeruginosa biofilms by alginate oligosaccharides, Npj Biofilms Microbiomes. 4 (2018). doi:10.1038/s41522-018-0056-3.

- [258] P. Dallas, V.K. Sharma, R. Zboril, Silver polymeric nanocomposites as advanced antimicrobial agents: Classification, synthetic paths, applications, and perspectives, Adv. Colloid Interface Sci. 166 (2011) 119-135. doi:10.1016/j.cis.2011.05.008.
- [259] L. Guo, W. Yuan, Z. Lu, C.M. Li, Polymer/nanosilver composite coatings for antibacterial applications, Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 439 (2013) 69-83. doi:10.1016/j.colsurfa.2012.12.029.
- [260] Z. Shi, K.G. Neoh, E.T. Kang, Surface-grafted viologen for precipitation of silver nanoparticles and their combined bactericidal activities, Langmuir. 20 (2004) 6847-6852. doi:10.1021/la049132m.
- [261] W. Yuan, J. Fu, K. Su, J. Ji, Self-assembled chitosan/heparin multilayer film as a novel template for in situ synthesis of silver nanoparticles, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 76 (2010) 549-555. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.12.017.
- [262] K. Vasilev, Nanoengineered antibacterial coatings and materials: A perspective, Coatings. 9 (2019). doi:10.3390/coatings9100654.
- [263] E.R. Kenawy, S.D. Worley, R. Broughton, The chemistry and applications of antimicrobial polymers: A state-of-the-art review, Biomacromolecules. 8 (2007) 1359-1384. doi:10.1021/bm061150q.
- [264] C.H. Ho, J. Tobis, C. Sprich, R. Thomann, J.C. Tiller, Nanoseparated polymeric networks with multiple antimicrobial properties, Adv. Mater. 16 (2004) 957-961. doi:10.1002/adma.200306253.
- [265] S. Lowe, N.M. O'Brien-Simpson, L.A. Connal, Antibiofouling polymer interfaces: Poly(ethylene glycol) and other promising candidates, Polym. Chem. 6 (2015) 198-212. doi:10.1039/c4py01356e.
- [266] M. Heuberger, T. Drobek, N.D. Spencer, Interaction forces and morphology of a protein-resistant poly(ethylene glycol) layer, Biophys. J. 88 (2005) 495-504. doi:10.1529/biophysj.104.045443.
- [267] M. Benčina, T. Mavrič, I. Junkar, A. Bajt, A. Krajnović, K. Lakota, P. Žigon, S. Sodin-Šemrl, V. Kralj-Iglič, A. Iglič, The Importance of Antibacterial Surfaces in Biomedical Applications, Adv. Biomembr. Lipid Self-Assembly. 28 (2018) 115-165. doi:10.1016/bs.abl.2018.05.001.
- [268] H. Shi, H. Liu, S. Luan, D. Shi, S. Yan, C. Liu, R.K.Y. Li, J. Yin, Effect of polyethylene glycol on the antibacterial properties of polyurethane/carbon nanotube electrospun nanofibers, RSC Adv. 6 (2016) 19238-19244. doi:10.1039/c6ra00363j.
- [269] C. Tao, W. Zhu, J. Iqbal, C. Xu, D.A. Wang, Stabilized albumin coatings on engineered xenografts for attenuation of acute immune and inflammatory responses, J. Mater. Chem. B. 8 (2020) 6080-6091. doi:10.1039/d0tb01111h.
- [270] A. Manuscript, M. Adhesives, Mussel-Inspired Adhesives and Coatings, Annu Rev Mater Res 41 (2011) 99-132.pdf, (2011) 99-132. doi:10.1146/annurev-matsci-062910-100429.Mussel-Inspired.
- [271] S. Cometta, N. Bock, S. Suresh, T.R. Dargaville, D.W. Hutmacher, Antibacterial Albumin-Tannic Acid Coatings for Scaffold-Guided Breast Reconstruction, Front. Bioeng. Biotechnol. 9 (2021) 1-14. doi:10.3389/fbioe.2021.638577.
- [272] T. Peters, A.J. Stewart, Albumin research in the 21st century, Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj. 1830 (2013) 5351-5353. doi:10.1016/j.bbagen.2013.05.012.
- [273] G. Fanali, A. Di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi, Human serum albumin: From bench to bedside, Mol. Aspects Med. 33 (2012) 209-290. doi:10.1016/j.mam.2011.12.002.
- [274] P.J. Rivero, A. Urrutia, J. Goicoechea, C.R. Zamarreño, F.J. Arregui, I.R. Matías, An antibacterial coating based on a polymer/sol- gel hybrid matrix loaded with silver nanoparticles, Nanoscale Res. Lett. 6 (2011) 1-7. doi:10.1186/1556-276X-6-305.
- [275] M.L. Guimarães, F.A.G. da Silva, M.M. da Costa, H.P. de Oliveira, Coating of conducting polymer-silver nanoparticles for antibacterial protection of Nile tilapia skin xenografts, Synth. Met. 287 (2022) 117055. doi:10.1016/j.synthmet.2022.117055.

- [276] B.B. Wang, Y.H. Quan, Z.M. Xu, Q. Zhao, Preparation of highly effective antibacterial coating with polydopamine/chitosan/silver nanoparticles via simple immersion, Prog. Org. Coatings. 149 (2020) 105967. doi:10.1016/j.porgcoat.2020.105967.
- [277] J. Wang, L. Zhan, X. Zhang, R. Wu, L. Liao, J. Wei, Silver Nanoparticles Coated Poly(L-Lactide) Electrospun Membrane for Implant Associated Infections Prevention, Front. Pharmacol. 11 (2020) 1-8. doi:10.3389/fphar.2020.00431.
- [278] H.A. Tran, P.A. Tran, In Situ Coatings of Silver Nanoparticles for Biofilm Treatment in Implant-Retention Surgeries: Antimicrobial Activities in Monoculture and Coculture, ACS Appl. Mater. Interfaces. 13 (2021) 41435-41444. doi:10.1021/acsami.1c08239.
- [279] M.A. Awad, A.A. Hendi, K.M.O. Ortashi, A.B. Alanazi, B.A. ALZahrani, D.A. Soliman, Greener synthesis, characterization, and antimicrobiological effects of helba silver nanoparticle-PMMA nanocomposite, Int. J. Polym. Sci. 2019 (2019). doi:10.1155/2019/4379507.
- [280] Z. Gouveia, H. Perinpanayagam, J. Zhu, Development of Robust Chitosan-Silica Class II hybrid coatings with antimicrobial properties for titanium implants, Coatings. 10 (2020). doi:10.3390/COATINGS10060534.
- [281] Ł. Pawłowski, M. Bartmański, A. Mielewczyk-Gryń, B.M. Cieślik, G. Gajowiec, A. Zieliński, Electrophoretically deposited chitosan/eudragit e 100/agnps composite coatings on titanium substrate as a silver release system, Materials (Basel). 14 (2021). doi:10.3390/ma14164533.
- [282] A.C. Schneid, M.B. Pereira, F. Horowitz, R.S. Mauler, C.R. Matte, M.P. Klein, F.H. Plinho, T.M.H. Costa, E.W.D. De Menezes, E. V. Benvenutti, Silver nanoparticle thin films deposited on glass surface using an ionic silsesquioxane as stabilizer and as crosslinking agent, J. Braz. Chem. Soc. 26 (2015) 1004-1012. doi:10.5935/0103-5053.20150066.
- [283] W. Zhou, Z. Jia, P. Xiong, J. Yan, Y. Li, M. Li, Y. Cheng, Y. Zheng, Bioinspired and Biomimetic AgNPs/Gentamicin-Embedded Silk Fibroin Coatings for Robust Antibacterial and Osteogenetic Applications, ACS Appl. Mater. Interfaces. 9 (2017) 25830-25846. doi:10.1021/acsami.7b06757.
- [284] W. Zhou, Y. Li, J. Yan, P. Xiong, Q. Li, Y. Cheng, Y. Zheng, Construction of Self-defensive Antibacterial and Osteogenic AgNPs/Gentamicin Coatings with Chitosan as Nanovalves for Controlled release, Sci. Rep. 8 (2018) 1-12. doi:10.1038/s41598-018-31843-2.
- [285] S.H. Choi, Y.S. Jang, J.H. Jang, T.S. Bae, S.J. Lee, M.H. Lee, Enhanced antibacterial activity of titanium by surface modification with polydopamine and silver for dental implant application, J. Appl. Biomater. Funct. Mater. 17 (2019). doi:10.1177/2280800019847067.
- [286] M. Herrmann, P.E. Vaudaux, D. Pittet, R. Auckenthaler, P. Daniel Lew, F. Schumacher-Perdreau, G. Peters, F.A. Waldvogel, Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material, J. Infect. Dis. 158 (1988) 693-701. doi:10.1093/infdis/158.4.693.
- [287] P. Brokke, J. Dankert, J. Carballo, J. Feijen, Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci onto Polyethylene Catheters in vitro and in vivo: A Study on the Influence of various Plasma Proteins, J. Biomater. Appl. 5 (1991) 204-226. doi:10.1177/088532829100500305.
- [288] R. Ma, H. Pan, T. Shen, P. Li, Y. Chen, Z. Li, X. Di, S. Wang, Interaction of flavonoids from woodwardia unigemmata with bovine serum albumin (BSA): Application of spectroscopic techniques and molecular modeling methods, Molecules. 22 (2017). doi:10.3390/molecules22081317.
- [289] T.R. Correia, D.R. Figueira, K.D. de Sá, S.P. Miguel, R.G. Fradique, A.G. Mendonça, I.J. Correia, 3D Printed scaffolds with bactericidal activity aimed for bone tissue regeneration, Int. J. Biol. Macromol. 93 (2016) 1432-1445. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.06.004.
- [290] R. García-Alvarez, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí, 3D scaffold with effective multidrug

sequential release against bacteria biofilm, Acta Biomater. 49 (2017) 113-126. doi:10.1016/j.actbio.2016.11.028.

- [291] M. Li, X. Liu, Z. Xu, K.W.K. Yeung, S. Wu, Dopamine Modified Organic-Inorganic Hybrid Coating for Antimicrobial and Osteogenesis, ACS Appl. Mater. Interfaces. 8 (2016) 33972-33981. doi:10.1021/acsami.6b09457.
- [292] S.K. Mishra, A.K. Teotia, A. Kumar, S. Kannan, Mechanically tuned nanocomposite coating on titanium metal with integrated properties of biofilm inhibition, cell proliferation, and sustained drug delivery, Elsevier B.V., 2017. doi:10.1016/j.nano.2016.08.010.
- [293] C.M. Xie, X. Lu, K.F. Wang, F.Z. Meng, O. Jiang, H.P. Zhang, W. Zhi, L.M. Fang, Silver nanoparticles and growth factors incorporated hydroxyapatite coatings on metallic implant surfaces for enhancement of osteoinductivity and antibacterial properties, ACS Appl. Mater. Interfaces. 6 (2014) 8580-8589. doi:10.1021/am501428e.
- [294] N. Liang, D.D. Kitts, Antioxidant property of coffee components: Assessment of methods that define mechanism of action, Molecules. 19 (2014) 19180-19208. doi:10.3390/molecules191119180.
- [295] M. Foti, C. Daquino, C. Geraci, Electron-Transfer Reaction of Cinnamic Acids and Their Methyl Esters with the DPPH• Radical in Alcoholic Solutions, J. Org. Chem. (2004) 2309-2314.
- [296] P. L.Ronald, W. Xianli, S. Karen, Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 4290-4302.
- [297] M. Ji, C. Wang, Y. Bai, M. Yu, Y. Wang, Structural evolution of polyacrylonitrile precursor fibers during preoxidation and carbonization, Polym. Bull. 59 (2007) 527-536. doi:10.1007/s00289-007-0796-3.
- [298] E. Grela, J. Kozłowska, A. Grabowiecka, Current methodology of MTT assay in bacteria A review, Acta Histochem. 120 (2018) 303-311. doi:10.1016/j.acthis.2018.03.007.
- [299] K. Bernacka, K. Bednarska, A. Starzec, S. Mazurek, I. Fecka, Antioxidant and Antiglycation Effects of Cistus × incanus Water Infusion, Its Phenolic Components, and Respective Metabolites, Molecules. 27 (2022). doi:10.3390/molecules27082432.
- [300] E. Barrajõn-Catalán, S. Fernández-Arroyo, C. Roldán, E. Guillén, D. Saura, A. Segura-Carretero, V. Micol, A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several Cistus genus species: Evolutionary relationship, Phytochem. Anal. 22 (2011) 303-312. doi:10.1002/pca.1281.
- [301] N. Buchner, A. Krumbein, S.R. Kroh, L. W., Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin, Rapid Commun. Mass Spectrom. 24 (2006) 1457-1466. doi:10.1002/rcm.
- [302] J.R. Vergara-Salinas, J. Pérez-Jiménez, J.L. Torres, E. Agosin, J.R. Pérez-Correa, Effects of temperature and time on polyphenolic content and antioxidant activity in the pressurized hot water extraction of deodorized thyme (Thymus vulgaris), J. Agric. Food Chem. 60 (2012) 10920-10929. doi:10.1021/jf3027759.
- [303] O. Benavente-García, J. Castillo, F.R. Marin, A. Ortuño, J.A. Del Río, Uses and Properties of Citrus Flavonoids, J. Agric. Food Chem. 45 (1997). doi:10.1021/jf970373s.
- [304] M.G. Traber, J.F. Stevens, Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective, Free Radic. Biol. Med. 51 (2011) 1000-1013. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.017.
- [305] A.T.M. Lima, M.N. Santos, L.A.R. De Souza, T.S. Pinheiro, A.A.O. Paiva, C.M.P.G. Dore, M.S.S.P. Costa, N.D. Santos, Y.G. Baseia, R.M. Araújo, E.L. Leite, Chemical characteristics of a heteropolysaccharide from Tylopilus ballouii mushroom and its antioxidant and anti-inflammatory activities, Carbohydr. Polym. 144 (2016) 400-409. doi:10.1016/j.carbpol.2016.02.050.
- [306] Y.L. Xiong, Antioxidant Peptides, in: and B.J. Yoshinori Mine, Eunice Li-Chan (Ed.), Bioact.

Proteins Pept. as Funct. Foods Nutraceuticals, 2010: pp. 29-42.

- [307] W. Ahmed, S. Rashid, Functional and therapeutic potential of inulin : A comprehensive review, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 0 (2017) 1-13. doi:10.1080/10408398.2017.1355775.
- [308] A. Slistan-Grijalva, R. Herrera-Urbina, J.F. Rivas-Silva, M. Ávalos-Borja, F.F. Castillón-Barraza, A. Posada-Amarillas, Classical theoretical characterization of the surface plasmon absorption band for silver spherical nanoparticles suspended in water and ethylene glycol, Phys. E Low-Dimensional Syst. Nanostructures. 27 (2005) 104-112. doi:10.1016/j.physe.2004.10.014.
- [309] R. Dosi, A. Daniele, V. Guida, L. Ferrara, V. Severino, A. Di, Nutritional and metabolic profiling of the Globe artichoke (Cynara scolymus L. 'Capuanella 'heads) in province of Caserta, Italy Nutritional and metabolic profiling of the globe artichoke (Cynara scolymus L. 'Capuanella ' heads) in province of C, (2013).
- [310] N. Using, A. Yadav, M. Rai, Bioreduction and Mechanistic Aspects Involved in the Synthesis of Silver Bioreduction and Mechanistic Aspects Involved in the Synthesis of Silver Nanoparticles Using Holarrhena antidysenterica, (2011). doi:10.1166/jbns.2011.1051.
- [311] J. Helmlinger, C. Sengstock, C. Groß-Heitfeld, C. Mayer, T.A. Schildhauer, M. Köller, M. Epple, Silver nanoparticles with different size and shape: Equal cytotoxicity, but different antibacterial effects, RSC Adv. 6 (2016) 18490-18501. doi:10.1039/c5ra27836h.
- [312] P. Korshed, L. Li, Z. Liu, A. Mironov, T. Wang, Size-dependent antibacterial activity for lasergenerated silver nanoparticles, J. Interdiscip. Nanomedicine. 4 (2019) 24-33. doi:10.1002/jin2.54.
- [313] M.S.P. Golinska, K.R.H. Dahm, Evaluation of cytotoxicity, immune compatibility and antibacterial activity of biogenic silver nanoparticles, Med. Microbiol. Immunol. 205 (2016) 603-613. doi:10.1007/s00430-016-0477-7.
- [314] L. Zhu, P.Q. Gu, H. Shen, Gallic acid improved inflammation via NF-κB pathway in TNBSinduced ulcerative colitis, Int. Immunopharmacol. 67 (2019) 129-137. doi:10.1016/j.intimp.2018.11.049.
- [315] R. Sun, M. Li, Y. Lu, A. Wang, Immersion behavior of hydroxyapatite (HA) powders before and after sintering, Mater. Charact. 56 (2006) 250-254. doi:10.1016/j.matchar.2005.11.012.
- [316] S. Hossain, S. Ahmed, FTIR spectrum analysis to predict the crystalline and amorphous phases of hydroxyapatite: a comparison of vibrational motion to re fl ection +, (2023) 14625-14630. doi:10.1039/d3ra02580b.
- [317] J.C. Elliott, D.W. Holcomb, R.A. Young, Infrared determination of the degree of substitution of hydroxyl by carbonate ions in human dental enamel, Calcif. Tissue Int. 37 (1985) 372-375. doi:10.1007/BF02553704.
- [318] M. Ibrahim, M. Labaki, J.M. Giraudon, J.F. Lamonier, Hydroxyapatite, a multifunctional material for air, water and soil pollution control: A review, J. Hazard. Mater. 383 (2020). doi:10.1016/j.jhazmat.2019.121139.
- [319] S.L. Bee, M. Mariatti, N. Ahmad, B.H. Yahaya, Z.A. Abdul Hamid, Effect of the calcination temperature on the properties of natural hydroxyapatite derived from chicken bone wastes, Mater. Today Proc. 16 (2019) 1876-1885. doi:10.1016/j.matpr.2019.06.064.
- [320] Y. Li, Y. Wang, Y. Li, W. Luo, J. Jiang, J. Zhao, C. Liu, Controllable Synthesis of Biomimetic Hydroxyapatite Nanorods with High Osteogenic Bioactivity, ACS Biomater. Sci. Eng. 6 (2020) 320-328. doi:10.1021/acsbiomaterials.9b00914.
- [321] P. Fratzl, H.S. Gupta, E.P. Paschalis, P. Roschger, Structure and mechanical quality of the collagen-mineral nano-composite in bone, J. Mater. Chem. 14 (2004) 2115-2123. doi:10.1039/b402005g.
- [322] Y.B. Li, W.J. Weng, K. Cheng, P.Y. Du, G. Shen, G.R. Han, Complexes of Ca(II) with polymers as

precursors for preparation of amorphous calcium phosthate, Mater. Sci. Technol. 20 (2004) 1075-1078. doi:10.1179/026708304225019740.

- [323] S. Liu, W. Weng, Z. Li, L. Pan, K. Cheng, C. Song, P. Du, G. Shen, G. Han, Effect of PEG amount in amorphous calcium phosphate on its crystallized products, J. Mater. Sci. Mater. Med. 20 (2009) 359-363. doi:10.1007/s10856-008-3584-1.
- [324] J.M. Ramis, C.C. Coelho, A. Córdoba, P.A. Quadros, M. Monjo, Safety assessment of nanohydroxyapatite as an oral care ingredient according to the EU cosmetics regulation, Cosmetics. 5 (2018) 1-13. doi:10.3390/COSMETICS5030053.
- [325] H. Minamisawa, Y. Kojima, M. Aizawa, Adsorption of Inositol Phosphate on Hydroxyapatite Powder with High Specific Surface Area, Materials (Basel). 15 (2022) 1-12. doi:10.3390/ma15062176.
- [326] L.H. Huang, X.Y. Sun, J.M. Ouyang, Shape-dependent toxicity and mineralization of hydroxyapatite nanoparticles in A7R5 aortic smooth muscle cells, Sci. Rep. 9 (2019) 1-18. doi:10.1038/s41598-019-55428-9.
- [327] M. Thommes, K. Kaneko, A. V. Neimark, J.P. Olivier, F. Rodriguez-Reinoso, J. Rouquerol, K.S.W. Sing, Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report), Pure Appl. Chem. 87 (2015) 1051-1069. doi:10.1515/pac-2014-1117.
- [328] M.K. Younis, A.Z. Tareq, I.M. Kamal, Optimization of Swelling, Drug Loading and Release from Natural Polymer Hydrogels, IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng. 454 (2018). doi:10.1088/1757-899X/454/1/012017.
- [329] J. Li, D.J. Mooney, Designing hydrogels for controlled drug delivery, Nat. Rev. Mater. 1 (2016) 1-18. doi:10.1038/natrevmats.2016.71.
- [330] S.F. Dana, D.V. Nguyen, J.S. Kochhar, X.Y. Liu, L. Kang, UV-curable pressure sensitive adhesive films: Effects of biocompatible plasticizers on mechanical and adhesion properties, Soft Matter. 9 (2013) 6270-6281. doi:10.1039/c3sm50879j.
- [331] R.A. Kohl, Hydrogen Bonding Between the Carbonyl Group and Wyoming Bentonite, All Grad. Theses Diss. (1960).
- [332] T. Şener Raman, M. Kuehnert, O. Daikos, T. Scherzer, C. Krömmelbein, S.G. Mayr, B. Abel, A. Schulze, A study on the material properties of novel PEGDA/gelatin hybrid hydrogels polymerized by electron beam irradiation, Front. Chem. 10 (2023) 1-12. doi:10.3389/fchem.2022.1094981.
- [333] S. Saimani, A. Kumar, Polyethylene glycol diacrylate and thermoplastic polymers based semi-IPNs for asymmetric membranes, Compos. Interfaces. 15 (2008) 781-797. doi:10.1163/156855408786778276.
- [334] X. Du, Y. Hou, L. Wu, S. Li, A. Yu, D. Kong, L. Wang, G. Niu, An anti-infective hydrogel adhesive with non-swelling and robust mechanical properties for sutureless wound closure, J. Mater. Chem. B. 8 (2020) 5682-5693. doi:10.1039/d0tb00640h.
- [335] N. Of, A. Of, N. Of, A. Of, A. Str, POWŁOKI APATYTOWE NA AZOTOWANYM I NIEAZOTOWANYM PODŁOŻU APATITE LAYERS ON THE TI6AL4V AND NITRIDED TI6AL4V, (n.d.) 58-61.
- [336] D. Siek, J. Czechowska, W. Mróz, A. Zima, S. Burdyńska, R. Załęczny, A. Ślósarczyk, Bioactivity of cement type bone substitutes, Bull. Polish Acad. Sci. Tech. Sci. 61 (2013) 433-439. doi:10.2478/bpasts-2013-0042.
- [337] F. Baino, Copper-doped ordered mesoporous bioactive glass: A promising multifunctional platform for bone tissue engineering, Bioengineering. 7 (2020).

doi:10.3390/bioengineering7020045.

- [338] P. Keikhosravani, H. Maleki-Ghaleh, A.K. Khosrowshahi, M. Bodaghi, Z. Dargahi, M. Kavanlouei, P. Khademi-Azandehi, A. Fallah, Y. Beygi-Khosrowshahi, M.H. Siadati, Bioactivity and antibacterial behaviors of nanostructured lithium-doped hydroxyapatite for bone scaffold application, Int. J. Mol. Sci. 22 (2021). doi:10.3390/ijms22179214.
- [339] K. Anselme, A. Ponche, M. Bigerelle, Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 2: Biological aspects, Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med. 224 (2010) 1487-1507. doi:10.1243/09544119JEIM901.
- [340] L.T. Kuhn, Biomaterials, in: Introd. to Biomed. Eng., 2005: pp. 255-312. doi:10.1016/B978-0-12-238662-6.50008-2.
- [341] A. Wennerberg, T. Albrektsson, Effects of titanium surface topography on bone integration: A systematic review, Clin. Oral Implants Res. 20 (2009) 172-184. doi:10.1111/j.1600-0501.2009.01775.x.
- [342] L. Pinheiro, C.I. Brito, V.C. Pereira, A. de Oliveira, C.H. Camargo, M. de L.R. de S. da Cunha, Reduced susceptibility to vancomycin and biofilm formation in methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis isolated from blood cultures, Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 109 (2014) 871-878. doi:10.1590/0074-0276140120.
- [343] J.R. Price, K. Cole, A. Bexley, V. Kostiou, D.W. Eyre, T. Golubchik, D.J. Wilson, D.W. Crook, A.S. Walker, T.E.A. Peto, M.J. Llewelyn, J. Paul, Transmission of Staphylococcus aureus between health-care workers, the environment, and patients in an intensive care unit: a longitudinal cohort study based on whole-genome sequencing, Lancet Infect. Dis. 17 (2017) 207-214. doi:10.1016/S1473-3099(16)30413-3.
- [344] Z. Khatoon, C.D. McTiernan, E.J. Suuronen, T.F. Mah, E.I. Alarcon, Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention, Heliyon. 4 (2018) e01067. doi:10.1016/j.heliyon.2018.e01067.