

**POLITECHNIKA WARSZAWSKA**

**Wydział Mechatroniki**

**ROZPRAWA DOKTORSKA**

mgr inż. Łucja Dybowska-Sarapuk

**Opracowanie technologii wytwarzania biozgodnego,  
przewodzącego atramentu grafenowego**

Promotor:

Prof. dr hab. mgr inż. Małgorzata Jakubowska

Promotor pomocniczy:

Dr n. med. Andrzej Kotela

Warszawa, 2019



*Rodzinie i przyjaciołom*





*Serdecznie dziękuję Pani Profesor Małgorzacie Jakubowskiej za poświęcony czas, prowadzenie mojej kariery naukowej, za cierpliwość, zrozumienie i opiekę w trakcie realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej.*

*Dziękuję Panu Doktorowi Andrzejowi Koteli za okazaną pomoc oraz cenne wskazówki podczas prowadzenia badań i opracowywaniu ich wyników.*

*Dziękuję Kolegom i Koleżankom z Wydziału Mechatroniki, w szczególności Jakubowi Krzemińskiemu oraz Bartłomiejowi Wałpuskiemu oraz wszystkim osobom, które przyczyniły się do powstania tej pracy za empatię i pomoc w realizacji badań.*

*Szczególnie dziękuję za pomoc Mężowi, za jego cierpliwość oraz motywowanie mnie do pracy i do podejmowania nowych wyzwań.*

*Dziękuję Rodzicom za wskazanie drogi życiowej, gotowość niesienia pomocy i okazywane przez całe życie wsparcie.*

*Dziękuję także przyjaciółce Agacie Gorczycy za dodawanie mi odwagi w chwilach zwątpienia oraz wspieranie mnie w każdej sytuacji.*



## **Streszczenie:**

Wykorzystanie technik elektroniki drukowanej do aplikacji biomedycznych, przy równoczesnym zastosowaniu grafenowego, przewodzącego atramentu heterofazowego, pozwala na wytworzenie tzw. inteligentnej powierzchni na urządzeniach i materiałach medycznych narażonych na niekontrolowane namnażanie bakterii. Powierzchnia taka powinna pełnić wiele różnych funkcji. Jej głównym zadaniem jest stworzenie antyadhezyjnej względem bakterii powłoki, która równocześnie jest biozgodna, a więc wykazuje zdolność interakcji ze zdrowymi komórkami i tkankami ludzkimi, bez powodowania szkodliwych, toksycznych efektów. Ponadto oczekuje się, iż inteligentna powierzchnia będzie stymulować integrację komórek, poprzez wzmacnianie ich zdolności do silnego namnażania się. Powinna ona także charakteryzować się adhezją i wysoką wytrzymałością mechaniczną.

Badania wykonane na potrzeby niniejszej pracy pozwoliły na opracowanie kompozycji oraz technologii wytwarzania biozgodnego, przewodzącego atramentu grafenowego służącego do wytwarzania warstw, powłok i wzorów technikami elektroniki drukowanej drukiem strumieniowym oraz powlekaniami natryskowym, do zastosowań w biomedycynie. Dzięki wykorzystaniu zbudowanego na potrzeby pracy stanowiska do druku biozgodnych atramentów możliwe była szczegółowa charakteryzacja opracowanych atramentów i wytworzenie przy ich użyciu grafenowych warstw i powłok na podłożach takich jak szkło, ceramika, folia PET, cewnik Foley'a czy tytanowe skafoldy. Opracowana, oryginalna technologia pozwala uzyskać atramenty grafenowe spełniające wymagania biologiczne i techniczne. Charakteryzuje je nie tylko biozgodność względem komórek, ale również jednorodność i stabilność. Posiadają wymagane w technikach drukarskich właściwości rozrzedzenia ścinaniem, a ich lepkość mieści się w zakresie zalecanym dla technik druku strumieniowego i powlekania natryskowego. Ponadto opracowane atramenty pozwalają także na sterowanie właściwościami elektrycznymi wytwarzanych przewodzących prąd warstw, zależnymi od ilości powtórzeń procesu drukarskiego i zawartości płatków grafenowych w atramencie.

W pracy przedstawiono szereg aplikacji wykorzystujących właściwości opracowanego atramentu grafenowego. Zaprezentowano powłoki zdolne do zablokowania procedury tworzenia biofilmu bakteryjnego oraz zmniejszenia zagrożenia występowania infekcji urologicznych, proces powlekania tytanowych implantów zwierzęcych w celu zastosowania ich do stymulacji proliferacji komórek, a także wytwarzanie przewodzących warstw do elektrostymulacji wzrostu komórek ludzkich.

**Słowa kluczowe:** nanopłatki grafenowe, druk strumieniowy, powlekanie natryskowe atramenty heterofazowe, atramenty biologiczne

## **Abstract:**

The use of graphene, conductive heterophasic ink deposited using printed electronics technics for biomedical applications, allows the production of so-called “smart surface” on medical devices and materials exposed to uncontrolled multiplication of bacteria. This surface should have many different functions. Its main task is to create a bacterially anti-adhesive coating that is at the same time biocompatible, and thus shows the ability to interact with healthy cells and human tissues, without causing harmful, toxic effects. In addition, it is expected that the “smart surface” will stimulate the integration of cells, by strengthening their ability to multiply. It should also be characterized by adhesion and high mechanical strength.

This dissertation presents the development of compositions and technologies of the production of biocompatible conductive graphene ink for the formation of layers, coatings and patterns using printing electronics techniques such ink-jet printing and spray coating for biomedicine applications. The preparation of purpose designated setup enabled through characterisation of the developed inks and formation of graphene layers and coatings on various substrates such as glass, ceramics, PET foil, Foley catheters and titanium scaffolds.

The developed technology allowed to obtain graphene inks that meet both biological and technical requirements. The obtained coatings were characterized not only by the biocompatibility with the cells, but also by homogeneity and stability. The inks show the shear thinning properties required in printing techniques, and their viscosity is within the range recommended for ink jet printing and spray coating techniques. Additionally, the produced layers are electrically conductive and their performance may be early controlled by the number of repetitions of the printing process and charge of the content of graphene platelets in the ink.

Finally thesis presents a number of applications, which are created using the developed graphene inks. There included formation of coatings capable of blocking the bacterial biofilm formation on catheters, thus reducing of the risk of urological infections, process of titanium animal implants coating for stimulation of cell proliferation as well as the production of conductive layers for electrostimulation of the human cells growth.

**Key words:** graphene nanoplatelets, ink-jet printing, spray-coating, heterophase inks,  
biological inks

## Wykaz ważniejszych skrótów i oznaczeń:

ADSC – (ang. adipose derived stem cells) komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej

CIJ – (ang. continuous ink-jet printing) druk strumieniowy ciągły

CVD – (ang. chemical vapor deposition) osadzanie z fazy gazowej

DMF – dimetyloformamid

DOD – (ang. drop-on-demand ink-jet printing) druk strumieniowy kropla na żądanie

EC – etyloceluloza

EPS – (ang. extracellular polymeric substance) macierz pozakomórkowa

FBS – (ang. fetal bovine serum) serum płodowe z cieląt, surowica bydłęca

FLG – (ang. few-layer graphene) grafen wielowarstwowy

GFNs – (ang. graphene family nanomaterials) rodzina grafenowych nanomateriałów

GNP – (ang. graphene nanoplatelets) nanopłatki grafenowe

GO – (ang. graphene oxide) tlenek grafenu

nAg – nanocząstki srebra

NMP – N-metylopirolidon

PBS (ang. phosphate buffered saline) bufor fosforanowy

PEG – (ang. polyethylene glycol) glikol polietylenowy

PLR – (ang. polyethylene glycol–polypropylene glycol–polyethylene glycol) Pluronic

PVA – poli(alkohol winylinowy)

rGO – (ang. Reduced Graphene oxide) zredukowany tlenek grafenu

ROS – (ang. reactive oxygen species) reaktywne formy tlenu

SEM – (ang. scanning electron microscope) skaningowy mikroskop elektronowy

TEM – (ang. transmission electron microscope) transmisyjny mikroskop elektronowy

## Spis treści:

<b>STRESZCZENIE:</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRACT:</b> .....	<b>8</b>
<b>WYKAZ WAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW I OZNACZEŃ:</b> .....	<b>9</b>
<b>SPIS TREŚCI:</b> .....	<b>10</b>
<b>1. WPROWADZENIE</b> .....	<b>13</b>
<b>2. STAN WIEDZY</b> .....	<b>17</b>
2.1. MATERIAŁY GRAFENOWE .....	17
2.1.1. <i>Rodzina materiałów grafenowych</i> .....	17
2.1.2. <i>Toksyczność i biogodność materiałów grafenowych</i> .....	20
2.1.3. <i>Zastosowanie GNP w medycynie</i> .....	24
2.2. ATRAMENTY HETEROFAZOWE I HYDROŻELE .....	33
2.2.1. <i>Grafenowe atramenty heterofazowe do technik elektroniki drukowanej</i> .....	34
2.2.2. <i>Heterofazowe atramenty biologiczne na bazie grafenu</i> .....	35
<b>3. CEL PRACY</b> .....	<b>38</b>
<b>4. METODYKA BADAWCZA</b> .....	<b>41</b>
4.1. TECHNOLOGIA WYTWARZANIA GRAFENOWYCH ATRAMENTÓW HETEROFAZOWYCH .....	41
4.2. TECHNOLOGIA WYTWARZANIA PRZEWODZĄCYCH ŚCIEŻEK I WARSTW GRAFENOWYCH .....	44
4.2.1. <i>Technologia wytwarzania ścieżek grafenowych metodą druku strumieniowego</i> .....	45
4.2.2. <i>Technologia wytwarzania warstw grafenowych metodą powlekania natryskowego</i> .....	47
4.2.3. <i>Obróbka cieplna ścieżek i warstw grafenowych</i> .....	49
4.3. METODY BADAWCZE STOSOWANE DO CHARAKTERYSTYKI WŁAŚCIWOŚCI BIOZGODNYCH, PRZEWODZĄCYCH ATRAMENTÓW I WARSTW GRAFENOWYCH .....	50
4.3.1. <i>Pomiary właściwości reologicznych atramentów grafenowych</i> .....	50
4.3.2. <i>Pomiary grubości oraz obserwacja mikrostruktury warstw i ścieżek grafenowych</i> .....	51
4.3.3. <i>Badanie adhezji i wytrzymałości mechanicznej ścieżek i warstw grafenowych</i> ... ..	53
4.3.4. <i>Pomiary właściwości elektrycznych ścieżek i wzorów grafenowych</i> .....	54
4.4. METODY BADAWCZE STOSOWANE DO CHARAKTERYSTYKI WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNYCH GRAFENOWYCH ŚCIEŻEK I WARSTW .....	55
4.4.1. <i>Metody badania cytotoksyczności warstw grafenowych</i> .....	55
4.4.2. <i>Metody badania stymulacji proliferacji komórek macierzystych</i> .....	56

4.4.3.	<i>Metody oceny antyseptyczności warstw grafenowych.....</i>	58
4.4.4.	<i>Technologia wytwarzania nanopłatków grafenowych dekorowanych nanocząstkami srebra.....</i>	59
<b>5.</b>	<b>OPRACOWANIE KOMPOZYCJI BIOZGODNYCH, PRZEWODZĄCYCH ATRAMENTÓW GRAFENOWYCH.....</b>	<b>62</b>
5.1.	HETEROFAZOWE ATRAMENTY DO ELEKTRONIKI DRUKOWANEJ.....	62
5.2.	DOBÓR ROZPUSZCZALNIKA .....	66
5.3.	DOBÓR MATERIAŁU NOŚNIKA.....	67
5.4.	DOBÓR MATERIAŁU FAZY FUNKCJONALNEJ.....	71
5.5.	DOBÓR MATERIAŁU SURFAKTANTU.....	76
5.6.	BADANIA CYTOZGODNOŚCI WYBRANYCH KOMPONENTÓW ATRAMENTÓW GRAFENOWYCH .....	77
<b>6.</b>	<b>OPRACOWANIE STANOWISKA DO DRUKU STRUMIENIOWEGO .....</b>	<b>82</b>
6.1.	TECHNOLOGIA DRUKU STRUMIENIOWEGO.....	82
6.2.	PROJEKT STANOWISKA DRUKARKI STRUMIENIOWEJ .....	85
6.3.	KONSTRUKCJA STANOWISKA DRUKARKI STRUMIENIOWEJ.....	90
6.4.	BIOLOGICZNY ASPEKT BUDOWY STANOWISKA DRUKARKI STRUMIENIOWEJ .....	94
<b>7.</b>	<b>CHARAKTERYZACJA I WŁAŚCIWOŚCI OPRACOWANYCH ATRAMENTÓW I WARSTW GRAFENOWYCH.....</b>	<b>97</b>
7.1.	CHARAKTERYZACJA I WŁAŚCIWOŚCI OPRACOWANYCH ATRAMENTÓW GRAFENOWYCH	97
7.1.1.	<i>Badanie stabilności atramentów heterofazowych z fazą funkcjonalną w postaci nanopłatków grafenowych.....</i>	97
7.1.2.	<i>Badanie lepkości heterofazowych atramentów grafenowych.....</i>	101
7.1.3.	<i>Model sił ścinających i prędkości ścinania w procesie druku strumieniowego.</i>	107
7.1.4.	<i>Badanie formowania kropli atramentów i tworzenia ścieżek– dobór parametrów procesu druku strumieniowego .....</i>	109
7.2.	CHARAKTERYZACJA I WŁAŚCIWOŚCI WYTWARZANYCH WARSTW I WZORÓW GRAFENOWYCH .....	115
7.2.1.	<i>Badanie adhezji i wytrzymałości mechanicznej wytwarzanych warstw na różnych typach podłoży.....</i>	115
7.2.2.	<i>Badanie grubości wytwarzanych warstw i ścieżek.....</i>	116
7.2.3.	<i>Badanie elektrycznych właściwości warstw.....</i>	123
7.2.4.	<i>Badanie cytozgodności warstw grafenowych.....</i>	127

<b>8. APLIKACJE PRZEWODZĄCEGO, BIOZGODNEGO ATRAMENTU GRAFENOWEGO .....</b>	<b>131</b>
8.1. ZASTOSOWANIE OPRACOWANEGO ATRAMENTU GRAFENOWEGO W OCHRONIE PRZED ZAKAŻENIAMI SPOWODOWANYMI CEWNIKOWANIEM PACJENTÓW .....	131
8.1.1. <i>Biofilm i problemy w jego eradykacji .....</i>	131
8.1.2. <i>Blokowanie powstawania biofilmu na cewnikach urologicznych .....</i>	132
8.1.3. <i>Technologia wytwarzania wypełniacza w postaci nanopłatków grafenowych dekorowanych nanocząstkami srebra .....</i>	133
8.1.4. <i>Blokowanie tworzenia biofilmu bakteryjnego na cewnikach Foley'a .....</i>	135
8.2. STYMULACJA PROLIFERACJI KOMÓREK MACIERZYSTYCH.....	139
8.2.1. <i>Dobór pożywki hodowlanej .....</i>	139
8.2.2. <i>Ocena zdolności stymulacji proliferacji komórek macierzystych materiałem grafenowym .....</i>	142
8.3. ZASTOSOWANIE PRZEWODZĄCYCH WARSTW GRAFENOWYCH DO ELEKTROSTYMULACJI KOMÓREK LUDZKICH .....	144
8.3.1. <i>Model procesu pośredniej, indukcyjnej metody elektrostymulacji.....</i>	147
8.3.2. <i>Stanowisko do elektrostymulacji komórek .....</i>	155
8.3.3. <i>Wyniki elektrostymulacji komórek nerwowych .....</i>	157
8.4. POKRYWANIE IMPLANTÓW - SCAFFOLDÓW .....	159
<b>9. PODSUMOWANIE I WNIOSKI .....</b>	<b>163</b>
<b>10. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>167</b>



# 1. WPROWADZENIE

Interdyscyplinarność, rozumiana jako przenikanie się różnych dziedzin naukowych pozwala na coraz bardziej wszechstronną analizę zachodzących w świecie zjawisk oraz umożliwia skuteczniejsze rozwiązywanie stawianych przez naukowców problemów. Łączenie technik badawczych stosowanych w różnych dziedzinach nauki pozwala na wykorzystanie ich zalet, przy jednoczesnym, wielostronnym wykorzystywaniu efektów badań stymulujących rozwój naukowy. Widocznym w świecie trendem jest kształtowanie się interdyscyplinarnych dziedzin nauki, takich jak mechatronika, fizyka medyczna czy inżynieria biomedyczna. Połączenie wiedzy, technik i metod badawczych wykorzystywanych zarówno przez nauki techniczne, takie jak nanotechnologia i elektronika, jak również biologiczne, pozwala podjąć różne wyzwania i rozwiązywać problemy stawiane przez współczesną medycynę.

Jednym z takich wyzwań jest zmniejszenie zagrożenia związanego z zakażeniami i infekcjami spowodowanymi bakteriami i mikroorganizmami w środowisku szpitalnym. Zarówno bakterie z rodziny Gram-dodatnich, takie jak gronkowce (np. *Staphylococcus aureus*) jak i Gram-ujemnych (m. in. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) są powszechnymi lekoopornymi patogenami – czynnikami chorobotwórczymi powodującymi poważne infekcje. Według opublikowanych w 2011 r. danych, co roku w Unii Europejskiej w wyniku zakażeń wywołanych przez odporne na antybiotyki bakterie umiera ponad 25 000 pacjentów [1]. Co więcej, poniesione przez szpitale koszty związane z leczeniem infekcji, szacowane są na około 1,5 miliarda euro rocznie [1]. W związku z tym, opracowywanie nowych środków przeciwbakteryjnych, mogących mieć zastosowanie w walce z tymi infekcjami, stało się ostatnimi czasy jednym z głównych nurtów badań w biomedycynie [1]. W celu znaczącego zmniejszenia ilości infekcji należy opracować metodę, która pozwoli zniwelowanie zagrożenia związanego z bakteriami o zwiększonej odporności na antybiotyki.

Główną przyczyną występujących w szpitalach trudności w zwalczaniu zakażeń bakteryjnych jest zwiększona odporność bakterii na działanie antybiotyków. Związana jest ona z umiejętnością tworzenia przez bakterie zorganizowanej, wielowarstwowej struktury nazwanej biofilmem, składającej się z jednego lub wielu gatunków drobnoustrojów, ściśle związanych z powierzchnią podłoża. Bakterie tworzące biofilm otoczone są pozakomórkową substancją polimerową – zwaną macierzą pozakomórkową (EPS, ang. extracellular polymeric substance). Struktura biofilmu bardzo utrudnia eradykację, a więc pełne usunięcie bakterii z powierzchni. Drobnoustroje żyjące w biofilmach wykazują bowiem znacznie zwiększoną tolerancję na związki przeciwdrobnoustrojowe. Zastosowanie nawet bardzo wysokich stężeń

antybiotyków i chemioterapeutyków nie powoduje pełnej eradykacji bakterii bytujących w strukturze biofilmu. W zależności od gatunku drobnoustroju, komórki takie mogą wykazywać nawet tysiąc razy większą odporność na środki przeciwdrobnoustrojowe [2], jak i niekorzystne dla ich rozwoju warunki środowiska, w porównaniu z wolnożyjącymi drobnoustrojami tego samego gatunku. Ponieważ powstawanie biofilmu zachodzi praktycznie na każdej powierzchni: od miedzianych rur, przez cewniki medyczne, wenflony, dreny, implanty, endoprotezy stawowe i kostne, jest to bardzo niebezpieczny proces, który może skutkować zanieczyszczeniem wody i żywności, a także rozwojem lekoopornych bakterii. W związku z tym, znalezienie sposobu blokowania procesu tworzenia biofilmu jest kluczowe dla rozwiązania problemu poważnych infekcji i zakażeń bakteryjnych w szpitalach.

Naukowcy na świecie ciągle poszukują skutecznych metod blokowania biofilmu. Jedną z metod zakłada wytworzenie na podłożach szczególnie narażonych na oddziaływanie bakterii antyseptycznych powłok. Obecnie w literaturze znaleźć można badania związane z zabezpieczaniem urządzeń medycznych poprzez nasączenie lub powlekanie ich antybiotykami, jonami srebra, rtęcią lub tellurem [3]–[5]. Jednakże skuteczność tych rozwiązań wciąż nie jest potwierdzona. Ponadto substancje te często są toksyczne dla pacjenta. W związku z tym, wciąż jeszcze niezrealizowanym przez naukowców zadaniem jest opracowanie powłoki charakteryzującej się nie tylko antybakteryjnością lub antyseptycznością, ale spełniającą jednocześnie kilka innych, równie ważnych funkcji biologicznych.

Warstwa taka, nazwana w literaturze inteligentną powierzchnią [6] powinna przede wszystkim tworzyć bakteriostatyczną, wstrzymującą rozwój bakterii i biofilmów, antyadhezyjną względem bakterii powłokę, aby przeciwdziałać infekcjom i zakażeniom. Jednakże, aby mogła być wykorzystana w zastosowaniach biomedycznych powinna być także biozgodna, a więc wykazywać zdolność interakcji ze zdrowymi komórkami i tkankami ludzkimi, bez powodowania szkodliwych, toksycznych efektów [7]. Ponadto oczekuje się, iż inteligentna powierzchnia będzie np. stymulować proliferację – namnażanie się komórek oraz regenerację tkanek. Powinna także charakteryzować się adhezją i wysoką wytrzymałością mechaniczną, tak aby możliwe było jej zastosowanie m.in. do pokrywania osprzętu medycznego, cewników czy implantów [6]. Zadanie to jest dużym wyzwaniem, którego podjęcie wymaga rozwiązania dwóch problemów: znalezienia właściwego materiału, spełniającego opisane wyżej wymogi oraz sposobu wytworzenia takiej biozgodnej warstwy, tworzącej inteligentną powierzchnię. Metoda jej wytwarzania musi gwarantować, niezbędną przy pracy z materiałami przeznaczonymi do aplikacji biologicznych, czystość i bezkontaktowość procesu. Warunki te spełniają niektóre z technik wytwarzania warstw i

pokryć stosowanych w dziedzinie elektroniki, zwanej elektroniką drukowaną: druk strumieniowy oraz powlekanie natryskowe.

Elektronika drukowana (ang. printed electronics) to gałąź przemysłu elektronicznego, którego dużym sukcesem jest udoskonalenie różnorodnych technik nanoszenia wzorów i warstw w celu tworzenia układów oraz elementów elektronicznych, zarówno na sztywnych jak i elastycznych podłożach. Techniki drukarskie, takie jak druk strumieniowy oraz powlekanie natryskowe, były początkowo wykorzystywane prawie wyłącznie w poligrafii. Ich ogromnym atutem jest to, że pozwalają w bezkontaktowy i efektywny ekonomicznie sposób nanosić warstwy i wzory na różnorodne podłoża – sztywne i elastyczne, płaskie i mające bardziej złożoną strukturę geometryczną. Ze względu na addytywny charakter tych technik, ich użycie zmniejsza straty materiałowe występujące w tradycyjnych technologiach, takich jak trawienie i galwanizacja [8], [9]. Niewątpliwą zaletą obu technik jest także czystość procesu, która eliminuje groźbę zanieczyszczenia drukowanego materiału i powstającej warstwy. Dzięki tym zaletom, techniki elektroniki drukowanej stanowią narzędzia dające szansę rozwiązania niektórych z problemów stojących przed współczesną medycyną.

Naturalnymi kandydatami do wytworzenia „inteligentnej powierzchni”, materiałami zapewniającymi jej biogodność, są wszelkie odmiany węgla. Ogromnym zainteresowaniem współczesnej nauki cieszy się ostatnimi czasy szczególnie jedna z alotropowych odmian węgla – grafen. Ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne oraz biogodność, materiał ten znalazł zastosowanie nie tylko w elektronice [10], [11], ale także w bioinżynierii i nanomedycynie m. in. do transportu leków wewnątrz organizmu pacjenta, inżynierii tkankowej [12], biologicznych sensorów, niszczenia komórek rakowych [13]. Grafen jako węgiel jest bowiem biodegradowalny i biokompatybilny. Ponadto, wedle doniesień literaturowych [1], [14] wskazuje, iż materiały grafenowe charakteryzują się także właściwościami antybakteryjnymi.

Wykorzystanie wspomnianych wcześniej metod elektroniki drukowanej do nanoszenia materiałów grafenowych, może stanowić w biomedycynie przełom związany z wytworzeniem wspomnianej wyżej inteligentnej powierzchni. Grafen stosowany w inżynierii tkankowej, nie jest bowiem szkodliwy względem komórek [7]. Wręcz przeciwnie, jest materiałem zdolnym do stymulacji ich proliferacji [15], [16], a ponieważ jest to materiał przewodzący prąd, możliwe jest również użycie stymulacji prądowej, która dodatkowo zwiększy efekt namnażania komórek. W przypadku komórek macierzystych, stymulacja prądowa pozwala również na sterowanie proliferacją. Przewodzące prąd warstwy grafenowe, nadrukowane na rusztowania komórkowe – skafoldy (ang. scaffold), oraz podłoża do hodowli komórkowych, przez

dotatkowe wykorzystanie prądowej stymulacji, mogłyby w przyszłości wspomóc np. terapię regeneracyjną serca, indukowanie proliferacji i sterowanie różnicowaniem komórek macierzystych (ukierunkowanie ich przekształcania w różnego rodzaju tkanki), jak również tworzenie wierzchnich warstw implantów o wysokim stopniu biogodności i osteoindukcyjności, a więc możliwości przekształcania się w komórki kostne.

Podsumowując, można stwierdzić, że wykorzystanie elektroniki drukowanej do zastosowań biomedycznych i medycznych pozwoli w przyszłości na rozwiązanie ważnego problemu współczesnej medycyny. Przy wykorzystaniu materiału grafenowego, użycie metod elektroniki drukowanej umożliwić może wytwarzanie nietoksycznych dla człowieka, antyseptycznych warstw i pokryć. Dzięki wytwarzaniu warstw grafenowych na powierzchniach z różnych materiałów i o różnych kształtach, także na osprzęcie medycznym np. na cewnikach, rurkach tracheotomijnych czy implantach chirurgicznych i medycznych, możliwe byłoby zapobieganie rozwojowi groźnych chorób bez użycia, często nieskutecznych, antybiotyków. Taka warstwa grafenowa naniesiona np. na powierzchnię implantów mogłaby pełnić funkcję inteligentnej powierzchni. Jej zadaniami byłoby zarówno zapobieganie zakażeniom występującym po wszczepieniu implantu pacjentowi, jak i stymulowanie wzrostu komórek kostnych, w celu szybszego przyłączenia implantu do kości.

## 2. Stan wiedzy

### 2.1. Materiały grafenowe

Poszukiwanie biozgodnych materiałów, które mogą zostać wykorzystane do wytwarzania cechującej się biokompatybilnością „inteligentnej powierzchni” w naturalny sposób prowadzi do badań nad materiałami węglowymi. Węgiel stanowi bowiem ponad 18% masy ciała człowieka [17] i odgrywa kluczową rolę w organizmie i życiu ludzkim, zarówno w dziedzinie biologicznej, jak i naukowej oraz technologicznej [18]. Jedną z alotropowych odmian węgla – grafen, cieszy się ostatnimi czasy, ze względu na unikalne właściwości mechaniczne i towarzyszącą im biokompatybilność, ogromnym zainteresowaniem współczesnej nauki. Zarówno ze względu na doniesienia o braku toksyczności grafenu względem komórek ludzkich jak i jego antybakteryjności, jest to obiecujący materiał do potencjalnego zastosowania w aplikacjach biomedycznych [19], [20].

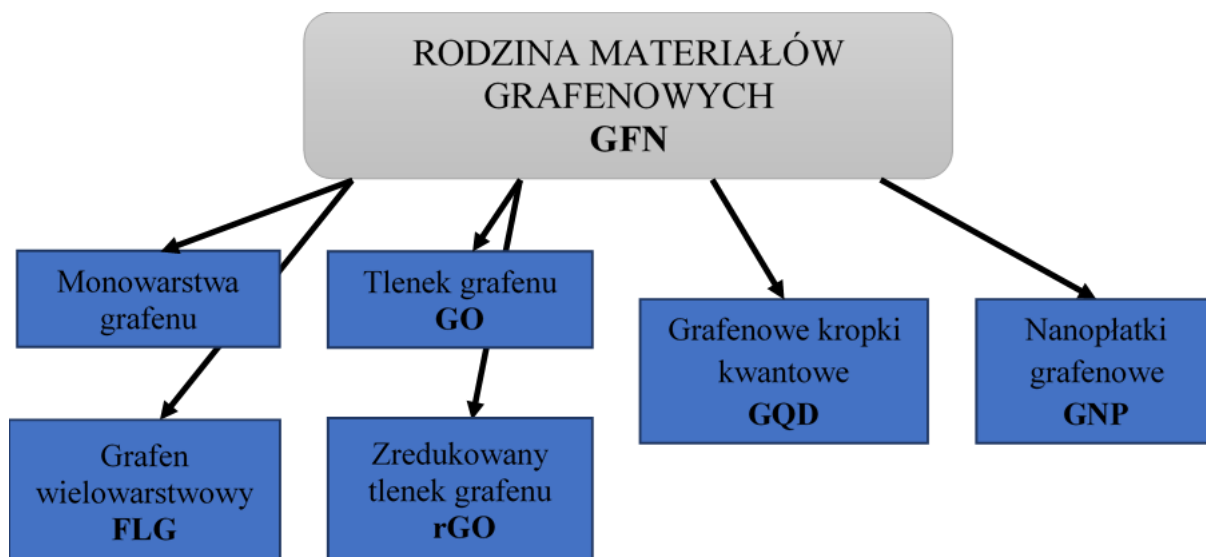
Odkrycie grafenu w roku 2004 było przełomowym wydarzeniem w dziedzinie nanomateriałów. Od tej chwili nieustannie wzbudza ogromne zainteresowanie naukowców na całym świecie oraz znajduje coraz więcej zastosowań, głównie w obszarze nanotechnologii [21], [22]. Monowarstwa węglowa, nazywana grafenem, jest to dwuwymiarowy arkusz o grubości pojedynczego atomu, tworzący strukturę przypominającą plaster miodu, złożony z sześciokątnie ułożonych atomów węgla, wyizolowany z trójwymiarowego węglowego materiału macierzystego jakim jest grafit [12], [22], [23]. Za odkrycie grafenu, stanowiącego najcieńszą znaną formę węgla, Andre K. Geim i Konstantin S. Novoselov zostali uhonorowani w roku 2010 nagrodą Nobla z dziedziny fizyki [24]. Jest to bowiem materiał o unikalnych właściwościach fizykochemicznych, termicznych, optycznych, mechanicznych, elektronicznych i biologicznych [12], [24]. Charakteryzuje się dużą powierzchnią właściwą ( $2630 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ ), wysoką ruchliwością wewnętrzną elektronów ( $15000 \text{ cm}^2\text{v}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), bardzo dobrą przewodnością cieplną (około  $5000 \text{ WmK}^{-1}$ ), wysokim modułem Younga (1 TPa) oraz optyczną transmitancją sięgającą 97,7% [25]–[28].

#### 2.1.1. Rodzina materiałów grafenowych

Opisane wyżej właściwości grafenu spowodowały zwiększone zainteresowanie wytwarzaniem i szukaniem nowych zastosowań dla materiałów bazujących na grafenie, nazwanych często rodziną grafenowych nanomateriałów GFNs (ang. Graphene family nanomaterials) [12], [21], [24], [29], [30]. Szczególną uwagę przyciągają nanomateriały takie jak tlenek grafenu i nanopłatki grafenowe. Wzbudzają one ogromne zainteresowanie m. in. jako potencjalne materiały do zastosowań w inżynierii tkankowej i medycynie regeneracyjnej [16].

Jednakże materiały grafenowe wchodzące w skład GFNs różnią się znacznie między sobą, zarówno pod względem fizycznym jak i chemicznym, m.in. kształtem i wymiarami, wymiarem poprzecznym, liczbą warstw z których są zbudowane, powierzchnią właściwą, modyfikacją chemiczną, czystością, jak również postacią fizyczną występujących w nich zanieczyszczeń [21], [29], [31], [32]. W związku z tym, charakteryzują się one nie tylko różnymi właściwościami elektrycznymi i mechanicznymi, ale także w odmienny sposób wchodzi w interakcje z komórkami. Fizycznochemiczne cechy nanomateriału wpływają bowiem na oddziaływania z systemami biologicznymi, penetrację komórek i potencjalną toksyczność [7], [18], [21], [31], [33]. Dlatego zarówno różne rodzaje materiałów należących do GFNs, jak i materiały grafenowe tego samego rodzaju, różniące się strukturą, mogą inaczej wpływać na komórki i tkanki, wywołując różne reakcje biologiczne [20]. Niezwykle ważne jest więc umiejętność rozróżnianie tych materiałów, szczególnie przy zastosowaniu ich w aplikacjach biomedycznych.

Do GFNs zaliczyć można, przedstawione na rysunku 1, m. in. jedno lub wielowarstwowy grafen (FLG), grafenowe kropki kwantowe QOD (ang. Graphene quantum dots), tlenek grafenu GO (ang. Graphene oxide), zredukowany tlenek grafenu rGO (ang. Reduced graphene oxide) oraz nanopłatki grafenowe GNP (ang. Graphene nanoplatelets) [12], [21], [22], [24], [29], [30].



Rysunek 1. Grupa materiałów wchodzących w skład rodziny materiałów grafenowych GFN

Grafen wielowarstwowy FLG (ang. few-layer graphene) definiowany jest jako stos warstw grafenowych, o grubości 2-10 warstw grafenu. Pierwotnie był to produkt uboczny uzyskiwany w produkcji monowarstwy grafenowej, jednak szybko stał się interesującym

materiałem komercyjnym, ponieważ może służyć do wytwarzania innych rodzajów materiałów grafenowych, należących do GFNs [12]. Grafenowe kropki kwantowe GQD (ang. Graphene quantum dots) – jest to forma nanopłatków grafenowych, złożonych z kilku warstw. Ze względu na ich właściwości fotoluminescencyjne, używane są przede wszystkim w optoelektronice i badaniach oraz aplikacjach związanych z fotoluminescencją. Ze względu na bardzo małe wymiary  $<30$  nm oraz grubości  $<10$  nm określone są materiałem zerowymiarowym [29], [31].

Tlenek grafenu GO (ang. Graphene oxide) to silnie utleniona forma chemicznie modyfikowanego grafenu, wytwarzana przez utlenianie i złuszczenie krystalicznego grafitu oraz działanie ultradźwięków (sonikację) wpływającą na wytworzenie monowarstwy, zazwyczaj w wodnej zawieszynie. Struktura GO składa się z węglowych arkuszy o grubości jednego atomu z dołączonymi na obwodzie grupami karboksylowymi, które zapewniają ujemny ładunek powierzchniowy i stabilność koloidalną. Tlenek grafenu to nieprzewodzący prądu materiał o wysokiej zawartości tlenu. Możliwe jest wytwarzanie GO składającego się z jednej lub wielu warstw [12], [29]. Jest materiałem, który nie tylko może być łatwo produkowany na dużą skalę, ale także jest łatwo dyspergowany w różnych rozpuszczalnikach, także w wodzie [34]–[37]. Jednak jego cechą charakterystyczną jest także to, iż nie przewodzi on prądu elektrycznego. W celu przekształcenia nieprzewodzącego materiału GO w materiał przewodzący, niezbędna jest dodatkowa obróbka, zwana redukcją [36], [38]. Proces redukcji lub funkcjonalizacji jest zarówno skomplikowany jak i kosztowny [36], [39]. W znacznym stopniu ogranicza on zakres stosowanych materiałów podłożowych, na które GO jest nanoszony, do tych, które wykazują stabilność w wysokich temperaturach lub odporność na stosowane reakcje chemiczne [36]. Najważniejsze jednak jest to, iż chemiczne i termiczne modyfikacje GO znacznie ograniczają właściwości elektryczne warstwy [39]. Zredukowany tlenek grafenu (rGO) ma znacznie słabszą przewodność w porównaniu do czystego grafenu [37], [40], [41] oraz może wykazywać niestabilne właściwości [42]. Zredukowany tlenek grafenu rGO (ang. Reduced Graphene oxide) jest produktem powstałym po poddaniu tlenku grafenu obróbce redukcyjnej. Redukcja obejmuje wysokotemperaturową obróbkę termiczną, obróbkę chemiczną lub foto-termiczną, pozwalającą na zmniejszenie zawartości tlenu. Jest ona wykonywana m.in. w celu przywrócenia przewodności elektrycznej i zwiększenia hydrofobowości materiału [12], [29].

Nanopłatki grafenowe GNP (z ang. Graphene nanoplatelets lub Graphene nanoflakes), nazywane często w literaturze nanoarkuszami grafenowymi GNS (z ang. Graphene nanosheets), są to nanocząstki zbudowane ze stosów arkuszy grafenowych, a więc składające

się z jednej lub wielu warstw grafenowych o grubości w zakresie 0,34-100 nm, [23], [29], [32]. Nanopłatki grafenowe zachowują dobrą przewodność elektryczną na poziomie  $10^4 - 10^5$  S/m [23]. Połączenie wysokiej odporności na odkształcenia mechaniczne z wysoką przewodnością cieplną i elektryczną sprawia, że GNPs są coraz częściej używane jako wypełniacz kompozycji do past i atramentów [23], [43], często w zastępstwie stosowanych do tej pory w elektronice nanowypełniaczy, takich jak sadza, nanorurki węglowe i nanocząstki metaliczne [32]. Nanopłatki są bowiem tańsze niż nanorurki węglowe, a ich przewodnictwo elektryczne jest o rząd wielkości wyższe niż zredukowanych tlenków grafenu [32]. GNP są także uważane za mniej toksyczne niż nanorurki węglowe [44]. Płatki grafenowe, nanoszone na podłoża w postaci kompozytów charakteryzuje znacznie wyższa adhezja niż warstw uzyskiwanych przez osadzanie grafenu jedno i wielowarstwowego [45]. Ponadto zwiększają one wytrzymałość mechaniczną kompozytu. Także możliwość nanoszenia ich na niepłaskie podłoża przedstawia GNP jako bardzo obiecujące wypełniacze, także do biomateriałów [19].

Mimo opisanych powyżej różnic we właściwościach materiałów grafenowych, w wielu publikacjach autorzy używają ogólnego określenia „grafen” opisując prace nad zupełnie odmiennymi materiałami z GFNs. Często weryfikacja stosowanej terminologii z metodyką badań, wskazuje, iż publikacja nie dotyczy zachowujących unikalne właściwości materiałów węglowych, takich jak monowarstwa grafenu czy nanopłatki grafenowe, ale nieprzewodzącego tlenku grafenu, lub zredukowanego, często w trudnych warunkach, tlenku grafenu [29], [37]. Zarówno w kontekście drukowania przewodzących ścieżek i warstw jak i wykorzystania ich do zastosowań biologicznych, bardzo istotne jest umiejętne rozróżnienie rodzajów materiałów grafenowych. Wiąże się to z potrzebą dokładnego zrozumienia czym jest i od czego zależy toksyczność i biokompatybilność tych nanomateriałów.

### **2.1.2. Toksyczność i biozgodność materiałów grafenowych**

Toksyczność, oznaczająca cechę substancji lub materiału powodującą zaburzenia funkcji lub śmierć komórek, wyklucza możliwość użycia nanomateriału w zastosowaniach biologicznych. Przeciwnością toksyczności jest biozgodność, rozumiana jako harmonia interakcji w obrębie materii żywej [46], a więc zdolność materiałów do interakcji z komórkami, tkankami i organizmami żywymi, bez powodowania szkodliwych, toksycznych efektów [7]. Określenie „biozgodność” stosowane jest zamiennie z określeniami „biokompatybilność” oraz „biotolerancja”. Cytokompatybilność natomiast związana jest bezpośrednio ze zdolnością do nietoksycznego oddziaływania materiałów w stosunku do komórek. W literaturze często opisane wyżej określenia stosowane są zamiennie.



Toksyczność nanomateriału zależy od wielu czynników m. in. jego kształtu oraz właściwości chemicznych powierzchni, ale także od zastosowanej dawki i czasu trwania interakcji między komórkami, a nanomateriałem [47]. Biokompatybilność lub toksyczność materiałów grafenowych zależy więc nie tylko od jego stężenia, ale tak jak napisano wcześniej, także od odmiany materiału grafenowego i metody jego produkcji [48].

Największy wpływ na oddziaływania nanocząstek grafenowych z komórkami oraz tkankami i organizmami żywymi ma bowiem rozmiar oraz wymiar poprzeczny cząstek grafenowych [48], [49]. Materiały należące do GFNs charakteryzują się małymi rozmiarami, w zakresie od dziesiątek do setek nanometrów. Grafenowe nanocząstki o najmniejszych wymiarach łatwiej, w porównaniu do większych nanocząstek, ulegają internalizacji przez komórki [21]. Oznacza to, że z powodzeniem przenikają one przez błonę komórkową, co zwiększa ryzyko biologiczne i intensyfikuje oddziaływania toksyczne. Procesowi temu sprzyja fakt, iż większość z nich posiada ostre i chropowate krawędzie. Z kolei większe cząstki grafenowe mają także większą powierzchnię właściwą, do której komórki w naturalny sposób adherują. Oznacza to, że przylegają do podłoża, dzięki czemu mogą się poprawnie namnażać [48]. Właśnie dlatego, możliwe jest wykorzystanie materiałów grafenowych jako podłoża wpływającego pozytywnie na wzrost komórek [16].

Należy jednak pamiętać, że toksyczność lub biokompatybilność grafenu zależy także od rodzaju komórek, z którymi materiał ten wchodzi w interakcję [48], [49]. W związku z jego potencjalnym zastosowaniem w nanomedycynie, skutki oddziaływań między grafenem a komórkami, tkankami lub narządami mają ogromne znaczenie [48].

Wielu autorów badało toksyczność materiałów grafenowych przy użyciu różnych komórek: nowotworowych [50], [51], fibroblastów [52], [53], preosteoblastów [54], komórek nabłonka płucnego itd. [48], [55]. W artykule przeglądowym Singh Zorowar stwierdził, że materiały z rodziny grafenowej, przede wszystkim tlenek grafenu, w bezpośrednim kontakcie mogą być toksyczne dla wielu rodzajów komórek ludzkich i zwierzęcych [31]. Cheng z zespołem [56] opisał potencjalną toksyczność nanomateriałów grafenowych względem tkanek i organów. Także Guo i wsp. potwierdzają, że niemodyfikowany grafen, w szczególności GO i rGO są cytotoksyczne lub genotoksyczne [21]. Jednakże autorzy ci opierali się na badaniach dotyczących tylko monowarstwowego grafenu, GO lub rGO. Nie przedstawili w pracy żadnych informacji związanych z nanopłatkami grafenowymi.

Z drugiej strony Abbasi i wsp. [25] przytaczają słowa profesora Chunhai Fan z Szanghaju, twierdzącego, iż grafen jest materiałem biokompatybilnym w stosunku do komórek, a podłoża grafenowe są dobrym materiałem do ich hodowli. Kim i wsp. potwierdzają te słowa,

informując wprost, iż grafen jest biokompatybilny [7]. Kenry i wsp. w artykule przeglądowym stwierdzili, że materiały grafenowe charakteryzują się biokompatybilnością, jako że komórki osadzone na tym materiale zachowują żywotność i w naturalny sposób przylegają do podłoża [16]. Ponadto autorzy stwierdzili, że grafen i materiały grafenowe mogą stymulować wzrost i proliferację różnych typów komórek m.in. komórek macierzystych i fibroblastów *in vitro* [15], [16]. W związku z tym GFNs, są postrzegane jako potencjalne materiały do wykonywania rusztowań i podłoża dla komórek macierzystych [57]. Wiele publikacji wskazuje, że wpływają one także na różnicowanie komórek macierzystych [16], [56], [58]–[60], między innymi w osteocyty i chondrocyty [19].

Chociaż różne materiały z GFNs były wielokrotnie badane pod względem biokompatybilności, badania te bardzo rzadko uwzględniają nanopłatki grafenowe.

Jaworski wraz z zespołem [61] studiowali wpływ nanopłatków grafenowych na dwa rodzaje komórek glejaka. Wykazali, że są one toksyczne względem komórek rakowych linii U118, U87. Komórki rakowe w naturalny sposób nie ulegają apoptozie – programowalnej, naturalnej śmierci komórek, przez co są tak niebezpieczne dla organizmu człowieka. Jednakże zastosowane przez Jaworskiego GNP powodowały apoptozę (99% komórek) i tylko w nieznacznym stopniu były przyczyną nekrozy (0,2% komórek).

Park i wsp. [55] badali oddziaływanie nanopłatków grafenu, zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. Z jednej strony wszczepili oni GNP do płuc myszy, z drugiej strony badali toksyczność GNP względem ludzkich komórek nabłonka oskrzeli BEAS-2B. Wykazali, że w obu przypadkach GNP były toksyczne. Redukowały żywotność komórek ludzkich, początkowały apoptozę i uszkodzenie mitochondriów. Ponadto powodowały odpowiedź zapalną w płucach myszy.

Zanni z zespołem natomiast badali wpływ GNP *in vivo* na żywy organizm nicienia *Caenorhabditis elegans*. Testy długości życia tego organizmu oraz zdolności do reprodukcji wykazały iż GNP są nietoksyczne [62], [63].

Potencjalna toksyczność nanocząstek, także nanocząstek materiałów grafenowych, związana jest z ich interakcją z błoną komórkową, która skutkuje fizycznym uszkodzeniem membrany lipidowej [47]. Jednakże na oddziaływanie między węglową powierzchnią grafenu a komórkami można wpływać m.in. poprzez proces funkcjonalizacji grafenu [20]. Zarówno poprzez funkcjonalizację jak i powlekanie nanomateriałów grafenowych innym materiałem, możliwe jest zminimalizowanie ryzyka związanego z ich toksycznością [47], [56].

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż zawieszenie materiału grafenowego w różnego rodzaju materiałach, takich jak biopolimery, czy surowica bydłęca zwiększyć może jego biogodność.

Grafen w czystej postaci charakteryzuje się dużą hydrofobowością, jednak defekty struktury występujące na jego powierzchni umożliwiają wprowadzanie różnego rodzaju modyfikacji chemicznych. Najczęściej zmiany polegają na wprowadzeniu określonych grup funkcyjnych zawierających atom tlenu, z utworzeniem wiązań kowalencyjnych. Wykorzystane są również metody modyfikacji, w których oddziaływania między grafenem a modyfikującą go substancją opierają się na siłach van der Waalsa oraz siłach elektrostatycznych lub wiązaniach wodorowych i koordynacyjnych, a także na oddziaływaniach warstwowych typu  $\pi$ - $\pi$  [64]. W przypadku wiązań kowalencyjnych przemiany dotyczą najczęściej modyfikacji powierzchni grafenu z użyciem różnego rodzaju polimerów, m.in.: glikolu polietylenowego (PEG), kwasu poliakrylowego (PAA), polilizyny, polietylenoiminy [47], [64]–[69]. Naturalne biopolimery charakteryzują się biokompatybilnością, co wpływa na obniżenie toksyczności połączonego z nimi grafenu [70], [71].

Syama i wsp. informują też, iż materiały grafenowe są mniej toksyczne w obecności używanego w hodowlach komórkowych serum płodowego z cieląt FBS (ang. fetal bovine serum) [47]. Yang i wsp. przeprowadzili badania cytozgodności *in vivo* przy użyciu płatków grafenowych zawieszonych w biokompatybilnym polimerze PEG. GNP wszczepiane były do organizmu myszy. Biochemia krwi, badania hematologiczne i histologiczne wykazały iż długotrwałe oddziaływanie GNP nie powodowało żadnej toksyczności [72]. Wojtoniszok z zespołem badali GO i rGO zawieszane w dwóch materiałach: PEG oraz Pluronic (PLR ang. polyethylene glycol–polypropylene glycol–polyethylene glycol) [73]. Porównanie oddziaływań GNP pokrytych tymi materiałami wykazało iż GNP w połączeniu z PEGiem wykazuje biokompatybilność względem mysich fibroblastów linii L929.

Biogodność zależna jest także od formy użycia nanomateriału w hodowli komórkowej oraz jego interakcji z komórkami. Nawet jeśli nanocząstki grafenowe zbadane *in vitro* lub wszczepione do organizmu żywego *in vivo* wykazują toksyczność, to zastosowane w postaci warstwy materiału na powierzchni, charakteryzują się często biogodnością [56], [74]. Dlatego materiały grafenowe stosowane jako podłoże do hodowli komórkowych, pokrycie implantów czy membran nie powodują toksyczności, lub wywołują ją w minimalnym stopniu [33], [56]

Kumar i wsp. w artykule przeglądowym [33] opisują wiele badań, w których materiały GO i rGO, wykorzystane w postaci warstwy nie powodowały toksyczności względem różnych typów komórek. Wymieniają oni m.in. badania dowodzące biokompatybilności warstw

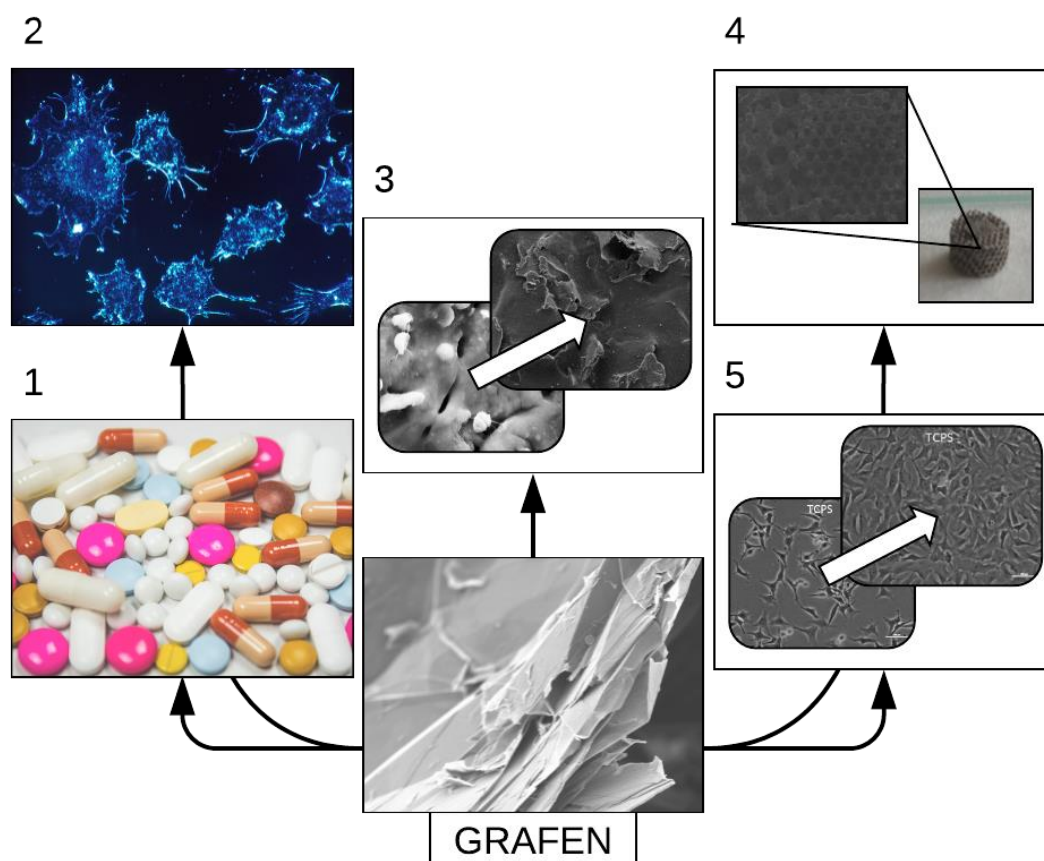
grafenowych względem mysich i ludzkich fibroblastów [15], [75], mysich i ludzkich komórek nerwowych [76], [77], oraz szczurzych i ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych [78]–[80].

Podsumowując należy stwierdzić, że ocena toksyczności grafenu jest bardzo trudnym zadaniem. W porównaniu do innych nanocząsteczek, gdzie jedynymi kryteriami jest ich koncentracja i czas oddziaływania, grafen, jako ogólnie pojęty materiał węglowy, do określenia biogodności wymaga zbadania znacznie większej liczby parametrów, w tym wielkości cząstek, ich kształtu, stanu aglomeracji [20]. Z tego powodu nie znaleziono jeszcze jednoznacznej odpowiedzi na pytanie o toksyczność materiałów grafenowych, a w literaturze pojawiają się sprzeczne opinie na ten temat [47], [81]. Część naukowców uważa, że grafen jest biogodny, natomiast inni, że może wykazywać toksyczność. Dyskusje mogą być spowodowane różnymi czynnikami, począwszy od odmienności w interakcji z grafenem poszczególnych typów komórkowych, poprzez sposób zastosowania nanomateriału w hodowli komórkowej, aż po rodzaj zastosowanych w badaniach materiałów grafenowych, różniących się właściwościami fizykochemicznymi [22]. Niezależnie od niespójnych opinii związanych z tematem biogodności grafenu, bezdyskusyjny jest fakt, iż materiał ten znajduje coraz powszechniejsze zastosowanie w aplikacjach medycznych oraz w inżynierii biomedycznej [13]. Na podstawie literatury możemy wywnioskować, iż wykorzystanie najnowszych osiągnięć, w zakresie badań nad materiałami grafenowymi, może przyczynić się do znacznego postępu w wielu dziedzinach nauk medycznych i farmaceutycznych.

### **2.1.3. Zastosowanie GNP w medycynie**

Obecnie za najważniejsze kierunki badań nad zastosowaniem materiałów grafenowych w medycynie uważa się przedstawione na rysunku 2:

- wykorzystanie GFNs jako nośnika dla związków aktywnych biologicznie m.in. do dostarczania do organizmu leków, enzymów, przeciwciał, itd. lub genów oraz leczenia chorób nowotworowych
- profilaktyka i leczenie zakażeń bakteryjnych
- wykorzystanie GFNs w inżynierii tkankowej jako materiały podłożowe lub rusztowania komórkowe zwane skafoldami do hodowli komórkowych oraz do stymulacji proliferacji i różnicowania komórek macierzystych



*Rysunek 2. Zastosowania materiałów grafenowych w medycynie 1) Dostarczanie leków i genów, 2) Leczenie chorób nowotworowych 3) Profilaktyka i leczenie zakażeń bakteryjnych) 4) Zastosowanie jako podłoża i skafoldy w hodowlach komórkowych 5) Stymulacja proliferacji komórek macierzystych*

Szereg unikalnych właściwości fizykochemicznych wynikających z płaskiej struktury grafenu w połączeniu z jego biokompatybilnością sprawia, iż materiał ten może być z powodzeniem stosowany jako nośnik różnego rodzaju mikro- i makrocząsteczek do ściśle określonych tkanek organizmu. Przeprowadzone w wielu ośrodkach naukowych analizy wykazały możliwość stosunkowo łatwego dołączania do cząsteczek grafenu różnych związków aktywnych biologicznie, w tym m.in. leków, enzymów, przeciwciał, składników odżywczych, związków mineralnych a także genów [64], [82]. Możliwość wykorzystania nanomateriałów grafenowych jako platform transportujących różnego rodzaju związki, stwarza możliwość szerokiego zastosowania grafenu w obszarze badań, diagnostyki oraz leczenia wielu jednostek chorobowych.

Szacuje się, iż tzw. powierzchnia czynna grafenu jest przeciętnie cztery razy większa niż innych znanych układów transportujących cząsteczki leków. Dzięki temu grafen może przenieść substancję aktywną w ilości sięgającej dwukrotności jego masy cząsteczkowej [64]. Ponadto duża powierzchnia czynna grafenu może być wykorzystana podczas tzw. terapii

skojarzonej, polegającej na jednoczesnym podawaniu dwóch lub więcej środków farmakologicznych [83]. Ma to szczególne znaczenie w przypadku leczenia chorób wymagających wdrożenia złożonej, wielokierunkowej terapii. Wówczas zastosowanie wielofunkcyjnej platformy grafenowej, będącej nośnikiem jednocześnie wielu substancji czynnych, o różnych właściwościach, może stanowić podstawę skuteczności zastosowanego leczenia. Ponadto działanie grafenu ograniczone jest do miejsca jego podania i nie uszkadza innych tkanek, co ma ogromne znaczenie z punktu widzenia bezpieczeństwa wdrożonego leczenia [61].

Jednym z najważniejszych i najbardziej obiecujących obszarów badań z zastosowaniem grafenu jako nośnika leków jest leczenie chorób nowotworowych. Grafen bowiem nie tylko może być nośnikiem substancji, w tym leków o już udowodnionej skuteczności terapeutycznej, ale także sam uśmierca komórki nowotworowe.

Yang i wsp. oraz Zhou i wsp. przedstawili wyniki udanej terapii antynowotworowej z użyciem doksorubicyny, należącej do grupy antybiotyków antracyklinowych, naniesionej na tlenek grafenu [84]. [85]. Zhang i wsp. [86] otrzymali tlenek grafenu funkcjonalizowany kwasem foliowym (GO-FA), który posłużył jako nośnik dla dwóch leków przeciwnowotworowych – doksorubicyny (DOX) i kamptotecyny (CPT). Jak wykazano, jednoczesne podanie obu chemioterapeutyków było bardziej efektywne w porównaniu z zastosowaniem GO-FA-DOX lub GO-FA-CPT oddzielnie. Chen i wsp. [87] z dobrymi rezultatami stosowali układ tlenku grafenu sfunkcjonalizowany kwasem poliakrylowym (PAA-GO) z przyłączoną karmustyną, związkiem z grupy chemioterapeutyków stosowanym przy leczeniu pacjentów z nowotworami mózgu. Zachęcające wyniki dostarczają badania nad układami tlenek grafenu–chitozan (GO-CS) wzbogaconymi o foliany (dla kierunkowej dostawy leków przeciwnowotworowych) [88]. Liu i wsp. [69] poddali ocenie także układ tlenku grafenu sfunkcjonalizowanego glikolem polietylenowym (PEG-GO), do którego przyłączono działający przeciwnowotworowo zmodyfikowany związek kamptotecyny. Jak wykazali, utworzony w ten sposób kompleks był nawet 1000 razy bardziej aktywny w porównaniu z niezwiązaną z materiałem grafenowym postacią kamptotecyny.

Chociaż grafen nie wykazuje istotnej cytotoksyczności względem komórek zdrowych, wyjaśnienia wymaga zjawisko bezpośredniej toksycznej aktywności materiałów grafenowych względem komórek zmienionych nowotworowo. Obecnie sugeruje się trzy mechanizmy bezpośredniego niszczenia komórek nowotworowych oraz bakterii, przede wszystkim przez nanopłatki grafenowe oraz tlenek grafenu. Po pierwsze uważa się, że komórki ulegające zniszczeniu mogą być przecinane przez ostre krawędzie płatków grafenu. Zgodnie z drugim

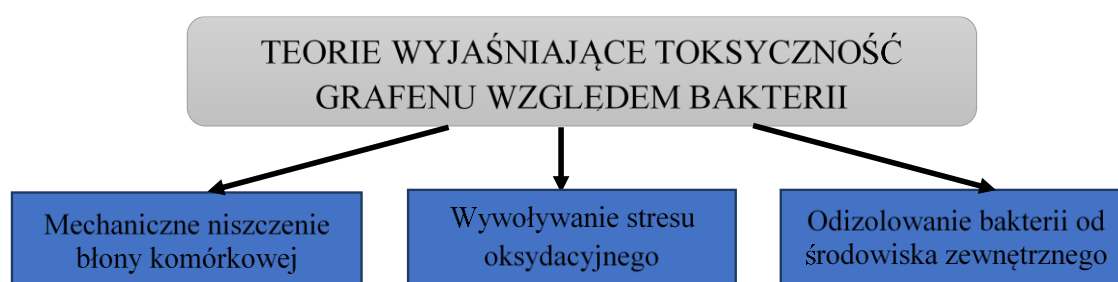
proponowanym mechanizmem, płatki grafenowe owijają się wokół komórek, odcinając dostęp tlenu i składników odżywczych, co prowadzi do ich śmierci. Trzecia teoria, uwzględniająca wytwarzane w obecności płatków grafenu aktywne formy tlenu, zakłada niszczenie komórek w mechanizmie stresu oksydacyjnego, a więc stanu braku równowagi pomiędzy działaniem reaktywnych form tlenu, a biologiczną zdolnością do szybkiej naprawy wyrządzonych w komórce uszkodzeń.

W związku z odkryciem opisanych wyżej przeciwbakteryjnych właściwości GFNs [12], [25] oraz coraz częściej potwierdzanym faktem, iż materiały te wpływają na morfologię, metabolizm i żywotność komórek drobnoustrojów [56], interakcje GFNs - bakterie są coraz częściej badany zagadnieniem. Wielu naukowców sugeruje, iż materiały grafenowe, ze względu na toksyczność bakteryjną, mogą w przyszłości znaleźć szerokie zastosowanie w produkcji powłok antybakteryjnych oraz produktów przeciwdrobnoustrojowych [12], [13]. Niska cytotoksyczność materiałów grafenowych w stosunku do komórek ssaków [89] dodatkowo zwiększyła zainteresowanie tym materiałem w kontekście właściwości bakteriobójczych oraz zastosowaniu w hamowaniu mechanizmu przyłączania się bakterii do podłoża [1].

Jedne z pierwszych testów antybakteryjności materiałów grafenowych przeprowadzono w 2010 r. Wykazano wtedy, że nanomateriały bazujące na grafenie, w szczególności na GO mogą skutecznie hamować wzrost bakterii *E. coli*, z całkowitą utratą ich żywotności (98,5%) [90]. Akhavan i wsp. [91] także zbadali toksyczność GO oraz rGO względem bakterii z rodziny gram-ujemnych: *E. coli* oraz gram-dodatnich: *S. aureus*. Obie pochodne grafenu wykazały się właściwościami antybakteryjnymi. Zaobserwowano bezpośrednią interakcję między ostrymi krawędziami nanocząstek, a błoną ścianą komórkowej bakterii [12], [13], [91]. Gurunathan i wsp. opisują antybakteryjne działanie materiałów GO i rGO względem bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. Wykazali zależne od stężenia zmniejszenie żywotności komórek [47], [92]. Barbolina i wsp. natomiast zakwestionowali właściwości antybakteryjne materiałów grafenowych. Na podstawie badań przeprowadzonych na GO zasugerowali, że to zanieczyszczenie materiału determinuje jego aktywność przeciwbakteryjną. Testy wykazały, że GO ani nie hamowało, ani nie stymulowało wzrostu bakterii, zarówno dla bakterii *E. coli*, jak i *S. aureus*, po tym gdy materiał został chemicznie oczyszczony z pozostałości kwasowych. Wedle autorów nieoczyszczony GO zadziałał antybakteryjnie właśnie z powodu występowania zanieczyszczeń kwasowych będących pozostałością po wytwarzaniu materiału grafenowego [93].

Aktualnie uważa się, że mechanizmy oddziaływania materiałów grafenowych na komórki bakteryjne zależne są od właściwości materiału takich jak rozmiar, powierzchnia właściwa, funkcjonalizacja, i właściwości elektryczne [1], [14]. Na interakcję z bakteriami wpływa więc również rodzaj badanego materiału grafenowego [1]. Inne czynniki mające wpływ na toksyczność to stężenie nanomateriału [47], [92] oraz jego czystość [93]. W związku z tym badacze opisują różne oddziaływania grafenu względem bakterii, a mechanizm tych oddziaływań nie jest jeszcze do końca wyjaśniony.

Trwające badania poskutkowały powstaniem trzech różnych teorii, pokazanych na rysunku 3, mających na celu wyjaśnienie podstawowych czynników będących przyczyną antybakteryjności materiałów grafenowych.



Rysunek 3. Teorie wyjaśniające toksyczność grafenu względem bakterii

Toksyczność nanocząstek z rodziny GFNs względem bakterii może być związana z mechanicznym niszczeniem błony komórkowej, wywołaniem stresu oksydacyjnego, odizolowania bakterii od środowiska zewnętrznego. Mechanizmy te mogą działać zarówno oddzielnie jak i w połączeniu, a ich skutkiem jest działanie bakteriobójcze, związane z bezpośrednim zabijaniem komórek bakteryjnych, lub bakteriostatyczne, polegające na nieinwazyjnym hamowaniu wzrostu bakterii i biofilmu bakteryjnego [1], [14].

Fizyczne oddziaływanie grafenu z bakteryjną błoną komórkową wywiera ogromny wpływ na interakcje tego materiału z bakteriami [47]. Jeden z czynników wywołujących mechanizm toksyczności jest wyjaśniany bezpośrednim oddziaływaniem ostrych krawędzi nanocząstek grafenowych z błoną komórkową bakterii [13]. Przecinają one błony komórkowe bakterii, powodując przez to jej poważne uszkodzenia, skutkujące wyciekami materiału wewnątrzkomórkowego i ostatecznie śmiercią komórki [1], [47].

Zhou i wsp. [56], [94] wykorzystali transmisyjny mikroskop elektronowy (TEM, ang. transmission electron microscope) do potwierdzenia trójstopniowego mechanizmu uszkodzania błony komórkowej bakterii *E. coli* w kontakcie z tlenkiem grafenu. Na początku GO nie wywoływał toksycznych reakcji. W trakcie obserwacji zauważono jednak, iż z czasem błony



bakteryjne częściowo utraciły integralność, a powierzchniowa gęstość fosfolipidów, stanowiących istotny składnik błony komórkowej, uległa zmniejszeniu. Dalsze oddziaływanie grafenu spowodowało poważne uszkodzenie błony komórkowej bakterii, a z większości komórek nastąpił wyciek zawartości komórkowej.

Kolejnym mechanizmem jest stres oksydacyjny, który powoduje utlenianie składników komórkowych, takich jak lipidy, kwasy nukleinowe oraz białka, powodując generowanie tzw. reaktywnych form tlenu ROS (ang. reactive oxygen species). Mechanizm ten może ostatecznie doprowadzić do zniszczenia błony komórkowej i zahamowania wzrostu komórkowego bakterii [47], [95], [96]. Wykonano liczne badania dowodzące, iż to właśnie stres oksydacyjny i związana z nim produkcja ROS w dużej mierze przyczyniają się do cytotoksyczności bakteryjnej grafenu [1], [14], [47]. Gurantow i wsp. udało się wykazać, że GO zachowuje się toksycznie względem bakterii *P. aeruginosa*, co jest związane z generowaniem stresu oksydacyjnego [56], [92]. Zredukowany tlenek grafenu rGO wykazał zmniejszone hamowanie żywotności bakterii. Mimo to materiał ten nadal wywoływał stres oksydacyjny, wpływający na aktywność mikroorganizmów.

Trzecim sugerowanym mechanizmem toksycznego oddziaływania na mikroorganizmy przy użyciu materiałów grafenowych jest odcięcie bakterii od środowiska zewnętrznego. Mechanizm ten określany jest jako „pułapka izolacyjna” [13], [14]. W tym wypadku materiał grafenowy, w szczególności aglomeraty, otaczają bakterie, izolując je od pożywki wzrostowej i tlenu [97]. W ten sposób komórki nie mają dostępności do składników odżywczych niezbędnych do ich wzrostu. Prowadzi to do śmierci komórek [98].

Jednakże interakcja bakterii z grafenem jest silnie zależna od orientacji powierzchni materiału grafenowego względem bakterii. W związku z tym, sposób w jaki grafen jest aplikowany w hodowlach komórkowych, może znacząco wpływać na specyfikę jego antibakteryjnego oddziaływania [1]. Gdy nanocząstki grafenowe są unieruchamiane na powierzchni podłożowej w postaci warstwy, ich interakcja z bakteriami znacznie różni się od oddziaływań między zawieszonymi w hodowli komórkowej nanocząstkami oraz bakteriami [14], [95]. Niszczenie błony komórkowej przez jej przebijanie lub rozcinanie w kontakcie z materiałem grafenowym jest przede wszystkim spowodowane przez ortogonalne oddziaływanie z krawędziami nanocząstek [94]. Warstwy i powłoki grafenowe zmniejszają ortogonalne oddziaływania komórek z krawędziami, dzięki czemu nie powodują zniszczenia komórek bakteryjnych [14]. Mimo to, przeprowadzone przez Hui i wsp. badania wykazały, iż interakcja z krawędziami nanocząstek skutkująca bezpośrednią penetracją błony komórkowej, nie jest konieczna dla antibakteryjnego działania materiału grafenowego [99]. Gdy tlenek

grafenu zastosowano w postaci warstwy, a komórki tylko nieznacznie były narażone na kontakt z krawędziami nanocząstek, wzrost bakterii na podłożu wciąż był hamowany. Wyniki tych badań potwierdzili Mangadlao i wsp. [100]. Udowodnili, że skuteczność przeciwbakteryjna grafenu nie zależy od jego ostrych krawędzi, ale od kontaktu, który ma miejsce między płaszczyzną podstawową GO a komórkami *E. coli*. Stwierdzili, że 89-cio procentową skuteczność zabijania bakterii *E. coli* można uzyskać przy użyciu warstwy GO wytworzonej metodą ograniczającą zakres ekspozycji ostrych krawędzi [1].

Na szczególną uwagę zasługują także badania wykonane przez Li i wsp. [101]. Przetestowali oni interakcję bakterii *S. aureus* i *E. coli* osadzonych na warstwach z GO oraz rGO wyprodukowanych metodą osadzania z fazy gazowej (CVD ang. chemical vapor deposition), na trzech podłożach o różnych właściwościach elektrycznych. Zastosowali przewodzące podłoże miedziane, półprzewodnikowe podłoże germanowe oraz nieprzewodzące podłoże ceramiczne. Wykazali, że toksyczne względem bakterii działanie powierzchni pokrytych grafenem jest związane z elektronicznymi właściwościami podłoża [101]. Warstwy grafenowe umieszczone na Cu i Ge hamowały wzrost bakterii, podczas gdy na podłożach SiO<sub>2</sub> zaobserwowano proliferację bakterii. Wedle autorów materiał grafenowy przechwytuje elektrony z wnętrza komórek bakteryjnych, przerywając w ten sposób transfer elektronów łańcucha oddechowego błony komórkowej, wywołując tym samym stres oksydacyjny [1]. Autorzy zasugerowali, iż to transfer elektronów jest podstawową przyczyną toksyczności wobec bakterii. SiO<sub>2</sub> będący izolatorem spowodował zatrzymanie transferu elektronów, w związku z czym wzrost bakterii na tym podłożu nie został zahamowany. Można więc stwierdzić, że materiały grafenowe wykazujące przewodnictwo elektryczne mogą skutecznie działać jako przewodzące mostki nad izolującą warstwą lipidową błony komórkowej. Pozwala to na przekazanie energii z wnętrza komórki bakteryjnej do otoczenia zewnętrznego [47] i unieszkodliwienie bakterii [1], [47], [101].

Podsumowując, odpowiedzią na ogromne zapotrzebowanie na opracowywanie nowych leków przeciwbakteryjnych i terapii w walce z infekcjami bakteryjnymi, które stało się ostatnio jednym z głównych nurtów badań naukowców walczących z infekcjami i zakażeniami szpitalnymi [1] może być zastosowanie warstw i powłok wykonanych z przewodzących materiałów grafenowych, takich jak nanopłatki grafenowe. Badania te mają ogromne znaczenie dla medycyny, tym bardziej, iż istnieją doniesienia literaturowe wykazujące, że przewodzące warstwy grafenowe, chociaż szkodliwe względem bakterii, nie są toksyczne względem komórek ludzkich. Jest to prawdopodobnie związane z różnicami w budowie obu rodzajów komórek oraz brakiem jądra komórkowego w organizmach bakteryjnych [102].

W związku z tym, dzięki potencjalnej biozgodności grafenu oraz warstw grafenowych możliwe jest także jego wykorzystanie w inżynierii tkankowej. Co więcej, unikalne, opisane w rozdziale 1.1., właściwości grafenu czynią z niego materiał o bardzo dużym potencjale, pod względem zastosowań w tym obszarze inżynierii biomedycznej.

Termin inżynieria tkankowa narodził się w 1988 roku w trakcie spotkania amerykańskiej Narodowej Fundacji Nauki. W rozumieniu uczestników obejmował „zastosowanie podstaw i metod inżynierii oraz nauk biologicznych w celu zrozumienia zależności między strukturą a funkcją w prawidłowej, a także patologicznej tkance ssaczey oraz opracowanie biologicznych substytutów umożliwiających naprawę lub regenerację tkanki albo organu, a w efekcie – odzyskanie ich funkcjonalności”. W 1993 Langer i Vacanti podsumowali pierwsze dokonania na tym polu i zdefiniowali inżynierię tkankową jako „interdyscyplinarną dziedzinę, wykorzystującą podstawy inżynierii i nauk biologicznych w celu pozyskania biologicznych zamienników, które przywracają, utrzymują lub poprawiają funkcjonowanie organu” [103]–[105]. Inżynieria tkankowa obejmuje manipulacje komórkami macierzystymi oraz somatycznymi. Dziedzina ta obejmuje także konstruowanie odpowiednich rusztowań podtrzymujących komórki, wpływanie na strukturę i warunki wzrostu tkanek oraz utrzymanie sprzyjających parametrów fizykochemicznych otoczenia. W połączeniu z metodami wykorzystującymi komórki macierzyste, inżynieria tkankowa pozostaje w obszarze zainteresowania tak zwanej medycyny regeneracyjnej.

Ze względu na doskonałe właściwości mechaniczne, tzn. dużą wytrzymałość i elastyczność, grafen znalazł zastosowanie m.in. jako materiał wzmacniający hydrożele, biodegradowalne folie, nanowłókna i inne materiały tworzące szkielety i rusztowania w inżynierii tkankowej [58], [64], [110], [111], [76], [78], [82], [102], [106]–[109].

Skafoldy hydrożelowe z dodatkiem tlenu grafenu oraz chitozanu (GO-CS) wykazywały znacząca poprawę adhezji komórek, ich różnicowania, proliferacji i odkładania fosforanu wapnia przez mysie komórki osteoblastów PPR- MC3T3-E1. Omawiane rusztowania charakteryzowały się lepszymi właściwościami mechanicznymi i niższym tempem degradacji, niż rusztowania bez materiału grafenowego [106].

Wiele publikacji naukowych wykazuje przydatność platform pokrytych warstwą grafenową do proliferacji i ukierunkowywania wzrostu (różnicowania) indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC), ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych (hMSC), ludzkich nerwowych komórek macierzystych (hNSC) oraz

preosteoblastów w osteoblasty [76], [112], [113]. Szybkość osteogennego różnicowania hMSC, a więc różnicowania w celu uzyskania komórek kostnych, na podłożu grafenowym była porównywalna do różnicowania się komórek w obecności naturalnych białek kości (BMP-2) [58]. Wykazano lepszą proliferację i silniejszą polaryzację hMSC w obecności fluorowanego grafenu, dzięki czemu możliwe było sterowanie różnicowaniem komórek w celu wytworzenia neuronów [108].

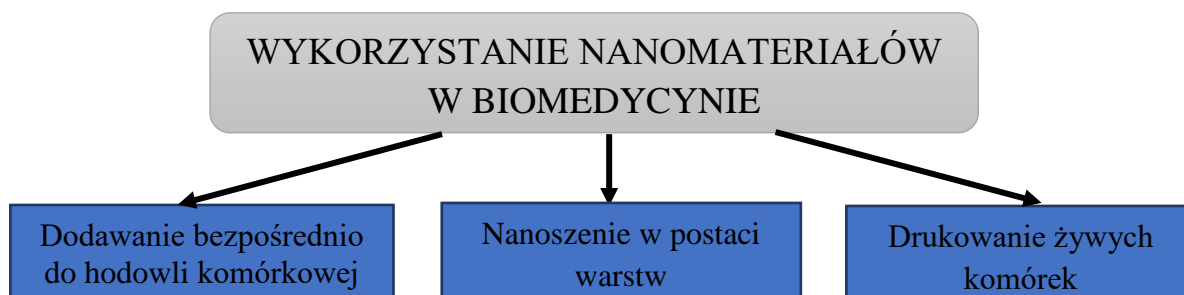
Fan i wsp. poddali ocenie rusztowanie złożone z GO-CS [109]. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość zastosowania takiego rozwiązania do namnażania, transplantacji oraz różnicowania komórek macierzystych w komórki mięśniowe i kostne, a także w terapii regeneracji chrząstki stawowej [78]. Lu i wsp. wykazali pozytywny wpływ grafenu na gojenie się ran u myszy i królików. Jest to związane z wykazanych przez nich faktem, iż obecność wolnych elektronów w grafenie nie wpływa negatywnie na namnażanie się komórek eukariotycznych (posiadających jądro komórkowe), ale hamuje namnażanie komórek prokariotycznych (bez jądra komórkowego), takich jak różne rodzaje bakterii, w tym gronkowce. Zapobiega to rozwojowi drobnoustrojów [102]. Równie korzystne wyniki w leczeniu ran otrzymali m.in. Jayakumar i wsp, którzy oceniali właściwości chitozanowego hydrożelu wzbogaconego o tlenek grafenu [111].

Podsumowując należy stwierdzić, iż możliwość zastosowania najnowszych osiągnięć inżynierii materiałowej na polu inżynierii tkankowej cieszy się coraz większym zainteresowaniem ze strony środowisk naukowych, a dostępne doniesienia literaturowe potwierdzają fakt, iż grafen i materiały grafenowe stanowią doskonałe podłoża do zastosowań w tym obszarze.

Jednakże, aby możliwe było zastosowanie grafenu w opisanych wyżej aplikacjach medycznych, szczególnie w inżynierii tkankowej, niezbędne jest opracowanie zarówno specjalnych technik i metod jego nanoszenia, jak i materiałów, zwanych heterofazowymi atramentami, w których GNP mogą być przenoszone na różnego rodzaju medyczne podłoża.

## 2.2. Atramenty heterofazowe i hydrożele

W inżynierii tkankowej i biomedycynie wydzielić można kilka różnych metod, dotyczących sposobu wykorzystania nanomateriałów w prowadzeniu hodowli komórkowych. Metody te zobrazowane zostały na rysunku 4.



Rysunek 4. Metody wykorzystywania nanomateriałów w biomedycynie

Pierwsza z metod zakłada dodawanie nanomateriałów w postaci nanocząstek, bezpośrednio do prowadzonej hodowli komórkowej [114]. Inne podejście polega na nanoszeniu nanomateriałów w postaci biogodnych atramentów na podłoża, w celu utworzenia warstw lub wzorów. Następnie komórki wraz z pożywką nakładane są na pokrytą nanomateriałem powierzchnię [115], w celu prowadzenia hodowli komórkowej *in vitro* [114]. Coraz większym zainteresowaniem cieszy się także metoda polegająca na nanoszeniu metodą druku żywych komórek (ang. bioprinting), zawartych wraz z pożywką, substancjami odżywczymi i nanomateriałem w specjalnych atramentach zwanych także hydrożelami, oraz ich osadzaniu na różnego rodzaju podłożach i rusztowaniach komórkowych – skafoldach [116] [115].

Jednakże to warstwy i pokrycia, które umożliwiają adherowanie i proliferację komórek są jednym z najistotniejszych zagadnień bioinżynierii. Pokrywanie implantów czy skafoldów biogodnymi materiałami wpływającymi na zachowanie komórek ma ogromne znaczenie dla inżynierii tkankowej [56]. Do nanoszenia nanomateriałów w postaci warstw, jak i drukowania komórek, wykorzystywane są kompozytowe materiały, zwane atramentami biologicznymi, bioatramentami lub hydrożelami [117]. Technologia wytwarzania atramentów biologicznych jest ogromnym wyzwaniem [118], ponieważ, aby mogły one być stosowane w biomedycynie, muszą jednocześnie spełniać, opisane w rozdziale 5, wymogi dwóch różnych dziedzin nauki: inżynierijno-techniczne oraz biologiczne [119]. Po pierwsze kluczowe jest zapewnienie odpowiednich właściwości atramentu od strony technicznej. Szczególnie istotne są wymagania dotyczące właściwości płynów, a więc lepkość i napięcia powierzchniowe atramentu właściwe dla stosowanej techniki wytwarzania warstw [119]. Ponadto istotne są także jednorodność i stabilność atramentu. Wymagania te mogą zostać spełnione tylko przy właściwym doborze

kompozycji i technologii wytwarzania atramentu. Ze względu na komórki oraz zastosowanie warstw w inżynierii biomedycznej i aplikacjach medycznych, atrament musi być także cytozgodny, tzn. nie powodujący zmian w integralności błony komórkowej, nie blokujący aktywności enzymów związanych z metabolizmem komórki oraz nie hamujący proliferacji. Biozgodne atramenty stosowane do wytwarzania warstw służących jako podłoża do hodowli komórkowych to zazwyczaj atramenty bazujące na różnych odmianach węgla, także na materiałach grafenowych, które spełniają wymóg biozgodności.

### **2.2.1. Grafenowe atramenty heterofazowe do technik elektroniki drukowanej**

Atramenty grafenowe, które spełniają wspomniane wyżej właściwości techniczne to przede wszystkim kompozyty drukowane metodami elektroniki drukowanej, przeznaczone do zastosowań elektronicznych. W literaturze znaleźć można opis badań związanych z takimi heterofazowymi zawiesinami bazującymi na różnych formach grafenu. Jednakże znaczna większość prac dotyczy drukowania atramentów zawierających tlenek grafenu lub jego chemiczne pochodne, takie jak redukowany tlenek grafenu [34], [36], [120]–[125]. Niewiele publikacji opisuje zastosowanie atramentów heterofazowych z nanopłatkami grafenowymi [37], [40] lub płatkami grafenowymi modyfikowanymi innymi materiałami już na poziomie ich wytwarzania [39], [41], [42].

Torrise i wsp. [37] wykorzystali w atramentach nanopłatki grafenowe wytworzone w procesie eksfoliacji. W trakcie eksfoliacji zawiesił on płatki grafenu w N-metylopirolidonie (NMP). W celu otrzymania właściwej reologii powstałą zawiesinę (GNP/NMP) zmieszał z różną zawartością glikolu etylenowego (od 20 do 80%).

W innej publikacji [40] autorzy także wykorzystali płatki grafenowe z bezpośredniej eksfoliacji, wykonanej w dimetyloformamidzie (DMF). Bazą atramentu były GNP zawieszane w terpineolu z dodatkiem EC. Zastosowanym rozpuszczalnikiem zmniejszającym lepkość zawiesiny był alkohol etylowy. Autorom udało się uzyskać stabilną zawiesinę grafenową, którą z powodzeniem zastosowali jako przewodzący atrament grafenowy.

W ostatnich czasach, często już na poziomie wytwarzania proszku wykonywana jest modyfikacja, której zadaniem jest ułatwienie dyspersji grafenu w rozpuszczalnikach. Zarówno Secor et al. [41] jak i Li et al. [42] do wytwarzania atramentów wykorzystali GNP zmieszane z EC, dodaną w trakcie eksfoliacji. Bazując na tych wynikach Secor et al. w 2017 roku opisał badania dotyczące proszku GNP z dodatkiem nitrocelulozy, dodanej także w trakcie eksfoliacji [39].

Secor et al. [41], dzięki zastosowaniu etylocelulozy, zaobserwował poprawę w dyspersji płatków w różnych rozpuszczalnikach. W artykule materiał GNP/EC zdyspergowano z mieszaniną cyklohexanonu i terpineolu. Po wytworzeniu proszku GNP/EC w drugim przypadku [42], wykonano dwa atramenty bazujące na mieszaninie terpineolu i alkoholu etylenowego. Proszek został przy pomocy ultradźwięków zawieszony w rozpuszczalnikach. Wytworzono atramenty do blade coatingu, z dodatkiem 20% terpineolu. Ich rozcieńczenie, przy użyciu alkoholu etylowego, pozwoliło im otrzymać atrament do spin coatingu.

Secor 2017 [39] zaprezentował natomiast proszek grafenowo/nitrocelulozowy, przy użyciu którego stworzył atramenty o szerokiej gamie lepkości – do bardzo różnych technik elektroniki drukowanej, takich jak powlekanie natryskowe, druk strumieniowy i blade coating. Dla druku strumieniowego zastosował proporcje 75:15:10 - mleczan etylu/octan oktylu/glikol etylenowy. Zmieniony skład: 80:20 – aceton/mleczan etylu, zastosowany został w atramencie do powlekania natryskowego.

Analiza literaturowa wskazuje iż heterofazowe atramenty bazujące na GNP nie zostały jeszcze dogłębnie przebadane. Jednakże pojawiające się publikacje, związane z tym tematem, wskazują na zastosowanie przy wytwarzaniu atramentów z GNP materiałów takich jak glikol etylenowy, terpineol, etyloceluloza, n-metylopirolidon, dimetyloformamid. Niestety, materiały te, powszechnie stosowane do wytwarzania atramentów heterofazowych, są szkodliwe względem komórek. Chociaż są stosowane przy wytwarzaniu grafenowych atramentów do elektroniki drukowanej, nie mogą być użyte przy wytwarzaniu biozgodnych, grafenowych atramentów heterofazowych do aplikacji biomedycznych.

### **2.2.2. Heterofazowe atramenty biologiczne na bazie grafenu**

Do aplikacji biomedycznych stosowane są biokompatybilne zawiesiny zawierające komórki, służące do drukowania komórek na podłoża i skafoldy, wykorzystujące często efekt żelowania, zwiększający żywotność komórek, powszechnie nazywane hydrożelami lub bioatramentami [117], [119]. Materiały te zawierają pożywkę komórkową suplementowaną białkami lub cukrami (np. kolagen, fibryna, polisacharydy) [119]. Inne komponenty dobierane są w zależności od docelowych właściwości fizycznych i reologicznych hydrożelu.

Wiele hydrożeli powstaje przy wykorzystaniu tylko medium podstawowego (np. Dulbecco's minimum essential med DMEM) i surowicy bydlęcej (FBS) [126]. Parsa et al. [127] wytworzył hydrożel poprzez połączenie hepatocytów z pożywką – kolagenem włóknistym rozpuszczonym w buferowanej soli fizjologicznej, wraz z komercyjnym surfaktantem Pluronic PLR. Również Chachal et al. [128] stworzył hydrożel bazujący tylko na materiale

polisacharydowym Ficoll rozcieńczonym DMEM z dodatkiem FBS lub samym surfaktancie Pluronic. Do zawiesiny dodał komórki raka piersi. Obie zawiesiny służyły do drukowania żywych komórek technologią druku strumieniowego, a surfaktant, dzięki modyfikacji napięcia powierzchniowego, zapewnił prawidłowe formowanie kropli atramentu w procesie druku.

Aby nadać hydrożelowi odpowiednie właściwości mechaniczne, reologiczne i żelujące, do zawiesiny dodaje się także inne, biokompatybilne materiały m. in.: gumę gellanową oraz różnego rodzaju polimery rozpuszczalne w wodzie, takie jak kwas poliakrylowy (PAA), poliglikol etylenowy (PEG), alkohol poliwinylowy (PVA) [119]. Skardal et al. [116] zastosował w tym celu różne pochodne PEGu. Xu et al. [129] Informuje on także, iż doskonałym materiałem są różne rodzaje alginianów. W swojej pracy do osadzania mysich fibroblastów metodą druku strumieniowego zastosował alginian sodu rozpuszczony w DMEM. Hydrożel o podobnym składzie wykorzystał Catros et. al. [115] do nakładania komórek metodą laserową.

Na podstawie analizy literaturowej można stwierdzić, iż przy wytwarzaniu bioatramentów, oprócz pożywek biologicznych najczęściej stosowane są materiały takie jak guma gellanowa, alginiany oraz różnego rodzaju polimery rozpuszczalne w wodzie, takie jak PAA, PEG, PVA oraz ich pochodne. Często wspomniany jest także komercyjny surfaktant Pluronic (PLR).

W literaturze można odnaleźć pojedyncze badania związane z hydrożelami zawierającymi materiały grafenowe [130], [131]. Li et. al. [130] wytworzył hydrożel na bazie alginianu sodu z dodatkiem wodnej zawiesiny tlenku grafenu. Jakus et al. [131] natomiast wykorzystali hydrożel z dodatkiem biokompatybilnego elastomeru o nazwie poliaktyd-coglikolid z dodatkiem nanopłatków grafenowych. Oba hydrożele wytworzone zostały z myślą o zastosowaniu w tzw. ekstruzji – druku 3D komórek. Materiały takie mają znacznie większą lepkość niż te stosowane w powlekanii natryskowym i druku strumieniowym.

Materiały grafenowe opisywane są w literaturze jako potencjalne materiały do wytworzenia biokompatybilnych podłoży do zastosowań biomedycznych [24]. W literaturze jednak jest bardzo niewiele informacji o takich podłożach, a wykonane różnymi technikami warstwy nie spełniały często wymogów adhezyjnych. Kim et .al. [114] hodował komórki macierzyste na warstwie z tlenku grafenu wytworzonej metodą zanurzeniową. Wykorzystał do tego celu wodną zawiesinę GO. Ponieważ nie zastosował żadnego nośnika, domniemywać można o znikomej adhezji utworzonej warstwy. W innej publikacji odnaleźć można informacje, że ludzkie osteoblasty hodowane były na powłoce GO otrzymanej metodą chemicznego osadzania z warstwy gazowej [132].



W 2018 Cheng [118] zaprezentował bioatrament do druku strumieniowego przeznaczony do zastosowań w aplikacjach biomedycznych. Jednakże, zastosowanym materiałem był zawieszony w wodzie tlenek grafenu. Rolę nośnika pełnił poliglicerol.

Grafenowe materiały do zastosowań biologicznych wytworzył także Wojtoniszak i wsp. [73]. Zawiesili oni GO i RGO w buforze fosforanowym (PBS ang. phosphate buffered saline) wraz z różnymi nośnikami m.in. PEG i Pluronic. Autorzy przeprowadzili badania stabilności płatków w wymienionych materiałach, ich stabilności oraz cytozgodności po bezpośrednim dodaniu do hodowli komórkowej.

Po przeprowadzeniu analizy literaturowej stwierdzono, iż biozgodne atramenty grafenowe przeznaczone do technik elektroniki drukowanej nie zostały jeszcze dogłębnie przebadane. Wykonywane do tej pory atramenty i hydrożele grafenowe bazowały na nieprzewodzącym tlenku grafenu. Stosowane były do technik takich jak ekstruzja, powlekanie zanurzeniowe czy CVD. Tematyka wytwarzania i stosowania atramentów bazujących na przewodzących nanopłatkach grafenowych, służących do wykonywania przewodzących, mocno związanych z podłożem warstw wykonywanych technikami elektroniki drukowanej, nie była jeszcze poruszana w literaturze.

### 3. Cel pracy

Obszarem, wokół którego skupiona jest niniejsza rozprawa jest wytworzenie wielozadaniowej warstwy charakteryzującej się jednocześnie różnymi właściwościami pozwalającymi na zastosowanie jej w aplikacjach biomedycznych, takimi jak biogodność, zdolność do stymulacji proliferacji komórek, a także antyseptyczność lub toksyczność względem bakterii. Ważne są także właściwości techniczne atramentu oraz wytwarzanej warstwy, a więc przewodność prądowa, wytrzymałość mechaniczna, wysoka rozdzielczość druku oraz adhezja do różnego rodzaju podłoży. Wytworzenie takiej warstwy w znacznym stopniu przyczyniłoby się do rozwoju biomedycyny i inżynierii tkankowej. Wykorzystanie w tym celu alotropowej odmiany węgla jakim jest grafen o unikalnych właściwościach (opisanych w rozdziale 1.1), czyni to zadanie coraz bardziej realnym.

Celem głównym rozprawy jest opracowanie technologii biogodnego, przewodzącego atramentu grafenowego o wyżej wymienionych cechach, do zastosowania w wytwarzaniu warstw i wzorów nanoszonych technikami druku strumieniowego lub powlekania natryskowego na potrzeby aplikacji biomedycznych. Kluczowym zadaniem jest także przebadanie właściwości opracowanych atramentów, pod kątem spełniania przez nie wymagań technicznych stawianych zawiesinom heterofazowym w wymienionych technologiach elektroniki drukowanej.

Do wytwarzania atramentów heterofazowych wykorzystane zostaną nanopłatki grafenowe. Materiał ten, będący alotropową odmianą węgla, odznacza się biogodnością i biodegradowalnością. Ponadto płatki grafenowe, jako jedyne z rodziny materiałów grafenowych (rozdział 2.1.1), mają właściwości zbliżone do czystego grafenu – przede wszystkim charakteryzują się wysoką przewodnością i wytrzymałością mechaniczną. Właściwości elektryczne płatków grafenowych, mogą zwiększać ich oddziaływanie antybakteryjne i umożliwić wytwarzanie warstw i pokryć do zastosowania w elektrostymulacji będącej skuteczną metodą stymulacji wzrostu i proliferacji zdrowych komórek. W przeciwieństwie do tlenku grafenu czy zredukowanego tlenku grafenu, brak jest w literaturze szeroko zakrojonych badań związanych z wykorzystaniem ich jako fazy funkcjonalnej w atramentach heterofazowych do technik elektroniki drukowanej, wykorzystanych przy wytwarzaniu atramentów i materiałów biogodnych do zastosowań w aplikacjach biomedycznych.

Wykorzystanie technik elektroniki drukowanej: druku strumieniowego i powlekania natryskowego pozwala na nanoszenia materiału grafenowego zarówno w postaci precyzyjnych wzorów, jak i powłok na podłożach wykonanych z różnych materiałów, charakteryzujących się niską lub wysoką elastycznością, o różnym kształcie powierzchni. Techniki te, ze względu na konstrukcje urządzeń i specyfikę procesu drukowania pozwalają na otrzymywanie powłok i wzorów w sposób bezkontaktowy, z zachowaniem pełnej czystości i sterylności procesu. Jest to kluczowe w wykorzystaniu wytworzonych warstw w zastosowaniach biomedycyny. Ponadto dzięki niskotemperaturowemu charakterowi procesu suszenia powłok, możliwe jest nanoszenie grafenu na podłoża medyczne o niskiej wytrzymałości na działanie wysokich temperatur, takich jak cewniki, płytki hodowlane z polistyrenu, rurki tracheotomijne i inne.

Do celu naukowego pracy należy zbadanie wpływu wytwarzanych warstw grafenowych na mechanizm blokowania biofilmu bakteryjnego. Przeprowadzone badania pozwolą także na określenie zachowania się poddanych elektrostymulacji komórek, osadzonych na przewodzących warstwach grafenowych. Zbadany zostanie wpływ działania pola elektrycznego na namnażania i ukierunkowanie wzrostu komórek.

Osiągnięcie opisanego wyżej celu pracy wymaga zrealizowania wieloetapowego planu badawczego, do którego należy:

- 1) Dobór komponentów atramentu grafenowego: płatków grafenowych o określonych właściwościach, rozpuszczalnika, nośnika oraz surfaktantu tak, aby powstały heterofazowy atrament nie tylko charakteryzował się przewodnością, ale także spełniał wymogi biologiczne oraz technologiczne narzucane przez wybrane technologie drukarskie. W szczególności obejmuje to:
  - ✓ Przeprowadzenie szeregu badań fizyko-chemicznych nad nanopłatkami grafenowymi w celu wyboru materiału fazy funkcjonalnej.
  - ✓ Przetestowanie stanu dyspersji płatków grafenowych w różnych biozgodnych materiałach nośników.
  - ✓ Wykonanie badań biozgodności wybranych komponentów atramentu oraz kompletnych zawiesin.
- 2) Budowa stanowiska do druku strumieniowego heterofazowych atramentów, zapewniającego wysoką czystość i sterylność procesu wykonywania wzorów do zastosowań biomedycznych.

- 3) Przeprowadzenie badań nad właściwościami atramentów grafenowych, takimi jak: stabilność dyspersji płatków grafenowych w kompozycji, jej jednorodność oraz właściwości reologiczne atramentów.
- 4) Zbadanie progu perkolacji elektrycznej atramentów, w celu doboru granicznej zawartości fazy funkcjonalnej w atramencie skutkującej jego przemianą z nieprzewodzącego w przewodzący, przy jednoczesnym braku zatykania dyszy drukarskiej.
- 5) Dobór parametrów druku strumieniowego decydujących o prawidłowości procesu drukowania ścieżek: napięcia i czasu trwania sygnału sterującego głowicą, częstotliwości generowania kropel, jak również posuwu, postojów i temperatury stolika.
- 6) Charakteryzacja mikrostruktury i grubości powierzchni, adhezji oraz elektrycznych właściwości wytwarzanych warstw i wzorów grafenowych.
- 7) Zbadanie antyseptyczności warstw grafenowych oraz wyjaśnienie mechanizmu blokowania przez warstwę grafenową biologicznego procesu formowania struktury biofilmu bakteryjnego,
- 8) Przeprowadzenie badań związanych z wzmocnieniem właściwości antybakteryjnych płatków grafenowych dzięki procesowi ich dekorowania nanocząstkami srebra.

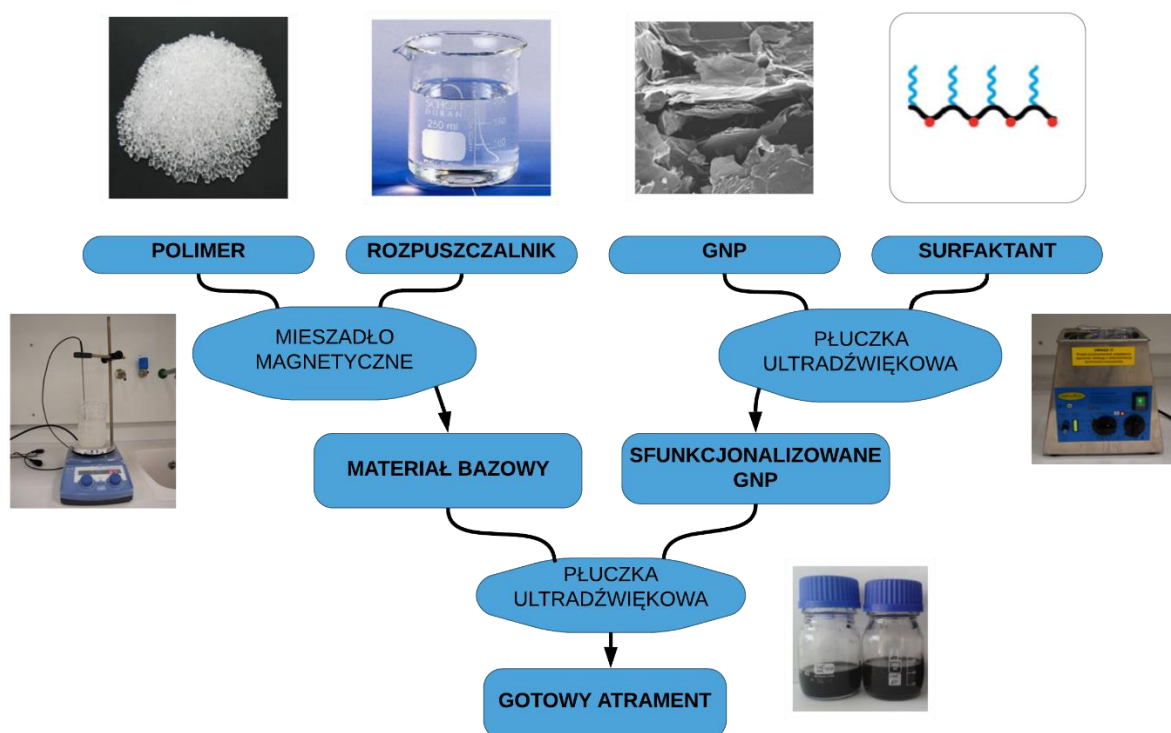
Przeprowadzenie tych badań pozwoli na opracowanie kompozycji grafenowych atramentów oraz wytwarzanie biozgodnych, przewodzących warstw i wzorów dzięki właściwościom antyseptycznym zdolnych jednocześnie, do hamowania zakażeń i infekcji, jak również do stymulacji czynników wzrostu zdrowych komórek lub ich elektrostymulacji. Warstwy te mogą znaleźć zastosowanie przy wytwarzaniu i pokrywaniu powłokami lub wzorami osprzętu medycznego takiego jak cewniki, rusztowania komórkowe, implanty.

## 4. Metodyka badawcza

### 4.1. Technologia wytwarzania grafenowych atramentów heterofazowych

Głównym celem pracy było opracowanie technologii wytwarzania heterofazowych, przewodzących, biogodnych, grafenowych atramentów do nanoszenia technikami elektroniki drukowanej: drukiem strumieniowym i powlekaniami natryskowym. Skomponowanie takich atramentów, spełniających wszystkie, opisane szczegółowo w rozdziale 5, warunki, wymagało przeprowadzenia szeregu badań, związanych zarówno z doбором kompozycji, jak i procesu ich wytwarzania. Oczekiwanym efektem było uzyskanie jednorodnego i stabilnego atramentu. Oznacza to, iż zdyspergowane w materiale bazowym, w skład którego wchodzi nośnik i rozpuszczalnik, nanopłatki grafenowe powinny utrzymywać się w całej objętości atramentu i nie osiadać na dnie. Ponadto, w jednorodnym atramencie, bez wykorzystania urządzeń optycznych nie powinno być widać skupisk aglomeratów fazy funkcjonalnej. Minimalna wymagana stabilność rozumiana jest w pracy jako zdolność zachowania jednorodności atramentu w czasie dłuższym niż okres trwania jednego procesu drukowania ścieżek lub warstw, który wynosi około godziny. Materiały, stosowane w wytwarzanych w pracy atramentach grafenowych opisane zostały w rozdziale 5.

Pierwszym etapem procesu wytwarzania grafenowych atramentów, pokazanego schematycznie na rysunku 5, było przygotowanie bazowego materiału, w którym następnie zawieszane są nanopłatki grafenowe. Materiał bazowy uzyskiwany jest poprzez rozpuszczenie odpowiedniego polimeru w kompatybilnym do niego rozpuszczalniku. W pracy etap ten wykonywany był w podwyższonej temperaturze, około 50°C z użyciem mieszadła magnetycznego firmy IKA RCT standard, przy prędkości obrotowej 300 rpm. Urządzenie to, przedstawione na rysunku 6, wyposażone jest w termoparę mierzącą temperaturę bezpośrednio w mieszanej zawieszynie. Dzięki temu możliwe jest jej nagrzewanie w zakresie 30-360°C oraz wybór prędkości obrotowej w zakresie 50-1500 rpm. Zastosowanie temperatury wyższej niż pokojowa (tj. 20°C) nie było niezbędne, jednak w znacznym stopniu przyspieszyło proces rozpuszczania polimeru. Rozpuszczenie wykorzystywanych w badaniach polimerów o wysokiej masie cząsteczkowej, opisanych szczegółowo w rozdziale 5.2, trwało w temperaturze pokojowej około dwóch godzin. Dzięki podgrzewaniu materiału, czas ten skrócił się do 30 minut.



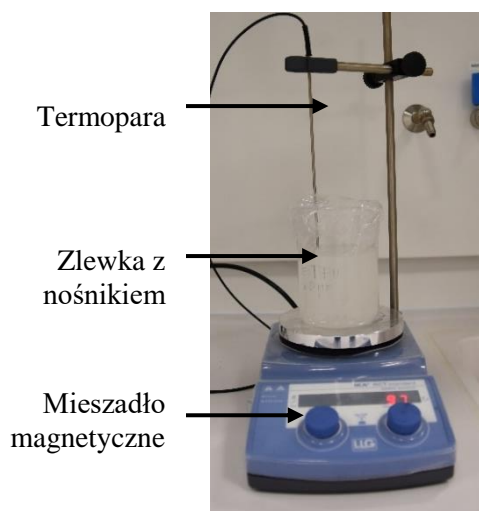
Rysunek 5. Schemat przedstawiający proces technologiczny wytwarzania grafenowych atramentów heterofazowych do druku strumieniowego i powlekania natryskowego

Przed połączeniem materiału bazowego z fazą funkcjonalną, niezbędnym etapem było funkcjonalizacja nanopłatków grafenowych oraz rozbicie aglomeratów. Czynności te zapewniają uzyskanie stabilnej dyspersji płatków grafenu w atramencie. Analiza literaturowa i wstępne badania wykazały, iż najskuteczniejszą stosowaną metodą, pozwalającą na rozbicie aglomeratów, jest wykorzystanie energii ultradźwięków [133]. Jak wiadomo z literatury, dyspersja poprzedzona dodaniem odpowiednich surfaktantów, umożliwia stworzenie na granicy nośnika i fazy funkcjonalnej cienkiej warstwy, zapobiegającej aglomerowaniu się cząstek. Proces ten nazywany jest funkcjonalizacją – przyłączaniem się do powierzchni cząstek fazy funkcjonalnej innego materiału [134].

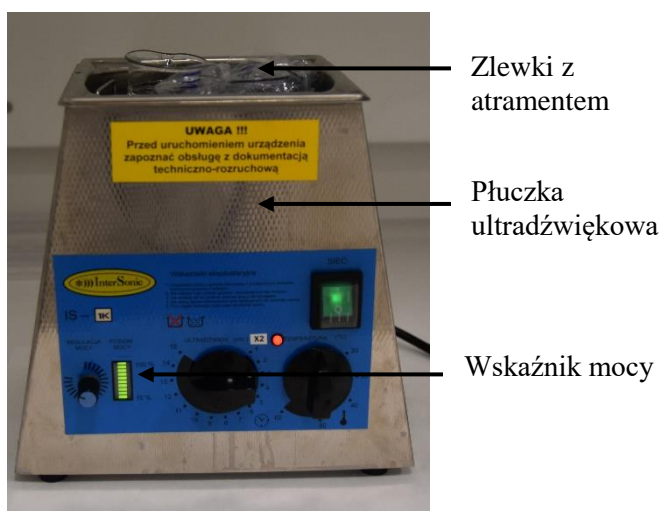
Nanopłytki grafenowe, wraz z surfaktantami (2-5% wt. względem GNP) i niewielką ilością rozpuszczalnika, poddawane były procesowi sonikacji w płuczce ultradźwiękowej InterSonic IS-1K, przy jej maksymalnej częstotliwości pracy – 35 kHz. Zbyt długi czas sonikacji powoduje uszkodzenia w strukturze fazy funkcjonalnej polegające na przecięciu i rozdrobnieniu płatków grafenowych. Dobrany na podstawie analizy literaturowej [23], czas trwania procesu wynosił około jedną godzinę. Był on wystarczająco długi, aby skutecznie rozbić aglomeraty, jednak na tyle krótki, aby nie uszkodzić nanopłatków grafenowych.

Zawieszenie sfunkcjonalizowanych płatków grafenowych w bazowym materiale nośnika i rozpuszczalnika uzyskiwano poprzez dalszą sonikację kompozycji w myjce ultradźwiękowej. Proces sonikacji prowadzony był do momentu osiągnięcia wizualnie jednorodnej zawiesiny atramentu. Czas jego trwania wynosił średnio jedną godzinę.

Prowadzone okiem nieuzbrojonym obserwacje testujące dyspersję GNP i obecność aglomeratów w zawieszynie atramentu opisano w rozdziale 5.2. Zlewki z atramentami grafenowymi, umieszczane były w płuczce ultradźwiękowej, do której nalewana była woda dejonizowana. Ze względu na wysoką moc pracy urządzenia, wynoszącą według producenta około  $5 \text{ W/cm}^3$  [135], woda dejonizowana ma tendencję do nagrzewania się do bardzo wysokich temperatur. Działanie wysokich temperatur ma niekorzystny wpływ na wytwarzane atramenty, powoduje bowiem niekontrolowane odparowanie rozpuszczalnika. W związku z tym, zlewki z atramentami powinny być w trakcie procesu sonikowania dokładnie przykryte. Należy także w trakcie sonikacji, co 15 minut kontrolować temperaturę wody oraz, w razie potrzeby, wymieniać ją na zimną.



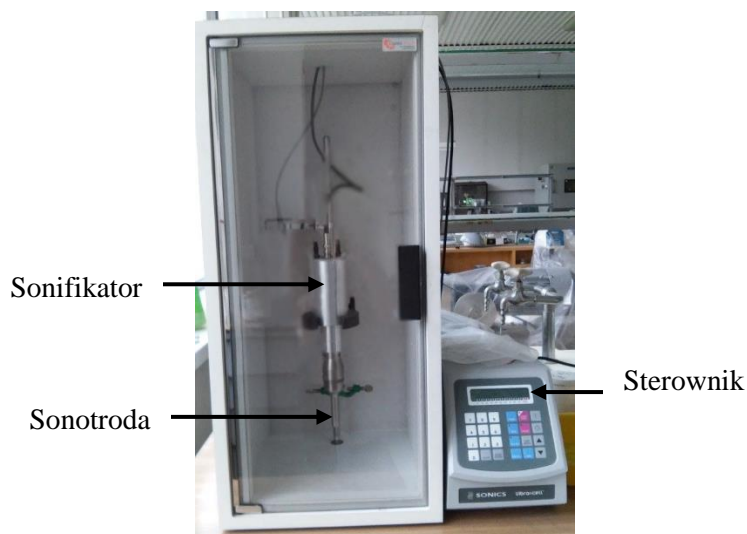
Rysunek 6. Mieszadło magnetyczne IKA RCT standard



Rysunek 7. Płuczka ultradźwiękowa InterSonic IS-1K

Wynikiem opisanego wyżej procesu jest wytworzenie heterofazowego atramentu bazującego na nanopłatkach grafenowych. Jednak jest to materiał, który bardzo trudno zdyspergować w rozpuszczalnikach [120]. Często, mimo pozornej stabilności, nanocząstki grafenowe ulegają sedymentacji. W związku z tym, w trakcie badań stwierdzono, że jeśli czas od wytworzenia atramentu do momentu jego druku był dłuższy niż jedna doba, przed procesem drukowania ścieżek i wzorów należało ponownie ujednorodnić atrament. W trakcie badań korzystano w tym celu z sonifikatora firmy Sonics, model VCX 750, o mocy 750 W

i częstotliwości ultradźwięków 20 kHz, przy amplitudzie drgań: 30% oraz czasie działania ultradźwięków: 30 sekund. Proces ten pozwalał na szybkie przywrócenie jednorodności atramentom.



*Rysunek 8. Sonifikator z sonotrodą firmy Sonics*

#### **4.2. Technologia wytwarzania przewodzących ścieżek i warstw grafenowych**

Grafenowe, przewodzące, biozgodne atramenty heterofazowe, których technologia wytwarzania została opracowana, przeznaczone są do nanoszenia na podłoża o różnej geometrii dwiema uzupełniającymi się technikami elektroniki drukowanej: drukiem strumieniowym oraz powlekaniami natryskowym. Są to technologie, znajdujące zastosowanie w drukowaniu dwóch różnych rodzajów cienkich warstw. Technologia druku strumieniowego pozwala na uzyskanie bardzo wąskich grafenowych ścieżek oraz precyzyjnych wzorów o rozdzielczości powyżej 30  $\mu\text{m}$  i grubościach nieprzekraczających 1  $\mu\text{m}$ . Natomiast dzięki wykorzystaniu technologii powlekania natryskowego można w łatwy sposób wykonywać warstwy i powłoki na dużych powierzchniach, o porównywalnych grubościach 0,1-0,8  $\mu\text{m}$  [45]. Głównymi zaletami obu tych metod jest nieinwazyjność, bezstykowość i możliwość zachowania czystości podczas procesu druku.

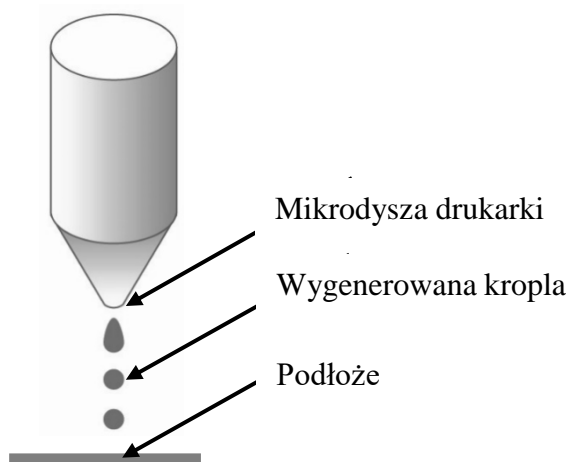
Dzięki tym zaletom, przy wykorzystaniu biozgodnych atramentów oraz dostosowanych do pracy z materiałami biologicznymi stanowisk (rozdział 6.5), metody te mogą znaleźć szerokie zastosowanie w biomedycynie i bioinżynierii. Precyzyjne i wąskie ścieżki, tworzące wzory na podłożach hodowlanych znajdują m. in. zastosowanie w różnicowaniu komórek macierzystych [136] oraz stymulacji czynników wzrostu komórek [137], a także w wytwarzaniu biozgodnych czujników i sensorów [138]–[140]. Z drugiej strony, warstwy



i powłoki wytworzone z materiałów stymulujących czynniki wzrostu komórek drukowane na podłożach hodowli komórkowych na rusztowaniach komórkowych, stentach czy implantach, mogą stymulować komórki do wzrostu i proliferacji [141], [142]. Z tego powodu, wytwarzane w pracy atramenty wykorzystywane były do druku ścieżek i warstw obiema technikami: drukiem strumieniowym i powlekaniami natryskowym.

#### **4.2.1. Technologia wytwarzania ścieżek grafenowych metodą druku strumieniowego**

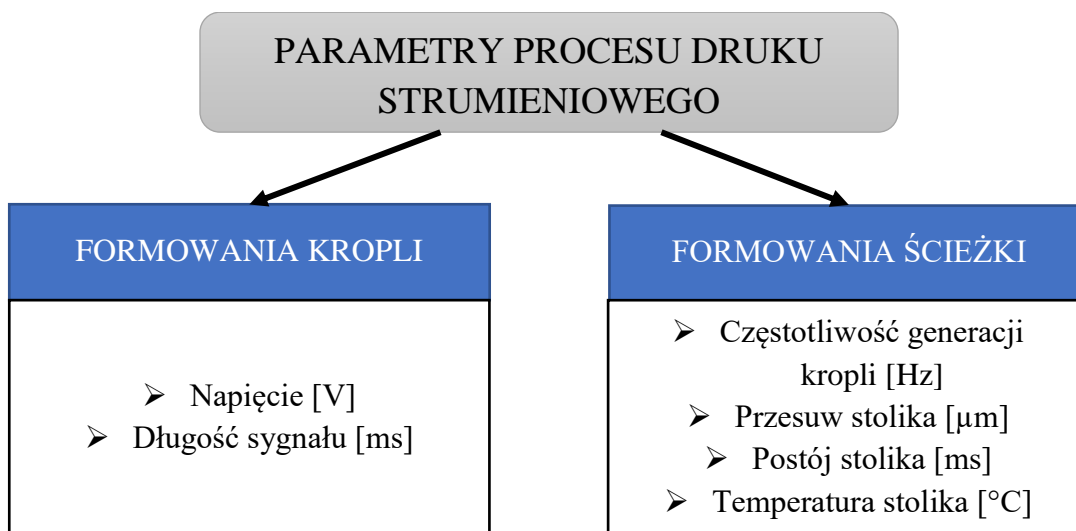
Proces druku strumieniowego, przedstawiony schematycznie na rysunku 9 i opisany szczegółowo w rozdziale 6.1., polega na generowaniu z mikrodyszy drukarskiej pikolitrowych kropelek o średnicach od 20 do 50  $\mu\text{m}$  [143], które po zderzeniu z podłożem i odparowaniu rozpuszczalnika, tworzą ścieżkę lub pożądaną wzór. W badaniach opracowano stanowisko, w którym w trakcie trwania procesu nadruku głowica pozostaje nieruchoma. Wytworzenie wzoru uzależnione jest od ruchu stolika, na którym umiejscowione jest podłoże.



*Rysunek 9. Schematyczne przedstawienie zasady działania druku strumieniowego*

Proces nadruku składa się z kilku etapów. Jest to: generowanie i lot kropli, zderzenie kropli z podłożem, zwilżanie podłoża i odparowywanie rozpuszczalnika oraz wstępne suszenie ścieżki [8], [9]. Krople wygenerowane z dyszy opadają na podłoże, w wyniku czego następuje ich rozprysk, zwilżanie podłoża oraz samoczynny rozplływ atramentu. Nadmierny oraz nieregularny rozplływ nanoszonego materiału, będący częstym utrudnieniem procesu, może być spowodowany niedostosowanymi do druku strumieniowego parametrami reologicznymi atramentu, zastosowaniem nieodpowiedniego rozpuszczalnika, o zbyt niskiej zdolności odparowywania w stosunku do prędkości druku, [8], [9] lub za niską temperaturą stolika podłożowego. Aby przyspieszyć proces odparowywania, podłoże umieszczane jest na podgrzewanym stoliku, dzięki czemu występuje wstępne suszenie. Po zakończonym procesie

druku, wytworzone wzory poddawane są często dodatkowej obróbce cieplnej [8], [9]. Użytkownik obsługujący drukarkę strumieniową ma wpływ na każdy z wyżej opisanych etapów, ze względu na możliwość doboru parametrów procesu druku, przedstawionych na rysunku 10.



*Rysunek 10. Parametry procesu przy wytwarzaniu ścieżek metodą druku strumieniowego*

Parametry formowania kropli są to przebiegi sterujące pracą głowicy: napięcie i długość sygnału, ustawiane na sterowniku głowicy. Napięcie bezpośrednio wpływa na zdolność wygenerowania kropli z dyszy oraz prędkość jej lotu, długość trwania sygnału – na objętość kropli [144]. Objętość kropli decyduje o ostrości krawędzi i dokładności wydruków. Prawidłowe ustawienie parametrów formowania kropli pozwala więc na generowanie kropli o powtarzalnych wymiarach. Jest to niezbędne dla uniknięcia błędów wydruku – nieregularnych lub nieciągłych ścieżek.

Rozpływ tuszu na materiale podłożowym jest zależny zarówno od właściwości reologicznych stosowanego atramentu jak i doboru prawidłowych dla danego atramentu i materiału podłoża parametrów formowania ścieżki [9]. Zaliczają się do nich parametry związane z szybkością drukowania, a więc częstotliwość generacji kropli oraz przesuw i postój stolika, na którym umiejscowione jest podłoże. Jeśli będą one niewłaściwie dobrane, a szybkość drukowania będzie zbyt wysoka, na podłożu, zamiast prawidłowej ścieżki, kształtować się będą skupiska kropeł, co będzie skutkowało rozlewaniem się atramentu na podłożu. Z drugiej strony, jeśli krople będą generowane za rzadko w stosunku do przesuwu podłoża, przerwana może zostać ciągłość ścieżki. Bardzo ważnym parametrem jest także temperatura stolika, na którym umieszczone jest podłoże. Ma ona wpływ na odparowywanie rozpuszczalnika z materiału

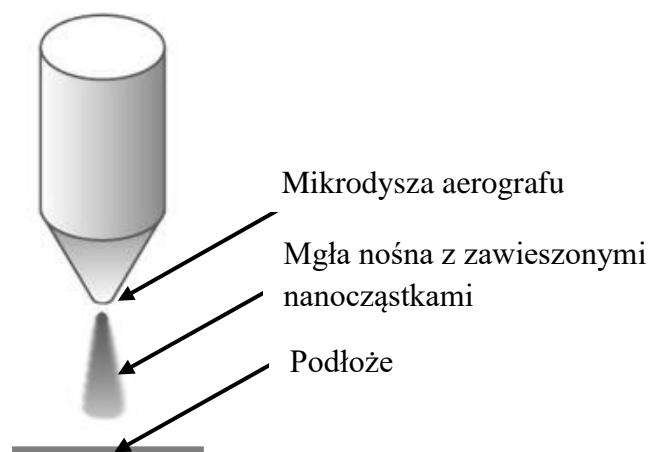
znajdującego się już na podłożu, w związku z czym powinna być dostosowana do szybkości drukowania.

W trakcie drukowania ścieżek grafenowych używano zbudowanego na potrzeby pracy, opisanego w rozdziale 6.4., stanowiska z głowicą firmy Microdrop o średnicy 50  $\mu\text{m}$ . Jest to jedna z najmniejszych średnic głowic, stosowanych w technologii druku strumieniowego atramentów heterofazowych. Najczęściej stosowane są bowiem głowice o średnicach 50 – 150  $\mu\text{m}$ . Opisana głowica została wybrana do badań w pracy, ponieważ dzięki małym wymiarom możliwe jest osiągnięcie najwyższych rozdzielczości ścieżek. Parametry procesu druku strumieniowego dobrane zostały na podstawie obserwacji kropli i procesu powstawania ścieżek wykonywanych za pomocą układu obrazowania, przedstawionego w rozdziale 6.3. Ustawiane na sterowniku głowicy napięcie zawierało się w zakresie 40-60 V, długość sygnału – 115-220 ms. Krople generowane były z częstotliwością 10 Hz, podłoże podgrzewane było do temperatury 60-80°C, a stosowany przesuw stolika to 30-40  $\mu\text{m}$  przy czasie jego postoju 0,1 s. Badania związane z doбором parametrów opisano w rozdziale 7.1.4.

Dobór parametrów jest bardzo istotną częścią procesu druku strumieniowego grafenowych atramentów heterofazowych, pozwala bowiem na uzyskanie ciągłych, przewodzących wzorów, charakteryzujących wysoką rozdzielczością.

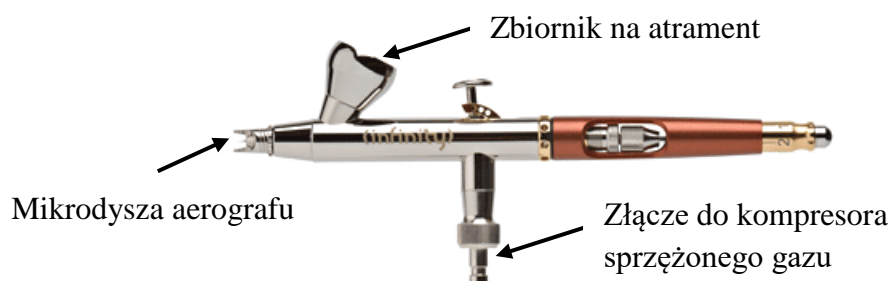
#### **4.2.2. Technologia wytwarzania warstw grafenowych metodą powlekania natryskowego**

W technologii powlekania natryskowego atrament jest atomizowany i pod wpływem sprężonego gazu, rozpylany przez dyszę, poruszającą się nad podłożem. Pojedyncze krople przenoszone są przez gaz nośny w stronę podłoża, gdzie następuje osadzanie nanocząstek fazy funkcjonalnej.



*Rysunek 11. Schematyczne przedstawienie zasady działania powlekania natryskowego*

Powlekanie natryskowe pozwala na pokrywanie podłoża powłokami charakteryzującymi się grubościami poniżej  $0,8\ \mu\text{m}$  podłoża o zróżnicowanym kształcie i o dużej powierzchni [45]. W trakcie badań wykorzystywany był, pokazany na rysunku 12, pistolet natryskowy firmy Infinity, zwany aerografem. Aerograf zawiera pojemnik do którego wlewany jest atrament. Jest on podłączany do generatora sprężonego powietrza, dzięki czemu po rozpoczęciu procesu nadruku z mikrodyszy otrzymywana jest mgła nośna. Aerograf zawieszany był w stałej odległości nad podłożem umieszczonym na płycie grzewczej umożliwiającej proces wstępnego suszenia drukowanych warstw.



*Rysunek 12. Aerograf firmy Infinity*

Na proces drukowania warstw metodą powlekania natryskowego wpływają parametry takie jak: średnica dyszy aerografu, ciśnienie gazu nośnego, odległości między dyszą a powlekanym podłożem, prędkości posuwu dyszy względem podłoża. Korzystając z wcześniejszych badań [11], [45], w których przetestowano wpływ wszystkich tych parametrów na proces drukowania i jakość otrzymywanych węglowych warstw, wybrano sposób wykonania procesu druku i parametry przedstawione w tabeli 1. Parametry te pozwalają na efektywny nadruk grafenowych atramentów, bez zatykania dyszy aerografu, skutkujący uzyskaniem jednolitych, pozbawionych pęcherzy

powietrza oraz nierówności, warstw grafenowych. Po procesie nadruku wytworzone warstwy poddawane były obróbce cieplnej.

*Tabela 1. Parametry zastosowane w procesie powlekania natryskowego do wytwarzania warstw grafenowych*

<b>Parametr</b>	<b>Wartość</b>
Średnica dyszy aerografu	400 $\mu\text{m}$
Ciśnienie gazu nośnego	0,3 MPa
Odległość między dyszą a podłożem	150 mm
Prędkość posuwu dyszy	150 mm/s

#### **4.2.3. Obróbka cieplna ścieżek i warstw grafenowych**

Bardzo istotnym elementem procesu wytwarzania przewodzących wzorów i ścieżek jest ich obróbka cieplna, wpływająca w znaczący sposób na ich jakość i właściwości elektryczne [145], [146]. Zarówno w technologii druku strumieniowego, jak i powlekania natryskowego stosowane są najczęściej dwa rodzaje obróbki cieplnej: suszenie wstępne oraz suszenie właściwe.

Suszenie wstępne odbywa się jeszcze w czasie trwania procesu druku. Podłoże umieszczane jest na płycie grzejnej lub grzonym stoliku. Stolik podgrzewany był, w zależności od podłoża i drukowanego atramentu, do 60-80°C. Dla atramentów bazujących na rozpuszczalnikach mniej lotnych, takich jak woda, temperatura stolika była wyższa. Zastosowanie rozpuszczalników łatwiej parujących, takich jak aceton pozwala obniżyć temperaturę wstępnego suszenia. Podgrzewanie podłoża pomaga w szybszym odparowywaniu rozpuszczalnika z warstwy, zabezpiecza przed niekontrolowanym rozplywem atramentu na podłożu.

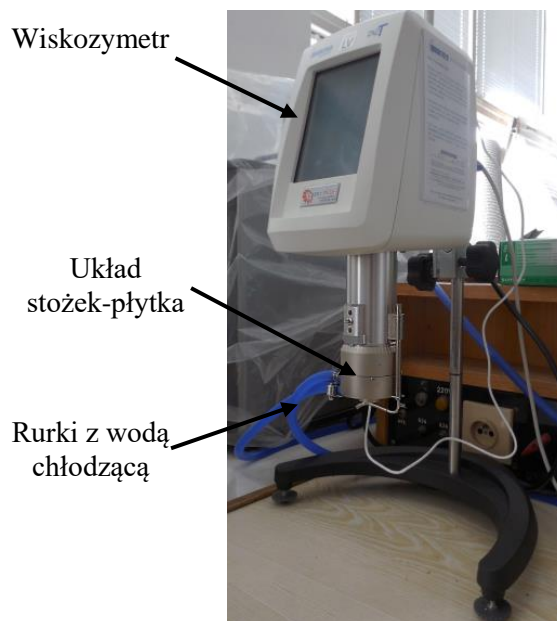
Suszenie właściwe przeprowadzane było w pracy dwiema różnymi metodami uzależnionymi od wykorzystywanego materiału podłożowego. Przy zastosowaniu podłoży wytrzymałych na działanie wysokich temperatur, takich jak szkło, szkiełka mikroskopowe i tytanowe rusztowania komórek, suszenie warstw odbywało się przy użyciu promieniowania cieplnego halogenu o mocy 150 W. Zapewniony przez urządzenie nagły wzrost temperatury następujący w ciągu kilku sekund, nie tylko zapewnia prawidłowe spieknięcie ścieżek, ale także jest bardzo efektywny czasowo. Lampa halogenowa była odsunięta od suszonej próbki o 150 mm, w celu zabezpieczenia podłoża przed uszkodzeniem. Ze względu na działanie wysokich temperatur, w zakresie 200-300°C, czas wystarczający do wysuszenia próbek to 30 sekund. Dłuższa obróbka często skutkuje pękaniem szklanego materiału podłożowego.

Materiały podłożowe nieodporne na działanie wysokich temperatur podlegały dłuższemu procesowi obróbki cieplnej w suszarce komorowej. Zarówno temperatura, jak i czas trwania procesu obróbki cieplnej, dobrane na podstawie wstępnych badań, dostosowane były do wytrzymałości cieplnej stosowanego podłoża tak, aby nastąpiło pełne wysuszenie warstwy. Folie PET i Kapton poddawane były działaniu temperatury 120°C przez godzinę, cewniki i stenty – 80°C, przez trzy godziny, płytki do hodowli komórkowych wytworzone z polistyrenu: 70°C przez 4 godziny. Zarówno technologią druku strumieniowego, jak i powlekania natryskowego uzyskuje się ścieżki cienkie, o grubościach poniżej 1µm. Badania wykazały, że przy tak dobranych temperaturach i czasie trwania obróbki następowało całkowite odparowanie rozpuszczalnika i wysuszenie warstwy.

### **4.3. Metody badawcze stosowane do charakterystyki właściwości biozgodnych, przewodzących atramentów i warstw grafenowych**

#### **4.3.1. Pomiary właściwości reologicznych atramentów grafenowych**

Właściwości reologiczne atramentów testowane były na wiskozymetrze typu stożek – płytką firmy Brookfield DV2T (rysunek 13), przy użyciu stożka o oznaczeniu CP-40. Regulacja temperatury, umożliwiającą wykonanie wszystkich reologicznych testów w jednakowych warunkach, jest ogromnie istotna dla zachowania powtarzalności badań. Temperatura jest bowiem jednym z parametrów, które w sposób znaczący zmieniają lepkość materiałów [147]. Temperatura stożka i płytki wynosząca 25°C regulowana była przy użyciu ultratermostatu Polyscience. Wyniki rejestrowane były w oprogramowaniu Rheocalc T, które umożliwiała dobór parametrów procedury pomiarowej. Kolejne wartości prędkości obrotowej, przy których mierzona była lepkość, zawierały się w zakresie od 0 do 65 rpm. Zakres ten pozwalał na zmierzenie lepkości dla wartości naprężeń występujących w procesie technologicznym druku.

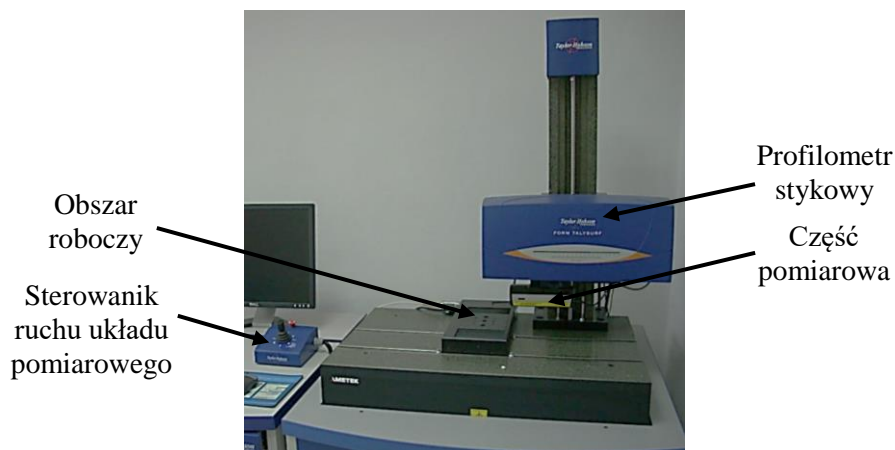


*Rysunek 13. Wiskozymetr stożek - płytka  
DV2T firmy Brookfield*

Wyniki pomiarów reologicznych zawiesin heterofazowych prezentowane są najczęściej na wykresie określonym jako krzywa lepkości [147]. Przedstawia ona zależność lepkości materiału od występujących naprężeń, nazywanych w literaturze szybkością ścinania [148], [149]. Uzyskane w trakcie pomiarów dane umożliwiły wygenerowanie krzywych lepkości charakteryzujących wytworzone heterofazowe atramenty grafenowe.

#### **4.3.2. Pomiar grubości oraz obserwacja mikrostruktury warstw i ścieżek grafenowych**

Pomiary grubości ścieżek i warstw grafenowych wykonane zostały na profilometrze stykowym Form Talysurf PGI 830, widocznym na rysunku 14, będącym własnością Zakładu Metrologii Współrzędnościowej Politechniki Warszawskiej. Urządzenie to umożliwia wykonanie pomiarów mikro i makrogeometrii z rozdzielczością 3,2 nm [150].



Rysunek 14. Profilometr stykowy Form Talysurf PGI 830 [150]

Obserwacje struktury ścieżek oraz jakości ich wykonania prowadzone były także przy użyciu cyfrowego mikroskopu z profilometrem VHX-900F firmy Keyence. Urządzenie to, przedstawione na rysunku 15, ma wielostronne zastosowanie. Pozwala na obserwację i pomiary struktury i jakości warstw. Dzięki wbudowanemu profilometrowi, umożliwia także wykonywanie obrazów 3D i obserwację profili powierzchni pod różnymi kątami. Przy użyciu obiektywu VH-Z20R/Z20T możliwe jest uzyskanie powiększenia do 200x. Dzięki temu mikroskop ten umożliwiał przeprowadzenie obserwacji struktury i poprawności uzyskanych warstw i ścieżek. Wykonano zdjęcia przedstawiające powiększone obrazy uzyskanych nadruków.



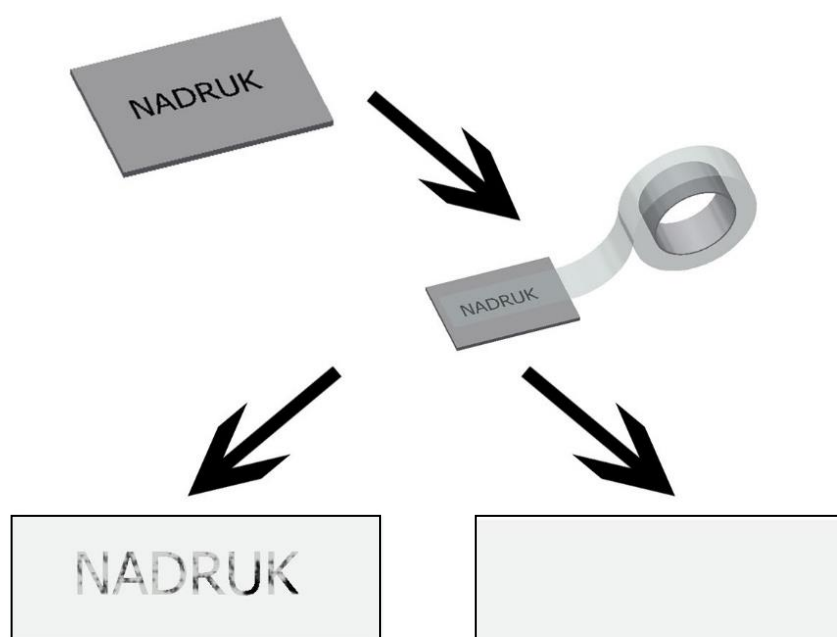
Rysunek 15. Mikroskop cyfrowy VHX-900F firmy Keyence



### 4.3.3. Badanie adhezji i wytrzymałości mechanicznej ścieżek i warstw grafenowych

Dwie powszechnie stosowane metody badania adhezji warstw, wzorów i powłok to „test zarysowania” oraz „test taśmy klejącej”. Test zarysowania (ang. scratch test), jest to technika, w której końcówka twardego i ostrego rysika lub igły przeciągana jest po powierzchni badanej powłoki. Obciążenie zwiększane jest aż do momentu, w którym nastąpi całkowite oderwanie warstwy [151], [152]. Zaletą tego rozwiązania jest możliwość ilościowej oceny adhezji powłoki do podłoża. Dużą wadą, wykluczającą możliwość zastosowania tego testu w prowadzonych w pracy badaniach, jest możliwość uszkodzenia podłoża. W pracy warstwy grafenowe nanoszone były bowiem nie tylko na twarde, płaskie i wytrzymałe mechanicznie podłoża takie jak płytki szklane i ceramiczne, ale także na elastyczne folie i podłoża nietypowe, takie jak wykonane z tworzyw sztucznych cewniki, stenty, czy tytanowe, porowate rusztowania dla komórek. Zbadanie przyczepności warstw na tych podłożach nie byłoby możliwe z wykorzystaniem opisaney wyżej techniki.

Do określania stopnia przyczepności warstwy wykorzystano więc w pracy drugą z popularnych metod badania adhezji, przedstawioną schematycznie na rysunku 16.



Rysunek 16. Schemat przedstawiający metodę badania adhezji za pomocą testu taśmy klejącej „scotch tape”

Test taśmy klejącej (ang. scotch tape test) jest najstarszą metodą badania adhezji [152]. Polega ona na naklejeniu na warstwę lub ścieżkę kawałka taśmy samoprzylepnej oraz

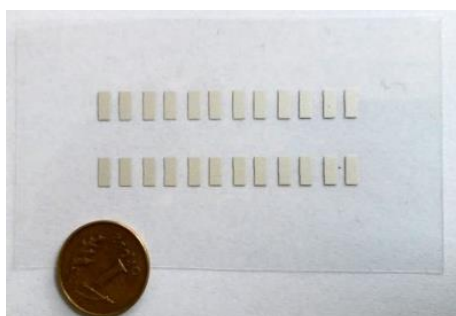
obserwacji, czy warstwa została usunięta wraz z oderwaniem taśmy [152]. Główną wadą tego rozwiązania jest jakościowy wynik testu. Badanie ma bowiem charakter „wszystko albo nic”, a częściowa poprawa adhezji jest bardzo trudna do zaobserwowania [151]. Mimo wszystko, jest to wystarczające i najlepsze rozwiązanie do testów adhezji grafenowych warstw i wzorów na różnych typach podłoża, zwłaszcza elastycznych. Zostało więc ono zastosowane w niniejszej pracy.

Do przeprowadzenia badań zmęczeniowych i określenia wpływu odkształceń mechanicznych warstwy grafenowej na jej mikrostrukturę oraz właściwości elektryczne wykorzystano przetestowaną we wcześniejszych badaniach metodę zmęczeniową [23]. W trakcie testu próbka zawierająca warstwę nadrukowaną na podłożu elastycznym z folii PET umieszczana jest w maszynie zmęczeniowej i poddawana powtarzalnemu cyklicznemu odkształcaniu. Proces przebiega z częstotliwością zginania próbki do 600 cykli na minutę, a obserwacje zmian struktury warstwy oraz pomiar rezystancji odbywał w przerwach między serią cykli.

#### 4.3.4. Pomiary właściwości elektrycznych ścieżek i wzorów grafenowych

Właściwości elektryczne ścieżek i warstw mierzone były metodą prądowo-napięciową, dwu- lub czteropunktową, przy użyciu cyfrowego multimetru Keysight 34461A.

W pracy wykonywano pomiary rezystancji ścieżek i wzorów wytworzonych metodami druku strumieniowego lub powlekania natryskowego. W celu przeprowadzenia badań i zapewnienia przepływu prądu pomiarowego w kierunku równoległym do powierzchni badanej warstwy, zaprojektowano wzory testowe, pokazane na rysunkach 17 oraz 18. Umożliwiły one jednoznaczne wyznaczenie rezystancji powierzchniowej drukowanych wzorów grafenowych. Na oba wzory składały się zaprojektowane z dostosowaniem do rozdzielczości każdej z technik drukarskich, srebrne warstwy kontaktowe. Wykonane zostały z lakieru srebrnego pozyskanego z firmy Novelinks, o rezystancji powierzchniowej około  $25 \text{ m}\Omega/\square$ .



Rysunek 17. Wzór testowy do druku strumieniowego, ze srebrowymi kontaktami



Rysunek 18. Wzór testowy do powlekania natryskowego, ze srebrowymi kontaktami [23]

Technologia druku strumieniowego pozwala na uzyskanie bardzo wąskich ścieżek, o szerokościach  $>30\mu\text{m}$ . Niestety, aby uzyskać grafenową ścieżkę przewodzącą, musi ona być nadrukowana wielokrotnie, zazwyczaj więcej niż 20 razy [40]. Aby przyspieszyć proces drukowania ścieżek, zaprojektowany na potrzeby pracy wzór testowy składa się z kontaktów srebrowych oddalonych od siebie na odległość 2, 3 lub 4 mm. Różnice w odległości pozwalają na ocenę rezystancji powierzchniowej warstwy z uniknięciem błędów jej kształtu.

Technologia powlekania natryskowego pozwala w łatwy sposób wykonywać powłoki na dużych powierzchniach. Aby zbadać przewodność warstw i ocenić ich rezystancję z uniknięciem błędów kształtu, w pracy wykorzystano wzór testowy zaproponowany w literaturze [23], umożliwiający badanie rezystancji warstwy przy wykonywaniu ścieżek i warstw o różnych wymiarach.

Standardową miarą, umożliwiającą porównanie przewodności warstw w elektronice drukowanej, jest przewodność na kwadrat, której jednostką jest ohm na kwadrat [ $\Omega/\square$ ]. Zaprojektowane w pracy wzory testowe umożliwiają pomiar tego parametru. Ze względu na to, iż grubość wytwarzanych warstw jest porównywalna i nie przekraczała  $1\mu\text{m}$ , przewodność na kwadrat pozwala na porównanie otrzymanych wyników związanych z właściwościami elektrycznymi warstw otrzymanych obiema technologiami: drukiem strumieniowym oraz powlekaniami natryskowymi.

#### **4.4. Metody badawcze stosowane do charakterystyki właściwości biologicznych grafenowych ścieżek i warstw**

##### **4.4.1. Metody badania cytotoksyczności warstw grafenowych**

Ponieważ cytotoksyczność często zależna jest od rodzaju komórek, z którymi badany materiał wchodzi w interakcję [48], [49], w pracy zbadano oddziaływanie GNP na dwa dodatkowe rodzaje komórek: ludzkie fibroblasty (HDF – Human Dermal Fibroblasts) oraz mysie, płodowe, neuralne komórki macierzyste (NE-4C(ATCC)). Badania przeprowadzono dzięki uprzejmości Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. M. Nałęcz w Warszawie.

Komórki hodowano w dedykowanym dla nich medium hodowlanym. Dla fibroblastów ludzkich linii HDF było to FGM (ang. Fibroblast Growth Medium; Sigma Aldrich). Dla neuralnych komórek macierzystych NE-4C(ATCC) było to EMEM (ang. Eagle's Minimum Essential Medium) suplementowane 10% płodową surowicą bydlęcą, l-glutaminą oraz kwasem retinowym. Komórki hodowano do osiągnięcia 80% konfluencji w płytce hodowlanej o powierzchni  $25\text{ cm}^2$ . Następnie komórki trypsynizowano i odwirowano (125xg, 6min.  $4^\circ\text{C}$ ).

Kolejnym krokiem było zlanie supernatantu i zawieszenie komórek w dedykowanym medium hodowlanym, a następnie zliczenie ich pod mikroskopem przy użyciu komory Bürkera. W eksperymencie zastosowano fibroblasty skóry ludzkiej z pasażu 5 oraz komórki macierzyste neuralne z pasażu 8. Hodowle prowadzono w standardowych płytkach polipropylenowych 6-cio dołkowych umieszczonych w inkubatorze komórkowym.

Komórki w liczbie po  $2 \times 10^3$  na  $1 \text{ cm}^2$  umieszczano w dołku hodowlanym i inkubowano w warunkach standardowych, w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  z atmosferą 5%  $\text{CO}_2$ . Następnie hodowle trypsynizowano po dobie oraz siedmiu dniach do oznaczeń cytometrycznych oraz utrwalano aldehydem glutarowym.

Żywotność fibroblastów oceniano dodatkowo po dobie oraz siedmiu dniach hodowli w reakcji cytochemicznej z jodkiem propidyny w cytometrze przepływowym FACS Canto. Jodek propidyny (PI) przenika jedynie przez uszkodzoną błonę komórkową interkalując pomiędzy nici dwuniciowych kwasów nukleinowych, emitując jasnoczerwoną fluorescencję w apoptotycznych i martwych komórkach.

Cytometr przepływowy FACS Canto (Becton Dickinson Immuno-cytochemistry Systems, USA) wyposażony w laser argonowy (488 nm), pozwala na analizę wyników przy pomocy systemu CellQuest (Becton Dickinson, USA). Analizowane komórki są w programie komputerowym FACS DIVA oddzielane od pozostałych przy pomocy charakterystyk świetlnych (bramka FSC, SSC oraz FL1/FL2).

Komórki po zakończeniu hodowli odklejano od podłoża z zastosowaniem trypsyny. Po odwirowaniu zlewano supernatant i zawieszano fibroblasty w 0,9% NaCl, następnie dodawano jodek propidyny (docelowe stężenie PI  $5 \mu\text{g/ml}$ ). Po 7 i 14 dniach hodowle prowadzone na szkiełkach utrwalano 4% paraformaldehydem (PFA).

#### **4.4.2. Metody badania stymulacji proliferacji komórek macierzystych**

Mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej (ADSC ang. Adipose derived stem cells) są zdolne do różnicowania w wiele wyspecjalizowanych typów komórek, takich jak osteoblasty, chondrocyty, adipocyty, miocyty, hepatocyty i inne [153], [154], co czyni je szczególnie przydatnymi do regeneracji tkanek w wielu przypadkach zaburzeń klinicznych [155], [156]. Ponadto ADSC można łatwo pozyskiwać w dużych ilościach przy użyciu procesu liposukcji. Dlatego ADSC zostały wybrane w pracy do określenia cytozgodności oraz zdolności warstw grafenowych do stymulowania czynników wzrostu i proliferacji komórek macierzystych. Badania wykonane zostały w Centrum Badań Przedklinicznych i Technologii w Warszawie [155].

Mezenchymalne komórki ADSC zawieszono w kompletnej pożywce hodowlanej (CCM). Pożywka składała się z DMEM uzupełnionego o: 10% FBS, 1% antybiotyku-antymikotycznego (Gibco), 2 mM L-glutaminy (Gibco) i 5 ng/ml czynnika wzrostu fibroblastów (FGF-2) (Sigma Aldrich). Po odwirowaniu i ponownym umieszczeniu w CCM, zawiesinę komórek przesączono przez filtr 100  $\mu$ m. Komórki zliczono w hemocytometrze i wysiano do naczyń hodowlanych T75 z gęstością 2-3 miliony komórek na naczynie. Komórki hodowano w wilgotnej atmosferze w 37°C i 5% CO<sub>2</sub>. Pożywkę hodowlaną wymieniono po 24 godzinach po wysianiu [155].

Polistyrenowe płytki do hodowli komórkowych (TCPS) najpierw pokryto przy użyciu 25  $\mu$ l atramentu nałożonego do każdej studzienki 96-studzienkowej płytki hodowlanej. Płytkę następnie przemyto dwukrotnie sterylnym PBS. Komórki ADSC trypsynizowano i wysiano na przygotowaną płytkę przy gęstości  $2,4 \times 10^3$  komórek na dołek hodowlany. Komórki hodowano w CCM przez 3 dni, w wilgotnej atmosferze w 37°C i 5% CO<sub>2</sub>. Hodowle obserwowano codziennie pod mikroskopem odwróconym. W trzecim dniu pożywkę aspirowano i do każdego dołka dodano 200  $\mu$ l roztworu Alamar Blue (Life Technologies) w pożywce DMEM w stosunku 1:10. Komórki dalej inkubowano przez 4 godziny, a otrzymany supernatant przeniesiono do 96-dołkowej płytki. Intensywność fluorescencji roztworu przy wzbudzeniu 540/10 nm i emisji 620/10 nm zmierzono w czytniku płytek FluorStar (BMG Labtech). Roztwór Alamar Blue inkubowany bez komórek zastosowano jako układ kontrolny - bazowy. Sygnał znormalizowano do komórek ADSC hodowanych w niepowlekanym GNP, standardowej płytce hodowlanej.

Test Alamar Blue polegał na enzymatycznej redukcji niefluorescencyjnego substratu (rezazuryna) do fluorescencyjnego produktu, którą przeprowadzają jedynie żywe komórki. Ilość produktu (intensywność fluorescencji) jest wprost proporcjonalna do liczby żywych komórek i aktywności metabolicznej komórek. Intensywność fluorescencji została znormalizowana do komórek hodowanych na TCPS (żywołność 100%).

Obserwację poklatkową (ang. time-lapse) komórek przeprowadzono przy użyciu mikroskopu Nikon Ti-Pad. W komorze mikroskopu ustawiono temperaturę 37°C i przepływ 5% CO<sub>2</sub>. Do obserwacji użyto obiektywu 10x, co skutkowało całkowitym powiększeniem 150x w rejestrowanych obrazach. Ustawiono pola obserwacji tak, aby około połowę zajmowała linia z warstwą grafenową, a drugą połowę – z czystą płytką TCPS.

#### 4.4.3. Metody oceny antyseptyczności warstw grafenowych

Adhezja komórek, w szczególności gronkowców do powierzchni abiotycznych stanowi duży problem kliniczny. Komórki bakterii mogą przylegać do powierzchni materiałów biomedycznych, tworząc biofilmy – zorganizowane, wielowarstwowe struktury, składającą się z jednego lub wielu gatunków drobnoustrojów, ściśle związanych z powierzchnią [157], [158].

Szczególnie komórki gronkowców stanowią jedną z przyczyn groźnych zakażeń u pacjentów, u których w celach diagnostycznych czy terapeutycznych istnieje konieczność zastosowania cewników naczyniowych czy urologicznych, wenflonów, drenów, zespołów naczyniowych lub implantów z tworzyw sztucznych, endoprotez stawowych czy kostnych. Z tego powodu do badań antyseptyczności warstw grafenowych i zdolności blokowania tworzenia biofilmu wybrano komórki gronkowców *Staphylococcus epidermidis* [159], [160]. Badania wykonane zostały w Wydziale Mikrobiologii Centralnego Szpitalu Klinicznego w Warszawie.

Próbki badanych materiałów zostały wysterylizowane tlenkiem etylenu. Sterylne szklane probówki zawierające  $10 \pm 0,5$  ml ciekłego ośrodka do infuzji mózgu (Graso) inokulowano 0,5 ml zawiesiny zawierającej bakterie *Staphylococcus* o gęstości 0,5 w skali McFarlanda. Badane próbki hodowano przez 7 dni w warunkach stacjonarnych w atmosferze otoczenia w temperaturze  $35 \pm 1$  ° C. Po zakończeniu okresu inkubacji próbki przepłukano i aseptycznie przeniesiono do probówki zawierającej 5 ml buforowanego rozcieńczalnika o pH 7,0 (Biocorp). Długość czasu ekspozycji próbki na rozcieńczalnik wynosiła 3 minuty. Proces ten przeprowadzono w temperaturze pokojowej. Następnie próbki umieszczono w 3 ml 2% roztworu aldehydu glutarowego na 40 minut, a następnie przepłukano dwukrotnie zbuforowanym rozcieńczalnikiem w następujących warunkach: temperatura pokojowa, czas kontaktu 15 minut i rozcieńczalnik 5 ml. Próbki odwadniano w etanolu w szeregu wzrastających stężeń (30, 50, 70, 80 i 96%) przez 10 minut każdy. Na koniec próbki umieszczono w 99,8% etanolu na 20 minut, a procedurę powtórzono dwukrotnie. Próbki suszono w warunkach aseptycznych w komorze laminarnej przez 2 godziny. Kliniczny szczep *S. epidermidis* zastosowany w badaniu został wyizolowany od pacjenta z zakażeniem krwi obwodowej z centralnego żylnego cewnika. Mikroorganizm zidentyfikowano przy użyciu układu MS z desorpcją laserową wspomaganego matrycą (Biotyper™; Bruker). Szczep został zdeponowany w roztworze krioprotektanta (różnych producentów) i przechowywany w zamrażarce w temperaturze -70 ° C. W teście próbkę zaszczepiono na agarze Columbia (Graso) i inkubowano w  $35 \pm 1$  ° C. Badanie przeprowadzono przy użyciu drugiego pasażu mikroorganizmu.

Metodą analizy tworzenia biofilmu, umożliwiającą obrazowanie ogólnego wyglądu i specyficznych cech biofilmów tworzonych w różnych środowiskach, zaproponowana przez El Abed et al. [161], wykorzystywana często w literaturze [162]–[164] to użycie skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM ang. scanning electron microscope). W pracy także wykorzystano tę technikę do oceny zdolności blokowania tworzenia biofilmu przez warstwę grafenową. Wykorzystywano w tym celu mikroskop AURIGA CrossBeam Workstation firmy Carl Zeiss o maksymalnej rozdzielczości 1 nm dla napięcia przyspieszającego równego 30 kV. Aby rozproszyć ładunek z powierzchni próbki, próbki pokryto materiałem Au/Pd dla uzyskania warstwy przewodzącej (około 5 nm). Bakteryjne warstwy biofilmu oceniano przy różnych powiększeniach, pozwalających na najlepsze ich zobrazowanie na podłożach grafenowych.

#### **4.4.4. Technologia wytwarzania nanopłatków grafenowych dekorowanych nanocząstkami srebra**

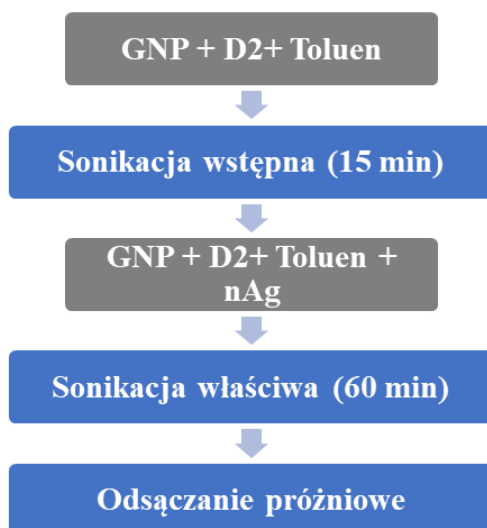
W związku z badaniami antyseptyczności warstw i powłok grafenowych na medycznym oprzyrządowaniu takim jak cewniki, wenflony, rurki tracheotomijne i inne, opracowano technologię wytwarzania nowego materiału fazy funkcjonalnej o zwiększonych właściwościach antybakteryjnych i antyseptycznych: poprzez udekorowanie nanopłatków grafenowych nanocząstkami srebra.

Nanopłatki grafenowe GNP oraz surfaktant wybrane zostały na podstawie selekcji, opisaney w rozdziale 5.3. GNP dekorowane były nanocząstkami srebra (nAg) z firmy Helioenergia, o średnich średnicach cząstek 6-8 nm (Tabela 2).

*Tabela 2. Materiały stosowane w technologii dekorowania nanopłatków grafenowych nanocząstkami srebra*

<b>Material</b>	<b>Skrót</b>	<b>Firma</b>	<b>Zawartość % wt.</b>
Nanopłatki grafenowe	GNP7	ITME, Z-8	60
Nanocząstki srebra	nAg	Helioenergia	40
Surfaktant AKM-0531 z serii MALIALIM	D2	NOF America Corporation	5% względem nanocząstek

Proces technologiczny wytwarzania nanopłatków grafenowych dekorowanych nanocząstkami srebra (GNP/nAg) wraz z czasami trwania sonikacji, opracowane na podstawie wstępnych badań [159], [165], przedstawiono na rysunku 19.

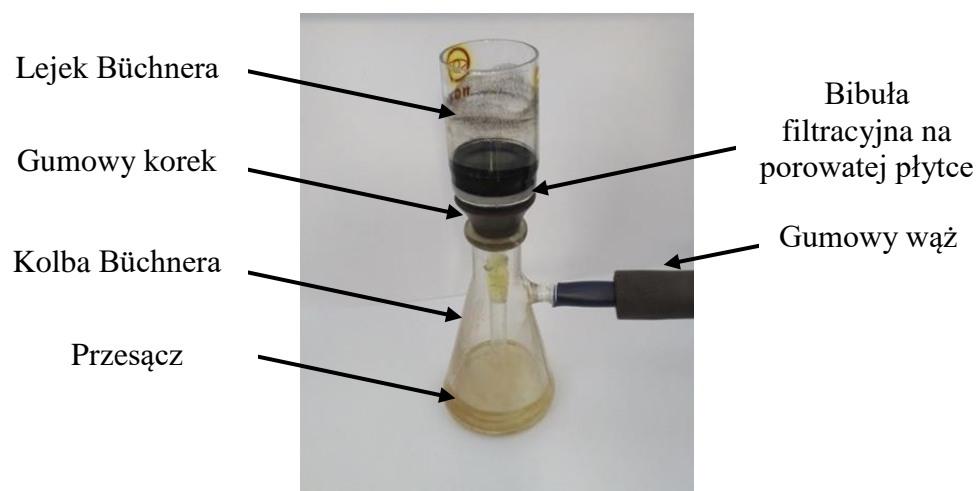


*Rysunek 19. Proces technologiczny wytwarzania nanopłatków grafenowych dekorowanych nanocząstkami srebra*

W pierwszym etapie procesu nanopłatki grafenowe GNP odważane były do zlewki, razem z 30 ml toluenu oraz surfaktantem. Dodanie dyspergatora miało na celu zarówno przeciwdziałanie powstawaniu aglomeratów nAg w dalszym etapie technologicznym, jak i ułatwienie przyłączenia nanocząstek srebra do płatków grafenowych. Tak przygotowana zawiesina była przez 15 minut sonikowana w płuczce ultradźwiękowej InterSonic IS-1K o mocy  $5 \text{ W/cm}^3$ , w celu utworzenia powłoki z surfaktantu na GNP. Następnie do zlewki dodawane były nanocząsteczki srebra. Całą zawiesinę ponownie sonikowano przez 60 minut. Pod wpływem ultradźwięków i zachodzącej w procesie kawitacji następuje osadzanie nanocząsteczek srebra na płatkach grafenowych. Po zakończeniu sonikacji, w celu otrzymania suchego proszku fazy funkcjonalnej GNP/nAg, wykonywano odsączanie próżniowe przy użyciu zestawu Büchnera (Rysunek 20).

Mikrostruktura otrzymanego proszku GNP/nAg oceniana była na podstawie mikroskopowych obrazów uzyskanych przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego AURIGA CrossBeam Workstation w zakładzie Instytutu Technologii Materiałów Elektronicznych w Warszawie.





*Rysunek 20. Zestaw Büchnera do odsączania próżniowego w procesie wytwarzania nanopłatków grafenowych dekorowanych nanosrebrem*

## 5. Opracowanie kompozycji biozgodnych, przewodzących atramentów grafenowych

### 5.1. Heterofazowe atramenty do elektroniki drukowanej

Jednym z głównych wyzwań elektroniki drukowanej jest skomponowanie materiałów heterofazowych, zwanych atramentami lub tuszami, dzięki którym przy użyciu różnych technik drukarskich możliwe jest wytwarzanie przewodzących warstw, wzorów i ścieżek, zapewniających jednocześnie wymaganą wydajność elektryczną i mechaniczną [38].

Kompozytowe zawiesiny heterofazowe składają się z trzech głównych komponentów: nośnika, rozpuszczalnika oraz fazy funkcjonalnej. Często dodatkowo w skład kompozytu wchodzi także surfaktant [38].

Nośnik stanowi osnowę nanocząstek materiału fazy funkcjonalnej. Dodany do atramentu pokrywa nanocząstki, zapewniając ich adhezję do podłoża po wydruku umożliwiając tym samym wytwarzanie przewodzących warstw [39]. W atramentach najczęściej stosowane są takie materiały jak: glikol etylenowy [36], [166], glicerol [35], [167], glikol dietylenowy [120], DMF i NMP [40] oraz terpineol.

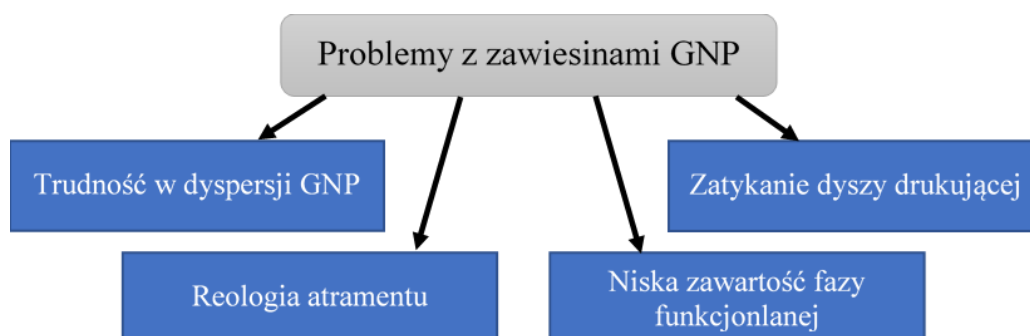
Dyspergatory oraz surfaktanty, zwane także stabilizatorami, są komponentami poprawiającymi dyspersję (równomierne rozproszenie) cząstek w nośniku, zmniejszając ich osiadanie na dnie – sedymentację. Stwarzają one na granicy osnowy i fazy funkcjonalnej cienką warstwę zapobiegającą aglomerowaniu się cząstek. Dzięki temu otrzymuje się jednorodną zawiesinę atramentu, która po nadruku tworzy równomierną warstwę o niskiej chropowatości, co przyczynia się jednocześnie do zwiększenia jej przewodnictwa elektrycznego [39]. Surfaktanty wpływają także znacząco na właściwości reologiczne zawiesin, poprzez obniżenie lepkości i napięcia powierzchniowego atramentów. Najczęściej stosowane w kompozycji atramentów surfaktanty to kwasy organiczne, bezwodniki kwasów, tiole, fosforany organiczne oraz polimery z reaktywnymi, polarnymi grupami funkcyjnymi [168]. Do atramentów dodawane są zarówno materiały takie jak sodium n-dodecyl sulphate (SDS) [120] jak i inne surfaktanty komercyjne [121].

Jednym z najistotniejszych składników atramentów przewodzących jest faza funkcjonalna, kształtująca fizyczne właściwości atramentu oraz decydująca o właściwościach elektrycznych otrzymanych z nich warstw [169]. Fazę funkcjonalną atramentów przewodzących mogą tworzyć różne materiały proszków metali, takie jak złoto [170], srebro lub nanocząstki srebra [171]–[173] czy miedź [174]. Jednakże materiały te posiadają szereg wad utrudniających wykorzystanie ich przy produkcji funkcjonalnych materiałów

heterofazowych. Przede wszystkim, nanocząstki metali są często niestabilne w standardowo stosowanych rozpuszczalnikach [37], takich jak: alkohol etylowy [42], aceton [36], alkohol izopropylowy [37] oraz woda [35], [36], [166], [167]. Miedź jest materiałem, który bardzo szybko ulega utlenieniu [34], [38] a materiały metaliczne, w tym złoto i srebro, są zbyt drogie [34], [38], [120], aby wykorzystywać je w produkcji atramentów. Trwające poszukiwania pozbawionych powyższych wad, wysoko przewodzących cząstek, mogących pełnić funkcję fazy funkcjonalnej, skupiły się ostatnio na materiałach węglowych, takich jak nanorurki węglowe [175]–[178] oraz różne formy grafenu [37], [40], [120], [121], [179].

Z grafenem wiąże się ogromne nadzieje jako z materiałem dedykowanym elektronice drukowanej [39], którego zastosowanie w atramentach jest często omawiane w literaturze. Zastosowanie grafenu do wytwarzania ścieżek i warstw metodami elektroniki drukowanej związane jest z doskonałymi właściwościami tego materiału (opisanymi w rozdziale 1.1): elektrycznymi, optycznymi i mechanicznymi a także stabilnością chemiczną i termiczną [35], [37]–[40], [42], [121].

Nanopłatki grafenowe, mimo ogromnego potencjału, są rzadko wykorzystywane jako faza funkcjonalna, ponieważ wytworzenie jednorodnego, stabilnego atramentu bazującego na tym materiale pozostaje wciąż dużym wyzwaniem [39], [120]. Istnieje kilka problemów, przedstawionych na rysunku 21, które powinny zostać rozpatrzone podczas wytwarzania i drukowania heterofazowych, przewodzących zawiesin bazujących na nanopłatkach grafenowych [38], [40].



Rysunek 21. Problemy związane z wytwarzaniem i zastosowaniem grafenowych atramentów heterofazowych bazujących na nanopłatkach grafenowych

Warunkiem wstępnym, niezbędnym do wytworzenia atramentów do różnych zastosowań w elektronice drukowanej, jest uzyskanie dobrej dyspersji grafenu w rozpuszczalniku [36]. Oznacza to, iż GNP. powinny utrzymywać się w całej objętości atramentu. Niezwykle istotne jest także, aby produkowany atrament był stabilny. Cząstki fazy

funkcjonalnej nie powinny sedymentować od razu po zakończeniu procesu wytwarzania [38], [41]. Wymagana jest również jednorodność zawiesiny, co oznacza, iż przy obserwacji okiem nieuzbrojonym nie są rozróżnialne pojedyncze cząstki i aglomeraty fazy funkcjonalnej w zawiesinie. Niestety, GNP są bardzo trudno dyspergowalne, a ze względu na ich nanometrowe wymiary skutkujące silnymi oddziaływaniami van der Waalsa [120], łatwo ulegają aglomeracji. Powoduje to znaczne utrudnienia w uzyskaniu jednorodnej, stabilnej, grafenowej zawiesiny heterofazowej.

Wytwarzany atrament grafenowy powinien wykazywać właściwości reologiczne, takie jak lepkość i napięcie powierzchniowe, dobrane do wymogów danej techniki wykonywania ścieżek. Dla techniki druku strumieniowego i powlekania natryskowego wymagana jest niska lepkość, dostosowana tak, aby możliwe było wytworzenie kropli bez wyciekania atramentu z dyszy lub jego wysychania w jej środku. Rekomendowany do techniki druku strumieniowego zakres lepkości to 1-25mPas [38], [40], [41] a do powlekania natryskowego: 0,7 do 2 mPas [180]. Właściwa lepkość atramentu pozwala także na uniknięcie nieregularnego i niekontrolowanego rozplywu materiału atramentu na podłożu.

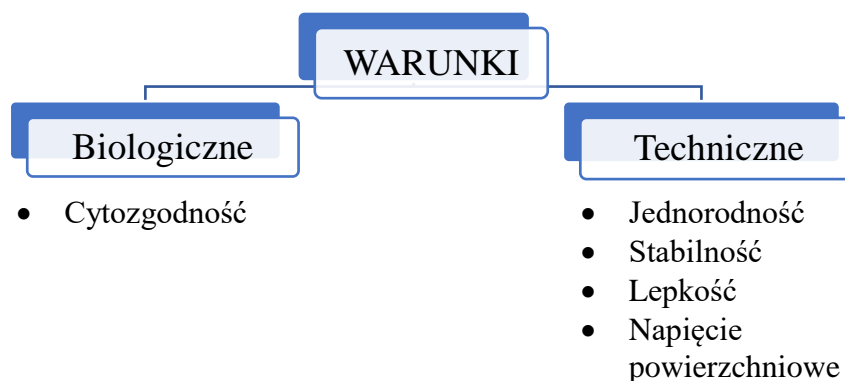
Zawartość GNP w atramentach do druku strumieniowego i powlekania natryskowego jest bardzo niska, zawiera się w zakresie 0,002-1 wag. % [38]. Najczęściej stosowana jest zawartość rzędu 0,1 wag % [120] [34] [121]. Z jednej strony zwiększenie zawartości GNP w atramencie skutkuje najczęściej zatykaniem dyszy drukarskiej, a w konsekwencji – zaburzeniem i często przerwaniem procesu druku. Z drugiej strony, przy niskiej zawartości wypełniacza, otrzymanie przewodzącej grafenowej warstwy jest utrudnione, a efektywność techniki drukarskiej – zmniejszona [38]. Większa zawartość GNP skutkuje bowiem lepszą przewodnością drukowanych ścieżek [23], pozwala więc na zmniejszenie liczby powtórzeń nadruku koniecznych do wytworzenia przewodzących wzorów [41].

W technikach druku strumieniowego i powlekania natryskowego, należy zwrócić szczególną uwagę na zagrożenie przerwania procesu nadruku ścieżek. Aby tego uniknąć, średnice nanocząstek w atramencie nie powinny przekraczać 1/50 średnicy dyszy [37], [181]. Niespełnienie tego warunku może powodować niestabilność w procesie drukowania związaną z gromadzeniem się cząstek fazy funkcjonalnej na krawędziach dyszy, skutkującą początkowo zmianą trajektorii lotu kropli, a ostatecznie nawet całkowitym zatkaniem dyszy [37]. GNP, ze względu na łatwość aglomeracji, mogą często powodować trudności w trakcie procesu wykonywania ścieżek i warstw przewodzących.

Aby spełnić wszystkie wymagania stawiane atramentom grafenowym niezbędne jest staranne, uwzględniające wymienione wyżej czynniki, opracowanie składu materiału

heterofazowego oraz szczegółowe zaplanowanie technologii jego wytwarzania. Wysiłek z tym związany może pozwolić na uzyskanie stabilnego kompozytu o odpowiednich właściwościach reologicznych, z wysoką zawartością fazy funkcjonalnej, wolnego od aglomeratów, zachowującego jednocześnie właściwości pierwotnego grafenu.

Głównym celem pracy było opracowanie kompozycji i technologii wytwarzania biozgodnych atramentów bazujących na nanopłatkach grafenowych, możliwych do nanoszenia techniką druku strumieniowego. Wysoki poziom trudności zadania wynikał z konieczności spełnienia przez atrament dwóch kategorii warunków [119], [182] – przedstawionych na rysunku 22.

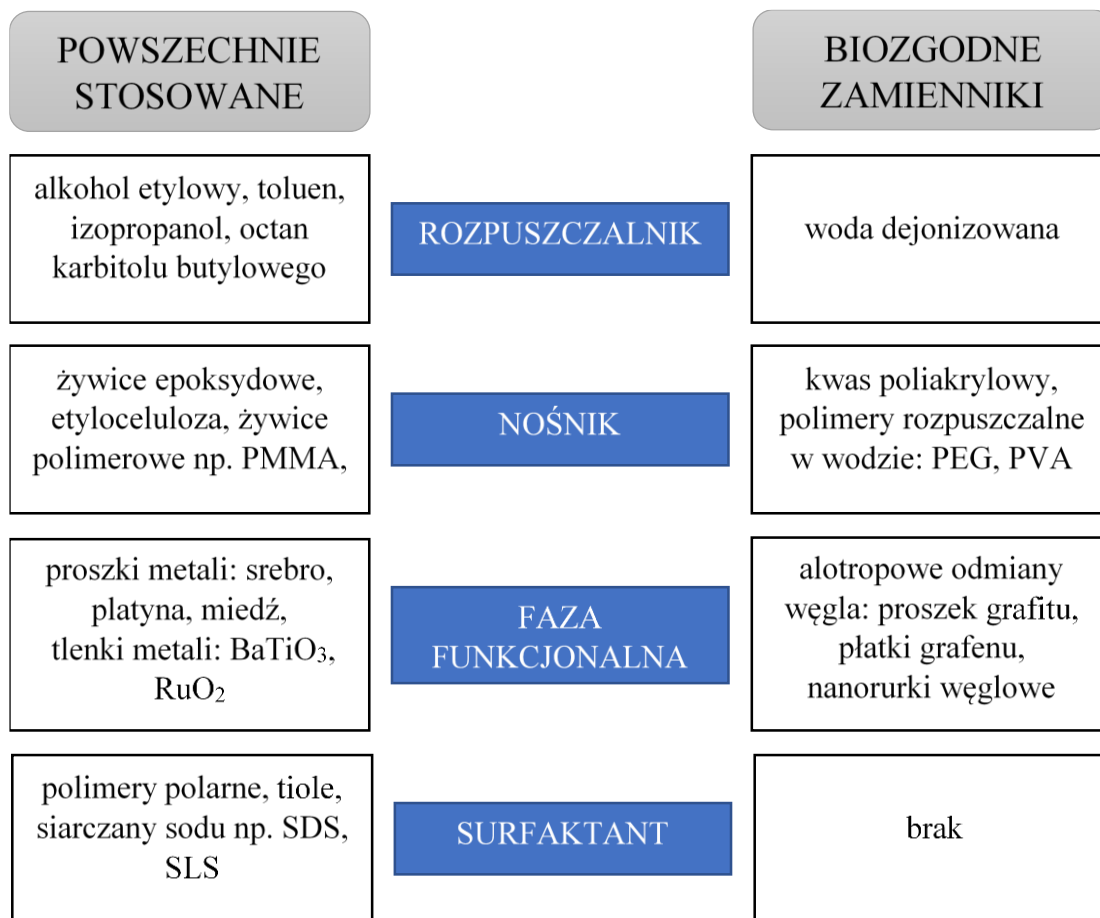


Rysunek 22. Warunki stawiane biozgodnym atramentom

Po pierwsze, ze względu na zastosowanie w biomedycynie, powstały atrament musi być cytozgodny, tzn. nie powodujący zmian w integralności błony komórkowej, w aktywności enzymów związanych z metabolizmem komórki czy też w zdolności do proliferacji. Po drugie, musi spełniać warunki techniczne, takie jak stabilność i jednorodność, umożliwiające poprawne drukowanie atramentu, oraz warunki reologiczne określone w technice druku strumieniowego [119], opisane szczegółowo w rozdziale 7.1.2.

Niestety, większość materiałów wykorzystywanych do wytwarzania zawiesin heterofazowych, stosowanych w elektronice drukowanej, jest biologicznie szkodliwa [183], tzn. powodująca defekty w strukturze żywych komórek, skutkujące zaburzeniami ich funkcji lub ich śmiercią. Rozpuszczalniki organiczne, w których zawieszane są cząstki fazy funkcjonalnej, takie jak toluen, izopropanol, alkohol etylowy, a także żywice i polimery powszechnie stosowane jako nośniki: żywica epoksydowa, glikol etylenowy, polimetakrylan metylu, oraz surfaktanty, niezbędne przy wykonywaniu atramentów do druku strumieniowego, są uważane za toksyczne [12]. Na podstawie analizy literaturowej stworzono schemat przedstawiony na rysunku 23. Prezentuje on materiały wykorzystywane do wytwarzania

atramentów heterofazowych przeznaczonych do technologii elektroniki drukowanej oraz ich biogodne zamienniki, które wykorzystane zostały w prowadzonych badaniach.



Rysunek 23. Materiały stosowane do wytwarzania atramentów do zastosowań elektroniki drukowanej i ich biogodne zamienniki

## 5.2. Dobór rozpuszczalnika

Rozpuszczalnik, wraz z nośnikiem tworzą bazę atramentu. Rozpuszczalnik musi być kompatybilny chemicznie z nośnikiem, co oznacza zdolność do rozpuszczenia materiału nośnika. Ponadto, powinien charakteryzować się wysoką lotnością, tak aby po nadruku ścieżki nie nastąpił nieregularny rozptył atramentu na podłożu. Dzięki odparowaniu rozpuszczalnika dostosowanego do prędkości druku, na podłożu otrzymywany jest pożądaný wzór, składający się z nośnika i cząstek fazy funkcjonalnej.

Powszechnie znanym rozpuszczalnikiem, stanowiącym nieodłączną i niezbędną część środowiska biologicznego, charakteryzującym się w związku z tym biogodnością, jest woda. Wykorzystanie tego rozpuszczalnika w atramentach związane jest jednak z komplikacją procesu drukowania wzorów. Wysoka temperatura wrzenia wody, wynosząca 100°C, oznaczająca powolne odparowywanie kropli, utrudnia formowanie ścieżek. Proces nadruku

staje się nieekonomiczny czasowo. Mimo to, wybór tego rozpuszczalnika jest wielce pożądanym przy produkcji atramentów do zastosowań biologicznych, szczególnie do bezpośredniego kontaktu z komórkami. Alternatywnym rozpuszczalnikiem jest aceton. Dzięki prawie dwukrotnie niższej temperaturze wrzenia wynoszącej 56°C, przy użyciu acetonu w procesie technologicznym druku ścieżek lub warstw, uzyskać można szybsze, niż w przypadku wody, odparowywanie kropli. Wykorzystanie tego rozpuszczalnika w badaniach biologicznych zakłada, iż po procesie powlekania nastąpi suszenie, dzięki któremu 100% rozpuszczalnika ulegnie odparowaniu, a w warstwie zostaną jedynie nietoksyczne: faza funkcjonalna i nośnik.

Rozpuszczalnikiem wchodzącym w skład atramentów wytwarzanych w pracy była woda dejonizowana lub aceton. Woda dejonizowana uniemożliwiała bowiem wytworzenie ścieżek i warstw na nietypowych podłożach stosowanych w pracy, takich jak cewniki czy płytki do hodowli komórkowych. Materiały te są niewytrzymałe na działanie wysokich temperatur. Możliwość uszkodzenia podłoża, podczas procesu wstępnego suszenia, opisanego w rozdziale 4.2.3, podczas którego podłoże podgrzewane jest do temperatury przyspieszającej odparowywanie kropli wody (80°C), eliminowała ją jako rozpuszczalnik atramentów zastosowanych do druku na nietypowych podłożach. W związku z tym część prac uwzględniała zamianę rozpuszczalnika wodnego na rozpuszczalnik odparowujący przy niższych temperaturach suszenia wstępnego (60°C) – aceton.

### **5.3. Dobór materiału nośnika**

Nośnik, zwany także osnową fazy funkcjonalnej, jest to materiał polimerowy, spajający cząstki wypełniacza [39], [184]. Nadaje on kompozycji właściwe dla wybranej technologii drukarskiej cechy reologiczne umożliwiając drukowalność zawiesiny. Drukowalność rozumiana jest jako zestaw właściwości fizycznych atramentu, umożliwiających poprawny proces nadruku ścieżki. Poprawny proces nadruku, opisany w rozdziale 7.1.4, osiągnąć jest w druku strumieniowym dzięki generowaniu z dyszy powtarzalnych kropli o tych samych średnicach, tworzących na podłożu ścieżki charakteryzujące się wysoką jakością, tzn. ciągłe, ścieżki, o jednorodnej grubości i równych krawędziach oraz wysoką rozdzielczością w zakresie 30-50 μm.

Przy pracy z materiałami biologicznymi wykorzystywane są często rozpuszczalne w wodzie polimery o różnej masie cząsteczkowej, takie jak poliglikol etylenowy (PEG), polialkohol winylowy (PVA), a także glicerol i komercyjne materiały dedykowane do hodowli komórkowych, takie jak Pluronic (PLR). Wiele źródeł wskazuje na cytozgodność tych materiałów [73], [116], [119], [127], [128], [185], [186]. Na podstawie wykonanej analizy

literaturowej jako potencjalne nośniki grafenowych, przewodzących atramentów heterofazowych wybrano do badań materiały przedstawione w tabeli 3.

*Tabela 3. Materiały testowane jako nośniki atramentów*

<b>Nr</b>	<b>Nazwa</b>	<b>Skrót</b>	<b>Masa cząsteczkowa</b>	<b>Firma</b>
1.	Poliglikol etylenowy 400	PEG 400	400	Fluka Analytical
2.	Poliglikol etylenowy 1500	PEG 1500	1500	Loba-chemie Wien Fischamend
3.	Polialkohol winylowy	PVA 31	31.000-50.000	Acros Organics
4.	Polialkohol winylowy	PVA 85	85.000-124.000	Acros Organics
5.	Gliceryna bezwodna	GLR	92.1	Avantor Performance Materials Poland
6.	Pluronic F-127	PLR	12.500	Sigma-Aldrich

W atramentach wytwarzanych do zastosowań elektroniki drukowanej, takich jak druk strumieniowy, zawartość nośnika w kompozycie jest zależna od lepkości, wymaganej w danej technologii. Jak już wspomniano, dla druku strumieniowego lepkość, zapewniająca zdolność formowania prawidłowej, regularnej kropli wpływającej na poprawność procesu drukowania, zawiera się w przedziale 1-25 mPas [38], [40], [41]. W zależności od rodzaju stosowanego materiału osnowy oraz wybranej fazy funkcjonalnej determinowana jest zawartość nośnika w atramencie. Wraz ze wzrostem zawartości nośnika w atramencie, wzrasta prawdopodobieństwo otrzymania jednorodnej zawiesiny i właściwej adhezji warstwy do podłoża. Dlatego w grafenowych atramentach heterofazowych, stosowanych w aplikacjach elektroniki drukowanej, stosuje się wysoką zawartość nośnika – od 10 do 30 % wag. [39], [41], [120]. Z kolei w atramentach biozgodnych powinno unikać się tak wysokich zawartości polimerów, tworzących nośnik, ponieważ w wysokim stężeniu mogą powodować degradację i śmierć komórek.

Ze względu na wymaganą biozgodność w pracy, podjęto próbę zmniejszenia zawartości nośnika w atramencie. Celem było zastosowanie najmniejszej możliwej zawartości, umożliwiającą jednocześnie wytworzenie jednorodnej zawiesiny heterofazowej. W związku z tym, podjęto próbę zawieszenia GNP w wodnym roztworze, zawierającym od 2% do 10% wag. materiału nośnika.

Stosowalność polimerów rozpuszczalnych w wodzie przy wytwarzaniu biozgodnych atramentów grafenowych, została w pracy określona poprzez zdolność do dyspersji, a więc



zawieszenia i rozproszenia GNP w tych materiałach. Procedura zawieszania GNP w materiale bazowym opisana została szczegółowo w rozdziale 4. Oczekiwany wynik byłoby otrzymanie zawiesiny heterofazowej, w której nie ma widocznych aglomeratów oraz nie są rozróżnialne pojedyncze cząstki GNP. W zawiesinie tej materiał GNP powinien być rozproszony równomiernie, w całej objętości i nie gromadzić się na dnie. W związku z tym, w pracy dyspersja oceniana była organoleptycznie pod kątem trzech kryteriów:

- Braku widoczności pojedynczych cząstek GNP
- Braku widoczności aglomeratów GNP
- Równomierności rozproszenia GNP w objętości zawiesiny

Lista wytworzonych atramentów, wraz z oceną ich stopnia dyspersji, przedstawiona została w tabeli 4. W tabeli 5. umieszczono natomiast zdjęcia, pozwalające na ocenę stopnia dyspersji.

*Tabela 4. Lista wytworzonych grafenowych zawiesin heterofazowych bazujących na różnych nośnikach, wraz z opisem uzyskanego stanu dyspersji fazy funkcjonalnej*

Nr	Nośnik	Zawartość	Ocena dyspersji		
			Brak cząstek GNP	Brak aglomeratów GNP	Równomierność rozproszenia
1.	PEG400	10%	NIE	TAK	TAK
2.		5%	NIE	NIE	TAK
3.	GLR	10%	NIE	TAK	TAK
4.		5%	NIE	NIE	TAK
5.	PEG1500	10%	TAK	TAK	TAK
6.		5%	TAK	TAK	TAK
7.		2%	TAK	TAK	TAK
8.	PVA31	10%	NIE	NIE	NIE
9.		5%	NIE	NIE	NIE
11.	PLR	10%	TAK	TAK	TAK
12.		5%	TAK	TAK	TAK
13.		2%	TAK	TAK	TAK

Przeprowadzone testy dyspersji fazy funkcjonalnej w wodnej zawiesinie, z różnymi rodzajami osnowy, pozwoliły na wykluczenie z dalszych badań materiałów alkoholi poliwinylowych (PVA) oraz gliceryny.

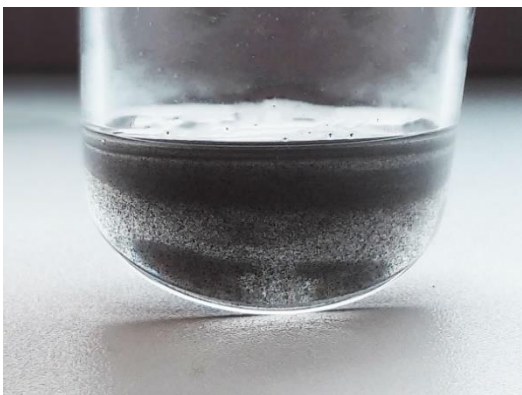
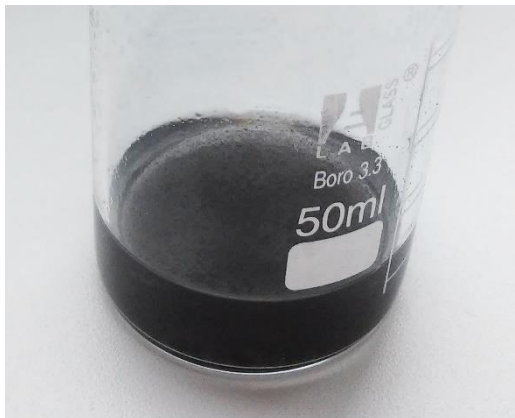
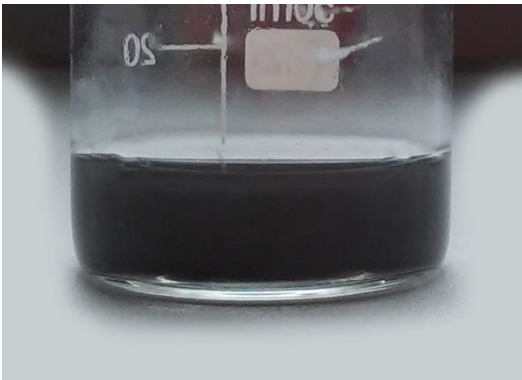
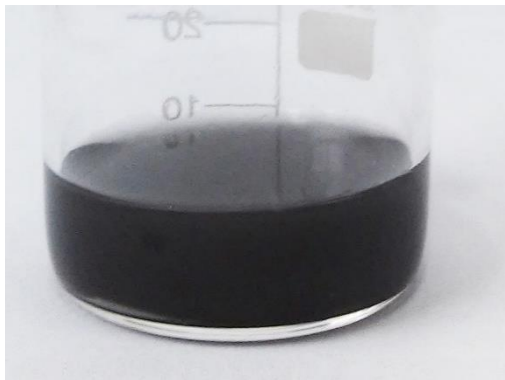
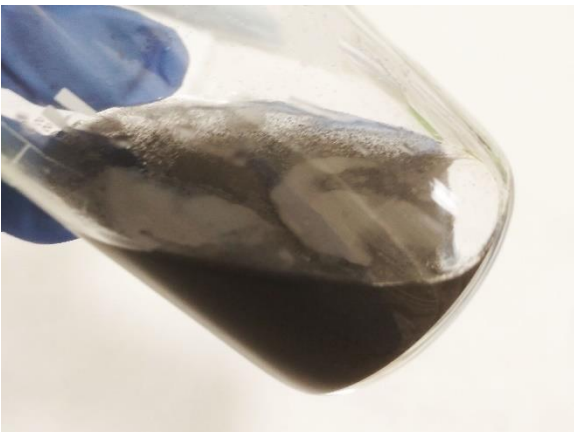
Długotrwała, trwająca ponad 24 h próba rozpuszczenia materiału polimerowego PVA85 w wodzie poskutkowało otrzymaniem niejednorodnej, wysokolepkiej zawiesiny. Próby rozpuszczenia nawet niskich zawartości tego materiału zakończyły się niepowodzeniem, wykluczono więc go z dalszych badań. Polimer PVA31, nawet zastosowany w dużej ilości, nie

umożliwił otrzymania zgodnej z postawionymi kryteriami dyspersji GNP. Już przy 10% w roztworze widoczne były poszczególne cząstki i aglomeraty GNP.

W podobny sposób przedstawiała się dyspersja GNP w wodnym, 10% roztworze gliceryny, w którym widoczne były gołym okiem aglomeraty nanocząstek. Dyspersja uzyskana dla 10% roztworu poliglikolu etylenowego PEG400 była lepsza od opisanych wyżej materiałów. W zawieszynie rozróżnialne były wprawdzie pojedyncze cząstki GNP jednak utrzymywały się one równomiernie w objętości kompozytu.

PEG1500 oraz Pluronic to materiały, w których udało się uzyskać dyspersję GNP, spełniającą wszystkie postawione kryteria, nawet przy tak niewielkiej zawartości nośnika, takiej jak 2% wagowo. GNP były równomiernie rozproszone w objętości kompozycji, po wytworzeniu nie osiadły na dnie a zawieszina była jednorodna: w jej objętości nie było widocznych aglomeratów i cząstek GNP. Oba materiały wybrane zostały do dalszych testów.

Tabela 5. Zdjęcia zawiesin GNP w różnych osnowach

<p>Atrament z osnową PVA31, z widocznymi aglomeratami GNP</p> 	<p>Atrament z osnową PEG400 z widocznymi cząstkami GNP</p> 
<p>Spełniający kryteria atrament z osnową PLR</p> 	<p>Spełniający kryteria atrament z osnową PEG1500</p> 
<p>Atrament z osnową GLR z widocznymi cząstkami GNP</p> 	

#### 5.4. Dobór materiału fazy funkcjonalnej

Faza funkcjonalna kształtuje fizyczne właściwości atramentu oraz decyduje o właściwościach elektrycznych otrzymanych z nich warstw [169]. Coraz częściej wykorzystywaną, przewodzącą fazą funkcjonalną są także różne postacie węgla m.in.: nanorurki węglowe [175]–[178] i nanopłatki grafenowe [37], [40], [41]. W kontekście aplikacji biomedycznych szczególnie istotne jest to, że materiały te, jako alotropowe odmiany węgla,

charakteryzuje cytozgodność [18], [24]. Jednak, ze względu na możliwość występowania zanieczyszczeń metalami wewnątrz nanorurek, jest to potencjalnie gorszy biomateriał węglowy od grafenu [13], [187].

Materiały grafenowe, w zależności od źródła, z którego są pozyskiwane i sposobu ich wytwarzania, mogą posiadać różne właściwości fizyczne. Ich różnice w powierzchni właściwej i wymiarach płatków w znaczący sposób wpływają na łatwość dyspersji płatków w zawieszynie oraz właściwości elektryczne i mechaniczne drukowanej warstwy [38]. Bardzo istotny jest także ich wpływ na zachowanie nanocząstek w stosunku do komórek. Właściwości fizyczne, fizykochemiczne i strukturalne determinują bowiem wpływ materiału na zdolność do penetracji komórek, przez co decydują jednocześnie o jego toksyczności lub cytozgodności [13], [18], [21].

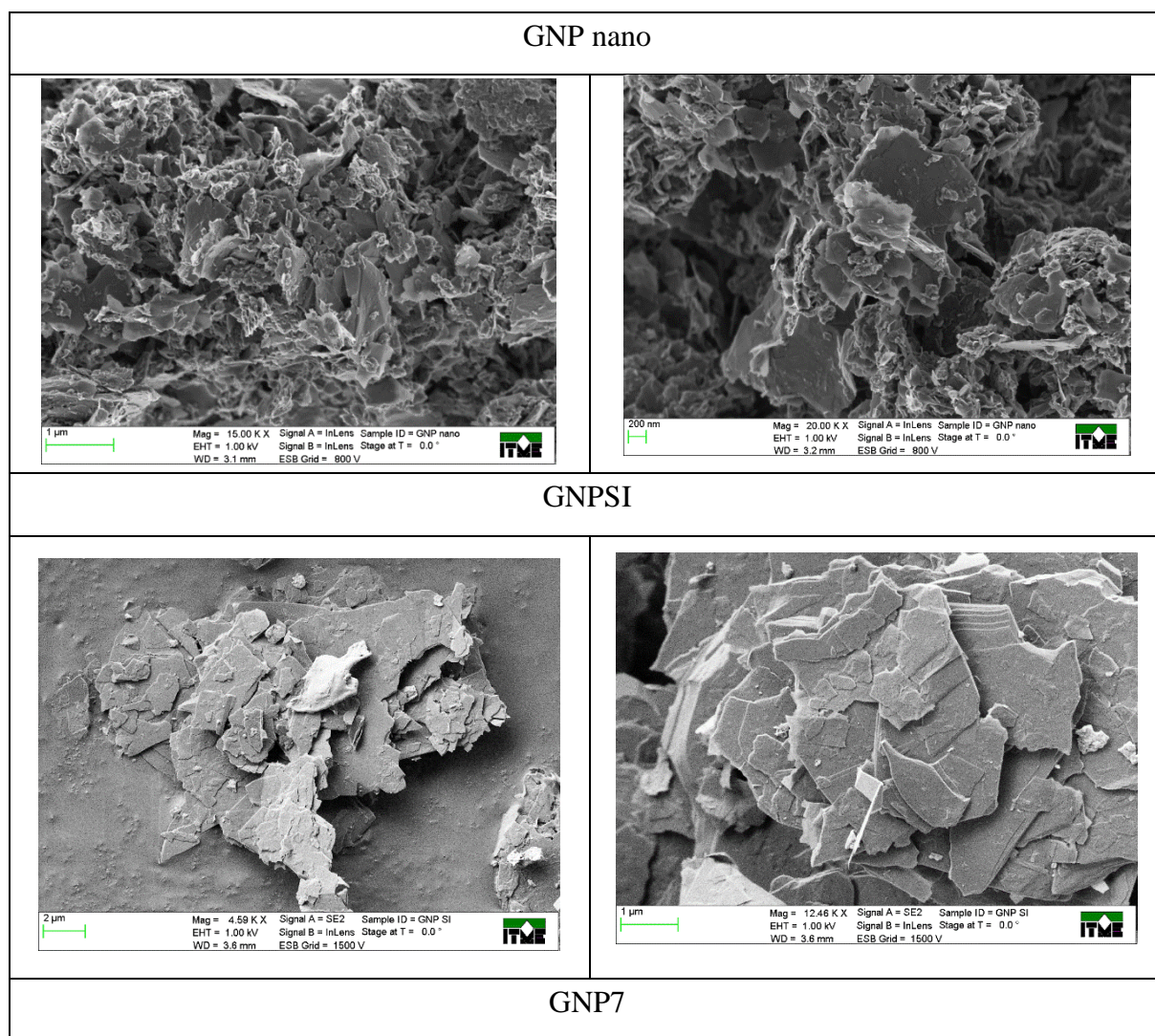
Niewątpliwymi zaletami płatków grafenowych GNP są ich właściwości elektryczne i zdolność przewodzenia prądu, będących niezbędnymi cechami fazy funkcjonalnej stosowanej do wytworzenia przewodzących atramentów. Ponadto wiele źródeł literaturowych wskazuje, iż materiały grafenowe, jako alotropowe odmiany węgla, charakteryzuje cytozgodność [185], [187], [188]. Z tego względu zostały one w pracy wybrane do zastosowania jako faza funkcjonalna wytwarzanego przewodzącego, biozgodnego atramentu. Po wstępnych badaniach wybrano pięć rodzajów nanopłatków grafenowych, różniących się źródłem pochodzenia i średnimi średnicami cząstek. Wybór ten umożliwił przeprowadzenie testów związanych z wpływem wielkości płatków na cytozgodność atramentów. W literaturze wielokrotnie podkreślana jest bowiem zależność cytozgodności nanocząstek od ich powierzchni właściwej, liczby warstw, czystości oraz przede wszystkim rozmiaru cząstek materiału, wchodzących w interakcję z komórkami [12], [18], [21].

*Tabela 6. Grafenowe materiały fazy funkcjonalnej*

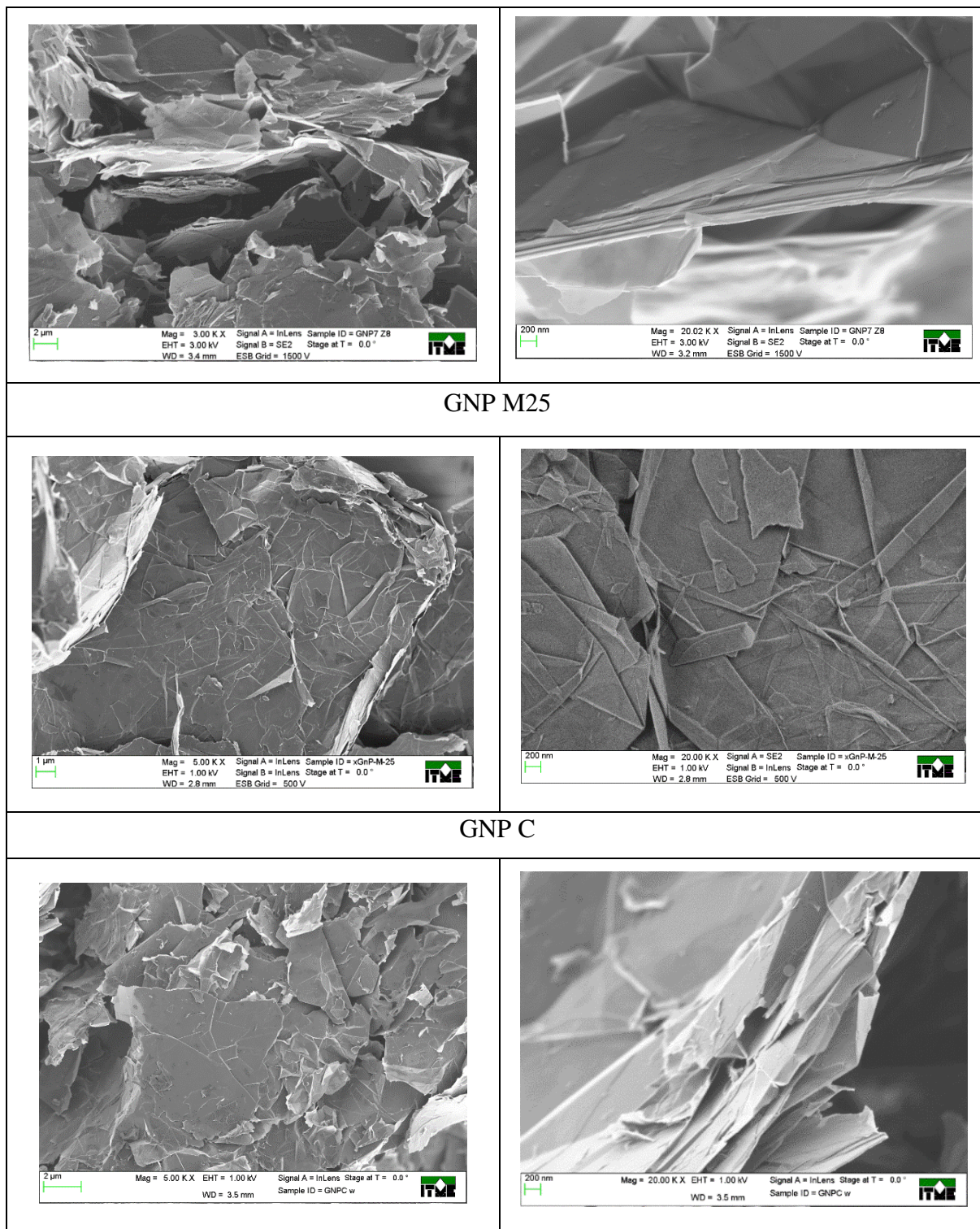
<b>Nazwa</b>	<b>Pochodzenie</b>	<b>Średnica płatków</b>
GNPnano	ITME, Z-8	< 2 $\mu\text{m}$
GNPSI	ITME, Z-8	< 8 $\mu\text{m}$
GNP7	ITME, Z-8	15 $\mu\text{m}$
GNP C	Cheap Tube	15 $\mu\text{m}$
GNP M25,	XG Science	20 $\mu\text{m}$

Z wykorzystaniem skaningowego mikroskopu elektronowego scharakteryzowano i zmierzono wielkości pięciu wyselekcjonowanych rodzajów nanopłatków grafenowych, przedstawionych w tabeli 6. Tabela 7. zawiera zdjęcia wszystkich badanych materiałów. Ze względu na znaczne różnice w wymiarach cząstek, zastosowano różne powiększenia zdjęć: od 3000 do 20000 dla tak, aby możliwe było jak najlepsze scharakteryzowanie każdego materiału.

*Tabela 7. Obrazy SEM grafenowych cząstek fazy funkcjonalnej*







GNP M25

GNP C

Na podstawie zdjęć SEM oceniono wielkości cząstek węglowych. Najmniejsze wymiary płatków widoczne były dla materiału GNPnano. Zmierzone wymiary wahały się od 720 nm do 1329 nm a średnia średnica płatków wynosiła około 1  $\mu\text{m}$ . Na zdjęciach przedstawiających GNPnano zauważyć można pojedyncze skupiska aglomeratów, niektóre z płatków tworzyły zawinięte, nieregularne skupiska. GNP SI miał bardzo zróżnicowane wymiary płatków. Niektóre, mniejsze, miały przybliżoną średnicę nawet 1,5  $\mu\text{m}$ ,

kiedy największe zmierzone – 8,85  $\mu\text{m}$ . Płatki te tworzyły zupełnie płaskie struktury, nie wykazywały podatności na aglomerowanie. Wymiary pozostałych materiałów, o większych średnicach wynosiły: GNP7 oraz GNPC – 15  $\mu\text{m}$  oraz GNPM25 – 20  $\mu\text{m}$ . Ponadto płatki GNP7, GNPM25, GNPC były wolne od skupisk aglomeratów.

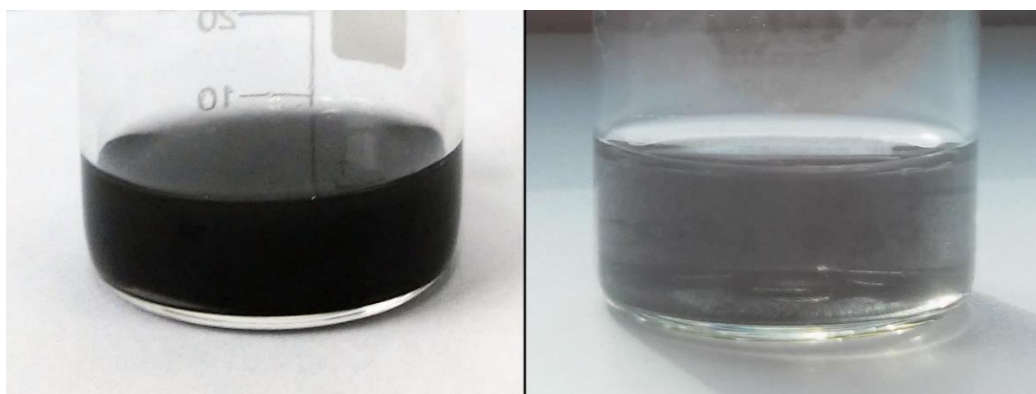
Każdy z przebadanych materiałów, ze względu na różnice w średniej średnicy płatków, może znaleźć zastosowanie w zawiesinach do różnych technik drukarskich. Do druku strumieniowego polecane jest stosowanie cząstek o jak najmniejszym wymiarze. Wynika to z problemów technologicznych procesu, związanych z czopowaniem wylotu dyszy. W głowicy drukarki cząstki zawarte w heterofazowym atramencie sedymentują i osadzają się na wylocie dyszy, co może skutkować zmianą trajektorii lotu kropli lub nawet przerwaniem procesu nadruku poprzez zatkanie dyszy [37]. Jak już wspomniano, aby uniknąć istotnych problemów z tym związanych, cząstki w atramencie heterofazowym powinny być mniejsze niż średnica dyszy drukarki strumieniowej. Najkorzystniejsze warunki druku uzyskuje się, jeśli cząstki są przynajmniej 50 razy mniejsze od średnicy dyszy [37], [181]. Ponieważ używana w pracy ma średnicę 50  $\mu\text{m}$ , do wytwarzania biogodnych przewodzących atramentów grafenowych do druku strumieniowego najlepszymi materiałami są GNPnano i GNP SI. Jednakże wraz ze wzrostem średnicy płatków, wzrastają także właściwości przewodnictwa wytworzonej warstwy [23]. Przy zastosowaniu technologii natrysku, w którym nie ma groźby zatkania dyszy drukującej, lepszym materiałem są płatki większe, a więc GNP7, GNPC lub GNPM25.

Przetestowano zdolność dyspersji wszystkich wymienionych rodzajów materiałów węglowych w wybranych osnowach polimerowych: PEG1500 oraz Pluronic.

Zawiesina zawierająca płatki grafenowe o najmniejszych średnicach GNPnano była trudna w dyspersji. Dostrzegalne w zawieszynie aglomeraty wpływały na niejednorodność uzyskanego materiału. Powstawanie aglomeratów, widocznych już na zdjęciach SEM, związane było z nanometrowymi wymiarami cząstek, powodujących występowanie bardzo silnych oddziaływań Van der Walsa między nimi [120]. Jednakże zarówno cząstki GNP jak i aglomeraty utrzymywały się w całej objętości zawiesiny. W związku z tym ten właśnie materiał zakwalifikowano do dalszych testów.

Wszystkie rodzaje płatków grafenowych o dużych średnich wymiarach: GNP7, GNPC oraz GNPM25, stworzyły jednorodne, heterofazowe zawiesiny o intensywnej, czarnej barwie. Zawieszenie w osnowie GNPSI o średnich rozmiarach płatków, także poskutkowało uzyskaniem jednorodnej zawiesiny, jednak charakteryzowała się ona szarą barwą. Uzyskana intensywność barwy bezpośrednio związana była z wymiarami płatków, co pokazano na

rysunku 24. Płatki o większych wymiarach zajmują więcej objętości w zawieszynie o ciemniejszej barwie.



*Rysunek 24. Porównanie intensywności barwy zawieszin zawierających tą samą zawartość fazy funkcjonalnej o różnych wymiarach płatków. Po lewej stronie: GNP7, 15  $\mu\text{m}$ , po prawej stronie: GNPSI, 8  $\mu\text{m}$*

Na podstawie przeprowadzonych obserwacji uznano, iż wszystkie wyselekcjonowane nanopłatki grafenowe mogą być zastosowane jako faza funkcjonalna w grafenowych, heterofazowych atramentach. Wszystkie pięć rodzajów zostało więc poddanych testom związanym z cytozgodnością względem mezenchymalnych komórek macierzystych, które zostały opisane w rozdziale 5.6.

### **5.5. Dobór materiału surfaktantu**

Surfaktanty są niezbędnym składnikiem atramentów w elektronice drukowanej. Wpływają one na zmniejszenie napięcia powierzchniowego atramentu, umożliwiając prawidłowe formowanie kropli w procesie nadruku oraz właściwy rozptył atramentu na podłożu [189]. Najistotniejsze jest jednak to, że surfaktanty ułatwiają uzyskanie prawidłowej dyspersji cząstek, będącej niezbędnym warunkiem uzyskania jednorodnego atramentu. Na podstawie analizy literaturowej można stwierdzić, iż do najczęściej stosowanych surfaktantów zaliczyć można polimery polarne, fosforany lub tiole [168], które stwarzają na granicy osnowy i fazy funkcjonalnej cienką warstwę zapobiegającą aglomerowaniu się cząstek. Dzięki temu otrzymuje się jednorodną zawieszynę atramentu, który po nadruku tworzy równomierną warstwę o niskiej chropowatości. Prowadzi to do obniżenia rezystancji tej warstwy. Ponadto cząstki, które nie mają tendencji do aglomerowania są lżejsze, nie ulegają więc sedymentacji.

Niestety, istnieje wiele publikacji wykazujących, iż surfaktanty, stosowane do wytwarzania heterofazowych zawieszin, są toksyczne [12], [20] wobec komórek, powodując ich obumieranie. Poprawa stanu dyspersji i zmniejszenie sedymentacji cząstek w atramentach



grafenowych, skutkujące ułatwieniem przyszłego procesu wytwarzania warstw i wzorów jest jednakże niezbędnym etapem w produkcji zawiesin heterofazowych [190].

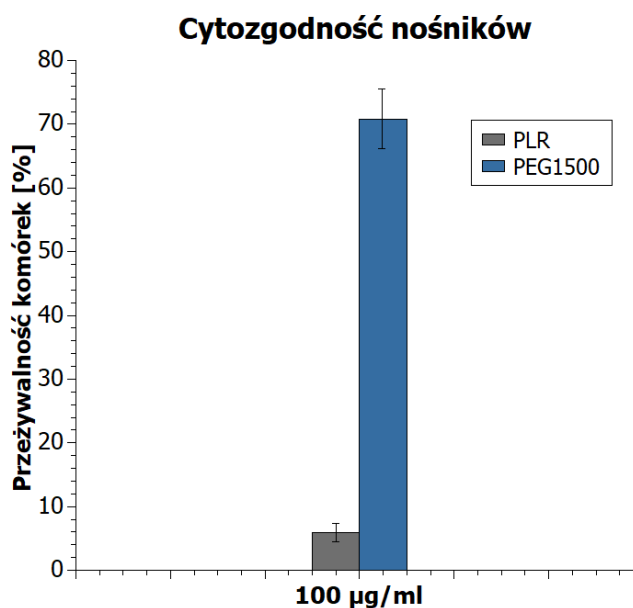
W związku z tym, w pracy podjęto próbę doboru funkcjonalnych pod względem fizycznym a jednocześnie biozgodnych surfaktantów. Wymogiem niezbędnym było zastosowanie materiałów rozpuszczalnych w wodzie i acetonie.

Na podstawie analizy literaturowej i wstępnych wyników wybrano dwa różne, rozpuszczalne w wodzie, komercyjne materiały: Capstone FS-3100 firmy DuPont (C) oraz AKM-0531 z serii Malialim japońskiej firmy NOF (D2). Niejonowy fluorosurfaktant firmy DuPont, nazwany roboczo surfaktantem C, wykorzystywany jest jako środek zapewniający doskonałe zwilżanie cząstek fazy funkcjonalnej i obniżający napięcie powierzchniowe w roztworach wodnych [191]. Jak wynika z informacji udostępnionych przez producenta [192] surfaktant Malialim, nazwany roboczo D2, tworzą polimery funkcyjne o budowie grzebieniowej. Posiadają one grupy jonowe na łańcuchach głównych, które odpowiadają za absorpcję polimeru do powierzchni proszku i jego zwilżenie, oraz łańcuchy boczne, które wywołują efekt odpychania się cząstek fazy funkcjonalnej, poprawiając ich dyspersję w zawiesinie. Jak wykazano w rozdziale 8.2 materiały te okazały się biozgodne. Po wytworzeniu atramentów z dodatkiem surfaktantów zaobserwowano poprawę dyspersji. Aby ocenić dokładniej ich wpływ, przeprowadzono dodatkowo testy sedymentacji cząstek atramentów – opisane szczegółowo w rozdziale 7.1.1. Testy te potwierdziły, iż użycie surfaktantów zwiększa stabilność atramentów, wydłużając czas, w którym pozostają one jednorodne.

## **5.6. Badania cytozgodności wybranych komponentów atramentów grafenowych**

W celu oceny biozgodności wyselekcjonowanych komponentów atramentów bazujących na nanopłatkach grafenowych, przeprowadzono wstępne testy żywotności mezenchymalnych komórek macierzystych (hADSC). Metodologia badań cytozgodności opisana została w rozdziale 4.4.2.

Ocena biozgodności wyselekcjonowanych nośników, przeprowadzono w celu oceny możliwości wykorzystania ich do produkcji biozgodnych atramentów grafenowych. Hodowla komórek macierzystych hADSC, na podstawie której wykonano test Alamar Blue, pozwoliła określić procentowo liczbę komórek, które przeżyły osadzone na warstwie zawierającej 100  $\mu\text{g/ml}$  GNP zawieszzonego w 2% roztworze polimerowego materiału PEG1500 lub Pluronic FS-127.

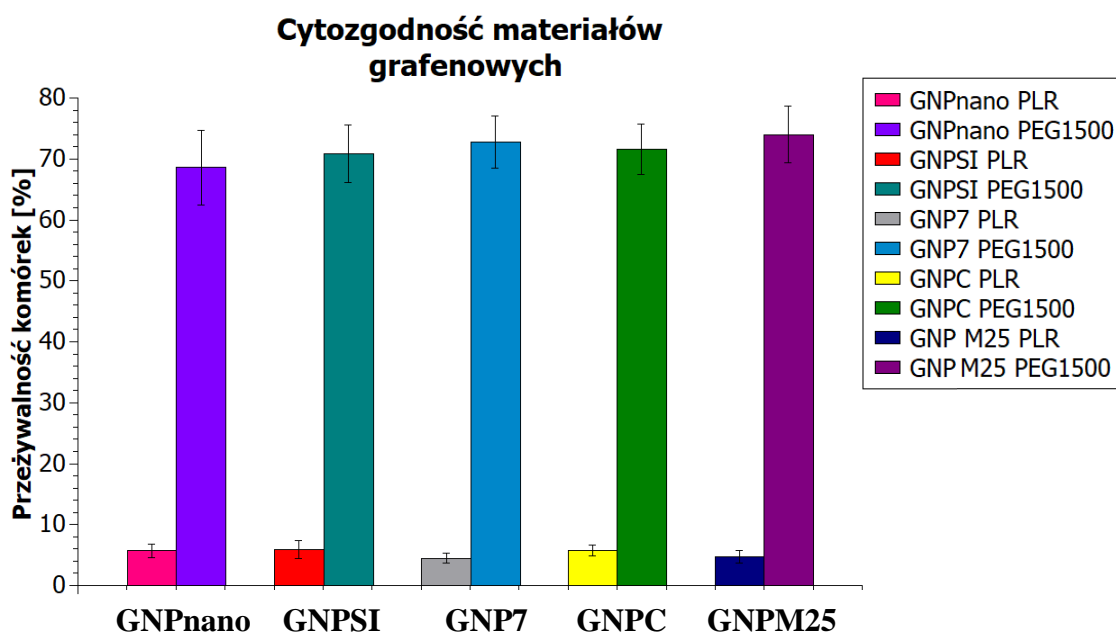


*Rysunek 25. Przeżywalność komórek macierzystych na warstwie grafenowej z wybranymi nośnikami*

Uzyskane wyniki, przedstawione na rysunku 25, wyraźnie wskazują, iż atramenty wykonane na bazie osnowy Pluronic tworzą nieodpowiednie podłoże do hodowli komórek. Przeżywalność komórek w tym wypadku wynosiła poniżej 10%. Jest to wynik zaprzeczający doniesieniom literaturowym, twierdzącym, iż Pluronic to materiał charakteryzujący się cytokompatybilnością. Powodem jest zastosowanie w atramentach większej ilości materiału polimerowego (2%) w stosunku do badań cytozgodności odnalezionych w literaturze: 0,002%-0,25% [73], [127], [128].

Z drugiej strony, ogromny potencjał materiałów PEG zastosowanych w bioinżynierii i w hodowlach komórkowych to temat często poruszany w literaturze [73], [193]–[195]. Przeprowadzone testy potwierdziły, że atramenty zawierające PEG mogą być wykorzystane w hodowli komórkowej, zapewniają bowiem zadawalającą przeżywalność komórek – ponad 70%. Równomierne rozproszenie GNP uzyskano w materiale o większej masie cząsteczkowej PEG1500. Polimer ten wybrano więc do dalszych badań.

Równolegle prowadzone wstępne, przeprowadzone na komórkach macierzystych hADSC testy pozwoliły na określenie stopnia biozgodności cząstek grafenowych o różnych wymiarach płatków, zawieszonych w ilości 100 µg/ml w osnowach polimerowych. Aby upewnić się, iż otrzymane w poprzednim badaniu wyniki nie zależały od rodzaju użytego w atramencie grafenu, ponownie zbadano oba nośniki: Pluronic i PEG1500.

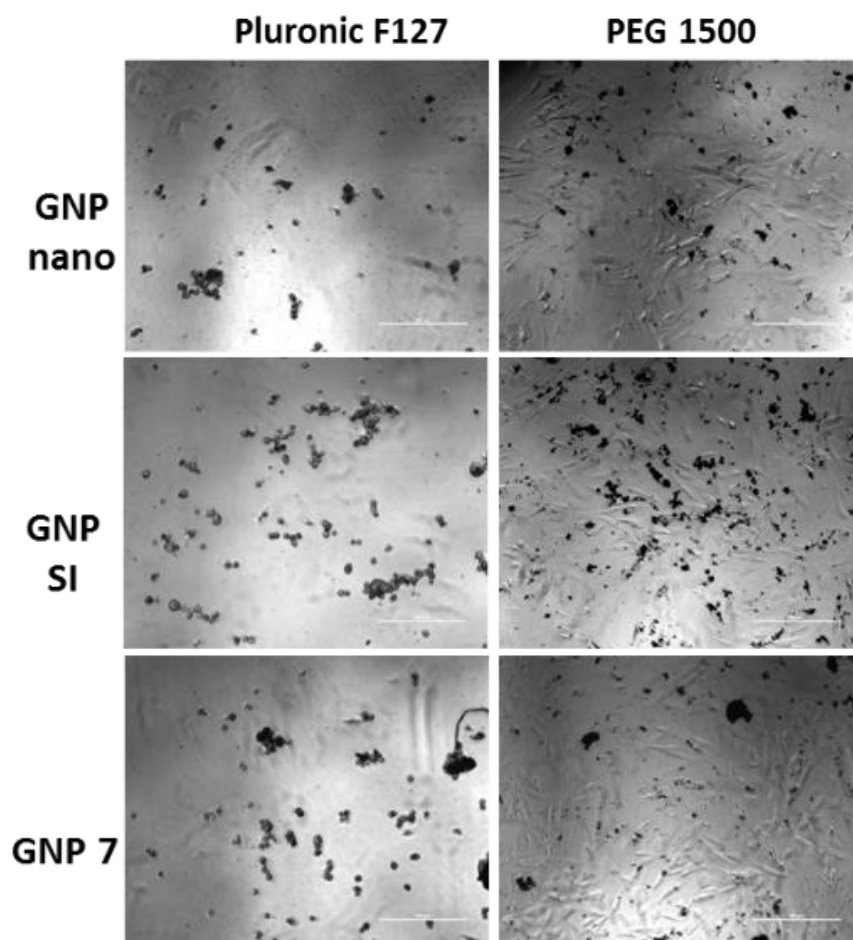


*Rysunek 26. Przeżywalność komórek macierzystych na warstwach grafenowych wytworzonych przy użyciu materiałów o różnych wymiarach cząstek*

Wyniki testów cytozgodności przedstawiono na rysunku 26. Na ich podstawie potwierdzono, iż na warstwie utworzonej przy użyciu osnowy PLR, niezależnie od rodzaju zastosowanego materiału grafenowego, komórki macierzyste hADSC obumierają. Przeżywalność w najlepszym przypadku nie przekraczała 20%.

Atramenty oparte na PEG1500 dla wszystkich materiałów grafenowych wykazały wysoką cytozgodność. Przeżywalność komórek w każdym wypadku wynosiła około 70%. Wartość ta jest granicą, przy której można uznać iż badany materiał jest cytozgodny. Dla GNPnano o małych płatkach przeżywalność komórek wynosiła 68,6%. GNPSI pozwalała na przeżycie 70,8% komórek. Materiał o największych płatkach, o średnicy 20µm: GNPM25 pozwalał uzyskać najlepszy wynik biozgodności – 73,5%. Jednakże pozostałe materiały grafenowe także wykazywały cytozgodność przy wynikach 71,6 dla GNPC oraz 72,8% dla GNP7. Różnice w przeżywalności komórek dla płatków grafenowych o różnych średnicach, choć nieznaczne, potwierdzają jednak doniesienia literaturowe, iż większe rozmiary płatków GNP zapewniają mniejszą toksyczność względem komórek [21]. Wynika to z faktu, iż płatki o małych rozmiarach, posiadające ostre krawędzie i szorstką powierzchnię łatwo wchodzi w interakcję z błoną komórkową, mogą ją przenikać i dotrzeć aż do jądra komórkowego [21].

W celu wyjaśnienia znaczących różnic w przeżywalności komórek przy użyciu dwóch różnych materiałów wykorzystanych w roli nośników, niektóre hodowle komórkowe, z wybranymi fazami funkcjonalnymi, poddano obserwacji w świetlnym mikroskopie biologicznym. Zdjęcia z obserwacji umieszczono na rysunku 27.



*Rysunek 27. Obrazy mikroskopowe z obserwacji hodowli komórkowej prowadzonej na warstwach grafenowych uzyskanych przy użyciu dwóch różnych nośników: Pluronic oraz PEG 1500*

Na podstawie obserwacji mikroskopowej stwierdzono, że na warstwach zawierających PEG, dla wszystkich rodzajów GNP, komórki adherowały do podłoża, co umożliwiało ich przeżycie. Z drugiej strony, komórki osadzone na warstwie zawierającej Pluronic, niezależnie od rodzaju GNP, nie adherowały do podłoża. Brak możliwości przylegania jednoznacznie oznaczał następującą z czasem trwania hodowli śmierć komórek. Uzyskane wyniki zdecydowały wykluczeniu materiału PLR z dalszych badań.

Do dalszych prac, zmierzających do wytworzenia grafenowego atramentu do druku strumieniowego, wybrano nanopłatki GNP SI. Nie wykazywały one znacznie większej toksyczności niż materiały o większych średnicach płatków, a jest to materiał umożliwiający wykonanie wydruku bez zatykania dyszy drukarki ink-jet. Z tego samego powodu do zastosowania w atramentach do natrysku wybrano materiał GNP7. GNPM25 charakteryzował się większą biogodnością, jednak jego płatki o średnicach 20 mikrometrów zatykałyby dyszę urządzenia do wykonywania powlekania natryskowego.

## 6. Opracowanie stanowiska do druku strumieniowego

### 6.1. Technologia druku strumieniowego

Komercyjnie dostępne stanowiska do druku strumieniowego często nie są przystosowane do druku heterofazowych atramentów bazujących na nanomateriałach. Drukarki takie nie posiadają dysz umożliwiających drukowanie atramentów zawierających standardowo stosowane, opisane w rozdziale 5, niskowrzące rozpuszczalniki oraz zawieszono w objętości atramentu, często mające tendencje do aglomerowania, nanocząstki fazy funkcjonalnej. Przystosowanie dyszy jest niezbędne, aby uniknąć jej zatykania w trakcie procesu druku. Ponadto komercyjne urządzenia przeznaczone są do pracy z dużymi objętościami atramentów. Prowadzenie badań wymaga przetestowania wielu atramentów różniących się kompozycją i technologią wytwarzania. Dla zmniejszenia strat materiałowych niezbędna jest minimalizacja objętości badanych zawiesin. Co najważniejsze jednak, wykorzystanie drukarki strumieniowej do wytwarzania wzorów i ścieżek biozgodnych, do zastosowań w biomedycynie, wymaga przystosowania i modyfikacji stanowiska w celu zapewnienia czystości i sterylności procesu druku.

Wymienione wyżej czynniki spowodowały, że jednym z głównych celów pracy było zaprojektowanie i zbudowanie kompletnego stanowiska do druku strumieniowego heterofazowych, biozgodnych atramentów, zapewniającego sterylne warunki drukowania, umożliwiającego wytwarzanie ścieżek i wzorów grafenowych nie tylko do zastosowań w elektronice, ale także w aplikacjach biologicznych.

Druk strumieniowy jest technologią znaną z zastosowań poligraficznych, jednak od wielu lat wykorzystywaną także na potrzeby elektroniki drukowanej [144]. Ze względu na addytywny charakter metody oraz prostotę technologii, druk strumieniowy jest atrakcyjną alternatywą dla konwencjonalnych technik takich jak litografia czy galwanizacja, stosowaną m.in. do wytwarzania płytek obwodów drukowanych, wyrobów tekstylnych, produkcji elementów takich jak tranzystory, diody elektroluminescencyjne, ogniwa słoneczne, refrakcyjne mikrosoczewki, sensory, a także do identyfikacji radiowej [8], [34], [37], [196]–[199]. Druk strumieniowy przyciąga uwagę jako technologia pozwalająca na drukowanie ścieżek i wzorów z rozdzielczością rzędu kilkudziesięciu mikrometrów [8] na różnych, także elastycznych podłożach, przy możliwości niskotemperaturowej obróbki powstałych nadruków [34]. Ze względu na wszystkie te zalety, a także niski koszt procesu oraz możliwość bezpośredniego, bezkontaktowego drukowania wzorów [8], [34], [40], [144], [197], oraz ograniczeniu strat materiałów [41], druk strumieniowy może być stosowany w bardzo

szerokim zakresie, nie tylko w elektronice czy przemyśle tekstylnym [109], [200], ale także w medycynie i bioinżynierii [201], [202]. Bezkontaktowość procesu jest kluczowa w aplikacjach inżynierii biomedycznej i tkankowej, pozwala bowiem na zachowanie czystości i sterylności procesu [8].

Ze względu na sposób generowania kropli z dyszy rozróżnia się dwa rodzaje druku strumieniowego: druk strumieniowy ciągły (CIJ ang. continuous ink-jet printing) oraz druk strumieniowy kropla na żądanie (DOD ang. drop-on-demand ink-jet printing) [143].

W pierwszym z wymienionych typów drukarek strumieniowych, z dyszy generowany jest ciągły strumień kropeł, nawet gdy nie jest to wymagane. W momencie gdy tworzony ma być wzór lub ścieżka, spadają one na podłoże. W przeciwnym razie odchylane są przez pole elektrostatyczne i kierowane do zbiornika, z którego atrament jest odzyskiwany po zakończeniu procesu nadruku. Główną wadą tego rozwiązania jest możliwość zanieczyszczenia atramentu podczas recyrkulacji. Wystrzeliwane z dyszy krople charakteryzują się średnicami w zakresie 100-150  $\mu\text{m}$  [143]. CIJ używany jest głównie do aplikacji graficznych wymagających wysokiej szybkości druku [203].

Obecnie technologia CIJ została w dużej mierze zastąpiona przez druk strumieniowy DOD [203], [204]. W tej technologii generowane krople charakteryzują się ponad dwukrotnie mniejszymi średnicami (20-50  $\mu\text{m}$ ), dzięki czemu drukowane są wzory z wyższą niż uzyskiwane metodą CIJ rozdzielczością [203]. Druk strumieniowy DOD jest to proces przerywany, kropla generowana jest tylko w momencie, gdy ma być drukowany wzór. W związku z tym metoda ta jest bardziej ekonomiczna od CIJ, gdyż bez wysłania sygnału, krople zostają w głowicy urządzenia drukującego. Z tego samego powodu ta technika drukowania pozwala też na zastosowanie mniejszych ilości atramentu, bez zagrożenia zanieczyszczenia atramentu w recyrkulacji [143].

Dwa najczęściej wykorzystywane w drukarkach strumieniowych sposoby sterowania generacją kropli to: sterowanie piezoelektryczne lub termiczne [143], [205].

W głowicach drukarek sterowanych piezoelektrycznie, w komorze razem z atramentem umieszczony jest piezoelektryczny przetwornik. W skutek zadania impulsu elektrycznego piezoelektryk zwiększa swoją objętość. W efekcie powstałego ciśnienia ustalona objętość atramentu opuszcza komorę i wydostaje się przez dyszę w postaci kropli. Kropla przyjmuje kształt zależny od parametrów impulsu sterującego, opisanych szczegółowo w 4.2.1, oraz właściwości reologicznych atramentu [143].

Sterowanie termiczne jest często wykorzystywane w drukarkach strumieniowych ze względu na niższy, niż dla sterowania piezoelektrycznego, koszt wytworzenia głowicy [206].

Polega ono na nagrzewaniu cienkiej grzałki, znajdującej się razem z atramentem w głowicy. Nagłe nagrzewanie atramentu powyżej jego temperatury wrzenia, powoduje zwiększenie objętości zawiesiny. Podobnie jak w sterowaniu piezoelektrycznym, powstałe ciśnienie powoduje wypchnięcie części atramentu w postaci kropli przez dyszę [143]. Wadą sterowania termicznego jest bezpośrednie oddziaływanie podwyższonych temperatur na atrament. Może to skutkować odparowaniem rozpuszczalnika oraz zaschnięciem atramentu w dyszy, a w konsekwencji – zatkaniem dyszy i przerwaniem procesu nadruku. W związku z tym sterowanie to stosowane jest zazwyczaj do druku atramentów zawierających niskowrzący, wodny rozpuszczalnik [203], [207]. Zmniejsza to jednak możliwość zastosowania materiałów nierozpuszczalnych w wodzie przy użyciu dyszy sterowanej termicznie.

Na podstawie przeprowadzonej analizy literaturowej stwierdzono, iż do zastosowań elektroniki drukowanej najlepszym rodzajem drukarki strumieniowej jest drukarka DOD generująca krople na żądanie, sterowana piezoelektrycznie. Umożliwia ona wytwarzanie ścieżek przy zachowaniu czystości procesu i wykorzystaniu niewielkiej objętości atramentu bez niebezpieczeństwa jego uszkodzenia przez działanie wysokich temperatur.

Prace związane z budową stanowiska podzielone zostały na dwa etapy. W pierwszym etapie opracowano projekt stanowiska uwzględniający koncepcję doboru elementów składowych oraz koncepcję sterowania i oprogramowania urządzenia. Drugi etap polegał na skonstruowaniu zaprojektowanego stanowiska z uwzględnieniem wszystkich elementów umożliwiających zastosowanie zbudowanego urządzenia do wytwarzania biogodnych wzorów do zastosowań w biomedycynie i bioinżynierii.



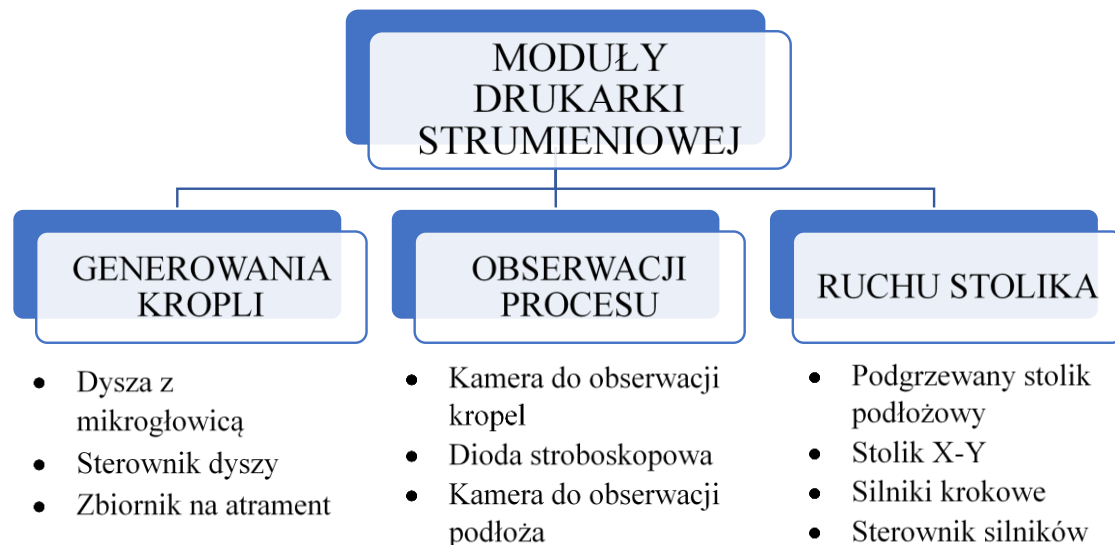
## 6.2. Projekt stanowiska drukarki strumieniowej

W pracy zaprojektowane zostało stanowisko do druku strumieniowego DOD, sterowane piezoelektrycznie, którego widok ogólny pokazano na rysunku 28.



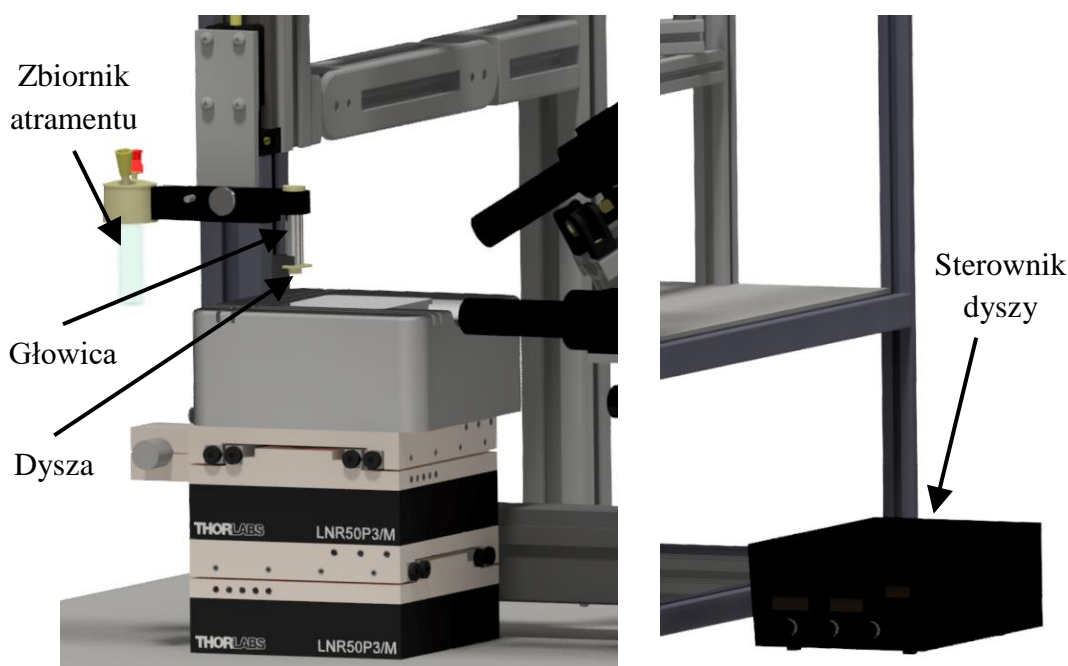
*Rysunek 28. Widok ogólny stanowiska do druku strumieniowego DOD, ze sterowaniem piezoelektrycznym*

Konstruowane stanowisko drukarki strumieniowej podzielone zostało na kilka modułów, dzięki którym możliwe jest precyzyjne sterowanie procesem nadruku wzorów. Jest to niezbędne dla uzyskania jednorodnych, przewodzących ścieżek. Sam proces nadruku oraz parametry sterujące tym procesem opisano szczegółowo w rozdziałach 6.1 oraz 4.2.1. Trzy moduły wchodzące w skład budowanego stanowiska drukarki strumieniowej, zobrazone na rysunku 29 to: moduł generowania kropli, moduł obserwacji procesu druku i moduł ruchu stolika.



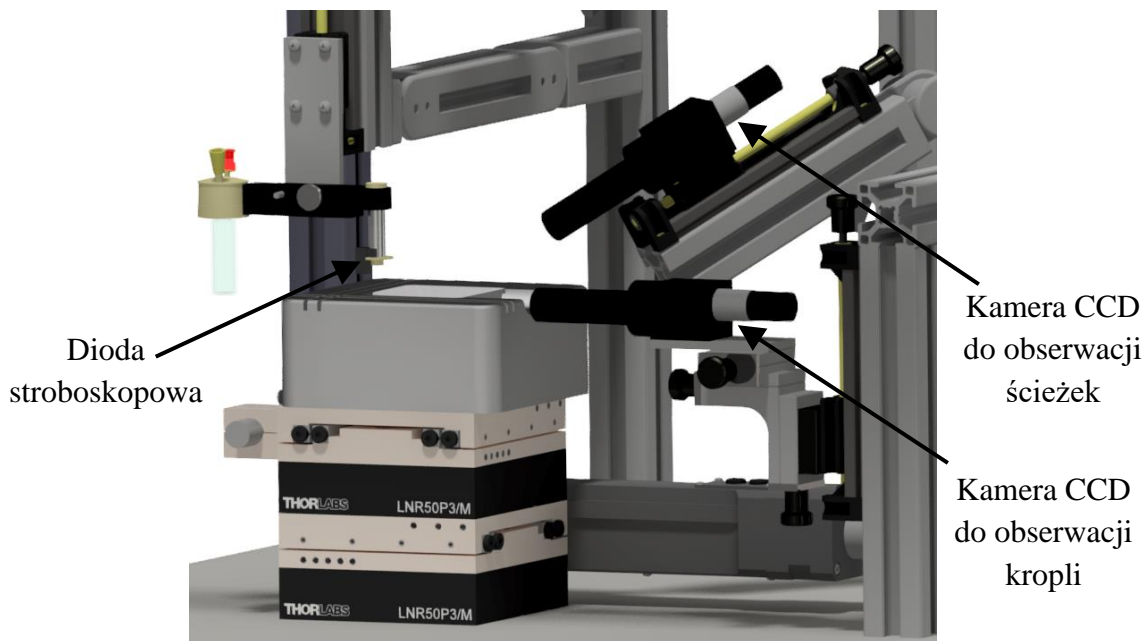
*Rysunek 29. Moduły wchodzące w skład budowanej drukarki strumieniowej*

W skład modułu generowania kropli, przedstawionego na rysunku 30, wchodzi wszystkie elementy, które umożliwiają zarówno generowanie kropeł, jak i sterowanie parametrami ich formowania. Przed procesem druku atrament umieszczany jest w zamkniętym, szczelnym zbiorniku, z którego jest pobierany w trakcie wytwarzania ścieżek. Dysza zawierająca mikrogłowicę podłączona jest do sterownika, dzięki któremu możliwe jest sterowanie parametrami procesu formowania kropli: napięcia [V], długości trwania sygnału [ms] oraz częstotliwości generowania kropli [Hz]. Z dyszy wystrzelwane są pikolitrowe krople o rozmiarach i prędkości zależnych od ustawianych za pomocą sterownika parametrów.



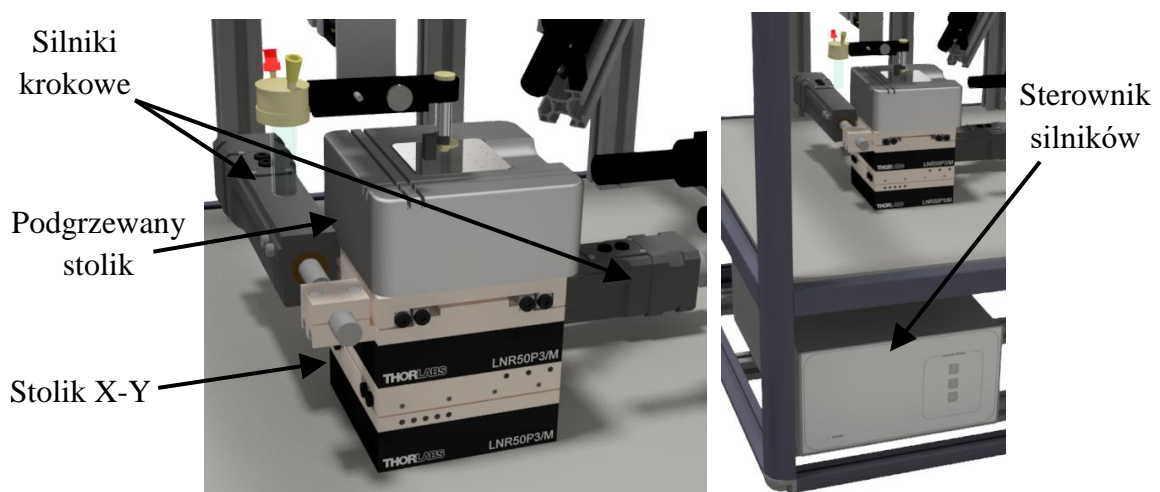
*Rysunek 30. Części składowe modułu generowania kropli*

Moduł obserwacji procesu druku, widoczny na rysunku 31, umożliwia bieżącą obserwację i fotografowanie kropeł oraz ścieżek powstających w trakcie trwania procesu. Obraz kropeł uzyskiwany jest dzięki zastosowaniu kamery CCD, której obiektyw skierowany jest wprost na mikrodyszę, z której wylatują krople atramentu. Dioda stroboskopowa, podłączona jest do sterownika głowicy. Oświetla ona od tyłu generowane krople z częstotliwością ich wystrzeliwania z dyszy, z regulowanym opóźnieniem. Taka konfiguracja pozwala na obserwację kropli w dowolnym momencie od jej wyrzutu. Skierowanie obiektywu drugiej kamery prosto na podłoże, na którym powstaje ścieżka, umożliwia w trakcie trwania druku podgląd formowanej ścieżki. Moduł optyczny jest niezbędną częścią stanowiska do druku heterofazowych atramentów, bowiem parametry procesu dobierane są na podstawie obserwacji kropeł i drukowanych ścieżek. Ponadto, dzięki ciągłej obserwacji kropeł i ścieżek, możliwe jest wychwycenie momentu, w którym proces drukowania zostaje zakłócony przez częściowe lub całkowite zatkanie dyszy.

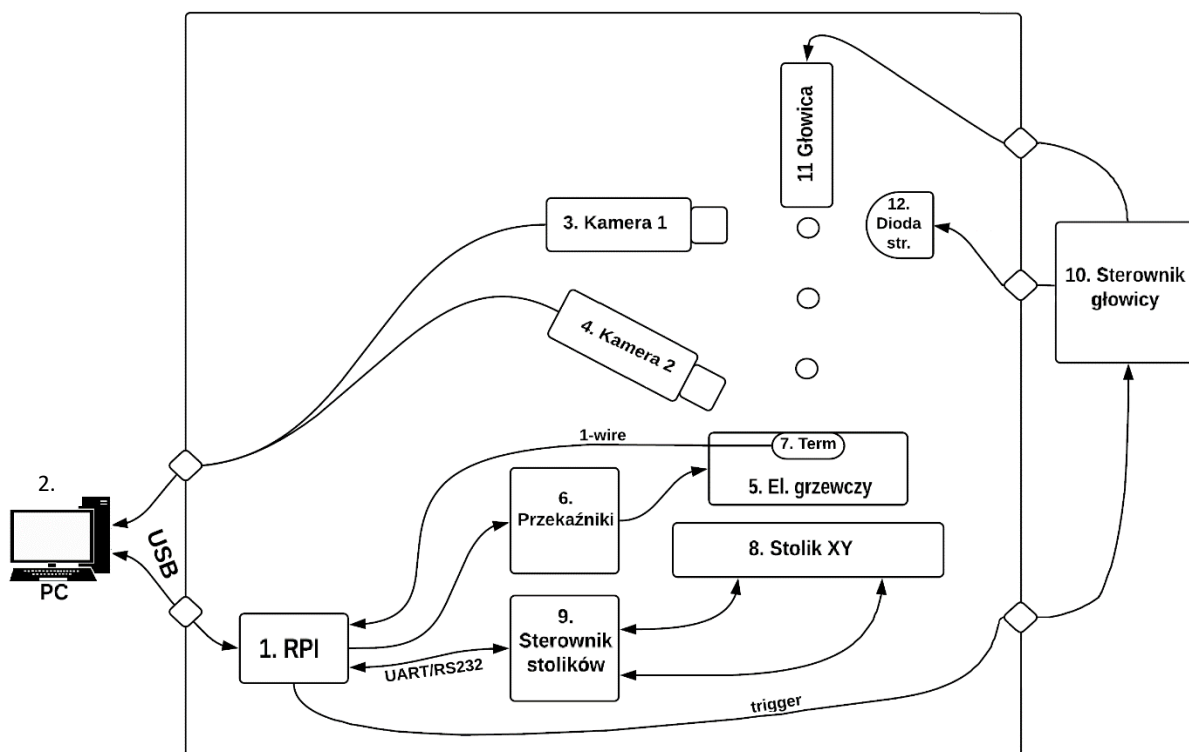


*Rysunek 31. Części składowe modułu do obserwacji kropeł atramentu i drukowanych ścieżek*

Trzeci moduł, będący częścią budowanego stanowiska to moduł ruchu stolika, pokazany na rysunku 32. W opracowanym stanowisku, podczas procesu druku głowica pozostaje nieruchoma. Wydruk wzoru odbywa się poprzez ruch stolika X-Y, dzięki silnikom krokowym podłączonym do sterownika. Na sterowniku ustawiać można parametry formowania ścieżki związane z prędkością wydruku: przesuw i postój stolika. Ponieważ niezbędnym etapem procesu jest suszenie wstępne, odbywające się w trakcie drukowania ścieżki, podłoże musi być umiejscowione na elemencie podgrzewanym. W tym celu w pracy wykorzystywany jest podgrzewany stolik.



*Rysunek 32. Części składowe modułu ruchu stolika*



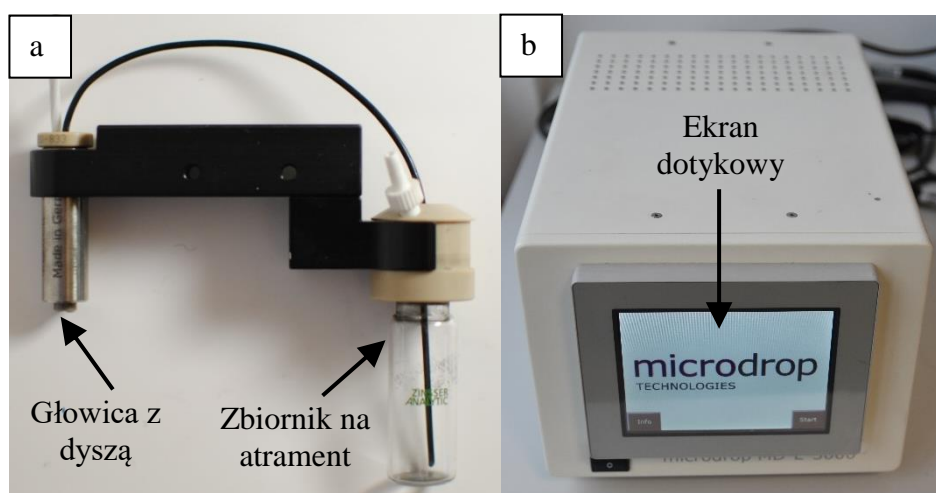
Rysunek 33. Model sterowania zewnętrznego drukarki strumieniowej: 1) Raspberry pi, 2) Komputer 3) Kamera do obserwacji kropli, 4) Kamera do obserwacji ścieżki 5) Stolik podłożowy podgrzewany 6) Przełączniki 7) Czujniki temperatury 8) Stolik X-Y 9) Sterownik silników 10) Sterownik głowicy 11) Głowica 12) Dioda stroboskopowa

Zastosowane oprogramowanie stanowiska do druku strumieniowego, pokazane na rysunku 33, zapewnia kompleksową obsługę procesu, a więc komputerowe ustawianie wszystkich parametrów procesu. Ponadto pełni ono również funkcję „dziennika laboratoryjnego”, ponieważ przechowuje pełną informację o przeprowadzonych badaniach oraz przyporządkowane im zarchiwizowane obrazy z kamer. Oprogramowanie zostało podzielone na dwa moduły. Pierwszy uruchamiany jest na komputerze klasy PC. Zapewnia wysokopoziomowe sterowanie, akwizycję obrazów i dostęp do historii użycia stanowiska. Drugi moduł, zainstalowany na jednopłytkowym module Raspberry Pi (RPI) podłączonym do komputera za pomocą złącza USB, pozwala na komunikację ze wszystkimi podłączonymi czujnikami, utrzymanie zadanej temperatury na podgrzewanym stoliku, a także odpowiada za wysyłanie sygnałów sterujących do elementów wykonawczych stanowiska. Zastosowany sterownik głowicy posiada dotykowy ekran z możliwością bezpośredniego ustawienia parametrów związanych z formowaniem kropli atramentu. Do poprawnego funkcjonowania w ramach stanowiska sterownik wymagał więc tylko sygnału sterującego, co zostało zrealizowane za pomocą modułu RPI.

### 6.3. Konstrukcja stanowiska drukarki strumieniowej

W celu skompletowania zaprojektowanego stanowiska dokonano wyboru urządzeń składowych biorąc pod uwagę stosunek funkcjonalności do ceny. Spis elementów wchodzących w skład modułów stanowiska, wraz ze źródłem ich pochodzenia oraz kluczowymi parametrami przedstawiono w tabeli 8.

W skład modułu stanowiska zapewniającego generowanie kropli wchodzi głowica piezoelektryczna firmy Microdrop z dyszą o średnicy 50  $\mu\text{m}$ . Dysza została przez firmę skonstruowana tak, aby zmniejszyć prawdopodobieństwo jej zatkania w trakcie druku atramentów heterofazowych. Głowica pozostaje nieruchoma w trakcie procesu druku. Pozwala to na wyeliminowanie drgań, które mogłyby wpływać na tor lotu kropli. Głowica ustawiana jest w osi Z względem podłoża. Jest ona w prosty sposób odłączana od urządzenia, co ułatwia jej czyszczenie. Zastosowany sterownik głowicy, z dotykowym ekranem umożliwia ustawienie: napięcia, długości impulsu, opóźnienia sygnału synchronizującego kamerę, częstotliwości wyrzutu kropli. Dołączony do głowicy zbiornik na atrament ma kształt szklanej buteleczki o objętości 4 ml. Ponieważ wykorzystywana ilość atramentu w trakcie drukowania ścieżek nie przekracza 1,5 ml, jest to wystarczająca objętość dla zbudowanego stanowiska.



Rysunek 34. Elementy składowe modułu generowania kropli, zastosowane w zbudowanym stanowisku: a) Głowica z dyszą oraz zbiornikiem na atrament b) sterownik głowicy

Moduł optyczny pozwala na obserwację kropli i drukowanej ścieżki w trakcie trwania nadruku, na podstawie których dokonywany jest dobór parametrów druku. W zbudowanym stanowisku moduł ten tworzą dwie monochromatyczne kamery CCD wraz z obiektywami makro, które umożliwiają obserwację kropli i podłoża.

Tabela 8. Spis elementów zbudowanego stanowiska do druku strumieniowego

Moduł	Nazwa elementu	Źródło pochodzenia	Nazwa katalogowa	Parametry
Generowania kropli	Głowica z dyszą	Microdrop technologies	MD-K-130-020	Średnica dyszy: 50 μm,
	Sterownik		MD-E-3011	Technologia: DOD, maks. częstotliwość kropli: 6000Hz, prędkość kropli <5 m/s
	Zbiornik na atrament		MD-V-304	Materiał: szkło, pojemność: 4 ml
Optyczny	Kamera CCD do obserwacji kropeł	A1pixel	DMK 27AUP006	Monochromatyczna, wejście: USB, 5Mpxl, 1/ 2,5", 15 fps
	Obiektyw kamery do obserwacji kropeł		VS-MC0510	Powiększenie 0.5-1x, 2/3"
	Kamera CCD do obserwacji ścięzek		ace U 106752	Monochromatyczna, wejście USB, 1.3 Mpxl, 1/ 2", 203 fps
	Obiektyw kamery do obserwacji ścięzek		VS-TC1-110	Powiększenie 1x, odległość robocza 113 mm
Ruchu stolika	Silniki krokowe	THORLABS	LNR50S/M	Zakres ruchu: 50 mm, maks. prędkość 8 mm/s, maks. przyspieszenie 8"/s <sup>2</sup> , min. skok 0,05 μm
	Sterownik silników		BSC102	Prędkość silników >600 RPM, napięcie silników: 48V
	Stolik X-Y		LNR50	Waga: 0,68 kg, grubość: 23,9 mm
	Stolik podgrzewany		---	Maks. temperatura: 80°C

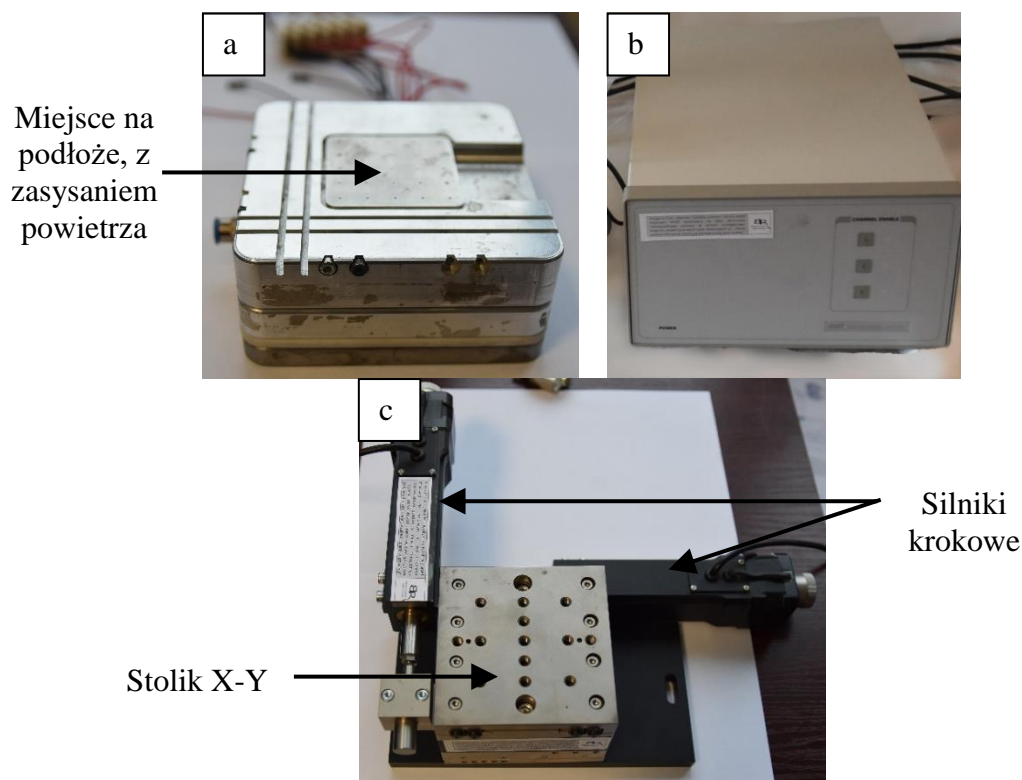


Dioda stroboskopowa, przymocowana jest do głowicy i skierowana w stronę pierwszej z kamer. Podłączona jest do sterownika dyszy, dzięki czemu oświetla kroplę dokładnie z częstotliwością jej generowania, z regulowanym opóźnieniem. Taka konfiguracja pozwala na obserwację kształtu kropli w każdym momencie od wystrzelenia z dyszy, aż do zderzenia z podłożem. Druga z kamer pozwala na obserwację powstającej na podłożu ścieżki, a także pełni funkcję obrazowania podłoża przed startem procesu nadruku, celem którego jest ustawienie początkowego punktu druku ścieżki lub wzoru.



Rysunek 35. Kamera CCD do obserwacji kropli wraz z obiektywem i diodą stroboskopową

Moduł ruchu stolika umożliwia wydruk ścieżki, poprzez zapewnienie ruchu podłoża. W skład tego modułu wchodzi: podgrzewany stolik podłożowy, stolik X-Y wraz z zestawem napędowym, a więc silnikami krokowymi i ich sterownikiem. Minimalny skok stolika X-Y, zapewniony przez zastosowane w stanowisku silniki krokowe i dwukanałowy sterownik, to 0,5  $\mu\text{m}$ .

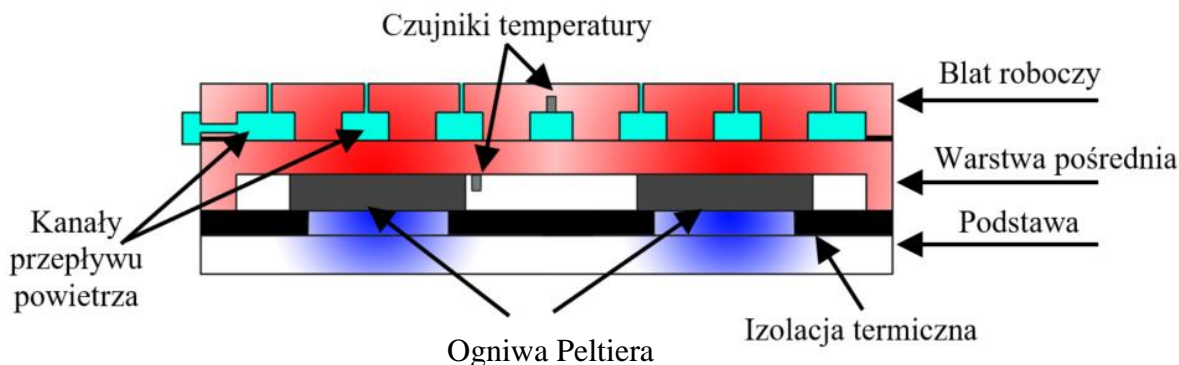


Rysunek 36. Moduł ruchu stolika: a) podgrzewany stolik podłożowy b) sterownik silników c) Stolik X-Y oraz silniki krokowe



Stolik podłożowy to element, na którym umieszcza się podłoże przygotowane do nadruku. Powinien więc umożliwiać unieruchomienie materiału podłożowego oraz kontrolowaną zmianę temperatury.

Zbudowany na potrzeby stanowiska stolik składa się z trzech aluminiowych części: blatu roboczego, warstwy pośredniej oraz podstawy (Rysunek 37).



Rysunek 37. Schemat budowy podgrzewanego stolika podłożowego

Pomiędzy blatem roboczym, a warstwą pośrednią znajdują się kanały pozwalające na przepływ powietrza oraz zasysanie powietrza przez otwory w blacie roboczym. Pozwala to na unieruchomienie podłoża w trakcie druku. Budowa stolika umożliwia przeprowadzenie w trakcie druku procesu suszenia wstępnego, opisanego w rozdziale 4.2.3. Aby umożliwić podniesienie temperatury stolika, pomiędzy warstwą pośrednią, a podstawą umieszczono elementy grzewcze, których funkcję pełnią: ogniwa Peltiera. Wprawdzie jako element grzewczy wymagają one dostarczenia większej ilości energii, niż grzałki rezystancyjne, jednak ich użycie pozwala, oprócz nagrzewania blatu stolika, na uzyskanie dwóch dodatkowych efektów. Dzięki ogniwom Peltiera podstawa stolika jest chłodzona, przez co nie zostają ogrzane inne elementy stanowiska, nawet przy długotrwałej pracy. Ponadto, występowanie efektów grzania i chłodzenia, wpływa na temperaturę powietrza wewnątrz obudowy. Podnosi się ona w mniejszym stopniu, niż w przypadku samego podgrzewania.

Pomiar temperatury stolika może być wykonywany na bieżąco, w trakcie procesu nadruku. Aby było to możliwe, w stoliku zamontowano dwa czujniki, umożliwiające pomiar temperatury zarówno przy blacie roboczym stolika, co jest istotne dla grzanego podłoża, jak i w środku stolika, przy elementach grzewczych, w celu zabezpieczenia przed użyciem zbyt wysokich temperatur, mogących wywołać uszkodzenia.

#### 6.4. Biologiczny aspekt budowy stanowiska drukarki strumieniowej

Druk strumieniowy jest technologią umożliwiającą zachowanie czystości procesu druku, oraz bezkontaktowe wykonywanie wzorów, także na niepłaskich podłożach. Dzięki temu może być wykorzystywany, zarówno w inżynierii tkankowej, do drukowania żywych komórek, jak i do nadrukowywania nietypowych podłoży, takich jak scaffolds czy cewniki, w celu wytwarzania wzorów i ścieżek do aplikacji biologicznych [119], [208].

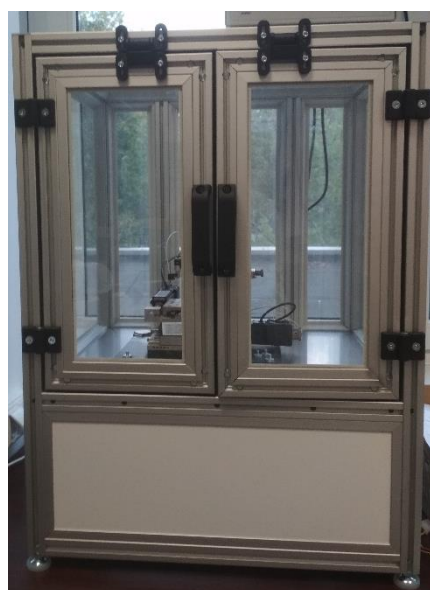
Jednak wykorzystanie w biomedycynie wzorów i ścieżek wytworzonych przy użyciu drukarki strumieniowej, która przystosowana jest do drukowania atramentów heterofazowych do aplikacji elektronicznych, wymaga wprowadzenia pewnych modyfikacji stanowiska. Przystosowanie stanowiska do wytwarzania elementów stosowanych w biologii i medycynie powinno zapewnić m. in. szczelność, czystość i sterylność obszaru roboczego w trakcie druku jak również możliwość sterylizacji całości układu przed procesem druku.

W związku z tym, w celu przystosowania opracowanego w pracy stanowiska drukarki strumieniowej tak, aby możliwe było drukowanie biozgodnych atramentów i wytwarzanie wzorów do aplikacji biomedycznych, stanowisko zostało wyposażone w dodatkowe elementy.

Aby mieć pewność, iż w trakcie procesu druku nie nastąpi zanieczyszczenie warstwy ani atramentu, niezbędna jest szczelna obudowa. Opracowano więc konstrukcję zabezpieczeń zapewniających sterylność procesu wytwarzania wzorów i ścieżek, prowadzonym na wybudowanym stanowisku do druku strumieniowego. W ramach wykonanych prac zaprojektowano i wykonano obudowę, w której umieszczona jest drukarka strumieniowa. Projekt oraz zdjęcie obudowy przedstawiono poniżej na rysunkach 38 oraz 39.



Rysunek 38. Projekt obudowy biodrukarki strumieniowej



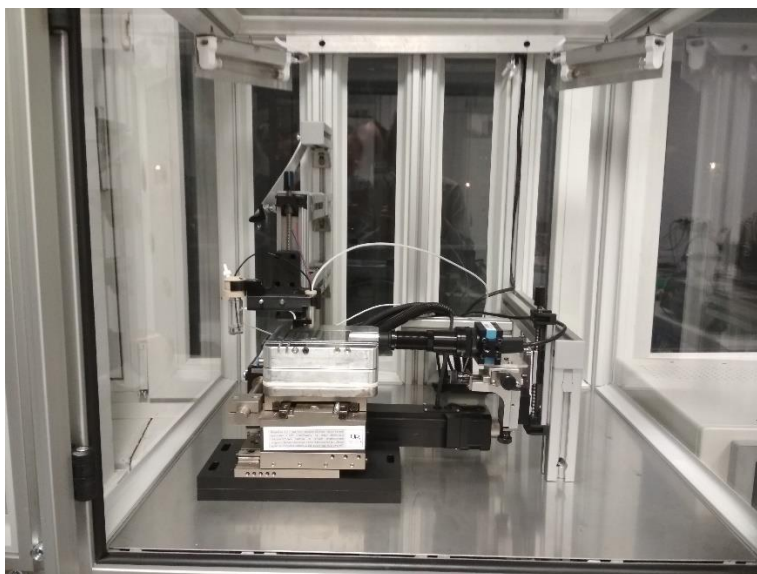
Rysunek 39. Wybudowana, sterylna obudowa biodrukarki strumieniowej

Zaprojektowana obudowa składała się z dwóch części – górnej oraz dolnej. W górnej części, zawierającej powierzchnię roboczą, umiejscowione zostały najważniejsze elementy stanowiska: stół podłożowy X-Y, razem z silnikami krokowymi, dysza wraz ze zbiornikiem na atrament oraz układ do monitorowania kropli i podłoża: kamery CCD wraz z diodą stroboskopową. Wnętrze obudowy, w celu zachowania czystości i sterylności czyszczone będzie acetonem lub alkoholem etylowym. Z tego powodu na materiał do wykonania obudowy wybrano szkło, zapewniające również możliwość obserwowania stanowiska. Błat roboczy wykonano z aluminium i stali nierdzewnej. Podwójne drzwiczki, umiejscowione na froncie obudowy pozwalają na dostęp do elementów stanowiska, niezbędny między innymi w celu czyszczenia obszaru roboczego lub przetykania dyszy. Uszczelnienie obudowy wykonane zostało przy użyciu specjalizowanych profili szyb ochronnych do pomieszczeń sterylnych, gwarantujących czystość obszaru roboczego drukarki. Dolna część obudowy, służąca do ukrycia elektroniki sterującej, obudowana została płytą uniwersalną. W celu zapewnienia stabilności pikokropeł wystrzeliwanych z dyszy w trakcie procesu nadruku, od spodu całej obudowy zamontowano nogi przegubowe, wyposażone dodatkowo w pierścienie amortyzujące, zapewniające tłumienie drgań. Całość obudowy została zabezpieczona od dołu jedynie siatką, tak aby nie ograniczać przepływu powietrza w dolnej części obudowy.

Zachowanie sterylności procesu w zmodyfikowanym stanowisku drukarki strumieniowej możliwe jest dzięki wykorzystaniu zamontowanych sterylizujących lamp UV. Dwie lampy, każda o mocy 4 W, wykorzystane przy modyfikacji stanowiska emitują światło UV o częstotliwości 254 nm, zapewniające sterylizację obszaru roboczego drukarki. Włączenie lamp przed procesem nadruku na minimum 30 minut eliminuje bakterie i drobnoustroje ze środka obudowy.

Światło UV nie przenika przez szkło. Jednak, w celu zabezpieczenia użytkownika przed otwarciem obudowy w trakcie procesu sterylizacji, co mogłoby go narazić na wpływ promieniowania, w drukarce zamontowano także czujnik otwartych drzwi.

Gotowe, w pełni funkcjonalne stanowisko do biodruku strumieniowego przedstawione zostało na rysunku 40.



*Rysunek 40. Zbudowane stanowisko do biodruku strumieniowego*

Powstałe stanowisko umożliwia precyzyjne wykonywanie wzorów oraz ścieżek przewodzących addytywną, efektywną ekonomicznie metodą bezkontaktową jaką jest technika druku strumieniowego. Dzięki temu możliwe jest wykonywanie wąskich ( $>3 \times 0 \mu\text{m}$ ) ścieżek przewodzących, także na elastycznych podłożach. Zastosowana metoda druku strumieniowego Drop on Demand oraz mikrogłowica piezoelektryczna umożliwia drukowanie atramentów heterofazowych, bez obawy o ich odparowanie w dyszy. Dzięki zapewnieniu czystości osiągniętej poprzez użycie zamkniętej, sterylnej obudowy oraz możliwość sterylizacji wnętrza, możliwe jest drukowanie biozgodnych atramentów do zastosowań w biomedycynie. Na stanowisku możliwe jest także prowadzenie innych badań biologicznych, np. polegających na drukowaniu i obserwacji żywych komórek zawieszonych w atramencie heterofazowym.

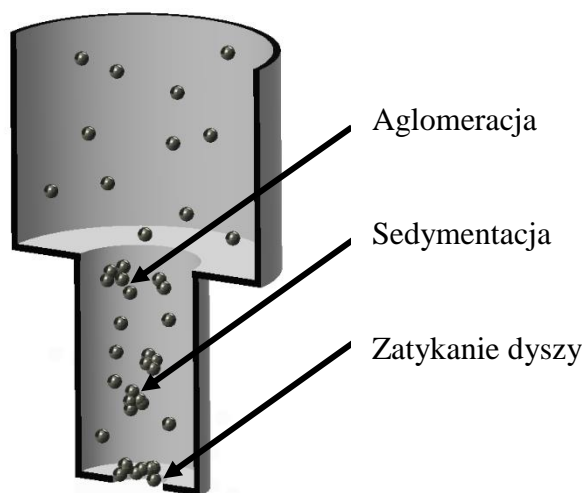
## **7. Charakteryzacja i właściwości opracowanych atramentów i warstw grafenowych**

### **7.1. Charakteryzacja i właściwości opracowanych atramentów grafenowych**

#### **7.1.1. Badanie stabilności atramentów heterofazowych z fazą funkcjonalną w postaci nanopłatków grafenowych**

Właściwa dyspersja, rozumiana jako równomierne rozproszenie cząstek fazy funkcjonalnej w atramencie, decyduje o jego jednorodności. Brak jednorodności atramentu powoduje niestabilność procesu drukowania oraz nieregularność powstających ścieżek i wzorów [184]. Obok równomiernej dyspersji cząstek w zawieszynie, jednym z najważniejszych wymogów technologicznych stawianych atramentom heterofazowym, dedykowanym technikom elektroniki drukowanej, jest ich stabilność. Minimalna stabilność atramentu heterofazowego, niezbędna do przeprowadzenia poprawnego procesu druku, rozumiana jest jako zdolność zachowania jednorodności w czasie dłuższym niż okres trwania jednego procesu drukowania ścieżek na podłożach. Niestety, ze względu na trudności w zawieszaniu nanopłatków grafenowych w rozpuszczalnikach [120], atramenty grafenowe często charakteryzują się brakiem stabilności. Skutkuje to zwykle ich szybką sedymentacją, występującą zaraz po procesie ujednorodniania zawiesiny. Wiąże się to z jednoczesnym rozwarstwieniem struktury atramentu.

Opadanie na dno cząstek fazy funkcjonalnej stanowi duży problem w procesie wytwarzania ścieżek metodą druku strumieniowego. W głowicy drukarki, pokazanej schematycznie na rysunku 41, cząstki zawarte w niestabilnym atramencie łatwo ulegają aglomeracji. Aglomeraty i niezdyspergowane cząstki sedymentują i osadzają się na wylocie dyszy, co może skutkować zmianą trajektorii lotu kropli lub nawet przerwaniem procesu nadruku, poprzez zatkanie dyszy [37].



Rysunek 41. Schemat sedymtacji cząstek fazy funkcjonalnej w dyszy drukarki strumieniowej

W przypadku technologii powlekania natryskowego, niestabilność atramentu powodować może brak atomizacji nanocząstek w gazie nośnym. Skutkuje to najczęściej niejednorodnością wytwarzanych warstw. Może jednak także wpływać, tak jak w przypadku druku strumieniowego, na zatykanie dyszy drukującej.

Celem badania było określenie poziomu stabilności przewodzących atramentów heterofazowych z fazą funkcjonalną w postaci nanopłatków grafenu. Poziom stabilności określany był jako czas, w którym atrament po ujednorodnieniu dokonanym w trakcie jego wytwarzania, pozostawał jednorodny. Zmierzono więc czas od wytworzenia atramentu aż do, widocznych okiem nieuzbrojonym, pierwszych oznak wystąpienia sedymtacji cząstek fazy funkcjonalnej.

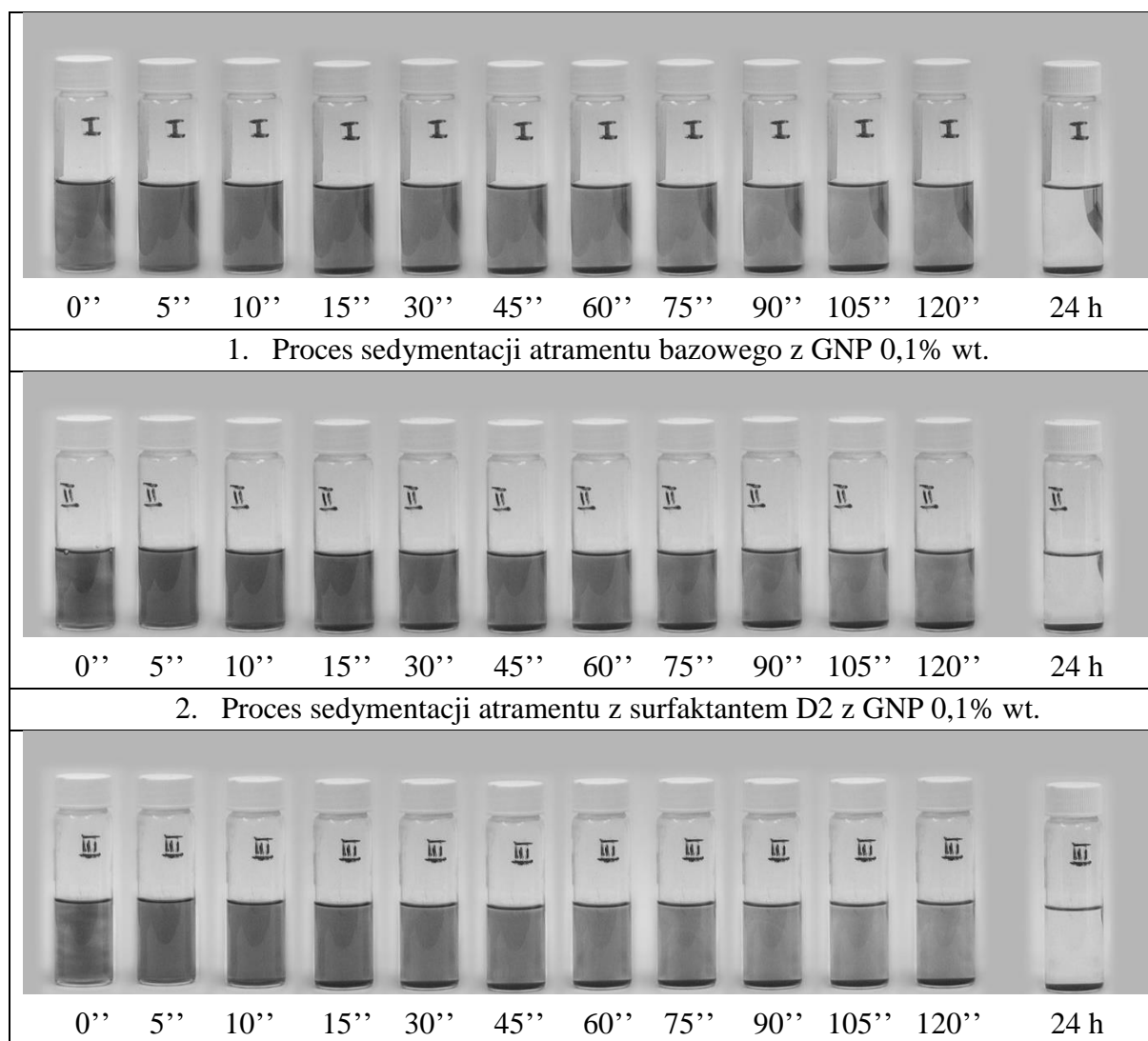
Każdorazowo zbadano trzy rodzaje atramentów, opis których znajduje się w tabeli 9. Atramenty skomponowane zostały przy użyciu nośnika, rozpuszczalnika i GNPSI, wybranych na podstawie starannej selekcji, opisanej w rozdziale 5. Ponieważ stabilność atramentów w znacznym stopniu zależy od zawartości fazy funkcjonalnej, wykonano dwie serie badań: dla atramentów z 0, 1 % wt. GNP oraz 0,5% wt. Zawartości te wybrane zostały z dwóch powodów. 0,01 % to najczęściej stosowana w literaturze zawartość atramentów z nanopłatkami grafenu [120] [34] [121]. 0,5% wt. natomiast jest to maksymalna zawartość GNP w atramencie opracowanym w pracy, który nie zatykał dyszy w procesie drukarskim. W skład dwóch z trzech atramentów wchodziły także wyselekcjonowane surfaktanty: Capstone FS-3100 firmy DuPont (C) oraz AKM-0531 z serii Malialim japońskiej firmy NOF (D2).

Tabela 9. Lista atramentów grafenowych poddanych badaniom stabilności

Nr.	Nazwa atramentu	Zawartość GNP	Surfaktant
1.	Bazowy	0,1% wt.	Brak
2.	Z surf. D2	0,1% wt.	AKM-0531 Malialim
3.	Z surf. C	0,1% wt.	Capstone FS-3100
4.	Bazowy	0,5% wt.	Brak
5.	Z surf. D2	0,5% wt.	AKM-0531 Malialim
6.	Z surf. C	0,5% wt.	Capstone FS-3100

Zdjęcia pokazujące zmianę stabilności atramentów w czasie oraz proces opadania na dno nanopłatków grafenowych zestawione zostały w tabeli 10. Ostateczne wyniki przedstawiono w tabeli 11.

Tabela 10. Zdjęcia pokazujące proces sedymentacji heterofazowych atramentów grafenowych

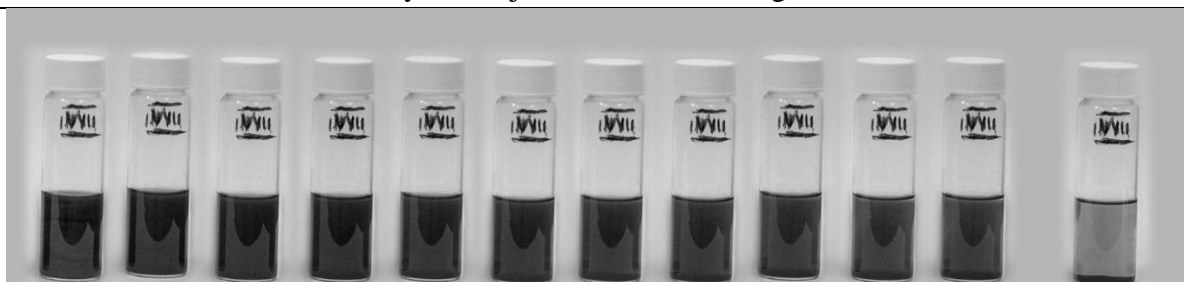


3. Proces sedymentacji atramentu z surfaktantem C z GNP 0,1% wt.



0'' 5'' 10'' 15'' 30'' 45'' 60'' 75'' 90'' 105'' 120'' 24 h

4. Proces sedymentacji atramentu bazowego z GNP 0,5% wt.



0'' 5'' 10'' 15'' 30'' 45'' 60'' 75'' 90'' 105'' 120'' 24 h

5. Proces sedymentacji atramentu z surfaktantem D2 z GNP 0,5% wt.



0'' 5'' 10'' 15'' 30'' 45'' 60'' 75'' 90'' 105'' 120'' 24 h

6. Proces sedymentacji atramentu z surfaktantem C z GNP 0,5% wt.

Zgodnie z przewidywaniami, niezależnie od zawartości nanopłatków grafenowych, najmniej stabilny okazał się atrament bazowy, w którym zawieszono GNP bez dodania surfaktantów. W pozostałych atramentach surfaktanty wydłużyły czas jednorodności zawiesiny heterofazowej. Potwierdza to doniesienia literaturowe, iż surfaktanty są niezbędnym składnikiem przewodzących atramentów heterofazowych [184], [190].



Tabela 11. Czasy stabilności atramentów grafenowych

Atrament	Czas stabilności
Bazowy, 0,1% wt.	10 minut
Z surf. D2, 0,1% wt.	15 minut
Z surf. C, 0,1% wt.	15 minut
Bazowy, 0,5% wt.	5 minut
Z surf. D2, 0,5% wt.	>120 minut
Z surf. C, 0,5% wt.	15 minut

W atramencie bazowym zawierającym 0,1% GNP pierwsze cząstki zaczęły sedymentować po 10 minutach. W atramencie z większą zawartością GNP opadanie cząstek zaobserwowano szybciej, już po 5 minutach od wytworzenia atramentu. Świadczy to o fakcie, iż zwiększenie zawartości fazy funkcjonalnej utrudnia ujednorodnienie atramentu i uzyskanie stabilnej zawiesiny.

Porównanie sedymentacji GNP w atramentach wytworzonych z dodatkiem dwóch różnych surfaktantów pozwoliło wybrać lepszy materiał modyfikujący napięcie powierzchniowe, do zastosowania w heterofazowych zawiesinach grafenowych. Niezależnie bowiem od zawartości zastosowanych płatków grafenowych, najlepszą dyspersję osiągnięto w atramentach, w których jako surfaktantu użyto materiału D2. Czas stabilności został określony jako 15 minut dla GNP 0,1% wt. oraz ponad 120 minut dla GNP 0,5% wt. Tak duża różnica, na korzyść stabilności atramentu z większą zawartością GNP wynika z braku możliwości dokładnego odważenia surfaktantu. Stosowane w pracy zawartości tego materiału to 2-5% wt. (rozdział 4.1) względem GNP. Trudność w odważeniu surfaktantów w przypadku atramentu GNP 0,1% mogła spowodować dodanie zbyt małej jego ilości do zawiesiny.

W atramencie z surfaktantem Capstone, niezależnie od zawartości fazy funkcjonalnej sedymentacja rozpoczęła się po 15 minutach.

Atramenty grafenowe zawierające 0,5% wt. GNP oraz surfaktant D2 pozostawały stabilne nawet po dwóch godzinach od wytworzenia. Biorąc pod uwagę analizę literaturową wskazującą, iż GNP są materiałem bardzo trudno dyspergowalnym [120], poziom stabilności wytworzonych atramentów uznano za satysfakcjonujący i pozwalający na wykonanie procesu nadruku atramentów. Do dalszych badań wybrano więc surfaktant D2.

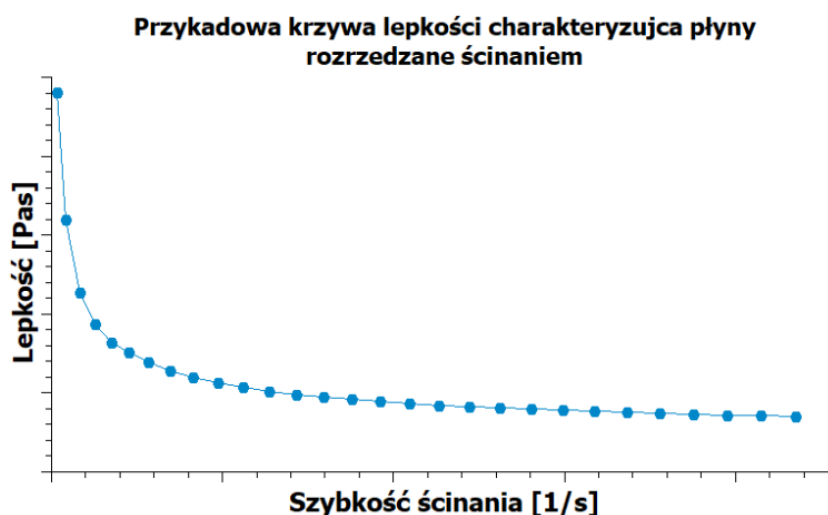
### 7.1.2. Badanie lepkości heterofazowych atramentów grafenowych

Ważnym parametrem charakteryzującym właściwości płynów jest lepkość. Lepkość określana jest jako wewnętrzny opór stawiany przez materiał przeciwko przemieszczaniu się jego części [148], [209]. Jej wartość wyrażana jest w jednostkach [147]. Lepkość determinuje

możliwość użycia atramentu heterofazowego w danej technologii [210], wpływa bowiem bezpośrednio na drukowalność atramentów [211]. W procesie druku strumieniowego związana jest, między innymi, z mechanizmem formowania kropli [197]. Determinuje nie tylko rozmiar, kształt i objętość kropli przy zadanym ze sterownika napięciu, ale również dokładność i powtarzalność ich występowania [184], [212]. Lepkość ułatwia więc generowanie powtarzalnych kropli o tych samych wymiarach, eliminując błędy ich formowania: tworzenie satelit, kropli podwójnych i innych, niekorzystnych w procesie, zjawisk [184], [212]. Ponadto, zbyt wysoka dla danej technologii wartość lepkości może powodować zatkanie dyszy drukującej i przerwanie procesu wytwarzania ścieżek. Zbyt niska natomiast – uniemożliwia uformowanie kropli. W takim przypadku zamiast kropli z dyszy generowany jest aerozol [198], [212]. Podsumowując, lepkość jest kluczowym parametrem w procesie drukowania warstw i ścieżek charakteryzujących się ciągłością, regularnością krawędzi [34], [212], [213]. Wpływa ona zarówno na rozdzielczość [214] jak i funkcjonalność [215] ścieżek.

Jednorodne warstwy o regularnej grubości mogą być uzyskane tylko wtedy, gdy lepkość atramentu jest dostosowana do konkretnej, stosowanej techniki drukarskiej [180]. W technologii druku strumieniowego, uniknięcie zatkania dyszy oraz błędów formowania kropli możliwe jest gdy lepkość atramentu zawiera się w zakresie 1-25 mPas [38], [40], [41], [211]. Natomiast w powlekanii natryskowym wykorzystywane są materiały o lepkości od 0,7 do 2 mPas [180]. Taki zakres zapewnia atomizację cząstek fazy funkcjonalnej umożliwiającą wytworzenie jednorodnych powłok i warstw w procesie natrysku.

Atramenty wykorzystywane w technikach elektroniki drukowanej powinny charakteryzować się właściwościami reologicznymi rozrzedzania ścinaniem [216]. Oznacza to, że ich lepkość powinna maleć wraz ze wzrostem występującego w procesie naprężenia, zwanego szybkością ścinania. Dzięki temu w trakcie działania naprężeń – powstających np. podczas przechodzenia atramentu przez dyszę – lepkość atramentu maleje na tyle, iż możliwy jest proces generowania kropli oraz sam proces nadruku. Po zderzeniu kropli z podłożem, gdy siły nacisku maleją, lepkość rośnie, uniemożliwiając niekorzystny i nieregularny rozpląt atramentu na podłożu. Przykładowy wykres krzywej lepkości, typowy dla płynów rozrzedzanych ścinaniem, przedstawiony został na rysunku 42.

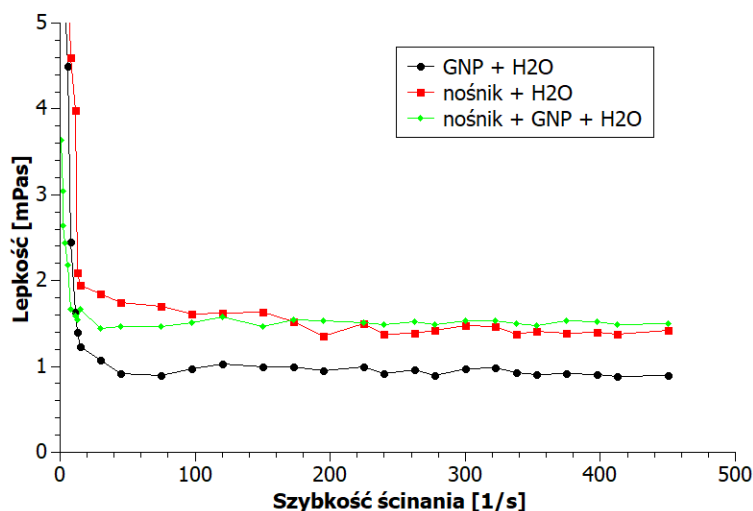


Rysunek 42. Krzywa lepkości charakterystyczna dla płynów rozrzedzanych ścinaniem

Jak widać na wykresie, lepkość badanego materiału jest bardzo wysoka dla niskich wartości szybkości ścinania, natomiast wraz ze wzrostem szybkości ścinania – maleje. Dla wysokich wartości ścinania, wynoszących zazwyczaj około 400 1/s, następuje widoczna stabilizacja wartości lepkości.

Celem pracy było zbadanie lepkości wytworzonych atramentów grafenowych oraz zweryfikowanie czy spełniają one kryteria reologiczne stawiane atramentom przeznaczonym do druku strumieniowego oraz natrysku. W związku z powyższym testy miały potwierdzić, iż zawiesiny grafenowe charakteryzują się właściwościami rozrzedzania ścinaniem a ich lepkość mieści się w zakresie 0,7-2 mPas. Przeprowadzone dodatkowo badania reologiczne poszczególnych, wyselekcjonowanych i opisanych w rozdziale 5, komponentów wytwarzanych atramentów heterofazowych, pozwoliło na sprawdzenie ich wpływu na lepkości opracowanych atramentów.

Nośnik nadaje zawiesinie heterofazowej określone właściwości reologiczne [147]. Celem potwierdzenia tej tezy w przypadku heterofazowych atramentów grafenowych, testom reologicznym poddano zawiesiny zawierające wybrany w pracy materiał nośnika PEG1500. Rysunek 43 przedstawia wyniki testów wpływu nośnika na lepkość atramentu. Na wykresach widoczne są krzywe lepkości: wodnej zawiesiny płatków grafenowych (GNP + H<sub>2</sub>O), 5%-owego roztworu nośnika w wodzie (nośnik + H<sub>2</sub>O), oraz kompletnego atramentu tworzonego przez zawiesinę nośnika, wody i płatków grafenowych (nośnik + GNP + H<sub>2</sub>O).



Rysunek 43. Krzywe lepkości przedstawiające wpływ nośnika na lepkość atramentu

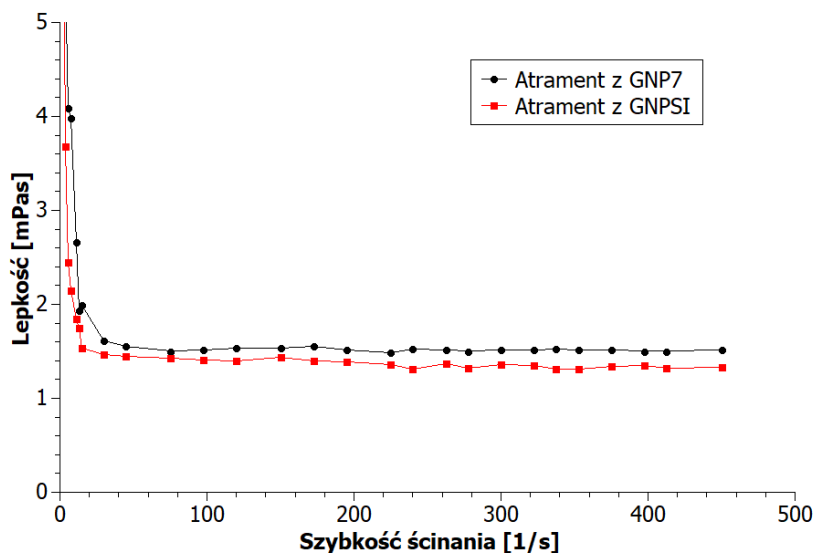
Na podstawie widocznych na rysunku 43 krzywych lepkości oraz wyników zaprezentowanych w tabeli 12 zauważyć można, iż najniższą lepkością, wynoszącą 0,88 mPas charakteryzuje się zawiesina GNP z wodą, pozbawiona nośnika. Dodanie nośnika do tej zawiesiny, oznaczające wytworzenie kompletnego atramentu, podnosi jej lepkość o ponad 0,6 mPas. Natomiast różnica w lepkości wodnego roztworu nośnika oraz kompletnego atramentu jest rzędu setnych części mPas. Uzyskane wyniki potwierdzają tezę, że to nośnik wpływa na lepkość wytwarzanego atramentu poprzez. W związku z tym użycie i wybór materiału nośnika determinuje możliwość użycia atramentu w danej technologii elektroniki drukowanej. Zwiększający lepkość, zastosowany w pracy nośnik PEG1500 nadaje atramentowi grafenowemu właściwości rozrzedzania ścinaniem. Otrzymana lepkość, wynosząca 1,5 mPas, pozwala na wykorzystanie atramentu zarówno w druku strumieniowym jak i powlekanii natryskowym.

Tabela 12. Wartości lepkości zawiesin testowanych w celu określenia wpływu nośnika na lepkość atramentu

Nazwa kompozycji	Skrót	Lepkość [mPas]
Wodna zawiesina nanopłatków grafenowych	GNP+H <sub>2</sub> O	0,88
5%-owy wodny roztwór nośnika PEG1500	nośnik+H <sub>2</sub> O	1,42
Kompletny atrament grafenowy bazujący na nośniku PEG1500	Nośnik+GNP+H <sub>2</sub> O	1,5

Część źródeł literaturowych wskazuje, iż lepkość płynów zależna jest także od rodzaju zawieszony w nich fazy funkcjonalnej oraz wymiarów użytych nanocząstek [217], [218]. W celu sprawdzenia wpływu średnic cząstek nanopłatków grafenowych na lepkość atramentów,

testom reologicznym poddano grafenowe atramenty bazujące na dwóch różnych materiałach nanopłatków, wyselekcjonowanych w rozdziale 5.4. Były to: wybrane do atramentów do druku strumieniowego GNP SI o średnicach cząstek 8  $\mu\text{m}$  oraz do powlekania natryskowego GNP7 o średnicach cząstek 15  $\mu\text{m}$ .



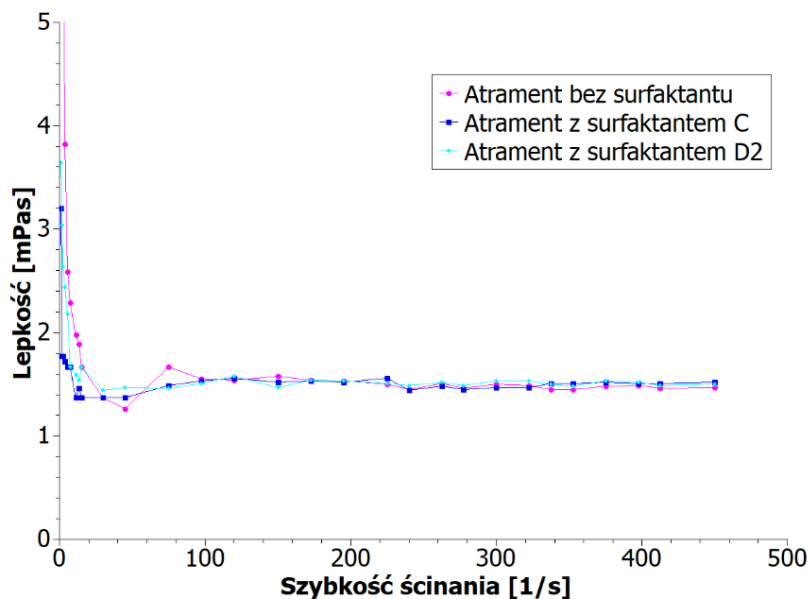
Rysunek 44. Krzywe lepkości grafenowych atramentów przedstawiające wpływ zastosowanych płatków grafenowych na lepkość

Na podstawie otrzymanych krzywych lepkości, przedstawionych na rysunku 44 stwierdzić można, że rodzaj materiału grafenowego fazy funkcjonalnej ma znikomy wpływ na lepkość całego atramentu. Pomimo iż GNP7 zawiera płatki o prawie dwukrotnie większych średnicach niż GNPSI, atramenty zawierające oba materiały fazy funkcjonalnej miały porównywalną lepkość, wynoszącą dla szybkości ścinania 450 1/s 1,33 mPas dla GNPSI oraz 1,50 mPas dla GNP7. Jest to spowodowane bardzo małą zawartością procentową GNP, wynoszącą od 0,1 % wt. w całym atramencie. W literaturze, wskazującej na wpływ średnic cząstek fazy funkcjonalnej na lepkość zawiesin heterofazowych, zawartość płatków zawierała się w zakresie 5 - 15 % wt.

Podsumowując, oba materiały grafenowe mogą bez przeszkód być wykorzystywane do wytwarzania grafenowych, przewodzących atramentów do druku strumieniowego lub natrysku o lepkości dostosowanej do wykorzystywanych w pracy technologii druku.

W ramach testów wpływu surfaktantów na lepkość grafenowych atramentów zbadano i zestawiono na rysunku 45 także krzywe lepkości trzech heterofazowych zawiesin. Pierwsza z nich to grafenowy atrament wytworzony bez użycia surfaktantu. Dwa pozostałe to atramenty bazujące na nanopłatkach grafenowych poddanych funkcjonalizacji przy użyciu dwóch

różnych surfaktantów: Capstone FS-3100 firmy DuPont (C) oraz AKM-0531 z serii Malialim japońskiej firmy NOF (D2). Wyniki przedstawiono także w tabeli 13.



Rysunek 45. Krzywe lepkości grafenowych atramentów przedstawiające wpływ zastosowanych surfaktantów na lepkość

Krzywe lepkości wszystkich trzech atramentów mają bardzo podobny kształt a ich lepkości charakteryzują się porównywalnymi wartościami dla całego zakresu szybkości ścinania. Wartości lepkości dla szybkości ścinania 450 1/s wynosiły od 1,47 do 1,52 mPas. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że dodatek surfaktantu do grafenowych atramentów heterofazowych nie zmienia ich lepkości. Surfaktant jako środek powierzchniowo czynny ma znaczący wpływ na drugi z parametrów reologicznych: na napięcie powierzchniowe. Dodatek surfaktantu zmniejsza wartość napięcia powierzchniowego atramentu, dzięki czemu niweluje niekontrolowany rozplływ kropeł na podłożu.

Tabela 13. Wartości lepkości atramentów testowanych w celu określenia wpływu surfaktantów na lepkość

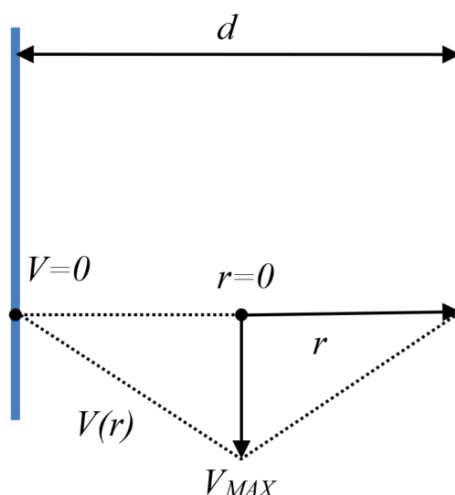
Nazwa kompozycji	Lepkość [mPas]
Atrament bez surfaktantu	1,47
Atrament z surfaktantem C	1,52
Atrament z surfaktantem D2	1,5

Wszystkie rodzaje przebadanych atramentów grafenowych mają lepkości zgadzające się z zakresem lepkości dedykowanym technice druku strumieniowego od 1 do 25 mPas [38], [40], [41] oraz powlekania natryskowego: 0,7-2 mPas [180]. Co więcej, na podstawie krzywych

lepkości potwierdzono, iż atramenty te charakteryzują się właściwościami rozrzedzenia ścinaniem. Oznacza to, że wyselekcjonowane i opisane szczegółowo w rozdziale 5 materiały nośników, fazy funkcjonalnej i surfaktantów nadają się do wykorzystania w produkcji atramentów do technologii druku strumieniowego i powlekania natryskowego.

### 7.1.3. Model sił ścinających i prędkości ścinania w procesie druku strumieniowego

Chociaż druk strumieniowy jest technologią używaną od lat [219], w literaturze brakuje dokładnego opisu sił ścinających i naprężeń działających na atrament w głowicy, występujących podczas procesu drukowania ścieżek. Jednakże, w kontekście właściwości reologicznych atramentu, a szczególnie jego lepkości, bardzo istotna jest wiedza na temat wartości naprężeń, określanych jako szybkości ścinania, działających na kroplę. Część źródeł literaturowych podaje iż szybkości ścinania w procesie druku strumieniowego powinny mieścić się w zakresie  $10^3$ – $10^4$  1/s [220]. W innych publikacjach znaleźć można informacje, że szybkości ścinania obserwowane podczas wytwarzania ścieżek tą metodą są zwykle rzędu  $10^5$  1/s [197], [203], [221]. Bazując na tych publikacjach można w prawdzie przypuszczać, że naprężenia występujące w dyszy drukarki strumieniowej są bardzo wysokie, jednak nikt nie policzył ich realnej wartości. W pracy przedstawiono kompletny model i obliczenia, opierające się na założeniach przedstawionych poniżej. Obliczenia te pozwoliły na określenie minimalnej wartości szybkości ścinania działającej na atrament podczas wyrzucania z dyszy, w trakcie procesu druku strumieniowego.



Rysunek 46. Model rozkładu prędkości atramentu w dyszy drukarki strumieniowej

Rozkład prędkości atramentu wewnątrz dyszy ma w przybliżeniu kształt trójkątny, z zerową wartością na ściankach dyszy, wzrastającą liniowo i osiągającą maksimum przy jej otworze, jak pokazano na rysunku 46. Trójkątny profil prędkości umożliwia określenie jednej średniej wartości prędkości ścinania dla całej objętości płynu, co nie byłoby możliwe przy użyciu skomplikowanego, parabolicznego profilu prędkości.

Zakładając, że dysza używana do druku strumieniowego ma kształt cylindryczny, pole jej przekroju jest oznaczone równaniem (1), a obwód dla danego promienia  $r$  – równaniem (2). Stosując wzór na szybkość ścinania według przepływu Couette (3), możliwe jest obliczenie prędkości atramentu na danym promieniu. Prowadzi to do wyznaczenia, w prosty sposób, wartości średniej prędkości zawiesiny w polu przekroju cylindrycznej dyszy (4). Z powodu oporów i strat energii podczas segmentacji strumienia płynu w kroplę, prędkość wyrzucanej kropli  $V_{DROP}$  nie może być wyższa niż średnia prędkość płynu wewnątrz dyszy  $V_{MEAN}$  (5).

$$S = \pi \cdot \left(\frac{d^2}{4}\right) \quad (1)$$

$$\delta S(r) = 2\pi r \quad (2)$$

$$V(r) = \gamma \cdot \left|\frac{d}{2} - r\right| \quad (3)$$

$$V_{MEAN} = \frac{\int_{r=0}^{\frac{d}{2}} \delta S(r) \cdot V(r) dr}{S} = 0.166 \cdot \gamma \cdot d \quad (4)$$

$$V_{DROP} \leq V_{MEAN} \quad (5)$$

$$\gamma \geq \frac{V_{DROP}}{0.166 \cdot d} \quad (6)$$

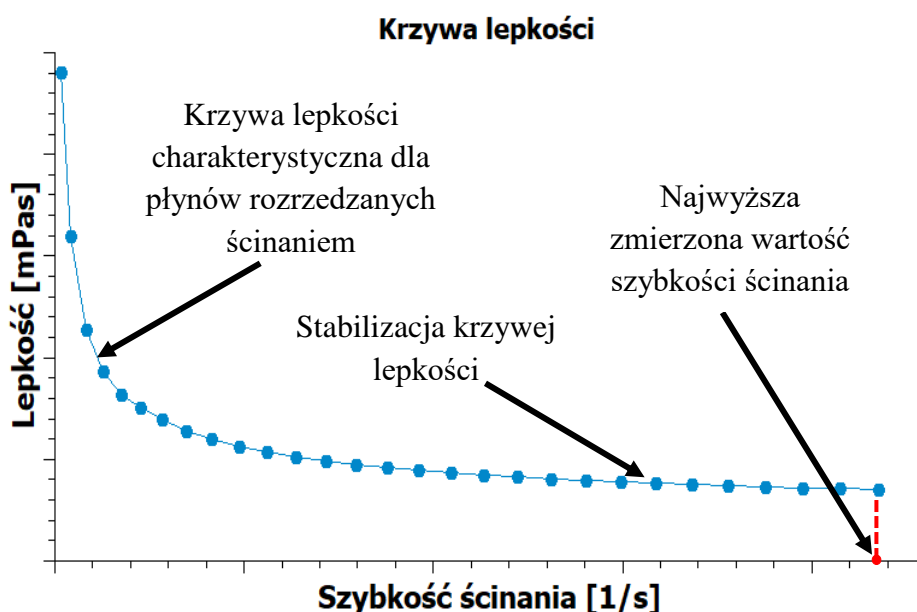
$$\gamma \geq 6 \cdot 10^5 \frac{1}{s} \quad (7)$$

gdzie:  $V_{MAX}$ —maksymalna prędkość atramentu na środku dyszy,  $d$ —średnica dyszy,  $S$ —przekrój poprzeczny dyszy,  $\delta S(r)$ —obwód dla danego promienia  $r$ ,  $V(r)$ —prędkość w punkcie o danym promieniu,  $V_{MEAN}$ —średnia prędkość płynu w obszarze przekroju poprzecznego,  $V_{DROP}$ —prędkość kropli,  $\gamma$ —prędkość ścinania.

Zgodnie z literaturą prędkość kropli w procesie druku strumieniowego  $V_{DROP}$  nie powinna być mniejsza niż 5m/s [167], [222]. Używana w badaniach średnica dyszy miała wymiar  $d = 50 \mu\text{m}$ . Dane te pozwalają obliczyć szybkość ścinania  $\gamma$  jako wartość większą lub równą 1/s, zgodnie z równaniem (6).



Obliczona wartość szybkości ścinania zgodna jest z publikacjami podającymi iż prędkość ścinania powinna być rzędu  $10^5$  1/s [197], [203], [221]. Ta bardzo wysoka wartość często przekracza zakresy pomiarowe lepkościomierzy. Ponieważ atramenty używane w elektronice drukowanej charakteryzują się najczęściej właściwościami rozrzedzania ścinaniem, ich lepkość, zmniejsza się wraz ze wzrostem prędkości ścinania, aż do uzyskania stabilnej wartości. W związku z tym, wartość lepkości może być odczytywana dla najwyższej zmierzonej szybkości ścinania, w których krzywa lepkości jest już ustabilizowana, tak jak przedstawiono na rysunku 47.



Rysunek 47. Przykładowy kształt krzywej lepkości płynu rozrzedzanego ścinaniem

#### 7.1.4. Badanie formowania kropli atramentów i tworzenia ścieżek– dobór parametrów procesu druku strumieniowego

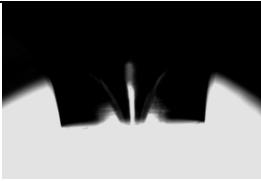
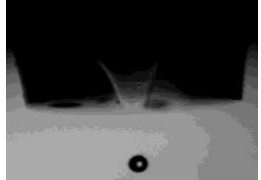


Parametry druku strumieniowego, opisane szczegółowo w rozdziale 4.2.1, mają znaczący wpływ na przebieg procesu druku, ze względu na ich bezpośrednie oddziaływanie na formowanie i lot kropli oraz formowanie drukowanej ścieżki. Zalicza się do nich: napięcie, czas trwania sygnału, częstotliwość generowania kropli, posuw, postój i temperaturę stolika.

Celem pracy był dobór parametrów druku strumieniowego tak, aby generowana z dyszy kropla miała powtarzalny kształt o regularnej średnicy oraz aby uniknąć błędów formowania kropli i ścieżki w trakcie trwania procesu.

Napięcie zadawane przez sterownik głowicy wpływa na zdolność uformowania kropli oraz prędkość jej lotu. Badania prowadzone w pracy miały na celu wyznaczenie zakresu wartości napięcia, przy którym możliwe jest uformowanie powtarzalnej kropli heterofazowego

atramentu grafenowego. Zbadano napięcie w zakresie od 0 do 80 V. Wyniki przedstawione zostały w tabeli 14.

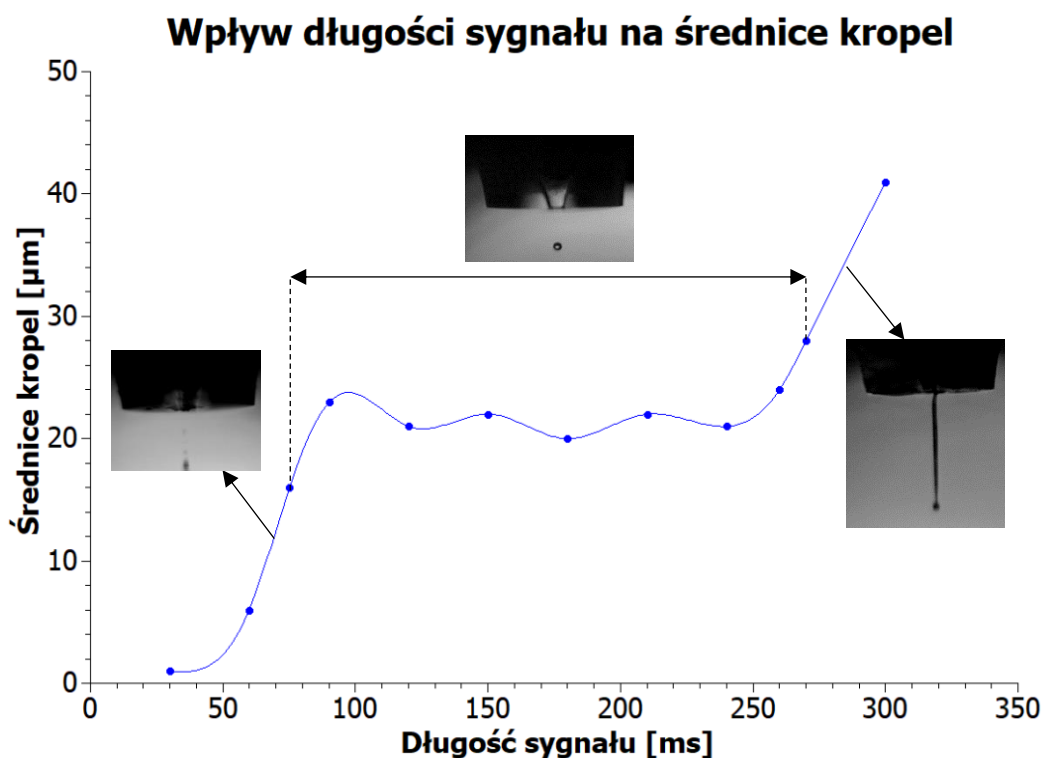
*Tabela 14. Wyniki badań związane z wpływem napięcia na generowaną z dyszy kroplę*

Napięcie [V]	Wynik	Obraz
0-40	Brak kropli	
40-50	Prawidłowa kropla	
50-65	Kropla z satelitą	
65-80	Podwójna kropla	

Na podstawie badań ustalono, iż dla wytworzonych atramentów grafenowych minimalne napięcie, przy którym formuje się kropla wynosiło 40 V. Kropla atramentu powstawała w zakresie 40-50 V, wraz ze wzrostem napięcia wzrastała prędkość jej lotu. Zastosowanie większych niż 50 V wartości napięcia powodowało zbyt dużą prędkość kropli, skutkującej powstawaniem błędów kropli takich jak widoczne w tabeli 14.: krople z satelitą lub podwójne krople. Błędy te uniemożliwiają wytwarzanie ciągłych ścieżek o jednorodnej grubości i prostych, równych krawędziach. W związku z tym, zakres stosowanego w pracy napięcia ustalono na 40-50 V.

Rozmiar kropli zależny jest od czasu trwania zadanego ze sterownika sygnału napięciowego. W związku z tym parametr ten determinuje rozdzielczość wykonywanych wydruków. Prawidłowy dobór długości trwania sygnału, oznaczający uzyskanie regularnych kropli o powtarzalnej średnicy, jest więc znaczący dla procesu druku.

W pracy wykonano testy wpływu długości sygnału na możliwość utworzenia kropli oraz na jej rozmiar. Zakres badanej długości sygnału to 30-300 ms. Wyniki przedstawiono na rysunku 48.



Rysunek 48. Średnice kropli atramentu grafenowego w zależności od czasu trwania sygnału

Pojedynczą kroplę atramentu grafenowego, o powtarzalnej, niezmiennej w czasie średnicy uzyskano dla czasu trwania sygnału w, zaznaczonym na rysunku, zakresie 75-270 ms. Otrzymywane w tym zakresie długości trwania sygnału krople miały średnice od 20 – 24  $\mu\text{m}$ . Krótszy czas trwania impulsu uniemożliwiał wytworzenie prawidłowej kropli atramentu. Dla sygnału <75 ms kropla nie powstawała wcale lub zamiast kropli generowany był aerozol. Generowany aerozol skutkowało wysychaniem atramentu w trakcie lotu w kierunku podłoża. W takim wypadku nanocząstki osadzające się na podłożu nie tylko nie tworzyły regularnej ścieżki, ale także charakteryzowały się brakiem adhezji do podłoża. Z kolei dłuższy czas trwania sygnału, >270 ms powodował powstanie strumienia atramentu zamiast kropli. Podawane w ten sposób były zbyt duże objętości materiału, co powodowało nieregularne rozlewanie się atramentu na podłożu i związany z tym brak możliwości uformowania ścieżki.

Proces dobierania parametrów formowania kropli zakończył się uzyskaniem prawidłowej kropli o powtarzalnej w czasie średnicy. Potwierdziło to, iż wytworzone grafenowe atramenty heterofazowe można wykorzystać w technologii druku strumieniowego.

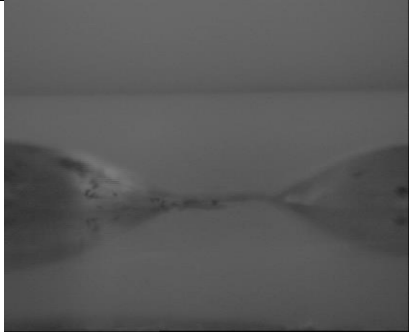
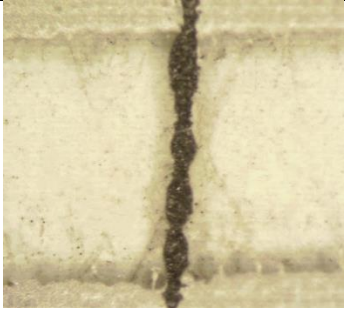

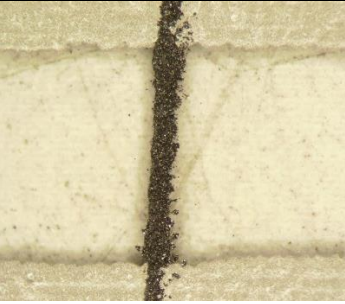
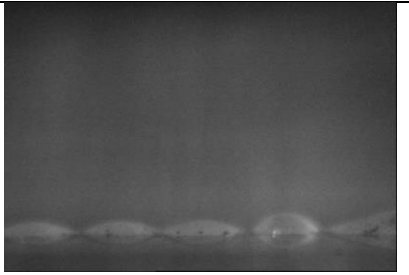
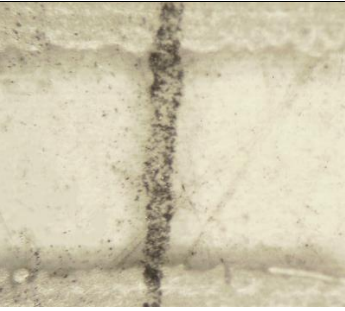
Celem kolejnych badań był dobór parametrów formowania ścieżki oraz wykonanie nadruku ścieżek.

Standardowo stosowana w procesie druku strumieniowego częstotliwość generowania kropli zawiera się w granicach 1-20 Hz [143]. Zmniejszenie częstotliwości zwiększa dokładność otrzymywanych wydruków, zwiększa jednak czas wytwarzania ścieżek. Na wstępnych badaniach ustalono iż w testach prowadzonych w pracy wystarczającą częstotliwością jest 10 Hz. Ustalenie stałej wartości częstotliwości pozwoliło na dobranie szybkości wykonywania wydruku poprzez dobór parametrów ruchu i postoju stolika X-Y.

Stolik podłożowy, na którym odbywało się wstępne suszenie ścieżek i warstw, podgrzewany był w trakcie procesu druku do 60-80°C. Dobór temperatury i proces suszenia wstępnego opisano w rozdziale 4.2.3.

Ustalenie prędkości przesuwu stolika możliwe było poprzez dobór skoku stolika i czasu jego postoju. Postawanie ścieżki jest wynikiem łączenia się pojedynczych kropeł na nadrukowywanym podłożu. Ze względu na stały, trwający 0,1 s, odstęp występujący między wystrzeliwaniem z dyszy kolejnych kropli, aby możliwe było utworzenie ciągłej ścieżki czas postoju stolika ustalono także na 0,1 s. Parametrem dobranym na podstawie obserwacji podłoża w trakcie oraz po procesie nadruku był skok stolika. Zbadany skok stolika, dopasowany do średnic wytwarzanych kropeł, mieścił się w zakresie 10 – 60  $\mu\text{m}$ , wyniki oraz wykonane zdjęcia przedstawiono w tabeli 15.

Tabela 15. Wyniki badań związane z wpływem skoku stolika na drukowaną ścieżkę

	Ścieżka w trakcie wydruku	Ścieżka po wydruku
Skok <30 $\mu\text{m}$		
Skok >30 i <40 $\mu\text{m}$		
Skok >40 $\mu\text{m}$		

Dla skoku <30  $\mu\text{m}$  krople spadały na podłoże zbyt blisko siebie, przez co zlewały się tworząc na podłożu nieregularnie, rozlewające się nagromadzenia atramentu. Skutkowało to wytworzeniem ścieżki o nieregularnych, pofalowanych brzegach. Z drugiej strony, dla skoku >40  $\mu\text{m}$ , krople spadały na podłoże tak, iż były od siebie zbyt oddalone. Powstające w wyniku zderzenia kropli z podłożem kropki atramentu nie łączyły się ze sobą. W związku z tym wytworzona ścieżka charakteryzowała się brakiem ciągłości. Jedynie przy skoku >30 i <40  $\mu\text{m}$  udało uzyskać się ciągłe ścieżki, o równych krawędziach. W tym wypadku krople po zderzeniu z podłożem łączyły się, a wysychając tworzyły ciągły wzór.

Dzięki dobraniu parametrów procesu druku strumieniowego wytworzonych w pracy grafenowych atramentów heterofazowych, badania zakończyły się uzyskaniem jednorodnych, ciągłych ścieżek o regularnych, prostych krawędziach. Zastosowane parametry przedstawiono w tabeli 16.

*Tabela 16. Dobrane parametry procesu druku strumieniowego grafenowych atramentów heterofazowych*

<b>Parametr</b>	<b>Wartość</b>
Napięcie [V]	40-50
Długość trwania sygnału [ms]	75-270
Częstotliwość kropli [Hz]	10
Postój stolika [ms]	100
Skok stolika [ $\mu\text{m}$ ]	30-40
Temperatura grzania stolika [ $^{\circ}\text{C}$ ]	60-80

## 7.2. Charakteryzacja i właściwości wytwarzanych warstw i wzorów grafenowych

### 7.2.1. Badanie adhezji i wytrzymałości mechanicznej wytwarzanych warstw na różnych typach podłoży

Adhezja to najważniejsza z właściwości drukowanych warstw i ścieżek [223] związana z interakcją materiału warstwy oraz podłoża. Dlatego zależna jest zarówno od kompozycji drukowanego atramentu jak i materiału podłożowego, na którym wytwarzany jest wzór lub warstwa.

Proces wytwarzania funkcjonalnych warstw i wzorów powinien skutkować otrzymaniem nadruków, które charakteryzują się adhezją zapewniającą pozostanie ścieżki na podłożu, nawet podczas działania naprężeń. W kontekście biologicznym warstwa ta powinna także pozostawać, w niezmienionej formie, na podłożu po zalaniu cieczą o przybliżonym składzie soli fizjologicznej, używanej w laboratoriach biologicznych przy pracy z komórkami.

W związku z tym, celem badań było zbadanie adhezji warstw drukowanych na różnych podłożach. Do testów wybrano zarówno materiały sztywne: szkło oraz ceramikę, jak i dedykowane elektronice drukowanej podłoża elastyczne: folię PET. Adhezja została zbadana także na podłożach nietypowych: cewnikach oraz metalowych implantach. Adhezję oceniano na dwa sposoby: metodą scotch test, opisaną w rozdziale 4.3.3 oraz poprzez obserwację warstwy, prowadzoną po zalaniu jej wodnym roztworem soli fizjologicznej oraz wysuszeniu. Wytwarzane warstwy powinny bowiem być odporne na ciecze, zbliżone składem do soli fizjologicznej, występujące w aplikacjach biologicznych. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 17.

*Tabela 17. Ocena adhezji warstw wytworzonych na różnych podłożach.*

<b>Materiał</b>	<b>Test scotch tape</b>	<b>Adhezja po zalaniu wodą</b>
Szkło	+++++	+++++
Płytk ceramiczna	+++++	+++++
Folia PET	+++	+++
Cewnik Foleya	+++	+++
Tytanowe implanty	++++	++++

Na podstawie poczynionych obserwacji stwierdzono, iż warstwy grafenowe na wszystkich badanych podłożach spełniają wymogi adhezyjne stawiane powłokom wytwarzanym metodami elektroniki drukowanej. Wyniki wskazują jednak, iż warstwy na podłożach takich jak szkło i ceramika, które suszone były w wyższych temperaturach wykazują

lepszą adhezję od warstw na podłożach z folii PET. Działanie wysokich temperatur przy krótkim czasie suszenia zapewnia szybszą polimeryzację materiału nośnika, przy braku efektu pęknięcia warstwy, co jest przyczyną lepszej adhezji.

Wytwarzane warstwy spełniają także wymagania adhezyjne związane z ich wykorzystaniem w badaniach i aplikacjach biologicznych. Zarówno po zalaniu roztworem soli fizjologicznej, jak i późniejszym wysuszeniu warstwa pozostawała na podłożu. Nie zaobserwowano odrywania się płatków od podłoża ani innych zmian mikrostruktury warstw. Można więc potwierdzić, iż zalanie wodnym roztworem soli fizjologicznej nie powoduje zniszczenia warstwy grafenowej. Wytwarzane warstwy grafenowe mogą w związku z tym być poddawane działaniu płynów i zawiesin używanych w hodowlach komórkowych w zastosowaniach biomedycznych.

Wytworzone na elastycznych podłożach warstwy poddane zostały także badaniom zmęczeniowym, które opisano w rozdziale 4.3.3. Adhezja warstw na nie uległa zmianie nawet po 30 000 cykli zginania. Badania te potwierdziły, iż wytwarzane warstwy grafenowe charakteryzują się wysoką wytrzymałością mechaniczną.

### **7.2.2. Badanie grubości wytwarzanych warstw i ścieżek**

Grubość ścieżek, wzorów i warstw otrzymywanych technikami elektroniki drukowanej jest parametrem zależnym m.in. od technologii ich wytwarzania. Za pomocą technik grubowarstwowych, takich jak sitodruk, uzyskuje się warstwy grube  $> 100 \mu\text{m}$  [224]. Znacznie cieńsze warstwy wytwarzane są technologią powlekania natryskowego: od 20 nm [38] oraz druku strumieniowego: od 30 do 50 nm [37].

W technologii druku strumieniowego grubość ścieżek jest wprost proporcjonalna do liczby wykonanych nadruków [37], [40], [41], co umożliwia sterowanie jej wartością. Jest to możliwe poprzez wykonywanie kolejnych powtórzeń procesu drukowania, rozumianych jako ponowny przesuw podłoża pod dyszą generującą krople [34].

Grubość wytwarzanych warstw może decydować o przewodnictwie i stopniu ich transparentności, co jest kluczowe w aplikacjach elektroniki drukowanej. Jednakże parametr ten jest istotny także w kontekście zastosowań biomedycznych. W zależności od grubości warstwy na podłożu hodowlanym zmienia się zdolność adhezji do podłoża komórek. Grubość wpływa w związku z tym na proces ich namnażania. Jeśli materiał jest biozgodny, zwiększenie grubości i jednorodności warstwy zwiększa przeżywalność komórek. Jeśli materiał jest toksyczny, zwiększenie jego grubości zmniejsza przeżywalność komórek.




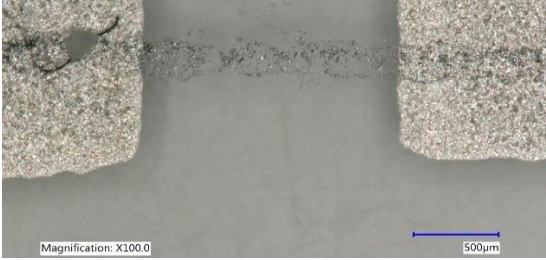





Przeprowadzone w pracy testy miały na celu zbadanie grubości warstw i ścieżek oraz określenie wpływu ilości powtórzeń procesu nadruku grafenowego atramentu heterofazowego, na grubość warstw i wzorów, wytwarzanych przy użyciu dwóch technologii: druku strumieniowego oraz powlekania natryskowego.

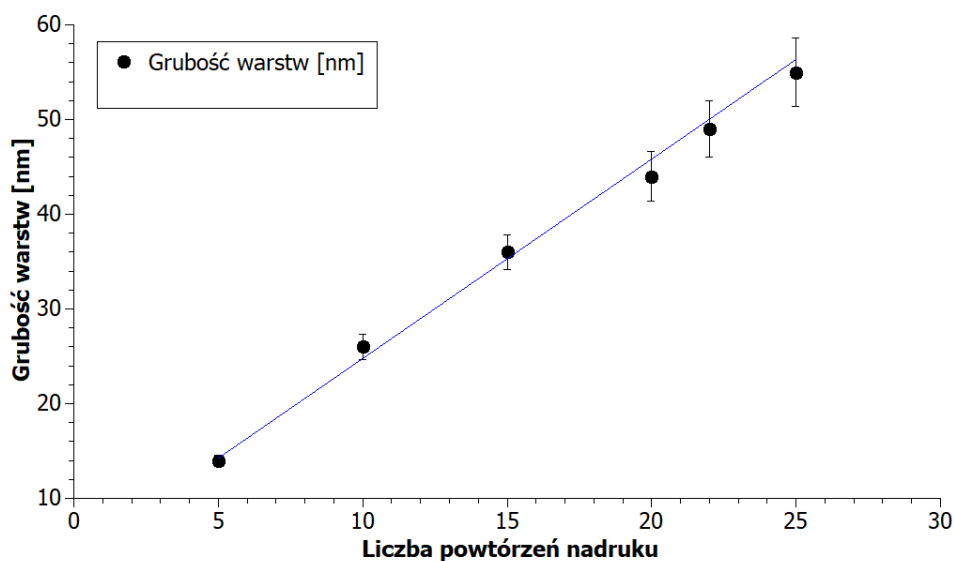
Do przeprowadzenia testów wykorzystano atramenty grafenowe o tym samym składzie, określonym w rozdziale 5, różniące się między sobą tylko rodzajem zastosowanej fazy funkcjonalnej. Do druku strumieniowego wykorzystano niezapychające mikro dyszy cząstki o średnicach płatków 8  $\mu\text{m}$ : GNPSI, do powlekania natryskowego większe, o wymiarach około 15  $\mu\text{m}$ : GNP7.

Zdjęcia mikroskopowe, przedstawiające w powiększeniu ścieżki uzyskane metodą druku strumieniowego, dla różnej ilości powtórzeń, oraz ich grubości, pokazane zostały w tabeli 18. Wykres zależności grubości od ilości powtórzeń widoczny jest natomiast na rysunku 49.

Obserwacja mikroskopowa pozwoliła potwierdzić, iż przy wytwarzaniu wzorów drukiem strumieniowym, w celu osiągnięcia jednorodnych ścieżek grafenowych, niezbędne jest wykonanie wielu powtórzeń procesu. Nadrukowanie od 1-4 warstw grafenowych skutkuje powstaniem ledwie widocznego zarysu ścieżki, który z tego względu nie został uwzględniony w badaniu grubości. Ścieżka zaczyna być widoczna przy wykonaniu 5 warstw, jednak pozostają wciąż zauważalne błędy związane z jej niedodrukowaniem. Ścieżka wypełnia się materiałem grafenowym dopiero przy 15 powtórzeniach procesu. Niejednorodności oraz widoczne braki materiału znikają całkowicie przy wykonaniu 22 warstw. Ocena mikrogeometrii pozwala stwierdzić, że ścieżki >22 warstw są jednorodne, poprawnie wydrukowane i powinny przewodzić prąd elektryczny.

*Tabela 18. Mikroskopowe zdjęcia przedstawiające obrazy warstw uzyskanych metodą druku strumieniowego dla różnej liczby powtórzeń procesu nadruku*

Mikroskopowe obrazy warstw	Liczba warstw	Grubość [nm]
	1	-
	5	14
	10	27
	15	36
	20	44
	22	49
	25	55



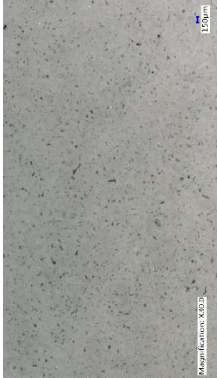
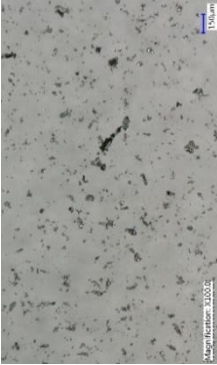
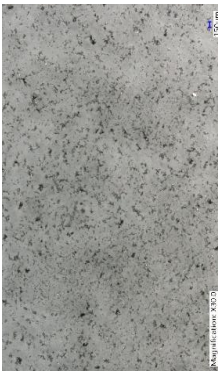
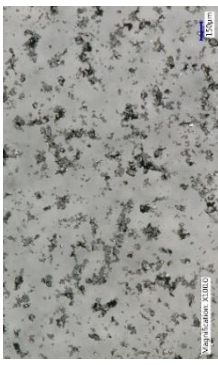
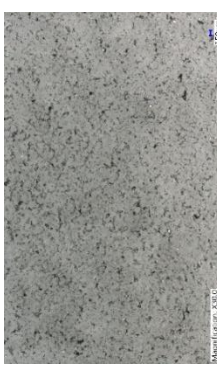
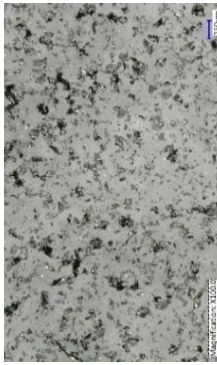
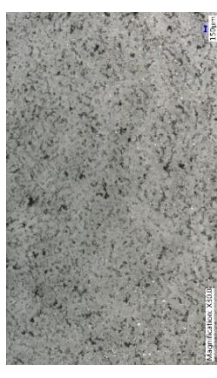
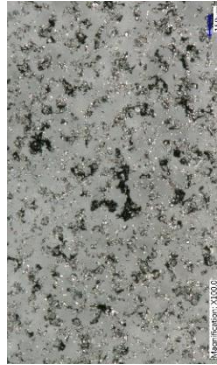
Rysunek 49. Wykres zależności grubości ścieżek od ilości powtórzeń procesu nadruku metodą druku strumieniowego

Na wykresie przedstawionym na rysunku 49 widać, że grubość ścieżek, uzyskanych przy użyciu opracowanego atramentu grafenowego, wzrasta wprost proporcjonalnie wraz ze wzrostem liczby wykonanych powtórzeń nadruków, a więc nadrukowanej liczby warstw.

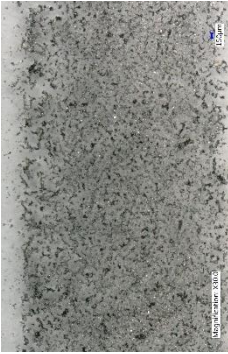
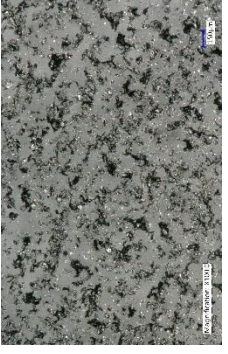
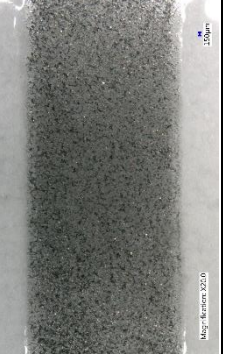

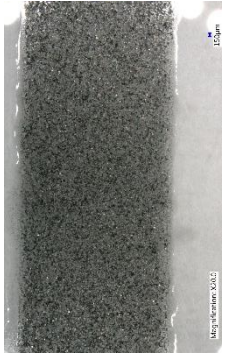

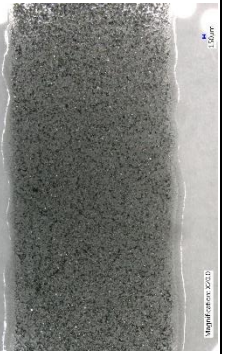


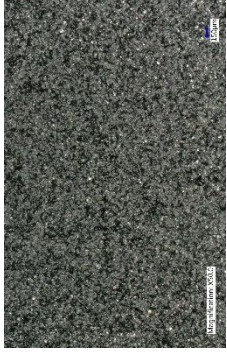



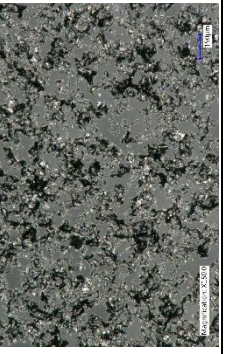
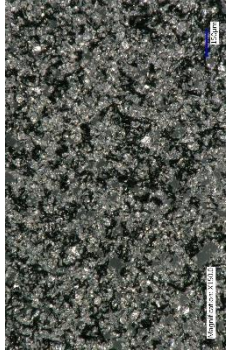
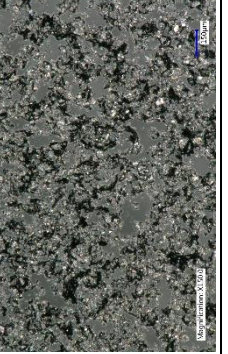
Uzyskane wyniki są porównywalne z wynikami prezentowanymi w literaturze dotyczących grubości warstw grafenowych powstałych przy użyciu atramentów bazujących na nanopłatkach grafenowych. Torrisi i wsp. dla 20 powtórzeń procesu nadruku uzyskali, w zależności od metody przygotowania podłoża, ścieżki o grubości od 35 – 60 nm [37]. Wytworzona w pracy ścieżka nadrukowana 20 razy, miała natomiast grubość 44 nm, co mieści się w zakresie prezentowanym w publikacji.

Powiększenia obrazujące wytworzone metodą powlekania natryskowego warstwy, wydrukowane przy różnej liczbie powtórzeń, wraz z informacją o ich grubościach, umieszczono w tabeli 19. Wykres zależności grubości od ilości powtórzeń widoczny jest natomiast na rysunku Rysunek 50. Wykres zależności grubości ścieżek od ilości powtórzeń procesu nadruku metodą powlekania natryskowego.

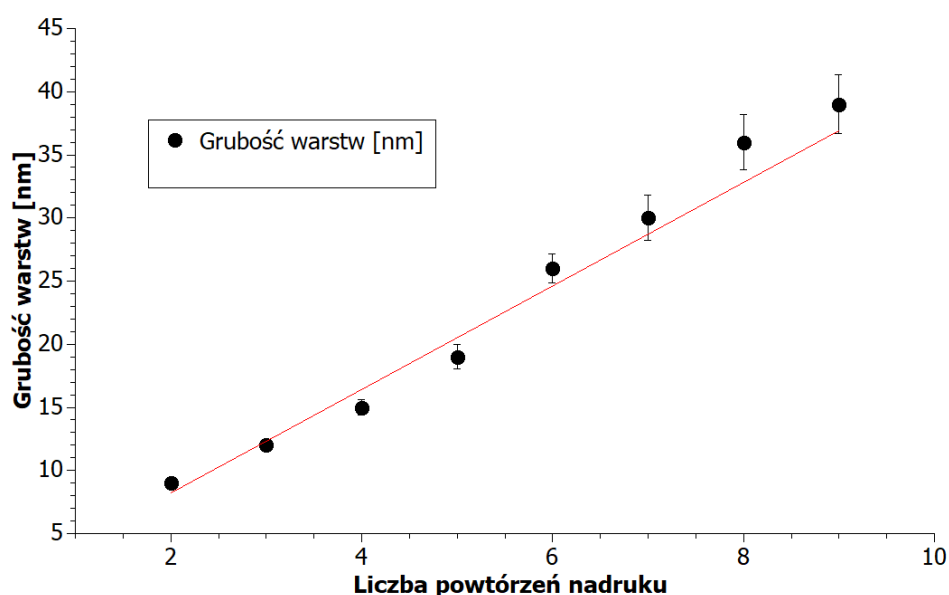
*Tabela 19. Mikroskopowe zdjęcia obrazów warstw uzyskanych metodą powlekania natryskowego dla różnej liczby powtórzeń procesu nadruku*

Mikroskopowe obrazy ścięzek		Liczba	Grubość [ $\mu\text{m}$ ]
		1	-
		2	10
		3	12
		4	15



				19
				5
				26
				31
				37
				42
				9

Dla pojedynczego wydruku warstwa jest niejednorodna oraz, ze względu na braki materiału grafenowego, w widoczny sposób nieciągała. Wraz ze wzrostem ilości nadruków w widoczny sposób warstwa wypełnia się płatkami grafenowymi. Ścieżkę o dobrej jakości, bez braków materiałowych uzyskano dla 6 nadruków. Przy powiększeniach obrazów warstw 150 razy widać jednakże, że dopiero kolejne warstwy eliminują pory występujące w warstwie. Brak porów i pełną jednorodność warstwy uzyskano od 8 powtórzeń procesu wydruku. W związku z tym uznano, iż jest to minimalna ilość wydruków niezbędnych dla uzyskania ścieżki jednorodnej charakteryzującej się odpowiednimi właściwościami mikrogeometrii, takimi jak jednolita chropowatość związana z brakiem porów w warstwie. Ilość nadruków i ich grubość powinna być jednak dostosowana do aplikacji ścieżek i warstw. Wraz ze wzrostem grubości spada bowiem ich transparentność oraz wzrasta zagrożenie ich toksycznością.



Rysunek 50. Wykres zależności grubości ścieżek od ilości powtórzeń procesu nadruku metodą powlekania natryskowego

Grubości warstw wytworzonych metodą powlekania natryskowego, podobnie jak w przypadku druku strumieniowego wzrastają liniowo. Uzyskanie jednorodnej warstwy możliwe jest jednak przy ponad dwukrotnie mniejszej liczbie powtórzeń nadruku, co jest związane ze specyfiką wybranej techniki drukarskiej. Przy procesie powlekania natryskowego, podczas pojedynczego przejścia aerografu nad zadrukowywanym podłożem nanoszona jest znacznie większa ilość materiału niż w przypadku przejścia głowicy nad podłożem w druku strumieniowym.

Na podstawie badań stwierdzono, iż jednorodne warstwy i ścieżki uzyskiwane metodami druku strumieniowego i powlekania natryskowego mają porównywalne grubości w zakresie: 31-55 nm. Grubość ścieżek zwiększa się liniowo wraz z liczbą wykonanych powtórzeń. Powtórzenie procesu 8 razy pozwala na otrzymanie jednorodnej warstwy w przypadku powlekania natryskowego oraz 22 przy wykorzystaniu technologii druku strumieniowego.

### **7.2.3. Badanie elektrycznych właściwości warstw**

Niewątpliwą zaletą nanopłatków grafenowych, w kontekście ich zastosowania jako materiału fazy funkcjonalnej atramentów, jest ich przewodność. Dzięki doskonałym właściwościom elektrycznym i mechanicznym nanopłatków grafenowych, opisanych w rozdziale 2.1.1, użycie grafenowych atramentów heterofazowych w technologiach elektroniki drukowanej umożliwi wytwarzanie przewodzących warstw i wzorów charakteryzujących się niską rezystancją i dobrymi właściwościami mechanicznymi. Stopień przewodnictwa zależy m.in. od dostosowanych do techniki drukarskiej właściwości drukowanego atramentu (lepkość, napięcie powierzchniowe, jednorodność i stabilność), wpływających na rozdzielczość otrzymywanych wzorów. Jednorodność warstw i ścieżek, związana jest także z poprawnością procesu technologicznego druku. Ścieżki jednorodne lepiej przewodzą prąd niż wzory wydrukowane błędnie, posiadające rozmyte lub faliste krawędzie lub braki związane z niedokładnym wypełnieniem materiałem.

Przewodzenie prądu przez biozgodne warstwy grafenowych może mieć ogromne znaczenie w ich zastosowaniu w bioinżynierii i inżynierii tkankowej. Elektrostymulacja jest bowiem metodą stymulowania czynników wzrostu komórek znaną od lat. Nanopłatki grafenowe są natomiast testowane ostatnimi czasy jako potencjalny materiał stymulujący wzrost i różnicowanie komórek. Dzięki wytworzeniu przewodzącej warstwy z płatków grafenowych można połączyć oba rodzaje stymulacji, osiągając synergiczne wyniki stymulacji wzrostu komórek. Z tego powodu bardzo istotnym parametrem warstw i wzorów grafenowych wytwarzanych w pracy do zastosowań w biomedycynie jest ich przewodność elektryczna.

W pracy przebadane zostały właściwości elektryczne warstw uzyskanych poprzez nadruk biozgodnych, grafenowych atramentów heterofazowych przy użyciu obu metod: druku strumieniowego oraz powlekania natryskowego. W związku z porównywalną grubością ścieżek i warstw otrzymywanych oboma technikami, oceny przewodności dokonano na podstawie pomiarów rezystancji na kwadrat, opisanej szczegółowo w rozdziale 4.3.4.

Tabela 20 przedstawia wyniki badań właściwości elektrycznych, wraz z informacją przy jakiej grubości warstwy dokonano pomiaru.

Tabela 20. Wyniki badań właściwości elektrycznych ścieżek i warstw grafenowych

Druk strumieniowy			Powlekanie natryskowe		
Liczba warstw	Grubość [nm]	Rezystancja na kwadrat [ $k\Omega/\square$ ]	Liczba warstw	Grubość [nm]	Rezystancja na kwadrat [ $\Omega/\square$ ]
20	44	200	7	31	800
22	49	125	8	37	692
25	55	90	9	42	638

Jak widać w tabeli, w pracy opracowano grafenowy, biogodny atrament, który pozwala na wytwarzanie wzorów i warstw przewodzących prąd elektryczny. Jak widać na umieszczonych w tabeli wykresach rezystancja powierzchniowa maleje wraz ze wzrostem liczby powtórzeń nadruków, które są bezpośrednio związane ze wzrostem grubości drukowanych wzorów. Najlepsze wyniki: 90  $k\Omega$  oraz 638  $\Omega$  uzyskano odpowiednio dla warstw otrzymanych drukiem strumieniowym oraz powlekaniami natryskowym, o grubościach 55 nm oraz 42 nm. Różnice w uzyskanych wynikach rezystancji wynikają z różnic występujących pomiędzy oboma wykorzystywanymi technikami. Główną przyczyną jest rodzaj drukowanych wzorów oraz sposób ich otrzymywania. W przypadku druku strumieniowego otrzymywane są ścieżki o szerokości kilkudziesięciu mikrometrów, a nanocząstki grafenowe przenoszone są w pikolitrowych kroplach. W związku z tym otrzymanie jednolitych wzorów o dobrej przewodności jest znacznie trudniejsze niż w przypadku powlekania natryskowego, w którym drukowane są całe powierzchnie, a nanocząstki przenoszone są w dużej objętości gazu nośnego.

W ramach testów właściwości elektrycznych przeprowadzono także badania wpływu zawartości fazy funkcjonalnej na przewodnictwo warstw wykonanych techniką powlekania

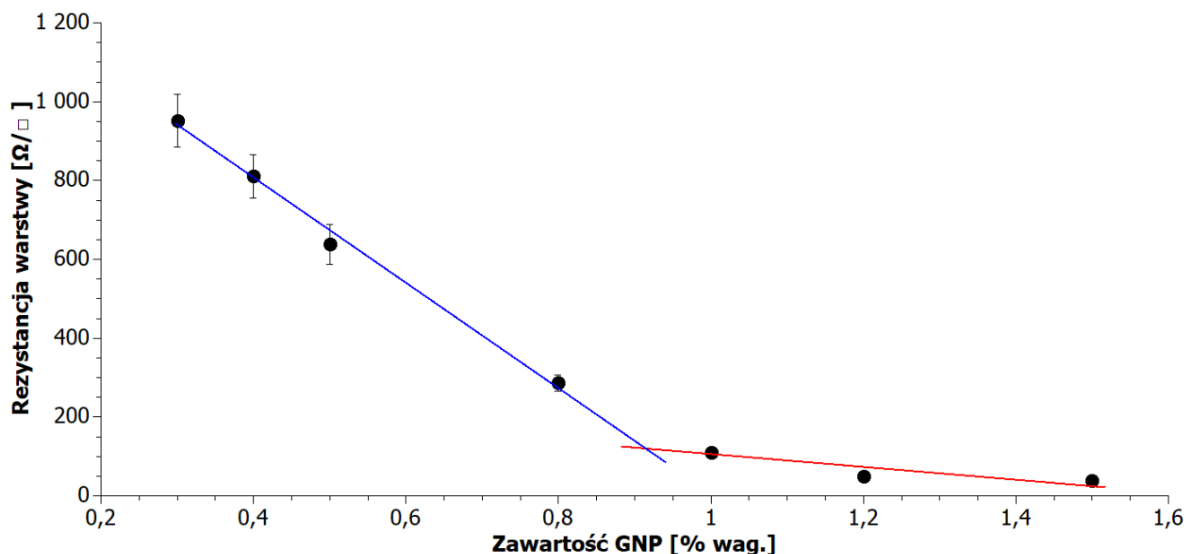


natryskowego. Testów nie przeprowadzono na ścieżkach wytwarzanych drukiem strumieniowym. Wstępne badania wykazały, iż zwiększenie zawartości fazy funkcjonalnej atramentu użytego w technice druku strumieniowego powodowało zatkanie dyszy drukującej oraz przerwanie procesu wytwarzania ścieżek. Z kolei mniejsza niż 0,5% wag. zawartość GNP w atramencie skutkowałą wytwarzaniem nieprzewodzących prądu ścieżek grafenowych.

Dla zawartości grafenu poniżej 0,3 % wytwarzane warstwy nie przewodziły prądu. Powyżej natomiast 1,5 % następowało zatykanie dyszy drukarskiej. W związku z tym przebadano atramenty o zawartości od 0,3 do 1,5 % wag. w atramencie. Wyniki przedstawiające rezystancję powierzchniową ścieżek uzyskanych dla atramentów o różnej zawartości płatków grafenowych przedstawiono w tabeli 21 oraz na rysunku 51.

*Tabela 21. Rezystancja powierzchniowa ścieżek wytwarzanych metodą powlekania natryskowego, dla atramentów o różnej zawartości płatków grafenowych*

Zawartość [% wag.]	Rezystancja powierzchniowa [ $\Omega/\square$ ]
0,3	951,56 ± 66,13
0,4	811,38 ± 54,91
0,5	638,24 ± 51,06
0,8	286,21 ± 20,03
1	109,28 ± 6,56
1,2	46,96 ± 2,35
1,5	39,36 ± 1,57



*Rysunek 51. Rezystancja powierzchniowa warstw wytwarzanych techniką powlekania natryskowego, w zależności od zawartości płatków grafenowych w atramencie wraz z dopasowanymi liniami trendu wskazującymi na liniowy charakter zmian*

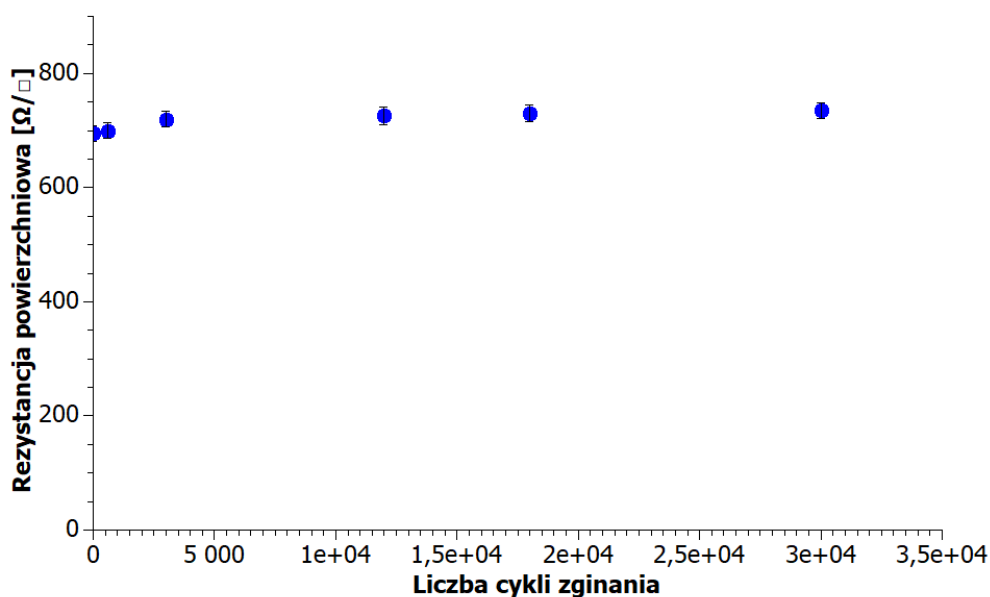
Wartość rezystancji powierzchniowej spadała liniowo wraz ze wzrostem fazy funkcjonalnej, aż do zawartości około 0,9 %. Przy dalszym zwiększaniu zawartości GNP, spadek rezystancji był już znacznie mniejszy, co oznaczono na wykresie za pomocą dopasowanych linii trendu w kolorze niebieskim i czerwonym.

Na podstawie wykresu widać, iż poprzez dobór zawartości grafenu możliwe jest, w bardzo szerokim zakresie, sterowanie przewodnością wytwarzanych warstw. Próg perkolacji, rozumiany jako minimalna zawartość fazy funkcjonalnej przy której warstwa zaczyna przewodzić prąd to 0,3 %. Jak widać w tabeli 21, dla stosowanej w pracy zawartości GNP w atramencie wynoszącej 0,5 % wag. rezystancja nadrukowanej warstwy bliska była 600 Ω. Jednakże dwukrotne zwiększenie zawartości GNP w atramencie powodowało już blisko sześciokrotny spadek rezystancji.

Na podstawie badań można stwierdzić, iż sterowanie rezystancją wykonywanych warstw możliwe jest zarówno poprzez modyfikację liczby wykonywanych nadruków, jak i zmianą zawartości GNP w atramencie. Należy jednak pamiętać, że zwiększenie zawartości grafenu w warstwach, w przypadku zastosowań biologicznych może mieć wpływ na ich oddziaływanie i toksyczność względem komórek.

Wytworzone techniką powlekania natryskowego warstwy zbadano pod kątem wpływu naprężeń na ich przewodność. Zmierzono rezystancję powierzchniową warstwy przed wykonaniem badania wytrzymałości mechanicznej opisanego dokładnie w rozdziale 4.3.3 oraz

kolejno po 600, 3000, 12000, 18000 i 30000 cyklach zginania. Wyniki zaprezentowano na rysunku 52.



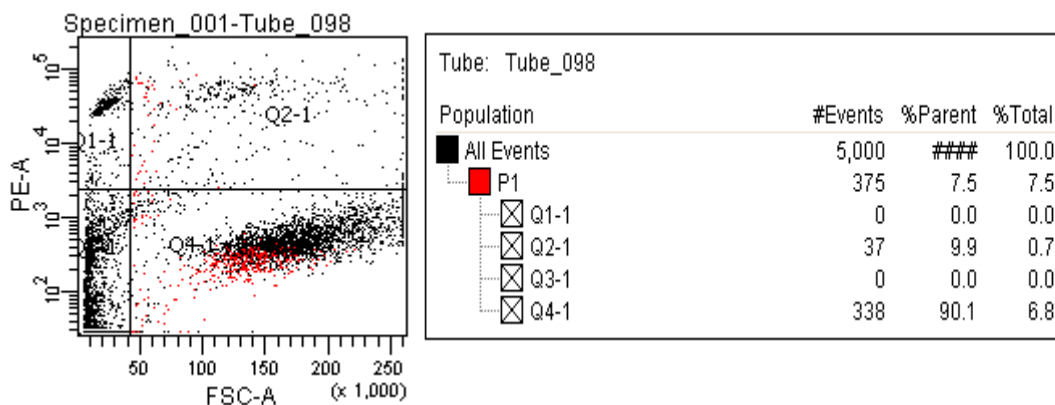
Rysunek 52. Wpływ naprężeń na rezystancję powierzchniową warstwy grafenowej

Po przeprowadzeniu badania wytrzymałości mechanicznej rezystancja warstwy nie uległa znaczącej zmianie, nawet po wykonaniu 30000 cykli zginania. Po 30000 rezystancja wzrosła jedynie o około 4,3%. Świadczy to o dużej wytrzymałości mechanicznej wytwarzanych warstw grafenowych.

Obie technologie: druku strumieniowego i powlekania natryskowego pozwalają na uzyskanie ścieżek i warstw różniących się znacznie właściwościami elektrycznymi. Jest to związane z różnicami w sposobie przenoszenia nanocząstek i ich rozplywem na podłożu, wiążącym się z ilością przenieszonego materiału. Jednakże zarówno powlekanie natryskowe jak i druk strumieniowy, dzięki możliwości uzyskiwania przewodzących ścieżek charakteryzujących się wysoką wytrzymałością mechaniczną, znaleźć mogą szerokie zastosowanie w biomedycynie, m.in. do elektrycznej do stymulacji komórek.

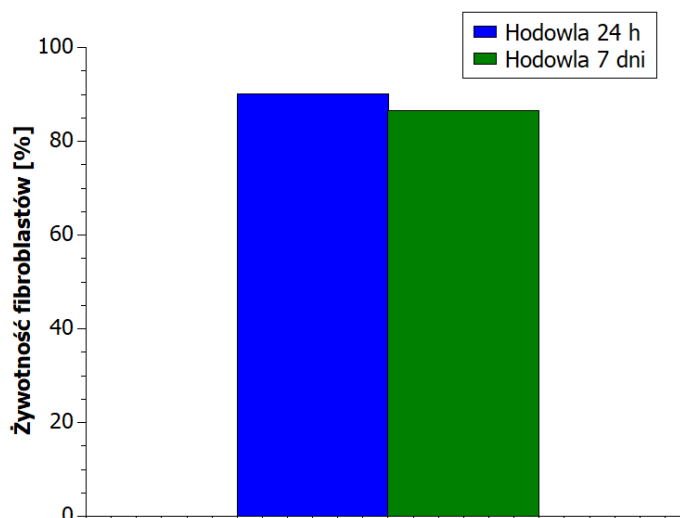
#### 7.2.4. Badanie cytozgodności warstw grafenowych

W pierwszym etapie, za pomocą cytometru przepływowego zbadano żywotność fibroblastów HDF po dobie oraz siedmiu dniach hodowli komórkowej. Wyniki przedstawiono na rysunkach 53 oraz 54, poniżej.



Rysunek 53. Analiza cytometryczna żywotności komórek HDF (hodowla 24 h) na podłożu grafenowym, po wybarwieniu jodkiem propidyny

Rysunek 53 prezentuje analizę cytometryczną żywotności komórek HDF po wybarwieniu jodkiem propidyny. Oś odciętych przedstawia natężenie fluorescencji jodku propidyny, oś rzędnych – rozmiar mierzonych cząsteczek. W kwadrancie Q2-1 widoczna jest w związku z tym liczba komórek martwych, w kwadrancie Q4-1 – komórek żywych, stanowiących 90,1% populacji mierzonych komórek.



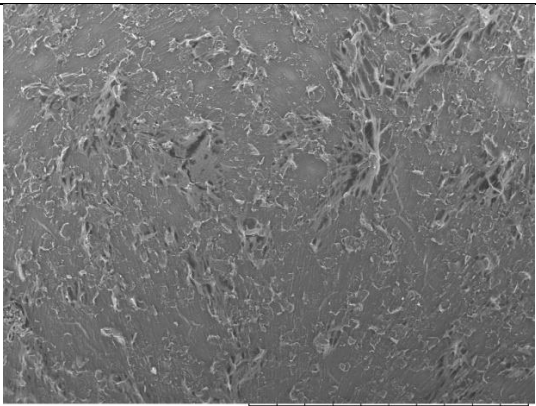
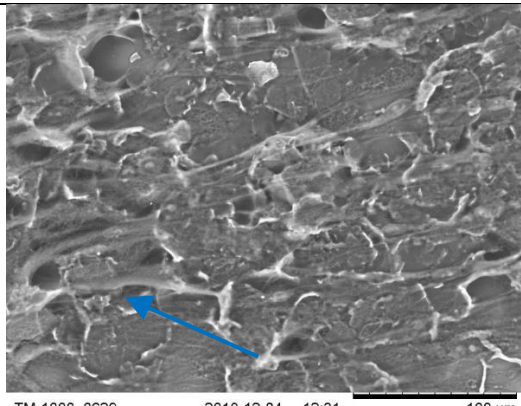
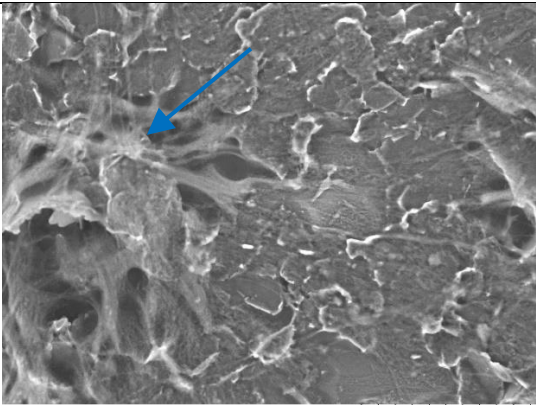
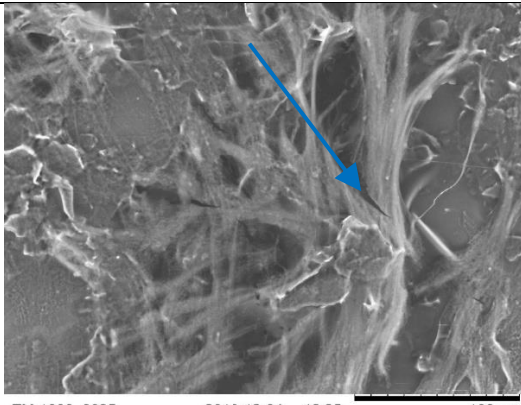
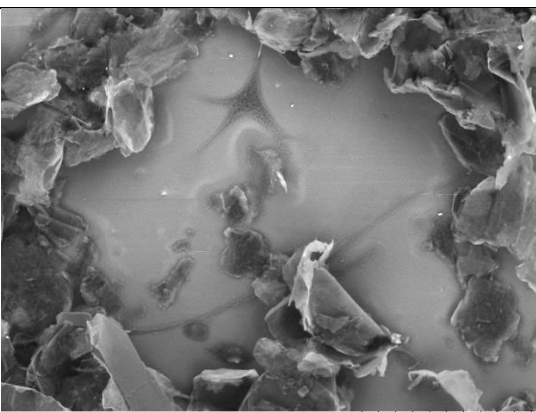
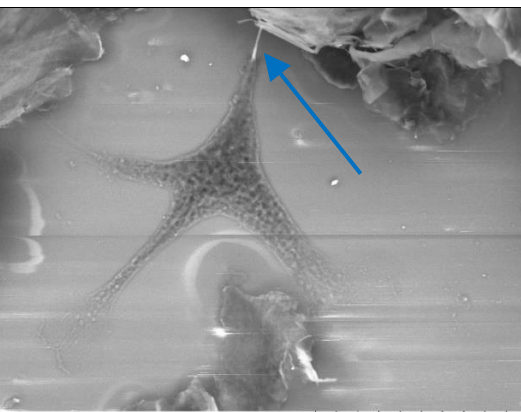
Rysunek 54. Żywotność fibroblastów na podłożu grafenowym po 24 godzinnej i 7 dniowej hodowli komórkowej

Na podstawie wyników uzyskanych z cytometru nie stwierdzono znacznego spadku żywotności komórek hodowanych na warstwach grafenowych. Po dobie i 7 dniach hodowli żywotność wynosiła bowiem odpowiednio 90,03% oraz 86,52%.

Przy użyciu mikroskopii elektronowej SEM dodatkowo skontrolowano cytozgodność warstw grafenowych względem komórek fibroblastów. Obserwacje pozwoliły na ocenę zdolności

wytwarzania przez komórki sprzyjających im warunków po tygodniowej hodowli, opisanej szczegółowo w rozdziale 4.4.1. Warunki te obejmują wytworzenie wypustek, niezbędnych w procesie adherowania komórek do podłoża. Wyniki przedstawione zostały w tabeli 22.

*Tabela 22. Mikroskopowe obrazy SEM przedstawiające komórki fibroblastów po tygodniowej hodowli na warstwach grafenowych*

 <p>TM-1000_0624 2018-12-04 12:23 1 mm</p>	 <p>TM-1000_0629 2018-12-04 12:31 100 um</p>
<p>Duża ilość wypustek komórkowych wskazujących na adherowanie komórek do warstwy grafenowej</p>	
 <p>TM-1000_0628 2018-12-04 12:30 100 um</p>	 <p>TM-1000_0625 2018-12-04 12:25 100 um</p>
 <p>TM-1000_0615 2018-12-04 11:58 100 um</p>	 <p>TM-1000_0616 2018-12-04 12:01 50 um</p>
<p>Brak warstwy grafenowej – pojedyncza komórka z wypustką sięgającą płatka grafenowego</p>	

Fibroblasty wytworzyły na warstwach grafenowych znaczącą ilość wypustek umożliwiających ich adherowanie do grafenowego podłoża. W miejscu gdzie nie ma warstwy grafenowej zauważalne są tylko pojedyncze komórki. Jednakże te pojedyncze wypustki, wypuszczane są przez komórki dokładnie w kierunku płatków grafenowych, co potwierdza brak toksyczności warstw i płatków względem komórek.

Obrazowanie SEM potwierdziło wstępną ocenę cytozgodności warstw grafenowych względem fibroblastów HDF uzyskaną przy użyciu cytometru. Określono, iż wytwarzane warstwy grafenowe są biozgodne i nietoksyczne względem komórek, które adherują do ich powierzchni. Badania pozwalające potwierdzić nietoksyczność atramentów grafenowych, wykonano także przy użyciu komórek macierzystych hADSC i opisano w rozdziałach 5.6 oraz 8.2.

## **8. Aplikacje przewodzącego, biozgodnego atramentu grafenowego**

### **8.1. Zastosowanie opracowanego atramentu grafenowego w ochronie przed zakażeniami spowodowanymi cewnikowaniem pacjentów**

Ostatnimi czasy duże zainteresowanie badaczy na całym świecie wzbudza możliwość zwalczania biofilmu poprzez zastosowanie ochronnych powierzchni i powłok grafenowych. Grafen charakteryzuje się bowiem zarówno właściwościami antybakteryjnymi, jak i niską toksycznością względem komórek ludzkich [1]. W związku z tym, celem pracy było wykazanie zdolności blokowania tworzenia biofilmu bakteryjnego na przewodzących warstwach grafenowych oraz wykorzystanie ich do pokrywania cewników urologicznych Foleya.

#### **8.1.1. Biofilm i problemy w jego eradykacji**

Biofilm jest zorganizowaną, wielowarstwową strukturą, składającą się z jednego lub wielu gatunków drobnoustrojów, ściśle związanych z powierzchnią. Powstaje on w wyniku wielowarstwowego podziału komórek drobnoustrojów, głównie bakterii oraz grzybów i jest podstawową strukturą ich bytowania w środowisku naturalnym [225]. Bakterie otoczone są w niej pozakomórkową substancją polimerową zwaną macierzą pozakomórkową (EPS, ang. extracellular polymeric substance) [157], [158], [226]. Dojrzały biofilm zbudowany jest więc z uporządkowanych struktur, składających się z mikrokolonii otoczonych warstwą EPS, które poprzedzielane są siecią kanałów. Kanałami tymi dostarczana jest woda, substancje odżywcze i tlen [227], [228].

Właściwości drobnoustrojów, związane zarówno z właściwościami fizjologicznymi bakterii, jak i ich płodnością, ruchliwością oraz cyklem życiowym, ulegają zmianie pod wpływem środowiska biofilmu. Nowe cechy, zwane cechami fenotypowymi, komórek tworzących strukturę biofilmu są przyczyną utrudnień związanych z jego eradykacją, oznaczającą całkowite zwalczenie biofilmu [158], [226]. Drobnoustroje żyjące w biofilmach wykazują znacznie zwiększoną tolerancję na związki przeciwdrobnoustrojowe [229]. Zastosowanie nawet bardzo wysokich stężeń antybiotyków i chemioterapeutyków nie powoduje pełnej eradykacji biofilmu. W zależności od gatunku drobnoustroju, komórki bakterii tworzące biofilm mogą wykazywać nawet tysiąc razy większą odporność na środki przeciwdrobnoustrojowe, jak i na warunki środowiska, w porównaniu do pojedynczych rozproszonych komórek – tzw. komórek planktonowych tego samego gatunku [2], [228].

Na problemy z penetracją substancji bakteriobójczych w głąb struktury, oprócz zmian fenotypowych bakterii w biofilmie wpływa m.in. skomplikowana budowa tej zorganizowanej struktury. Mechanizm zwiększonej oporności komórek wynika także z inaktywacji

antybiotyków przez zewnątrzkomórkowe polimery znajdujące się w strukturze biofilmu lub z ograniczonej dostępności składników odżywczych wpływającej na spowolnienie tempa wzrostu zdrowych komórek [227], [228], [230].

Problem z pojawianiem się biofilmu jest ściśle powiązany ze stosowaniem materiałów biomedycznych m.in. endoprotez, sztucznych zastawek serca, cewników linii naczyniowych i urologicznych. Kolonizacja bakterii w postaci biofilmu na tych materiałach jest powodem groźnych schorzeń [231], [232]. Kontaminacja, oznaczająca skażenie materiału biomedycznego, może nastąpić zarówno przez drobnoustroje ze środowiska zewnętrznego, np. w przypadku braku właściwej higieny personelu medycznego, jak i poprzez zakażenie endogenne, spowodowane własną, naturalną florą bytującą w organizmie pacjenta.

W szczególności adhezja komórek gronkowców (łac. *Staphylococcus*) do powierzchni stanowi duży problem kliniczny [233]. Komórki tych bakterii mogą przylegać do powierzchni materiałów biomedycznych, tworząc biofilmy na źle oczyszczonych i niezabezpieczonych powierzchniach. Gronkowce stanowią jedną z głównych przyczyn zakażeń u pacjentów, u których w celach diagnostycznych czy terapeutycznych istnieje konieczność zastosowania cewników naczyniowych czy urologicznych, wenflonów, drenów czy zespołów naczyniowych lub implantów z tworzyw sztucznych, endoprotez stawowych lub kostnych.

### **8.1.2. Blokowanie powstawania biofilmu na cewnikach urologicznych**

Jak opisano w literaturze [159], cewniki urologiczne, powszechnie stosowane na oddziałach szpitalnych, stanowią często materiał podłożowy na którym rozwijają się biofilmy bakteryjne. Biofilm przyczynia się do powstawania różnego rodzaju infekcji, w tym zakażeń dróg moczowych i krwioobiegu związanych z cewnikowaniem. W związku z tym pozostaje istotnym źródłem zachorowalności i śmiertelności światowej populacji [159], [229]. Ze względu na trudności w eradykacji biofilmu oraz nieskuteczności leków i antybiotyków, nieustannie trwają poszukiwania nowych substancji i tworzyw o potencjalnym działaniu przeciw biofilmom.

W literaturze zaproponowano kilka metod zapobiegających kolonizacji bakterii na powierzchni cewników urologicznych [159]. Rozważano użycie materiałów polimerowych do zwiększenia adsorpcji antybiotyków [233], jak również impregnację i powlekanie cewników różnymi środkami antybakteryjnymi, takimi jak antybiotyki, chloroheksadyna, triklosan, tlenek srebra, tlenek tytanu, tellur i inne [4], [234]–[238]. Należy podkreślić, że znaczna część z zaproponowanych metod jest bardzo skomplikowana a ich zastosowanie wymaga kosztownego sprzętu. Niektóre z prac naukowców koncentrowały się także na wykorzystaniu w walce z



biofilmami srebra [3], [239]–[241]. Jest to materiał znany z antybakteryjności, jednak w większych ilościach, szkodliwy dla organizmu ludzkiego.

### **8.1.3. Technologia wytwarzania wypełniacza w postaci nanopłatków grafenowych dekorowanych nanocząstkami srebra**

Nanocząstki srebra (nAg) są jednym z najstarszych materiałów stosowanych jako środki antybakteryjne [1]. Jednakże, chociaż antybakteryjny charakter nAg jest bardzo interesujący, to praktyczne zastosowanie tych nanocząstek jest znacznie utrudnione. Jest to związane z tendencją do ich aglomerowania, powodującą utratę aktywności antybakteryjnej nAg [1], [242]. Ponadto analiza literaturowa wykazuje, iż istnieją silne obawy związane z cytotoksycznością, stosowanego w większych stężeniach, nAg w stosunku do komórek ludzkich [243].

Jednakże jedną z kluczowych cech nAg jest to, że przy niskich stężeniach są toksyczne dla drobnoustrojów ale jednocześnie – bezpieczne dla ludzkich komórek. Problemy związane z utlenianiem tego materiału, negatywnie wpływające na właściwości przeciwdrobnoustrojowe ograniczają jednak efektywne stosowanie nAg [1].

Z drugiej strony, niska cytotoksyczność materiałów grafenowych w stosunku do różnych rodzajów komórek [7], [16], [62], [63] spowodowała wzmożone zainteresowanie właściwościami bakteriobójczymi tego materiału, a także zastosowaniem go w hamowaniu adherowania bakterii do różnego rodzaju podłoży [1]. W związku z tym, poprzez przyłączenie nanocząstek Ag do materiałów grafenowych uzyskać można nie wykazujący tendencji do aglomerowania materiał o stabilnych antybakteryjnych właściwościach.

Z tego powodu, w celu wzmocnienia antybakteryjnych właściwości nanopłatków grafenowych, przy jednoczesnym zachowaniu ich biokompatybilności, w pracy opracowano technologię wytwarzania nowego materiału fazy funkcjonalnej: nanopłatków grafenu dekorowanych nanocząstkami srebra (GNP/nAg). GNP/nAg opracowany w pracy składa się w 60% wt. z GNP oraz w 40 % wt. z nAg.

Proces dekorowania grafenu, wykonywany w celu poprawy jego właściwości, był już opisywany w literaturze [165]. Kazuma Gotoh et. al. wzmocnili katalizujące własności grafenu poprzez dekorację m. in. nanocząsteczkami srebra, uzyskaną dzięki wymianie kationów w tlenku grafitu. Tlenek grafitu w roztworze NaOH pod wpływem ultradźwięków (w procesie sonikacji) połączono z  $\text{Ag}[(\text{imH})_2]\text{NO}_3$ . Następnie mieszano przez 24 godziny, przefiltrowano oraz podgrzewano w wielu cyklach. Uzyskana w efekcie eksfoliacja pozwoliła na uzyskanie płatków grafenowych udekorowanych nanocząsteczkami srebra [244]. Hsi-Wen Tien et al. otrzymali grafen dekorowany nanocząsteczkami srebra w procesie sonikacji tlenku grafitu,

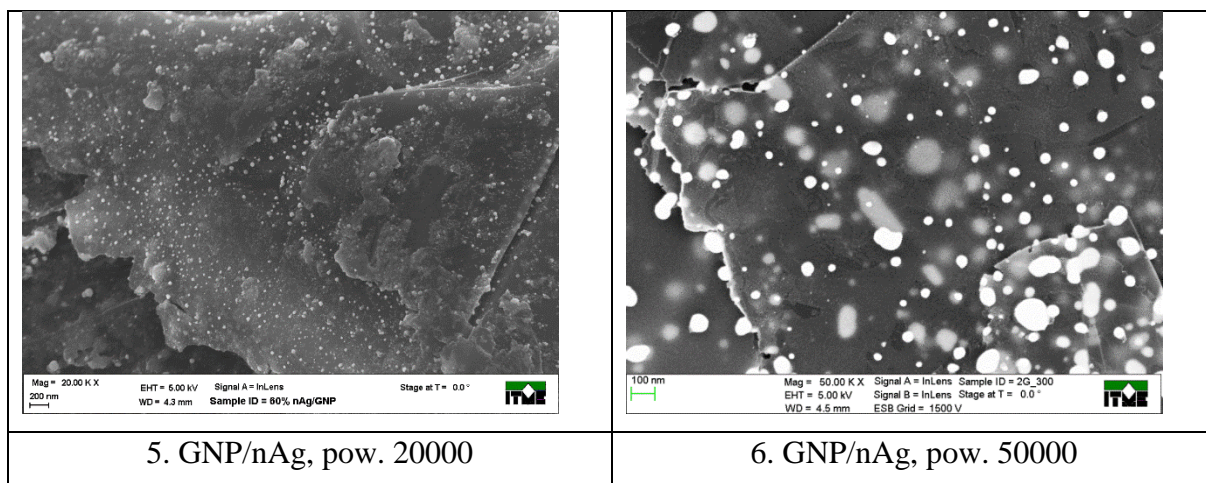
azotanu srebra  $\text{AgNO}_3$  oraz wody destylowanej. Zawiesinę zmieszano z  $\text{NaBH}_4$  w temperaturze  $100^\circ\text{C}$ . Następnie przeprowadzono 10 cykli wirowania z prędkością 10000 obrotów na minutę [245]. Subrahmanyam et al. także wykorzystali materiał  $\text{AgNO}_3$ . Mieszaninę  $\text{AgNO}_3$ , grafenu, wody oraz glikolu etylenowego poddali działaniu mikrofal o mocy 900W przez 15 minut [246].

Na podstawie literatury można stwierdzić iż do tej pory proces otrzymywania grafenu dekorowanego nanocząsteczkami srebra był bardzo czasochłonną technologią, o wysokim stopniu skomplikowania. Opracowana w pracy technologia, opisana w rozdziale 4.4.4, polegająca na połączeniu, w procesie sonikacji i w obecności surfaktantów, materiałów GNP oraz nAg jest znacznie prostsza i wymaga użycia mniejszej ilości materiałów.

Efektem opracowanej technologii było uzyskanie proszku fazy funkcjonalnej grafenu dekorowanego nanocząstkami srebra (GNP/nAg). W celu dokładnej charakteryzacji struktury otrzymanego materiału, przeprowadzono obserwacje przy użyciu mikroskopu SEM. Wyniki, w postaci obrazów SEM przedstawiono w tabeli 23.

*Tabela 23. Obrazy z mikroskopu SEM prezentujące wytworzony materiał nanopłatków grafenowych dekorowanych nanocząstkami srebra*

<p>1. Nieudekorowane GNP, pow. 5000</p>	<p>2. GNP/nAg, pow. 1000</p>
<p>3. GNP/nAg, pow. 5000</p>	<p>4. GNP/nAg, pow. 10000</p>



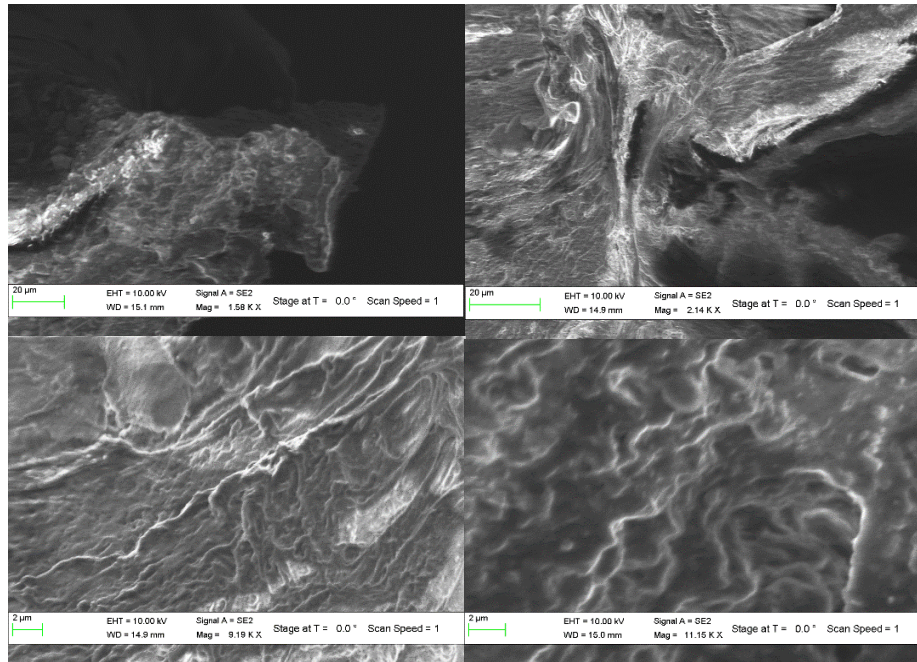
W nowo wytworzonym materiale na powierzchni płatków równomiernie rozmieszczone są pojedyncze nanocząsteczki srebra. Szczególnie jest to widoczne przy porównaniu obrazów mikroskopowych, o tym samym powiększeniu, płatków nieudekorowanych (nr 1) oraz udekorowanych nanocząstkami srebra (nr 3). Na podstawie zdjęć obrazów wykonanych przy różnych powiększeniach można stwierdzić, iż nAg osadzone są równomiernie zarówno na powierzchni, jak i na krawędziach GNP. Ponadto widać, że nAg ani GNP nie miały tendencji do aglomerowania. Na podstawie opisanych obserwacji stwierdzono, iż powstały materiał można wykorzystać w produkcji heterofazowych atramentów stosowanych w technikach elektroniki drukowanej.

Faza funkcjonalna GNP/nAg została zastosowana, tak samo jak GNP, do wytworzenia atramentów do techniki powlekania natryskowego. Oba atramenty naniesiono na cewniki urologiczne w celu zbadania zdolności blokowania biofilmów przez warstwy grafenowe i grafenowo-srebrne. Na podstawie wcześniejszych badań potwierdzono iż oba rodzaje warstw cechuje biozgodność.

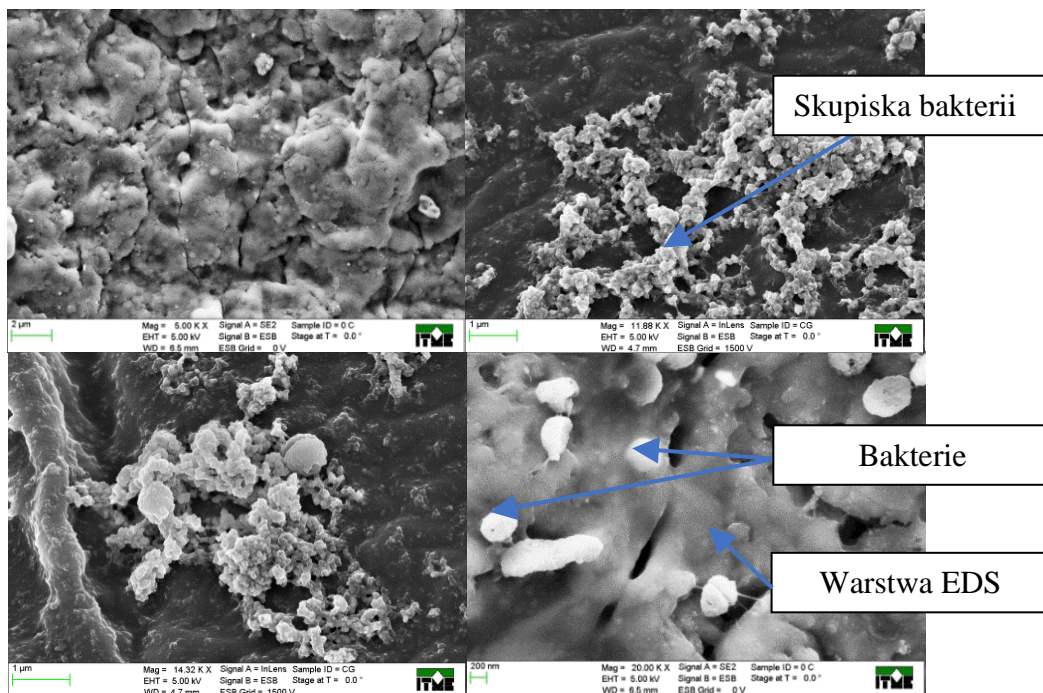
#### **8.1.4. Blokowanie tworzenia biofilmu bakteryjnego na cewnikach Foley'a**

Ocenie poddano możliwość zastosowania opracowanej technologii do wytwarzania antyseptycznych warstw blokujących proces tworzenia biofilmu bakteryjnego na cewnikach urologicznych. Przeprowadzono ocenę i analizę porównawczą tworzenia biofilmu przez bakterie *Staphylococcus aureus* na powierzchniach: cewnika Foley'a, cewnika Foley'a pokrytego warstwą grafenową GNP oraz cewnika Foley'a pokrytego warstwą grafenowo – srebrną GNP/nAg.





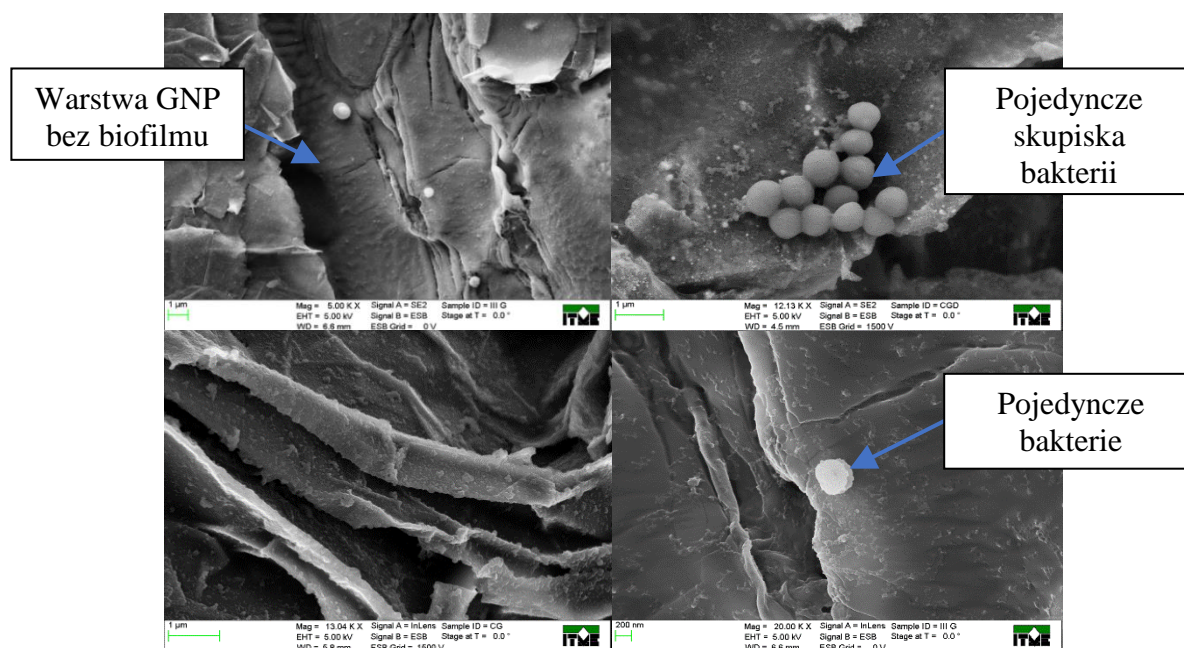
Rysunek 55. Obrazy SEM cewnika urologicznego Foleya, przy powiększeniach od najmniejszego do największego



Rysunek 56. Obrazy SEM biofilmu powstałego na cewniku urologicznym Foleya, przy powiększeniach od najmniejszego do największego

Powierzchnię kontrolną, stanowiącą powierzchnię odniesienia przeprowadzonych badań, tworzył niepokryty bakteriami ani dodatkową warstwą cewnik urologiczny Foleya (Rysunek 55).

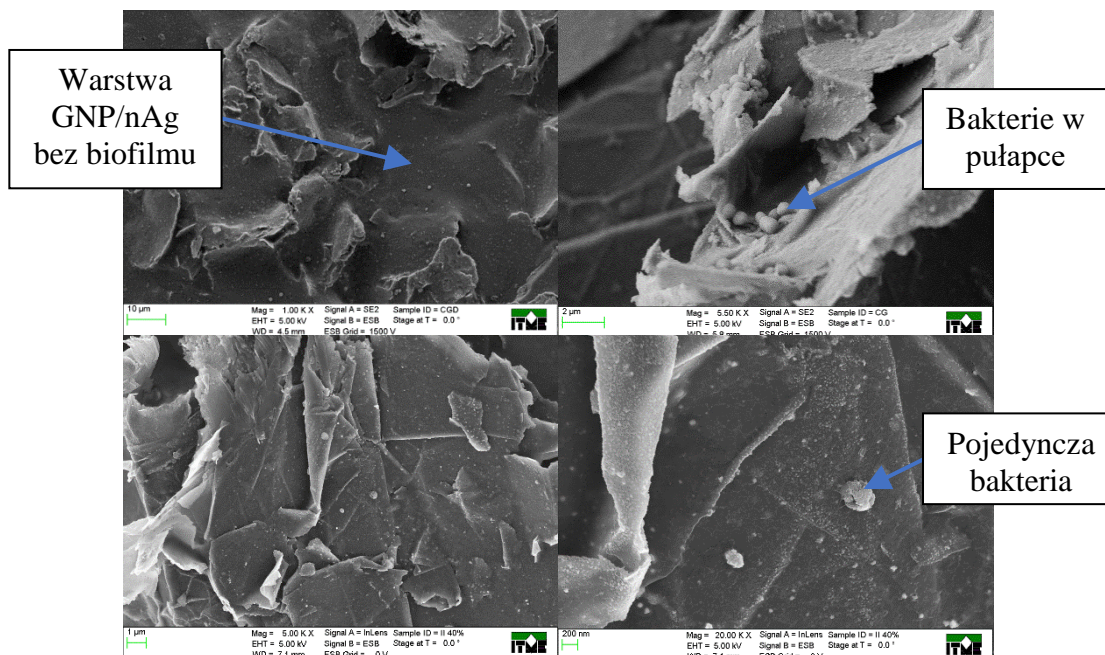
Na powierzchni cewnika przeprowadzono, zgodnie z metodologią opisaną w rozdziale 4.4.3, hodowlę komórkową bakterii gronkowca *Staphylococcus aureus* (Rysunek 56). Porównanie obrazów mikroskopowych obu powierzchni pozwala zaobserwować wyraźną strukturę biofilmu wytworzoną na cewniku po wysianiu na niego bakterii. Na powierzchni cewnika widoczne są skupiska komórek bakteryjnych osadzonych w polimerowej warstwie EDS, otaczającej komórki. Potwierdza to iż powierzchnia cewnika, niepokryta żadną dodatkową warstwą, nie jest antyseptyczna, a na jej powierzchni tworzy się dojrzała struktura biofilmu, zwiększająca odporność bakterii na leki.



*Rysunek 57. Obrazy SEM warstwy grafenowej na cewniku urologicznym Foleya z występującymi pojedynczymi skupiskami bakterii*

Na warstwach grafenowych osadzonych na cewniku (Rysunek 57) nie wytworzyła się struktura biofilmu bakteryjnego. Chociaż na powierzchni widoczne były zarówno skupiska bakterii, jak i pojedyncze bakterie, nie zaobserwowano żadnych oznak początku tworzenia struktury biofilmu.





*Rysunek 58. Obrazy SEM warstwy grafenowo-srebrowej na cewniku urologicznym Foley'a z występującymi pojedynczymi bakteriami*

Na powierzchni warstwy GNP/nAg także zauważono pojedyncze komórki bakterii, jednak wciąż pozbawione otoczki polimerowej, która świadczyłaby o powstaniu biofilmu. Bakterie pozbawione były także wypustek pozwalających na zwiększenie ich adhezji do podłoża.

W kilku obszarach na warstwach grafenowych i grafenowo-srebrowych widoczne były pojedyncze komórki bakterii lub skupiska komórek przylegające do powierzchni. Pomimo tygodniowego czasu trwania hodowli, nie zaobserwowano objawów produkcji biofilmu przez te bakterie. Na podstawie obserwacji struktury stwierdzono, iż na warstwie GNP/nAg znajdowało się znacznie mniej komórek bakteryjnych. Wskazuje to na możliwość synergicznego efektu działania materiału jakim jest grafen dekorowany nanocząstkami srebra [159].

Warto również zauważyć, że skupiska komórek były zwykle obserwowane w regionach charakteryzujących się wyższą chropowatością, w których cząstki materiału nie były ułożone poziomo względem leżącej pod spodem powierzchni. Sposób nakładania się na siebie niektórych płatków wskazuje, że bakterie odnalezione w szczelinach zostały tam uwięzione mechanicznie.

Podsumowując, zarówno w przypadku cewników powlekanych GNP, jak i cewników z warstwą GNP/nAg, hodowane bakterie gronkowca nie rozpoczęły procedury tworzenia

biofilmu bakteryjnego. Bakterie osadzone w tych samych warunkach na cewniku, który nie był pokryty dodatkową warstwą, wyprodukowały dojrzałą strukturę biofilmu bakteryjnego.

Osiągnięte wyniki pozwalają stwierdzić, iż opracowane w pracy atramenty grafenowe mogą być stosowane do wytwarzania antyseptycznych warstw m.in. na cewnikach Foley'a. Skutecznie blokują powstawanie biofilmu bakteryjnego, mogą więc przyczynić się do zmniejszenia zagrożenia zakażeniami związanymi z bakteriami gronkowca.

## **8.2. Stymulacja proliferacji komórek macierzystych**

Grafen i nanopłatki grafenowe są w ostatnich czasach brane pod uwagę jako materiał używany do wzbogacenia rusztowań komórkowych zwiększający potencjał regeneracyjny komórek [24], [107], [155], [186], [247]. W pracy oceniono możliwość stymulacji proliferacji mezenchymalnych komórek macierzystych hADSC przy użyciu opracowanego biozgodnego, przewodzącego atramentu bazującego na nanopłatkach grafenowych. Metodologia prowadzonych badań biologicznych opisana została w rozdziale 4.4.2.

Komórki macierzyste cieszą się ostatnimi czasy ogromnym zainteresowaniem ze względu na ich potencjalne zastosowanie w medycynie regeneracyjnej i inżynierii tkankowej [155]. Są one zdolne do różnicowania się w wiele wyspecjalizowanych typów komórek, w związku z czym mogą być szczególnie użyteczne do regeneracji lub wymiany tkanek u pacjentów. Przeszczepianie komórek w podejściu inżynierii tkankowej jest zwykle wykonywane w połączeniu z biomateriałem, który tworzy specjalistyczne rusztowanie dla komórek. Materiał taki ma wpływać na ich właściwości biologiczne, w tym proliferację, różnicowanie lub stymulację czynników wzrostu.

### **8.2.1. Dobór pożywki hodowlanej**

Hodowla komórek macierzystych wymaga zastosowania odpowiedniej pożywki hodowlanej, stanowiącej podstawowe środowisko wzrostu, które powinno jak najlepiej zastępować środowisko naturalnego występowania komórek. Pożywka w hodowli komórkowej, stanowi źródło substancji odżywczych oraz, poprzez właściwy skład, odpowiada za zachowanie pożądanego pH komórek. Dobór pożywki, w zależności od rodzaju hodowanych komórek oraz materiału podłożowego wykorzystywanego w hodowli, stanowi kluczowy krok w procesie prowadzenia hodowli komórkowej [248].

Wstępne testy przeprowadzone w pracy polegały na mikroskopowej poklatkowej obserwacji (ang. Time-Lapse) hodowli komórkowej na podłożu kontrolnym referencyjnym: hodowlanej płytce polistyrenowej (TCPS) oraz na warstwie grafenowej. Ich celem była kontrola zachowania komórek macierzystych na warstwach wykonanych przy użyciu

opracowanego w pracy atramentu grafenowego, dla różnych kombinacji pożywek. Rodzaje stosowanych pożywek przedstawiono w tabeli 24.

Obserwację komórek prowadzono, począwszy od momentu ich wysiania, przez 142 godziny, w celu jakościowej analizy: adhezji, stanowiącej podstawę przeżycia komórek, zdolności do podziałów komórkowych, związanych ze zdolnością do namnażania się komórek, oraz ich ruchliwości. Bazę stanowiła bezbiałkowa medium podstawowe DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium). Testowano zachowanie komórek po dodaniu do pożywki bazowej surowicy bydlęcej FBS (ang. fibroblast growth factor) lub czynników wzrostu komórek FGF (ang. fibroblast growth factor). Do badań zastosowano więc dwie kompozycje pożywek: DMEM+FBS, DMEM+FBS+FGF.

*Tabela 24. Materiały biologicznych pożywek*

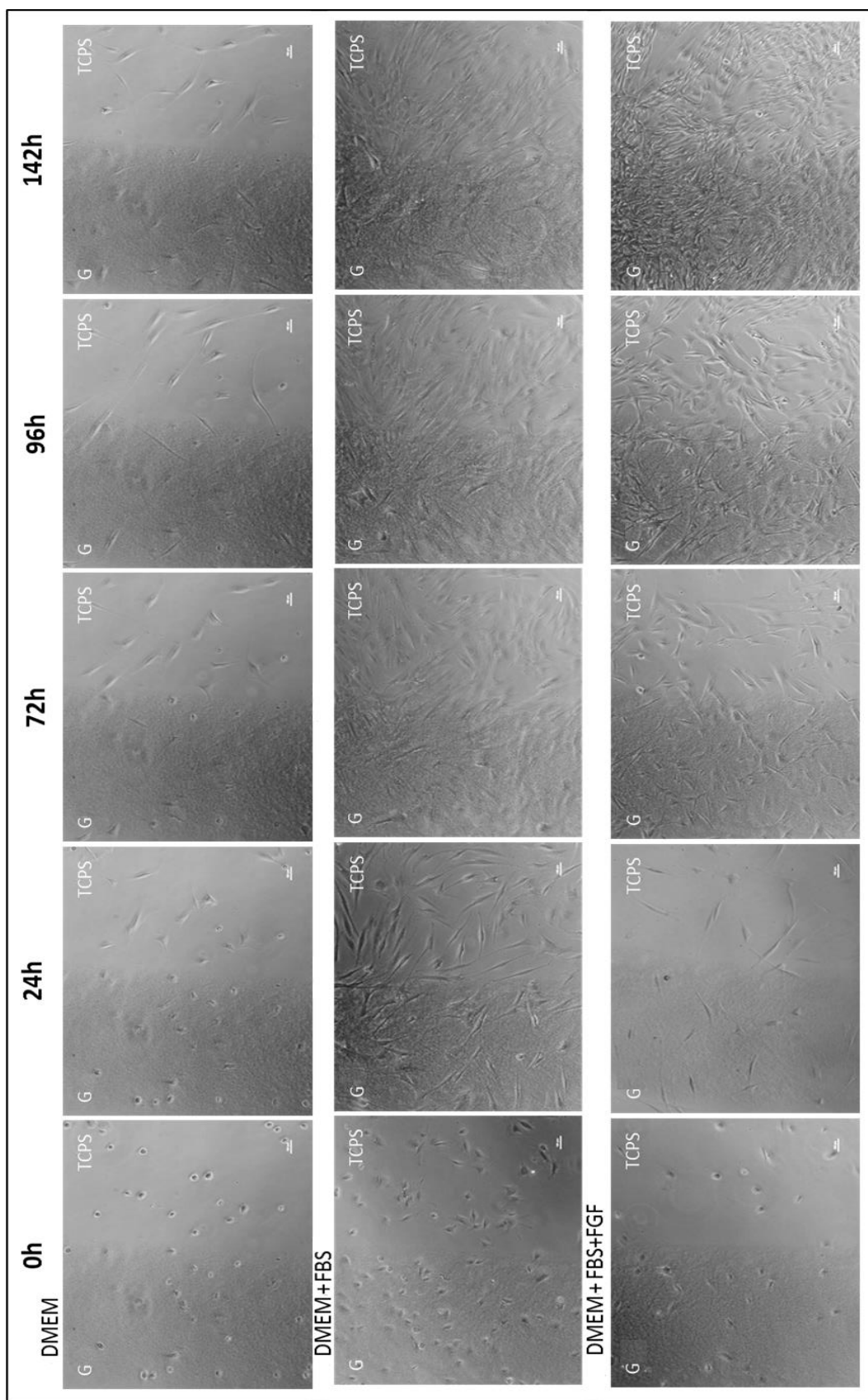
<b>Material</b>	<b>Skrót</b>
Surowica bydlęca, serum płodowe z cieląt	FBS (ang. fetal bovine serum)
Czynniki wzrostu fibroblastów	FGF (ang. fibroblast growth factor)
Medium podstawowe	DMEM (ang. Dulbecco's modified Eagle's medium)

Zdjęcia z przeprowadzonych obserwacji Time Laps, widoczne są na rysunku 59. W pierwszym etapie na podstawie obserwacji mikroskopowej oceniono adhezję, a więc przyleganie komórek do warstwy podłożowej. Stwierdzono, iż we wszystkich grupach eksperymentalnych komórki adherowały do podłoża.

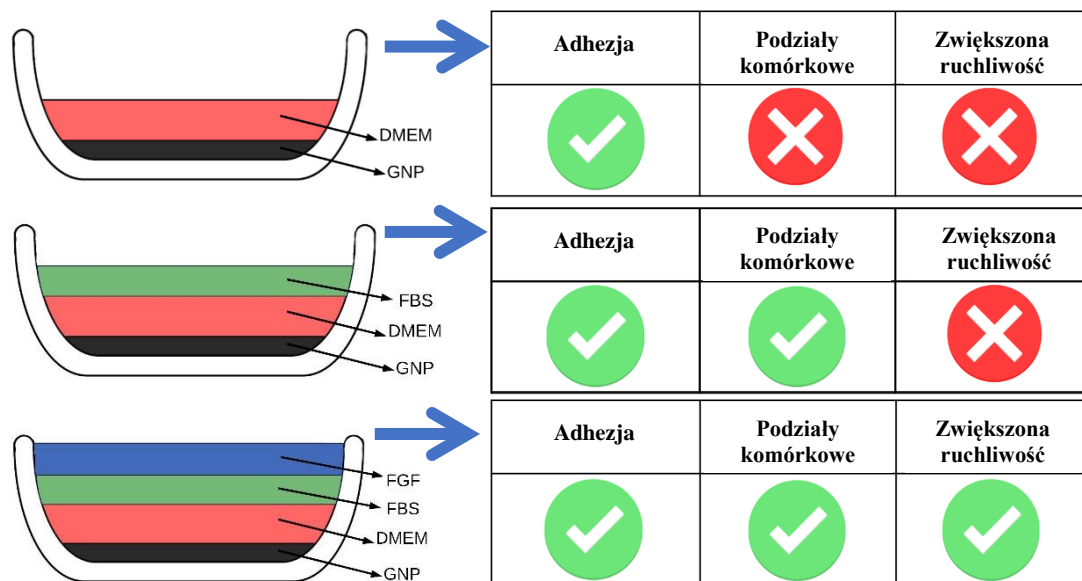
Proliferacja komórek z samą pożywką DMEM była mało efektywna. Komórki na TCPS oraz na GNP namnażały się znacznie wolniej, w porównaniu do komórek hodowanych przy innych kombinacjach pożywek. Jednakże nie zaobserwowano śmierci komórek związanej z nekrozą – objawiającej się pękaniem błony komórkowej. Podziały komórkowe były bardzo częste w grupach eksperymentalnych, w których w pożywce zawarto FBS, zarówno w hodowli referencyjnej jak i na materiale grafenowym.

Obecność FGF w materiale hodowlanym powodowała natomiast nieco większą ruchliwość komórek. W przypadku hodowli referencyjnych TCPS dodatek FGF do pożywki powodował także większą liczbę podziałów, jednak efekt ten nie był jednoznacznie widoczny w przypadku hodowli na warstwie grafenowej. Podsumowanie wyników obserwacji przedstawiono schematycznie na rysunku 60.





*Rysunek 59. Obrazy z mikroskopu świetlnego z obserwacji Time Laps zachowania komórek macierzystych osadzonych na grafenie, hodowanych przy użyciu różnej kombinacji pożywek*



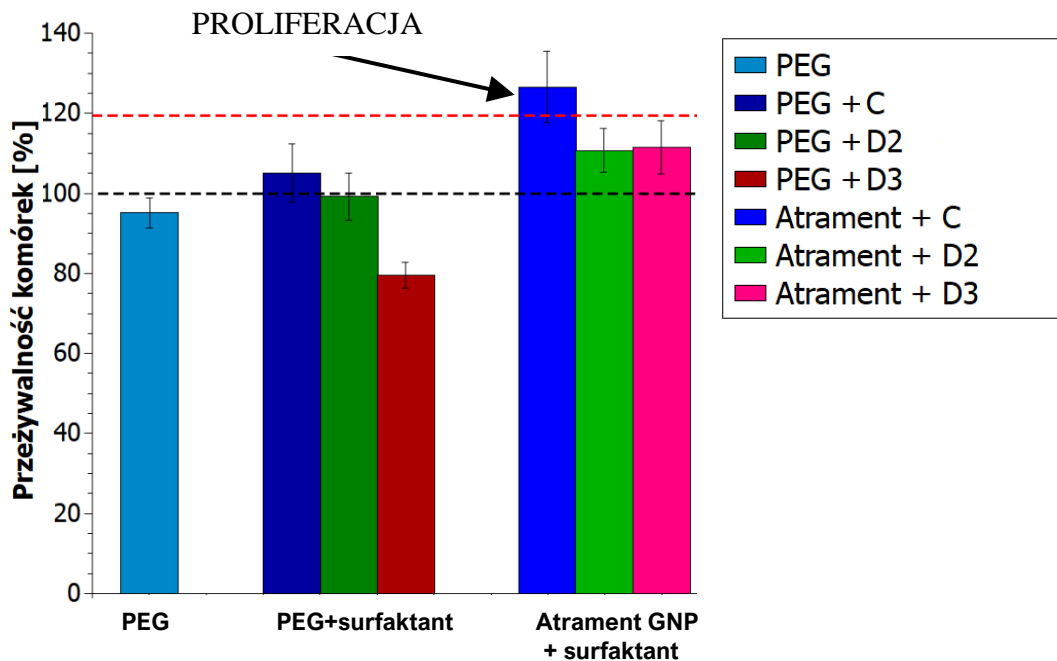
Rysunek 60. Podsumowanie kontroli zachowania komórek hodowanych na materiale grafenowym przy różnej kombinacji pożywek hodowlanych

Ostatecznie do aplikacji grafenowego, biogodnego atramentu do stymulacji proliferacji komórek macierzystych hADSC zastosowano DMEM + FBS + FGF wraz z dodatkiem aminokwasu w postaci L-glutaminy i antybiotyku antymikotycznego, dobranych na podstawie wcześniejszych badań, gwarantujących właściwy rozwój komórek.

### 8.2.2. Ocena zdolności stymulacji proliferacji komórek macierzystych materiałem grafenowym

Ocena stymulacji wzrostu i podziałów komórek macierzystych hADSC przy użyciu opracowanego w pracy atramentu grafenowego odbywała się na podstawie Testu Alamar Blue, opisanego dokładnie w rozdziale 4.4.2. Zbadano liczebność komórek po 4 dniach hodowli na różnych podłożach zawierających: 1) nośnik (PEG1500), 2) nośnik z trzema różnymi surfaktantami: C, D2, D3 oraz 3) kompletny atrament składający się z GNP zawieszonych w nośniku wraz z surfaktantami. Wyniki przedstawiono na rysunku 61.

Na podstawie mikroskopowej obserwacji stwierdzono, iż komórki macierzyste na wszystkich testowanych pokryciach przylegały do podłoża oraz posiadały prawidłową morfologię. Nie zaobserwowano różnic związanych z zastosowanym materiałem podłożowym, jakim były standardowo stosowane TCPS lub warstwa grafenowa.



Rysunek 61. Wyniki badania zdolności proliferacji komórek macierzystych przy użyciu atramentów grafenowych. Linia czarna oznacza bazową liczbę komórek hodowli referencyjnej (100%) wysianą na początku hodowli, linia czerwona oznacza liczebność komórek, dla której uznaje się iż nastąpiła proliferacja

Procent żywych komórek zliczonych na podłożu referencyjnym po 4 dniach hodowli, oznaczono na rysunku 61 czarną przerywaną linią (100%). Jest to linia odniesienia, względem której obserwowano śmierć lub zwiększony przyrost komórek na pozostałych podłożach, nazywany żywotnością. Linia czerwona oznaczono liczbę komórek, przy której nastąpiła proliferacja.

Materiał nośnika PEG1500, tak jak opisano w rozdziale 5.3, charakteryzowała cytozgodność względem komórek macierzystych hADSC. Procent żywych komórek zliczonych na podłożu PEG wynosił 95%, to tylko o 5% mniej od podłoża referencyjnego. Warstwa wykonana z kompozycji nośnik + surfaktant, bez materiału grafenowego pozwalała na uzyskanie żywotności komórek w zakresie 80-105%, w zależności od zastosowanego surfaktantu. Najbardziej cytozgodny okazał się surfactant C. Żywotność komórek na warstwie wykonanej przy użyciu opracowanego w pracy atramentu, zawierającego GNP zawieszony w nośniku, z dodatkiem surfaktantów była znacznie wyższa niż dla hodowli referencyjnej TCPS, wynosiła od 111% do 127%. Jak można zaobserwować, surfaktanty zwiększyły więc cytozgodność warstw GNP. Komórki macierzyste na warstwie grafenowej z dodatkiem surfaktantu C zwiększyły swoją liczebność o prawie 30%. Widoczny wzrost żywotności

związany był z poprawą jednorodności warstwy uzyskanej przy zastosowaniu atramentów z surfaktantem.

Podsumowując, w wykonanych badaniach udało się skomponować grafenowe materiały heterofazowe, które nie tylko nie były toksyczne względem komórek macierzystych, ale co więcej, powodowały ich proliferację. Na podstawie badań, można stwierdzić iż warstwa otrzymana z atramentu bazującego na GNP zawieszonych w PEG1500 z dodatkiem surfaktantu C, może mieć zastosowanie w aplikacjach związanych z komórkami macierzystymi.

Opracowany w pracy biozgodny grafenowy atrament może znaleźć zastosowanie w inżynierii tkankowej do stymulacji wzrostu komórek. Technologie druku strumieniowego lub powlekania natryskowego pozwalają na powlekanie warstwą grafenową warstw oraz scaffoldów komórkowych. Przeprowadzone badania mają charakter wstępny, niezbędne jest ich powtórzenie oraz rozszerzenie. Opisana w rozdziale 7.2.3 przewodność prądowa opracowanych w pracy warstw może zostać dodatkowo wykorzystana do prądowej stymulacji komórek na warstwach grafenowych.

Celowe jest więc przetestowanie wpływu impulsów prądowych komórek osadzonych na warstwach grafenowych. Wyniki literaturowe wskazują, iż stymulacja komórek macierzystych prądem może bowiem w znaczny sposób wpływać na ich proliferację. W połączeniu z wzmagającym proliferację działaniem grafenu, można uzyskać podwójny efekt stymulacji i znaczny wzrost podziałów komórkowych. W związku z tym podkreślić należy uniwersalność opracowanego biozgodnego atramentu grafenowego.

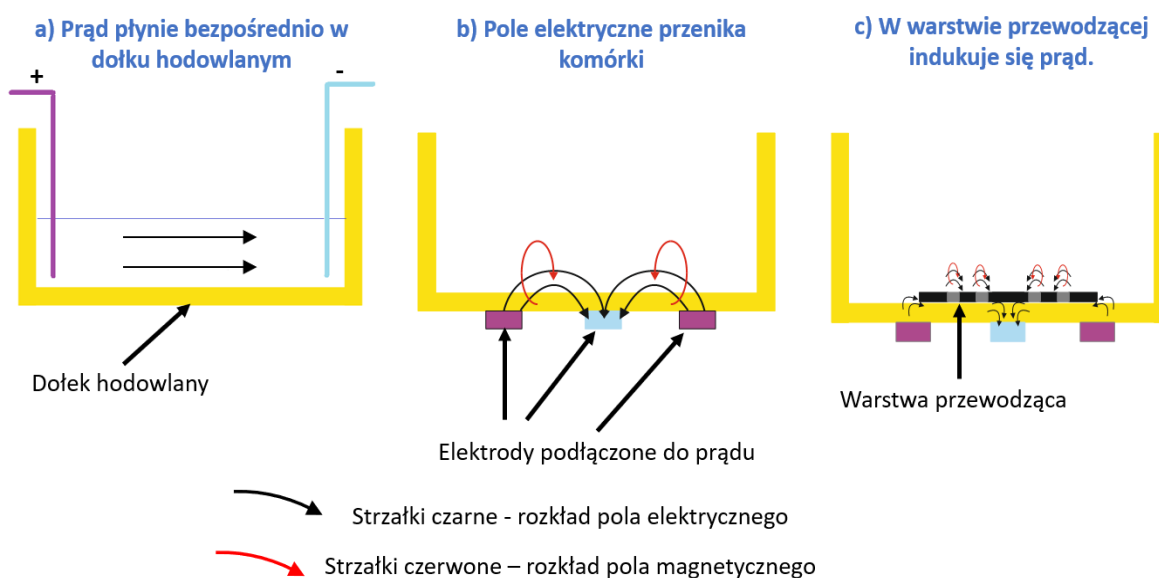
### **8.3. Zastosowanie przewodzących warstw grafenowych do elektrostymulacji komórek ludzkich**

Stymulacja przy zastosowaniu stałego lub zmiennego pola elektrycznego, zwana elektrostymulacją, umożliwia wpływanie na zachowanie komórek i ich aktywności fizjologiczne. Ostatnie badania wykazały, że ma ona ogromne znaczenie w sterowaniu procesami takimi jak: proliferacja, różnicowanie, migracje, adhezja, metabolizm czy produkcja czynników wzrostu [249]–[254] i wpływa na zachowania różnych typów komórek, zwierzęcych i ludzkich: nerwowych [185], [252], [255], [256], osteoblastów i prosteoblastów [253], [257]–[260], fibroblastów [257], [261], [262], kardiomiocytów [263], mioblastów [254] oraz komórek macierzystych: z tkanki tłuszczowej [249], [264], [265], embrionalnych [250], z miazgi zębowej [251], nerwowych [76], [266] oraz ze szpiku kostnego [265], [267].

Dzięki temu elektrostymulacja może znaleźć szerokie zastosowanie w medycynie i inżynierii tkankowej, m. in. do regeneracji tkanek: skóry, mięśni, nerwów oraz kości [185],

[249]–[251], [253]. Ze względu na to, iż pole elektryczne może potencjalnie wspomagać synaptogenezę i regenerację nerwów jego zastosowanie jest także obiecującą metodą w terapiach chorób neurologicznych możliwą do zastosowania przy stosowaniu protez nerwowych [252], [255]. Elektrostymulacja wykazała także pozytywne wyniki w leczeniu zarówno złamań kości, jak i urazów tkanek miękkich: przyspiesza zrost tkanki kostnej oraz skraca czas gojenia się rany, działa przeciwbólowo w miejscu urazu, zmniejsza odczyn zapalny, ma działanie hamujące rozwój drobnoustrojów [255], [258], [259]. W związku z tym jest także jednym z potencjalnych rozwiązań przyspieszających czas osteointegracji implantu z kością człowieka [257].

Ze względu na sposób działania pola elektrycznego rozróżnić można trzy rodzaje elektrostymulacji komórek, schematycznie przedstawione na rysunku 62, metodą bezpośrednią, pośrednią pojemnościową lub pośrednią indukcyjną [259].



Rysunek 62. Rodzaje elektrostymulacji komórek a) metoda bezpośrednia b) metoda pośrednia pojemnościowa c) metoda pośrednia indukcyjna

Pierwszą, najprostszą i najbardziej popularną, stosowaną w wielu badaniach metodą jest stymulacja bezpośrednia. W tym układzie, w dołku płytki hodowlanej, wraz z wysianymi komórkami i pożywką, znajdują się też dwie, równoległe względem siebie, podłączone do prądu elektrody. Powodują one bezpośredni przepływ prądu w dołku a kierunek wytwarzanego pola elektrycznego jest równoległy do powierzchni próbki [261]. W sytuacji, gdy komórki osadzone są na podłożu przewodzącym prąd, do którego podłączone są elektrody, mówimy o metodzie bezpośredniej powierzchniowej. Elektryczne przewody indukują elektryczny prąd boczny,

płynący następnie w obrębie całego substratu, wpływając na osadzone tam komórki. Przykład takiego układu opisany został między innymi w badaniach N. Kam i innych [255], [262], [266].

W wielu przypadkach działanie na komórki poprzez prąd zadany bezpośrednio może spowodować ich uszkodzenie [252]. Aby tego uniknąć możliwe jest zastosowanie jednej z pośrednich metod stymulacji. Stymulacja pośrednia to bezkontaktowe oddziaływanie na hodowlę komórkową przy użyciu pola elektromagnetycznego, bez zadawania prądu wprost do komórek. W tym wypadku, zarówno w metodzie pojemnościowej, jak i w indukcyjnej komórki pobudzane są polem elektrycznym. Podłączone do prądu elektrody umieszczone są pod podłożem. Dzięki temu oddzielone są od komórek nieprzewodzącą warstwą płytki hodowlanej. W metodzie pojemnościowej pole elektryczne przenika przez płytkę hodowlaną oraz komórki, a następnie zanika [252]. Natomiast w przypadku metody indukcyjnej, pole elektromagnetyczne przenika przez izolujący materiał podłoża hodowlanego i indukuje prąd w przewodzącej warstwie, na której osadzone są stymulowane komórki. Chociaż obie opisane wyżej, bezkontaktowe metody są znacznie bezpieczniejsze dla komórek od metody bezpośredniej, ze względu na stopień skomplikowania stanowiska, są także znacznie rzadziej wykorzystywane.

Wybór metody elektrostymulacji wiąże się też z koniecznością doboru odpowiednich parametrów procesu. Skuteczność metody zależy może od czynników takich jak: materiał a użytego w hodowli podłoża, parametrów prądowych (amplitudy, częstotliwości impulsów, szerokości impulsu) oraz czasu trwania stymulacji (długości serii impulsów i przerwy pomiędzy seriami, ilości serii) [261]. Warunki muszą być odpowiednio dobrane do potrzeb stymulowanych komórek. Jest to bardzo trudne, tym bardziej, iż czasem nawet różne komórki tej samej tkanki (np. osteoblasty i osteoklasty) [261] lub te same komórki różnego pochodzenia (np. mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego i z tkanki tłuszczowej) [265] przy tych samych parametrach prądowych mogą wykazywać różne zachowanie.

Materiały grafenowe określone zostały jako podłoża do hodowli komórkowych, wzmagające proliferację lub różnicowanie komórek. Wykorzystanie na raz dwóch bodźców: stymulacji materiałem podłożowym oraz polem elektrycznym może dać synergiczny efekt w kontekście skuteczności wyników stymulacji. Chociaż materiały grafenowe, takie jak nanopłatki grafenowe, są biokompatybilne oraz mogą wpływać na zachowanie komórek, co więcej posiadają unikalne właściwości elektryczne (opisane w rozdziale 2.1.1), to analiza literaturowa wskazuje, iż prądowa stymulacja komórek, hodowanych na tym materiale, nie została jeszcze szczegółowo przebadana.

Jedną z pierwszych grafenowych elektrod w zastosowaniu do stymulacji prądowej sznurzych komórek nerwowych PC-12 przedstawili Sherell et al. [256] Wykazali oni, że elektryczna stymulacja prądem zmiennym w znaczny sposób wpływa na różnicowanie komórek osadzonych na monowarstwie grafenu. Balikov et al. w 2016 roku osadził na, uzyskanej metodą CVD, monowarstwie grafenowej, mezynechmalne komórki macierzyste ze szpiku kostnego. Badania wykazały ich zwiększoną osteointegrację [267]. Efektywne różnicowanie uzyskali oni zarówno na warstwach, jak i na zaprojektowanych wzorach grafenowych. Kim et al. natomiast udowodnił, że tlenek grafenu ułożony we wzory wpływa na osteogenne i neurogenne różnicowanie komórek macierzystych ADSC. Proces ten był zależny od ułożenia rzędów i kolumn wzoru grafenowego [268].

Analiza literaturowa związana ze stymulacją prądową wykonywaną na materiałach grafenowych, wykazuje jej wpływ na proliferację lub różnicowanie komórek. W związku z tym, celem w pracy była ocena elektrostymulacji komórek na warstwach wytworzonych przy użyciu opracowanych biozgodnych, przewodzących, bazujących na nanopłatkach grafenowych atramentów.

### **8.3.1. Model procesu pośredniej, indukcyjnej metody elektrostymulacji**

Aby uniknąć ryzyka związanego z niszczeniem komórek, które może mieć miejsce w bezpośredniej technice elektrostymulacji, do oceny użyteczności opracowanych warstw grafenowych w prądowej stymulacji wykorzystano metodę pośrednią, indukcyjną.

Badania numeryczne przeprowadzono w celu oceny możliwości wykorzystania pośredniej metody indukcyjnej w elektrostymulacji na opracowanych warstwach grafenowych. Głównym zadaniem było oszacowanie występujących wartości natężenia pola elektrycznego w otoczeniu cienkowarstwowej powierzchni przewodzącej, wykonanej z atramentu na bazie grafenu. W odpowiedzi poszukiwano wartości modułu wektora natężenia pola elektrycznego oraz wartości modułu indukowanych prądów wirowych. Parametrami zadanymi była wartość napięcia przyłożonego do elektrod wymuszających oraz częstotliwość jego zmian. Badania numeryczne wykonano dla dwóch rodzajów elektrod: grzebieniowych lub pierścieniowych, bez galwanicznego połączenia. Rozważany model uwzględniał umieszczoną na nieprzewodzącym materiale płytki hodowlanej, o grubości od 1 mm do 2 mm, cienkowarstwową, przewodzącą, grafenową warstwę, która była równoległa do płaszczyzn elektrod. Model przygotowano dla częstotliwości wymuszających mieszczących się w zakresie 10 - 5000 Hz.

W obszarach nieprzewodzących zadeklarowano równania pola elektromagnetycznego, zgodne z prawem Amphere'a (8), w którym  $\mathbf{H}$  oznacza wektor natężenia pola magnetycznego a  $\mathbf{J}$  wektor gęstości prądu, będącego sumą gęstości prądu przewodzenia (w obszarach

nieprzewodzących  $\gamma=0$ ) oraz prądu przesunięcia (9). Związek pomiędzy wektorowym potencjałem magnetycznym  $\mathbf{A}$  a wektorem indukcji magnetycznej  $\mathbf{B}$  oraz wektorem natężenia pola elektrycznego  $\mathbf{E}$  określają zależności odpowiednio równania (10) i (11).

$$\nabla \times \mathbf{H} = \mathbf{J} \quad (8)$$

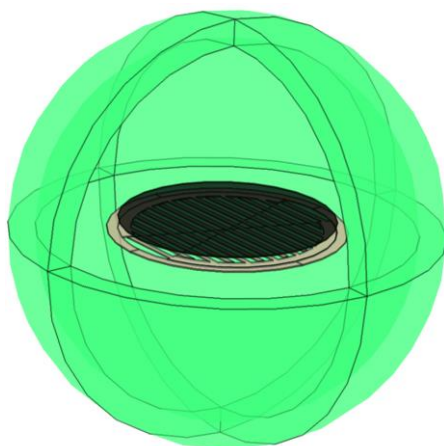
$$\mathbf{J} = \gamma \mathbf{E} + j\omega \epsilon \mathbf{E} \quad (9)$$

$$\mathbf{B} = \nabla \times \mathbf{A} \quad (10)$$

$$\mathbf{E} = -j\omega \mathbf{A} \quad (11)$$

Powyższe równania przedstawiono w dziedzinie zespolonej dla modelu równań pola harmonicznego o pulsacji  $\omega$ ,  $j$  – oznacza jednostkę urojoną ( $j^2=-1$ ).

Na rysunku 63 przedstawiono geometrię dla modelu numerycznego układu wykorzystującego elektrody grzebieniowe. W modelu wprowadzono jeden wolumen otoczenia, w którym założono równania pola elektromagnetycznego (8) z symulacją warunków nieskończoności na brzegach obszaru.

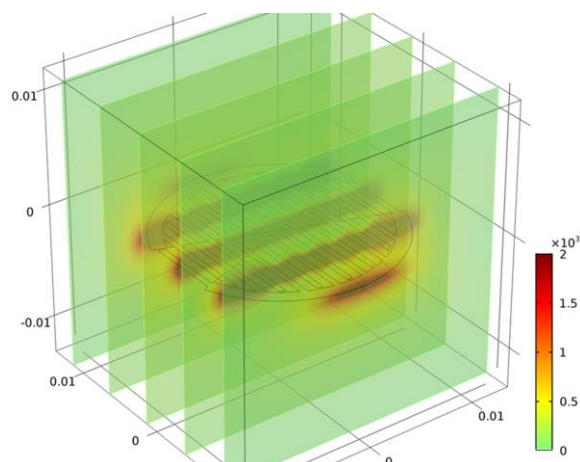


*Rysunek 63. Geometria modelu numerycznego układu elektrod grzebieniowych: kolor zielony – obszar imitujący nieskończoność, kolor pomarańczowy – obszar konduktywnych elektrod grzebieniowych, kolor czarny – obszar konduktywny warstwy przewodzącej grafenowej*

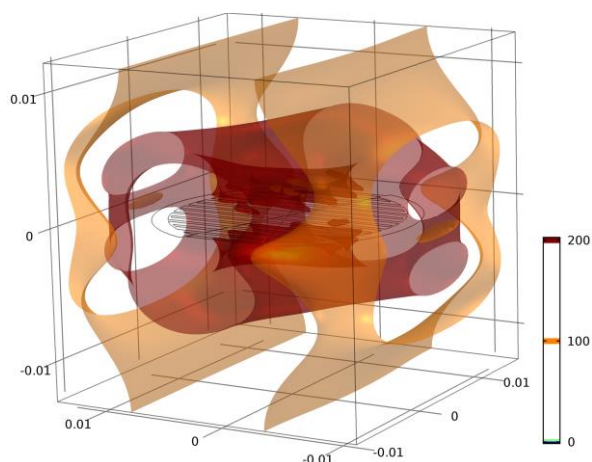
Analiza pierwszych wyników (Rysunek 64) pozwoliła na sformułowanie wniosku, że dla wymuszenia napięciowego  $U=10$  V, przyłożonego na krawędziach elektrod, w zakresie częstotliwości  $f$  od 100 Hz do 5 Hz, można zaobserwować zmiany natężenia pola elektrycznego w otoczeniu elektrod grzebieniowych od wartości 0 do  $2 \text{ kVm}^{-1}$ . Przedstawione na rysunku 65 powierzchnie ekwipotencjalne wykazują, że w uśrednionym otoczeniu 2,5 mm od powierzchni elektrod, zaobserwować można natężenie pola elektrycznego  $200 \text{ Vm}^{-1}$ . Zgodnie z



przewidywaniami, wartość ta maleje w funkcji bezwzględnej odległości od powierzchni elektrod.



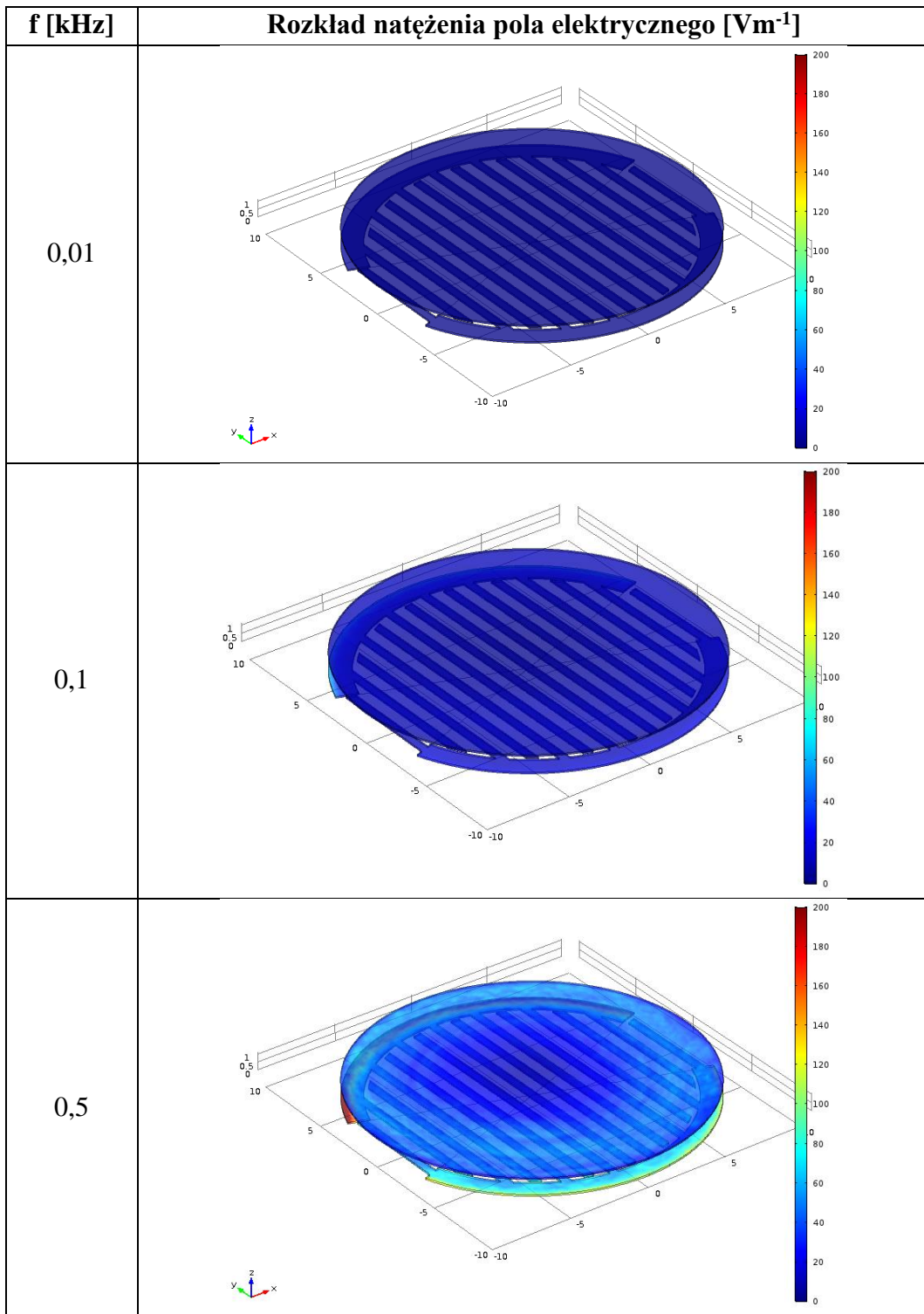
*Rysunek 64. Rozkład modułu wektora natężenia pola elektrycznego na powierzchniach prostopadłych stanowiących przecięcie przestrzeni analizowanego obszaru*

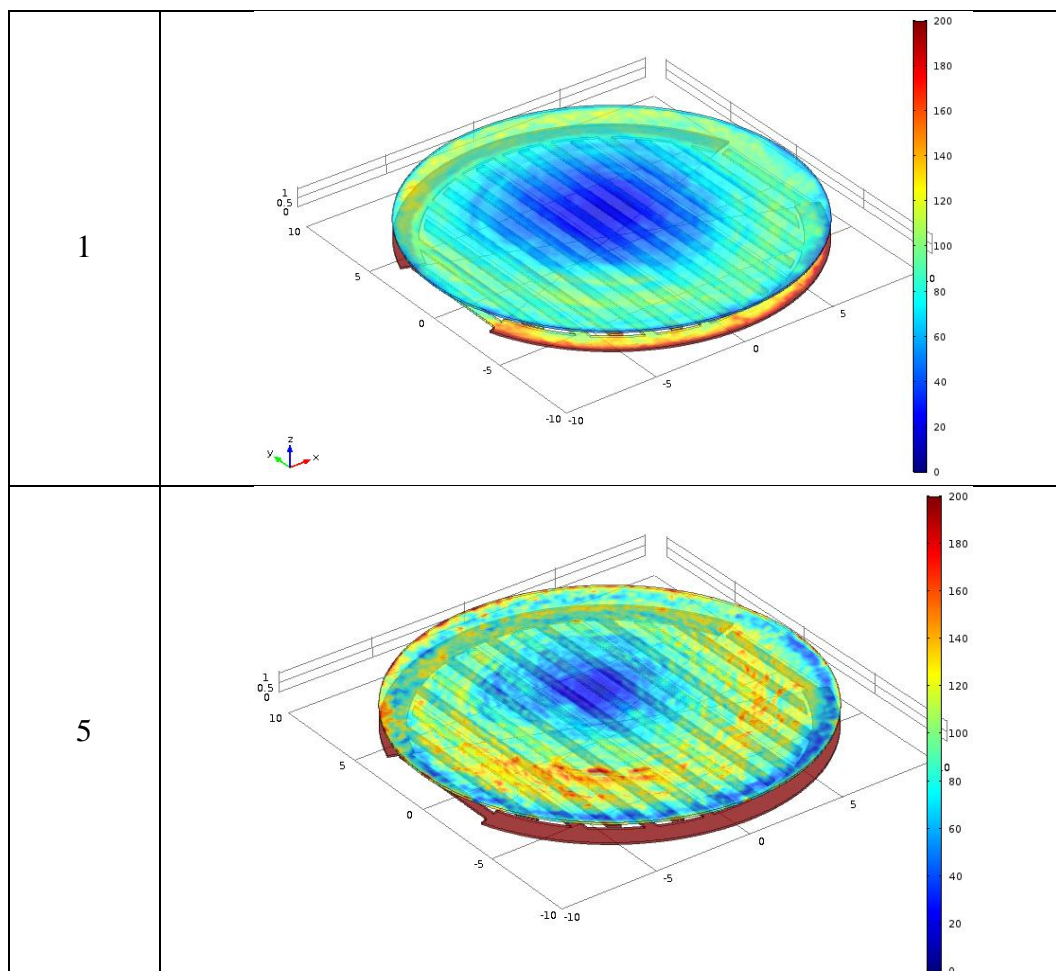


*Rysunek 65. Powierzchnie ekwipotencjalne wektora natężenia pola elektrycznego*

Rysunki umieszczone w tabelach 25 oraz 26 przedstawiają obszar ograniczony powierzchniami ekwipotencjalnymi dla wybranych częstotliwości, prezentując rozkład natężenia pola elektrycznego oraz gęstości prądów indukowanych na modelowanych powierzchniach.

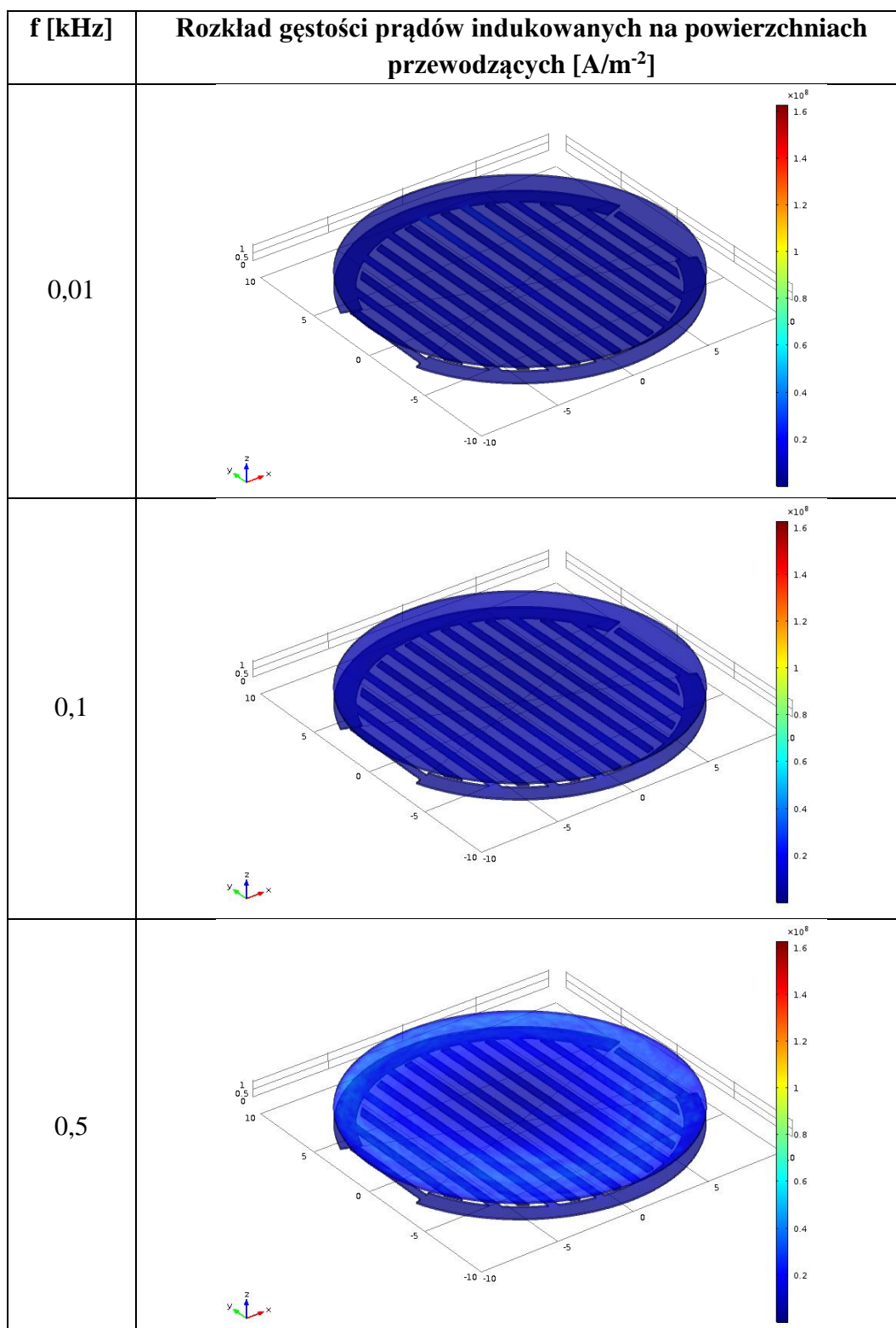
Tabela 25. Rozkład natężenia pola elektrycznego na powierzchniach przewodzących przy napięciu  $U=10\text{ V}$  oraz różnych częstotliwościach wymuszających

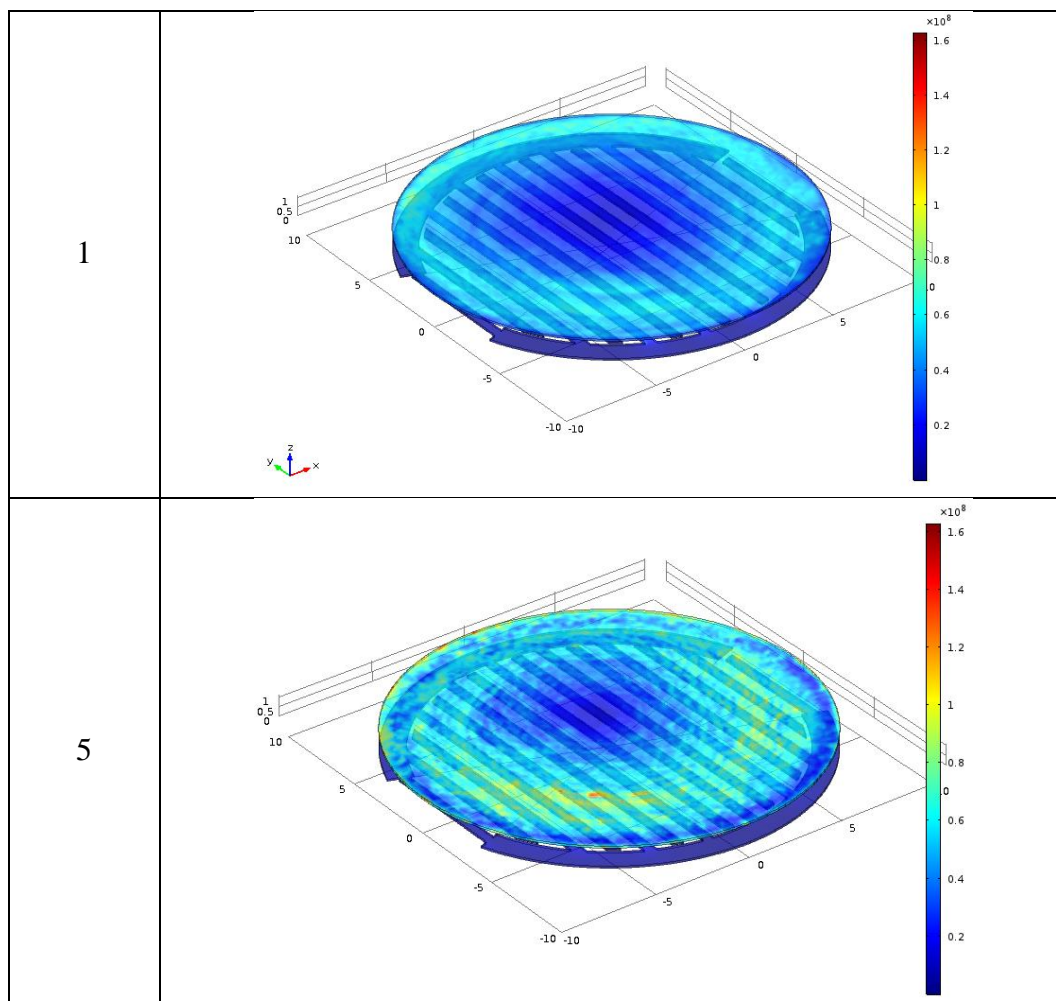




Na podstawie przedstawionych wyników stwierdzono, że na powierzchni warstwy węglowej, natężenie pola elektrycznego nie przekracza lokalnie  $160 \text{ Vm}^{-1}$  (dla 5 kHz), przy wartości minimalnej  $20 \text{ Vm}^{-1}$  (dla 100 Hz). Wobec przedstawionych wyników należy także stwierdzić, że wraz ze wzrostem częstotliwości, wzrastają prądy przesunięcia, których wynikiem jest silniejsze pole elektryczne na modelowanej powierzchni oraz wzrost gęstości prądu przewodzenia.

Tabela 26. Rozkład gęstości prądów indukowanych na powierzchniach przewodzących przy napięciu wymuszającym 10 V oraz różnych częstotliwościach wymuszających

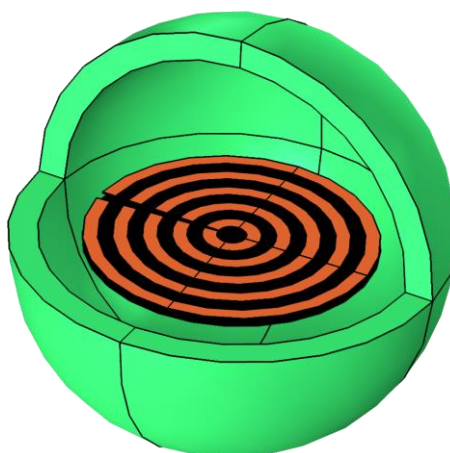




Przy częstotliwości pola wymuszającego mniejszej lub równej 100 Hz nie zauważa się przepływu prądów indukowanych. Pojawiają się one przy częstotliwości 500 Hz a wartość modułu prądów indukowanych zawiera się w zakresie 0,2 - 0,5 Am<sup>-2</sup>. Przy częstotliwości 1 kHz można zaobserwować lokalne obszary których wartość modułu prądów indukowanych wynosi 0,8 Am<sup>-2</sup> a przy 5 kHz – 1,2 Am<sup>-2</sup>.

W celu opracowania wzoru elektrod, zapewniających indukowanie się w warstwie przewodzącej prądów lokalnych, wykonano także obliczenia dla układu, którego geometria uwzględnia zastosowanie elektrod pierścieniowych (rysunek 66). Uzyskane, przy częstotliwościach wymuszających 0,1, 1 oraz 5 kHz, wyniki obrazujące rozkład natężenia pola elektrycznego oraz rozkład gęstości prądów indukowanych w tym układzie przedstawiono w tabeli 27.

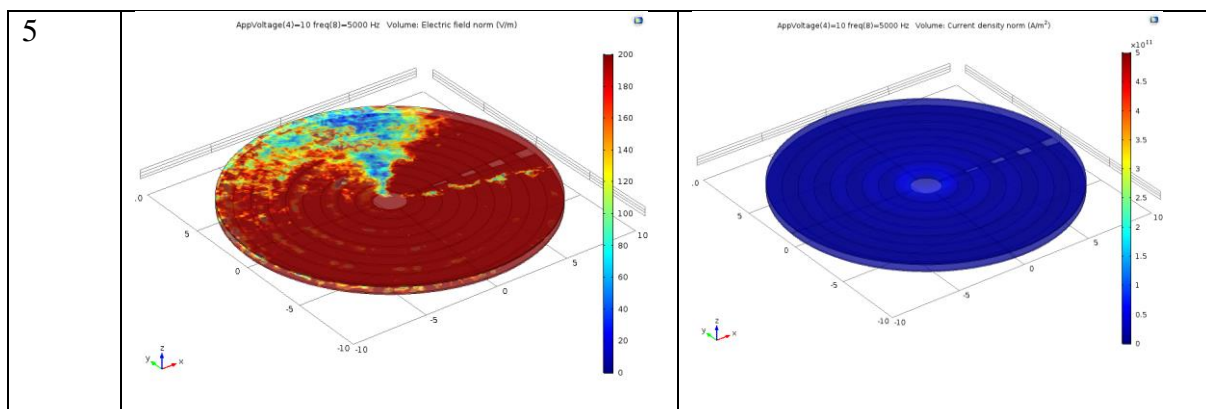




Rysunek 66. Geometria modelu numerycznego układu elektrod pierścieniowych: kolor zielony – obszar imitujący nieskończoność, kolor pomarańczowy – obszar kondukcyjnych elektrod grzebieniowych, kolor czarny – obszar kondukcyjny warstwy przewodzącej grafenowej

Tabela 27. Rozkład natężenia pola elektrycznego oraz rozkład gęstości prądów indukowanych na powierzchni przewodzącej przy napięciu wymuszającym 10 V oraz różnych częstotliwościach wymuszających

f [kHz]	Rozkład natężenia pola elektrycznego [Vm <sup>-1</sup> ]	Rozkład gęstości prądów indukowanych [A/m <sup>2</sup> ]
0,1		
1		

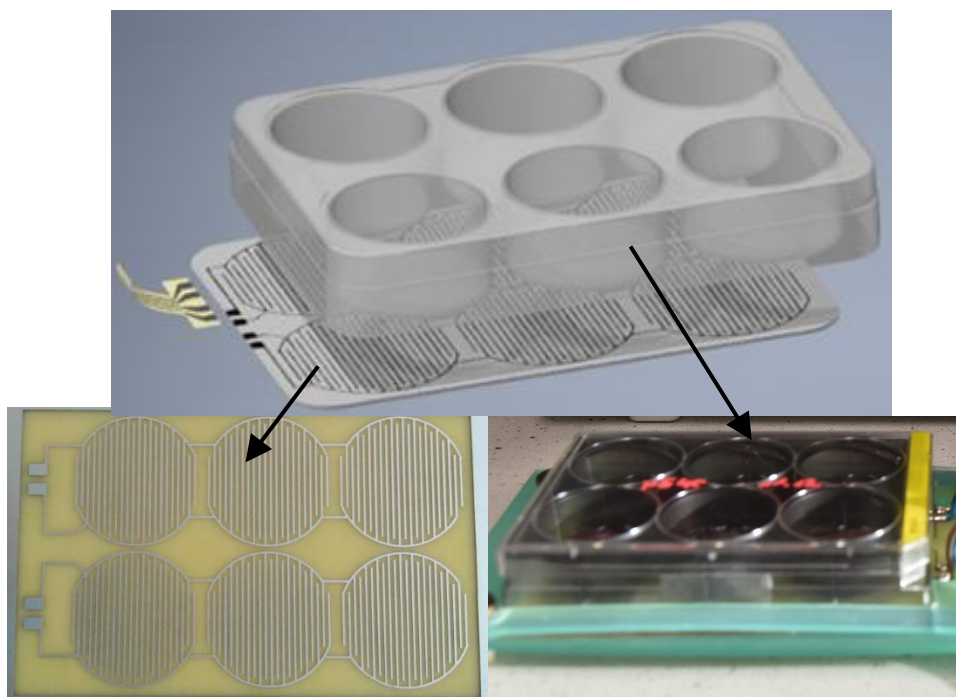


Przy częstotliwościach wymuszających niższych niż 5 kHz rozkład pola elektrycznego w modelowanym obszarze dołka hodowlanego jest nierównomierny. Występują lokalnie natężenia pola o wartości od 80 do 200  $\text{Vm}^{-1}$ , jednak występują także obszary gdzie wartość natężenia pola równa jest 0  $\text{Vm}^{-1}$ . Przy 5 kHz natężenie pola elektrycznego wynosi na większości powierzchni około 200  $\text{Vm}^{-1}$ . Jednakże przy żadnym ze zbadanych parametrów wymuszających w warstwie przewodzącej nie zaobserwowano prądów indukowanych.

Wyniki uzyskane w modelu, wskazują, iż w układzie zawierającym elektrody grzebieniowe, w przeciwieństwie do układu z elektrodami pierścieniowymi, uzyskać można prądy indukujące się w przewodzącej warstwie grafenowej, na której osadzone będą komórki. W związku z tym, opierając się na wynikach modelu założono, iż zbudowany w pracy układ do elektrostymulacji komórek składać się będzie z elektrod grzebieniowych, a wstępnie dobrane parametry wynosić będą: amplituda napięcia  $U=10\text{V}$ , częstotliwość wymuszająca:  $f=1\text{kHz}$ , prąd sinusoidalny, zmienny.

### 8.3.2. Stanowisko do elektrostymulacji komórek

Pierwszą częścią zbudowanego w pracy stanowiska do elektrostymulacji jest układ, podłączanych do generatora prądu zmiennego, elektrod grzebieniowych wytrawionych na miedzianej płytce (Rysunek 67). Wzór elektrod jest dopasowany kształtem do 6-cio dołkowej płytki hodowlanej.

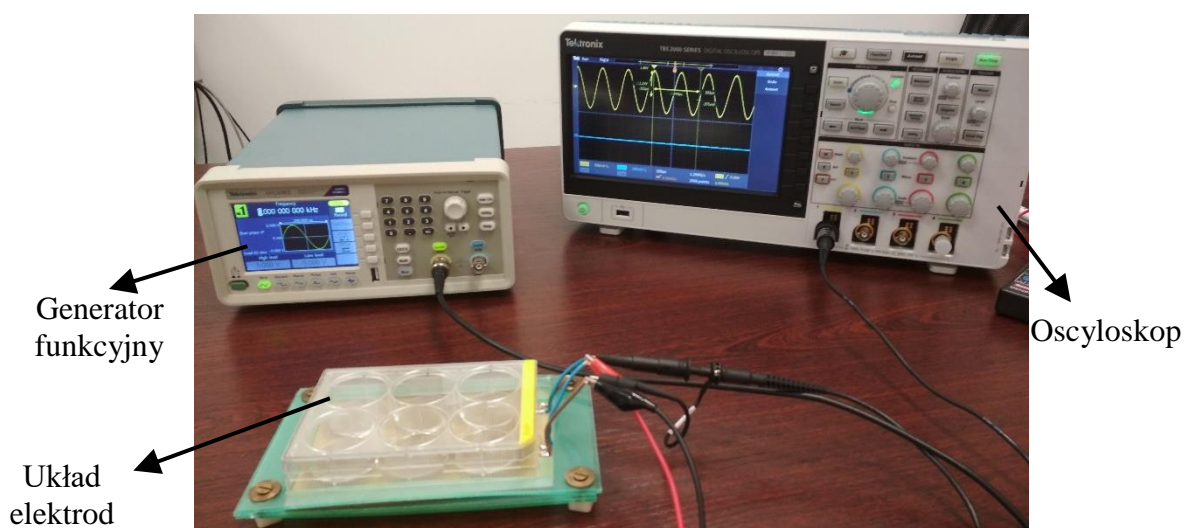


Płytką z elektrodami grzebieniowymi

Płytką hodowlaną z przewodzącą warstwą grafenu

*Rysunek 67. Układ elektrod grzebieniowych wraz z 6-cio dołkową płytką hodowlaną*

Druga część stanowiska obejmuje generator funkcyjny prądu zmiennego firmy Tektronix AFG1062, wraz z oscyloskopem Tektronix TBS 2000 Series, który umożliwia obserwację zadawanego sygnału napięciowego (Rysunek 68).



Generator funkcyjny

Oscyloskop

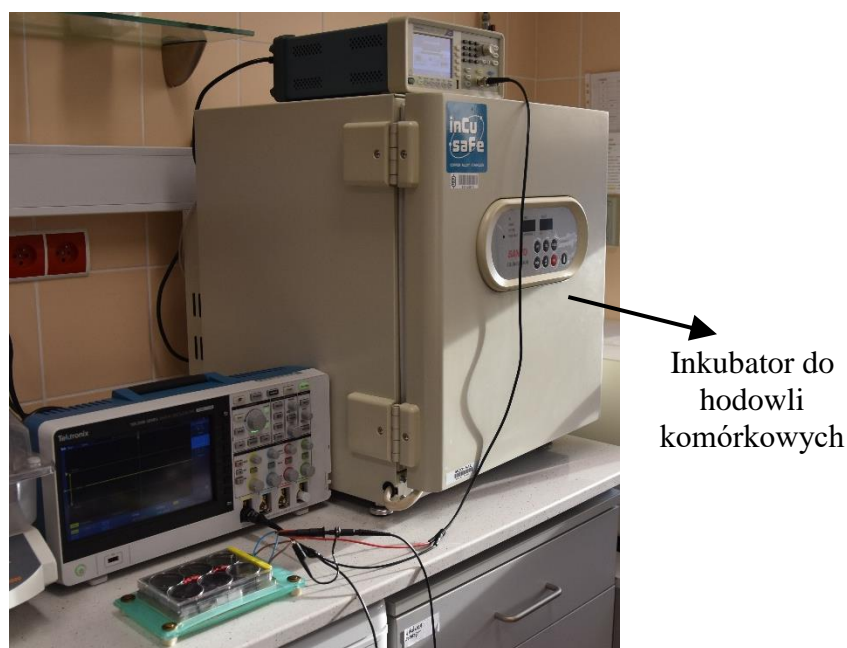
Układ elektrod

*Rysunek 68. Stanowisko do elektrostymulacji komórek*

Płytką hodowlaną z dołkami pokrytymi przewodzącą warstwą grafenową wraz z wysianymi komórkami umieszczona została w zapewniającym jej stabilność uchwycie. Pola



kontaktowe elektrod podłączone zostały do generatora funkcyjnego. Następnie układ elektrod wraz z płytką i wysianymi na niej komórkami umieszczone zostały w laboratorium biologicznym, w inkubatorze komórkowym firmy Sanyo, zapewniającym hodowlom komórkowym właściwe warunki tj. 37°C z atmosferą 5%CO<sub>2</sub> (Rysunek 69).

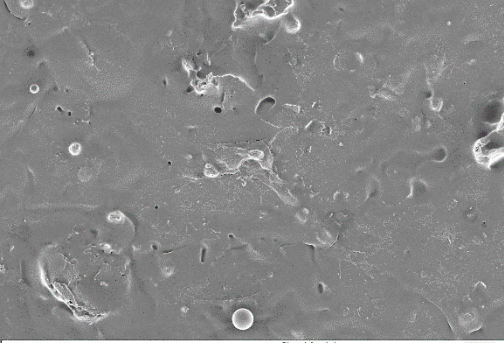
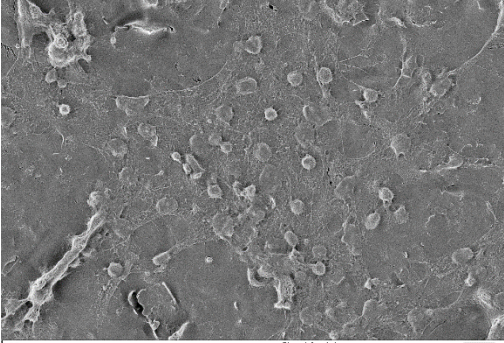
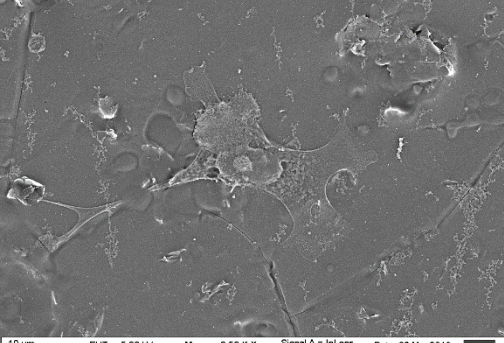
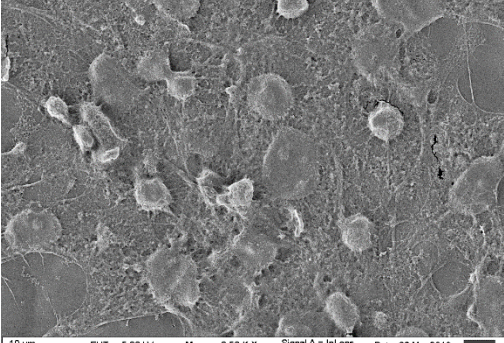
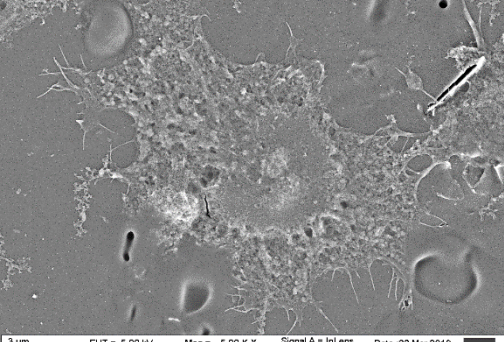
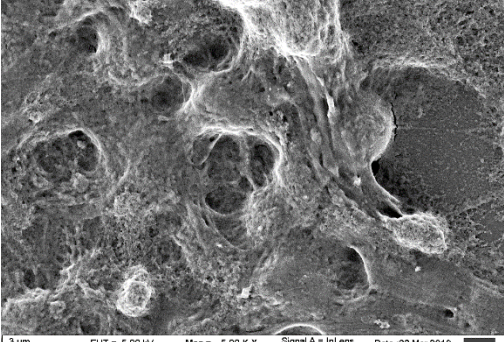
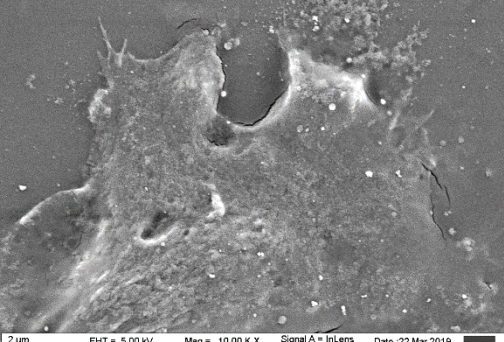
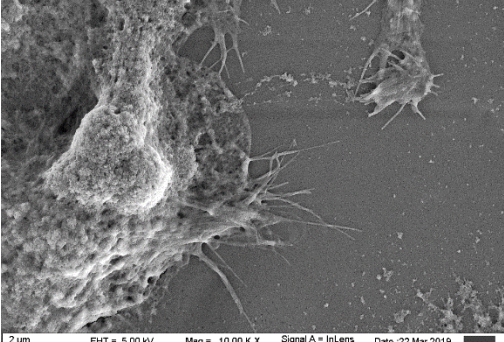


*Rysunek 69. Stanowisko do elektrostymulacji umieszczone w laboratorium biologicznym*

### **8.3.3. Wyniki elektrostymulacji komórek nerwowych**

Efektywność elektrostymulacji komórek osadzonych na warstwie grafenowej, stymulowanych prądowo przy użyciu zbudowanego stanowiska, oceniano na podstawie obserwacji z zastosowaniem skaningowego mikroskopu elektronowego. Macierzyste komórki neuralne hodowane były 7 dni, stymulację rozpoczynano po 24 godzinach od wysiania hodowli. Zdjęcia przedstawione w tabeli 28 prezentują zarówno komórki stymulowane prądowo na warstwie grafenowej, jak i komórki osadzone na warstwie grafenowej niestymulowane, pochodzące z hodowli kontrolnej.

Tabela 28. Obrazy z mikroskopu SEM przedstawiające komórki osadzone na warstwie grafenowej. Zdjęcia prezentują wyniki dla komórek stymulowanych prądowo oraz pochodzących z niestymulowanej hodowli kontrolnej..

Komórki z hodowli kontrolnej	Komórki stymulowane prądowo
 <p>10 µm EHT = 5.00 kV Mag = 1.00 K X Signal A = InLens Date :22 Mar 2019 ESB Grid is = 0 V WD = 3.8 mm Signal B = HE-SE2 Time :11:43:19 File Name = control_11.tif</p>	 <p>20 µm EHT = 5.00 kV Mag = 1.00 K X Signal A = InLens Date :22 Mar 2019 ESB Grid is = 0 V WD = 3.9 mm Signal B = HE-SE2 Time :12:21:44 File Name = wpolu_37.tif</p>
 <p>10 µm EHT = 5.00 kV Mag = 2.50 K X Signal A = InLens Date :22 Mar 2019 ESB Grid is = 0 V WD = 3.8 mm Signal B = HE-SE2 Time :11:55:30 File Name = control_24.tif</p>	 <p>10 µm EHT = 5.00 kV Mag = 2.50 K X Signal A = InLens Date :22 Mar 2019 ESB Grid is = 0 V WD = 3.9 mm Signal B = HE-SE2 Time :12:22:11 File Name = wpolu_38.tif</p>
 <p>3 µm EHT = 5.00 kV Mag = 5.00 K X Signal A = InLens Date :22 Mar 2019 ESB Grid is = 0 V WD = 3.8 mm Signal B = HE-SE2 Time :11:50:31 File Name = control_18.tif</p>	 <p>3 µm EHT = 5.00 kV Mag = 5.00 K X Signal A = InLens Date :22 Mar 2019 ESB Grid is = 0 V WD = 3.9 mm Signal B = HE-SE2 Time :12:14:59 File Name = wpolu_24.tif</p>
 <p>2 µm EHT = 5.00 kV Mag = 10.00 K X Signal A = InLens Date :22 Mar 2019 ESB Grid is = 0 V WD = 3.8 mm Signal B = HE-SE2 Time :11:37:16 File Name = control_04.tif</p>	 <p>2 µm EHT = 5.00 kV Mag = 10.00 K X Signal A = InLens Date :22 Mar 2019 ESB Grid is = 0 V WD = 3.9 mm Signal B = HE-SE2 Time :12:00:49 File Name = wpolu_04.tif</p>

Na zdjęciach SEM wykonanych przy najmniejszych powiększeniach, wynoszących 1000x zaobserwowano, iż elektrostymulacja zwiększyła liczbę prawidłowo rozplaszczonych komórek. Powiększenie 2500x pozwala zauważyć ponadto jak bardzo rozwinięta jest w tym wypadku sieć, wytworzona poprzez wypustki owych komórek. Podobne wnioski wyciągnąć można na podstawie zdjęć o powiększeniu 5000x. Komórki z hodowli kontrolnej adherują w sposób prawidłowy do podłoża, rozplaszczają się i wypuszczają wypustki. Jednakże po zastosowaniu prądu widoczna jest większa liczba. Ponadto wypuszczają one w tym wypadku obserwowalne na powiększeniach 10000x wypustki, które, w wypadku neuronów, tworzą załączki dendrytów oraz aksonów.

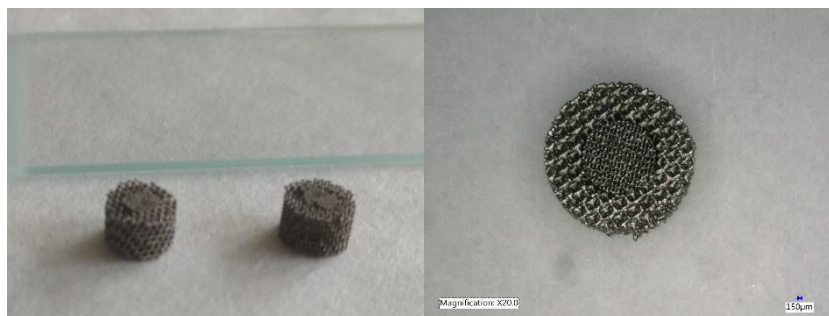
Na podstawie obserwacji mikroskopowej stwierdzić można, iż widoczny jest wyraźny wpływ elektrostymulacji na zachowanie macierzystych komórek neuralnych osadzonych na warstwie grafenowej. Komórki te nie tylko dużo szybciej namnażają się, ale także tworzą liczne cylindryczne wypustki cytoplazmatyczne, stanowiące przedłużenie ciała komórki nerwowej.

#### **8.4. Pokrywanie implantów - scaffoldów**

Opracowane materiały grafenowe, ze względu na biokompatybilność, antyseptyczność oraz zdolność do stymulacji proliferacji komórek, a także przewodność warstw z nich wytwarzanych mogą znaleźć szerokie zastosowanie przy wytwarzaniu różnego rodzaju implantów. Bezkontaktowe techniki elektroniki drukowanej, takie jak druk strumieniowy lub powlekanie natryskowe umożliwiają bowiem nanoszenie materiałów grafenowych, w postaci kompozytów heterofazowych na implanty o różnych kształtach. Użycie tych metod pozwala jednak nie tylko na nanoszenie powłoki z płatków grafenowych, charakteryzującej się wysoką adhezją do powierzchni implantu, ale także umieszczanie płatków w środku porowatej struktury implantu. Jest to znaczna zaleta metod elektroniki drukowanej, ponieważ umieszczenie biozgodnego materiału w środku skafoldów jest bardzo trudne do osiągnięcia innymi technikami.

W pracy zademonstrowano zastosowanie grafenowych, przewodzących atramentów do pokrywania tytanowych, porowatych implantów zwierzęcych wytwarzanych metodą druku 3D przez firmę MaterialsCare w Warszawie. Badane próbki implantów, przedstawione na rysunku 70 mają rozróżnialne dwie części różniące się wielkością porów: część środkową oraz zewnętrzną.

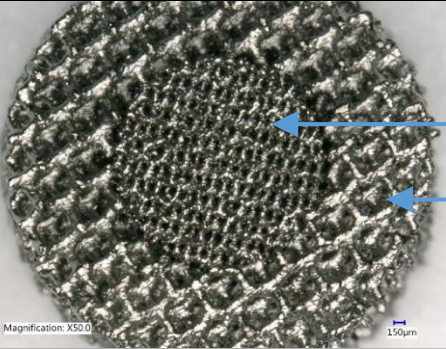

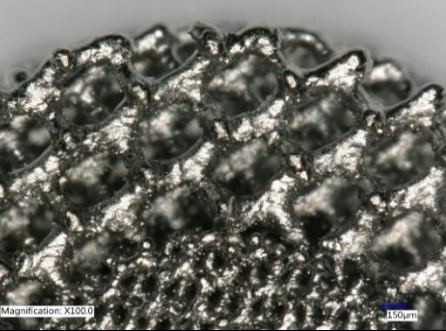
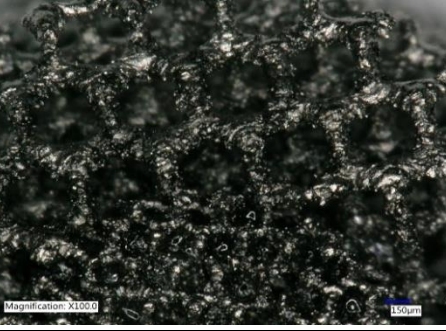
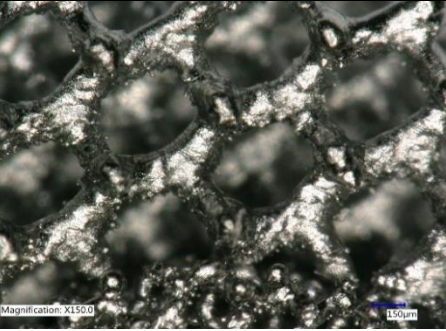
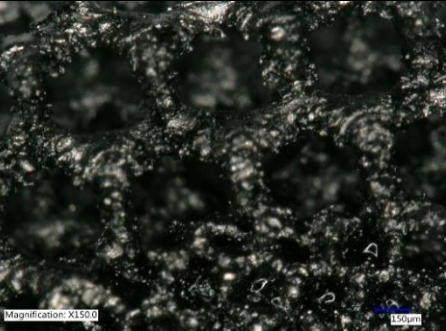
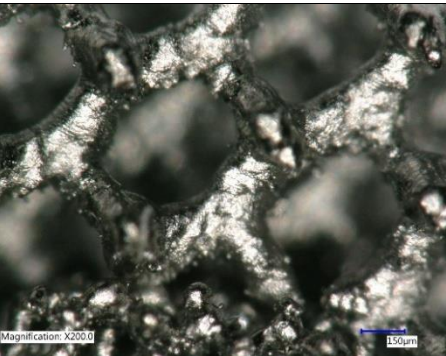
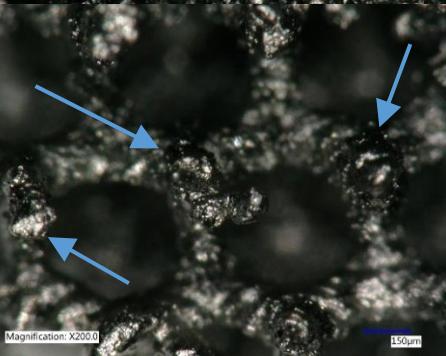
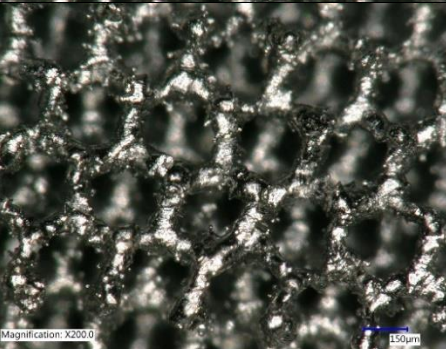
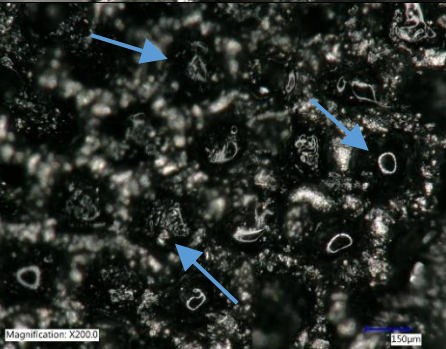




*Rysunek 70. Próbki tytanowych, porowatych implantów zwierzęcych.*

Implanty pokryto warstwą grafenową używając techniki powlekania natryskowego. Wstępne określenie przydatności metody do powlekania porowatych struktur skafoldów warstwą grafenową, jak również umieszczania płatków grafenowych wewnątrz nich, wykonano za pomocą obserwacji przy użyciu mikroskopu świetlnego, opisanego szczegółowo w rozdziale 4.3.2. Powiększenia obrazujące strukturę implantów, zarówno bez warstwy grafenowej oraz po powlekanii atramentem GNP, pokazano w tabeli 29.

Tabela 29. Obrazy przedstawiające strukturę porowatych skafoldów - przed oraz powlekanii warstwą grafenową

Scaffold	Scaffold powleczony warstwą GNP
 <p>Magnification: X500.0 150µm</p>	 <p>Magnification: X500.0 150µm</p>
 <p>Magnification: X1000.0 150µm</p>	 <p>Magnification: X1000.0 150µm</p>
 <p>Magnification: X1500.0 150µm</p>	 <p>Magnification: X1500.0 150µm</p>
 <p>Magnification: X2000.0 150µm</p>	 <p>Magnification: X2000.0 150µm</p>
 <p>Magnification: X2000.0 150µm</p>	 <p>Magnification: X2000.0 150µm</p>

Na podstawie obserwacji mikroskopowej zauważono, iż scaffoldy powleczone GNP mają inną, ciemniejszą barwę. Wynika to z osadzania cząstek grafenu na ich powierzchni. Przy dwustukrotnym powiększeniu, na części zewnętrznej implantu dostrzec można płatki grafenowe w postaci warstwy. Pojedyncze płatki grafenowe są również zauważalne wewnątrz struktury, przede wszystkim w części środkowej.

Wykonanie testów adhezyjnych implantów powleczonych warstwą grafenową, których wyniki znajdują się w rozdziale 7.2.1, umożliwiło zbadanie skuteczności wypełniania porów implantów płatkami grafenowymi. Przede wszystkim wykorzystano w tym celu metodę scotch tape test opisaną w rozdziale 4.3.3, która potwierdziła wysoką adhezyjność warstwy grafenowej do tytanowych implantów. Drugi z testów polegał na zalaniu pokrytego warstwą grafenową implantu roztworem soli fizjologicznej. Badanie to pozwoliło stwierdzić, że nanocząstki grafenowe nie są wypłukiwane z porów.

Na podstawie obserwacji stwierdzono, że metoda druku strumieniowego oraz użycie opracowanego, grafenowego, atramentu pozwala na pokrywanie implantów – zarówno w środku, jak i na zewnątrz biogodnym materiałem grafenowym. Wytwarzane pokrycie cechuje dobra adhezja. Scaffoldy takie wszczepiane zwierzętom jako implanty przyspieszają przyłączanie kości, zabezpieczając jednocześnie przed zakażeniami. Jednakże takie zastosowanie implantów z opracowaną warstwą grafenową wymaga przeprowadzenia dalszych badań naukowych.

## 9. Podsumowanie i wnioski

W pracy zawarto wyniki badań, które umożliwiły opracowanie kompozycji oraz technologii wytwarzania biozgodnego, przewodzącego atramentu grafenowego wykorzystywanego do wytwarzania warstw, powłok i wzorów technikami elektroniki drukowanej: drukiem strumieniowym oraz powlekaniami natryskowym, do zastosowań w biomedycynie. Szczegółowo scharakteryzowano właściwości zarówno materiałów komponentów, jak i opracowanych atramentów oraz wytworzonych przy ich użyciu warstw.

Szereg przeprowadzonych fizyko-chemicznych oraz biologicznych badań pozwolił potwierdzić, iż wytwarzane atramenty spełniają wymagania stawiane przed dwiema odmiennymi dziedzinami nauki: wymaganiami biologicznymi i technicznymi. Przede wszystkim charakteryzuje je jednorodność i stabilność, umożliwiające wykorzystanie ich w technikach elektroniki drukowanej. Ponadto, kompleksowe testy reologiczne wykazały, iż są to materiały cechujące się rozrzedzaniem ścinaniem, o lepkości mieszczącej się w zakresie 0,7-2 mPas, dedykowanym technikom druku strumieniowego i powlekania natryskowego.

Wykazano także, iż opracowane atramenty są cytozgodne względem szeregu komórek: tłuszczowych mezenchymalnych komórek macierzystych ADSC, ludzkich fibroblastów oraz komórek nerwowych. Cytozgodność względem wielu różnych, zdrowych komórek ludzkich potwierdziła, iż atramenty te są biozgodne. Dodatkowo badania, przeprowadzone nad drukowanymi przy użyciu opracowanych atramentów grafenowych warstw, wykazały, iż skutecznie blokują one powstawanie biofilmu bakteryjnego. Wyjaśniono mechanizm blokowania rozwoju biofilmu na warstwach grafenowych. W pracy potwierdzono także ich antyseptyczność.

Należy bowiem podkreślić, że przewodzące warstwy grafenowe, chociaż szkodliwe względem bakterii, często nie są toksyczne względem komórek ludzkich. Jest to związane z różnicami w budowie obu rodzajów komórek. Bakterie, jako organizmy nie posiadające jądra komórkowego przekazują wolne elektrony z wnętrza, poprzez mostek grafenowy co wywołuje stres oksydacyjny i ich obumieranie. Natomiast komórki ludzkie, jako organizmy posiadające jądro komórkowe, nie są narażone na oddziaływania związane z wolnymi elektronami i przewodnością materiałów grafenowych w warstwie [102].

Opracowana oryginalna technologia wytwarzania atramentów bazujących na nanopłatkach grafenowych pozwala także na sterowanie właściwościami elektrycznymi wytwarzanych warstw, zależnymi od ilości powtórzeń procesu drukarskiego. Uzyskane właściwości przewodnictwa warstw w zakresie: 90-100 k $\Omega$  dla ścieżek wydrukowanych

technologią druku strumieniowego oraz 600-800  $\Omega$  dla warstw uzyskanych techniką powlekania natryskowego, pozwala na wykorzystanie ich m.in. do stymulacji prądowej komórek, która w znaczący sposób przyczynia się do wzrostu i proliferacji. Opisana w pracy elektrostymulacja macierzystych komórek neuralnych, poskutkowała nie tylko wzrostem liczby komórek, ale także wytworzeniem przez te komórki znacznej liczby cylindrycznych wypustek cytoplazmatycznych – dendrytów i aksonów.

Na podstawie badań i modeli wykonanych w pracy stwierdzono ponadto, że:

1. Wyselekcjonowane w pracy nanopłatki grafenowe, przeznaczone do zastosowania w postaci fazy funkcjonalnej opracowanych atramentów heterofazowych, cechuje brak tendencji do aglomerowania. Średnia średnica wybranych płatków wynosi odpowiednio 8 oraz 15  $\mu\text{m}$  dla technologii druku strumieniowego i powlekania natryskowego, dzięki czemu nie zatykają one mikrodyszy drukarskiej. Płatki te charakteryzują się ponadto biozgodnością.
2. Poliglikol etylenowy o masie cząsteczkowej 1500 (PEG 1500) stanowi biozgodny, polimerowy nośnik, pozwalający na uzyskanie reologii atramentu dostosowanej do wymagań wybranych technologii drukarskich oraz warstw charakteryzujących się adhezją spełniającej wymogi ich aplikacji w zastosowaniach biologicznych.
3. Zastosowany przy wytwarzaniu atramentów komercyjny surfaktant z japońskiej firmy NOF, będący polimerem polarnym, zapewnia zarówno stabilność fazy funkcjonalnej w zawiesinie, jak również jego jednorodność. Surfaktant ten nie wykazywał toksyczności względem badanych komórek.
4. Prędkości ścinania działające na atrament w mikrodyszy, w trakcie procesu druku strumieniowego przekraczają wartość  $6 \cdot 10^5$  1/s. Wartość ta przekracza zakresy pomiarowe reometrów. Lepkość atramentów powinna być odczytywana dla ostatniego punktu pomiarowego krzywej lepkości, gdy wartość lepkości jest już ustabilizowana.
5. Lepkości opracowanych atramentów mają wartości w zakresie 1,33-1,52 mPas. Mieszczą się więc w zakresie lepkości dedykowanym technologiom druku strumieniowego i powlekania natryskowego. Wykazują także zachowanie rozrzedzania ścinaniem, w związku z tym mogą z powodzeniem być stosowane w obu technikach.
6. Wytwarzane z biozgodnych atramentów warstwy charakteryzuje wysoka adhezja do podłoża oraz odporność na płukanie różnymi cieczami lub roztworami. Pozwala to na zastosowanie ich w hodowlach komórkowych i bakteryjnych



7. Przewodzące ścieżki grafenowe wytworzone przy użyciu opracowanego atramentu uzyskać można przy minimalnej grubości warstw 44 nm, po wykonaniu około 20 powtórzeń druku metodą druku strumieniowego lub 37 nm grubości po 8 powtórzeń przejścia dyszy drukującej w procesie powlekania natryskowego. Możliwe jest sterowanie właściwościami elektrycznymi warstwy poprzez zmianę jej grubości w wyniku przeprowadzonych powtórzeń procesu nadruku.
8. Warstwy grafenowe charakteryzują się rezystancją w zakresie 90-100 k $\Omega$  oraz 600-800  $\Omega$  odpowiednio dla druku strumieniowego i powlekania natryskowego, która zależna jest od grubości warstwy i zawartości nanopłatków grafenowych w atramencie. Minimalna zawartość GNP w atramentach przewodzących do druku strumieniowego to 0,5% wt. Przy większej zawartości proces drukowania był niestabilny, następowało zatykanie dyszy drukującej. W przypadku powlekania natryskowego możliwe jest sterowanie przewodnością warstwy poprzez zmianę zawartości płatków grafenowych w atramencie.
9. Nowoopracowany materiał płatków grafenowych dekorowanych nanocząstkami srebra ma zwiększone właściwości antyseptyczne objawiające się wysoką zdolnością do blokowania biofilmu oraz namnażania się bakterii.
10. Zamodelowano układ do elektrostymulacji komórek w celu ustalenia wartości modułu wektora natężenia pola elektrycznego oraz wartości modułu indukowanych prądów wirowych w otoczeniu grafenowej, przewodzącej powierzchni.
11. Wyjaśniono mechanizmy antyseptyczności przy jednoczesnej cytozgodności względem różnych rodzajów komórek (fibroblasty, macierzyste neuralne, mezenchymalne macierzyste) warstw grafenowych.

Wykorzystanie technik elektroniki drukowanej do nanoszenia warstw i wzorów grafenowych na potrzeby inżynierii biomedycznej stanowi przełom w biomedycynie. W pracy opracowano bowiem technologię wytwarzania grafenowych atramentów, przy użyciu których możliwe jest wydrukowanie pożądanej do zastosowań medycznych inteligentnej powierzchni na podłożach wykonanych z różnych materiałów i o różnych kształtach. Otrzymywane warstwy spełniają wiele zadań biologicznych, takich jak: cytozgodność, antyseptyczność, biodegradowalność a także zdolność do stymulacji wzrostu komórek.

W związku z powyższym opracowane w niniejszej pracy atramenty, nanoszone technikami elektroniki drukowanej, mogą być zastosowane w wielu różnych aplikacjach inżynierii biomedycznej i biomedycyny. Aplikacje przedstawione w pracy to: pokrywanie cewników w

celu zablokowania procedury tworzenia biofilmu bakteryjnego oraz zmniejszenia zagrożenia występowania infekcji urologicznych, powlekanie tytanowych implantów zwierzęcych w celu zastosowania ich do stymulacji proliferacji komórek, a także wytwarzanie przewodzących warstw do elektrostymulacji wzrostu komórek ludzkich takich jak neurony. Zastosowanie opracowanego atramentu w medycynie, szczególnie w celu wytwarzania inteligentnych, grafenowych, cechujących się zarówno biozgodnością jak i antyseptycznością warstw na urządzeniach i elementach medycznych mających kontakt z pacjentami, wymaga jednakże przeprowadzenia dalszych badań.

Wyniki przeprowadzonych badań zostały zaprezentowane na 18-stu konferencjach, w tym 13-stu międzynarodowych oraz trzech referatów wygłoszonych na specjalne zaproszenie. Grafenowe atramenty do technologii elektroniki drukowanej opracowane w ramach niniejszej pracy stały się także przedmiotem ponad 21 recenzowanych artykułów, w tym 8 z listy JCR. Autorka rozprawy otrzymała w 2015 roku dwukrotnie nagrody za wystąpienia konferencyjne. W 2018 roku została ponadto nagrodzona za osiągnięcia naukowe przeprowadzone w latach 2016-2017 zespołową nagrodą Rektora Politechniki Warszawskiej pierwszego stopnia.

## 10. Bibliografia

- [1] S. Szunerits and R. Boukherroub, “Antibacterial activity of graphene-based materials,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 4, no. 43, pp. 6892–6912, 2016.
- [2] T. C. Mah and G. A. O. Toole, “Mah - Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents,” vol. 9, no. 1, pp. 34–39, 2001.
- [3] D. Lee, R. E. Cohen, and M. F. Rubner, “Antibacterial properties of Ag nanoparticle loaded multilayers and formation of magnetically directed antibacterial microparticles,” *Langmuir*, vol. 21, no. 21, pp. 9651–9659, 2005.
- [4] J. A. Lemire, J. J. Harrison, and R. J. Turner, “Antimicrobial activity of metals: Mechanisms, molecular targets and applications,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 11, no. 6, pp. 371–384, 2013.
- [5] C. Baker, A. Pradhan, L. Pakstis, D. Pochan, and S. I. Shah, “Synthesis and Antibacterial Properties of Silver Nanoparticles,” *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 5, no. 2, pp. 244–249, Feb. 2005.
- [6] J. Gallo, M. Holinka, and C. S. Moucha, *Antibacterial surface treatment for orthopaedic implants*, vol. 15, no. 8. 2014.
- [7] J. Kim, “Synthesis, toxicity, biocompatibility and biomedical applications of graphene and graphene- related materials,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 11, pp. 1927–1945, 2016.
- [8] I. Burgués-Ceballos, M. Stella, P. Lacharmoise, and E. Martínez-Ferrero, “Towards industrialization of polymer solar cells: material processing for upscaling,” *J. Mater. Chem. A*, vol. 2, no. 42, pp. 17711–17722, 2014.
- [9] Z. Naukowe, P. Rzeszowskiej, G. Tomaszewski, J. Potencki, and M. Dudek, “Druk strumieniowy jako metoda wytwarzania elastycznych obwodów drukowanych,” vol. 34, pp. 259–274, 2015.
- [10] G. Wroblewski, B. Swatowska, **L. Dybowska-Sarapuk**, M. Jakubowska, and T. Stapinski, “Optical properties of transparent electrodes based on carbon nanotubes and graphene platelets,” *J. Mater. Sci. Mater. Electron.*, vol. 27, no. 12, pp. 12764–12771, Dec. 2016.

- [11] G. Wroblewski *et al.*, “Graphene Platelets as Morphology Tailoring Additive in Carbon Nanotube Transparent and Flexible Electrodes for Heating Applications,” *J. Nanomater.*, vol. 2015, pp. 1–8, Jun. 2015.
- [12] V. C. Sanchez, a Jachak, R. H. Hurt, and a B. Kane, *Biological Interactions of Graphene-Family Nanomaterials—An Interdisciplinary Review*, vol. 25, no. 1. 2012.
- [13] H. Y. Mao *et al.*, “Graphene: Promises, Facts, Opportunities, and Challenges in Nanomedicine,” 2013.
- [14] H. M. Hegab, A. Elmekawy, L. Zou, D. Mulcahy, C. P. Saint, and M. Ginic-Markovic, “The controversial antibacterial activity of graphene-based materials,” *Carbon N. Y.*, vol. 105, pp. 362–376, 2016.
- [15] S.-R. Ryoo, Y.-K. Kim, M.-H. Kim, and D.-H. Min, “Behaviors of NIH-3T3 Fibroblasts on Graphene/Carbon Nanotubes: Proliferation, Focal Adhesion, and Gene Transfection Studies,” *ACS Nano*, vol. 4, no. 11, pp. 6587–6598, Nov. 2010.
- [16] Kenry, W. C. Lee, K. P. Loh, and C. T. Lim, “When stem cells meet graphene: Opportunities and challenges in regenerative medicine,” *Biomaterials*, vol. 155, pp. 236–250, 2018.
- [17] J. B. Reece *et al.*, *Campbell biology*. 2014.
- [18] M. Omid *et al.*, “Bio-Applications of Graphene Composites: From Bench to Clinic,” *Adv. 2D Mater.*, pp. 433–471, 2016.
- [19] M. Li *et al.*, “An overview of graphene-based hydroxyapatite composites for orthopedic applications,” *Bioact. Mater.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–18, 2018.
- [20] G. Reina, J. M. González-Domínguez, A. Criado, E. Vázquez, A. Bianco, and M. Prato, “Promises, facts and challenges for graphene in biomedical applications,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 46, no. 15, pp. 4400–4416, 2017.
- [21] X. Guo and N. Mei, “Assessment of the toxic potential of graphene family nanomaterials,” *J. Food Drug Anal.*, vol. 22, no. 1, pp. 105–115, 2014.
- [22] L. Ou *et al.*, “Toxicity of graphene-family nanoparticles: A general review of the origins and mechanisms,” *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 13, no. 1, 2016.

- [23] D. Janczak, “Opracowanie technologii wytwarzania kompozytów polimerowych z nanopłatkami grafenowymi do zastosowań w elektronice drukowanej,” Politechnika Warszawska, 2015.
- [24] J. A. Jaleel, S. Sruthi, and K. Pramod, “Reinforcing nanomedicine using graphene family nanomaterials,” *J. Control. Release*, vol. 255, pp. 218–230, 2017.
- [25] E. Abbasi, A. Akbarzadeh, M. Kouhi, and M. Milani, “Graphene: Synthesis, bio-applications, and properties,” *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 44, no. 1, pp. 150–156, 2016.
- [26] F. Schedin *et al.*, “Detection of individual gas molecules adsorbed on graphene,” *Nat. Mater.*, vol. 6, no. 9, pp. 652–655, Sep. 2007.
- [27] A. A. Balandin *et al.*, “Superior Thermal Conductivity of Single-Layer Graphene,” *Nano Lett.*, vol. 8, no. 3, pp. 902–907, Mar. 2008.
- [28] C. Lee, X. Wei, J. W. Kysar, and J. Hone, “Measurement of the Elastic Properties and Intrinsic Strength of Monolayer Graphene,” *Science (80-. )*, vol. 321, no. 5887, pp. 385–388, Jul. 2008.
- [29] A. Bianco *et al.*, “All in the graphene family - A recommended nomenclature for two-dimensional carbon materials,” *Carbon N. Y.*, vol. 65, pp. 1–6, 2013.
- [30] N. Chatterjee, J. S. Yang, K. Park, S. M. Oh, J. Park, and J. Choi, “Screening of toxic potential of graphene family nanomaterials using in vitro and alternative in vivo toxicity testing systems,” *Environ. Health Toxicol.*, vol. 30, p. e2015007, 2015.
- [31] Z. Singh, “Applications and toxicity of graphene family nanomaterials and their composites,” *Nanotechnol. Sci. Appl.*, vol. 9, pp. 15–28, 2016.
- [32] P. Cataldi, A. Athanassiou, and I. Bayer, “Graphene Nanoplatelets-Based Advanced Materials and Recent Progress in Sustainable Applications,” *Appl. Sci.*, vol. 8, no. 9, p. 1438, 2018.
- [33] S. Kumar and K. Chatterjee, “Comprehensive Review on the Use of Graphene-Based Substrates for Regenerative Medicine and Biomedical Devices,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 8, no. 40, pp. 26431–26457, 2016.

- [34] L. Huang, Y. Huang, J. Liang, X. Wan, and Y. Chen, "Graphene-based conducting inks for direct inkjet printing of flexible conductive patterns and their applications in electric circuits and chemical sensors," *Nano Res.*, vol. 4, no. 7, pp. 675–684, 2011.
- [35] T. Le, V. Lakafosis, Z. Lin, C. P. Wong, and M. M. Tentzeris, "Inkjet-printed graphene-based wireless gas sensor modules," *Proc. - Electron. Components Technol. Conf.*, pp. 1003–1008, 2012.
- [36] F. J. Tölle, M. Fabritius, and R. Mülhaupt, "Emulsifier-free graphene dispersions with high graphene content for printed electronics and freestanding graphene films," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 22, no. 6, pp. 1136–1144, 2012.
- [37] F. Torrasi *et al.*, "Inkjet-Printed Graphene Electronics," *ACS Nano*, vol. 6, no. 4, pp. 2992–3006, 2012.
- [38] W. Yang and C. Wang, "Graphene and the related conductive inks for flexible electronics," *J. Mater. Chem. C*, vol. 4, no. 30, pp. 7193–7207, 2016.
- [39] E. B. Secor *et al.*, "Enhanced Conductivity, Adhesion, and Environmental Stability of Printed Graphene Inks with Nitrocellulose," *Chem. Mater.*, vol. 29, no. 5, pp. 2332–2340, 2017.
- [40] J. Li, F. Ye, S. Vaziri, M. Muhammed, M. C. Lemme, and M. Östling, "Efficient inkjet printing of graphene," *Adv. Mater.*, vol. 25, no. 29, pp. 3985–3992, 2013.
- [41] E. B. Secor, P. L. Prabhumirashi, K. Puntambekar, M. L. Geier, and M. C. Hersam, "Inkjet printing of high conductivity, flexible graphene patterns," *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 4, no. 8, pp. 1347–1351, 2013.
- [42] L. Li *et al.*, "High-Performance Solid-State Supercapacitors and Microsupercapacitors Derived from Printable Graphene Inks," *Adv. Energy Mater.*, vol. 6, no. 20, pp. 1–8, 2016.
- [43] W. Qin, F. Vautard, L. T. Drzal, and J. Yu, "Mechanical and electrical properties of carbon fiber composites with incorporation of graphene nanoplatelets at the fiber–matrix interphase," *Compos. Part B Eng.*, vol. 69, pp. 335–341, Feb. 2015.
- [44] Y. Zhang *et al.*, "Cytotoxicity Effects of Graphene and Single-Wall Carbon Nanotubes in Neural Phaeochromocytoma-Derived PC12 Cells," *ACS Nano*, vol. 4, no. 6, pp. 3181–3186, Jun. 2010.

- [45] G. Wróblewski, “Transparentne elektrody kompozytowe nanoszone techniką powlekania natryskowego,” 2015.
- [46] N. R. Council, *Materials Science and Engineering for the 1990s*. Washington, D.C.: National Academies Press, 1989.
- [47] S. Syama and P. V. Mohanan, “Safety and biocompatibility of graphene: A new generation nanomaterial for biomedical application,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 86, pp. 546–555, 2016.
- [48] X. Wu, S. J. Ding, K. Lin, and J. Su, “A review on the biocompatibility and potential applications of graphene in inducing cell differentiation and tissue regeneration,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 5, no. 17, pp. 3084–3102, 2017.
- [49] B. Zhang, Y. Wang, and G. Zhai, “Biomedical applications of the graphene-based materials,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 61, pp. 953–964, 2016.
- [50] Y. Chang *et al.*, “In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells,” *Toxicol. Lett.*, vol. 200, no. 3, pp. 201–210, Feb. 2011.
- [51] K. Kandiah, P. Muthusamy, S. Mohan, and R. Venkatachalam, “TiO<sub>2</sub>-graphene nanocomposites for enhanced osteocalcin induction,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 38, no. 1, pp. 252–262, 2014.
- [52] K. Wang *et al.*, “Biocompatibility of Graphene Oxide,” *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 6, no. 1, p. 8, Dec. 2011.
- [53] S. Publication Details Sayyar *et al.*, “Processable conducting graphene/chitosan hydrogels for tissue engineering,” 2015.
- [54] S. Dinescu *et al.*, “In vitro cytocompatibility evaluation of chitosan/graphene oxide 3D scaffold composites designed for bone tissue engineering,” *Biomed. Mater. Eng.*, vol. 24, no. 6, pp. 2249–2256, Jan. 2014.
- [55] E.-J. Park *et al.*, “Toxic response of graphene nanoplatelets in vivo and in vitro,” *Arch. Toxicol.*, vol. 89, no. 9, pp. 1557–1568, Sep. 2015.
- [56] C. Cheng, S. Li, A. Thomas, N. A. Kotov, and R. Haag, “Functional Graphene Nanomaterials Based Architectures: Biointeractions, Fabrications, and Emerging Biological Applications,” *Chem. Rev.*, vol. 117, no. 3, pp. 1826–1914, 2017.

- [57] A. Blaeser, D. F. Duarte Campos, U. Puster, W. Richtering, M. M. Stevens, and H. Fischer, "Controlling Shear Stress in 3D Bioprinting is a Key Factor to Balance Printing Resolution and Stem Cell Integrity," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 5, no. 3, pp. 326–333, 2016.
- [58] W. C. Lee *et al.*, "Origin of Enhanced Stem Cell Growth and Differentiation on Graphene and Graphene Oxide," *ACS Nano*, vol. 5, no. 9, pp. 7334–7341, Sep. 2011.
- [59] S. Y. Park *et al.*, "Enhanced Differentiation of Human Neural Stem Cells into Neurons on Graphene," *Adv. Mater.*, vol. 23, no. 36, pp. H263–H267, Sep. 2011.
- [60] G.-Y. Chen, D. W.-P. Pang, S.-M. Hwang, H.-Y. Tuan, and Y.-C. Hu, "A graphene-based platform for induced pluripotent stem cells culture and differentiation," *Biomaterials*, vol. 33, no. 2, pp. 418–427, Jan. 2012.
- [61] S. Jaworski *et al.*, "In vitro evaluation of the effects of graphene platelets on glioblastoma multiforme cells," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 8, pp. 413–20, 2013.
- [62] A. B. Seabra, A. J. Paula, R. De Lima, O. L. Alves, and N. Durán, "Nanotoxicity of graphene and graphene oxide," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 27, no. 2, pp. 159–168, 2014.
- [63] E. Zanni *et al.*, "Graphite Nanoplatelets and *Caenorhabditis elegans* : Insights from an *in Vivo* Model," *Nano Lett.*, vol. 12, no. 6, pp. 2740–2744, Jun. 2012.
- [64] J. Żwawiak and L. Zaprutko, "Pharmaceutical applications of graphene.," *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)*, vol. 71, no. 0, pp. 129–136, Feb. 2017.
- [65] K. Yang, J. Wan, S. Zhang, Y. Zhang, S.-T. Lee, and Z. Liu, "In Vivo Pharmacokinetics, Long-Term Biodistribution, and Toxicology of PEGylated Graphene in Mice," *ACS Nano*, vol. 5, no. 1, pp. 516–522, Jan. 2011.
- [66] G. Gollavelli and Y.-C. Ling, "Multi-functional graphene as an in vitro and in vivo imaging probe," *Biomaterials*, vol. 33, no. 8, pp. 2532–2545, Mar. 2012.
- [67] C. Shan, H. Yang, D. Han, Q. Zhang, A. Ivaska, and L. Niu, "Water-Soluble Graphene Covalently Functionalized by Biocompatible Poly- l -lysine," *Langmuir*, vol. 25, no. 20, pp. 12030–12033, Oct. 2009.
- [68] C. Shan *et al.*, "Polyethyleneimine-functionalized graphene and its layer-by-layer assembly with Prussian blue," 2013.



- [69] Z. Liu, J. T. Robinson, X. Sun, and H. Dai, "PEGylated Nanographene Oxide for Delivery of Water-Insoluble Cancer Drugs," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, no. 33, pp. 10876–10877, Aug. 2008.
- [70] S. Faghihi, M. Gheysour, A. Karimi, and R. Salarian, "Fabrication and mechanical characterization of graphene oxide-reinforced poly (acrylic acid)/gelatin composite hydrogels," *J. Appl. Phys.*, vol. 115, no. 8, p. 083513, Feb. 2014.
- [71] K. Liu, J. J. Zhang, F. F. Cheng, T. T. Zheng, C. Wang, and J. J. Zhu, "Green and facile synthesis of highly biocompatible graphene nanosheets and its application for cellular imaging and drug delivery," *J. Mater. Chem.*, vol. 21, no. 32, pp. 12034–12040, 2011.
- [72] K. Yang, J. Wan, S. Zhang, Y. Zhang, S.-T. Lee, and Z. Liu, "In Vivo Pharmacokinetics, Long-Term Biodistribution, and Toxicology of PEGylated Graphene in Mice," *ACS Nano*, vol. 5, no. 1, pp. 516–522, Jan. 2011.
- [73] M. Wojtoniszak *et al.*, "Synthesis, dispersion, and cytocompatibility of graphene oxide and reduced graphene oxide," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 89, no. 1, pp. 79–85, 2012.
- [74] N. Dubey, R. Bentini, I. Islam, T. Cao, A. H. Castro Neto, and V. Rosa, "Graphene: A Versatile Carbon-Based Material for Bone Tissue Engineering," *Stem Cells Int.*, vol. 2015, pp. 18–23, 2015.
- [75] H. Chen, M. B. Müller, K. J. Gilmore, G. G. Wallace, and D. Li, "Mechanically Strong, Electrically Conductive, and Biocompatible Graphene Paper," *Adv. Mater.*, vol. 20, no. 18, pp. 3557–3561, Jul. 2008.
- [76] S. Y. Park *et al.*, "Enhanced differentiation of human neural stem cells into neurons on graphene," *Adv. Mater.*, vol. 23, no. 36, pp. 263–267, 2011.
- [77] M. Tang, Q. Song, N. Li, Z. Jiang, R. Huang, and G. Cheng, "Enhancement of electrical signaling in neural networks on graphene films," *Biomaterials*, vol. 34, no. 27, pp. 6402–6411, Sep. 2013.
- [78] T. R. Nayak *et al.*, "Graphene for Controlled and Accelerated Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells," *ACS Nano*, vol. 5, no. 6, pp. 4670–4678, Jun. 2011.

- [79] O. Akhavan, E. Ghaderi, and M. Shahsavari, "Graphene nanogrids for selective and fast osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells," *Carbon N. Y.*, vol. 59, pp. 200–211, Aug. 2013.
- [80] J. Lu *et al.*, "Self-Supporting Graphene Hydrogel Film as an Experimental Platform to Evaluate the Potential of Graphene for Bone Regeneration," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 23, no. 28, pp. 3494–3502, Jul. 2013.
- [81] A. Sahu, W. Il Choi, and G. Tae, "A stimuli-sensitive injectable graphene oxide composite hydrogel," *Chem. Commun.*, vol. 48, no. 44, pp. 5820–5822, 2012.
- [82] Ł. Bojko and A. M. Ryniewicz, "Wykorzystanie grafenu w medycynie: studium literaturowe," *Probl. Nauk Stosow.*, vol. T. 3, 2015.
- [83] J. Liu, L. Cui, and D. Losic, "Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications," *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 12, pp. 9243–9257, Dec. 2013.
- [84] X. Yang, X. Zhang, Z. Liu, Y. Ma, Y. Huang, and Y. Chen, "High-Efficiency Loading and Controlled Release of Doxorubicin Hydrochloride on Graphene Oxide," *J. Phys. Chem. C*, vol. 112, no. 45, pp. 17554–17558, Nov. 2008.
- [85] T. Zhou, X. Zhou, and D. Xing, "Controlled release of doxorubicin from graphene oxide based charge-reversal nanocarrier," *Biomaterials*, vol. 35, no. 13, pp. 4185–4194, Apr. 2014.
- [86] L. Zhang, J. Xia, Q. Zhao, L. Liu, and Z. Zhang, "Functional Graphene Oxide as a Nanocarrier for Controlled Loading and Targeted Delivery of Mixed Anticancer Drugs," *Small*, vol. 6, no. 4, pp. 537–544, Feb. 2010.
- [87] J.-P. Chen *et al.*, "Improving thermal stability and efficacy of BCNU in treating glioma cells using PAA-functionalized graphene oxide," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, p. 1737, Mar. 2012.
- [88] H. Zhang, S. Mardiyani, W. C. W. Chan, and E. Kumacheva, "Design of Biocompatible Chitosan Microgels for Targeted pH-Mediated Intracellular Release of Cancer Therapeutics," *Biomacromolecules*, vol. 7, no. 5, pp. 1568–1572, May 2006.
- [89] S. S. Nanda, G. C. Papaefthymiou, and D. K. Yi, "Functionalization of Graphene Oxide and its Biomedical Applications," *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.*, vol. 40, no. 5, pp. 291–315, Sep. 2015.

- [90] W. Hu *et al.*, “Graphene-Based Antibacterial Paper,” *ACS Nano*, vol. 4, no. 7, pp. 4317–4323, Jul. 2010.
- [91] O. Akhavan and E. Ghaderi, “Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria,” *ACS Nano*, vol. 4, no. 10, pp. 5731–5736, 2010.
- [92] S. Gurunathan, J. Woong Han, A. Abdal Daye, V. Eppakayala, and J. Kim, “Oxidative stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and reduced graphene oxide in *Pseudomonas aeruginosa*,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, p. 5901, Nov. 2012.
- [93] I. Barbolina, C. R. Woods, N. Lozano, K. Kostarelos, K. S. Novoselov, and I. S. Roberts, “Purity of graphene oxide determines its antibacterial activity,” vol. 3, p. 25025, 2016.
- [94] Y. Tu *et al.*, “Destructive extraction of phospholipids from *Escherichia coli* membranes by graphene nanosheets,” *Nat. Nanotechnol.*, vol. 8, no. 8, pp. 594–601, Aug. 2013.
- [95] F. Perreault, A. F. de Faria, S. Nejati, and M. Elimelech, “Antimicrobial Properties of Graphene Oxide Nanosheets: Why Size Matters,” *ACS Nano*, vol. 9, no. 7, pp. 7226–7236, Jul. 2015.
- [96] S. Liu *et al.*, “Antibacterial Activity of Graphite, Graphite Oxide, Graphene Oxide, and Reduced Graphene Oxide: Membrane and Oxidative Stress,” *ACS Nano*, vol. 5, no. 9, pp. 6971–6980, Sep. 2011.
- [97] O. Akhavan, E. Ghaderi, and A. Esfandiar, “Wrapping Bacteria by Graphene Nanosheets for Isolation from Environment, Reactivation by Sonication, and Inactivation by Near-Infrared Irradiation,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 115, no. 19, pp. 6279–6288, May 2011.
- [98] S. Liu *et al.*, “Lateral Dimension-Dependent Antibacterial Activity of Graphene Oxide Sheets,” *Langmuir*, vol. 28, no. 33, pp. 12364–12372, Aug. 2012.
- [99] L. Hui *et al.*, “Availability of the Basal Planes of Graphene Oxide Determines Whether It Is Antibacterial,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, no. 15, pp. 13183–13190, Aug. 2014.
- [100] J. D. Mangadlao, C. M. Santos, M. J. L. Felipe, A. C. C. de Leon, D. F. Rodrigues, and R. C. Advincula, “On the antibacterial mechanism of graphene oxide (GO) Langmuir–Blodgett films,” *Chem. Commun.*, vol. 51, no. 14, pp. 2886–2889, Feb. 2015.

- [101] J. Li *et al.*, “Antibacterial activity of large-area monolayer graphene film manipulated by charge transfer,” *Sci. Rep.*, vol. 4, 2014.
- [102] B. Lu *et al.*, “Graphene-based composite materials beneficial to wound healing,” *Nanoscale*, vol. 4, no. 9, p. 2978, Apr. 2012.
- [103] A. Atala, “Engineering organs,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 20, no. 5, pp. 575–592, Oct. 2009.
- [104] M. S. Chapekar, “Tissue engineering: challenges and opportunities,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 53, no. 6, pp. 617–20, 2000.
- [105] F. Marga, A. Neagu, I. Kosztin, and G. Forgacs, “Developmental biology and tissue engineering,” *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.*, vol. 81, no. 4, pp. 320–328, Dec. 2007.
- [106] D. Depan, B. Girase, J. S. Shah, and R. D. K. Misra, “Structure–process–property relationship of the polar graphene oxide-mediated cellular response and stimulated growth of osteoblasts on hybrid chitosan network structure nanocomposite scaffolds,” *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 9, pp. 3432–3445, Sep. 2011.
- [107] Y. Zhang, T. R. Nayak, H. Hong, and W. Cai, “Graphene: a versatile nanoplatform for biomedical applications,” *Nanoscale*, vol. 4, no. 13, p. 3833, Jul. 2012.
- [108] Y. Wang *et al.*, “Fluorinated Graphene for Promoting Neuro-Induction of Stem Cells,” *Adv. Mater.*, vol. 24, no. 31, pp. 4285–4290, Aug. 2012.
- [109] C. Wang *et al.*, “Fabrication of reactive pigment composite particles for blue-light curable inkjet printing of textiles,” *RSC Adv.*, vol. 7, no. 57, pp. 36175–36184, 2017.
- [110] S. H. Ku and C. B. Park, “Myoblast differentiation on graphene oxide,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 8, pp. 2017–2023, Mar. 2013.
- [111] R. Jayakumar, M. Prabakaran, P. T. Sudheesh Kumar, S. V. Nair, and H. Tamura, “Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 29, no. 3, pp. 322–337, May 2011.
- [112] Y. Zhang, T. R. Nayak, H. Hong, and W. Cai, “Graphene: a versatile nanoplatform for biomedical applications,” *Nanoscale*, vol. 4, no. 13, p. 3833, Jul. 2012.

- [113] T. R. Nayak *et al.*, “Graphene for Controlled and Accelerated Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells,” *ACS Nano*, vol. 5, no. 6, pp. 4670–4678, Jun. 2011.
- [114] J. Kim *et al.*, “Bioactive effects of graphene oxide cell culture substratum on structure and function of human adipose-derived stem cells,” *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 101, no. 12, pp. 3520–3530, 2013.
- [115] S. Catros, B. Guillotin, M. Bačáková, J. C. Fricain, and F. Guillemot, “Effect of laser energy, substrate film thickness and bioink viscosity on viability of endothelial cells printed by laser-assisted bioprinting,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 257, no. 12, pp. 5142–5147, 2011.
- [116] A. Skardal, J. Zhang, and G. D. Prestwich, “Bioprinting vessel-like constructs using hyaluronan hydrogels crosslinked with tetrahedral polyethylene glycol tetracrylates,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 24, pp. 6173–6181, 2010.
- [117] W. L. Ng, J. M. Lee, W. Y. Yeong, and M. Win Naing, “Microvalve-based bioprinting – process, bio-inks and applications,” *Biomater. Sci.*, vol. 5, no. 4, pp. 632–647, 2017.
- [118] C. Cheng *et al.*, “A Water-Processable and Bioactive Multivalent Graphene Nanoink for Highly Flexible Bioelectronic Films and Nanofibers,” *Adv. Mater.*, vol. 30, no. 5, 2018.
- [119] C. Ferris, “Bio-inks for drop-on-demand cell printing,” 2013.
- [120] C. L. Lee, C. H. Chen, and C. W. Chen, “Graphene nanosheets as ink particles for inkjet printing on flexible board,” *Chem. Eng. J.*, vol. 230, pp. 296–302, 2013.
- [121] J. Wang *et al.*, “Flexible, transparent, and conductive defrosting glass,” *Thin Solid Films*, vol. 556, pp. 13–17, 2014.
- [122] K. Y. Shin, J. Y. Hong, and J. Jang, “Micropatterning of graphene sheets by inkjet printing and its wideband dipole-antenna application,” *Adv. Mater.*, vol. 23, no. 18, pp. 2113–2118, 2011.
- [123] L. T. Le, M. H. Ervin, H. Qiu, B. E. Fuchs, and W. Y. Lee, “Graphene supercapacitor electrodes fabricated by inkjet printing and thermal reduction of graphene oxide,” *Electrochem. commun.*, vol. 13, no. 4, pp. 355–358, 2011.

- [124] V. Dua *et al.*, “All-organic vapor sensor using inkjet-printed reduced graphene oxide,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 49, no. 12, pp. 2154–2157, 2010.
- [125] L. Zhang *et al.*, “Inkjet printing high-resolution, large-area graphene patterns by coffee-ring lithography,” *Adv. Mater.*, vol. 24, no. 3, pp. 436–440, 2012.
- [126] Y. K. Kim, J. A. Park, W. H. Yoon, J. Kim, and S. Jung, “Drop-on-demand inkjet-based cell printing with 30- $\mu$ m nozzle diameter for cell-level accuracy,” *Biomicrofluidics*, vol. 10, no. 6, 2016.
- [127] S. Parsa, M. Gupta, F. Loizeau, and K. C. Cheung, “Effects of surfactant and gentle agitation on inkjet dispensing of living cells,” *Biofabrication*, vol. 2, no. 2, 2010.
- [128] D. Chahal, A. Ahmadi, and K. C. Cheung, “Improving piezoelectric cell printing accuracy and reliability through neutral buoyancy of suspensions,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 109, no. 11, pp. 2932–2940, 2012.
- [129] C. Xu, M. Zhang, Y. Huang, A. Ogale, J. Fu, and R. R. Markwald, “Study of droplet formation process during drop-on-demand inkjetting of living cell-laden bioink,” *Langmuir*, vol. 30, no. 30, pp. 9130–9138, 2014.
- [130] H. Li, S. Liu, and L. Lin, “Rheological study on 3D printability of alginate hydrogel and effect of graphene oxide,” *Int. J. Bioprinting*, vol. 2, no. 2, pp. 10–12, 2016.
- [131] A. E. Jakus, E. B. Secor, A. L. Rutz, S. W. Jordan, M. C. Hersam, and R. N. Shah, “Three-dimensional printing of high-content graphene scaffolds for electronic and biomedical applications,” *ACS Nano*, vol. 9, no. 4, pp. 4636–4648, 2015.
- [132] M. Kalbacova, A. Broz, J. Kong, and M. Kalbac, “Graphene substrates promote adherence of human osteoblasts and mesenchymal stromal cells,” *Carbon N. Y.*, vol. 48, no. 15, pp. 4323–4329, Dec. 2010.
- [133] K. Lu, R. Lago, Y. Chen, M. Green, P. Harris, and S. Tsang, “Mechanical damage of carbon nanotubes ultrasound,” *Carbon N. Y.*, vol. 34, no. 6, 1996.
- [134] D. Janczak *et al.*, “Screen-Printed Resistive Pressure Sensors Containing Graphene Nanoplatelets and Carbon Nanotubes,” *Sensors*, vol. 14, no. 9, pp. 17304–17312, Sep. 2014.

- [135] “Myjka ultradźwiękowa.” [Online]. Available: <http://intersonic.pl/myjnia-is-1k>. [Accessed: 26-Oct-2018].
- [136] I. Lauria *et al.*, “Inkjet printed periodical micropatterns made of inert alumina ceramics induce contact guidance and stimulate osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells,” *Acta Biomater.*, vol. 44, pp. 85–96, 2016.
- [137] M. Choi *et al.*, “Multilayer Nanofilms via Inkjet Printing for Stabilizing Growth Factor and Designing Desired Cell Developments,” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 6, no. 14, p. 1700216, Jul. 2017.
- [138] F. Arduini *et al.*, “Screen-printed biosensor modified with carbon black nanoparticles for the determination of paraoxon based on the inhibition of butyrylcholinesterase,” *Microchim. Acta*, vol. 182, no. 3–4, pp. 643–651, Feb. 2015.
- [139] V. Scognamiglio, “Nanotechnology in glucose monitoring: Advances and challenges in the last 10 years,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 47, pp. 12–25, Sep. 2013.
- [140] F. Arduini *et al.*, “Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 79, pp. 114–126, 2016.
- [141] R. Podila, T. Moore, F. Alexis, and A. Rao, “Graphene Coatings for Biomedical Implants,” *J. Vis. Exp.*, no. 73, pp. 1–9, 2013.
- [142] M. Wawrzyńska *et al.*, “Biocompatible Carbon-Based Coating as Potential Endovascular Material for Stent Surface,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2018, pp. 1–10, 2018.
- [143] B. Derby, “Inkjet Printing of Functional and Structural Materials: Fluid Property Requirements, Feature Stability, and Resolution,” *Annu. Rev. Mater. Res.*, vol. 40, no. 1, pp. 395–414, 2010.
- [144] M. wei He, L. ling Sun, K. yuan Hu, Y. long Zhu, and H. ning Chen, “Analysis of DoD inkjet printhead performance for printable electronics fabrication using dynamic lumped element modeling and swarm intelligence based optimal prediction,” *J. Cent. South Univ.*, vol. 22, no. 10, pp. 3925–3934, 2015.
- [145] H. Lei, J. A. Payne, A. V. McCormick, L. F. Francis, W. W. Gerberich, and L. E. Scriven, “Stress development in drying coatings,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 81, no. 4, pp. 1000–1013, Jul. 2001.

- [146] H. P. Blandin, J. C. David, J. M. Vergnaud, J. P. Illien, and M. Malizewicz, “Modelling of drying of coatings: Effect of the thickness, temperature and concentration of solvent,” *Prog. Org. Coatings*, vol. 15, no. 2, pp. 163–172, Jun. 1987.
- [147] **L. Dybowska-Sarapuk**, “Reologia past i tuszy - praca magisterska.” 2014.
- [148] K. Wilczyński, *Reologia w przetwórstwie tworzyw sztucznych*. 2001.
- [149] G. Schramm, *Reologia : podstawy i zastosowania*. Ośrodek Wydawnictw Naukowych PAN, 1998.
- [150] “Laboratorium Zaawansowanych Technik Pomiarów Geometrycznych Profilometr Stykowy.” [Online]. Available: <http://pomiar.edu.pl/pomiary/maszyny/form-talysurf-pgi-830/>. [Accessed: 23-Oct-2018].
- [151] S. W. Russell *et al.*, “Enhanced adhesion of copper to dielectrics via titanium and chromium additions and sacrificial reactions,” *Thin Solid Films*, vol. 262, no. 1–2, pp. 154–167, 1995.
- [152] D. G. Fisher and R. C. Rowe, “The adhesion of film coatings to tablet surfaces— instrumentation and preliminary evaluation,” *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 28, no. 12, pp. 886–889, 1976.
- [153] S.-J. Huang *et al.*, “Adipose-Derived Stem Cells: Isolation, Characterization, and Differentiation Potential,” *Cell Transplant.*, vol. 22, no. 4, pp. 701–709, Apr. 2013.
- [154] R. S. Mahla, “Stem Cells Applications in Regenerative Medicine and Disease Therapeutics.,” *Int. J. Cell Biol.*, vol. 2016, p. 6940283, 2016.
- [155] **L. Dybowska-Sarapuk** *et al.*, “Aqueous biological graphene based formulations for ink-jet printing,” *Polish J. Chem. Technol.*, vol. 18, no. 2, pp. 46–52, 2016.
- [156] F.-J. Lv, R. S. Tuan, K. M. C. Cheung, and V. Y. L. Leung, “Concise Review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells,” *Stem Cells*, vol. 32, no. 6, pp. 1408–1419, Jun. 2014.
- [157] H. Gu, S. W. Lee, S. L. Buffington, J. H. Henderson, and D. Ren, “On-Demand Removal of Bacterial Biofilms via Shape Memory Activation.,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 8, no. 33, pp. 21140–4, Aug. 2016.



- [158] N. Rabin, Y. Zheng, C. Opoku-Temeng, Y. Du, E. Bonsu, and H. O. Sintim, “Agents that inhibit bacterial biofilm formation,” *Future Med. Chem.*, vol. 7, no. 5, pp. 647–671, Apr. 2015.
- [159] **L. Dybowska-Sarapuk et al.**, “Graphene nanolayers as a new method for bacterial biofilm prevention: Preliminary results,” *J. AOAC Int.*, vol. 100, no. 4, pp. 900–904, 2017.
- [160] **L. Dybowska-Sarapuk et al.**, “Antibacterial activity of graphene layers,” in *Proc. SPIE. 10031, Photonics Applications in Astronomy, Communications, Industry, and High-Energy Physics Experiments 2016*, 2016, p. 100310G.
- [161] S. El, S. Koraichi, H. Latrache, and F. Hamadi, “Scanning Electron Microscopy (SEM) and Environmental SEM: Suitable Tools for Study of Adhesion Stage and Biofilm Formation,” in *Scanning Electron Microscopy*, InTech, 2012.
- [162] G. M. P. A. Camargo, A. C. Pizzolitto, and E. L. Pizzolitto, “Biofilm formation on catheters used after cesarean section as observed by scanning electron microscopy,” *Int. J. Gynecol. Obstet.*, vol. 90, no. 2, pp. 148–149, Aug. 2005.
- [163] K. K. Akerman, I. Kuronen, and E. O. Kajander, “Scanning electron microscopy of nanobacteria - Novel biofilm producing organisms in blood,” *Scanning*, vol. 15, 1993.
- [164] P. Allan-Wojtas, L. Truelstrup Hansen, and A. T. Paulson, “Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 41, no. 1, pp. 101–108, Jan. 2008.
- [165] Aleksandra Najmowicz, “Badanie antybakteryjnych właściwości nanopłatków grafenowych dekorowanych nanocząsteczkami srebra,” Politechnika Warszawska, 2017.
- [166] P. Shin, J. Sung, and M. H. Lee, “Control of droplet formation for low viscosity fluid by double waveforms applied to a piezoelectric inkjet nozzle,” *Microelectron. Reliab.*, vol. 51, no. 4, pp. 797–804, 2011.
- [167] H. Dong, W. W. Carr, and J. F. Morris, “An experimental study of drop-on-demand drop formation,” *Phys. Fluids*, vol. 18, no. 7, 2006.

- [168] M. Nelo, A. Sowpati, V. K. Palukuru, J. Juuti, and H. Jantunen, "FORMULATION OF SCREEN PRINTABLE COBALT NANOPARTICLE INK FOR HIGH FREQUENCY APPLICATIONS," *Prog. Electromagn. Res.*, vol. 110, pp. 253–266, 2010.
- [169] M. J. i J. S. Praca zbiorowa pod redakcją, *Drukowana elektronika w Polsce*. 2010.
- [170] H. M. Nur, J. H. Song, J. R. G. Evans, and M. J. Edirisinghe, "Ink-jet printing of gold conductive tracks," *J. Mater. Sci. Mater. Electron.*, vol. 13, no. 4, pp. 213–219, 2002.
- [171] J. Perelaer, B. J. De Gans, and U. S. Schubert, "Ink-jet printing and microwave sintering of conductive silver tracks," *Adv. Mater.*, vol. 18, no. 16, pp. 2101–2104, 2006.
- [172] P. J. Smith, D. Y. Shin, J. E. Stringer, B. Derby, and N. Reis, "Direct ink-jet printing and low temperature conversion of conductive silver patterns," in *Journal of Materials Science*, 2006, vol. 41, no. 13, pp. 4153–4158.
- [173] S. Magdassi, A. Bassa, Y. Vinetsky, and A. Kamyshny, "Silver nanoparticles as pigments for water-based ink-jet inks," *Chem. Mater.*, vol. 15, no. 11, pp. 2208–2217, 2003.
- [174] B. K. Park, D. Kim, S. Jeong, J. Moon, and J. S. Kim, "Direct writing of copper conductive patterns by ink-jet printing," *Thin Solid Films*, vol. 515, no. 19 SPEC. ISS., pp. 7706–7711, 2007.
- [175] P. Beecher *et al.*, "Ink-jet printing of carbon nanotube thin film transistors," *J. Appl. Phys.*, vol. 102, no. 4, 2007.
- [176] J. W. Song, Y. H. Yoon, J. Kim, C. S. Han, B. S. Choi, and J. H. Kim, "Direct fabrication and patterning of transparent conductive carbon nanotube film using inkjet printing," in *Digest of Technical Papers - SID International Symposium*, 2007, vol. 38, no. 2, pp. 1613–1616.
- [177] A. Denneulin, J. Bras, A. Blayo, B. Khelifi, F. Roussel-Dherbey, and C. Neuman, "The influence of carbon nanotubes in inkjet printing of conductive polymer suspensions," *Nanotechnology*, vol. 20, no. 38, 2009.
- [178] M. Mionić, K. Pataky, R. Gaal, A. Magrez, J. Brugger, and L. Forró, "Carbon nanotubes–SU8 composite for flexible conductive inkjet printable applications," *J. Mater. Chem.*, vol. 22, no. 28, p. 14030, 2012.

- [179] D. Lahiri *et al.*, “Graphene nanoplatelet-induced strengthening of ultrahigh molecular weight polyethylene and biocompatibility in vitro,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 4, no. 4, pp. 2234–2241, 2012.
- [180] **L. Dybowska-Sarapuk**, J. Szałapak, G. Wróblewski, I. Wyzkiewicz, M. Słoma, and M. Jakubowska, “Rheology of inks for various techniques of printed electronics,” Springer, Cham, 2016, pp. 447–451.
- [181] T. H. J. van Osch, J. Perelaer, A. W. M. de Laat, and U. S. Schubert, “Inkjet Printing of Narrow Conductive Tracks on Untreated Polymeric Substrates,” *Adv. Mater.*, vol. 20, no. 2, pp. 343–345, Jan. 2008.
- [182] J. H. Y. Chung *et al.*, “Bio-ink properties and printability for extrusion printing living cells,” *Biomater. Sci.*, vol. 1, no. 7, p. 763, Jun. 2013.
- [183] S. R. Shin *et al.*, “A Bioactive Carbon Nanotube-Based Ink for Printing 2D and 3D Flexible Electronics,” *Adv. Mater.*, vol. 28, no. 17, pp. 3280–3289, 2016.
- [184] A. Kamyshny, “Metal-based Inkjet Inks for Printed Electronics,” *Open Appl. Phys. J.*, vol. 4, no. 1, pp. 19–36, 2011.
- [185] S. Meng, “Nerve cell differentiation using constant and programmed electrical stimulation through conductive non-functional graphene nanosheets film,” *Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 11, no. 4, pp. 274–283, 2014.
- [186] J. K. Carrow and A. K. Gaharwar, “Bioinspired polymeric nanocomposites for regenerative medicine,” *Macromol. Chem. Phys.*, vol. 216, no. 3, pp. 248–264, 2015.
- [187] H. Fan *et al.*, “Fabrication, mechanical properties, and biocompatibility of graphene-reinforced chitosan composites,” *Biomacromolecules*, vol. 11, no. 9, pp. 2345–2351, 2010.
- [188] Y. Talukdar, J. T. Rashkow, G. Lalwani, S. Kanakia, and B. Sitharaman, “The effects of graphene nanostructures on mesenchymal stem cells,” *Biomaterials*, vol. 35, no. 18, pp. 4863–4877, 2014.
- [189] D. Gamota, P. Brazis, K. Kalyanasundaram, and J. Zhang, *Printed Organic and Molecular Electronics Printed Organic and*. 2004.

- [190] **L. Dybowska-Sarapuk** *et al.*, “Efficient Inkjet Printing of Graphene-Based Elements: Influence of Dispersing Agent on Ink Viscosity,” *Nanomater. (Basel, Switzerland)*, vol. 8, no. 8, Aug. 2018.
- [191] D. Chemicals, “DuPont™ Capstone® FS-3100 DuPont™ Capstone® Repellents and Surfactants,” 2010.
- [192] “MALIALIM™ series.” [Online]. Available: [https://www.nofamerica.com/store/index.php?dispatch=categories.view&category\\_id=131](https://www.nofamerica.com/store/index.php?dispatch=categories.view&category_id=131). [Accessed: 13-Oct-2018].
- [193] F. W. Holtsberg, C. M. Ensor, M. R. Steiner, J. S. Bomalaski, and M. A. Clark, “Poly(ethylene glycol) (PEG) conjugated arginine deiminase: effects of PEG formulations on its pharmacological properties.,” *J. Control. Release*, vol. 80, no. 1–3, pp. 259–71, Apr. 2002.
- [194] J. S. Bomalaski, F. W. Holtsberg, C. M. Ensor, and M. A. Clark, “Uricase formulated with polyethylene glycol (uricase-PEG 20): biochemical rationale and preclinical studies.,” *J. Rheumatol.*, vol. 29, no. 9, pp. 1942–9, Sep. 2002.
- [195] B. K. Mann and J. L. West, “Cell adhesion peptides alter smooth muscle cell adhesion, proliferation, migration, and matrix protein synthesis on modified surfaces and in polymer scaffolds.,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 60, no. 1, pp. 86–93, Apr. 2002.
- [196] Y. Xu *et al.*, “Inkjet-printed energy storage device using graphene/polyaniline inks,” *J. Power Sources*, vol. 248, pp. 483–488, 2014.
- [197] K. Woo, D. Jang, Y. Kim, and J. Moon, “Relationship between printability and rheological behavior of ink-jet conductive inks,” *Ceram. Int.*, vol. 39, no. 6, pp. 7015–7021, 2013.
- [198] W. L. Zhang, H. J. Choi, H. S. Ko, and K. S. Kwon, “Ink-jetting and rheological behavior of a silica particle suspension,” *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 22, pp. 120–126, 2015.
- [199] A. Araźna, K. Futera, M. Jakubowska, and **L. Dybowska-Sarapuk**, “Investigation of treated PEN foil surface properties for inkjet application,” *Solder. Surf. Mt. Technol.*, vol. 27, no. 3, pp. 108–111, Jun. 2015.

- [200] Z. Stempien, E. Rybicki, T. Rybicki, and J. Lesnikowski, "Inkjet-printing deposition of silver electro-conductive layers on textile substrates at low sintering temperature by using an aqueous silver ions-containing ink for textronic applications," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 224, pp. 714–725, 2015.
- [201] N. Scoutaris, M. R. Alexander, P. R. Gellert, and C. J. Roberts, "Inkjet printing as a novel medicine formulation technique," *J. Control. Release*, vol. 156, no. 2, pp. 179–185, 2011.
- [202] B. J. Tricomi, A. D. Dias, and D. T. Corr, "Stem cell bioprinting for applications in regenerative medicine," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1383, no. 1, pp. 115–124, 2016.
- [203] B.-J. de Gans, P. C. Duineveld, and U. S. Schubert, "Inkjet printing of polymers: State of the art and future developments.," *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)*, vol. 16, no. 3, pp. 203–213, 2004.
- [204] P. Calvert, "Inkjet printing for materials and devices," *Chem. Mater.*, vol. 13, no. 10, pp. 3299–3305, 2001.
- [205] E. Tekin, P. J. Smith, and U. S. Schubert, "Inkjet printing as a deposition and patterning tool for polymers and inorganic particles," *Soft Matter*, vol. 4, no. 4, pp. 703–713, 2008.
- [206] A. K. Sen and J. Darabi, "Droplet ejection performance of a monolithic thermal inkjet print headnt," *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 17, no. 2007, pp. 1420–1427, 2007.
- [207] A. B. M. Buanz, M. H. Saunders, A. W. Basit, and S. Gaisford, "Preparation of personalized-dose salbutamol sulphate oral films with thermal ink-jet printing," *Pharm. Res.*, vol. 28, no. 10, pp. 2386–2392, 2011.
- [208] L. Moroni *et al.*, "Biofabrication: A Guide to Technology and Terminology," *Trends Biotechnol.*, pp. 1–19, 2017.
- [209] A. Dziedzic and L. Golonka, *Technika grubowarstwowa i jej zastosowania. .*
- [210] W. L. Zhang, H. J. Choi, H.-S. Ko, and K.-S. Kwon, "Ink-jetting and rheological behavior of a silica particle suspension," *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 22, pp. 120–126, Feb. 2015.

- [211] P. Ihalainen, A. Määttänen, and N. Sandler, “Printing technologies for biomolecule and cell-based applications,” *Int. J. Pharm.*, 2015.
- [212] U. Caglar, *Studies of Inkjet Printing Technology with Focus on Electronic Materials*. 2009.
- [213] M. Montanino *et al.*, “Gravure-printed PEDOT:PSS on flexible PEN substrate as ITO-free anode for polymer solar cells,” *Polym. Compos.*, p. n/a-n/a, Apr. 2015.
- [214] M. Pospischil *et al.*, “Investigations of thick-film-paste rheology for dispensing applications,” in *Energy Procedia*, 2011, vol. 8, pp. 449–454.
- [215] A. Silva-Weiss, V. Bifani, M. Ihl, P. J. A. Sobral, and M. C. Gómez-Guillén, “Structural properties of films and rheology of film-forming solutions based on chitosan and chitosan-starch blend enriched with murta leaf extract,” *Food Hydrocoll.*, vol. 31, no. 2, pp. 458–466, 2013.
- [216] M. Toivakka, “NUMERICAL INVESTIGATION OF DROPLET IMPACT SPREADING IN SPRAY COATING OF PAPER.”
- [217] J. W. Nam *et al.*, “The influence of filler on the emission properties and rheology of carbon nanotube paste,” *Diam. Relat. Mater.*, vol. 14, no. 11–12, pp. 2089–2093, 2005.
- [218] H. Zhang, S. Jiang, and K. Kajiyoshi, “Control of paste rheology and piezoelectric properties of  $\text{Bi}_{0.5}(\text{Na}_{0.82}\text{K}_{0.18})_{0.5}\text{TiO}_3$  Lead-free piezoelectric thick films deposited by screen printing,” *Int. J. Appl. Ceram. Technol.*, vol. 8, no. 3, pp. 658–668, 2011.
- [219] J. Heinzl and C. H. Hertz, *Ink-Jet Printing*. 1985.
- [220] B. Derby and N. Reis, “Inkjet Printing of Highly Loaded Particulate Suspensions,” *MRS Bull.*, vol. 28, no. 11, pp. 815–818, 2003.
- [221] T. R. Tuladhar and M. R. Mackley, “Filament stretching rheometry and break-up behaviour of low viscosity polymer solutions and inkjet fluids,” *J. Nonnewton. Fluid Mech.*, vol. 148, no. 1–3, pp. 97–108, 2008.
- [222] J. R. Castrejón-Pita, G. D. Martin, S. D. Hoath, and I. M. Hutchings, “A simple large-scale droplet generator for studies of inkjet printing,” *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 79, no. 7, 2008.

- [223] J. Valli, “A review of adhesion test methods for thin hard coatings,” *J. Vac. Sci. Technol. A Vacuum, Surfaces, Film.*, vol. 4, no. 6, pp. 3007–3014, 1986.
- [224] D. Marani, C. Gadea, J. Hjelm, P. Hjalmarsson, M. Wandel, and R. Kiebach, “Influence of hydroxyl content of binders on rheological properties of cerium-gadolinium oxide (CGO) screen printing inks,” *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 35, no. 5, pp. 1495–1504, 2015.
- [225] J. Chandra, G. Zhou, and M. Ghannoum, “Fungal Biofilms and Antimycotics,” *Curr. Drug Targets*, vol. 6, no. 8, pp. 887–894, Dec. 2005.
- [226] R. Van Houdt and C. W. Michiels, “Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation,” *Res. Microbiol.*, vol. 156, no. 5–6, pp. 626–633, 2005.
- [227] M. Dade-Robertson, A. Keren-Paz, M. Zhang, and I. Kolodkin-Gal, “Architects of nature: growing buildings with bacterial biofilms.,” *Microb. Biotechnol.*, vol. 10, no. 5, pp. 1157–1163, 2017.
- [228] K. Czaczyk and K. Myszka, “Mechanizmy warunkujące oporność biofilmów bakteryjnych na czynniki antymikrobiologiczne,” *Biotechnologia*, vol. 76, no. 1, pp. 40–52, 2007.
- [229] M. S. Aparna and S. Yadav, “Biofilms: microbes and disease.,” *Braz. J. Infect. Dis.*, vol. 12, no. 6, pp. 526–30, Dec. 2008.
- [230] P. S. Stewart and J. W. Costerton, “Antibiotic resistance of bacteria in biofilms.,” *Lancet (London, England)*, vol. 358, no. 9276, pp. 135–8, Jul. 2001.
- [231] B. Kołwzan, “Analiza zjawiska biofilmu - Warunki jego powstawania i funkcjonowania,” *Ochr. Sr.*, vol. 33, no. 4, pp. 3–14, 2011.
- [232] J. W. Costerton, L. Montanaro, and C. R. Arciola, “Biofilm in implant infections: its production and regulation.,” *Int. J. Artif. Organs*, vol. 28, no. 11, pp. 1062–8, Nov. 2005.
- [233] G. Donelli, I. Francolini, A. Piozzi, R. Di Rosa, and W. Marconi, “New Polymer-Antibiotic Systems to Inhibit Bacterial Biofilm Formation: A Suitable Approach to Prevent Central Venous Catheter-Associated Infections,” *J. Chemother.*, vol. 14, no. 5, pp. 501–507, 2002.

- [234] J. L. Russo, “Inhibition of Urinary Tract Infections and Biofilm Formation on Long-term Indwelling Urethral Catheters through Antibacterial Coatings,” 2014.
- [235] R. M. Donlan, “Biofilm Elimination on Intravascular Catheters: Important Considerations for the Infectious Disease Practitioner,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 52, no. 8, pp. 1038–1045, Apr. 2011.
- [236] N. M. Lai, N. Chaiyakunapruk, N. A. Lai, E. O’Riordan, W. S. C. Pau, and S. Saint, “Catheter impregnation, coating or bonding for reducing central venous catheter-related infections in adults,” *Cochrane Database Syst. Rev.*, vol. 3, p. CD007878, Mar. 2016.
- [237] Y. Sekiguchi *et al.*, “Self-sterilizing catheters with titanium dioxide photocatalyst thin films for clean intermittent catheterization: Basis and study of clinical use,” *Int. J. Urol.*, vol. 14, no. 5, pp. 426–430, May 2007.
- [238] M. J. McGuffie *et al.*, “Zinc oxide nanoparticle suspensions and layer-by-layer coatings inhibit staphylococcal growth,” *Nanomedicine*, vol. 12, no. 1, pp. 33–42, Jan. 2016.
- [239] F. Paladini, M. Pollini, D. Deponi, A. Di Giancamillo, G. Peretti, and A. Sannino, “Effect of silver nanocoatings on catheters for haemodialysis in terms of cell viability, proliferation, morphology and antibacterial activity,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 24, no. 4, pp. 1105–1112, 2013.
- [240] H. Heidari Zare, V. Juhart, A. Vass, G. Franz, and D. Jocham, “Efficacy of silver/hydrophilic poly( *p* -xylylene) on preventing bacterial growth and biofilm formation in urinary catheters,” *Biointerphases*, vol. 12, no. 1, p. 011001, 2017.
- [241] A. Jacombs *et al.*, “In vitro and in vivo investigation of the influence of implant surface on the formation of bacterial biofilm in mammary implants,” *Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 133, no. 4, 2014.
- [242] K. K. Y. Wong and X. Liu, “Silver nanoparticles—the real ‘silver bullet’ in clinical medicine?,” *Medchemcomm*, vol. 1, no. 2, p. 125, Aug. 2010.
- [243] H. Kong and J. Jang, “Antibacterial Properties of Novel Poly(methyl methacrylate) Nanofiber Containing Silver Nanoparticles,” *Langmuir*, vol. 24, no. 5, pp. 2051–2056, Mar. 2008.



- [244] K. Gotoh *et al.*, “Exfoliated graphene sheets decorated with metal/metal oxide nanoparticles: Simple preparation from cation exchanged graphite oxide,” *Carbon N. Y.*, vol. 49, no. 4, pp. 1118–1125, Apr. 2011.
- [245] H.-W. Tien, Y.-L. Huang, S.-Y. Yang, J.-Y. Wang, and C.-C. M. Ma, “The production of graphene nanosheets decorated with silver nanoparticles for use in transparent, conductive films,” *Carbon N. Y.*, vol. 49, no. 5, pp. 1550–1560, Apr. 2011.
- [246] K. S. Subrahmanyam, A. K. Manna, S. K. Pati, and C. N. R. Rao, “A study of graphene decorated with metal nanoparticles,” *Chem. Phys. Lett.*, vol. 497, no. 1–3, pp. 70–75, Sep. 2010.
- [247] N. Li *et al.*, “Three-dimensional graphene foam as a biocompatible and conductive scaffold for neural stem cells,” *Sci. Rep.*, vol. 3, no. 1, p. 1604, Dec. 2013.
- [248] “Hodowle komórkowe w warunkach in vitro – media hodowlane - Artykuły - Biotechnologia.pl - łączymy wszystkie strony biobiznesu.” [Online]. Available: <https://biotechnologia.pl/biotechnologia/hodowle-komorkowe-w-warunkach-in-vitro-media-hodowlane,13533>. [Accessed: 23-Nov-2018].
- [249] S. Mobini, L. Leppik, and J. H. Barker, “Direct current electrical stimulation chamber for treating cells in vitro,” *Biotechniques*, vol. 60, no. 2, pp. 95–98, 2016.
- [250] E. Serena *et al.*, “Electrical stimulation of human embryonic stem cells: Cardiac differentiation and the generation of reactive oxygen species,” *Exp. Cell Res.*, vol. 315, no. 20, pp. 3611–3619, 2009.
- [251] A. Im, J. Kim, K. Lim, H. Seonwoo, and W. Cho, “Effects of Micro-Electrical Stimulation on Regulation of Behavior of Electro-Active Stem Cells,” vol. 38, no. 2, pp. 113–120, 2013.
- [252] C. Heo *et al.*, “The control of neural cell-to-cell interactions through non-contact electrical field stimulation using graphene electrodes,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 1, pp. 19–27, 2011.
- [253] N. F. Santos *et al.*, “Diamond-graphite nanoplatelet surfaces as conductive substrates for the electrical stimulation of cell functions,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, no. 2, pp. 1331–1342, 2017.

- [254] S. Ahadian *et al.*, “Electrically regulated differentiation of skeletal muscle cells on ultrathin graphene-based films,” *RSC Adv.*, vol. 4, no. 19, pp. 9534–9541, 2014.
- [255] M. K. Gheith *et al.*, “Stimulation of neural cells by lateral currents in conductive layer-by-layer films of single-walled carbon nanotubes,” *Adv. Mater.*, vol. 18, no. 22, pp. 2975–2979, 2006.
- [256] P. C. Sherrell *et al.*, “Maintaining cytocompatibility of biopolymers through a graphene layer for electrical stimulation of nerve cells,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 24, no. 6, pp. 769–776, 2014.
- [257] A. K. Dubey, P. Agrawal, R. D. K. Misra, and B. Basu, “Pulsed electric field mediated in vitro cellular response of fibroblast and osteoblast-like cells on conducting austenitic stainless steel substrate,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 24, no. 7, pp. 1789–1798, 2013.
- [258] M. Drygalski and T. Bielecki, “Zastosowanie elektrostymulacji w leczeniu uszkodzeń tkanek miękkich i kości,” vol. 3, no. 3, pp. 35–46, 2006.
- [259] R. Onibere *et al.*, “Ispub.com,” vol. 11, no. 2, pp. 1–9, 2008.
- [260] B. Ercan and T. J. Webster, “Greater osteoblast proliferation on anodized nanotubular titanium upon electrical stimulation,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 3, no. 4, pp. 477–485, 2008.
- [261] A. K. Dubey, S. D. Gupta, and B. Basu, “Optimization of electrical stimulation parameters for enhanced cell proliferation on biomaterial surfaces,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 98 B, no. 1, pp. 18–29, 2011.
- [262] I. I. Bobrinetskiy, “Investigation of the Effect of Local Electrical Stimulation on Cells Cultured on Conductive Single-Walled Carbon Nanotube/Albumin Films,” *J. Biomater. Nanobiotechnol.*, vol. 03, no. 03, pp. 377–384, 2012.
- [263] H. T. Heidi Au, B. Cui, Z. E. Chu, T. Veres, and M. Radisic, “Cell culture chips for simultaneous application of topographical and electrical cues enhance phenotype of cardiomyocytes,” *Lab Chip*, vol. 9, no. 4, pp. 564–575, 2009.
- [264] N. Tandon *et al.*, “Surface-patterned electrode bioreactor for electrical stimulation,” *Lab Chip*, vol. 10, no. 6, p. 692, 2010.

- [265] S. Mobini, L. Leppik, V. Thottakkattumana Parameswaran, and J. H. Barker, “*In vitro* effect of direct current electrical stimulation on rat mesenchymal stem cells,” *PeerJ*, vol. 5, p. e2821, 2017.
- [266] N. Kam, E. Jan, and N. Kotov, “Electrical stimulation of neural stem cells mediated by humanized carbon nanotube composite made with extracellular matrix protein,” *Nano Lett.*, vol. 9, no. 1, pp. 273–278, 2008.
- [267] D. A. Balikov *et al.*, “Directing lineage specification of human mesenchymal stem cells by decoupling electrical stimulation and physical patterning on unmodified graphene,” *Nanoscale*, vol. 8, no. 28, pp. 13730–13739, 2016.
- [268] T. H. Kim *et al.*, “Controlling differentiation of adipose-derived stem cells using combinatorial graphene hybrid-pattern arrays,” *ACS Nano*, vol. 9, no. 4, pp. 3780–3790, 2015.