

Cel naukowy i streszczenie osiągniętych wyników

Biomateriały metaliczne do zastosowań medycznych nieustannie starają się udoskonalić liczne jednostki badawcze na całym świecie. Bo choć pozwalają ratować ludzkie życie i/lub przywracać sprawność, nawet odporne na korozję materiały nie wykazują pełnej stabilności w środowisku jakim jest organizm ludzki, a ich szkodliwe produkty degradacji, w tym jony metali, mogą wywoływać niepożądane reakcje organizmu. Dodatkowy problem stanowi wysoka trombogenność biomateriałów metalicznych. Z tego powodu od wielu lat dużo uwagi poświęca się modyfikacjom ich powierzchni, co ma na celu poprawę ich właściwości, m.in. w kontekście wywoływanych reakcji biologicznych. Do jednych z najczęściej proponowanych rozwiązań należy zastosowanie dodatkowej powłoki nałożonej na powierzchnię implantu. Takimi powłokami, od wielu już lat cenionymi w zastosowaniach medycznych, są warstwy węglowe. W wyniku prac badawczych prowadzonych nad tymi powłokami przez liczne jednostki na całym świecie udało się osiągnąć ich dobre parametry wytrzymałości na zużycie oraz biogodność. Dzięki temu wykazują wysoki potencjał w zastosowaniach medycznych i stanowią jeden ze sposobów zniwelowania problemu odrzucania implantów na skutek występowania reakcji alergicznej stanowiąc barierę ochronną.

Powłoki nakładane na implanty, poza stwarzaniem bariery ochronnej i poprawy właściwości mechanicznych, czy też odporności korozyjnej, mogą nieść również dodatkowe funkcje w kontekście docelowo wywoływanych reakcji biologicznych, takich jak przyspieszone procesy osteosyntezy, proliferacji, czy też podwyższone działanie antybakteryjne, antytrombogenne i inne. Taki efekt może zostać osiągnięty poprzez zastosowanie dodatku konkretnego pierwiastka i wprowadzenie go do matrycy warstwy węglowej. Pierwiastki, które naukowcy wykorzystują, wprowadzają i które są analizowane w badaniach można podzielić na pozwalające uzyskać właściwości antybakteryjne (np. Ag, Cu, Si), obniżające trombogenność (np. Si, Ca, P) oraz stymulujące proliferację komórek (np. Si, Ti, Ca, P), w tym przyspieszające proces osteointegracji (np. Ti, Si).

Ze względu na przedstawiony powyżej wachlarz korzystnych właściwości cienkich warstw węglowych, bez względu na ich odmianę i postać, stanowi on obiekt zainteresowania wielu naukowców na całym świecie. Moje zainteresowanie tym materiałem rozpoczęło się już poprzez zaproponowany mi do realizacji temat w ramach pracy magisterskiej. Badałam wówczas skuteczność powłok nanokrystalicznego diamentu (NCD – z *ang. nanocrystalline diamond*), jako pokryć chroniących ludzi przed bezpośrednim kontaktem z niklem, a tym samym przed wystąpieniem reakcji alergicznych [tytuł mojej pracy mgr „*NCD layer as an anti-allergic barrier on the nickel alloys*”]. Wytwarzane powłoki okazały się bardzo skuteczne a dalsze badania nad nimi i ich odmianami, jako powłokami stanowiącymi barierę dla niebezpiecznych pierwiastków podłoży, z których wykonywane są wyroby medyczne, w sposób naturalny stały się tematem mojej rozprawy doktorskiej [„*Powłoki węglowe na jubilerskie tworzywa metaliczne*”]. W ramach tej pracy skupiałam się na opracowaniu warstw

diamentopodobnych (DLC – z ang. *diamond-like carbon*) dających najlepsze efekty ochronne na stali austenitycznej. W swojej dysertacji doktorskiej obronionej w 2007 roku, przedstawiłam wyniki dotyczące powłok DLC naniesionych na austenityczną stal medyczną. Przeprowadziłam porównawcze badania dla powłok wytworzonych metodą RF PACVD (z ang. *Radio Frequency Plasma Assisted Chemical Vapour Deposition*) oraz MW/RF PACVD (z ang. *Microwave/Radio Frequency Plasma Assisted Chemical Vapour Deposition*), oceniając nie tylko ich właściwości fizykochemiczne i mechaniczne, ale również badania odpowiedzi biologicznej w modelu *in vitro* (na komórkach linii fibroblastów), *in vivo* (na szczurach rasy Wistar) oraz badania kliniczne w postaci płatkowych testów alergicznych. Te kompleksowe badania biologiczne i materiałowe pokazały, że jony metali uwalniane z biomateriału przenikają do organizmu i są akumulowane w organach odległych, co potwierdziły badania histopatologiczne śledzion pobranych od szczurów po implantacji pręcików ze stali medycznej na 26 tygodni do tkanek miękkich w okolicy łopatek. Te same badania potwierdziły również skuteczność powłok DLC jako bariery dla uczulających jonów metali typu Ni, Cr, Mo – obserwowano brak odczynów alergicznych u pacjentów a w śledzionach nie odnotowano zmian nawet po najdłuższych okresach implantacji.

Po uzyskaniu stopnia doktora obszar moich zainteresowań badawczych nadal związany był z biomateriałami i ich skutecznym i bezpiecznym stosowaniem w medycynie. O ile jednak moje wcześniejsze prace skupiały się bardziej na niwelowaniu skutków ubocznych materiałów stosowanych na wyroby będące w kontakcie z organizmem ludzkim, o tyle projekty i badania, które podejmowałam w dalszej mojej działalności naukowej, skupiały się już na uzyskiwaniu określonej zmiany odpowiedzi biologicznej poprzez modyfikację powierzchni biomateriałów metalicznych powłokami węglowymi domieszkowanymi różnymi pierwiastkami.

Analiza literatury w zakresie domieszkowania powłok węglowych różnymi pierwiastkami wskazuje, że mogą one mieć różny wpływ na odpowiedź biologiczną, co determinuje możliwości i potencjał ich zastosowania w medycynie. Jednocześnie badania jasno pokazują, że odpowiedź ta zależy nie tylko od rodzaju użytego pierwiastka, ale w dużej mierze również od właściwości, głównie fizykochemicznych (zarówno powierzchniowych, jak i objętościowych), uzyskanych powłok. To z kolei jest efektem zastosowanej techniki wytwarzania, parametrów prowadzonych procesów, ilości wprowadzonego pierwiastka domieszki, uzyskanej jego formy, jak i samego materiału podłoża, na którym są nanoszone powłoki. Funkcjonalne materiały do zastosowań biomedycznych muszą zatem spełniać wymagania co do odpowiednich właściwości fizycznych, chemicznych, mechanicznych i tribologicznych gwarantujących niezawodność działania w całym okresie eksploatacji. Co więcej, badania tych właściwości powinny poprzedzać etap testów biologicznych ze względu na fakt, że są w zdecydowanej większości przypadków szybsze do wykonania i tańsze, a uzyskane w ich wyniku potwierdzenie dobrych parametrów użytkowych powłok determinuje zasadność podjęcia długotrwałych i kosztownych badań oceny reakcji biologicznych (*in vitro*, *in vivo* i klinicznych). Niemniej jednak należy pamiętać, że **możliwość klinicznego**

zastosowania danego biomateriału ostatecznie determinuje odpowiedź biologiczna, jaką on wywołuje. Tego zakresu dotyczy mój główny obszar zainteresowań badawczych.

Publikacje z zakresu domieszkowania powłok węglowych w większości przypadków opisują badania nad biomateriałami i efektami ich modyfikacji skupiając się albo na charakterystyce fizykochemicznej (często połączonej z mechaniczną) albo ocenie odpowiedzi biologicznej. To sprawia, że bardzo trudno, albo wręcz nierealnym jest ocenić możliwość klinicznego zastosowania opracowanych materiałów. W odniesieniu do powyższego, niezwykle istotnym było dla mnie, aby badania nad modyfikacjami biomateriałów prowadzić kompleksowo. Tylko wówczas możliwe jest bowiem określenie rzeczywistego medycznego potencjału aplikacyjnego danego rozwiązania. Ze względu na to, w każdym realizowanym przeze mnie projekcie efekty proponowanej i optymalizowanej technologii wytwarzania powłok węglowych z daną domieszką weryfikowane były poprzez badania fizykochemiczne, mechaniczne i biologiczne. Dodatkowo procesy i badania docelowo prowadzone były zawsze na podłożach wykonanych z rynkowo stosowanych biomateriałów metalicznych.

W efekcie dwóch kierowanych przeze mnie projektów międzynarodowych [projekt badawczy pt. „Warstwy węgiel-srebro”, akronim CARSILA, nr umowy: **ERA-NET/MNT/CARSILA/1/2010**, realizowany w latach 01.09.2010 – 31.08.2013 - **II.J7**. oraz projekt badawczy pt. „Powłoki węglowe domieszkowane Ag/Si do zastosowań biomedycznych” akronim CARLA, nr umowy: **M-ERA.NET/2012/02/2014**, realizowany w latach 01.01.2014 – 31.12.2016 – **II.J11**] wraz z moimi zespołami badawczymi (z Polski i zagranicznych jednostek partnerskich) opracowałam i przebadalam różne technologie wytwarzania warstw węglowych: RF PACVD – osadzania z fazy gazowej wspomaganą plazmą generowaną polem elektromagnetycznym wysokiej częstotliwości (z ang. *Radio Frequency Plasma Assisted Chemical Vapour Deposition*), RF/MS PACVD – impulsowego rozpylania magnetronowego wspomaganego plazmą częstotliwości radiowej chemicznego osadzania z fazy gazowej (z ang. *Radio Frequency/Magnetron Sputtering Plasma Assisted Chemical Vapour Deposition*), implantacji jonów do uprzednio wytworzonej powłoki DLC, PLD – osadzanie laserem impulsowym (z ang. *Pulsed Laser Deposition*) oraz MAPLE – techniką impulsowego odparowania laserowego wspomaganego matrycą (z ang. *Matrix-Assisted Pulsed Laser Evaporation*) domieszkowanych srebrem (Ag) oraz krzemem (Si). Jedną z tych technologii, opracowaną a w ramach projektu CARSILA [nr umowy: **ERA-NET/MNT/CARSILA/1/2010**, pt. „Warstwy węgiel-srebro”], dała bardzo dobre efekty w zakresie wprowadzania domieszki srebra do warstwy węglowej i został przyznany na nią **patent** [numer prawa wyłącznego: **PAT.225955** udzielony na podstawie zgłoszenia nr P.401955 z dn. 10.12.2012 pt. „Sposób wytwarzania nanokompozytowej warstwy węglowej domieszkowanej srebrem na powierzchniach metalicznych”], **którego jestem współautorem.**

W krajowym projekcie wdrożeniowym realizowanym w konsorcjum z firmą Medgal Sp. z o.o. [projekt pt. „SiMED – Nowe biokompatybilne warstwy Si-DLC na implanty kostne”, nr umowy: **INNOTECH-K1/IN1/18/156542/NCBR/12**, realizowany w latach 01.04.2012 – 31.03.2015 – **II.J9**], w którym byłam wykonawcą badań *in vitro* oraz koordynatorem wszystkich badań biologicznych (*in vitro*, *in vivo*, klinicznych) prowadzonych na rzecz wdrożenia i certyfikacji wyrobu

medycznego, prace dotyczyły wytwarzania powłok DLC domieszkowanych Si techniką RF PACVD – osadzania z fazy gazowej wspomaganej plazmą generowaną polem elektromagnetycznym wysokiej częstotliwości (z ang. *Radio Frequency Plasma Assisted Chemical Vapour Deposition*). W efekcie opracowań stanowiących rezultat tego projektu w roku 2015 w ofercie firmy Medgal znalazły się wyroby medyczne z pokryciem Si-DLC przyspieszające zrost kostny [*firma uzyskała certyfikat CE HD 60101841 0001 oraz ISO 13485 na warstwy Si-DLC stosowane na wszystkich typach produkowanych przez nią implantów*], które to **wdrożenie** w zakresie technologicznym oparte zostało na **patencie** [*prawo wyłączne: PAT.223008 udzielone na podstawie zgłoszenia nr P.398452 z dn. 15.03.2012 pt. „Sposób wytwarzania warstwy węglowej zawierającej krzem na implantach medycznych”*], **którego jestem współautorem**.

W kolejnym kierowanym przez mnie projekcie [*projekt pt. "MODified BIOMaterials – MEDicine future", akronim MOBIOMED, nr umowy: LIDER/040/707/L-4/12/NCBR/2013, realizowany w latach 01.01.2014 – 31.12.2017 – II.J12*] wraz z moim zespołem badawczym dokonałam weryfikacji wpływu na efekt odpowiedzi biologicznej powłok węglowych z różnymi domieszkami (w tym również Ag i Si, które badałam w ramach innych projektów) wytwarzanych metodą fizycznego osadzania, mianowicie niereaktywnego rozpylania magnetronowego przy stałym prądzie (DC) lub częstotliwości radiowej (RF) – DC-RF MS PVD – (z ang. *Direct Current – Radio Frequency Magnetron Sputtering Physical Vapour Deposition*). Przebadanymi pierwiastkami domieszek były: Ag, Si, Ti, Cu, Ca, P.

W wyżej wymienionych projektach procesy modyfikacji prowadzone były na trzech najczęściej stosowanych w medycynie biomateriałach metalicznych, tj. stali medycznej AISI316LVM, stopie tytanu z dodatkiem wanadu (Ti6Al4V) oraz niobu (Ti6Al7Nb). Stal medyczna była przede mną uwzględniana w badaniach, gdyż wciąż jest bardzo często stosowana do produkcji wyrobów medycznych, szczególnie do zastosowań w ortopedii, a wybór implantów z niej wykonanych jest często podyktowany. Stanowi więc nadal materiał, którego nie należy zaniedbywać w badaniach (ze względu na stosowanie), i dla którego warto opracowywać technologie modyfikacji (ze względów ekonomicznych).

Przedstawione poniżej wyniki stanowią rezultat prac badawczych prowadzonych od 2010 roku przez krajowe i międzynarodowe zespoły naukowe, z którymi współpracowałam i które prowadziłam w ramach kierowanych przede mną projektów lub zadań badawczych w których pełniłam rolę lidera. **Zakres badań, na których ja się skupiałam, dotyczył oceny reakcji biologicznych dla powłok węglowych domieszkowanych srebrem oraz krzemem wytwarzanych różnymi technikami** (zarówno chemicznego (CVD), jak i fizycznego osadzania (PVD)) prowadzonych na poziomie badań w modelu komórkowym (*in vitro*), zwierzęcym (*in vivo*) oraz badań klinicznych. W efekcie szerokiego zakresu testowanych parametrów procesów wytwórczych oraz bieżącej weryfikacji uzyskiwanych powłok poprzez badania ich właściwości fizykochemicznych i mechanicznych, dokonywana była optymalizacja technologii a następnie najlepsze próbki typowane były do dalszych badań oceny reakcji biologicznych. Miały one na celu określenie odpowiedzi biologicznej w konkretnych aspektach aplikacyjnych związanych ze zdolnością do działania antybakteryjnego (Ag, Si), stymulującego

proliferaację komórek (Si), w tym przyspieszające proces osteointegracji (Si). oraz obniżające trombogenność (Si).

Najważniejsze wnioski i spostrzeżenia dotyczące wywieranych efektów reakcji biologicznych wynikających z badań, które prowadziłam (lub prowadziłam i koordynowałam kierując pracami zespołów badawczych), są następujące:

- **Warstwy węglowe wytwarzane na podłożu ze stali medycznej AISI316LVM metodą hybrydową RF/MS PACVD, z pierwiastkiem srebra (Ag) wprowadzanym na drodze rozpylania magnetronowego czy też poprzez technikę implantacji jonów**, pozwalają uzyskać biomateriał ograniczający wzrost bakterii przy jednoczesnym zachowaniu jego wysokiej biokompatybilności.

Zastosowanie metody implantacji jonów do wprowadzania Ag do matrycy gradientowej warstwy węglowej a-C:H/Ti uzyskanej w procesie RF PACVD daje możliwość wprowadzania wysokich zawartości % tego pierwiastka bez negatywnego wpływu na biogodność materiału pod warunkiem kontroli właściwości fizykochemicznych powierzchni otrzymywanej po przeprowadzonym procesie wprowadzania domieszki srebra.

Okazuje się jednak, że na ilość proliferujących na powierzchni komórek i wpływ wytworzonej powierzchni na toksyczność w stosunku do nich (w badaniach *in vitro* na liniach: Saos-2, EA.hy 926) oraz na przeżywalność bakterii (*E.coli*) i możliwość ich adhezji na powierzchni, większe znaczenie ma ilość energii dostarczonej do materiału w procesie implantacji jonów (zmienia ona bowiem stosunek $sp^2/(sp^2+sp^3)$ w matrycy węglowej), aniżeli zawartość procentowa Ag znajdująca się w objętości materiału pozostającego w kontakcie z materiałem biologicznym.

A zatem w przypadku podłoża ze stali medycznej i metody implantacji jonów Ag otrzymanie pożądanej odpowiedzi biologicznej można uzyskać poprzez wpływ i kontrolę struktury materiału. Kontrola taka daje możliwość wprowadzania nawet bardzo wysokich zawartości srebra (powyżej 9 %), które są pożądane w niektórych zastosowaniach antybakteryjnych, a które w większości przypadków wywołują już wysoką cytotoksyczność w stosunku do komórek ssaczych.

Zastosowanie metody rozpylania magnetronowego w celu wprowadzenia domieszki Ag do matrycy węglowej a-C:H/Ti uzyskanej w procesie RF PACVD pozwala na uzyskanie kontrolowanego efektu bakteriobójczości zależnego od ilości wprowadzonego srebra. Obserwowany jest bowiem zwiększający się efekt bakteriobójczości i bakteriostatyczności wraz z rosnącą zawartością srebra obecnego w wytworzonej warstwie. Ta rosnąca ilość Ag skorelowana jest jednocześnie ze zwiększonym efektem toksyczności w stosunku do komórek eukariotycznych. W związku z tym, w przypadku tej metody, optymalna zawartość Ag, przy której powłoki zachowują swoją biokompatybilność przy jednoczesnym osiągnięciu zdolność do zwiększonej oporności na kolonizację bakteryjną, to ok. 2% at.

Znaczącym wynikiem uzyskanym dla tych powłok, była ich potwierdzona zdolność uwalniania jonów Ag w czasie. Badania pokazały, że zawartość srebra w powłoce węglowej nie ma znaczenia dla zastosowań do 24h – w tym przypadku, bez względu na wyjściową zaw. % Ag ilość uwolnionych jonów była taka sama. Zmienia się to jednak w czasie – po 30 dniach zdolność do uwalniania jonów srebra jest tym większa, im grubsza jest wytworzona warstwa zawierająca w swej objętości srebro.

A zatem w przypadku podłoża ze stali medycznej i zastosowania metody rozpylania magnetronowego do implantacji jonów Ag otrzymanie pożądanej odpowiedzi biologicznej można uzyskać poprzez wprowadzenie odpowiedniej ilości Ag. Dodatkowo w przypadku tej techniki, dla implantów długoterminowych możliwe jest uzyskanie efektu utrzymania bakteriobójczości w czasie poprzez wpływ na grubość wytworzonej powłoki, w której zawarta jest domieszka srebra.

Wszystkie rodzaje procesów plazmowych stosowanych przeze mnie w badaniach prowadziły do uzyskania warstw węglowych, w których srebro nie jest chemicznie związane z matrycą węglową a jego efekty biologiczne uzyskiwane poprzez zastosowanie tego pierwiastka opierają się na zjawiskach fizykochemicznych, które są efektem zmian uzyskiwanych na drodze prowadzenia procesów wytwarzania warstwy węglowej oraz jej domieszkowania.

- **Warstwy węglowe wytwarzane na podłożu ze stali medycznej AISI316LVM oraz stopu tytanu Ti6Al4V metodą RF PACVD z domieszką pierwiastka krzemu (Si) wprowadzanym z prekursora krzemooorganicznego (HMDSO – heksametylodisiloksan) pozwalają uzyskać biomateriał przyspieszający zrost kostny (osteointegracyjne) przy jednoczesnym zachowaniu jego wysokiej biokompatybilności, biostabilności oraz efektu ograniczania zdolności bakterii do zasiedlania jego powierzchni.**

Bez względu na rodzaj podłoża (stal, czy stop tytanu) zastosowanie warstwy węglowej z domieszką Si stwarza na powierzchni implantu silną barierę dyfuzyjną dla jonów metalu, oddzielając w ten sposób materiał metaliczny od tkanek organizmu. Dodatkowo poprzez wytworzenie na biomateriale warstwy Si-DLC następuje poprawa właściwości mechanicznych – wprowadzenie dodatku krzemu do powłoki węglowej korzystnie wpływa na tłumienie naprężeń w warstwie. Stwarza to możliwość wytwarzania warstw o większej grubości, twardości i adhezji do metalicznego podłoża. Przekłada się to korzystnie na zwiększenie biokompatybilności implantu, poprzez zapewnienie lepszej ochrony metalicznego podłoża, za pośrednictwem grubszej i bardziej szczelnej bariery dyfuzyjnej dla jonów metalu. Jest to znaczący wynik, gdyż poprawa właściwości mechanicznych, dzięki zastosowaniu domieszki krzemowej, daje możliwość poszerzenia oferty implantów modyfikowanych z wszczepów krótkookresowych również na długookresowe. W tym wypadku warstwa węglowo krzemowa spełnia nie tylko rolę biokompatybilnej bariery dyfuzyjnej ale

umożliwia również zmniejszenie tarcia w węzłach trybologicznych, przyczyniając się do zwiększenia trwałości implantu i poprawy jego właściwości funkcjonalnych.

Dodatek krzemowy w warstwie węglowej bardzo korzystnie wpływa również na ograniczenie zdolności bakterii do zasiedlania powierzchni implantu. Pozwala to na znaczące zmniejszenie ryzyka wystąpienia powikłań na tle pooperacyjnych infekcji bakteryjnych, łatwiejsze gojenie się ran, zapobiega powstawaniu na powierzchni implantu bardzo trudnych do usunięcia z organizmu bakteryjnych biofilmów.

Warstwy Si-DLC cechują się również hemokompatybilnością – cecha szczególnie pożądana w przypadku implantów przeznaczonych do kontaktu z krwią. Dodatek krzemu do powłoki węglowej sprzyja w tym wypadku lepszej biotolerancji implantu w otoczeniu komórek krwi i zmniejsza ryzyko powstawania zakrzepów. Ta cecha warstw węglowo-krzemowych stwarza możliwość ich zastosowania w kardiochirurgii.

Znaczącym wynikiem uzyskanym dla powłok Si-DLC, była ich zdolność do stymulowania szybszego zrostu kostnego potwierdzona badaniami klinicznymi. Obserwacje radiologiczne pokazały szybsze pojawienie się kostniny lub konsolidacji złamania u większości chorych, u których zastosowano implanty z naniesioną powłoką Si-DLC.

Reasumując, głównym moim osiągnięciem, mającym znaczący wkład w rozwój dyscypliny naukowej Inżynieria Biomedyczna jest wykazanie, że wykorzystując różne metody chemicznego i fizycznego osadzania cienkich powłok węglowych z odpowiednim pierwiastkiem domieszki możliwe jest osiągnięcie zamierzonego efektu reakcji biologicznej, takiego jak:

- zwiększenie stopnia i szybkości proliferacji komórek eukariotycznych,
- przyspieszony zrost kostny – szybsze pojawienie się kostniny na skutek stymulującego działania krzemu w pierwszej fazie zrostu kostnego (faza zapalna),
- zmniejszenie stopnia zasiedlania biomateriału przez bakterie,
- zwiększony efekt bakteriobójczości,
- zwiększona hemokompatybilność – brak zjawisk aktywacji i agregacji płytek krwi, co zmniejsza ryzyko powstawania skrzepów.

Uzyskane przeze mnie wyniki badań, umieszczone w cyklu 12 wybranych najważniejszych publikacji i 2 patentów wpłynęły w istotny sposób na rozwój wiedzy związanej z tematyką kompleksowej oceny domieszkowanych powłok węglowych z domieszką Ag oraz Si o charakterze aplikacyjnym w zakresie medycznym.