

Periodyczne strukturowanie powierzchni wybranych materiałów biozgodnych

Streszczenie. W artykule przedstawiono eksperymentalnie wytworzone struktury periodyczne, w skali mikro i sub-mikro, na powierzchniach wybranych biozgodnych materiałów – stopów tytanu i amorficznego węgla (DLC). Strukturowanie powierzchni tych materiałów uzyskano wykorzystując metodę bezpośredniej laserowej litografii interferencyjnej, tworząc 1D i 2D wzory o okresie równym użytej długości fali i jej wielokrotności, w zależności od ilości wiązek lasera biorących udział w interferencji.

Abstract. The paper presents experimentally fabricated periodical structures, in a micro- and submicro scale, at surfaces of selected biocompatible materials – Titanium alloys and amorphous carbon (DLC). Surface structuring of these materials has been performed using direct laser interference lithography method. It resulted in the creation of 1D and 2D patterns with periods equal to the laser wavelength and its multiples, in dependence on the number of interfering laser beams. (**Periodical surface structuring of selected biocompatible materials**).

Słowa kluczowe: ablacja laserowa, bezpośrednia litografia interferencyjna, strukturowanie powierzchni biozgodnych.

Keywords: laser ablation, direct laser interference lithography, biocompatible surfaces structuring.

Wstęp

Na podstawie literatury [1-3] i z badań własnych autorów wynika, że topograficzna modyfikacja powierzchni materiałów biozgodnych wzmacnia oddziaływanie komórek z taką powierzchnią. Konsekwencją jest zwiększenie przyczepności komórek do podłoża (zwiększenie adhezji), zwiększony zasięg rozprzestrzeniania się komórek, a także ukierunkowanie ich rozwoju.

W artykule przedstawiono eksperymentalnie wytworzone struktury periodyczne, w skali mikro i sub-mikro, na powierzchniach wybranych biozgodnych materiałów. Strukturowanie powierzchni tych materiałów uzyskano wykorzystując metodę bezpośredniej laserowej litografii interferencyjnej, tworząc 1D i 2D wzory o okresie równym użytej długości fali i jej wielokrotności. Ważnymi parametrami powierzchni, po obróbce interferencyjnej, wpływającymi na adhezję, wzrost i orientację komórek są: kąt kontaktu, wymiar okresu i morfologia (linie lub dołki).

Technika bezpośredniej litografii interferencyjnej, polega na selektywnej ablacji materiału w maksimach interferencyjnych, uzyskując w wyniku mikro prążki lub mikro dołki w zależności od ilości wiązek lasera biorących udział w interferencji. Niekwestionowaną zaletą tej techniki w porównaniu z losowym strukturoowaniem jest pełna kontrola pożądanych wymiarów na powierzchni biomateriałów (okresowość, wysokość i szerokość linii lub dołków), poprzez sterowanie parametrami wiązki laserowej. Metodę tę wykorzystano do modyfikacji powierzchni różnorodnych biozgodnych materiałów, takich jak: stopy tytanu, warstwy DLC na podłożu krzemowym i polistyrenowym.

Laserowa modyfikacja warstw wierzchnich materiałów

Modyfikację warstw wierzchnich promieniowaniem laserowym można przeprowadzać poniżej progu ablacji (trawienia) materiału tarczy, jak również powyżej progu ablacji. W literaturze pojęcie „ablacja” (od łac. „ablatio” – odjęcie) oznacza zbiór złożonych procesów fizyczno-chemicznych, w wyniku których następuje „odjęcie” warstwy materiału z powierzchni lub z objętości ciała stałego. Dziś pod tym pojęciem rozumiemy również dowolny, wspomagany laserem proces „usuwania materiału”, włączając w to również produkty trawienia a także emisję elektronów i jonów [4].

W praktyce, w eksperymentach przebiegających w normalnych warunkach atmosferycznych, wykorzystuje się

gęstości mocy promieniowania laserowego poniżej poziomu $10^{10} \div 10^{11}$ W/cm², określającego granicę jonizacji suchego powietrza (przebiecie, iskra laserowa) [5]. Przy wyższych gęstościach mocy, wyemitowany strumień energii laserowej nie osiągnie powierzchni tarczy. Poziomy jonizacji powietrza są funkcją emitowanej długości fali promieniowania, rozmiaru wiązki w ognisku, czasu trwania impulsu laserowego oraz zależą od zanieczyszczeń i wilgotności powietrza. Typowa, graniczna wartość, dla czystego powietrza i lasera Nd:YAG emitującego długość fali 1064 nm i długości impulsu 10^{-8} s, wynosi około 10^{10} W/cm². W procesach mikro/nano obróbki laserowej wymagany jest precyzyjny rozkład gęstości energii w przekroju poprzecznym wiązki laserowej. Na precyzję i jakość obróbki wpływa także długość fali, czas trwania impulsu laserowego, częstotliwość repetycji impulsów, położenie płaszczyzny ogniskowej względem tarczy, a także własności fizyko-chemiczne obrabianego materiału.

Bezpośrednia laserowa litografia interferencyjna

Metoda laserowej bezpośredniej litografii interferencyjnej (DLIL – direct laser interference lithography) polega na napromieniowaniu, praktycznie każdej powierzchni ciała stałego, odpowiednim wzorem interferencyjnym za pomocą lasera impulsowego o dużej gęstości mocy (od MW/cm² do GW/cm²). Jest to technologia wykorzystywana współcześnie w medycynie, bioinżynierii powierzchni i tribologii w celu uzyskania odpowiedniej topografii i mikrostruktury powierzchniowej.

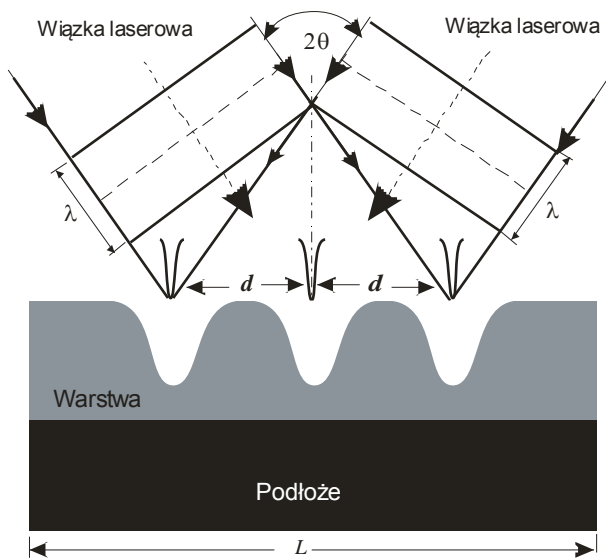
W ostatnich dwóch dekadach szczególnie uwagę poświęcono stopom tytanu (Ti6Al4V i Ti13Nb13Zr) oraz amorficznemu węglowi (DLC). DLC charakteryzuje się dużą gładkością, jest obojętny chemicznie, odporny na ścieranie i posiada niski współczynnik tarcia. Jego właściwości optyczne, mechaniczne, termiczne i elektryczne są funkcją metod jego wytwarzania – składu chemicznego [6,7].

Ugólny zapis interferencji „n” wiązek laserowych

Obraz pełnego pola \vec{E} wielu interferujących wiązek uzyskuje się w wyniku superpozycji każdej indywidualnej składowej pola \vec{E}_j od każdej wiązki laserowej. To wypadkowe pole zapisać można w postaci:

$$(1) \quad \vec{E} = \sum_{j=1}^n \vec{E}_j = \sum_{j=1}^n \vec{E}_{j0} \cdot \exp[-i(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega \cdot t)],$$

gdzie: \vec{E} – wypadkowy wektor pola elektrycznego fali elektromagnetycznej (światła), \vec{E}_j „ j ” – ta składowa wektorowa pola elektrycznego, \vec{k} – wektor falowy, \vec{r} – współrzędna, ω – częstość fali elektromagnetycznej, t – czas.



Rys.1. Ilustracja interferencji dwóch fal płaskich. Kąt pomiędzy wiązkami wynosi 2θ . Interferencja wytwarza proste, równoodległe prążki interferencyjne w płaszczyźnie x - y , prostopadłej do rysunku.

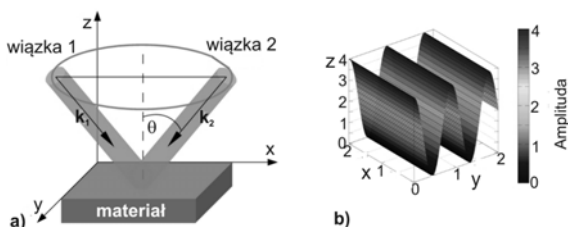
Zapis interferencji dwóch wiązek laserowych zilustrowany na rysunku 1, można przedstawić zależnością:

$$(2) \quad I = 4I_0 \cos^2(kx \sin \theta),$$

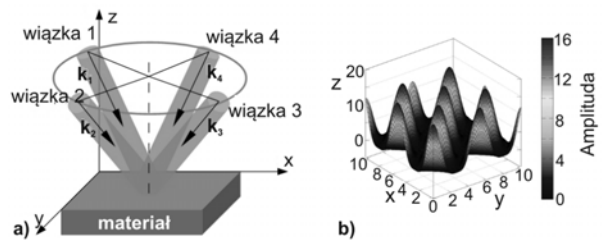
gdzie: I_0 – natężenie światła w wiązce laserowej, θ – połowa kąta między wiązkami laserowymi. Okres „ d ” pola prążkowego wynosi:

$$(3) \quad d = \frac{\lambda}{2 \sin \theta},$$

Przykładowe wyniki obliczeń numerycznych interferencji dwóch i czterech wiązek laserowych przedstawiono odpowiednio na rysunku 2 i 3, na których wykreślono wielkości periodów w funkcji kąta ϕ (dla dwóch wiązek laserowych) i dwóch kątów ϕ oraz θ (dla czterech wiązek laserowych) między interferującymi wiązkami. Parametrem na tym wykresie jest użyta długość fali światła laserowego.

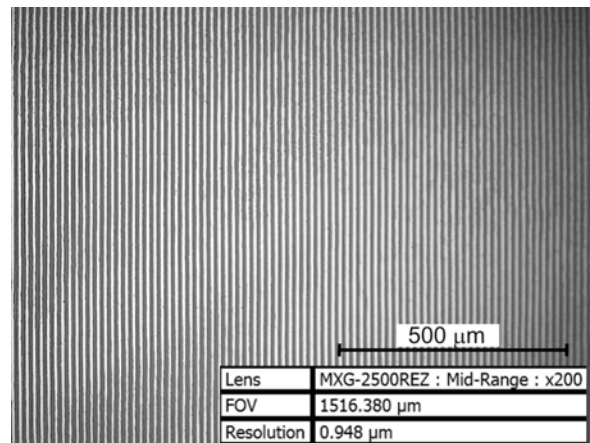


Rys.2. Ilustracja periodu 1D: a) geometria oświetlenia podłoża dwoma wiązkami laserowymi, interferującymi na powierzchni próbki oraz b) obraz interferencyjny kwadratu amplitud obu wiązek. Powierzchnia podłoża jest usytuowana w położeniu: $z = 0$, w płaszczyźnie x , y .

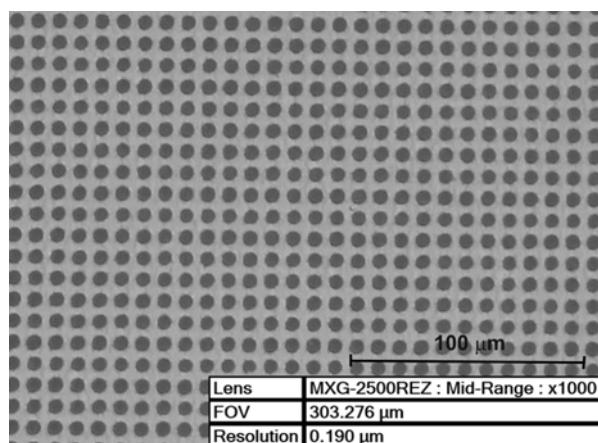


Rys.3. Ilustracja okresu 2D: a) geometria oświetlenia podłoża czterema wiązkami laserowymi, interferującymi na powierzchni próbki oraz b) obraz interferencyjny kwadratu amplitud czterech wiązek. Powierzchnia podłoża jest usytuowana w położeniu: $z = 0$, w płaszczyźnie x , y .

Na rysunkach 4 i 5 pokazano przykładowe struktury interferencyjne, otrzymane na warstwach amorficznego węgla przy wykorzystaniu dwukanałowego systemu laserowego Nd:YAG, specjalnie skonstruowanego do prowadzenia badań struktury DLIL [8,9], których wyniki opisano w kolejnych rozdziałach artykułu.



Rys.4. Przykład struktury 1D na warstwie DLC o grubości 300 nm naparowanej metodą PVD. Obraz otrzymano za pomocą cyfrowego mikroskopu optycznego KH 8700 firmy Hirox. Liniovą strukturę periodyczną uzyskano w wyniku interferencji dwóch wiązek laserowych o długości fali 532 nm

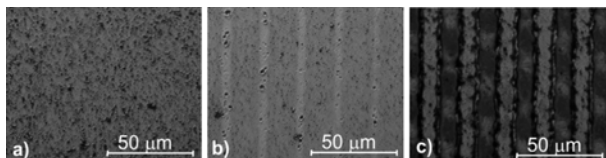


Rys.5. Przykład struktury 2D na warstwie DLC o grubości 300 nm naparowanej metodą PVD. Obraz otrzymano za pomocą cyfrowego mikroskopu optycznego KH 8700 firmy Hirox. Kropkową strukturę periodyczną uzyskano w wyniku interferencji czterech wiązek laserowych o długości fali 532 nm

Przykłady procesów strukturywania powierzchni warstw biozgodnych

Warstewki Au/Cr na podłożu z kwarcu.

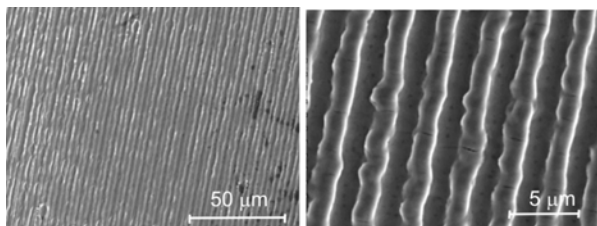
Strukturywanie wykonano w warstewce Au o grubości 50 nm leżącej na warstewce Cr o grubości 20 nm. Obie warstwy metaliczne naporowano metodą PVD na podłoże kwarcowe. Tego rodzaju złote siatki dyfrakcyjne wykazują silny rezonans plazmowy (SPR) i mogą być wykorzystane w budowie czujników do testów biochemicznych pomiaru koncentracji makromolekuł w roztworach [10].



Rys.6. Topografia powierzchni Au w funkcji gęstości energii F : (a) $F < F_{\text{topnienia}}$ brak strukturywania powierzchni; (b) $F_{\text{topnienia}} < F < F_{\text{próg ablacji}}$ – strukturywanie bez usuwania materiału – polerowanie powierzchni; (c) $F_{\text{próg ablacji}} < F$, strukturywanie z usuwaniem materiału (ablacja warstewki złota).

Stop Ti6Al4V

Klasyczny biostop tytanowy Ti6Al4V poddany był procesowi laserowej litografii interferencyjnej ze względu na możliwość polepszenia jego właściwości jako materiału na implanty słuchu, a także jako podłoża dla warstw hydroksyapatytu, co opisano w kolejnym punkcie. Przykładowe wyniki strukturywania przedstawiono na rysunku 7.

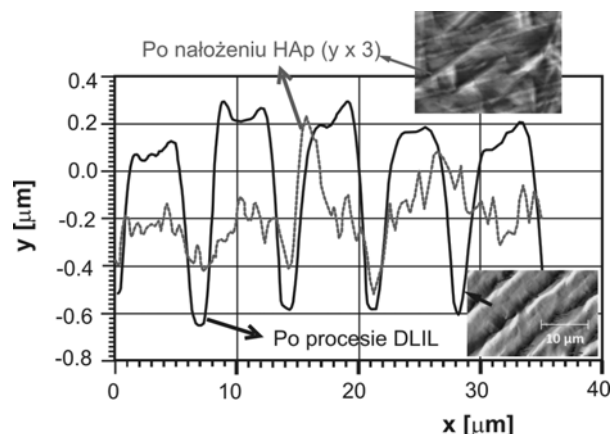


Rys.7. Obrazy SEM struktury periodycznej naniesionej na powierzchnię stopu Ti6Al4V w różnych powiększeniach. Gęstość energii w każdej wiązce 430 mJ/cm².

Stop Ti13Nb13Zr

Prowadzono również ciekawe, wstępne prace nad laserowym, interferencyjnym przetapianiem powierzchni biostopu Ti13Nb13Zr przed procesem nakładania warstw hydroksyapatytu (HAp) [11]. Założono, że laserowa obróbka interferencyjna spowoduje utworzenie na powierzchni stopu bardziej równomiernego rozkładu chropowatości, przy dużej kontroli okresu, wysokości i grubości tworzonych siatek wzorów. Takie przygotowanie powierzchni może spowodować poprawę zwilżalności podłoża i uporządkowanie nałożonych warstw HAp. To z kolei pozwoli zmniejszyć grubość warstw HAp i zwiększyć ich adhezję do powierzchni stopu Ti13Nb13Zr. Na rysunku 8 przedstawiono jeden z wielu wyników strukturywania DLIL stopu Ti13Nb13Zr. Widać, że struktura nałożonej warstwy HAp częściowo naśladuje liniową strukturę wzoru interferencyjnego na podłożu.

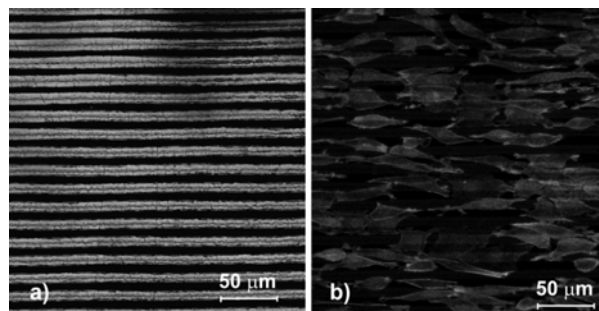
W cyklu kolejnych pomiarów chropowatości metodą profilometrii optycznej i lokalnej twardości metodą nanoindentacji stwierdzono ponadto: 3-krotny wzrost równomiernej chropowatości HAp w porównaniu z chropowatością na powierzchni szlifowanej, wyższą twardość warstwy ceramicznej HAp (10,1 GPa) niż samego stopu (3,7 GPa) oraz wzrost adhezji warstw HAp ze wzrostem energii impulsów laserowych (nanoscratch test).



Rys.8. Fotografie z mikroskopu sił atomowych (AFM) oraz profile powierzchni (nałożone z profili AFM) biozgodnego stopu Ti13Nb13Zr po strukturywaniu interferencyjnym i nałożeniu warstewki hydroksyapatytu. Gęstość energii podczas procesu wynosiła 430 mJ/cm². Długość fali lasera Nd:YAG 1064 nm.

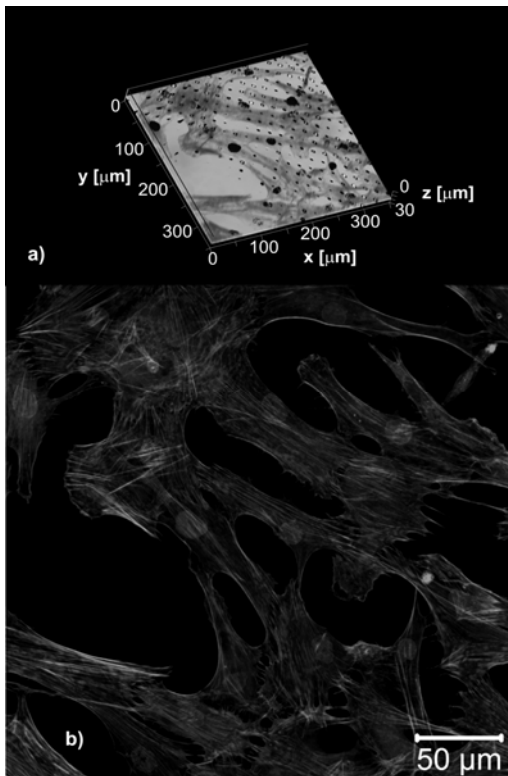
Warstwa DLC na podłożu polistyrenowym

Dwa kolejne rysunki przedstawiają laserowe, interferencyjne przygotowanie warstw DLC na podłożu polistyrenowym pod badania zarodkowania i wzrostu komórek mięśni gładkich. Na rysunku 9 widać rozwój i ukierunkowanie wzrostu komórek zgodnie z liniowym szablonem utworzonym metodą DLIL.



Rys.9. a) Obraz z mikroskopu optycznego struktury w postaci prążków naświetlonych II harmoniczną lasera Nd:YAG. Grubość warstwy DLC na podłożu polistyrenowym wynosiła 300 nm; b) Obraz z mikroskopu konfokalnego gładkich komórek mięśniowych wyhodowanych na strukturze (a) [6]. Metodę przygotowywania komórek przedstawiono w pracy [7].

Rysunek 10 przedstawia z kolei niepublikowane dotąd wyniki hodowli komórek na kropkowych strukturach 2D na warstwie DLC. W tym przypadku, na powierzchni utworzonych laserowo periodycznych studzienek zostały naniesione, podobnie jak poprzednio, gładkie komórki mięśniowe. Komórki inkubowano w medium zawierającym suplementy, czyli czynniki wzrostu, witaminy, antybiotyki i surowicę. Inkubowano w okresie 3 dniowym, na próbce w temp. 37 stopni, 99% wilgotności i 5% przepływie CO₂. Po tym okresie komórki zostały utrwalone, czyli zatrzymano ich funkcje życiowe i utrwalono substrukturę komórkową. Za pomocą barwnika AlexaFluor, wybarwiono cytoskielet aktywny komórek. Wzbudzenie dokonano za pomocą wiązki laserowej o długości 488nm przy emisji 530nm. Jądra komórkowe wybarwiono barwnikiem DAPI (wizualizowano ziarnistość jąder komórkowych). Ogólnie, zaobserwowano tendencję do migrowania komórek w kierunku prawidłowo przetworzonego materiału powierzchni. Stwierdzono polaryzację błony komórkowej i wysuwanie w tym miejscu wypustek komórkowych, czyli tzw. lamelipodiów. Obrazowanie dokonano w układzie 3D.



Rys.10. Wyniki hodowli komórek mięśni gładkich na kropkowych strukturach periodycznych wytworzonych laserowo w warstwie DLC: a) obraz przestrzenny z częściowo zakrytą siecią kropek; b) powiększony mikroskopowy obraz fluorescencyjny, obrazujący rozwój komórek

Podsumowanie

Wytwarzanie periodycznych struktur na powierzchni różnych materiałów o cechach mikronowych i sub-mikronowych jest szybko rozwijającym się polem badań z zastosowaniami w wielu obszarach naukowych, technicznych, medycznych i w bioinżynierii. W procesie mikro- nanoobróbki „twardych materiałów” wykorzystuje się głównie ablację laserową, która jest uniwersalnym narzędziem zdolnym do wytwarzania struktur 1D, 2D i 3D, i modyfikacji powierzchni lub wnętrza materiału. Proces ablacji zapewnia obróbkę wszelkich materiałów, począwszy od najbardziej twardej i trudnotopliwych a skończywszy na materiałach plastycznych. Wielkość, kształt, rozmieszczenie i gęstość mikro-/nano-struktur zależy od danej metody modyfikacji powierzchni materiału, a także od długości fali emisji lasera, czasu trwania impulsu (także liczby impulsów), gęstości energii (fluencji) i od danych materiałowych. Takie wzajemne sprzężenie parametrów (lasera i materiału) zapewnia wysoką precyzję obróbki (wysoką rozdzielczość) i niski koszt wytworzenia nawet podczas obróbki materiałów transparentnych, takich jak np. szkło lub kwarc.

Największe korzyści wynikają z zastosowania bezpośredniej litografii interferencyjnej do wytwarzania w skali mikro- i sub-mikro gęsto upakowanych struktur na szerokich obszarach, w jednym procesie technologicznym w ciągu kilku sekund. Zastosowanie dwóch lub więcej interferujących wiązek światła z laserów o dużej mocy szczytowej zapewnia możliwość bezpośredniej obróbki powierzchni materiału w tym, metali, materiałów ceramicznych i polimerów. Zmodyfikowane w ten sposób powierzchnie można wykorzystywać w wielu obszarach zastosowań, począwszy od tribologii (zmniejszenie tarcia), a skończywszy na bioinżynierii.

Podziękowania

Badania były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki z dwóch projektów, a mianowicie: projekt N N507 232640 „Laserowe interferencyjne kształtowanie powierzchni metali” oraz projekt pt. „Samodostosowujące się, biomimetyczne podłoża porowate w aspekcie hamowania aktywacji układu krzepnięcia”, o numerze 2011/03/D/ST8/04103.

LITERATURA

- [1] Roach P., Farrar D., Perry C.C, Surface Tailoring for Controlled Protein Adsorption: Effect of Topography at the Nanometer Scale and Chemistry, *J. Am. Chem. Soc.*, 128 (2006), n.12, 3939–3945
- [2] Harvey A.G., Hill E.W., Bayat A., Designing implant surface topography for improved biocompatibility, *Expert Rev Med Devices*, 10 (2013), n.2, 257-67
- [3] Xuan L., Poinern J., Nurshahidah A., Berry C.M., Fawcett D., Engineering a Biocompatible Scaffold with Either Micrometre or Nanometre Scale Surface Topography for Promoting Protein Adsorption and Cellular Response, *Int. J. Biomaterials*, 2013 (2013), Article ID 782549
- [4] Miller J.C., Laser ablation: Principles and Application, *Springer Series in Mater. Sci.*, 28 (1994).
- [5] Glumac N.G., Elliott G.S., Boguszko M., Temporal and Spatial Evolution of a Laser Spark in Air, *AIAA Journal*, 43 (2005), n. 9, 1984-1994
- [6] Major R., Bruckert F., Lackner J. M., Marczak J., Major B., Surface treatment of thin-film materials to allow dialogue between endothelial and smooth muscle cells and the effective inhibition of platelet activation, *RSC Adv.*, 4, (2014) 9491–9502
- [7] Marczak J., Kusiński J., Major R., Rycyk A., Sarzyński A., Strzelec M., Czyż K., Laser interference patterning of DLC layers for directed migration and growth of smooth muscle cell depositions, *Opt. Appl.*, 44, (2014), 575
- [8] Marczak J., Rycyk A., Sarzyński A., Strzelec M., Direct laser manufacturing of 1D and 2D micro- and submicro-scale periodic structures, *Proc. SPIE*, 8703 (2013), 87030F
- [9] Marczak J., Rycyk A., Sarzyński A., Strzelec M., Czyż K., An Nd:YAG dual-channel laser system with Q - modulation for direct interference lithography, *Photonics Letters of Poland*, 6, (2014), n.1, 44
- [10] Arriola A., Rodriguez A., Perez N., Tavera T., Withford M.J., Fuerbach A., Olaizola S.M., Fabrication of high quality sub-micron Au gratings over large areas with pulsed laser interference lithography for SPR sensors, *Optical Mat. Express*, 2, (2012), n.11, 1571
- [11] Majkowska B., Jażdżewska M., Zielinski A., Marczak J., Sarzyński A., Strzelec M., Rycyk A., Czyż K., EMRS Fall Meeting 2014, Poster Session, Bioceramics for bone and joint repair, http://www.emrs-strasbourg.com/index.php?option=com_abstract&task=view&id=284&year=2014&Itemid=&id_season=12&PHPSESSID=633883b1743e9ddf607fee432898b962.

Autorzy: mgr inż. Krzysztof Czyż, Wojskowa Akademia Techniczna, Instytut Optoelektroniki, ul. gen. Sylwestra Kaliskiego 2, 00-908 Warszawa, E-mail: kczyz@wat.edu.pl; mgr Klaudia Trembecka-Wójciga, Instytut Metalurgii i Inżynierii Materiałowej Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, ul. Reymonta 25, 30-059 Kraków, e-mail: k.trembecka@imim.pl; mgr inż. Antoni Rycyk, Wojskowa Akademia Techniczna, Instytut Optoelektroniki, ul. gen. Sylwestra Kaliskiego 2, 00-908 Warszawa, E-mail: arycyk1@wat.edu.pl; dr inż. Antoni Sarzyński, Wojskowa Akademia Techniczna, Instytut Optoelektroniki, ul. gen. Sylwestra Kaliskiego 2, 00-908 Warszawa, E-mail: asarzynski@wat.edu.pl; dr inż. Marek Strzelec, Wojskowa Akademia Techniczna, Instytut Optoelektroniki, ul. gen. Sylwestra Kaliskiego 2, 00-908 Warszawa, E-mail: mstrzelec@wat.edu.pl; dr hab. inż. Jan Marczak, prof WAT, Wojskowa Akademia Techniczna, Instytut Optoelektroniki, ul. gen. Sylwestra Kaliskiego 2, 00-908 Warszawa, E-mail: jmarczak@wat.edu.pl.