

STRESZCZENIE

Współcześnie w medycynie poszukuje się materiałów, które oprócz spełniania podstawowych funkcji będą dodatkowo bioaktywne. Do takiej grupy należą cienkowarstwowe powłoki na bazie miedzi i tytanu. Dzięki połączeniu dwóch metali o różnych właściwościach uzyskano kompozyt o unikatowych cechach. Zastosowanie nanokrystalicznych powłok o różnej koncentracji Cu oraz Ti może wspomagać walkę ze współczesnymi problemami, do których należy ciągły wzrost oporności antybiotykowej czy wzrost ilości przypadków zakażeń poszpitalnych. Należy jednakże pamiętać, że przy projektowaniu nowych biomateriałów najważniejszą cechą jest bezpieczeństwo ich stosowania, czyli biokompatybilność wobec organizmu. Wykorzystywanie nanomateriałów budzi wciąż wiele obaw ze względu na zbyt mało informacji dotyczących ich wpływu na organizmy żywe. Dlatego też wyniki badań niniejszej pracy mają na celu poszerzenie wiedzy na temat ich interakcji z komórkami eukariotycznymi oraz bakteryjnymi.

Głównym celem pracy było zbadanie odpowiedzi komórkowej w warunkach *in vitro* dla wybranych linii komórkowych w kontakcie z nanokrystalicznymi warstwami na bazie miedzi i tytanu. Analiza wyników polegała na powiązaniu poziomu przeżywalności komórek z wybranymi właściwościami tych warstw z uwzględnieniem wyników badań poziomu ich aktywności antydrobnoustrojowej.

Pierwszym etapem badań nanomateriałów na bazie miedzi i tytanu była szczegółowa charakterystyka właściwości strukturalnych i fizykochemicznych powierzchni oraz określenie składu materiałowego. W tym celu wykorzystane były między innymi takie metody badawcze, jak dyfrakcja rentgenowska (XRD), czy skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM). Do oceny stechiometrii i stopnia utlenienia pierwiastków w warstwie przypowierzchniowej wykorzystano rentgenowską spektroskopię fotoelektronów (XPS). Za pomocą mikroanalizy rentgenowskiej (EDS) określono skład warstw. Wszystkie badane warstwy charakteryzowały się nanokrystaliczną strukturą i były zbudowane w większości z kryształitów o wielkości wynoszącej $10 \div 20$ nm. Taka struktura daje możliwość uzyskania innowacyjnych materiałów cienkowarstwowych o odmiennych właściwościach w porównaniu do materiałów w formie litej. Analiza widm XPS pokazała, że powierzchnia nanokrystalicznych warstw ulegała utlenieniu. Efekt ten ma pozytywny wpływ na ich aktywność biologiczną (z uwagi na większościowy udział jonów $\text{Cu}^{0,1+}$ na powierzchni) oraz stabilność w środowisku (dzięki samopasywacji tytanu). Po szczegółowej charakterystyce właściwości fizyko-chemicznych materiałów wykonano rekomendowane badania poziomu cytotoksyczności potencjalnych

biomateriałów w oparciu o normę *PN-EN ISO 10993-12:2009* oraz *PN-EN ISO 10993-5:2009*. Ze względu na innowacyjny charakter cienkich warstw część metod badawczych należało zoptymalizować. Do określenia wpływu składu materiałowego na poziom aktywności mitochondrialnej komórek L929 wykorzystano metodę spektrofotometryczną. Analiza wyników testu MTT ujawniła istotność wpływu czasu inkubacji, rodzaju stężenia wyciągu z materiału jak również składu materiałowego na poziom przeżywalności fibroblastów L929. Wszystkie te czynniki były istotne statystycznie i miały potwierdzenie w literaturze przedmiotu. Badane cienkie warstwy Cu-Ti o zawartości miedzi niższej niż 53% at. nie hamowały aktywności mitochondrialnej po kontakcie bezpośrednim jak i pośrednim. Większa ilość miedzi w cienkich warstwach Cu-Ti, tj. powyżej 53% at., miała negatywny wpływ na komórki L929 poprzez pojawienie się ziarnistości w cytoplazmie oraz przerwanie błony komórkowej prowadzące do ich śmierci. Kolejne testy potwierdziły brak negatywnego wpływu na zdolność komórek do proliferacji w kontakcie z wyciągami z cienkich warstw, w składzie których było mniej niż 53% at. Cu. Szczegółowa analiza oddziaływania nanomateriałów cienkowarstwowych na bazie Cu i Ti wykonana została dla warstwy $\text{Cu}_{25}\text{Ti}_{75}$, gdyż wyniki badań z udziałem komórek L929 pokazały, że poziom ich przeżywalności w kontakcie z tą warstwą był wyższy lub równy w porównaniu do prób kontrolnych. W kontakcie bezpośrednim komórki te tworzyły monowarstwę. Kolejnym etapem były badania i analiza rodzaju śmierci komórkowej, fazy cyklu komórkowego oraz zmian morfologicznych (ziarnistość i wielkość). Wszystkie te badania wykonano przy użyciu cytometru przepływowego. Analiza wyników badań ujawniła kinetykę wpływu nanokrystalicznych materiałów cienkowarstwowych na komórki mysich fibroblastów L929 oraz Balb/C. Skład materiałowy powłoki ($\text{Cu}_{25}\text{Ti}_{75}$) nie wpłynął na indukcję apoptozy czy nekrozy. Odsetek komórek będących w poszczególnych fazach cyklu komórkowego był porównywalny do prób kontrolnych. Zmniejszenie ilości miedzi w nanokrystalicznej cienkiej warstwie miało wpływ na uzyskanie innego poziomu oddziaływania na bakterie z grupy Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych. Różnica ta wynosiła jednakże niecałe 3 p.p., dlatego też można uznać, że materiał o składzie $\text{Cu}_{25}\text{Ti}_{75}$ ma właściwości antydrobnoustrojowe.

Podsumowując można stwierdzić, że przeprowadzone badania pozwoliły przybliżyć dynamikę procesów komórkowych zachodzących na styku: powierzchnia materiału – komórka, oraz wyselekcjonować materiał o składzie, który jest toksyczny tylko dla komórek bakteryjnych. Uzyskane wyniki stanowią podstawę do opracowania nowych biomateriałów cienkowarstwowych o kontrolowanym poziomie oddziaływania zarówno na komórki jak i drobnoustroje.

Abstract

Nowadays researches in medicine focus on defining new materials that, on top of basic functions, will be additionally bioactive. This group of multifunctional materials includes nanocrystalline thin layers based on copper and titanium. The combination of two metals with majorly different properties allowed the creation of a composite with unique features. The use of thin-film coatings based on copper and titanium may support the struggle against contemporary problems in the form of the continuous increase of antibiotic resistance or the increase in the number of nosocomial infections. However, it should be remembered that when designing new biomaterials, safety of their use, that is biocompatibility for the host, should always be top priority. The use of nanomaterials still raises many concerns due to the insufficient data about their effects on living organisms. Therefore, the results of this research can broaden the knowledge about their interaction with eukaryotic and bacterial cells.

The main goal of the research was to investigate in vitro the cellular response to selected cell lines in contact with copper and titanium nanocrystalline films. The analysis of the results aimed at finding a correlation between the level of cell survival and selected properties of these layers, also considering the results of studies on the level of their antimicrobial activity.

The first stage of the research for Cu-Ti based nanomaterials involved a detailed analysis of the structural and physicochemical properties of the surface as well as determining the material composition. For this purpose, methods such as X-ray diffraction (XRD) or scanning electron microscopy (SEM) were applied. The X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) was used to assess the stoichiometry and the degree of the oxidation of elements in the near surface layer. Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS) determined the composition of the layers. All examined layers were built with a nanocrystalline structure and were mostly made of crystallites with the size of 10-20 nm. This structure gives the opportunity to create innovative thin-film materials with different properties compared to the counterpart solid materials. The analysis of the XPS spectra showed that the surface of the nanocrystalline layers was oxidized. This has a positive effect on the biological activity (due to the concentration of $\text{Cu}^{0,1+}$ on the surface) and the stability in the environment. After a detailed physicochemical analysis, recommended cytotoxicity studies were performed on the PN-EN ISO 10993-12: 2009 and PN-EN ISO 10993-5: 2009 standards. Due to the innovative nature of the thin layers, some of the existing research methods had to be optimized. The spectrophotometric method was used to determine the level of the mitochondrial activity of L929 cells. The analysis of the results of

the MTT assay revealed the influence of the incubation time, extract concentration as well as the material composition on the survival rate of L929 cells. All these factors were statistically significant and were confirmed in the literature of the subject. Tested thin Cu-Ti layers with a copper content lower than 53% at. did not inhibit mitochondrial activity after direct and indirect contact. More copper (over 53% at) had a negative effect on L929 cells. It was observed that granules had been created in the cytoplasm, followed by the rupture of the cell membrane that lead to its death. Further tests confirmed no adverse effect on the cell's ability to proliferate in contact with thin film extracts which contained less than 53% at. Cu. A detailed analysis of the interaction of thin-film nanomaterials based on Cu and Ti was made for the Cu₂₅Ti₇₅ layer, as the results of the L929 cells shown that the level of their survival was on a comparable or higher level than the control samples. In direct contact, these cells formed a monolayer. The next stage was the research and analysis of the type of cell death, cell cycle phase and morphological changes (granularity and size). All these tests were performed using a flow cytometer. The analysis of the test results revealed the kinetics of the effect of nanocrystalline thin-film materials on the cellular response of mouse fibroblasts L929 and Balb / C. The material composition of the coating (Cu₂₅Ti₇₅) did not affect the induction of apoptosis or necrosis. The percentage of cells in each phase of the cell cycle was comparable to the control. The reduction in the amount of copper in the nanocrystalline thin layer shown a different level of interaction with Gram-positive and Gram-negative bacteria. This difference, however, was less than 3 pp, therefore it can be stated that the material with the Cu₂₅Ti₇₅ composition has antimicrobial properties. Summing up, it can be concluded that the conducted research allowed to better understand the dynamics of cellular processes occurring at the interface of 'material surface' – 'cell'. It also allowed the selection of a material with a composition that is toxic only to bacterial cells. The obtained results form the basis for the development of new thin-film biomaterials with a controlled level of impact on both cells and microorganisms.