

Uniwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych

Mgr inż. Klaudia Grzywnowicz

**Synteza oraz charakterystyka modyfikowanych biomateriałów
polimerowych w medycynie regeneracyjnej**

Praca doktorska napisana pod kierunkiem naukowym:
dr hab. Krzysztofa Jasika
dr hab. Andrzeja Swinarewa

Katowice 2023

*Składam serdeczne podziękowania moim promotorom:
Panu dr hab. Krzysztofowi Jasikowi
Panu dr hab. Andrzejowi Swinarewowi
za poświęcony czas i wszystkie wskazówki merytoryczne,
mgr Jadwidze Gabor oraz moim najbliższym,
za wsparcie podczas pisania niniejszej rozprawy.*

Streszczenie

Celem pracy była synteza oraz charakterystyka modyfikowanych biomateriałów polimerowych do zastosowania w medycynie a w szczególności na implanty chrzęstne oraz kostne. Jako materiału bazowego użyto poliwęglanu. Wykorzystano również następujące domieszki: betulinę, nanosrebro oraz nanokrzemionkę.

Realizację założonego celu pracy podzielono na dwa etapy. Pierwszym z nich było przygotowanie materiałów do badań. W ramach tego punktu otrzymane domieszki wraz z materiałem bazowym zostały poddane blendowaniu a następnie wytłaczaniu. Wytworzony w ten sposób filament wykorzystano do wydrukowania próbek z zastosowaniem technologii przyrostowej 3D. Drugi etap pracy obejmował charakterystykę otrzymanych materiałów. W ramach tego etapu przeprowadzone zostały badania właściwości mechanicznych – wytrzymałości na rozciąganie oraz udużności. Ponadto wykonano także chromatografię gazową oraz chromatografię wykluczenia. Charakterystykę uzupełniono badaniami spektrofotometrycznymi. Próbkę zbadano również z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni FT-IR oraz spektrometrii mas MALDI-ToF. Dodatkowo przeprowadzona została ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej i ocena cytotoxyczności.

Otrzymane wyniki potwierdziły skład oraz stabilność termiczną materiałów w procesie wytórczym. Potwierdzono także pozytywny wpływ domieszek na materiał bazowy w aspekcie poprawy właściwości przeciwdrobnoustrojowych.

Uzyskane podczas pracy wyniki pozwoliły potwierdzić przydatność otrzymanych materiałów do zastosowania w branży medycznej.

Abstract

The aim of the study was the synthesis and characterization of modified polymer biomaterials possible to use in medicine for cartilage and bone implants. Polycarbonate has been used as the base material while: betulin, nanosilver and nanosilica have been used as admixtures.

The research was divided into two stages - the first part was to prepare materials and second was to characterize them. In the first stage the obtained admixtures together with the base material were blended and then extruded. The filament, produced that way, was used to print samples with the use of 3D additive technology. During second stage, tests of mechanical properties were carried out - tensile strength and impact strength. In addition, gas chromatography and size exclusion chromatography were also performed. The characterization was supplemented with spectrofluorometric studies. The samples were also examined using FT-IR infrared spectroscopy and MALDI-ToF mass spectrometry. Additionally, the assessment of antimicrobial activity and cytotoxicity were performed.

The obtained results confirmed the composition and thermal stability of the materials in the manufacturing process - no thermal degradation was found at any stage of material production. The positive effect of the admixtures on the base material in terms of improving antimicrobial properties was also confirmed.

Obtained results confirmed the suitability of the manufactured materials for use in the medical industry.

Spis treści

I.	Wstęp	- 1 -
II.	Przegląd literatury	- 3 -
2.1	Biomateriały	- 3 -
2.1.1.1	Historia biomateriałów	- 3 -
2.1.1.2	Biomateriały pierwszej generacji	- 4 -
2.1.1.3	Biomateriały drugiej generacji	- 6 -
2.1.1.4	Biomateriały trzeciej generacji	- 8 -
2.1.2	Wyroby medyczne do kontaktu z żywym organizmem	- 11 -
2.1.3	Biomateriały polimerowe	- 17 -
2.1.3.1	Polimery – podstawowe pojęcia i podział	- 18 -
2.1.3.2	Sposoby otrzymywania polimerów	- 19 -
2.1.3.3.1	Polimeryzacja rodnikowa	- 19 -
2.1.3.3.2	Polimeryzacja rodnikowa żyjąca/kontrolowana	- 19 -
2.1.3.3.3	Polimeryzacja koordynacyjna	- 19 -
2.1.3.3.4	Elektropolimeryzacja	- 20 -
2.1.3.3.1	Kopolimeryzacja	- 20 -
2.1.3.2.6	Polikondensacja	- 21 -
2.1.3.2.7	Poliaddycja	- 22 -
2.1.3.2.8	Polimeryzacja jonowa żyjąca	- 22 -
2.1.3.2.9	Polimeryzacja jonowa	- 23 -
2.1.3.2.10	Inne metody syntezy	- 23 -
2.1.3.3	Charakterystyka wybranych polimerów do zastosowań medycznych ..	- 23 -
2.1.3.3.1	Polietylen	- 24 -
2.1.3.3.2	Polipropylen	- 27 -
2.1.3.3.3	Poli(chlorek winylu)	- 28 -
2.1.3.3.4	Poli(metakrylan metylu)	- 29 -
2.1.3.3.5	Poli(tereftalan etylenu)	- 30 -
2.1.3.3.6	Poliuretany	- 31 -
2.1.3.3.7	Polieteroeteroketon	- 34 -

2.1.3.3.8	Poli(tetrafluoroetylen)	- 35 -
2.1.3.3.9	Polisiloksany	- 36 -
2.1.3.3.10	Poliwęglany	- 38 -
2.1.3.3.11	Polimery o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych	- 39 -
2.2	Modyfikatory właściwości przeciwdrobnoustrojowych	- 41 -
2.2.1	Betulina	- 42 -
2.2.2	Nanosrebro	- 43 -
2.2.3	Nanokrzemionka	- 44 -
2.3	Biomechanika tkanek oporowych	- 45 -
2.3.1	Tkanka kostna	- 45 -
2.3.2	Tkanka chrzęstna	- 48 -
2.4	Uzasadnienie podjęcia tematyki badawczej	- 50 -
III.	Założenia i cel pracy	- 54 -
IV.	Badania własne	- 56 -
4.1.	Materiał do badań	- 56 -
4.1.1.	Synteza polioliu	- 56 -
4.1.2.	Ekstrakcja betuliny	- 58 -
4.1.3.	Nanokrzemionka	- 61 -
4.1.4.	Nanosrebro	- 63 -
4.1.5.	Wytłoczenie blendy polimerowej	- 64 -
4.1.6.	Wydruk próbek do badań	- 66 -
4.2.	Metodyka badawcza	- 70 -
4.2.1.	Statyczna próba rozciągania	- 70 -
4.2.2.	Pomiar twardości	- 73 -
4.2.3.	Próba udarowości	- 73 -
4.2.4.	Chromatografia gazowa	- 76 -
4.2.5.	Chromatografia wykluczania	- 80 -
4.2.6.	FT-IR	- 83 -

4.2.7.	Spektrofluorymetria	- 85 -
4.2.8.	Spektrometria mas MALDI-ToF	- 88 -
4.2.9.	Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej	- 91 -
4.2.10.	Ocena cytotoksyczności	- 93 -
V.	Wyniki.....	- 94 -
5.1	Wyniki statycznej próby rozciągania	- 94 -
5.2	Wyniki pomiarów twardości	- 96 -
5.3	Wyniki próby udarności	- 97 -
5.4	Wyniki chromatografii gazowej.....	- 98 -
5.5	Wyniki chromatografii wykluczenia	- 100 -
5.6	Wyniki spektroskopii w podczerwieni FT-IR.....	- 104 -
5.7	Wyniki spektrofluorymetrii.....	- 117 -
5.8	Wyniki spektrometrii mas MALDI-ToF.....	- 121 -
5.9	Wyniki oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej	- 126 -
5.10	Wyniki oceny cytotoksyczności	- 133 -
VI.	Omówienie wyników badań	- 134 -
VII.	Wnioski	- 137 -
VIII.	Podsumowanie	- 140 -
IX.	Bibliografia	- 141 -
X.	Spis rysunków	- 158 -
XI.	Spis tabel.....	- 162 -
XII.	Załączniki.....	- 165 -

Wykaz stosowanych skrótów i symboli

7-AAD – 7-aminoaktynomycyna D

A_0 – powierzchnia początkowego przekroju próbki

AC – węgiel aktywny

APC – poliwęglany alifatyczne

A_t – średnia z logarytmu dziesiętnego liczby żywych komórek bakterii znajdujących się na próbkach badanych po 24 godzinach inkubacji

ATP - adenozyno-5'-trifosforan

ATR – spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni

BHET - tereftalan bis (2-hydroksyetyl)

Bis-GMA – żywica dimetakrylanowa

BMP – białko morfogenetyczne kości

BPA – bisfenol acetonu

CA- celuloza octanowa

CAD – projektowanie wspomagane komputerowo

CF – włókno węglowe

CFRP - włókno węglowe wzmocnione polimerem

CFRTP - tworzywo termoplastyczne wzmocnione włóknami węglowymi

COVID-19 – choroba wywoływana przez SARS-CoV-2

CT – tomografia komputerowa

DEHP – ftalan di(2-etyloheksylu)

DHB – (kwas 2,5-dihydroksy-benzoowy)

DLaTGS – deuterowany siarczan trójglicyny domieszkowany L-alaniną

DLC – węgiel diamentopodobny

DMT - dimetyloester kwasu tereftalowego

E – moduł Younga

ECM – macierz międzykomórkowa/zewnątrzkomórkowa, istota międzykomórkowa

EG – glikol etylenowy

EMI - elektromagnetyczne ekranowanie interferencyjne

ePTFE – ekspandowany poli(tetrafluoroetylen)

ePTFE – ekspandowany poli(tetrafluoroetylen)

FDA – Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków

F-DLC – powłoki DLC domieszkowane fluorem

FDM – osadzanie topionego materiału

FID – detektor płomieniowo-jonowy

FM – maksymalna siła rozciągająca

FR – siła zrywająca

FT-IR – spektroskopia fourierowska w podczerwieni

GC-MS - chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas

GLC – chromatografia gazowa, gdzie fazę stacjonarną stanowi ciecz

GPC – chromatografia wykluczenia (żelowa)

GSC – chromatografia adsorpcyjna, gdzie fazę stacjonarną stanowi ciało stałe

HAp – hydroksyapatyt

HDPE – polietylen wysokiej gęstości

HMWPE – polietylen o dużej masie cząsteczkowej

HPMA – N-(2-hydroksypropylo)metakrylamid

HV – oznaczenie twardości zmierzonej metodą Vickersa

IL-10 – interleukina 10

IL-6 – interleukina 6

K – energia zużyta na złamanie próbki (praca uderzenia)

KB – linia komórek nowotworowych, użytych do badań

KC – udarność

LDPE – polietylen niskiej gęstości

LLDPE – polietylen liniowy niskiej gęstości

LN-MCT – detektor MCT chłodzony ciekłym azotem

LTIC – niskotemperaturowy pirolityczny węgiel izotropowy

MALDI-ToF – desorpcja/ionizacja laserem wspomagana matrycą z pomiarem czasu przelotu jonów

MCF7 – linia komórek nowotworowych, użytych do badań

MCT – detektor rtęciowo-kadmowo-tellurkowy

MDPE – polietylen średniej gęstości

MR – rezonans magnetyczny

MS – spektrometria masowa

MTS – udoskonalona wersja testu MTT

MTT – test do oznaczania aktywności mitochondrialnej (dehydrogenazy mitochondrialnej)

NGF – czynnik wzrostu nerwów

Od. Std (σ) – odchylenie standardowe populacji próbek

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

PA – poliacetal

PBT – poli(tereftalan butylenu)

PC – poliwęglan

PCL – poli(ϵ -kaprolakton)

PDMS – poli(dimetylosiloksan)

PE – polietylen

PEEK – polieteroeteroketon

PEG – poli(glikol etylenowy)

PET – poli(tereftalan etylenu)

PGA – poli(kwas glikolowy)

PI – jodek propidyny

PLA – poli(kwas mlekowy)

PLGA – kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego

PLLA – poli(L-laktyd)

PLOT – kolumna z warstwą porowatą na ściankach

PMDI – polimeryczny diizocjanian

PMMA – poli(metakrylan metylu)

PP – polipropylen

PS – przesunięcie Stokesa

PSA – *ang. particle size analyzer* – analizator wielkości cząstek

PSU – polisulfon

PTFE – poli(tetrafluoroetylen)

PU – poliuretan

PVA – poli(alkohol winylowy)

PVC – poli(chlorek winylu)

PVP - poli(winylopirolidon)

R – aktywność bakteriobójcza

RC – regenerowana celuloza

R_e – granica sprężystości

RFT – reaktywne formy tlenu

R_H – granica proporcjonalności

R_m – wytrzymałość materiału na rozciąganie

rpm – obroty na minutę

R_{sp} – granica plastyczności

R_u – naprężenie zrywające

S – pole powierzchni bocznej odcisku [mm²]

S_0 – powierzchnia przekroju próbki w miejscu karbu

SARS-CoV-2 – wirus należący do grupy koronawirusów

SCE – nasycona elektroda kalomelowa

SCOT – kolumna z naniesionym na ściankach nośnikiem nasyconym ciekłą fazą stacjonarną

SEM – skaningowy mikroskop elektronowy

SiNPs – nanocząsteczki krzemionki

SNP – nanocząstki krzemionki

SR – kauczuk silikonowy

SRB – sulforodamina B

TCA – kwas trichlorooctowy

TCD – detektor cieplno-przewodnościowy

TEOS – tetraetoksylsilan

THF – tetrahydrofuran

TNF- α – czynnik martwicy nowotworów- α

TPA – kwas tereftalowy

TVT – taśma załonowa (ang. Tension free vaginal tape)

U_0 – średnia z logarytmu dziesiętnego liczby żywych komórek bakterii znajdujących się na próbkach kontrolnych bezpośrednio po inokulacji

UHMWPE – polietylen o ultra-wysokiej masie cząsteczkowej

ULTIC – ultra-niskotemperaturowy pirolityczny węgiel izotropowy

U_t – średnia z logarytmu dziesiętnego liczby żywych komórek bakterii znajdujących się na próbkach kontrolnych po 24 godzinach inkubacji

WCOT – kolumna o gładkich ścianach, które pokryto ciekłą fazą stacjonarną

XTT – sól sodowa 2,3-bis(2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenylo)-2H-tetrazolo-5- karboksyanilidu

α CHCA – (kwas α -cyjanohydroksycynamonowy)

α -TCP – alfa fosforany trójwapniowe

β -TCP – beta-fosforany trójwapniowe

ϵ_M – wydłużenie względne przy maksymalnym naprężeniu rozciągającym

ϵ_{pl} – wydłużenie trwałe

ϵ -PL - ϵ -polizyna

ϵ_R – odkształcenie przy zerwaniu

ϵ_{sp} – odkształcenie sprężyste

σ_B – naprężenie przy zerwaniu (stosunek siły zrywającej F_R do powierzchni początkowego przekroju próbki A_0)

σ_M – rzeczywiste naprężenie podczas rozciągania (stosunek maksymalnej siły rozciągającej F_M do powierzchni początkowego przekroju próbki A_0)

I. Wstęp

Materiały polimerowe są obecnie jednymi z najczęściej wykorzystywanych materiałów na świecie. Coraz częściej zastępują tradycyjne materiały konstrukcyjne. Ich parametry oraz nowe technologie przetwórstwa umożliwiają wytworzenie z nich elementów maszyn czy skomplikowanych mechanizmów, a odpowiednio zmodyfikowane, są wykorzystywane jako materiały funkcjonalne. Szeroka gama polimerów o różnych właściwościach pozwoliła również na ich zastosowanie w branży medycznej. Początkowo były to elementy urządzeń medycznych, które nie miały bezpośredniego kontaktu z organizmem ludzkim. Wykonywano przedmioty takie jak strzykawki, wzierniki czy chociażby szczoteczki do zębów. Ich główną cechą jest to, że czas kontaktu z organizmem ludzkim jest dość krótki. Ograniczyło to więc czas potrzebny do ich przebadania i dopuszczenia do użytku. Następną grupę stanowią urządzenia, bądź przedmioty, których kontakt z organizmem żywym jest zdecydowanie dłuższy, powyżej kilku godzin, jednak z reguły nie przekraczający doby. Wśród tej grupy znajdują się wszelkiego rodzaju protezy kończyn, protezy dentystyczne czy też popularne soczewki kontaktowe. Istotną grupę produktów medycznych stanowią dreny, elementy mające styk z płynami ustrojowymi, przykładowo aparaty służące do hemodializy. Jednymi ze stosowanych materiałów są polimery, których użytkowanie wiąże się z długotrwałym kontaktem z organizmem ludzkim bądź z jego płynami ustrojowymi. Przykładami są nici chirurgiczne, zastawki serca (wykonane z tworzywa), różnego rodzaju kleje a także implanty czy protezy (ścięgien, naczyń krwionośnych).

Do tej grupy należą również materiały będące przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej. Badania materiałów znajdujących się w tej grupie są czasochłonne, a także wymagają zastosowania szerokiego zakresu metodyki – od badań wytrzymałościowych, aż po badania mikrobiologiczne i toksykologiczne, w celu ustalenia przydatności i możliwości użytkowania ich w zabiegach medycznych.

W rozprawie skupiono się na syntezie oraz charakterystyce nowoczesnych materiałów polimerowych, które potencjalnie będą mogły zostać wykorzystane w medycynie regeneracyjnej, a konkretnie służąc jako materiał na implanty chrzęstne oraz kostne. Materiały wykonane zostały na bazie poliwęglanu. Jednym z warunków jakie przyjęto w prezentowanych tu badaniach, była możliwość skorzystania z technologii przyrostowej FDM dzięki, której można by wykonywać implanty spersonalizowane. W celu charakterystyki otrzymanych materiałów wykonano między innymi badania wytrzymałościowe, chromatograficzne,

spektrofluorymetryczne czy też mikrobiologiczne, co pozwoliło na ich ocenę pod kątem przydatności w zaproponowanej gałęzi branży medycznej.

II. Przegląd literatury

2.1 Biomateriały

Biomateriał to każda inna substancja niż lek albo kombinacja substancji naturalnych lub syntetycznych, która może być użyta w dowolnym czasie, a której zadaniem jest uzupełnianie lub zastąpienie tkanek narządu lub jego części w celu spełnienia ich funkcji [1].

Rozszerzona definicja obejmuje również inne aspekty związane z zadaniami funkcjonalnymi jakie musi spełniać biomateriał. Zgodnie z nią przyjmuje się, że są to [2]:

- materiały przeznaczone do współistnienia z biologicznymi systemami, przydatne do leczenia, diagnozowania, poprawiania oraz całkowitego bądź częściowego zastąpienia tkanki, narządu lub spełnienia ich funkcji w organizmie;

- materiały stosowane we wszelkiego rodzaju urządzeniach, wyrobach i przyrządach medycznych przeznaczonych do oddziaływania z systemami biologicznymi;

- materiały pochodzenia naturalnego bądź sztucznego używane do wspomaganie lub zastąpienia funkcji żywych tkanek.

Ogólna klasyfikacja dzieli biomateriały na trzy główne podgrupy: metale, ceramika i polimery [3]. Ich historia sięga czasów starożytności.

2.1.1.1 Historia biomateriałów

Pierwsze wzmianki dotyczące biomateriałów odnotowano już około 3000 lat p.n.e. – w starożytnym Egipcie w celach biomedycznych wykorzystywano lniane sznury, a od 600 r. n.e. muszle – jako elementy sztucznego uzębienia. Na przestrzeni dziejów widać również stały wzrost zainteresowania wykorzystaniem obcych substancji do leczenia i naprawy uszkodzeń w ludzkim ciele a także wzrost możliwości korzystania z coraz bardziej zaawansowanych materiałów [4][5]. Jednakże większość wczesnych implantów medycznych była skazana na niepowodzenie, ponieważ nie znano wagi reakcji biologicznych i zjawisk takich jak kontaminacja materiałów implantacyjnych, infekcja, problematyka toksykologiczna, czy zjawiska immunologiczne.

Znaczący rozwój biomateriałów przypada na XVIII i XIX wiek, kiedy to naukowcy zaczęli zdawać sobie sprawę jak ważną rolę odgrywa biokompatybilność. W 1775 roku

zaprezentowano technikę zespajania kości z użyciem metalowego drucika. Od połowy do końca XIX wieku biokompatybilność elementów metalowych wykonanych ze złota, platyny czy też srebra była przedmiotem badań H. S. Leverta. W 1888 roku Adolf Fick opracował pierwszą działającą szklaną soczewkę kontaktową, chociaż pomysł na jej wykonanie przedstawił już Leonardo da Vinci w 1508 roku [5]. Na początku XX wieku zaczęto stosować płytki i śruby w leczeniu złamań kości. W 1930 roku wprowadzono nowe materiały takie jak stal nierdzewna, stopy tytanu czy materiały z dodatkiem kobaltu i chromu. W 1938 roku P. Wiles opracował koncepcję całkowitej protezy stawu biodrowego.

Za początek współczesnej ery implantów przyjmuje się kilka odkryć. Jednym z nich są obserwacje poczynione przez brytyjskiego okulistę Harolda Ridley'a w późnych latach 40 XX wieku. Podczas badania jednego z pilotów myśliwców, który stracił wzrok na skutek utkwienia w jego oczach licznych odłamków szkła akrylowego Ridley zauważył, że tkanki ludzkiego oka tolerują ten materiał bez wywoływania reakcji zapalnych czy też innych efektów ubocznych. Zaowocowało to pomysłem na wykorzystanie szkła akrylowego jako materiału na sztuczną soczewkę [4]. W tych latach zaczęto również stosować materiały polimerowe. Poli(metakrylan metylu) - PMMA wykorzystywano do naprawy defektów kostnych; celuloza została wprowadzona jako materiał filtracyjny do dializy, a materiałem, którego używano do produkcji nici chirurgicznych były nylonowe struny. Warto również zwrócić uwagę na długość życia ludzkiego – na początku XX wieku średnia długość życia wynosiła około 40 lat, podczas gdy już pod jego koniec jest to około 80 lat. Wzrost populacji, jak również wydłużenie średniej długości życia przyczyniły się do jeszcze bardziej intensywnego rozwoju w dziedzinie biomateriałów. W rzeczywistości ostatnie 60 lat obfitowało w wiele różnorodnych badań i odkryć naukowych, co doprowadziło do wyodrębnienia trzech generacji biomateriałów [6].

Pierwsza generacja skupia się wokół biomateriałów obojętnych, gdzie głównym problemem stawianym przed potencjalnym biomateriałem jest toksyczność.

2.1.1.2 Biomateriały pierwszej generacji

O biomateriałach pierwszej generacji można mówić od około 1950 roku. Zgodnie z przyjętą ówczesnie koncepcją, biomateriały powinny być obojętne względem tkanek gospodarza po wszczepieniu lub wywoływać ich minimalną reakcję.

W generacji tej wykorzystywano przede wszystkim materiały stosowane w branżach takich jak przemysł mechaniczny, lotniczy, samochodowy i chemiczny. Ogromnym sukcesem była

pierwsza, całkowita wymiana stawu biodrowego. Zastosowany wówczas trzpień udowy składał się z austenicznej stali nierdzewnej, którą dobrano ze względu na odpowiednie właściwości mechaniczne i odporność na korozję [6]. Jednakże doświadczenia kliniczne pokazały, że materiał ten nie jest wolny od wad i generuje wiele problemów takich jak korozja. Zaobserwowano również duże zużycie materiału w kontakcie między głową kości udowej a panewką. Dlatego też wspomniane powyżej materiały znalazły zastosowanie tylko jako implanty krótkotrwałe. Ulepszono również procesy produkcyjne austenicznej stali nierdzewnej z wykorzystaniem topienia próżniowego i rafinacji w celu ograniczenia wtrąceń niemetalicznych. Rozwijano także stopy niklu poprzez wprowadzenie do nich azotu i manganu.

Kolejnym stopem mającym potencjalnie znacznie w implantologii był stop kobalt-chrom o wysokiej odporności na zużycie. Teoretycznie nadawał się doskonale do zastosowania w sztucznych stawach. Z dużym powodzeniem zastosowano również komercyjnie czysty tytan i stop lotniczy Ti_6Al_4V szczególnie w chirurgii twarzowo-szczękowej i ortopedii. Materiały te charakteryzują się doskonałą odpornością na korozję, odpornością zmęczeniową, niską gęstością i niskim modułem sprężystości. Opracowano także inne stopy bazujące na tytanie, zwane stopami biomedycznymi, w których usunięto elementy aluminiowe i wanadowe ze względu na niekorzystne oddziaływanie na organizm ludzki. Pierwiastkami stopowymi, którymi je zastąpiono były niob, cyrkon i tantal.

W tym czasie badano również materiały ceramiczne, takie jak tlenek glinu i dwutlenek cyrkonu stabilizowane za pomocą tlenku itru, które są materiałami o dużej stabilności chemicznej i odporności na zużycie. Do ich wad zalicza się natomiast kruchość i małą odporność na pękanie. Pomimo wad materiały te znalazły zastosowanie w rekonstrukcji czaszki, kości udowej i panewki. W okresie tym zaczęto także używać ceramiki wapniowo-fosforanowej takiej jak hydroksyapatyt (HAp) i β -fosforan trójwapniowy do wypełnienia ubytków kostnych.

Przykładami obojętnych materiałów polimerowych zaliczanych do pierwszej generacji biomateriałów są polietylen, poliuretan, polipropylen i czy też materiały silikonowe.

Kauczuki silikonowe były używane przez jakiś czas w zastępowaniu stawów palców w wyniku przebytego zapalenia bądź innych urazów, ale z małym powodzeniem ze względu na pękanie kauczuku, które następowało krótko po implantacji.

Zacząto również stosować polietylen o ultra-wysokiej masie cząsteczkowej – UHMWPE. Dzięki doskonałej odporności na zużycie, stosowany jest aż po dzień dzisiejszy. Przede wszystkim wykorzystuje się go do produkcji protez ortopedycznych (między innymi na implanty kolanowe i panewki stawu biodrowego).

Biomateriały pierwszej generacji przyczyniły się do zdecydowanego rozwoju protez stawów, implantów dentystycznych, implantów piersi, protez naczyniowych, stentów czy zastawek serca [5].

Kolejna, druga generacja biomateriałów związana jest przede wszystkim z materiałami bioaktywnymi oraz resorbowalnymi. Zdolność do wytworzenia wiązania z kością (bioaktywność) i możliwość wykorzystania syntetycznych, resorbowalnych biomateriałów takich jak beta-fosforany trójwapniowe (β -TCP) i alfa fosforany trójwapniowe (α -TCP) okazały się być kamieniami milowymi na dalszej drodze rozwoju.

2.1.1.3 Biomateriały drugiej generacji

O drugiej generacji biomateriałów można mówić od około 1970 roku. Stwierdzono, że istnieje potrzeba opracowania materiałów, które mogłyby wchodzić w interakcje z tkankami organizmu ludzkiego. Potrzeba ta wynikała z obserwacji, że w większości zastosowań implanty otoczone były tkanką włóknistą wraz ze składnikami macierzy międzykomórkowej na skutek odpowiedzi immunologicznej organizmu. Reakcje zachodzące w organizmie po wszczepieniu implantu, regulowane są przede wszystkim przez makrofagi, leukocyty i inne komórki układu odpornościowego oraz przez zespół czynników bioaktywnych, uwalnianych do macierzy międzykomórkowej wskutek ekspresji genetycznej różnych komórek. Zaobserwowano, że zmiany zachodzące w organizmie w wyniku tych reakcji, uniemożliwiają skuteczną integrację dotychczas stosowanych biomateriałów z kością. Wspominana osteointegracja jest niezwykle pożądana w przypadku implantów [6]. Ważnym wydarzeniem było opracowanie bioaktywnego szkła, które oprócz biokompatybilności ma zdolność do chemicznego wiązania z kością. Wynalazcą był Larry Hench [7]. Hench wyróżnił także cztery możliwe reakcje na wszczep biomateriału [8]:

1. Jeśli materiał jest toksyczny, otaczająca tkanka umiera.
2. Jeśli materiał jest nietoksyczny i biologicznie nieaktywny, tworzy się tkanka łączna właściwa o zmiennej grubości.

3. Jeśli materiał jest nietoksyczny i biologicznie aktywny (bioaktywny), powstaje wiązanie międzyfazowe.

4. Jeśli materiał jest nietoksyczny i rozpuszcza się, zastępuje go otaczająca tkanka.

Przykładami materiałów powodujących reakcję typu 2 (materiał jest nietoksyczny i biologicznie nieaktywny) wg. niektórych autorów mogą być: austenityczna stal nierdzewna, stopy kobaltowo-chromowe, tlenek glinu, tlenek cyrkonu, UHMWPE. Materiałem wywołującym reakcję typu 3 jest hydroksyapatyt czy też różnego rodzaju bioaktywne szkła. Przykładami materiałów wywołujących reakcję typu 4 typu są: siarczan wapnia, fosforan trójwapniowy, fosforan wapnia, poli(kwas glikolowy), poli(ϵ -kaprolakton).

W przypadku biomateriałów ceramicznych takich jak hydroksyapatyt czy też bioszkła interakcje między biomateriałem a tkanką gospodarza opisał Best et al. [9]. W drugiej generacji biomateriałów znalazło się także miejsce dla materiałów metalicznych. W szczególności skupiono się na dwóch sposobach poprawy właściwości implantów.

Pierwszy z nich związany jest z nałożeniem powłoki ceramicznej na implant. Powłoki te wykonane są głównie z hydroksyapatytu, fosforanu β -trójwapniowego i ceramiki dwufazowej [10]. Zastosowano różne techniki powlekania m. in. natryskiwanie plazmowe, rozpylanie oraz elektroforezę. Pierwsza technika – natryskiwanie plazmowe, odniosła największy sukces ze względu na szybkość i wydajność. W metodzie tej, problem stanowi uzyskanie jednolitej grubości powłoki i jej słaba przyczepność do metalu. Większość nowoczesnych technik wykorzystuje mieszaniny tytanu lub powłoki tantalum z fosforanami wapnia poprawiającymi adhezję między powłoką a podłożem.

Drugi sposób oparty jest na modyfikacji powierzchni materiałów metalicznych poprzez wprowadzenie bioaktywnych substancji lub biomolekuł. Tytan i jego stopy, ze względu na osteointegrację, są szeroko stosowane w implantach zębów oraz implantach ortopedycznych. Właściwości powierzchniowe tych metali będą odgrywać istotną rolę w interakcjach, które wystąpią między implantowanym materiałem a środowiskiem biologicznym [6]. Dlatego też, tak ważne jest, aby właściwości powierzchniowe były jak najlepsze.

Do biokompatybilnych polimerów drugiej generacji zalicza się te, które przez pewien czas pełnią funkcję mechaniczną, a następnie ulegają degradacji i są zastępowane przez tkankę gospodarza. Produktami degradacji polimeru, są proste i nietoksyczne substancje takie jak woda czy CO₂. Początkowo, polimery te wykorzystywano w produkcji nici chirurgicznych,

a następnie do leczenia złamań małych kości dłoni czy twarzy. Przykładami takich polimerów są: PLLA, PGA, PCL, PLGA i PVP.

Właściwości powierzchniowe materiałów są kluczowe w odniesieniu do ich interakcji ze środowiskiem biologicznym do którego zostaną wprowadzone. Topografia powierzchni na różnych poziomach (nano- i mikroskala), skład warstwy powierzchniowej, rodzaje białek i innych makromolekuł, które do niej przylegają, energia powierzchniowa i struktura powierzchni warstw materiału implantu są parametrami, które silnie wpływają na oddziaływanie implantów z komórkami i mikroorganizmami [11].

W ostatnich dziesięcioleciach rozwój technologiczny oraz lepsze zrozumienie pojęcia biokompatybilności na poziomie komórkowym i molekularnym, umożliwiło opracowanie bardziej wyrafinowanych biomateriałów wykorzystywanych w inżynierii tkankowej. Biomateriały te mają zdolność do współdziałania z receptorami powierzchniowymi, czynnikami wzrostu i innymi molekułami istoty międzykomórkowej [5]. Zapoczątkowało to prace nad kolejną, trzecią generacją biomateriałów, której główne cele oscylują wokół regeneracji i inżynierii tkankowej.

2.1.1.4 Biomateriały trzeciej generacji

Dalszy rozwój technologii przekłada się obecnie na rozwój biomateriałów trzeciej generacji, które mogą modulować specyficzną odpowiedź komórkową [12]. Przykładami są bioaktywne szkła (trzeciej generacji) i porowate pianki, zaprojektowane w taki sposób, że potencjalnie aktywują geny, które z założenia powinny stymulować regenerację żywej tkanki. Podejmowane są również starania, aby opracować materiały na rusztowania, posiadające cechy nanoskalowe w celu naśladowania substancji międzykomórkowej gospodarza [13].

Trzecia generacja zbiega się więc czasowo i pod kątem badawczym z koncepcją inżynierii tkankowej, wprowadzając ideę medycyny regeneracyjnej. Zamiast zastępowania uszkodzonych tkanek ludzkiego ciała różnymi implantami z materiałów o właściwościach zbliżonych do naturalnej tkanki, zaczęto myśleć o opracowaniu systemów, które będą zachowywać spójność tkanki żywej z sztucznym implantem, a nawet stymulować uszkodzoną tkankę do regeneracji. W związku z większą wiedzą na temat funkcjonowania układów biologicznych, biomateriały zyskują zdolność do stymulowania funkcji komórek tworzących tkanki (kości, mięśni, chrząstek) jednocześnie próbując zminimalizować reakcje zapalne oraz efekty degeneracyjne [6].

Inżynieria tkankowa musi zatem integrować informacje z wielu dziedzin nauki takich jak biochemia, biologia molekularna, biologia komórki, immunologia czy cytofizjologia, wykorzystując również aspekty z zakresu nauki o materiałach i ich przetwórstwie [14]. Rozwój tych dziedzin nauki połączony z rozwojem techniki, potencjalnie umożliwia regenerację żywych tkanek pacjenta. Poprzez hodowlę niezmiennych chorobowo komórek na odpowiednio przygotowanych matrycach, a także zastosowanie substratu adhezyjnego, uzyskuje się izolowany wzrost tkanki. Matryca, zwany również rusztowaniem, jest przygotowywana w celu naśladowania warunków pierwotnej tkanki i jest wytwarzana z materiału ulegającemu degradacji. Pozwala to uniknąć konieczności drugiego zabiegu w celu usunięcia syntetycznego materiału [15].

Wyróżnia się także regenerację tkanek *in situ*. To podejście obejmuje wykorzystanie biomateriałów w formie proszków, roztworów lub domieszkowanych mikrocząstek mogących stymulować miejscową naprawę tkanek. Bioaktywne materiały uwalniają substancje czynne w formie produktów rozpuszczania jonowego lub czynników wzrostu takich jak białko morfogenetyczne kości (BMP) w kontrolowanych dawkach. Białko to dyfundując lub ulegając rozpadowi chemicznemu aktywuje komórki w kontakcie z ich receptorami. Komórki produkują dodatkowe czynniki wzrostu, które z kolei stymulują kolejne pokolenia proliferujących komórek do samoorganizacji w wymagane tkanki *in situ* zgodnie z biochemicznym i biomechanicznym gradientem. Przykładem takiego materiału jest bioaktywne szkło. W następstwie szybkich reakcji na jego bioaktywnej powierzchni, obserwuje się procesy zarówno osteokondukcji jak i osteoindukcji. Reakcje powierzchniowe uwalniają krytyczne stężenia rozpuszczalnych jonów Si, Ca, P i Na z nanomodifikatorów, które powodują reakcje wewnątrzkomórkowe i pozakomórkowe na granicy szkła ze środowiskiem komórkowym [12].

Biomateriały trzeciej generacji obejmują również aspekt molekularnego dostosowywania polimerów resorbowalnych do specyficznej odpowiedzi komórkowej. Poprzez immobilizację specyficznych białek, peptydów i innych biomolekuł na implantowanym materiale możliwe jest naśladowanie środowiska macierzy zewnątrzkomórkowej zwanej również istotą międzykomórkową (ECM) i zapewnienie wielofunkcyjnej powierzchni umożliwiającej adhezję komórek [16]. Rozpoznane, specyficzne czynniki komórkowe mogą być włączane do resorbowalnej powierzchni polimerowej i mogą zawierać adhezyjne białko fibronektyny, glikozaminoglikany, kolagen, elastynę i inne funkcjonalne domeny komponentów ECM. Powierzchnie polimerowe mogą być również wzbogacone białkami przykładowo lamininą,

które mają niebagatelne znaczenie w interakcjach ze śródbłonkiem, rozwojem synaps i stymulacją regeneracji neuronów [17].

Prowadzone prace koncentrują się również na przeszczepach komórkowych, zwłaszcza w leczeniu zaburzeń neurologicznych takich jak choroba Parkinsona [18]. Jednakże, aby przywrócić funkcję w zwyrodniałych regionach ośrodkowego układu nerwowego (OUN), badania powinny się koncentrować na hamowaniu procesów degeneracyjnych oraz stymulowaniu regeneracji w tkance nerwowej gospodarza. Prace badawcze powinny skupiać się nad formułą leków o wydłużonym działaniu i technologią wszczepialnych nośników polimerowych, co mogłoby zrównoważyć długoterminową kurację. Kluczowe znaczenie w badaniach nad wszczepianiem komórek nerwowych ma stworzenie lokalnego środowiska w OUN, które pozwoliłoby na zainicjowanie procesów regeneracyjnych. Biorąc jednak pod uwagę fakt, że w OUN w naturalnych warunkach nie występuje typowa regeneracja, badania takie wymagają jeszcze wielu analiz.

Biomateriały trzeciej generacji umożliwiają stworzenie specyficznego mikrośrodowiska. Przykładowo Mahoney i Saltzman [19] opracowali technikę, która tworzy lokalny i trwały poziom nierozpuszczalnych i rozpuszczalnych cząsteczek bezpośrednio w miejscu wszczepu komórek w mózgu. Do włączenia czynnika wzrostu nerwów (NGF) wykorzystano kopolimery PLA/PGA. Podobną technikę zastosowano również w celu poprawy kierunkowej regeneracji nerwów [20]. Obecnie pracuje się nad rozwojem biomateriałów, które będą wykazywać takie same cechy architektoniczne jak naturalny odpowiednik. Z materiałów tych, będzie można wykonać resorbowalne rusztowanie do rozwoju sztucznych tkanek bądź wykorzystać je jako materiały stosowane tymczasowo, w celu wspomagania procesów regeneracyjnych.

Trzecia generacja biomateriałów skupia się więc wokół projektowania molekularnych rusztowań dla inżynierii tkankowej oraz na regeneracji i naprawie tkanek *in situ*, z minimalnym wykorzystaniem chirurgii inwazyjnej. W przyszłości powinno być możliwe zaprojektowanie nowej generacji biomateriałów aktywujących dany gen, dostosowanych do konkretnych pacjentów i stanów chorobowych. Przykładowo będzie można wytwarzać specyficzne nośniki oparte na komórkach własnych pacjenta w celu doboru optymalnego leczenia farmaceutycznego. Odrębne badania skupiają się na próbach aktywacji genów i wprowadzenia tzw. terapii genowej. Do niedawna koncepcja ta wydawała się całkowicie abstrakcyjna. Obecnie w badaniach uwzględnia się nie tylko czynniki genetyczne, ale również epigenetyczne. Istnieje bowiem olbrzymia liczba czynników wpływająca na pożądaną

ekspresję genów i wprowadzenie takich metod będzie możliwe dopiero w sytuacji rzetelnego rozpoznania całej strefy epigenetycznej. Niemniej, w rozważaniach nad sensownością tego typu badań warto zauważyć fakt, że zaledwie 30 lat temu koncepcja materiału, który nie byłby odrzucany przez żywe tkanki, również była czymś abstrakcyjnym.

Obecnie różnorodność wykorzystywanych wyrobów oraz materiałów medycznych zaowocowała stworzeniem klasyfikacji oraz norm jakie dane produkty muszą spełniać, opartej między innymi na sposobie kontaktu z organizmami żywymi.

2.1.2 Wyroby medyczne do kontaktu z żywym organizmem

Wyroby medyczne do kontaktu z żywym organizmem można podzielić według kilku kategorii. Najczęściej wykorzystywaną klasyfikacją jest klasyfikacja wprowadzona w normie ISO 10993-1: „Biologiczna ocena wyrobów medycznych - Część 1: Ocena i badanie w procesie zarządzania ryzykiem”. Dzieli materiały według rodzaju kontaktu z organizmem oraz ze względu na czas trwania tego kontaktu. W pierwszym przypadku wyróżnia się [21]:

- wyroby kontaktujące się z powierzchnią (np. ze skórą, błonami śluzowymi czy uszkodzonymi powierzchniami)
- wyroby kontaktujące się zewnątrz (krew, tkanki miękkie, zębina)
- wyroby implantowane, czyli wszczepy, które mogą mieć kontakt z krwią, tkankami miękkimi czy kośćmi

Drugą grupę stanowią [21]:

- wyroby o ekspozycji ograniczonej – czas trwania jednorazowego kontaktu nie przekracza 24 godzin
- wyroby o przedłużonej ekspozycji – ich użycie wymaga kontaktu stałego, który jest dłuższy niż 24 godziny, ale krótszy niż 30 dni
- wyroby o stałym kontakcie, dłuższym niż 30 dni.

Materiały, których przeznaczeniem jest kontakt z organizmem człowieka muszą wykazywać szereg odpowiednich właściwości. Istotne jest, aby materiał spełniał wskazane wymogi fizykochemiczne oraz mechaniczne. Należy go również poddać badaniom biologicznym w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Dopiero uzyskanie zadowalających wyników umożliwia przeprowadzenie badań przedklinicznych i klinicznych [22]. W tabeli 1 przedstawiono kierunek badań laboratoryjnych w zależności od klasyfikacji materiału.

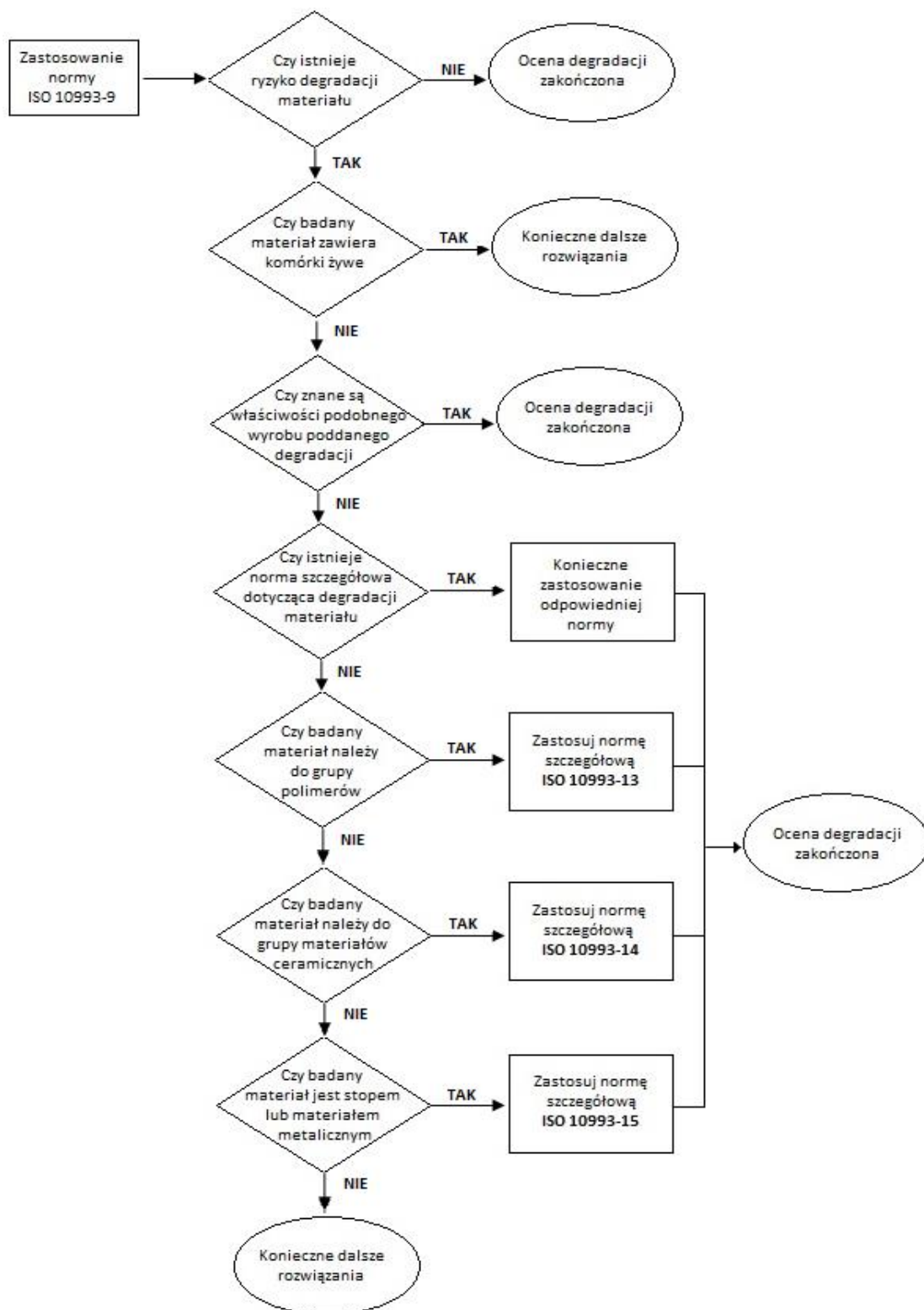
Bez względu na czas trwania i rodzaj kontaktu każdy materiał musi zostać przebadany pod kątem jego odporności i trwałości w warunkach, które są jak najbardziej zbliżone do tych występujących w organizmie ludzkim. Metody badań oraz podstawowe pojęcia zdefiniowane są w normie ISO10993 arkusz 9 – *Degradacja materiałów związanych z badaniami biologicznymi* [23]. Norma zobowiązuje do wykonania badań w przypadku, kiedy:

- materiał implantowany jest na okres dłuższy niż 30 dni,
- występuje uzasadnione podejrzenie uwalniania się substancji toksycznych do organizmu w warunkach pracy *in vitro* bądź *in vivo*,
- wyrób medyczny jest bioresorbowalny.

Prowadząc badania związane z degradacją ocenie poddawany jest zarówno sam materiał, jak i środowisko, w którym przebywał. Oznaczania produktów degradacji dokonuje się z wykorzystaniem metod z zakresu chemii analitycznej oraz inżynierii materiałowej. W momencie stwierdzenia nieprawidłowości bądź uszkodzeń w materiale po badaniach, należy ocenić go pod kątem zmian: morfologii powierzchni, biochemicznych oraz właściwości chemicznych i fizykochemicznych [24]. Schemat postępowania podczas oceny stopnia degradacji materiałów zgodnie z normą PN-EN ISO 10993-9 [23] przedstawiono na rysunku 1. W zależności od typu materiału stosuje się dedykowaną dla niego normę. Dla polimerów jest to norma PN-EN ISO 10993-13.

Tabela 1. Rodzaje badań laboratoryjnych dotyczących oceny biogodności w zależności od klasyfikacji materiału [22].

Klasyfikacja materiału ze względu na zastosowanie			Kierunek badań laboratoryjnych			
Rodzaj kontaktu		Czas kontaktu	Toksyczność ostra	Toksyczność Podostra i subchroniczna	Toksyczność chroniczna	Biogodność z krwią
Kategoria	Kontakt					
Biomateriały kontaktujące się z powierzchnią wewnętrzną	Skóra	< 24 h				
		24h – 30 dni				
		> 30 dni				
	Błony śluzowe	< 24 h				
		24 h – 30 dni				
		> 30 dni		x		
	Powierzchnie uszkodzone	< 24 h				
		24 h – 30 dni				
		> 30 dni		x		
Biomateriały kontaktujące się zewnętrznie	Układ krwionośny	< 24 h	x			x
		24 h – 30 dni	x			x
		> 30 dni	x	x	x	x
	Tkanka miękka, kość, zębina	< 24 h				
		24 h – 30 dni				
		> 30 dni				
	Krew krążąca	< 24 h	x			x
		24 h – 30 dni	x			x
		> 30 dni	x	x	x	x
Wyroby implantowane	Tkanka miękka, kość	< 24 h				
		24 h – 30 dni				
		> 30 dni			x	
	Krew	< 24 h	x			x
		24 h – 30 dni	x			x
		> 30 dni	x	x	x	x



Rysunek 1. Schemat postępowania podczas oceny stopnia degradacji materiałów zgodnie z normą PN-EN ISO 10993-9 [23].

Kolejną istotną grupą badań są badania cytotoksyczności. Główną wykorzystywaną normą, która określa warunki i sposób prowadzenia badań jest norma PN-EN ISO 10993-5: 2009, Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 5: Badania cytotoksyczności *in vitro*. W zależności od rodzaju materiału i jego przeznaczenia stosuje się różnego rodzaju rekomendowane linie komórkowe – fibroblasty, chondrocyty czy też osteoblasty. Norma przewiduje trzy rodzaje testów: analiza bezpośredniego kontaktu, dyfuzji w agarze oraz na wyciągach. Formy testu, podobnie jak linie komórkowe dobiera się w zależności od rodzaju analizowanego materiału i jego potencjalnego zastosowania. Przedstawione w normie procedury pozwalają na dokonanie jakościowej i ilościowej oceny toksyczności. Testy na wyciągach polegają na ocenie strukturalnych zmian komórek, wywołanych przez substancje wyekstrahowane z badanego materiału.

Ponadto warto wspomnieć o dodatkowych normach, które dotyczą oceny biogodności szczególnego rodzaju wyrobów medycznych, a które trzeba uwzględnić podczas dokonywania oceny biogodności pomimo, że nie należą one do norm zharmonizowanych. Przykładem jest tutaj norma obejmująca wyroby stomatologiczne [25] czy też implanty oftalmiczne [26].

Na podstawie tych analiz stosuje się pięciostopniową skalę, według której:

stopień 0 – **wyrób klasyfikowany jest jako nietoksyczny** – dopuszcza się możliwość istnienia/obserwacji pojedynczych, wewnątrz plazmatycznych ziarnistości.

stopień I – **wyrób klasyfikowany jest jako słabo toksyczny** – w wyrobach tego typu obserwuje się pojedyncze komórki, dopuszczalne jest także występowanie około 20% komórek zaokrąglonych bądź odklejonych,

stopień II – **wyrób klasyfikowany jest jako umiarkowanie toksyczny** – dopuszczalna jest umiarkowana liza komórek. Ponadto można zaobserwować zahamowanie proliferacji (w około 50 %) ilość komórek zaokrąglonych oscyluje w granicach 50%,

stopień III – **wyrób klasyfikowany jest jako średnio toksyczny**– w wyrobach tego typu następuje zahamowanie proliferacji, można zaobserwować zaawansowaną lizę komórek. W tym przypadku ilość komórek które się odlepiają i są zaokrąglone wynosi około 70 %,

stopień IV – **wyrób klasyfikowany jest jako silnie toksyczny** – w wyrobach, które zostały przyporządkowane do IV stopnia obserwuje się prawie całkowite zniszczenie hodowli.

Ocena jakościowa dla testu dyfuzji w agarze oraz ocena testu bezpośredniego kontaktu przebiega podobnie. Różnica polega na analizie zmian komórek z zachowaniem agarowego pośrednictwa lub w bezpośrednim kontakcie z badanym materiałem.

Do oceny jakościowej i ilościowej zwyczajowo stosowane są kolorymetryczne testy z wykorzystaniem barwników różnicujących komórki żywe i martwe oraz testy pozwalające określić aktywność mitochondriów; MTT, MTS, XTT. Każdy z tych testów posiada wady i pozwala jedynie w ograniczony sposób określić aktywność enzymów procesów oddychania komórkowego.

Testy cytotoksyczności wg standardowo najprostszych metod przeprowadza się w hodowli z wykorzystaniem płytek 24 lub 96 dołkowych. Komórki hoduje się w obecności badanego materiału od kilkunastu godzin do kilku dni, a następnie przeprowadza się ocenę. Określa się żywotność komórek i typy śmierci komórkowej. Żywotność komórek obrazowana jest za pomocą testów kolorymetrycznych, na przykład AlamarBlue, testu przemiany resazuryny do resorufiny lub testów, które wykorzystują barwniki fluorescencyjne oraz przeciwciała sprzężone z fluorochromami, które wykazują aktywność enzymatyczną lub poziom ATP.

Apoptozę i inne typy śmierci komórkowej można oceniać ilościowo metodą cytometrii przepływowej z wykorzystaniem barwnika jakim jest PI lub 7-AAD w połączeniu z aneksyną V lub znakując *in situ* aktywność kaspazy. Standardowo oznacza się aktywność kaspazy-3 i kaspazy-7.

Najczęściej stosowanym testem oznaczania cytotoksyczności w warunkach hodowli *in vitro* jest test MTT. Opiera się on na oznaczaniu aktywności dehydrogenazy bursztynianowej. Żywotność i/lub śmierć komórkową bada się również z wykorzystaniem testu luminescencyjnego ViaLight [27]. Polega on na bioluminescencyjnym wykrywaniu komórkowego ATP stanowiącego miarę żywotności. Pomiar ilości ATP jest nie tylko najdokładniejszym, ale również najbardziej wiarygodnym i bezpośrednim sposobem określania liczby żywych komórek w badanej kulturze komórkowej.

Inne metody obejmują ocenę morfologii komórek, której dokonuje się z wykorzystaniem elektronowej mikroskopii transmisyjnej, skaningowej jak i świetlnej. Po takiej ocenie szacuje się zdolność komórek do zasiedlania badanego materiału oraz bada ich zdolności do

proliferaacji i aktywności enzymatycznej. Pozytywne przejście przez wszystkie etapy i wskazane testy umożliwia podjęcie badań *in vivo*.

W dobie rozwoju technik diagnostyczno-biotechnologicznych istotne są również badania dotyczące genotoksyczności oraz onkogenezy. Ocenę transformacji nowotworowej wywoływanej przez związki chemiczne opiera się przede wszystkim na badaniach biochemicznych. W tym przypadku, badania *in vivo* na zwierzętach są kluczowe. Mimo licznych dyskusji nad etycznym punktem widzenia, ten etap badań nie może być pominięty, zwłaszcza w przypadku testowania leków czy biomateriałów. Pomimo, że badania te są drogie, czasochłonne i niestety wymagają czasem zadania cierpień zwierzętom, są obecnie jedyną dostępną metodą, dzięki której można przeanalizować oddziaływanie leku na organizm żywy jako całości, z wszystkimi współzależnościami odpowiedzialnymi za homeostazę.

Testy biologiczne wykorzystujące drobnoustroje przeprowadza się dla substancji rozpuszczalnych. Wykonuje się je zgodnie z wytycznymi Organizacji Współpracy Ekonomicznej i Rozwoju (OECD). Testy genotoksyczności są szczególnie istotne w przypadku biomateriałów związanych z medycyną regeneracyjną. Należy wykonać kilka różnych testów, ponieważ nie ma obecnie opracowanego jednego, który wykrywałby wszystkie jej typy [27][28]. Jednym z częściej wykonywanych obecnie testów jest test Ames opierający się na badaniach mutacji pierwotnych z wykorzystaniem histydyno-zależnych mutantów *Salmonella typhimurium*. Genotoksyczność w odniesieniu do komórek eukariotycznych, polega na analizie mutacji genu kinazy tymidynowej w komórkach chłoniaka myszy L5178Y [29]. Zgodnie z wytycznymi o których mowa w normie PN-EN ISO 10993-3:2014-12 oraz z wytycznymi OECD w celu badania genotoksyczności można zastosować opracowaną metodę obserwacji mikrojąder, stanowiących fragmenty chromosomów. Ich obecność świadczy o nieprawidłowościach podczas podziałów komórkowych. Test przeprowadza się na liniach komórkowych jajnika chomika chińskiego CHO-K1 [30]–[32].

Jednymi z najbardziej popularnych biomateriałów wykorzystywanych do wytworzenia wyrobów medycznych są biomateriały polimerowe, na których oparta została niniejsza praca.

2.1.3 Biomateriały polimerowe

Materiały polimerowe były wykorzystywane już od dawna – drewno, wszelkiego rodzaju włókna i skóry były znane już około 10000 lat przed naszą erą. Wraz z postępem czasu,

rozwojem nauki oraz przemysłu zaczęto wytwarzać polimery syntetyczne, do których można zaliczyć polietylen, poli(metakrylan metylu) czy polipropylen. Żeby mówić o biomateriałach polimerowych należy zdefiniować czym jest polimer oraz przybliżyć ich podział oraz sposoby otrzymywania.

2.1.3.1 Polimery – podstawowe pojęcia i podział

Polimery to struktury łańcuchowe składające się z ogniw połączonych wiązaniami kowalencyjnymi [33]. Ich cechą charakterystyczną jest występowanie **merów** - powtarzających się ugrupowań atomów, które budują makrocząsteczki. **Stopień polimeryzacji** określa liczbę merów w cząsteczce, który w przybliżeniu jest równy ilorazowi średniej masy cząsteczkowej polimeru i masy cząsteczkowej monomeru. **Monomerem** nazywamy związek wyjściowy do otrzymywania polimeru [34].

Jeden z podziałów polimerów związany jest z budową makrocząsteczek i obejmuje [35]:

– polimery liniowe

- liniowe, nierozgałęzione
- liniowe, rozgałęzione
 - ✓ rozgałęzione o przypadkowej długości rozgałęzień
 - ✓ rozgałęzione o jednakowej długości rozgałęzień – grzebieniowe
 - ✓ gwiazdowe
 - ✓ gwiazdowe dendrytyczne
- liniowo-cykliczne
- liniowo-dwupasmowe
 - ✓ drabinkowe
 - ✓ spiro

– polimery usieciowane

Inny podział dotyczy pochodzenia i sposobu otrzymywania. Wyróżnia się wtedy polimery **naturalne**, **polimery naturalne i modyfikowane** oraz **polimery syntetyczne** [35][36]. Ponadto wyróżnia się jeszcze **homopolimery** – otrzymywane z jednego monomeru i **kopolimery** – zbudowane z dwóch lub więcej różnych monomerów. Ze względu na właściwości fizyczne rozróżnia się **polimery termoplastyczne**, które mięknią podczas ogrzewania, co sprawia, że łatwo je wtedy formować oraz **polimery chemoutwardzalne** i **termoutwardzalne**. Ten typ polimerów twardnieje pod wpływem temperatury bądź obecności odpowiedniego związku chemicznego, nie topi się i nie płynie co sprawia, że trudno je formować. Biorąc pod uwagę właściwości reologiczne polimery dzieli się na **elastomery** – łatwo odkształcalne i **plastomery** wykazujące małe odkształcenia pod wpływem naprężenia.

Istotny, pod kątem właściwości, jest również sam sposób otrzymywania polimerów.

2.1.3.2 Sposoby otrzymywania polimerów

Zdecydowana większość polimerów, które są produkowane na skalę masową otrzymywana jest metodami polimeryzacji, wśród których można wyróżnić polimeryzację rodnikową, jonową, anionową, kationową czy też koordynacyjną [34].

2.1.3.3.1 Polimeryzacja rodnikowa

Rozpoczyna się od reakcji inicjowania (zwykle jest to termiczny rozpad związku chemicznego, pod wpływem działania promieniowania jonizującego), w której dochodzi do utworzenia wolnego rodnika, zdolnego do przyłączenia cząsteczki monomeru i utworzenia nowego rodnika. W kolejnym etapie następuje wzrost łańcucha. Do aktywnego centrum, jakim jest utworzony wcześniej rodnik, przyłączają się kolejne cząsteczki monomeru. Na końcu rosnącego łańcucha za każdym razem odtwarza się rodnik, do którego może przyłączyć się następna cząsteczka monomeru. Czas życia rodników jest krótki, ponieważ reagują one ze sobą, co przyczynia się do terminacji czyli zakończenia wzrostu łańcucha [33][36].

2.1.3.3.2 Polimeryzacja rodnikowa żyjąca/kontrolowana

Ten rodzaj polimeryzacji został odkryty końcem XX wieku i jest związany z czynnikiem, który przeprowadza rodnik w postać nieaktywną. Postać nieaktywna jest zdolna do ponownego rozpadu z utworzeniem rodnika w dowolnym momencie. Jest to więc odwracalna aktywacja uspiionych rodników, które pozostają w równowadze z wolnym rodnikiem i czynnikiem dezaktywującym, towarzysząca reakcjom inicjowania, wzrostu i zakończenia łańcucha.

2.1.3.3.3 Polimeryzacja koordynacyjna

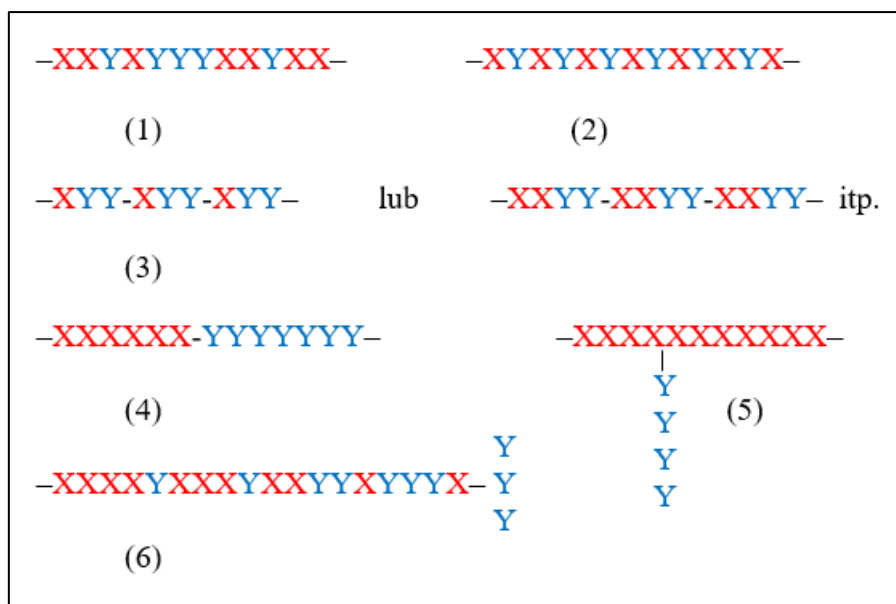
Rozwój polimeryzacji koordynacyjnej został zapoczątkowany w wyniku odkrycia przez Karla Zieglera i Giulio Nattę katalizatorów niskociśnieniowej polimeryzacji etylenu oraz stereospecyficznego polimeryzacji propylenu w 1953 roku [34]. Niezwykle istotne jest to, że zmieniają się parametry polimeryzacji etylenu – w obecności katalizatorów koordynacyjnych polimeryzacja zachodzi przy niewielkim nadciśnieniu oraz w temperaturze pokojowej. W mechanizmie rodnikowym wytwarzanie polietylenu wymaga ekstremalnych wartości ciśnienia i temperatury (do 200°C i 1000 do 2000 atm). Dzięki polimeryzacji koordynacyjnej możliwe stało się również uzyskanie polimerów stereoregularnych.

2.1.3.3.4 Elektropolimeryzacja

Elektropolimeryzacja stanowi alternatywę dla chemicznej syntezy polimerów przewodzących. W metodzie tej przewodzący polimer jest formowany i osadzany z roztworu monomeru na przewodzącym podłożu (powierzchnia elektrody) [38][39]. Metoda ta stosowana jest w przypadku powlekania stosunkowo niewielkich obszarów. Istotne jest zachowanie szczególnej ostrożności przy wyborze warunków elektropolimeryzacji, w szczególności przyłożonego potencjału i prądu. Zastosowany potencjał powinien być wystarczająco wysoki, aby utlenić monomer i wywołać proces polimeryzacji, ale wystarczająco niski, aby nie rozpuścić metalu (materiału, na którym osadzamy powłokę) lub nie wywołać korozji. Powłokę elektrochemiczną otrzymuje się zazwyczaj w ogniwie elektrochemicznym składającym się z podłoża, które ma być powleczone – elektroda pracująca, dwóch materiałów obojętnych stanowiących przeciwelektrody (zwykle wykonane z platyny) i elektrody odniesienia (zazwyczaj Ag/AgCl lub SCE). Roztwór polimeryzacji zawiera monomer, rozpuszczalnik i elektrolit podtrzymujący. Metodę tę można dalej podzielić na potencjodynamiczną, galwanostatyczną i elektropolimeryzację potencjostatyczną. Właściwości otrzymanego produktu zależą od rodzaju rozpuszczalnika, elektrolitu i stosowanych dodatków, w tym zawartości wody w rozpuszczalniku aprotonowym [34].

2.1.3.3.1 Kopolimeryzacja

Kopolimerami nazywa się polimery otrzymane z więcej niż jednego monomeru. W zależności od sposobu prowadzenia reakcji można otrzymać produkty o różnej budowie. W przypadku kopolimerów otrzymanych z dwóch monomerów, X i Y, wyróżnić można sześć podstawowych struktur przedstawionych na rysunku 2 [34]. Należy do nich struktura: statystyczna (1) – o przypadkowym ułożeniu merów; naprzemienna (2) – monomer X przyłącza się tylko i wyłącznie do centrum aktywnego Y i odwrotnie; okresowa (3) – charakteryzująca się obecnością identycznych, powtarzających się jednostek zbudowanych z merów X i Y; blokowa (4) – najprostsza składa się z jednego bloku X i jednego Y (typ XY); szczepiona (5) – łańcuch boczny różni się od łańcucha głównego; gradientowa (6), w której liczba jednego z merów stopniowo maleje a drugiego zwiększa się [34].



Rysunek 2. Budowa kopolimerów zbudowanych z dwóch monomerów – "X" i "Y"

2.1.3.2.6 Polikondensacja

Polikondensacja to alternatywna metoda syntezy polimerów względem polimeryzacji łańcuchowej. Polega na wielokrotnej kondensacji grup funkcyjnych, które w momencie rozpoczęcia procesu znajdują się w monomerze, a następnie na końcach rosnących łańcuchów [33]. Reakcja ta wymaga również dostarczenia energii z zewnątrz (nie jest reakcją samorzutną).

W praktyce wyróżnia się trzy metody prowadzenia polikondensacji: w stopie, w roztworze i na granicy faz. Najczęściej stosowaną metodą w przemyśle jest metoda w stopie. Przeprowadza się ją z użyciem wysokich temperatur sięgających nawet do 300°C oraz w atmosferze gazu obojętnego. Monomer znajduje się w stanie stopionym stanowiąc jednocześnie rozpuszczalnik powstającego polimeru. W celu usunięcia produktu małowcząsteczkowego proces kończy się pod zmniejszonym ciśnieniem. Polikondensacja w roztworze stosowana jest, kiedy monomery i polimer są nietrwałe w podwyższonych temperaturach. Uzyskanie wysokiego stopnia przemiany związane jest z użyciem rozpuszczalnika, w którym małowcząsteczkowy produkt jest słabo rozpuszczalny, lub z którym tworzy mieszaninę azeotropową, co przyczynia się do jego łatwego usunięcia. Proces międzyfazowy opiera się na udziale dwóch monomerów rozpuszczonych w dwóch niemieszających się cieczach. Polimer powstaje na granicy faz. Jedną z najważniejszych zalet tej metody jest duża szybkość reakcji w stosunkowo niskich temperaturach [34].

2.1.3.2.7 Poliaddycja

Poliaddycja ma charakter pośredni pomiędzy procesami polimeryzacji a polikondensacji i zachodzi stopniowo, bez wydzielania produktu ubocznego. Jest to proces nieodwracalny. Otrzymane w ten sposób polimery mają ten sam skład chemiczny, co wykorzystane monomery, różnica występuje w budowie. Istotny jest również fakt, że nie zachodzi reakcja zakończenia łańcucha a stopień polimeryzacji wzrasta wraz z postępem reakcji w analogiczny sposób jak podczas procesu polikondensacji, jednak zupełnie inaczej niż ma to miejsce w procesach polimeryzacji żyjącej i rodnikowej [34].

2.1.3.2.8 Polimeryzacja jonowa żyjąca

Pojęcie „polimeryzacji żyjącej” i „polimerów żyjących” wprowadzone zostało przez Szwarcza w 1956, który opisał ją po raz pierwszy dla styrenu i izoprenu [40][41]. Zgodnie z definicją polimeryzacja żyjąca jest polimeryzacją łańcuchową, w której wyeliminowano reakcję zakończenia i przeniesienia łańcucha. Taki przypadek osiągnięty został tylko dla kilku systemów polimeryzacji anionowej, w pozostałych można mówić o „tak zwanej” żyjącej polimeryzacji, ponieważ systemy te nie są wolne od reakcji takich jak wspomniana wcześniej terminacja czy przeniesie łańcucha [42]. Proces polimeryzacji żyjącej związany jest z liniowym wzrostem masy cząsteczkowej polimeru wraz z konwersją monomeru. Z reguły po bardzo szybkim inicjowaniu, zachodzi wyłącznie wzrost łańcucha. Sam proces podlega czterem regułom [34]:

- stężenie rosnących łańcuchów równe stężeniu centrów aktywnych jest stałe,
- stopień polimeryzacji (a więc i masa cząsteczkowa polimeru) rośnie liniowo wraz z konwersją monomeru,
- dyspersyjność polimeru maleje w czasie procesu polimeryzacji osiągając wartość końcową zbliżoną do jedności,
- funkcyjność polimeru równa jest przewidywanej i pozostaje stała podczas procesu polimeryzacji.

Odkrycie procesu polimeryzacji żyjącej umożliwiło wytworzenie nowych rodzajów polimerów o specjalnych właściwościach jak i budowie, które bazowały na znanych wcześniej monomerach.

2.1.3.2.9 Polimeryzacja jonowa

W zależności od ładunku zlokalizowanego na aktywnej grupie końcowej wyróżnia się polimeryzację **klasyczną kationową** – ładunek dodatni, **pseudokationową** (kationowo-koordynacyjna) – dodatnio naładowany fragment aktywnego dipolu oraz **anionową** – ładunek ujemny. W układzie musi być również obecny przeciwjon, który zapewni równowagę ładunków elektrycznych [34]. Pozostające w bezpośrednim kontakcie kationy i aniony tworzą pary jonowe. W wyniku ich rozpadu dochodzi do utworzenia wolnych jonów. Położenie stanu równowagi pomiędzy różnymi postaciami jonowych centrów aktywnych zależy od czynników takich jak: temperatura, polarność rozpuszczalnika, stężenie roztworu oraz dodatek ligandów, do których należą glimy – etery liniowe, etery koronowe – etery cykliczne czy też kryptandy – etery bicykliczne. Dodatek ligandu powoduje rozdzielenie par jonowych i zwiększenie stężenia wolnych jonów [34]. Nawet relatywnie niewielki przyrost stężenia wolnych jonów wpływa na przebieg procesu polimeryzacji, co ma związek z ich na ogół znaczenie wyższą reaktywnością w porównaniu do par jonowych. W procesie jonowym trzeba więc wziąć pod uwagę obecność różnych rodzajów centrów aktywnych, charakteryzujących się różnym stopniem oddziaływania pomiędzy kationem i anionem. Z powodu odpychania się centrów aktywnych, reakcja zakończenia łańcucha w postaci takiej jak ma to miejsce w procesie polimeryzacji rodnikowej nie jest możliwa. Zakończenie wzrostu makrocząstek następuje zazwyczaj poprzez wprowadzenie czynnika reagującego z centrami aktywnymi. Wzrost łańcucha może zostać zakończony także w wyniku reakcji jego przeniesienia.

2.1.3.2.10 Inne metody syntezy

Pozostałe metody otrzymywania polimerów są wykorzystywane, wówczas gdy nie istnieją niezbędne do tego celu monomery. Jednym z przykładów jest PVA. Powstaje on na skutek przekształcenia innego polimeru i jako jeden z nielicznych jest rozpuszczalny w wodzie [34].

W dalszej części pracy przedstawiono pokrótce charakterystykę wybranych materiałów polimerowych. Ich wyboru dokonano w oparciu o możliwość zastosowania w branży medycznej, uwzględniając najczęściej stosowane.

2.1.3.3 Charakterystyka wybranych polimerów do zastosowań medycznych

W ostatnich latach obserwuje się olbrzymi wzrost zainteresowania materiałami polimerowymi, zwłaszcza w aspekcie zastosowania w szeroko pojętej branży medycznej i ochronie zdrowia. Polimery znalazły zastosowanie w tak różnorodnych dziedzinach

biomedycznych jak inżynieria tkankowa, implantacja urządzeń medycznych i sztucznych narządów oraz protez, okulistyka, stomatologia, rekonstrukcja kości i wiele innych [42]. Podczas gdy pierwotne zastosowania polimerów w chirurgii skupiały się głównie na zastępowaniu tkanek łącznych, postęp w dziedzinie biologii molekularnej i biologii rozwoju sprawił, że pojawiło się wiele nowych możliwości wykorzystania. Zastosowania w stosunkowo nowej dziedzinie jaką jest inżynieria tkankowa, są niezwykle obiecujące. W tej dziedzinie polimery są wykorzystywane do wspomagania regeneracji trójwymiarowych struktur tkanek i narządów [43].

Przykładami polimerów, które znalazły zastosowanie biomedyczne są: PE, PU, PTFE, PA, PMMA, PET, SR, PSU, PEEK, PGA i PLA. Wśród kompozytów można wymienić na przykład: CF/UHMWPE, CF/żywica epoksydowa i CF/PEEK [44].

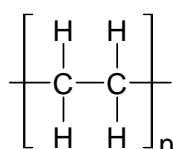
W ortopedii i traumatologii kluczową rolę odgrywa UHMWPE, który jest stosowany w konstruowaniu panewek i elementów ślizgowych w endoprotezach stawu biodrowego i kolanowego. Dodatkowo wykorzystuje się również cement kostny na bazie PMMA. W chirurgii kręgosłupa – na trzpienie i śruby stosowany jest PEEK. Protezy więzadeł, ścięgien wykonuje się z PET. Śruby, trzpienie czy płytki wykorzystywane w chirurgii szczękowo-twarzowej wykonywane są z PGA, PLA oraz ich kopolimeru – PLGA [45]. Do materiałów takich jak nici chirurgiczne wykorzystuje się PE, PP, PTFE, PET tudzież PGA, czy PLGA. W chirurgii naczyniowej na protezy naczyń krwionośnych używa się ePTFE lub dzianin z PET. W chirurgii plastycznej dominują materiały silikonowe, z których wytwarzane są elementy takie jak protezy piersi. Do regeneracji nerwów stosuje się rurki wykonane z PGA oraz PVA. W protetyce stomatologicznej wykorzystuje się PMMA, a w nowoczesnych wypełnieniach kompozytowych matrycę wytwarza się z Bis-GMA [46]. Materiały przeznaczone do krótkotrwałego kontaktu z tkankami bazują na poliuretanach, silikonach oraz PVC, PEG, PVP. Inną grupą są polimery stosowane w dializatorach. Należą do nich PSU. Pojemniki na krew wykonuje się z plastyfikowanego PVC a strzykawki z PP.

W kolejnych podrozdziałach skupiono się na charakterystyce i zastosowaniach konkretnych polimerów z uwzględnieniem aspektu medycznego.

2.1.3.3.1 Polietylen

Polietylen (rys.3), zaliczany do grupy poliolefin, otrzymywany jest zazwyczaj wyniku polimeryzacji etenu – C₂H₄. W zależności od warunków procesu syntezy wyróżnia się kilka

rodzajów polietylenu. Należą do nich polietylen o niskiej gęstości – LDPE nazywany też polietylenem wysokociśnieniowym, o średniej gęstości MDPE oraz polietylen o dużej gęstości HDPE, funkcjonujący również pod nazwą polietylenu niskociśnieniowego. Ponadto wyróżnia się jeszcze polietylen liniowy o małej gęstości – LLDPE, polietylen o dużej masie cząsteczkowej – HMWPE oraz o ultrawysokiej masie cząsteczkowej UHMWPE. Każdy rodzaj charakteryzuje się innymi właściwościami.



Rysunek 3. Wzór strukturalny polietylenu.

LDPE otrzymywany jest z etenu, zwyczajowo nazywanego również etylenem, w fazie gazowej pod ciśnieniem 150 – 350 MPa [47]. Temperatura procesu waha się w zakresie od 150-300°C. Reakcję prowadzi się w autoklawach i reaktorach rurowych wykorzystując polimeryzację wolnorodnikową z udziałem wodorotlenków lub nadtlenków pełniących funkcję katalizatorów. Specyficzna budowa LDPE charakteryzująca się łańcuchami z licznymi odgałęzzeniami bocznymi sprawia, że oddziaływania jakie występują między cząsteczkami są słabsze, co wpływa bezpośrednio na słabszą wytrzymałość, stabilność termiczną oraz gęstość a lepszą odkształcalność w porównaniu do innych odmian PE. LDPE ma gęstość 0,915-0,935 g/cm³, masę cząsteczkową 50-200 kDa a jego krystaliczność wynosi 35-55%. Ponadto charakteryzuje się modułem Younga o wartości 0,1-0,5 GPa i wskaźnikiem płynięcia 2,17g/10min [47], [48]. Jego zastosowanie jest bardzo szerokie - dzięki podatności na zgrzewanie stosuje się go do produkcji opakowań w postaci torebek czy folii (folie termokurczliwe, folie ogrodnicze) oraz do wytwarzania butelek i strzykawek.

HDPE funkcjonujący również pod nazwą polietylenu niskociśnieniowego otrzymywany jest dwoma metodami. Pierwsza z nich – średniociśnieniowa (Philipsa), bazuje na ciśnieniu 3-4 MPa i temperaturze 85-180°C, wykorzystując tlenek chromu spełniający funkcję katalizatora. Drugą metodą jest metoda niskociśnieniowa, znana również jako metoda Zieglera. Temperatura tego procesu waha się w zakresie 50-70°C, a reakcję prowadzi się pod ciśnieniem normalnym lub nieco podwyższonym 0,3-0,5 MPa. Katalizatorami są estry tytanowe, oraz chlorowce. W porównaniu do LDPE charakteryzuje się on łańcuchami nie posiadającymi praktycznie żadnych bocznych odgałęzień, co sprawia, że parametry takie jak gęstość (0,940-0,965 g/cm³) stabilność termiczna, stopień krystaliczności (60-80%) czy wytrzymałość są

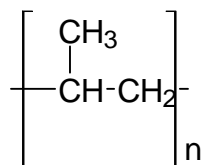
wyższe. Moduł Younga wynosi 0,4-1,5 GPa. Istotną cechą jest również jego odporność na wyższe temperatury (nawet do 120°C w czasie krótkotrwałej ekspozycji podczas gdy LDPE wykazuje odporność tylko do 95°C w takich samych warunkach).

Wspólną cechą łączącą wszystkie rodzaje polietylenu jest brak możliwości ich sterylizacji w autoklawie parowym.

Z punktu widzenia zastosowania w obszarze związanym z implantologią oraz szeroko rozumianą inżynierią biomedyczną największą rolę odgrywa UHMWPE. Charakteryzuje się on przede wszystkim wysoką odpornością na zużycie, powierzchnią o niskim współczynniku tarcia, biologiczną obojętnością, wysoką wytrzymałością, odpornością na pęcznienie [49]. Jego gęstość wynosi 0,930 – 0,935 cm³ a stopień krystaliczności 50-60%. Otrzymywany jest z wykorzystaniem katalizatorów Zieglera-Natta oraz metallocenowych, pod ciśnieniem 3,5 MPa i temperaturze w zakresie od 130 do 150°C. Moduł Younga (0,3-0,8 GPa), wytrzymałość na rozciąganie 39-49 MPa oraz inne wymienione wyżej właściwości wynikają z oddziaływań sił van der Waalsa, które występują pomiędzy długimi łańcuchami polimeru, tworzącymi w stanie krystalicznym, formę płaskiego zygzaka [48]. Od lat sześćdziesiątych, UHMWPE jest jednym z najważniejszych materiałów wykorzystywanych w całkowitej wymianie stawu biodrowego i kolanowego – głównie w połączeniu z metalowym lub ceramicznym nośnikiem. Obecnie badania prowadzi się w kierunku przedłużenia żywotności całego stawu – ścieranie przez ceramiczną bądź metaliczną główkę powierzchni panewki może powodować problemy takie jak osteoliza czy związane z obłuzowaniem konstrukcji. W celu zapobiegania ich wystąpieniu należy zapewnić wystarczającą odporność na zużycie oraz zapewnić trwałość oksydacyjną materiału. Oba czynniki należy rozważać z uwzględnieniem właściwości mechanicznych – tak, aby nie uległy one znacznemu pogorszeniu [50], [51]. Jednym z rozwiązań jest zastosowanie HAp, który ułatwia powstawanie wiązania biologicznego między implantem a komórki ludzkimi. Ostatnie badania wykazały, że dodanie HAp do matrycy polimerowej powoduje zwiększenie właściwości mechanicznych i tribologicznych. Ponadto poprawia również tworzenie rzeczywistego wiązania pomiędzy materiałem a żywym organizmem, ponieważ HAp jest głównym składnikiem mineralnej części kości ludzkiej [52]. Z UHMWPE wytwarza się głównie panewki endoprotez stawu biodrowego. Rozwój technologii przetwarzania materiałów umożliwił uzyskanie formy włóknistej, co znacząco poprawia właściwości mechaniczne. Z otrzymanych włókien wytwarza się wysokowytrzymałe nici chirurgiczne oraz materiały kompozytowe [52].

2.1.3.3.2 Polipropylen

Polipropylen (rys. 4) jest biokompatybilnym i biostabilnym polimerem, wykazującym dobre właściwości mechaniczne, co pozwala na wykorzystywanie go w dziedzinie biomedycyny związanej z naprawą i regeneracją kości.



Rysunek 4. Wzór strukturalny polipropylenu.

Nie jest on jednak całkowicie wolny od wad – charakteryzuje się niską energią powierzchni, co przekłada się na gorsze właściwości adhezyjne i ograniczenie stosowania go w innych dziedzinach biomedycznych [53]. Nie ma też właściwości przeciwbakteryjnych. W rezultacie bakterie łatwo go kolonizują i należy dokonać modyfikacji, aby uczynić go antybakteryjnym [54]. Otrzymywany jest w wyniku niskociśnieniowej polimeryzacji propenu (propylenu) w obecności katalizatorów (proces Zieglera-Natty). Reakcja może zachodzić w fazie gazowej lub w roztworze w zakresie temperatur od 50 do 100°C [33]. W zależności od warunków polimeryzacji oraz użytego katalizatora można otrzymać polimery o różnej budowie przestrzennej związane z różnym położeniem grup metylowych. I tak wyróżnia się [33], [55]:

- polipropylen izotaktyczny (wszystkie grupy metylowe znajdują się po jednej stronie łańcucha), charakteryzujący się uporządkowaną strukturą przestrzenną i wysokim stopniem krystaliczności, mającym najlepsze właściwości mechaniczne spośród możliwych odmian oraz najwyższą odporność cieplną;

- polipropylen ataktyczny (grupy metylowe są ułożone losowo po obu stronach łańcucha) mający postać amorficzną (struktura nieuporządkowana) charakteryzujący się właściwościami zbliżonymi do niewulkanizowanej gumy;

- polipropylen syndiotaktyczny (naprzemienne ułożenie grup metylowych), częściowo krystaliczny, charakteryzujący się właściwościami pośrednimi pomiędzy między polipropylem ataktycznym i izotaktycznym.

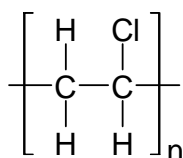
Polipropylen jest jednym z najczęściej stosowanych polimerów do produkcji opakowań oraz w innych zastosowaniach przemysłowych ze względu na niski koszt i doskonałe właściwości, takie jak niska gęstość – 0,900-0,915 g/cm³ i wysoka odporność chemiczna [54].

Ponadto jest jednym z najczęściej stosowanych materiałów dielektrycznych w przemyśle elektrycznym, zwłaszcza w kondensatorach mocy i kablach energetycznych [56]. Technologia przetwarzania jest zbliżona do przetwórstwa polietylenu. Wykorzystuje się metody wytłaczania, formowania próżniowego, wtrysku czy prasowania. Można z niego formować wyroby cienkościenne.

Oprócz regeneracji kosztnej wykorzystywany jest do produkcji nici chirurgicznych, siatek służących do operacyjnego leczenia przepuklin oraz taśm TVT (ang. tension free vaginal tape), które wykorzystywane są przy chirurgicznym leczeniu nietrzymania moczu u kobiet [47].

2.1.3.3.3 Poli(chlorek winylu)

PVC (rys.5) należy do jednych z najstarszych materiałów syntetycznych. Jest wytwarzany od lat trzydziestych XX wieku w skali przemysłowej.



Rysunek 5. Wzór strukturalny poli(chlorku winylu).

Otrzymywany jest w wyniku polimeryzacji chlorku etenu, funkcjonującego również pod nazwą chlorku winylu. Pierwszy etap produkcji to połączenie etylenu i chloru w celu utworzenia produktu pośredniego - ditlenku etylenu. W kolejnym etapie jest on przekształcany w chlorek winylu, który stanowi właściwy monomer wyjściowy. PVC w przemyśle można otrzymać stosując jedną z trzech metod [58]:

- polimeryzację emulsyjną, która polega na emulgowaniu chlorku winylu z wodą z użyciem odpowiednich emulgatorów. Proces prowadzi się w sposób periodyczny lub ciągły w reaktorach, które zaopatrzone są w system wymiany ciepła oraz mieszadło. Pierwszym etapem jest wprowadzenie mieszaniny zawierającej monomer, wody destylowanej oraz środków emulgujących. Następnie produkty te podgrzewa się jednocześnie mieszając, aż do utworzenia emulsji. Otrzymany produkt poddaje się procesowi suszenia. Tak uzyskany polimer charakteryzuje się dobrą przezroczystością i chłonnością wody. W porównaniu do produktów wytworzonych pozostałymi metodami (polimeryzacja suspensyjna, polimeryzacja w masie) wykazuje gorsze właściwości elektroizolacyjne;

– polimeryzację suspensyjną – najczęściej stosowana metoda [47], wykorzystująca inicjatory rodnikowe oraz stabilizatory suspensji. Proces prowadzi się w reaktorze periodycznym w około 60°C. Końcowy produkt charakteryzuje się dobrymi właściwościami elektroizolacyjnymi;

– polimeryzację w masie – wykorzystującą inicjatory rodnikowe. Otrzymany produkt charakteryzuje się doskonałymi właściwościami, jednak koszt tego procesu sprawia, że jest stosowany rzadziej.

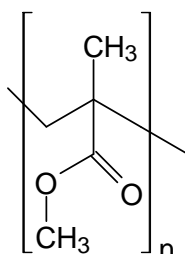
PVC jest szeroko stosowany w życiu codziennym jak i przemyśle ze względu na jego niski koszt wytwarzania (jest znacznie tańszy niż polianilina, politiofen i polipirol [58]), lekkość, odporność chemiczną oraz odporność na korozję [61]. Ze względu na doskonałe właściwości mechaniczne i termiczne jest wykorzystywany w różnych dziedzinach, takich jak budownictwo, do produkcji urządzeń gospodarstwa domowego, motoryzacji, produkcji opakowań, wytwarzania produktów elektronicznych, elektrycznych czy mebli [60]. Jego gęstość mieści się w zakresie 1,16-1,70 g/cm³. W zależności od ilości plastyfikatorów różni się PVC twardy oraz miękki. Odmiana twarda zawiera do 5% plastyfikatorów, charakteryzuje się wytrzymałością na rozciąganie wynoszącą około 75 MPa i modułem Younga nie przekraczającym 4 GPa. Odmiana miękka zawiera już znacznie więcej dodatków plastyfikujących, najczęściej 25-30%, jednak zdarza się, że ich udział procentowy wynosi nawet 70. Tym samym jej moduł Younga jest znacznie niższy niż odmiany twardej i oscyluje w granicach 1,8 GPa [47].

W przemyśle medycznym wykorzystuje się głównie odmianę miękką. Z PVC wytwarza się cewniki, worki na krew, zestawy: do przetaczania krwi, do stomii, hemodializy czy żywienia pozajelitowego. Obecnie prowadzone są badania mające na celu zastąpienie toksycznego plastyfikatora ftalanowego – di(2-etyloheksylu) – DEHP (najczęściej używany w procesie produkcji odmiany miękkiej). Badania na zwierzętach wykazały, że przyczynia się on do zaburzeń płodności oraz ma negatywny wpływ na proces krzepnięcia krwi [47]. Zmiana modyfikatora pozwoli na wytworzenie znaczenie bezpieczniejszych produktów zapewniając większy komfort zarówno dla użytkownika (pacjenta) jak i personelu medycznego [61].

2.1.3.3.4 Poli(metakrylan metylu)

Najbardziej znanym przedstawicielem poliakrylanów – pochodnych kwasu akrylowego – jest PMMA (rys. 6) będący liniowym polimerem termoplastycznym. Charakteryzuje się on

wysokim modułem Younga – 3-4,8 GPa oraz dobrymi właściwościami mechanicznymi w porównaniu do innych polimerów. Do jego cech należy również bardzo dobra przepuszczalność światła widzialnego, nieprzepuszczalność dla wody i powietrza oraz łatwość przetwórstwa. Wszystko to sprawia, że znalazł zastosowanie w wielu dziedzinach przemysłu i medycyny.



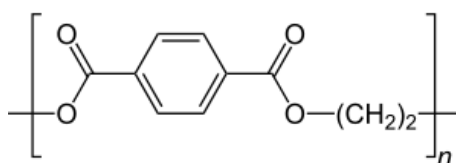
Rysunek 6. Wzór strukturalny poli(metakrylanu metylu).

PMMA jest otrzymywany w wyniku procesu polimeryzacji metakrylanu metylu. W zależności od warunków jego prowadzenia uzyskuje się polimer ataktyczny, syndiotaktyczny bądź izotaktyczny. Materiały na bazie akrylowej lub polimetakrylanu metylu wykorzystywano do zastosowań biomedycznych od lat 30-tych XX wieku. Po raz pierwszy wprowadzono je do odontologii a następnie do zastosowań ortopedycznych. Obecnie akrylowe cementy kostne są przede wszystkim stosowane w operacjach wymiany stawów [62]. Należy jednak wziąć pod uwagę toksyczność monomerów, które pozostają w momencie braku całkowitego przereagowania i możliwość wystąpienia nekrozy tkanek na skutek zbyt dużej ilości ciepła wydzielonego w czasie procesu polimeryzacji [48]. PMMA wykorzystuje się również do produkcji sztucznych kości, protez i wewnątrzgałkowych soczewek okulistycznych. Bezpośredni kontakt z krwią i tkankami wewnątrz ludzkiego ciała, sprawia, że ulega on z czasem degradacji z powodu słabych właściwości powierzchniowych, do których zalicza się mały kąt zwilżania, niższą twardość w porównaniu do innych polimerów, słabą odporność na zużycie i podatność na uszkodzenia. Degradacja biomateriału może powodować reakcje wrażliwych tkanek z implantem bądź protezą skutkując zakażeniami. Dlatego też stosuje się modyfikację powierzchni mającą na celu poprawę właściwości powierzchniowych [63].

2.1.3.3.5 Poli(tereftalan etylenu)

PET (rys. 7) to semikrystaliczny, termoplastyczny poliester o bardzo dobrych właściwościach mechanicznych (gęstość mieści się w zakresie 1,31-1,38 g/cm³, moduł

Younga 3-4,9 MPa), i bezpieczeństwie użytkowania. Do jego wytworzenia wykorzystuje się półprodukty – czysty TPA i EG, pochodzące najczęściej z ropy naftowej [64]. Produkty te ogrzewa się i w wyniku otrzymuje BHET stanowiący monomer, zmieszany z polimerami o małej masie cząsteczkowej (oligomerami). Kolejnym krokiem jest oddestylowanie nadmiaru glikolu etylenowego i utworzenie PET w wyniku polikondensacji otrzymanego monomeru w obecności katalizatora metalicznego. Na tym etapie PET jest lepka, stopioną cieczą. Należy poddać go chłodzeniu i hartowaniu w wodzie, aby utworzyć podobny do szkła, bezpostaciowy materiał. Niektóre PET są również wytwarzane przy użyciu technologii opartej na DMT [65].



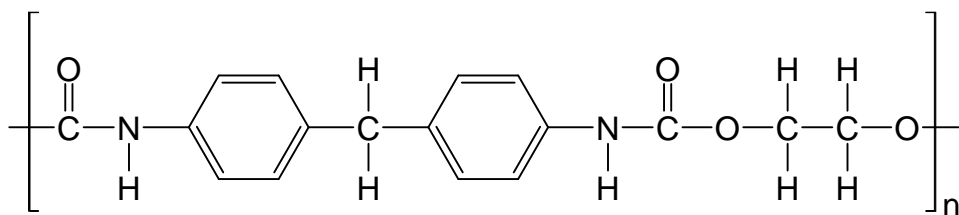
Rysunek 7. Wzór strukturalny poli(teraftalanu etyleny).

Jego unikalny zestaw właściwości, w tym wysoka temperatura topnienia (zakres 245-255°C) sprawia, że jest to najbardziej znany i powszechnie stosowany poliester na całym świecie. Wykorzystuje się go do produkcji butelek, pojemników i folii. Jego odporność chemiczna (na słabe kwasy, tłuszcze oraz oleje) sprawia, że jest jednak trudny do rozłożenia w środowisku naturalnym. Jego przewidywany, naturalny czas życia wynosi od 25 do 50 lat [67] [68].

W praktyce medycznej wykorzystuje się go jako materiał do produkcji protez naczyniowych oraz na protezy ścięgien, więzadeł, mankiety do szycia zastawek serca [67] i nici chirurgiczne. Ponadto jest stosowany w formie włókienek, z których można wykonać matrycę, co jest niezwykle korzystne ze względu na możliwość uzyskania dużej, porowatej powierzchni [68].

2.1.3.3.6 Poliuretany

Spośród szeregu polimerów niedegradowanych, poliuretany (rys.8) stanowią grupę o szerokim zastosowaniu nie tylko w przemyśle, ale również w obszarach związanych z inżynierią biomedyczną, takich jak inżynieria tkankowa, implanty ortopedyczne, plastry przezskórne, cewniki i systemy dostarczania leków [69].



Rysunek 8. Wzór strukturalny poliuretanu.

Tak duże możliwości związane są z jego właściwościami – PU jest łatwo przetwarzalnym polimerem, wykazującym właściwości sztywnego lub elastycznego materiału. Charakteryzują go również dobre właściwości mechaniczne oraz parametry, które można modyfikować za pomocą różnych odczynników wykorzystywanych w procesie syntezy. Dodatkowym atutem jest jego kompatybilność z tkankami oraz krwią, niska szybkość degradacji oraz fakt, że produkty tej degradacji są nieszkodliwe i metabolizowane przez organizm [71]. Dodanie napelniaczy umożliwia wytworzenie materiałów kompozytowych np. polimerowo-ceramicznych, które łączą zalety poszczególnych składników: elastyczność, którą zapewnia matryca polimerowa z doskonałą biogodnością napelniacza ceramicznego. W zależności od rodzaju zastosowanego napelniacza i jego rozkładu przestrzennego, materiały kompozytowe wykazują duże możliwości w zakresie dopasowania właściwości mechanicznych i biologicznych do konkretnego typu implantu. Przykładowo dodanie węglanu wapnia (kalcyt, aragonit) pozwala stymulować wzrost tkanki kostnej. Napelniacze tego typu w kontakcie z płynami ustrojowymi tworzą na ich powierzchni warstwę HAp, stymulując stałe połączenie z kością w żywym organizmie [72].

Do produktów poliuretanowych należą elastyczne elastomery, sztywne i elastyczne pianki, powłoki, włókna, folie, tkaniny, kleje czy masy uszczelniające. W aplikacjach medycznych są wykorzystane do produkcji balonów żołądkowych i naczyniowych, opatrunków, zastawek serca, worków na krew, cewników czy protez naczyń krwionośnych. PU można łatwo zsyntetyzować i stosować na wielu rodzajach powierzchni [47], [71].

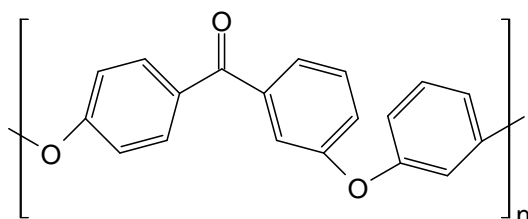
Poliuretany otrzymuje się poprzez polimeryzację ze stopniowym wzrostem (poliaddycja) trzech podstawowych składników: oligodiolu (polimeryczny polioliol), poliizocyjanianu (izocyjanianu z co najmniej dwiema grupami funkcyjnymi) i łańcucha o niskiej masie cząsteczkowej (diole lub aminy). Poliaddycję można prowadzić w jednoetapowym lub dwuetapowym procesie [74]. Jednoetapowy proces jest stosowany głównie w produkcji pianek. Jako środek spieniający najczęściej wykorzystuje się wodę, która dodana do

mieszaniny reakcyjnej, reaguje z grupą izocyjanianową i tworzy pochodną kwasu karbaminowego, która po dekarboksylacji przekształca się w dwutlenek węgla. W metodzie tej miesza się odpowiednią proporcję oligodioli, przedłużacza łańcucha, wody oraz innych dodatków z izocyjanianem. W reakcjach tych otrzymuje się między innymi aminę, która reaguje z pozostałymi izocyjanianami tworząc grupy mocznikowe. Reakcja między izocyjanianami i aminami przebiega bardzo szybko (około 100 razy szybciej niż w przypadku dioli), dlatego katalizator nie jest potrzebny. Proces dwuetapowy, zwany również metodą prepolimerową, jest bardziej skomplikowany, daje jednak więcej możliwości kontrolowania parametrów syntezy i parametrów poliuretanu. Co więcej, jest mniej egzotermiczny. W pierwszym etapie syntezy oligodioli i nadmiar diizocyjanianów łączy się w celu otrzymania prepolimeru. Prepolimer jest mieszaniną złożoną z miękkich segmentów zakończonych grupami izocyjanianowymi i nieprzereagowanymi diizocyjanianami, które później utworzą segmenty twarde. Na tym etapie określa się zarówno długość segmentów miękkich, jak i segmentów twardych. W drugim etapie wprowadza się do mieszaniny reakcyjnej przedłużacz łańcucha o niskiej masie cząsteczkowej, np. diol, diamina. Przedłużacz łańcucha reaguje z nieprzereagowanym diizocyjanianem, tworząc twarde segmenty. Na tym samym etapie następuje także połączenie między segmentami miękkimi i twardymi. W obu segmentach występują grupy uretanowe $-NHCOO-$. Ich stężenie w poszczególnych obszarach jest różne, co prowadzi do większej lub mniejszej sztywności łańcuchów. Kolejną unikalną właściwością poliuretanów jest oddzielenie miękkich i twardych segmentów spowodowane ich niemieszalnością i oddziaływaniem między łańcuchami lub obecnością wiązań wodorowych. Zjawisko to prowadzi do tworzenia struktur zwanych domenami. Domeny składają się z twardych lub miękkich segmentów. Obok domen, można również wyróżnić struktury wielkości mikrometrów powstające w wyniku aglomeracji lub krystalizacji różnych łańcuchów. Zagadnienia te są niezwykle istotne z materiałowego punktu widzenia i w dalszym ciągu są przedmiotem badań naukowych, stymulując rozwój nowoczesnych materiałów inżynierskich [72], [73].

Odpowiedni dobór monomerów wpływa na właściwości hydrofilowe i hydrofobowe oraz pozwala na otrzymanie poliuretanów ulegających biodegradacji, co jest niezwykle istotne w aspekcie ich wykorzystania w inżynierii tkanki kostnej; lub poliuretanów stabilnych w środowisku.

2.1.3.3.7 Polieteroeteroketon

Polieteroeteroketon (rys. 9) został po raz pierwszy zsyntetyzowany przez brytyjskich naukowców w roku 1972. Od tego czasu był szeroko stosowany w dziedzinach przemysłowych takich jak lotnictwo, motoryzacja, produkcja maszyn czy w przemyśle chemicznym. Pod koniec lat 90. XX wieku, został zatwierdzony przez FDA jako biomateriał implantowany [76].



Rysunek 9. Wzór strukturalny polieteroeteroketonu.

PEEK to półkryształiczny liniowy polimer aromatyczny [75]. Jego mer składa się z trzech pierścieni aromatycznych połączonych ze sobą wiązaniem eterowym oraz poprzez wiązanie węgla z grupy karbonylowej ketonowej. Otrzymuje się go w wyniku polikondensacji chlorofenolanów [47]. Powszechną drogą syntezy PEEK jest reakcja pomiędzy 4,4'-difluorobenzofenonem i solą disodową hydrochinonu w polarnym rozpuszczalniku w 300°C [76]. Jego krystaliczność mieści się w zakresie 30-35% a temperatura zeszklenia wynosi około 143°C [77] choć niektóre źródła podają [47], że waha się ona w zakresie 80 do 120°C. Temperatura topnienia to około 343°C. Takie parametry ułatwiają jego formowanie. Istotny jest również moduł sprężystości mieszczący się w zakresie od 3 do 4 GPa (zbliżony do modułu Younga kości gąbczastej), który poprzez zastosowanie różnych metod (przykładowo włączenie włókien węglowych) można dostosować do modułu kości korowej (~ 18 GPa) [76], [77]. Jego niepolarne, aromatyczne łańcuchy główne sprawiają, że charakteryzuje się on powierzchnią o właściwościach hydrofobowych i chemicznie obojętnych, co ogranicza lokalną przyczepność kości. Ponadto, współczynnik tarcia czystego PEEK jest względnie wysoki [80]. Materiał ten, może być modyfikowany przez dodanie funkcjonalizowanych monomerów (prepolimeryzacja) lub modyfikacji postpolimeryzacyjnych za pomocą procesów chemicznych, takich jak sulfonowanie, aminowanie, nitrowanie czy osadzanie tytanu [74], [76].

Wartości wytrzymałości na rozciąganie otrzymane dla PEEK są analogiczne do wartości zmierzonych dla kości, szkliwa i zębiny, co czyni go odpowiednim materiałem wzmacniającym pod kątem właściwości mechanicznych. W przeciwieństwie do tytanu, materiał ten ma jednak bardzo ograniczone naturalne właściwości osteokondukcyjne.

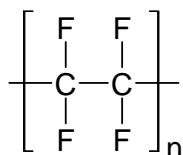
W związku z tym wprowadzono szereg metod w celu poprawy jego bioaktywności. Do metod tych należy: powlekanie syntetycznym, osteokondukcyjnym HAp, zwiększenie chropowatości powierzchni, modyfikacja chemiczna oraz włączenie cząstek bioaktywnych. PEEK ma biały kolor i doskonałe właściwości mechaniczne i może być wykorzystywany do zastosowań protetycznych – do produkcji protez stałych oraz ruchomych [78]. Innym pomysłem było zbudowanie trójwymiarowej (3D), porowatej struktury na powierzchni PEEK poprzez sulfonowanie za pomocą stężonego kwasu siarkowego, co wpłynęło na jego dobrą biogodność i osteogenerację. Hierarchiczna, porowata struktura sulfonowanego PEEK jest korzystna dla adsorpcji i dostarczania leków, ponieważ jako nano-rezerwuuar może być wykorzystywana jako nośnik substancji leczniczych [79].

PEEK jest półprzezroczysty dla promieni rentgenowskich i niemagnetyczny, dzięki czemu nie tworzy artefaktów w obrazach tomografii komputerowej (CT) lub rezonansu magnetycznego (MR). Jest antyalergiczny, lekki (gęstość 1,29 – 1,49 g/cm³ [47]), odporny na zmęczenie i chemikalia. Może być wielokrotnie sterylizowany bez uszczerbku dla jego właściwości mechanicznych [75].

Obecnie wykorzystuje się go jako materiał dla potrzeb ortopedii wytwarzając z niego dyski oraz czopy międzytrzonowe, trzpienie endoprotez stawu kolanowego i biodrowego, implanty czaszki i twarzoczaszki oraz jak wspomiano wcześniej jako nośniki substancji leczniczych.

2.1.3.3.8 Poli(tetrafluoroetylen)

PTFE (rys.10) należy do grupy polimerów fluorowych, charakteryzujących się łańcuchem głównym zbudowanym z atomów węgla i grupami bocznymi, które tworzą atomy fluoru bądź grupy alkilowe zawierające fluor. Polimery te powstają w wyniku polimeryzacji nienasyconych fluorowęglowodorów. Specyficzna budowa łańcuchów sprawia, że są bardziej odporne chemicznie niż polietylen oraz pozostałe polimery należące do grupy poliolefin.



Rysunek 10. Wzór strukturalny poli(tetrafluoroetyleny).

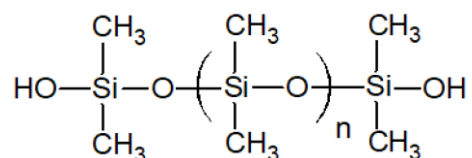
PTFE podobnie jak PVC powstaje w procesie polimeryzacji suspensyjnej bądź emulsyjnej tetrafluoroetyleny. Funkcjonuje pod nazwą handlową teflon oraz jest wykorzystywany

w formie ekspandowej (ePTFE) – Gore Tex®. PTFE oraz inne fluoropolimery znalazły zastosowanie w niemal każdej branży odgrywając kluczową rolę w branży medycznej, przemyśle lotniczym, motoryzacyjnym, chemicznym, elektrycznym, elektronicznym, farmaceutycznym, kosmicznym, obronnym, spożywczym oraz w innych sektorach [80]. PTFE charakteryzuje się wysoką stabilnością chemiczną i termiczną oraz bardzo niskim współczynnikiem tarcia. Jest również znany ze swoich właściwości antyadhezyjnych. Zwilżenie powierzchni PTFE rozpuszczalnikami komercyjnymi i płynnymi klejami jest praktycznie niemożliwe. Wyjątek stanowią specjalne rozpuszczalniki, które mają niższą energię powierzchniową niż PTFE [81]. Polimer ten jest bardzo wrażliwy na działanie środowiska promieniowania kosmicznego – cząstek takich jak protony, elektrony czy jony ciężkie. Interakcja pomiędzy materiałem a wymienionymi czynnikami może spowodować jego degradację [82]. Materiał ten nie może być przetwarzany za pomocą typowych technik przetwórstwa w stanie stopionym (roztworze), takich jak: wytłaczanie, formowanie wtryskowe, formowanie z rozdmuchiwaniem lub inne, co jest spowodowane wyjątkowo wysoką lepkością. Można obrabiać go wszystkimi typowymi procesami stosowanymi w obróbce skrawaniem, o ile narzędzia skrawające są bardzo ostre [83].

PTFE wykorzystuje się do produkcji nici chirurgicznych oraz dentystycznych. Ponadto wytwarza się z niego protezy naczyń krwionośnych oraz rurki do regeneracji tkanki nerwowej. Wykonane z niego wyroby można poddawać procesom sterylizacji wykorzystując tlenek etylenu bądź sterylizując go w autoklawie. Jak wspomniano wcześniej, ze względu na jego wrażliwość na działanie środowiska promieniowania kosmicznego, nie można go sterylizować z wykorzystaniem metod radiacyjnych [47].

2.1.3.3.9 Polisiloksany

Polisiloksany (rys.11) zwane również silikonami są nieorganicznymi polimerami, które składają się z powtarzających się jednostek – siloksanów.



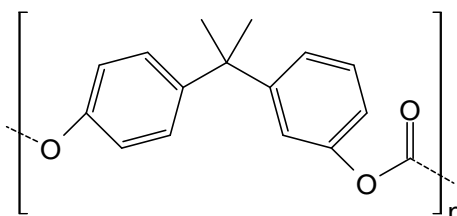
Rysunek 11. Wzór strukturalny polisiloksanów.

W zależności od długości łańcucha i grup organicznych (na przykład: grupy metylowe, fenylowe, winylowe) przyłączonych do atomów krzemu, związki te mogą przybierać różną formę. Silikony zostały wprowadzone na rynek w połowie lat czterdziestych ubiegłego wieku, ale w ciągu sześćdziesięciu lat znalazły zastosowanie w prawie każdej gałęzi przemysłu [84]. Są odporne na przenikanie przez ciecze i środki powierzchniowo czynne o niskiej energii powierzchniowej. Ich kompatybilność z różnymi substancjami chemicznymi sprawia, że są rozważane do wykorzystania w celu opracowania różnych testów chemicznych i biologicznych. Obecnie w stosowanych do tego celu materiałach hydrofobowych takich jak wosk i dimer alkiloketenu dochodzi do naruszenia struktury przez surfaktanty o niskiej energii powierzchniowej. Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić, że struktura polisiloksanów pozostaje nienaruszona pod wpływem działania tych samych środków, ze względu na własną, stosunkowo niską energię powierzchniową. Do środków powierzchniowo czynnych (surfaktantów) zalicza się środki: anionowe (na przykład dodecylosiarczan sodu), niejonowe (na przykład triton X-100) i kationowe (na przykład bromek cetylotrimetyloamoniowy). Środki te, są powszechnie stosowane jako odczynniki do lizy w większości testów biologicznych [86].

Do celów biomedycznych najczęściej stosuje PDMS należące do grupy elastomerów. Poza biokompatybilnością, charakteryzują się one szerokim zakresem temperatur pracy, stabilnością chemiczną i termiczną oraz ognioodpornością [86]. Niemniej jednak, polidimetylosiloksan jest hydrofobowy i ma słabą przyczepność do komórek. Jedną z konwencjonalnych metod jego przekształcania na hydrofilowy (co wiąże się ze zwiększeniem adhezji komórek) jest trawienie plazmowe i następująca po nim adsorpcja kolagenu [88]. Ze względu na wymienione właściwości oraz dobrą elastyczność PDMS jest stosowany do produkcji wielu różnych implantów medycznych [88] między innymi implantów: szczękowych, piersi, stawu śródrečno-paliczkowego; wykorzystuje się go także do wytwarzania cewników, drenów czy folii opatrunkowych. PDMS rozważany jest również w kontekście wykorzystania go jako matrycy dla systemów dostarczania leków i bioobrazowania fluorescencyjnego [88].

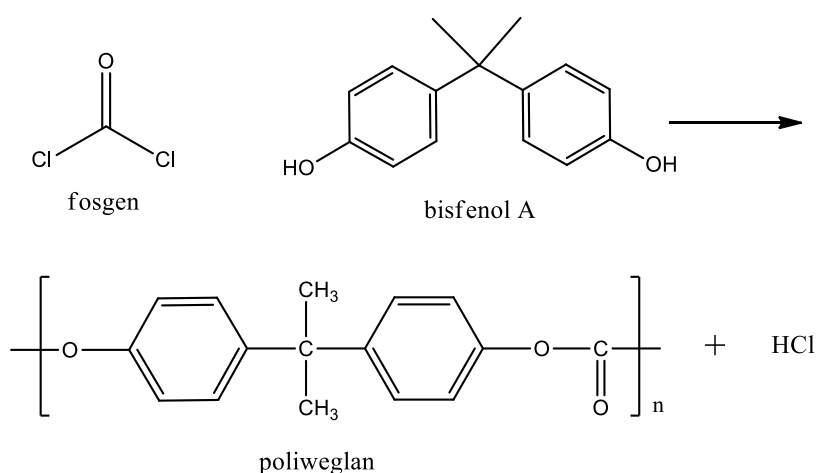
2.1.3.3.10 Poliwęglany

Poliwęglany to klasa termoplastycznych polimerów zawierających jednostki węglanowe w swojej strukturze chemicznej [90] o wzorze ogólnym (rysunek 12):



Rysunek 12. Wzór strukturalny poliwęglanu

Otrzymywane są najczęściej w wyniku reakcji syntezy fosgenu z bisfenolem acetonu [22]. Reakcję przedstawiono na rysunku 13.



Rysunek 13. Schemat otrzymywania poliwęglanu w wyniku reakcji syntezy BPA z fosgenem.

Charakteryzują się gęstością w zakresie 1,2-1,26 g/cm³ i modułem Younga wynoszącym od 2,8 do 4,6 GPa [47]. Temperatura zeszklenia jest wysoka i mieści się w przedziale 140-155°C, temperatura topnienia 225-250°C [47], [89]. Żywice poliwęglanowe na bazie BPA mają niezwykley profil właściwości, łączący ciągliwość, wytrzymałość i trwałość z wysoką przezroczystością i akceptowalną stabilnością temperaturową. Materiały na bazie tej żywicy są wykorzystywane w dyskach kompaktowych, oknach kuloodpornych, urządzeniach

medycznych, hełmach, opakowaniach, okularach przeciwsłonecznych, soczewkach reflektorów samochodowych i innych [90].

Istotny jest również fakt, że ze względu na właściwości termostabilne, domieszkowane poliwęglany można zastosować w druku trójwymiarowym [22]. Poliwęglany tego typu są odporne na działanie promieniowania jonizującego i działanie płynów ustrojowych. Można je sterylizować metodami radiacyjnymi, tlenkiem etylenu oraz metodami termicznymi. Wyroby z PC wytwarza się metodami wyciągania, wtrysku lub z roztworu. W medycynie PC stosowany jest głównie do produkcji strzykawek, na elementy pomp infuzyjnych oraz elementy systemów, które wspomagają pracę serca [47].

Obecnie trwają badania nad wyrobami zawierającymi w swoim składzie BPA, zwłaszcza w kontekście materiałów stosowanych do kontaktu z żywnością i na wyroby medyczne. BPA jest uznawany za potencjalny czynnik szkodliwy, dlatego tak ważne jest, aby zapobiegać degradacji materiałów, które go zawierają. Ponadto, w kontekście wyrobów medycznych należy rozważać PC, które są wytwarzane w odpowiedni sposób - z ograniczeniem BPA zarówno w procesie syntezy jak i w końcowym produkcie.

Odrębną grupę stanowią poliwęglany alifatyczne (APC), które ulegają biodegradacji i są powszechnie stosowane jako integralne składniki inżynierii tkankowej oraz w systemach dostarczania leków. Charakteryzują się jednak słabą stabilnością termiczną i łatwo ulegają hydrolizie [91]. Od ostatniego dziesięciolecia obserwuje się znaczący wzrost ich użycia w branży medycznej, na skutek unikalnej kombinacji biodegradowalności i biokompatybilności. W zastosowaniach medycznych, tak zwana niestabilność lub czasowa stabilność poliwęglanów alifatycznych jest niewątpliwą zaletą. Przykładowo, biodegradowalne polimery nie wymagają usuwania po implantacji, co pozwala uniknąć kolejnego zabiegu chirurgicznego oraz związanego z nim leczenia. Wraz z degradacją APC, której ulegają po spełnieniu swojej funkcji, niepożądana reakcja fizjologiczna jest znacznie zmniejszona w porównaniu do reakcji związanej z trwale wszczepionymi materiałami [92].

2.1.3.3.11 Polimery o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych

W ostatnich latach sporo czasu poświęca się również polimerom charakteryzującym się właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi. Wśród nich można wyróżnić polimery naturalne takie jak chitozan, heparyna czy ϵ -polizyna (ϵ -PL) [93] jak i polimery, które zyskują

właściwości przeciwdrobnoustrojowe w wyniku modyfikacji z zastosowaniem odpowiednich komponentów:

Chitozan został odkryty przez Rougeta w 1859 roku. W aspekcie medycznym jako pierwsi zastosowali go Allan i Hadwinger [94]. Jego właściwości fizykochemiczne oraz biologiczne zależą od liczby grup aminowych. Działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze chitozanu nie jest w pełni wyjaśnione, jednakże powszechnie tłumaczy się ten fakt w dwojaki sposób. Po pierwsze, interakcje NH_3^+ chitozanu z ujemnie naładowanymi powierzchniami komórek drobnoustrojów zmieniają przepuszczalność błon, powodując uwolnienie struktur wewnątrzkomórkowych. Ponadto, jako drugi mechanizm uznaje się wpływ chitozanu na zawartość wapnia w ścianach komórkowych co skutkuje destabilizacją peptydoglikanu i zaburzenie równowagi osmotycznej drobnoustrojów [94]–[96]

Niewątpliwą zaletą chitozanu jest możliwość łatwego przetwarzania do różnych form takich jak: membrany, gąbki, żele, mikrocząstki, nanocząsteczki czy nanowłókna. W zakresie biomedycznym jest on wykorzystywany w produkowaniu systemów dostarczania leków, w terapii genowej, inżynierii tkankowej czy do leczenia ran [97]. Warto wspomnieć również o kompozytowych rusztowaniach na bazie α -chityny/nanosrebra i β -chityny/nanosrebra, które wykazywały działanie przeciwbakteryjne wobec *S.aureus* i *E. coli* [98].

Heparyna jest polisacharydem należącym do rodziny glikozaminoglikanów i jest wykorzystywana w leczeniu od 1938 roku. Zainteresowanie nią znacznie wzrosło w wyniku pandemii wirusem SARS-CoV-2 wywołującego chorobę COVID-19, gdzie podawano ją pacjentom w celu uniknięcia choroby zakrzepowej. Co więcej, jest ona testowana jako potencjalny środek leczniczy [99]. Mechanizm przeciwdrobnoustrojowy heparyny jest jednak niedookreślony. Ze względu na jej wiązanie z wapniem prawdopodobnym jest, że działa ona poprzez chelatowanie kationów niezbędnych do wzrostu bakterii. Innym możliwym wyjaśnieniem jest hamowanie transportu lub utylizacja wewnątrzkomórkowa wspomnianych wcześniej kationów. Przykład działania przeciwdrobnoustrojowego heparyny względem *S.aureus* oraz *E.stewartii* opisali Warren i Graham [100]. Spore znaczenie ma włączenie heparyny jako dodatku do hydrożeli. Materiały te były stosowane w kontrolowanym uwalnianiu czynników wzrostu, regulujących procesy angiogenezyjne i regeneracji kości [101].

Naturalnie występująca ϵ -PL jest biodegradowalna, nietoksyczna i rozpuszczalna w wodzie. Jej pochodne mogą być stosowane jako emulgatory, nośniki leków, włókna

biodegradowalne i inne [102]. Jako czynnik przeciwbakteryjny po raz pierwszy została użyta w Japonii, gdzie przeprowadzone badania wykazały, że całkowicie hamuje wzrost *S.epidermis*, *P.aeruginosa*, *E. coli* i *S.aureus* [103].

Inną grupą polimerów są polimery kationowe, które mogą być pochodzenia naturalnego bądź syntetycznego. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe wykazują hydrofobowej odmiany tych materiałów. Tego typu polimery mogą być stosowane jako powłoki implantów czy też wyrobów medycznych, stwierdzono bowiem ich zdolność do hamowania rozwoju bakterii i grzybów chorobotwórczych dla człowieka [104]. Mechanizm ten związany jest z oddziaływaniem polimeru na ściany komórkowe bakterii i grzybów. W wyniku tego procesu dochodzi do zaburzenia integralności błony fosfolipidowej i upośledzenia transportu związków, co ostatecznie prowadzi do lizy komórek. Wprowadzenie kationowych peptydów amfipatycznych, takich jak magainina do komórek grzybów powoduje lizę ich błony oraz zakłóca integralność DNA [105].

Dodatki o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych polimerów zostały omówione w dalszej części pracy.

2.2 Modyfikatory właściwości przeciwdrobnoustrojowych

W dzisiejszych czasach, pomimo wielu sukcesów terapeutycznych zakażenia bakteryjne generują nadal wiele problemów. Widoczne jest to nie tylko w szpitalach i innych placówkach opieki zdrowotnej, ale także w naszych domach. Jako pacjenci mamy trudności z wyleczeniem różnego rodzaju nabytych zakażeń bakteryjnych. Ich zwalczanie jest obecnie ogromnym wyzwaniem, ze względu na oporność mikroorganizmów na stosowane dotychczas środki przeciwdrobnoustrojowe, zróżnicowanie mechanizmów lekooporności oraz spore tempo powstawania i rozprzestrzeniania się szczepów antybiotykoopornych.

Rozwiązaniem tych problemów, może być poszukiwanie nowych materiałów, które wykazują zdolność do hamowania wzrostu drobnoustrojów na swojej powierzchni lub w otaczającym środowisku. Materiały te mogą być stosowane nie tylko do wyrobu urządzeń medycznych, ale również do konstrukcji wszelkiego rodzaju implantów, protez oraz ich elementów. Otrzymywanie takich materiałów związane jest przede wszystkim z odpowiednim doбором różnego rodzaju modyfikatorów, które wpływają na końcowe właściwości, w tym właściwości przeciwdrobnoustrojowych.

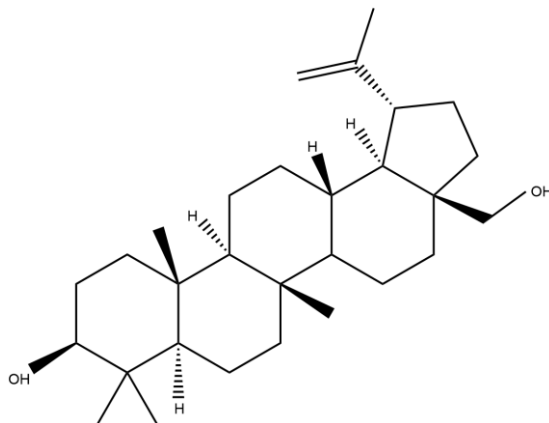
Obecnie, jednymi z częściej wykorzystywanych modyfikatorów właściwości przeciwdrobnoustrojowych są nanocząsteczki. Są to struktury o wymiarach całkowitych poniżej 100 nm [106]. W branży medycznej są wykorzystywane w diagnostyce nowotworów [107][108], jako nośniki dostarczania leków w tym leków w terapii celowanej [109], jako antyoksydanty [110], w terapii genowej [111] oraz jako dodatki o charakterze przeciwdrobnoustrojowym [112]–[114]. Co istotne, można je również stosować z powodzeniem w materiałach polimerowych, gdzie najczęściej wykorzystywanymi są nanocząsteczki srebra, miedzi [115] czy też tlenku tytanu [116].

Do innych związków stosowanych jako dodatek do polimerów w celu zwiększenia odporności przeciwdrobnoustrojowej należą: N-halaminy [117].

W pracy badawczej skupiono się na nowym dodatku wpływającym na aktywność przeciwdrobnoustrojową jakim jest betulina, oraz na dwóch szerzej znanych, jakimi są nanosrebro i nanokrzemionka. Modyfikatory te zostały szczegółowo scharakteryzowane w dalszej części rozdziału.

2.2.1 Betulina

Betulina [betulinol, lup-20(29)-en-3 β ,28-diol] (rys. 14) należy do klasy pentacyklicznych triterpenów [118]. Występuje jako metabolit wtórny w ponad 200 różnych gatunkach roślin, najczęściej w korze drzewa brzoźowego – *Betula pendula* i *Betula pubescens* [119] oraz w innych, takich jak leszczyna, grab czy olcha. Betulina, kwas betulinowy i ich pochodne cechują się właściwościami antynowotworowymi, przeciwzapalnymi, przeciwbakteryjnymi, przeciwgrzybiczymi oraz przeciwwirusowymi. Są wykorzystywane w przypadku uszkodzeń skóry, zarówno jako środek profilaktyczny, jak i leczniczy [118]. Na uwagę zasługuje także działanie ochronne przeciwko cytotoksyczności indukowanej kadmem. Jednym z powszechnie uznawanych analogów kwasu betulinowego jest Bevirimat, który jak stwierdzono hamuje rozwój wirusa HIV, blokuje replikację HIV-1 poprzez zakłócanie przetwarzania Gag-SP1 i w późnym etapie stymuluje hamowanie dojrzewania wirusa. Analog ten osiągnął II etap badań klinicznych w leczeniu HIV. Pierwotnie został opracowany przez Panacos Pharmaceuticals [119]. Na podstawie obszernych badań przeciwnowotworowych stwierdzono, że kwas betulinowy wywołuje apoptozę komórek poprzez bezpośrednią regulację szlaków mitochondrialnych i zwiększoną produkcję kaspazy-3. Potwierdzono także, że wpływa na immunoregulację *in vivo*, jak również hamuje cykl komórkowy w fazie G2 / M i wykazuje działanie ochronne w sytuacji zapalenia jelita grubego u myszy [119].



Rysunek 14. Wzór strukturalny betuliny.

2.2.2 Nanosrebro

Srebro to biały, błyszczący, metaliczny materiał o symbolu chemicznym „Ag” pochodzącym od łacińskiego słowa „argentum”. Czyste srebro jest ciągliwe i charakteryzuje się wysoką przewodnością elektryczną oraz cieplną, jak również niską rezystancją styku [120]. Materiały na bazie srebra są od dawna szeroko stosowane w różnych dziedzinach życia takich jak fotografia, medycyna, czy elektronika. Koloidalne zole srebra wykorzystuje się w medycynie od początku XX wieku, a obecnie są one sprzedawane jako suplement diety i leki alternatywne, chociaż znaczenie tych parafarmaceutyków budzi wiele kontrowersji [121]. W nanoskali srebro wykazuje niezwykle właściwości fizyczne, chemiczne i biologiczne. Ze względu na jego silne działanie antybakteryjne, powłoki nanosrebra są stosowane w różnych tekstyliach, jak również wykorzystuje się je jako powłoki na implantach. Ponadto nanosrebro jest stosowane do leczenia ran i oparzeń, jako środek antykoncepcyjny oraz sprzedaje się go także jako środek do dezynfekcji wody i spray do pomieszczeń. Jego zastosowanie jest bardzo rozpowszechnione w weterynarii i medycynie oraz powiązanych z nimi gałęziami przemysłu. Obecnie bada się jego biodystrybucję, możliwą akumulację w narządach, degradację, możliwe działania niepożądane oraz toksyczność [122]. Wykazano, że nanosrebro jest cytotoksyczne dla kilku różnych linii komórkowych, w tym mysich fibroblastów (NIH3T3) [123] monocytów (THP1) [124], komórek wątroby szczura (BRL 3A) [125], męskich komórek płciowych myszy (C18-4) [126] ludzkich komórek fibroblastów płuc (IMR-90) i ludzkich komórek glejaka (U251) [127]. Działanie teratogenne i neurotoksyczność nanosrebra są więc obserwowane w badaniach zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Zaproponowano kilka mechanizmów w celu wyjaśnienia jego cytotoksyczności. Podobnie jak działanie przeciwbakteryjne, cytotoksyczność nanosrebra jest związana z uwalnianiem jonów srebra, które mogą „celować”

w mitochondria wywołując nekrozę, obrzęk mitochondrialny oraz nieprawidłowy metabolizm lub apoptozę. Jony srebra mogą zatem wiązać się z wewnątrzkomórkowymi grupami biologicznymi jako kompleks DNA i RNA, aby blokować procesy replikacji i transkrypcji, wpływając tym samym na cykl komórkowy i powodując genotoksyczność. Ekspozycja na nanocząstki srebra powoduje wytwarzanie reaktywnych form tlenu (RFT) wewnątrz komórki, w sposób zależny od ich stężenia [128]. To wysokie stężenie nanocząstek związane jest ze stanem stresu oksydacyjnego, który może powodować uszkodzenia oksydacyjne DNA/białek, apoptozy i martwicy [129]. Niezwykle istotne jest więc umiejętne wykorzystywanie nanosrebra w aplikacjach medycznych [129], tak aby uniknąć wszelkich negatywnych konsekwencji związanych z jego cytotoksycznością.

2.2.3 Nanokrzemionka

Krzemionka (SiO_2) jest związkiem chemicznym składającym się z tlenu (O_2) i krzemu (Si). Pierwiastki te, należą do dwóch najliczniej występujących w skorupie ziemskiej. Około 56% masy ziemi jest pokryte krzemionką, natomiast 95% z nich jest powszechnie nazywane skałami [130]. Krzemionka występuje w postaci krystalicznej bądź amorficznej. Trzy główne odmiany krzemionki krystalicznej to kwarc, trydymit i krystobalit. Do postaci amorficznej zalicza się naturalne próbki takie jak ziemia okrzemkowa, szkło krzemionkowe oraz produkty wytwarzane przez człowieka [131]. Zastosowanie syntetycznej krzemionki amorficznej, zwłaszcza nanocząstek krzemionki – SNP cieszy się szerokim zainteresowaniem w wielu gałęziach przemysłu. SNP są produkowane na skalę przemysłową jako dodatki do kosmetyków, leków, tonerów do drukarek, lakierów i żywności. Ponadto nanokrzemionka wykorzystywana jest w wielu zastosowaniach biomedycznych i biotechnologicznych, takich jak terapia nowotworowa, transfekcja DNA, czy unieruchomienie enzymów [132]–[134]. Jako nośnik leków może zmniejszać toksyczność leku, poprawiać kontrolowane uwalnianie jego cząsteczek oraz zwiększać jego biodostępność poprzez bezpośrednią metodę ścisłego oddziaływania składnika aktywnego z błonami/ścianami komórkowymi drobnoustrojów. Podobnie jak w przypadku nanosrebra należy również rozważyć aspekt cytotoksyczności. Do niedawna większość badań koncentrowała się na cząstkach krzemionki o wielkości od 0,5 do 10 μm , głównie w postaciach krystalicznych. Unikalne właściwości fizykochemiczne krzemionki nanometrycznej, które czynią ją atrakcyjną dla przemysłu, mogą stanowić potencjalne zagrożenie dla zdrowia ludzkiego. Ostatnie badania wykazały, że SNP mogą wywoływać niekorzystne skutki zdrowotne *in vitro* i *in vivo*, jednakże większość badań wykorzystywała słabo scharakteryzowane cząstki pod względem ich składu i właściwości

fizykochemicznych. Właściwości fizykochemiczne nanocząstek określają ich interakcję z komórką jak i wewnątrz komórki. Nawet subtelne różnice w takich właściwościach mogą modulować toksyczność i sposób oddziaływania. Wyniki badań toksyczności stają się więc trudne do zinterpretowania i porównania, co sprawia, że wyciągnięcie odpowiednich wniosków jest praktycznie niemożliwe [135].

2.3 Biomechanika tkanek oporowych

Tkanki łączne takie jak tkanki łączne właściwe, kostne i chrzęstne stanowią część bierną układu ruchu. W jego skład wchodzi kości, chrząstki, ścięgna oraz więzadła. Elementy te z jednej strony umożliwiają ruchy organizmu, z drugiej natomiast chronią narządy wewnętrzne w okolicy miednicy, klatki piersiowej i głowy.

Chrząstki to zespół tkanek o zróżnicowanej strukturze, wyraźnie odmiennej od kości. W zależności od budowy oraz właściwości mechanicznych, chrząstki występują w różnych częściach ciała, zapewniając stosowne dla określonych narządów cechy. Inna jest bowiem konstrukcja tkanek chrzęstnych w klatce piersiowej, uchu zewnętrznym, tchawicy, przegrodzie nosowej lub krtani. W połączeniach stawowych, w zależności od rodzaju, chrząstki łączą sąsiednie kości zapewniając mniejszą lub większą ruchomość.

Więzadła zbudowane są z pasm tkanki łącznej właściwej. Ich zadaniem jest stabilizacja stawów ruchomych. Zapobiegają nieprawidłowym ruchom stawu, które mogłyby przyczynić się do jego uszkodzeń.

2.3.1 Tkanka kostna

Podobnie jak inne tkanki łączne, tkanka kostna składa się z komórek osadzonych w ECM. Kość jest to żywa, dynamiczna tkanka, która nieustannie ulega remodelowaniu. Przeprowadzone badania dowiodły, że co roku 10 –15% kości w całym organizmie jest zastępowane nową kością [136]. Macierz kości to trójwymiarowa struktura wydzielana przez komórki do przestrzeni pozakomórkowej. Macierz kostna składa się ze związków organicznych (40%) i nieorganicznych (60%). Jej dokładny skład różni się w zależności od płci, wieku i stanu zdrowia. Główne nieorganiczne składniki ECM to ubogi w wapń apatyt i pierwiastki śladowe. Natomiast organiczna ECM jest znacznie bardziej złożona – składa się głównie z kolagenu typu I (90%), oraz białek niekolagenowych (10%). Jest ona syntetyzowana głównie przez osteoblasty przed procesem mineralizacji. Białka niekolagenowe można podzielić na cztery grupy: białka zawierające γ -karboksyglutaminian, proteoglikany,

glikoproteiny oraz małe glikoproteiny wiążące ligandy integrynowe N-linked (SIBLINS) [137]. ECM kości dynamicznie oddziałuje z osteoblastami i osteoklastami regulując procesy przebudowy lub regeneracji kości.

Proces przebudowy kości zachodzi dzięki wyspecjalizowanym komórkom tkanki kostnej, wśród których wyróżniamy [138]:

- osteoblasty, które są odpowiedzialne za syntezę kości,
- osteoklasty, które są odpowiedzialne za resorpcję kości,
- osteocyty i komórki wyściółki, które na stałe przebywają w tkance kostnej.

Ze względu na budowę, położenie i funkcję wyróżnia się: kość zbitą i gąbczastą. Jedną różnicą, między tymi dwoma typami, jest ich porowatość. Różnicę tą można określić ilościowo, biorąc pod uwagę pozorną gęstość próbki kości, zdefiniowaną jako jej masa podzielona przez jej objętość. Gęstość pozorna litej kości zbitej wynosi około $1,8 \text{ g/cm}^3$, natomiast gęstość względna, czyli stosunek gęstości pozornej próbki do masy litej kości osiąga wartość $> 0,7$. Kość gąbczasta charakteryzuje się gęstością względną $< 0,7$, chociaż typowe wartości są dużo niższe. W niektórych przypadkach osiągają około 0,05. Gęstość pozorna kości gąbczastej wynosi od 0,1 do $1,0 \text{ g/cm}^3$ [139]. Istotne różnice pod względem właściwości fizykochemicznych wykazują również kości drobnowłóknista i młodociana – grubowłóknista.

Właściwości biomechaniczne kości są efektem odmienności ich składu i struktury. Obserwowano je w kilku różnych wymiarach. W skali rzędu mikrometrów, tkanka kostna drobnowłóknista ma wiele cech podobnych do kompozytu wzmocnionego włóknem, przy czym HAp zapewnia sztywność, a włókna kolagenowe zapewniają wytrzymałość na rozciąganie i plastyczność, zapobiegając kruchemu pękaniu. Ogólnie uważa się, że tkanka kostna tworząca pojedynczą beleczkę w kości gąbczastej jest około 20-30% mniej sztywna niż tkanka kostna zbita, ze względu na subtelne różnice w mineralizacji oraz organizacji mikrostruktury blaszkowatej [140]. Właściwości biomechaniczne kości gąbczastej oraz kości zbitej wykazują dużo więcej różnic, gdy weźmie się pod uwagę strukturalną organizację tkanek w milimetrowej skali długości.

Cylindryczny układ osteonów i orientacja blaszek międzysystemowych nadaje kości właściwości silnie anizotropowe. W szczególności sztywność i wytrzymałość wzdłuż osi kości długiej są dużo większe niż w płaszczyźnie poprzecznej kości. Ponadto kość drobnowłóknista zbita charakteryzuje się większą wytrzymałością na ściskanie niż rozciąganie względem kości

splotowatej. Z biologicznego punktu widzenia jest to logiczne, ponieważ koreluje z typowymi warunkami obciążenia. Sztywność i wytrzymałość kości zależy także od szybkości z jaką kość poddawana jest naprężaniu. Dla kości zbitej i gąbczastej zależność ta jest niska. Sztywność i wytrzymałość są proporcjonalne do szybkości odkształcenia (do potęgi 0,06 dla szybkości odkształcenia w zakresie fizjologicznym $0,001-0,03 \text{ s}^{-1}$) [141]. W rezultacie kość jest sztywniejsza i mocniejsza przy wyższych współczynnikach odkształcenia. Jest to niezwykle istotne, ponieważ dzięki temu można zrekompensować większe naprężenia powstające podczas wykonywania energicznych czynności.

Właściwości mechaniczne kości gąbczastej, która składa się z wielu elementów beleczkowatych o wymiarach powyżej 1 mm, nazywane są pozornymi właściwościami mechanicznymi. Właściwości te zależą od cech macierzy tkanki kostnej, ilości tkanki oraz organizacji przestrzennej beleczek. Istotne znaczenie ma względna gęstość i architektura kości gąbczastej. Ponieważ gęstość względna i architektura kości gąbczastej różnią się w zależności od miejsca anatomicznego, wieku i przebytych bądź trwale nabytych chorób, występują znaczne różnice w sztywności i wytrzymałości kości. Przy małych odkształceniach kość zachowuje się jak materiał liniowo sprężysty. Liniowa odpowiedź sprężysta kończy się w momencie, gdy beleczki zaczynają się zapadać pod rosnącym naprężeniem. Gdy zapadające się beleczki zetkną się ze sobą, eliminując w ten sposób przestrzenie w obrębie jamy szpikowej, naprężenie gwałtownie wzrasta. Zapadnięcie się beleczek, umożliwia kości gąbczastej poddanie się dużym naprężeniom ściskającym przy mniej więcej stałym naprężeniu. Dodatkowo dochodzi również do absorpcji dużej ilości energii. Kość gąbczastą, można więc porównać do piankowego opakowania, zapewniającego wysoką absorpcję energii przy minimalnej gęstości i wadze.

W celu zaprojektowania implantu kostnego, po dobranym biomateriale, należy rozważyć kilka zagadnień związanych z obszarem biomechanicznym. Wśród nich najważniejsze są:

- wytrzymałość na obciążenia osiowe, zginające, skręcające i uderowe, z uwzględnieniem większej wytrzymałości w niektórych kierunkach niż w pozostałych, w zależności od dominujących trybów obciążenia
- sztywność pod obciążeniem osiowym, zginającym i skręcającym, ale ponownie z uwzględnieniem większej sztywności w niektórych kierunkach, w zależności od dominujących trybów obciążenia

- niska masa
- wysoka odporność na pękanie zmęczeniowe
- zdolność do pochłaniania energii podczas uderzenia
- zdolność do regeneracji
- możliwość dynamicznego optymalizowania swojej struktury

Wymagania te, nie są spójne, ale jednakowo istotne. Przykładowo nasze kości mogłyby być znacznie mocniejsze (odporniejsze na złamania), lecz wówczas byłyby zbyt ciężkie. Z tego powodu konstruowanie substytutu kości nie może uwzględniać tylko pojedynczych wymagań. Wszystkie parametry powinny być zoptymalizowane, uwzględniając warunki fizjologiczne [142].

2.3.2 Tkanka chrzęstna

W organizmie wyróżnia się trzy rodzaje tkanki chrzęstnej: szklistą, elastyczną i włóknistą. Chrzęstki te, różnią się układem komórek, składem i ilością włókien, budową chemiczną bezpostaciowej ilości międzykomórkowej. Ze względu na te różnice, poszczególne rodzaje chrząstek wykazują niejednorodne właściwości fizyczne i są różnorodnie zlokalizowane. Chrzęstka szklista z homogeną macierzą międzykomórkową, zawierającą kolagen II typu i agrekan występuje w różnych miejscach ciała, jak np. w wielu częściach górnych dróg oddechowych, w przegrodzie nosowej, pomiędzy żebrami a mostkiem, pokrywa nasady kości długich, buduje powierzchnie stawowe, a także stanowi szkielet płodu. W połączeniach ruchomych kości chrząstka szklista nazywana jest chrząstką stawową. Jej zadaniem jest zapewnienie gładkiej powierzchni, ułatwiającej poruszanie się jednej kości względem drugiej przy minimalnym tarcu [138].

Chrzęstki stawów określanych jako maziowe nie są pokryte chrzęstną, ale nabłonkiem, określanym jako błona maziowa. Wytwarza ona płyn maziowy o dużej lepkości. Błony maziowe są dobrze unaczynione, zawierają liczne komórki, typowe dla tkanki łącznej właściwej zbitej, a także synowiocyty typu A i B odpowiedzialne za produkowanie mazi stawowej.

Tkanka chrzęstna szklista tych stawów posiada typowe chondrocyty, otoczone ECM. Jak każda dojrzała chrząstka nie zawiera nerwów, naczyń krwionośnych ani limfatycznych. Jest odżywiana jedynie na drodze dyfuzji z otaczającej ją mazi stawowej.

Agrekan jest głównym proteoglikanem chrząstki stawowej, odpowiedzialnym za zdolność tkanki do amortyzacji obciążeń ściskających, z którymi styka się przez całe życie. Zdolność ta jest ściśle związana ze strukturą agrekanu, a w szczególności z jego wysokim stopniem wysycenia przez siarczanowe łańcuchy glikozaminoglikanów oraz zdolnością do tworzenia dużych agregatów molekularnych związanych z hialuronianem. Białko rdzeniowe agrekanu można podzielić na odrębne regiony strukturalne i funkcjonalne. Na jego aminowym końcu znajdują się regiony globularne, rozdzielone krótką domeną międzyglobularną. Jeden z regionów globularnych wiąże glikozaminoglikany z domeną bogatą w siarczan keratanu. Inne natomiast wiążą siarczan chondroityny. Na karboksylowym końcu znajduje się trzeci region globularny. Region ten odpowiada za interakcję agrekanu z hialuronianem, zapobiega swobodnej dyfuzji cząsteczek w obrębie tkanki. Interakcja ta, stabilizowana jest przez obecność białka łączącego, które niekowalencyjnie oddziałuje zarówno z agrekanem, jak i hialuronianem. Łańcuchy siarczanu keratiny i siarczanu chondroityny zapewniają właściwości osmotyczne odpowiedzialne za zatrzymywanie wody pod wpływem obciążenia ściskającego, co zapobiega uszkodzeniu tkanki [143].

Chrzątka stawowa jest tkanką anizotropową. Jej skład oraz organizacja poszczególnych składników zmienia się w zależności od jej grubości. W dojrzałej chrząstce stawowej widoczne są cztery strefy. W pobliżu powierzchni stawowej kolagen jest ułożony w gęste włókienka, które biegną równoległe do powierzchni stawowej. Obszar ten nazywany jest strefą powierzchniową i stanowi 10–20% całkowitej grubości warstwy chrząstki stawowej. Uważa się, że organizacja włókien stycznych do powierzchni pomaga przeciwdziałać siłom ścinającym generowanym przez ruch stawów. Ten obszar jest również stosunkowo nieprzepuszczalny dla przepływu płynu. Pomaga on zatrzymać płyn w matrycy kolagenowej, gdy jest ona ściśnięta. Zatrzymywanie płynu i zwiększanie jego ciśnienia wraz ze ściskaniem tkanki umożliwia chrząstce wytrzymywanie dużych obciążeń ściskających [144]. W kolejnych 40–60% grubości warstwy, zwanej strefą środkową, zawartość kolagenu jest mniejsza, a włókienka są zorganizowane bardziej losowo. Zawartość wody jest również niższa w obszarze środkowym w porównaniu z obszarem powierzchniowym, ale udział proteoglikanów agrekanu jest wyższy. W strefie głębokiej (kolejne 20–30% grubości tkanki) włókna kolagenowe biegną prostopadle do powierzchni leżącej poniżej kości, a zawartość proteoglikanów jest najwyższa. Pomiędzy strefą głęboką a leżącą poniżej kością (podchrzęstną) znajduje się strefa zwapniała. Włókna kolagenowe ze strefy głębokiej

przechodzą do strefy zwapniałej, gdzie ulegają mineralizacji i zapewniają zakotwiczenie między chrząstką a kością.

Oprócz chrząstki szklistej, wyróżnia się jeszcze chrząstkę elastyczną i chrząstkę włóknistą.

Chrzątka elastyczna (sprężysta) zawiera sporą ilość włókien elastynowych, a także kolagen typu II. Znajduje się w małżowinie usznej, zewnętrznych przewodach słuchowych, w trąbkach Eustachiusza, w nagłośni i niektórych częściach krtani.

Chrzątka włóknista znajduje się w krążkach międzykręgowych, łąkotkach oraz w spojeniu łonowym. Zbudowana jest z grubych warstw gęstych włókien kolagenowych typu I i II rozmieszczonych między warstwami istoty międzykomórkowej z chondrocytami. Ten rodzaj tkanki chrzęstnej ma cechy i właściwości pośrednie między chrząstką a gęstą tkanką łączną [138].

Podobnie jak w przypadku tkanki kostnej, projektując implanty chrzęstne również należy wziąć pod uwagę i rozważyć te same problematyczne aspekty, w szczególności uwzględniając przeznaczenie implantu i funkcje jakie powinna pełnić w organizmie.

2.4 Uzasadnienie podjęcia tematyki badawczej

Zgodnie z obecną wiedzą i rozwojem technik analitycznych, diagnostycznych i klinicznych oczywiste jest, że zapotrzebowanie na dobrej jakości biomateriały jest ogromne. W zakresie szeroko rozumianej medycyny, biomateriały są niezbędne do produkcji urządzeń medycznych, wszelkiego rodzaju implantów, protez, materiałów opatrunkowych czy nośników leków. Polimery stanowią zasadniczy materiał bazowy, którego właściwości można modyfikować za pomocą odpowiednich dodatków, uzyskując tym samym materiały stosowane do produkcji różnych przedmiotów użytkowych, wykorzystywanych praktycznie w każdej dziedzinie życia. Elektronika, budownictwo, przemysł, a także branża medyczna to tylko niektóre z nich.

W dalszej części pracy skupiono się na uzyskaniu materiału polimerowego domieszkowanego betuliną, nanosrebrem i nanokrzemionką. W zależności od domieszki i wytworzonego na jej bazie kompozytu, jego możliwości zastosowania są zróżnicowane.

Liczne dane literaturowe wskazują na znaczną bioaktywność betuliny oraz jej pochodnych. Powszechnie znany jest fakt, że kwas betulinowy wywołuje odpowiedź antyangiogenną. Wiadomo również, że zmniejsza stres oksydacyjny i wykazuje zarówno w warunkach *in vitro* i *in vivo* działanie przeciwapoptotyczne między innymi tymocytów indukowanymi deksametazonem [143]. Betulina hamuje także szlak TLR4/NF-kB, co z kolei powoduje zmniejszenie uszkodzeń nerek [144], wątroby i płuc [145] u szczurów. Kwas betulinowy wykazuje również działanie ochronne przeciwko zapaleniu jelita grubego u myszy [146]. Korzystnym wydaje się więc połączenie betuliny oraz jej pochodnych z materiałami polimerowymi. Przykładem może być nowoczesna matryca polimerowa na bazie polimerów przewodzących [147] z dodatkiem betuliny. Taka modyfikacja pozwoliła na miejscowe działanie chemioterapeutyczne w leczeniu onkologicznym. Przeprowadzone badania potwierdziły toksyczny wpływ uwolnionej betuliny na linie komórek nowotworowych KB i MCF-7. Kwas betulinowy wykorzystano również do wytworzenia koniugatów polimer – kwas betulinowy opartych na nośnikach kopolimeru HPMA, umożliwiających kontrolowane uwalnianie cytotoksycznych pochodnych kwasu betulinowego w litych guzach lub komórkach nowotworowych [148].

Nanocząsteczki krzemionki ze względu na wiele zalet, jak na przykład łatwość ich przygotowania i niski koszt produkcji znalazły szerokie zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu. Ich specyficzne właściwości powierzchniowe, porowatość czy liczne możliwości modyfikacji funkcjonalnej sprawiają, że mogą mieć różne zastosowania. Mogą służyć do wykrywania i rozdzielania biomolekuł, jako stałe nośniki do systemów dostarczania leków lub jako środki ochronne w różnego rodzaju płynach kontrastowych. W aspekcie biomedycznym są wykorzystywane do diagnozowania i kontrolowania postępu chorób, identyfikowania i korygowania zaburzeń genetycznych [149]. Nanocząsteczki krzemionki mogą być wykorzystywane w różnego rodzaju narzędziach służących do adsorpcji i separacji specyficznych białek. Wykorzystuje się je także do wykrywania, separacji i oczyszczania DNA. Adsorpcja DNA na powierzchni SiNPs jest na ogół kontrolowana przez trzy efekty: słabe siły odpychania elektrostatycznego, odwodnienie i tworzenie wiązań wodorowych [150]. Analiza tych zjawisk pozwoliła na opracowanie powierzchni krzemionkowych w taki sposób, aby uzyskać lepszą interakcję z badanym materiałem. SiNPs są również wykorzystywane do projektowania biosensorów DNA. Funkcjonalizacja za pomocą oligonukleotydów poprzez hybrydyzację z docelowymi komplementarnymi sondami DNA lub RNA, znakowanymi fluorochromami pozwala uzyskać zmienną intensywność fluorescencji [149], [151].

Krzemionka ma dużą powierzchnię pokrytą polarnymi grupami silanolowymi, co sprzyja również adsorpcji wody. Właściwość tą wykorzystali Gore i Banker do stabilizacji tabletek popularnej aspiryny [151]. Obecnie prowadzone są również badania nad membranami poliuretanowymi z 0,02% domieszką nanokrzemionki w celu uzyskania odwróconej osmozy [152].

Pomimo wielu kontrowersji, nadal wzrasta zainteresowanie wykorzystaniem nanosrebra jako domieszki w materiałach polimerowych. Mnogość form oraz różnego rodzaju struktura jaką można opracować, przekłada się na szeroki zakres możliwości ich zastosowania, zwłaszcza pod kątem biomedycznym [153], [154]. Przykładem mogą być powłoki przeciwdrobnoustrojowe czy opatrunki na rany, w tym rany oparzeniowe [154]. Warto wspomnieć o preparacie Aticoat, gdzie udokumentowane zostało dłuższe działanie przeciwbakteryjne oraz lepsza penetracja w głąb tkanek martwiczych w porównaniu do opatrunków wykorzystujących tradycyjne związki srebra [155]. Od wielu lat sporą uwagę przykuwa zastosowanie tej domieszki w celu modyfikacji implantów ortopedycznych. Dzięki temu można zapobiec zakażeniom związanym z procesem ich użytkowania. Nowoczesne protezy kości udowych bądź piszczelowych, szpilki mocujące pokryte nanocząsteczkami srebra, czy cement kostny, który go zawiera wykazują tendencję do hamowania infekcji [156]–[158]. Nanosrebro w postaci domieszki jest również wykorzystywane w endodoncji, gdzie, coraz częściej podczas płukania kanałów korzeniowych wykorzystywany jest preparat Nanocare Plus wzbogacony cząsteczkami nanokoloidalnego srebra, złota i ozonu. Preparaty z serii Nanocare są także polecane w innych procedurach takich jak: wypełnianie ubytków próchnicowych, cementowanie koron, licówek bądź mostów. W każdym z tych przykładów użycie preparatu sprzyja jałowości i chroni przed powstawaniem zakażenia bakteryjnego [155]. Nanosrebro wykorzystane zostało również do powlekania plastikowych cewników, co przyczyniło się do zmniejszenia liczby zakażeń w szpitalach. Wykazano, że taki sposób zabezpieczenia sprzyja zwiększeniu aktywności przeciwdrobnoustrojowej *in vitro* oraz zapobiega tworzeniu się biofilmu [159], [160].

Oprócz tego cząsteczki nanosrebra znalazły zastosowanie do produkcji tkanin na ubrania noszone przez pacjentów szpitali oraz pracowników służby zdrowia oraz na pozostałe materiały tekstylne, wykorzystywane w tego typu placówkach. Chorobotwórcze szczepy bakterii mają zdolność przetrwania na odzieży bądź pościeli nawet do trzech miesięcy. Czasami, szczepy te, są wystarczająco silne, aby przetrwać również czyszczenie jakim jest pranie. Przeprowadzone badania potwierdziły wysoką skuteczność w ograniczaniu zakażeń

bakteryjnych w szpitalach po zastosowaniu tkanin impregnowanych nanocząsteczkami srebra [161].

Nie wolno jednak zapominać, że istnieją prace wzbudzające wątpliwości nad bezpieczeństwem stosowania tych preparatów [125], [145]–[147].

Przedstawione powyżej zastosowania wybranych domieszek wyraźnie wskazują na ich przydatność w branży medycznej. Ponadto każdą z nich można połączyć z materiałem polimerowym, co jest niezwykle istotne z punktu niniejszej pracy.

Wielostronne działania bioaktywne prezentowanych w tej pracy komponentów, które mogą wchodzić w skład kompozytów, stanowią zasadniczy problem niniejszej dysertacji. Polimery będące potencjalnymi nośnikami czynników o znaczeniu medycznym, otwierają perspektywę tworzenia sporej gamy produktów, które mogą być wykorzystywane w szeroko rozumianej medycynie, tzn. od podstawowych przedmiotów wyposażenia szpitali i ośrodków medycznych, poprzez wyroby sprzętu medycznego, aż po wykonywanie struktur wszczepialnych o ściśle określonej konformacji.

III. Założenia i cel pracy

Celem pracy była synteza, charakterystyka fizykochemiczna i badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej materiałów z uwzględnieniem możliwości zastosowania ich w branży medycznej. Badania te, dedykowane są głównie wstępnej ocenie możliwości konstruowania implantów chrzęstnych oraz kostnych lub zewnętrznych klamer ortopedycznych.

W pracy skupiono się na wytworzeniu całkowicie nowego materiału jakim jest PC domieszkowany betulina oraz dwóch innych: PC domieszkowanego nanosrebrem oraz PC domieszkowanego nanokrzemionką. Dla wszystkich materiałów dobrano odpowiednie stężenia domieszki, sposób jej połączenia z materiałem bazowym oraz parametry przetwórstwa. Mając na uwadze jakość wytworzonych do badań materiałów i uzyskanie lepszego połączenia na granicy faz, do komponentów wprowadzono dodatkowo niewielką ilość zsyntezowanego uprzednio polioliu – 0,1-1,6 % masy całkowitej, w zależności od domieszki.

Docelowo, tak wykonane materiały, mogłyby zostać wykorzystane na niedegradowalne, spersonalizowane rusztowania zastępujące lub stabilizujące elementy chrzęstne (chrząstki krtani, ucha czy nosa) oraz kostne. Rusztowania byłyby projektowane z wykorzystaniem techniki MR oraz CT dla konkretnego pacjenta. Na tak przygotowanej matrycy polimerowej (wykonanym rusztowaniu) można by hodować komórki autogeniczne pobrane od pacjenta, minimalizując tym samym ryzyko odrzutu wszczepionego później implantu. Zasadniczy problem, z punktu widzenia medycyny regeneracyjnej, stanowi prawidłowa inkubacja komórek i ich proliferacja zarówno przed jak i po implantacji. Uwzględniając zasady naturalnej regeneracji chrząstki lub kości, wytworzone kompozyty mogłyby być wszczepiane do większych ubytków jako nośniki komórek progenitorowych, służące do prowokacji procesów odtwórczych.

W rozprawie zawarto następujące hipotezy:

- 1) Wykorzystanie betuliny jako modyfikatora w materiałach polimerowych, w szczególności w poliwęglanach, poprawi właściwości przeciwdrobnoustrojowe materiału.

- 2) Poliwęglan domieszkowany betuliną nie będzie wykazywał działania cytotoksycznego względem mysich fibroblastów.
- 3) Zastosowanie nanokrzemionki oraz nanosrebra jako dodatku, pozwoli na otrzymanie materiału o poprawionych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych.
- 4) Zastosowanie metod takich jak chromatografia gazowa, chromatografia wykluczenia oraz analiz spektralnych wspomaganych metodami mikrobiologicznymi i analizą właściwości mechanicznych, pozwoli na wstępną ocenę materiałów pod kątem ich potencjalnego wykorzystania na rusztowania tkankowe.

IV. Badania własne

4.1. Materiał do badań

Na podstawie danych literaturowych oraz wstępnych badań, do dalszych analiz, prezentowanych w niniejszej rozprawie wytypowano trzy materiały: poliwęglan z dodatkiem betuliny, poliwęglan z dodatkiem nanosrebrem oraz poliwęglan z dodatkiem nanokrzemionki.

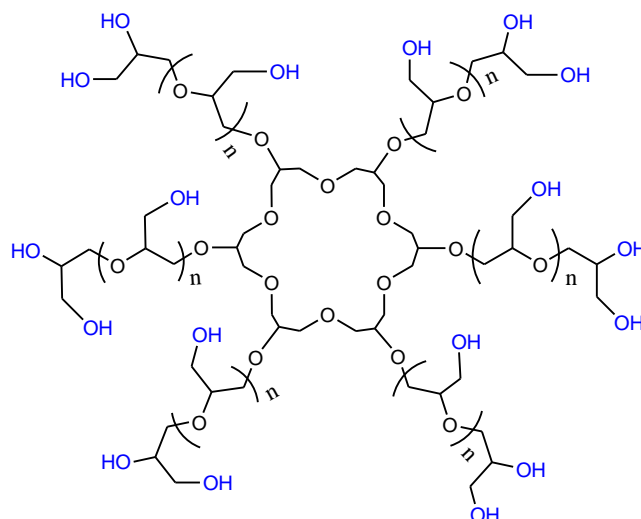
Do wytworzenia materiałów wykorzystano granulaty poliwęglanu – Makrolon 2600® [162]. Wybrano go ze względu na brak dodatków stabilizujących, plastyfikatorów oraz modyfikatorów własności i przetwórstwa. Co więcej, charakteryzuje się on bardzo dobrymi właściwościami mechanicznymi, odpornością korozyjną oraz biokompatybilnością zgodną z normą ISO 21305-2:2019 [163] (wcześniej ISO 7391-PC,M,X-18-9), co jest podstawowym wymogiem dla wytworzonego materiału. Ponadto, wszystkie rodzaje Makrolonu charakteryzują się zawartością BPA poniżej 0.1%, co ma niezwykle istotne znaczenie w przypadku wykorzystania go w branży medycznej. Dodatkowo Makrolon 2600® może być poddawany obróbce termicznej i nadaje się do wykorzystania w druku 3D. Aby móc wykorzystać go na implanty należy przedstawić wyniki wskazanych badań i uzyskać zgodę firmy Covestro. Tak więc wykonane w pracy badania, są badaniami wstępnymi, umożliwiającymi sprawdzenie czy materiał ten może być brany pod uwagę do dalszych badań. W przeprowadzonym przeglądzie literaturowym nie odnaleziono informacji na temat wykorzystania tego typu materiałów jako rusztowania powlekanego komórkami pacjenta, które następnie będzie można zaimplantować w jego organizmie.

Dla poliwęglanu z dodatkiem nanosrebra, nanokrzemionki oraz betuliny, jako modyfikatora stabilności cząstek użyto wytworzonego wcześniej i opatentowanego (PAT 217497) gwiaździstego polioliu [164]. Pełnił on rolę czynnika chelatującego.

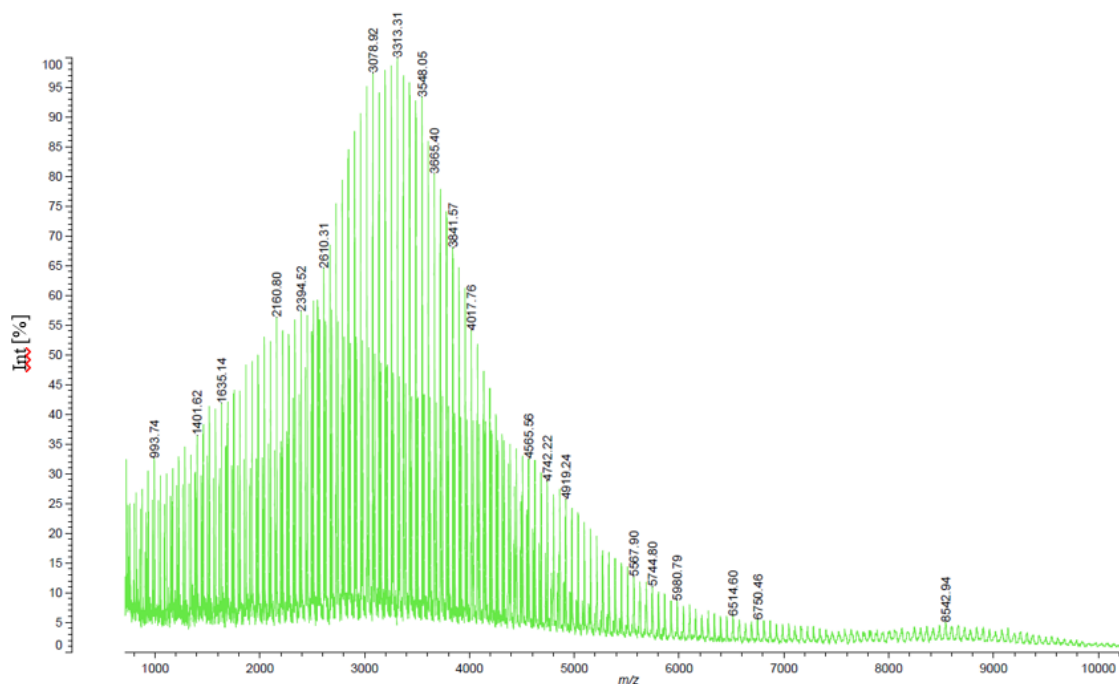
4.1.1. Synteza polioliu

Modyfikator stabilności cząstek został otrzymany na podstawie patentu [148]. Reakcję syntezy przeprowadzono w reaktorze wypełnionym argonem, do którego wprowadzono odpowiednią ilość zawiesiny wodoru potasu w oleju mineralnym a następnie po usunięciu oleju, wprowadzono roztwór eteru koronowego w tetrahydrofuranie oraz stopniowo wkroplono glicydol. Reaktor wyposażony był w płaszcz wodny, umożliwiający ogrzewanie lub chłodzenie. Całość mieszano przez 30 minut do czasu utworzenia metastabilnych kompleksów

(kompleksy są stabilne przez okres 20 minut). Następnie przed upływem 20 minut, aby zapobiec rozpadowi kompleksów stopniowo wkraplano tlenek propylenu i prowadzono polimeryzację. Po wyczerpaniu się monomeru, alkoholowe grupy końcowe przeprowadzone zostały w grupy hydroksylowe z wykorzystaniem mieszanki alkoholu etylowego. Przebieg procesu polimeryzacji kontrolowany był z wykorzystaniem metod chromatograficznych – chromatografii gazowej i żelowej. Masę bezwzględną produktu oznaczano z wykorzystaniem techniki MALDI ToF. Otrzymany polimer poddano procesowi sieciowania z wykorzystaniem odczynnika PMDI oraz katalizatora OH/NCO. Do połączenia niezwiązanego na etapie sieciowania PMDI wykorzystano katalizator trymerizacji. Na rysunku 15 pokazano otrzymany propoksylat cyklicznego heksameru glicydolanu potasu z końcowymi grupami hydroksylowymi. Dla otrzymanego polioliu wykonano także badania MALDI-ToF (rysunek 16).



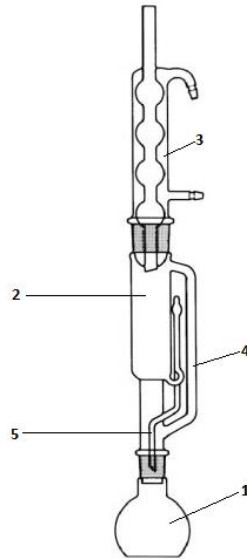
Rysunek 15. Propoksylat cyklicznego heksameru glicydolanu potasu z końcowymi grupami hydroksylowymi.



Rysunek 16. Wyniki badania MALDI-ToF otrzymanego poliolu.

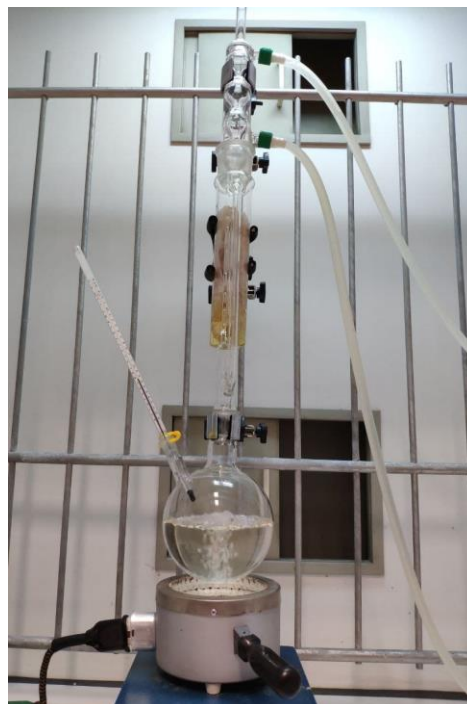
4.1.2. Ekstrakcja betuliny

W celu uzyskania ekstraktu zdecydowano się na skorzystanie z metody ekstrakcji ciągłej Soxhleta, która ma zastosowanie w przypadku, kiedy układ charakteryzuje się małym współczynnikiem ekstrakcji. Aparat Soxhleta (rys.17) składał się z kolby kulistej (1), ekstraktora (2) oraz chłodnicy zwrotnej (3). Ekstrahowany materiał umieszczono w glizie (bibuła bądź tkanina) w części ekstraktora. Do kolby wprowadzono odpowiedni, lotny rozpuszczalnik, który podgrzewał się do momentu wrzenia. Pary rozpuszczalnika transportowane były przez rurkę (4) do chłodnicy zwrotnej, gdzie następowało skraplanie. Po skropleniu rozpuszczalnik trafiał do ekstraktora z glizą, w którym umieszczono materiał do ekstrakcji. Po osiągnięciu odpowiedniego poziomu, rozpuszczalnik z wyekstrahowaną substancją przelewał się samoczynnie poprzez zamknięcie syfonowe (5) do kolby. W kolbie następowała jego ponowa destylacja. Zamknięty obieg aparatu oraz destylacja rozpuszczalnika sprawiły, że materiał był ekstrahowany wielokrotnie świeżymi porcjami rozpuszczalnika a sama ekstrakcja nie wymagała ciągłego nadzoru.



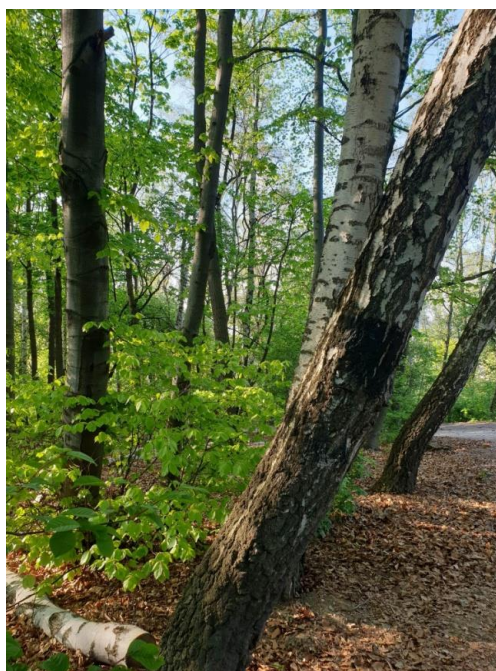
Rysunek 17. Schemat poglądowy aparatu do ekstrakcji ciągłej Soxhleta, gdzie 1 – kolba kulista, 2 – ekstraktor, 3 – chłodnica zwrotna, 4 – rurka połączona z chłodnicą zwrotną, 5 – zamknięcie syfonowe.

Aparat wykorzystany do pozyskania betuliny w pracy przedstawiono na rysunku 18.



Rysunek 18. Aparat Soxhleta wykorzystany do ekstrakcji betuliny.

Do ekstrakcji betuliny wykorzystano materiał pobrany z gatunku brzozy brodawkowej (*Betula pendula*) (rys.19) rosnącej w miejscowości Kraków w lesie Wolskim.



Rysunek 19. Brzoza z gatunku *Betula pendula* z której pobrano korę do ekstrakcji.

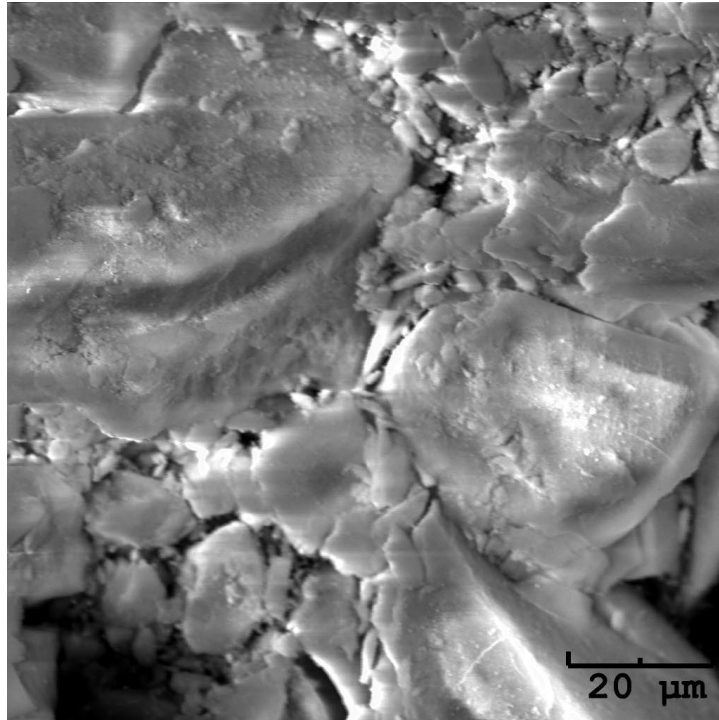
Materiał pozyskano wiosną w 2017 roku. Pierwszy etap polegał na oczyszczeniu kory, a konkretnie usunięciu z warstwy zewnętrznej zdrewniałych elementów. Następnie korę poddano suszeniu w temperaturze 120°C. Czas suszenia wynosił 45 minut. Kolejny etap polegał na pocięciu kory na pasy o wymiarach około 100 mm x 20 mm, odważeniu 20g i umieszczeniu ich w glizie. Tak przygotowany materiał wprowadzono do komory aparatu Soxhleta o pojemności 250 cm³. Pojemność kolby wynosiła 500 cm³. Jako rozpuszczalnika użyto 750 ml alkoholu etylowego. Kolba została umieszczona w płaszczu grzewczym i była ogrzewana w celu utrzymania alkoholu etylowego w stanie łagodnego wrzenia – punkt wrzenia wynosił 78°C. Skraplające się pary gromadziły się w ekstraktorze z glizą. Po osiągnięciu odpowiedniego poziomu, mieszanina wyekstrahowanej betuliny oraz alkoholu etylowego przelewała się samoczynnie do kolby. Proces powtarzał się automatycznie i był prowadzony w trzech cyklach, każdy cykl trwał 6 godzin. Kolejny etap polegał na wyodrębnieniu ekstraktu z mieszaniny. W tym celu należało zatężyć ekstrakt, aż do momentu pojawienia się pierwszego osadu, a następnie poddać go krystalizacji z metanolu. W pracy wykorzystano 250 ml metanolu. Wydzielony produkt został odsączony na lejku Hirscha, wysuszony oraz zważony. Użyte do ekstrakcji czynniki zestawiono w tabeli nr 2.

Tabela 2. Odczynniki użyte do ekstrakcji betuliny.

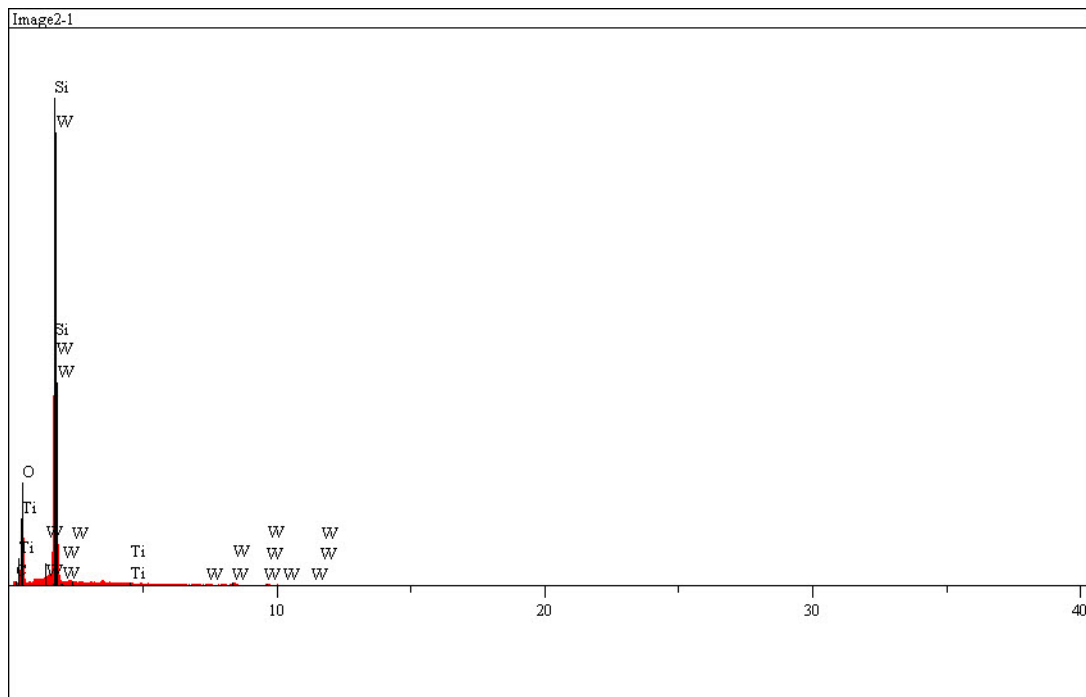
Odczynnik	Masa molowa [g/mol]	Czystość [%]	Producent
Alkohol etylowy – C ₂ H ₅ OH	46,07	96,00	Sigma Aldrich
Metanol - CH ₃ OH	32,04	99,85	Sigma Aldrich
Tetrahydrofuran- C ₄ H ₈ O	72,11	99,50	Sigma Aldrich
Standard betuliny - C ₃₀ H ₅₀ O ₂	442,72	97,50	Sigma Aldrich

4.1.3. Nanokrzemionka

Nanokrzemionkę otrzymano w wyniku mielenia z użyciem planetarnego młyna kulowego. Do reakcji użyto objętościowo 30 ml krzemionki (Geduran® Si 60 for column chromatography (0.063-0.200 mm); CAS 7631-86-9. Przygotowaną mieszaninę umieszczono w komorze młyna pokrytej od wewnątrz warstwą węgla spiekanego wolframu. W środku znajdowało się również 200 g kul o średnicy 1,6 mm, które wykonano z takiego samego materiału, co wewnętrzną powłokę komory. Dodano 5 ml toluenu. Po uszczelnieniu komory teflonem prowadzono proces mieszania oraz rozdrabniania mieszaniny reakcyjnej, kontrolując jednocześnie temperaturę, poprzez regulowanie prędkości obrotowej komory i ilości cykli. Całkowity czas mielenia oszacowano na 33 godziny przy zastosowaniu trzydziestominutowych cykli pracy urządzenia – 15 minut mielenia i 15 minut chłodzenia, co miało na celu nie dopuścić do przegrzania się środowiska reakcji. Temperaturę reakcji utrzymywano na poziomie około 72°C. Temperatura została zmierzona z wykorzystaniem pirometru optycznego. Prędkość obrotową komory ustalono na 360 rpm. Wykonano 66 cykli. Z otrzymanej mieszaniny reakcyjnej wymyło rozpuszczalnik – toluen – za pomocą THF. Następnie pozostałości THF odparowano z wykorzystaniem wysokiej próżni. Proces przeprowadzony został za pomocą próżniowej wyparki rotacyjnej. W wyniku mielenia otrzymano 200 mg nanokrzemionki ze śladowymi ilościami wolframu. Wielkość otrzymanych cząstek została potwierdzona w laboratorium w Krapkowicach z wykorzystaniem PSA. Na rysunku 20 przedstawiono zdjęcie otrzymanego produktu uzyskane za pomocą SEM a na rysunku 21 analizę pierwiastkową.



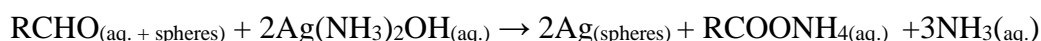
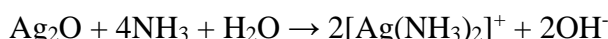
Rysunek 20. Zdjęcie nanokrzemionki uzyskane za pomocą SEM



Rysunek 21. Analiza pierwiastkowa wykonana podczas badania SEM.

4.1.4. Nanosrebro

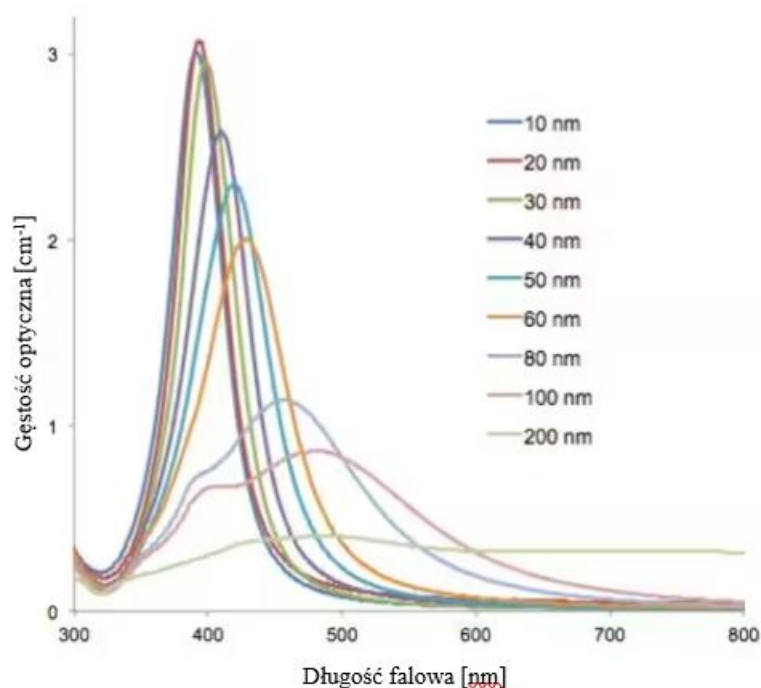
Nanosrebro przygotowano na bazie nanokrzemionki otrzymanej z wykorzystaniem zmodyfikowanej syntezy Stöbera. Zastosowano następujące odczynniki: alkohol etylowy (95%, Polish Chemicals), wodę amoniową (25%, Polish Chemicals) i tetraetoksylian – TEOS – $(\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4)$ (Sigma Aldrich). Stosunek molowy wynosił odpowiednio: NH_4OH : TEOS: $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ – 14: 1: 49. Pierwszy etap obejmował wymieszanie wody amoniakalnej (stanowiącej katalizator) z etanolem a następnie dodanie do mieszaniny tetraetoksylianu. Proces trwał około 30 minut i był prowadzony w mieszadło magnetycznym działającym z prędkością 400 rpm w temperaturze pokojowej. Następnie mieszaninę przemyto alkoholem metylowym, poddano wirowaniu w probówkach i suszeniu w temperaturze 70°C przez 24 godziny. Zachodzące procesy obejmowały hydrolizę TEOS, a następnie kondensację powstałych grup hydroksylowych z utworzeniem sieci krzemionkowej $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$ i wody stanowiącej uboczny produkt reakcji. Otrzymane w ten sposób cząstki charakteryzowały się budową amorficzną. Na uwagę zasługuje również fakt uzyskania niewielkiego rozrzutu wymiarów otrzymanych cząstek. Do wytworzenia nanosrebra zastosowano metodę Tollena. Nanoproszki zdyspergowano w wodzie destylowanej a następnie dodano roztwór kompleksu amoniaku srebra $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$ [0,2 M, 0,02 ml/mg]. Jako środek redukujący zastosowano roztwór glukozy [0,4 M] (RCHO , 0,02 ml/mg $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Stosunek molowy $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+ : \text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_7$ wynosił 1: 2. Proces obejmował następujące reakcje chemiczne:



W ten sposób otrzymano nanocząstki krzemionki domieszkowanej srebrem ($\text{Ag}-\text{SiO}_2$).

Wytworzone w ten sposób nanosrebro nie zostało jednak wykorzystane do dalszych badań, ze względu na możliwość oddziaływania ewentualnych pozostałości nanokrzemionki. Mogłoby to prowadzić do zafałszowania wyników badań, ponieważ trudno byłoby jednoznacznie określić czy potencjalne właściwości przeciwdrobnoustrojowe pochodzą od nanokrzemionki czy też wytworzonego nanosrebra. Na dalszym etapie korzystano z nanosrebra firmy Sigma Aldrich – nr produktu 730793, charakteryzującego się nanocząsteczkami o wielkości nie przekraczającej 20 nm. Wielkość cząstek została

przedstawiona w karcie charakterystyki [149]. Na rysunku 22 przedstawiono rozkład cząstek uzyskany dla wykorzystanego produktu [149].



Rysunek 22. Rozkład cząsteczek nanosrebra przy stężeniu 0.02 mg/ml

4.1.5. Wytłoczenie blendy polimerowej

Proces wytłaczania blendy polimerowej poprzedzony był odpowiednim przygotowaniem poszczególnych granulatów. W tym celu należało zmieszać w odpowiednich proporcjach wytypowany granulát z domieszkami: betuliną, nanosrebrem i nanokrzemionką oraz otrzymanym wcześniej poliolem. Polioliol pozwolił na równomierne rozprowadzenie dodatków w blendzie. Odpowiednie ilości substratów dla wykonywanej blendy wprowadzono do reaktora ze stali nierdzewnej o pojemności 3000 cm³ w temperaturze 24°C. Reaktor wyposażony był w system odprowadzania ładunku elektrostatycznego. Komponenty mieszano z wykorzystaniem teflonowego mieszadła przez okres 60 minut. W celu uzyskania odpowiedniej homogenizacji zastosowano prędkość 50 rpm. Tak uzyskana mieszanina była suszona w temperaturze 100°C pod ciśnieniem 50 mmHg. Czas suszenia wynosił 24 godziny.

Pierwszą otrzymaną blendą polimerową była blendą z dodatkiem betuliny. Wykonano ją w kilku wariantach, charakteryzujących się różną zawartością procentową betuliny - 1, 5 oraz 10 %. Przykładowe proporcje użyte do wykonania jednego z filamentów przedstawiono w tabeli 3. Analogicznie wykonano pozostałe filamenty.

Do badań właściwości mechanicznych wykorzystano bazowy filament wykonany z 500 g granulatu i 1g betuliny stabilizowanej z wykorzystaniem poliolu, ze względu na najbardziej zbliżoną ilość domieszki w porównaniu do nanosrebra i nanokrzemionki. Dodatkowo przeprowadzone badania wstępne wykazały, że ilość betuliny nie wpływa na właściwości mechaniczne.

Tabela 3. Proporcje składników blendy polimerowej z betuliną dla stężenia 1%.

Substrat	Masa substratu [g]
Makrolon 2600®	500
Poliol	1
Betulina	5

Proporcje składników do blendy z dodatkiem nanosrebra i nanokrzemionki przedstawiono w tabeli 4 i 5. Stężenie czynnika aktywnego wynosiło 0.6% zarówno dla nanokrzemionki jak i nanosrebra i zostało dobrane empirycznie na podstawie wcześniej przeprowadzonych badań własnych.

Tabela 4. Proporcje składników blendy polimerowej z nanosrebrem.

Substrat	Masa substratu [g]
Makrolon 2600®	700
Poliol	11,2
Nanosrebro	4,2

Tabela 5. Proporcje składników blendy polimerowej z nanokrzemionką.

Substrat	Masa substratu [g]
Makrolon 2600®	700
Poliol	11,2
Nanokrzemionka	4,2

Proces wytłaczania przeprowadzony został w Instytucie Inżynierii Materiałów Polimerowych i Barwników w Gliwicach. Filamenty wytłoczono z wykorzystaniem wytłaczarki jednoślismakowej marki Brabender z czterostrefowym ekstruderem o geometrii zespołu plastyfikującego zdefiniowanej dla poliwęglanu (L/D – 32/1 i stopniu sprężania 10/1). Dobrano również temperatury na strefach i po zoptymalizowaniu wynosiły one odpowiednio od głowicy: 265°C, 230°C, 210°C i 160°C. Prędkość wytłaczania oszacowano empirycznie na 60 rpm. Wytłaczany filament o średnicy 2,95 mm był odbierany przez odpowiedni podajnik taśmowy oraz chłodzony powietrzem na odcinku 3 metrów.

4.1.6. Wydruk próbek do badań

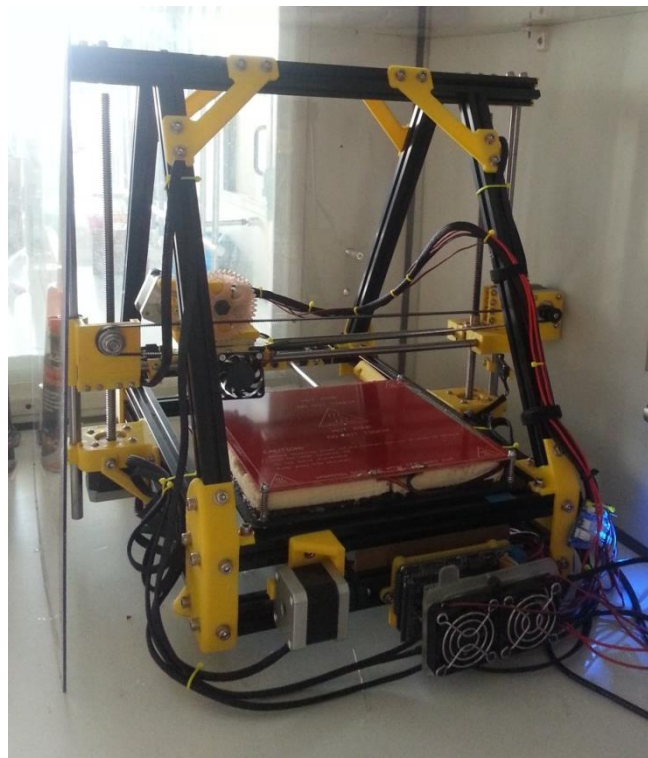
Próbki do badań wykonano z użyciem technologii FDM. Pierwszym etapem procesu było opracowanie modelu obiektu z użyciem oprogramowania CAD. W pracy wykorzystano program AutoDesk Inventor oraz modele otrzymane na podstawie rezonansu magnetycznego. Plik CAD jest zapisywany w formacie pliku stereolitograficznego – „.STL”. Oprogramowanie komputerowe przetwarza plik .STL i konwertuje model obiektu na kilka części z wykorzystaniem stosownych algorytmów. Pliki STL są eksportowane do oprogramowania drukarki FDM, które generuje odpowiednie ścieżki narzędziowe [150]. Sam proces drukowania rozpoczyna się od stopienia wybranego materiału w głowicy urządzenia, a następnie nanoszeniu go warstwa po warstwie na stół drukarki zgodnie z założeniami modelu teoretycznego. Zarówno stół jak i głowica mogą poruszać się w trzech wymiarach w zależności od typu posiadanego urządzenia.

Do badań przygotowano kwadratowe próbki o wymiarach 50x50±0,1 mm i grubości 2±0,05mm. Próbki wydrukowano na zmodyfikowanej drukarce RepRap Mendel Max 1,5 (rys. 23) przystosowanej do pracy z temperaturą do 300°C na głowicy i 160°C na stole roboczym. W tym celu wymieniono ekstruder na metalowy. Wymieniony został także czujnik temperatury ekstrudera oraz stół – na własny dedykowany. Drukarkę wyposażono również w dodatkowy

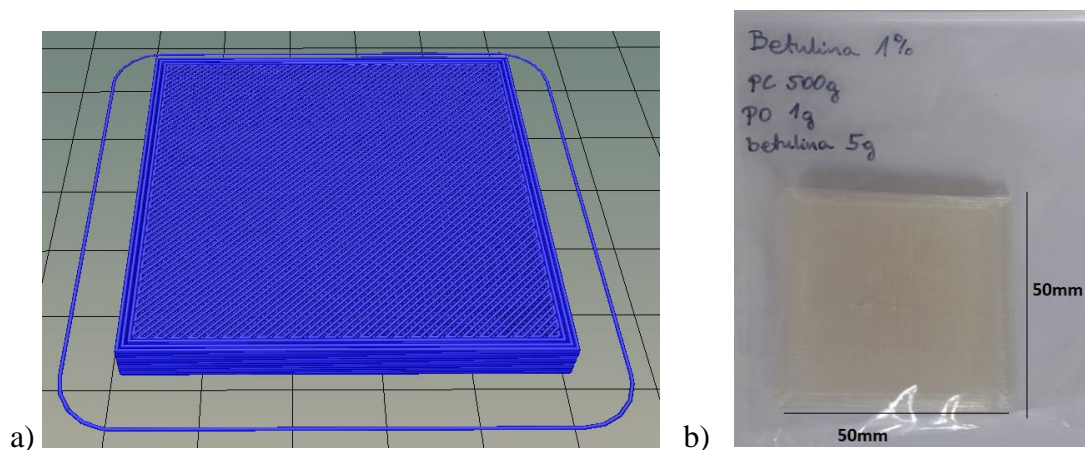
zasilacz. Przygotowano po 20 sztuk próbek dla każdego z wytypowanych materiałów (rys.24).
W tabeli 6 zebrano podstawowe parametry druku dla wykonanych próbek.

Tabela 6. Parametry druku dla wykonanych próbek.

Parametr	Wartość
Średnica filamentu	2,95 mm
Rodzaj wypełnienia	liniowe
Stopień wypełnienia	100 %
Grubość warstwy	0,2 mm
Temperatura głowicy	290
Temperatura stołu	75

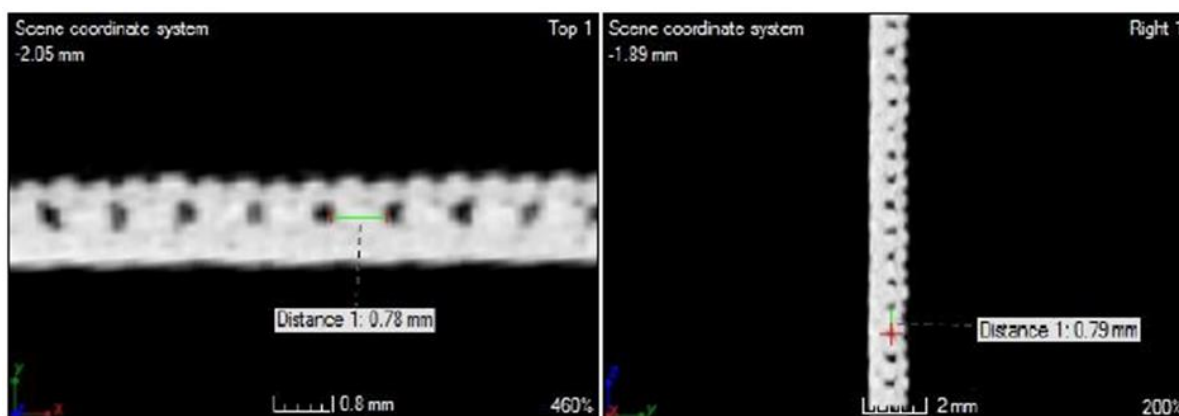


Rysunek 23. Drukarka RepRap Mendel Max 1,5



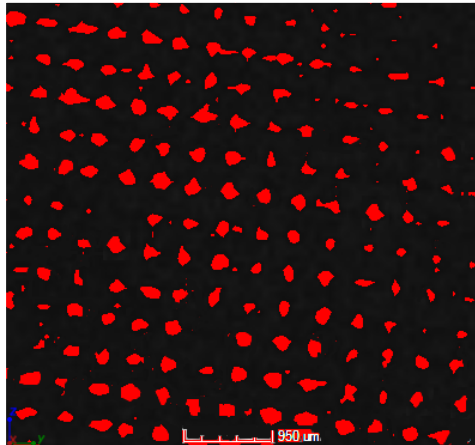
Rysunek 24. a) Model próbki w programie Slic3r przedstawiający sposób prowadzenia ścieżek; b) wydrukowana próbka z poliwęglanu z 1% zawartością domieszki betuliny umieszczona w aseptycznym opakowaniu.

Dla wydrukowanych próbek określono również porowatość, która ma niezwykle istotne znaczenie, zwłaszcza w kontekście wykorzystania materiałów na rusztowania tkankowe. Na rysunku 25 przedstawiono zestawienie przekrojów mikrostruktur płytek z domieszkami odpowiednio nanosrebra oraz nanokrzemionki ukazującą porowatość struktury wykonane za pomocą mikrotomografu komputerowego. Widoczne są równomiernie rozłożone pory o ułożeniu sekwencyjnym. Ich wielkość oszacowano za pomocą programu komputerowego ImageJ.



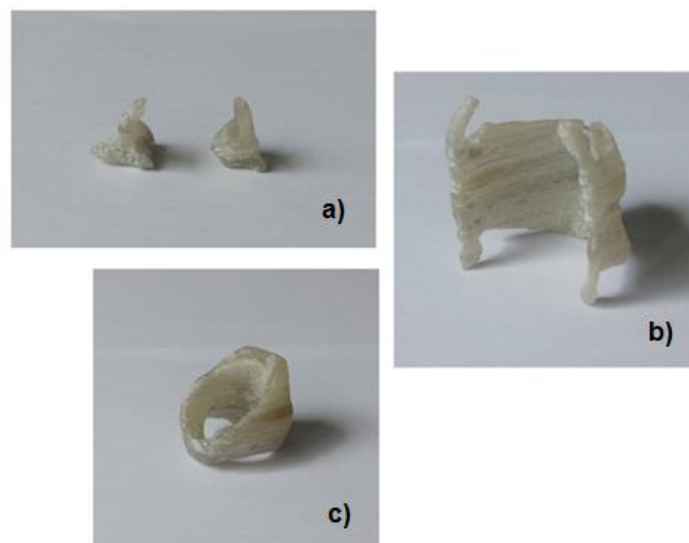
Rysunek 25. Zestawienie przekrojów mikrostruktur płytek z domieszkami odpowiednio Ag oraz Si.

Na uzyskane obrazy nałożone zostały belki, dzięki którym zmierzono odległość między poszczególnymi lukami występującymi w materiale (rys.26) W ten sposób określono, że różnice w występowaniu porów wynoszą $\pm 0,1\text{mm}$ i że odległość ta jest stała oraz niezależna od kierunku. Badanie mikrotomograficzne potwierdziło, że wykonane materiały charakteryzują się porami o kształcie sferycznym a ich średnia wielkość wynosi $\pm 0,015\text{mm}$.



Rysunek 26. Przykładowe zdjęcie mikrostruktury poliwęglanu z dodatkiem nanosrebra, na podstawie którego oszacowywano wielkość porów.

Ponadto w ramach pracy przygotowano również prototypowe trójwymiarowe elementy krtani (rys. 27), ucha oraz nosa.



Rysunek 27. Prototypowe chrząstki krtani: a – chrząstki nalewkowate, b – chrząstka tarczowata, c – chrząstka pierścieniowata.

4.2. Metodyka badawcza

Charakterystyka otrzymanych materiałów obejmowała badania właściwości mechanicznych w tym:

- Statyczna próba rozciągania
- Pomiar twardości
- Pomiar udarności

oraz badania fizykochemiczne:

- Chromatografia gazowa i żelowa – GC-MS i GPC
- MALDI-ToF
- Spektroskopia w podczerwieni FT-IR
- Spektrofluorymetria

Dodatkowo przeprowadzono również:

- Badania aktywności mikrobiologicznej według normy ISO 22196:2011
- Badania cytotoksyczności według normy ISO 10993-5 – test SRB

4.2.1. Statyczna próba rozciągania

Właściwości mechaniczne oznaczono z wykorzystaniem statycznej próby rozciągania. Parametry i sposób przeprowadzenia próby określono w normach PN-EN ISO 527-1:2012 oraz PN-EN ISO 527-2:2012 [151], [152]. Próba polega na jednoosiowym rozciąganiu specjalnie przygotowanych próbek ze stałą szybkością oraz w odpowiedniej temperaturze, aż do momentu jej zerwania.

Podczas badania mierzone jest odkształcenie oraz siły odkształcające. Na tej podstawie można wyznaczyć naprężenie σ , które jest stosunkiem siły odkształcającej do pola przekroju poprzecznego próbki przed badaniem i wyrażone jest wzorem (1):

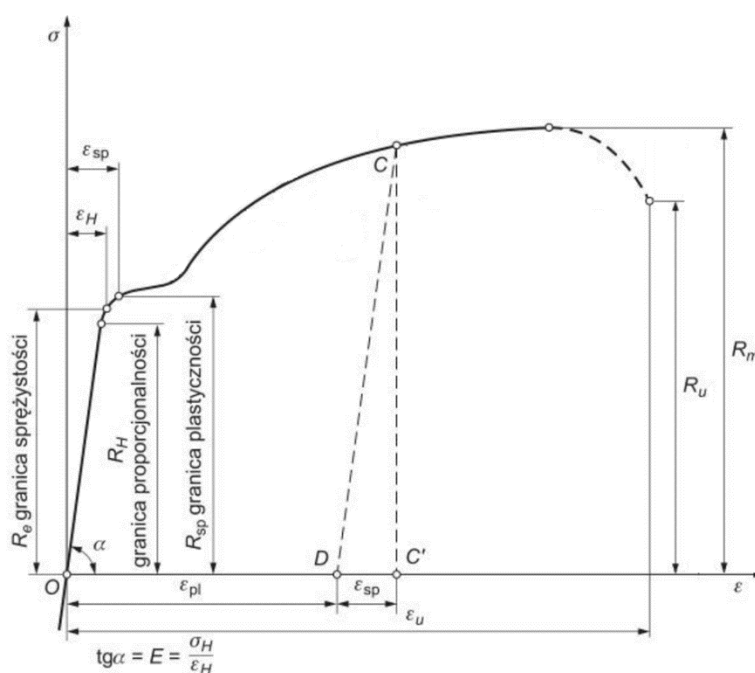
$$\sigma = \frac{F}{A_0} [MPa] \quad (1)$$

gdzie:

F – siła odkształcająca [N],

A_0 – powierzchnia początkowego przekroju poprzecznego [m²]

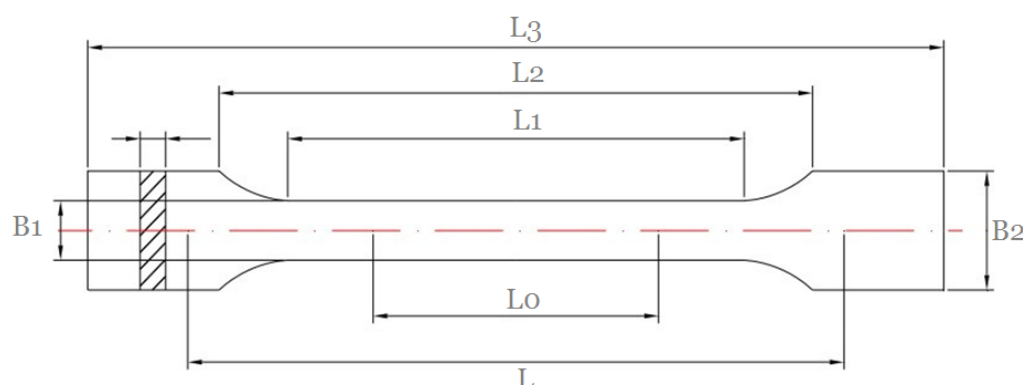
W trakcie próby, określa się również następujące parametry (rys.28) [153], [154]: granica proporcjonalności R_H – granica, w której zastosowanie ma prawo Hooke’a – maksymalna wartość naprężenia, do której zależność pomiędzy naprężeniem a odkształceniem jest proporcjonalna, granica sprężystości R_e – maksymalne naprężenie nie powodujące wystąpienia trwałego (plastycznego) odkształcenia materiału, granica plastyczności R_{sp} – minimalna wartość naprężenia, przy której powstają trwałe odkształcenia, których wielkości nie można pominąć (w przypadku próbek bez wyraźnej granicy plastyczności powyżej 0,2% długości pomiarowej próbki), wytrzymałość materiału na rozciąganie R_m – maksymalna wartość naprężenia, naprężenie zrywające R_u , które powoduje zerwanie się próbki, ϵ_R – odkształcenie przy zerwaniu.



Rysunek 28. Wykres statycznej próby rozciągania [153].

Na podstawie uzyskanych wyników można obliczyć moduł Younga – E , będący tangensem kąta nachylenia początkowej części wykresu rozciągania (do granicy proporcjonalności) do osi odciętych, czyli stosunku $\frac{\sigma_H}{\epsilon_H}$.

Wymiary kształtki zgodnie z normą [152] przedstawiono na rysunku 29 oraz w tabeli 7.



Rysunek 29. Wymiary kształtek dla statycznej próby rozciągania [151]

Tabela 7. Wymiary kształtek dla statycznej próby rozciągania [148].

Wymiary kształtek	Typ A1 [mm] Bezpośrednio formowana	Typ B1 [mm] Obrabiana mechanicznie
L_3 – długość całkowita	$\pm \geq 150$	150
L_1 – długość części ograniczonej liniami równoległymi	80 ± 2	60 ± 2
L_2 – odległość między szerokimi równoległymi usytuowanymi częściami	104-113	106-120
B_2 – szerokość na końcach	$20,0 \pm 0,2$	$20,0 \pm 0,2$
B_1 – szerokość wąskiej części	$10,0 \pm 0,2$	$10,0 \pm 0,2$

Do badań własnych kształtki wykonano zgodnie z normą dla typu B1 [152]. Kształtki wydrukowano na drukarce 3D. Materiał drukowany był metodą FDM. W odcinku pomiarowym wiosełka, ścieżki były prowadzone wzdłuż osi wzdłużnej działania siły w warstwach nieparzystych i prostopadle w warstwach parzystych. Wszystkie kształtki zostały wydrukowane na płasko, wzdłuż osi Y drukarki. Aby zachować powtarzalność próbek, kształtki drukowano pojedynczo, zachowując następujące parametry drukowania: prędkość drukowania pierwszej warstwy: 20 mm/s, prędkość drukowania kolejnych warstw: 60 mm/s, temperatura głowicy: 295°C, wysokość warstwy: 0,2 mm, grubość dolnej i górnej warstwy: 0,6 mm, grubość ścian bocznych: 0,8 mm. Dodatkowo wykorzystano podgrzewany stolik, na którym ustawiono temperaturę $90 \pm 5^\circ\text{C}$. Próbkę wydrukowano stosując wypełnienie krzyżowe pod kątem 45° względem osi Y; gęstości wypełnienia 100 %.

Próbe przeprowadzono w Instytucie Inżynierii Materiałów Polimerowych i Barwników w Gliwicach na maszynie wytrzymałościowej Instron 5982 zgodnie z zaleceniami normy.

4.2.2. Pomiar twardości

Twardość wykonanych materiałów zmierzono metodą Vickersa, ze względu na brak dostępnego aparatu do pomiarów metodą Shore'a. Sposób przeprowadzenia pomiarów zawarty został w normie [155]. Metoda polega na wciskaniu diamentowego wgłębnika w kształcie ostrosłupa o kwadratowej podstawie (kąt pomiędzy przeciwległymi ścianami wynosi 136°) w powierzchnię badanego materiału pod statycznym obciążeniem F . Zadawane obciążenie jest prostopadłe do badanej powierzchni. W zależności od wybranego obciążenia wgłębnika wyróżnia się: nanotwardość, kiedy obciążenie nie przekracza 10 g, mikrotwardość dla obciążenia nie przekraczającego 200 g, twardość pod małymi obciążeniami (obciążenie mieści się w zakresie 200 – 1000 g) oraz makrotwardość (obciążenie w zakresie 1 – 120 kg).

Twardość materiału obliczono według następującego wzoru (2):

$$HV = \frac{0,102F}{S} (2)$$

gdzie:

0,102 – współczynnik wynikający z wyrażenia siły wciskającej F w Niutonach [N]

S – pole powierzchni bocznej odcisku [mm^2]

Pomiary przeprowadzono zgodnie z normą [155] z wykorzystaniem twardościomierza Wolpert Wilson Instruments. Siła nacisku wgłębnika wynosiła 980 mN. Z uwagi na warstwową budowę próbek pomiaru dokonano prostopadle do warstw materiału. Dzięki temu można było uniknąć delaminacji materiału. Próbki do badań wykonano na drukarce 3D.

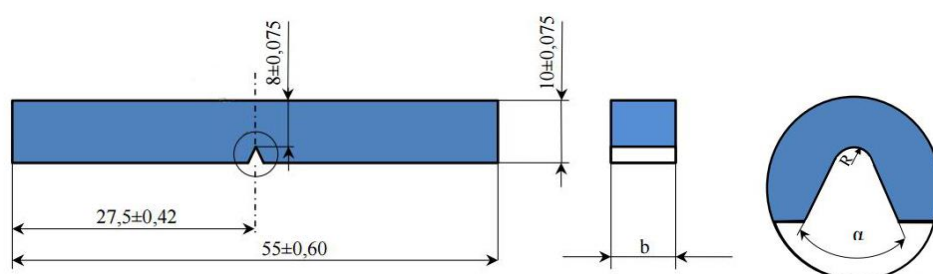
4.2.3. Próba udarności

Próba udarowa jest próbą dynamiczną, określającą zdolność materiału do przenoszenia gwałtownych obciążeń typu uderzeniowego. Pozwala na scharakteryzowanie właściwości materiału, których nie można określić wykorzystując próby statyczne. Najczęściej stosuje się udarową próbę zginania bądź rozciągania. Udarowe próby ściskania lub skręcania wykonywane są zdecydowanie rzadziej.

Próba udarności pozwala na ocenę materiału w warunkach, które sprzyjają kruchemu pękaniu. Warunki te wywołane są obecnością karbu w próbce oraz dużą szybkością odkształcenia, spowodowaną działaniem temperatury oraz dynamicznym działaniem siły.

Próbkę udarności polegającą na złamaniu jednym uderzeniem wahadłowego młota próbki z karbem, podpartej swobodnie na obu końcach przeprowadzono zgodnie z normą [156].

Norma opisuje dwa rodzaje próbek. Próbkę o karbie V kształtnym (rys. 30) cechuje 45° kąt rozwarcia karbu, głębokość 2 mm oraz promień zaokrąglenia dna wynoszący 0,25 mm. W tabeli 8 przedstawiono również dodatkowe parametry dla tego typu próbki.

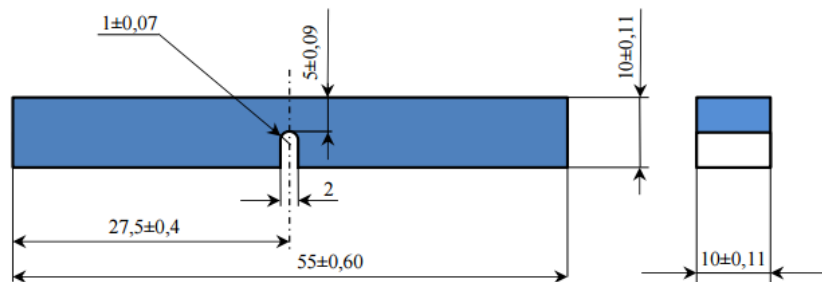


Rysunek 30. Próбка z karbem V – kształtnym

Tabela 8. Wymiary próbki z V – kształtnym karbem [156].

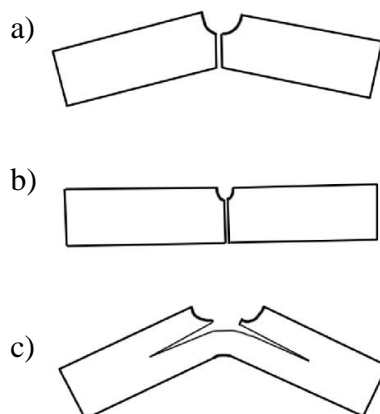
Symbol	Wartość [mm]	Dokładność [mm]
R	0,25	$\pm 0,025$
α	45°	$\pm 2^\circ$
b	10	$\pm 0,11$
	7,5	$\pm 0,11$
	5	$\pm 0,06$
	2,5	$\pm 0,05$

Próbka o karbie U kształtnym (rys. 31) charakteryzuje się głębokością karbu 5 mm a zaokrąglenie dna i promień wynoszą 1 mm. Dopuszcza się również stosowanie próbek o innym kształcie i wymiarach, wtedy kiedy przewidują to warunki techniczne bądź stosowne normy przedmiotowe [156].



Rysunek 31. Próbką z karbem U – kształtnym.

Próbkę przeprowadza się za pomocą młota wahadłowego typu Charpy’ego, który przeznaczony jest do badania próbek, podpartych swobodnie na obu końcach. Zasób energii dobierany jest w zależności od badanego materiału oraz rozmiaru próbek. Stosuje się młoty w zakresie od 2500 J do 0,4 J przy czym większość z nich można nastawić na dwa zakresy. Udarność określa się na podstawie energii potrzebnej do złamania próbki. Powstałe po złamaniu przełomy klasyfikuje się na rozdzielcze (przekroczenie granicy plastyczności powoduje pęknięcie próbki), kruche (próbka pękła, jednak nie wykazuje odkształceń plastycznych) oraz mieszane (próbka charakteryzuje się dużym stopniem anizotropii materiału bądź występują zanieczyszczenia). Rodzaje przełomów przedstawiono na rysunku 32.



Rysunek 32. Rodzaje przełomów: a) przełom rozdzielczy b) przełom kruchy c) przełom mieszany.

Udarność obliczono na podstawie wzoru (3):

$$KC = \frac{K}{S_0} \left[\frac{J}{m^2} \right] \quad (3)$$

gdzie:

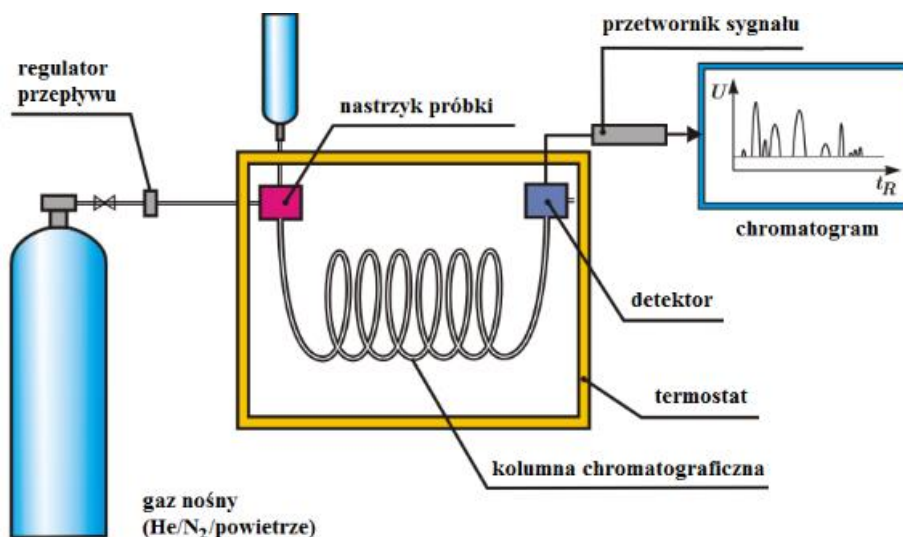
K – energia zużyta na złamanie próbki (praca uderzenia)

S_0 – powierzchnia przekroju próbki w miejscu karbu

Badania przeprowadzone zostały z wykorzystaniem Młota Charpy’ego firmy WPM Lipsk. Energia początkowa młota wynosiła 0,049 J a dokładność pomiarowa 0,001 J. Próba prowadzona była zgodnie z normą [156], próbki U-kształtne przygotowano na drukarce 3D przy czym kolejne warstwy próbek drukowano pod kątem 45° (wypełnienie krzyżowe) względem siebie w celu maksymalnego rozłożenia naprężeń w materiale. Gęstość wypełnienia 100% . Do badania wykorzystano próbki o długości 55 mm, pole przekroju poprzecznego było w kształcie kwadratu, którego bok wynosił 10 mm.

4.2.4. Chromatografia gazowa

Chromatografia należy do metod fizykochemicznych bazujących na rozdzielaniu jednorodnych składników mieszaniny w wyniku ich różnego podziału pomiędzy dwie fazy: ruchomą, która porusza się w określonym kierunku i fazę nieruchomą – stacjonarną. Taki sposób podziału wiąże się ze zróżnicowaną prędkością migracji a tym samym z rozdzieleniem składników. W przypadku chromatografii gazowej możliwa jest analiza substancji pod postacią gazów lub par, których temperatura wrzenia lub sublimacji nie przekracza 350-400°C. W zależności od rodzaju fazy stacjonarnej można wyróżnić chromatografię adsorpcyjną – GSC, gdzie fazą stacjonarną jest adsorbent (ciało stałe) - rozdzielenie składników mieszaniny jest wynikiem różnej siły, z jaką są one adsorbowane. Przykładami fazy stacjonarnej są zeolity oraz polimery porowate; i chromatografię podziałową – GLC, w której fazę stacjonarną stanowi osadzona na nośniku ciecz. Przepływające przez kolumnę anality rozpuszczają się w niej z różną prędkością, co stanowi podstawę rozdziału. Jako fazy stacjonarnej używa się węglowodorów (np. skwalanu), silikonów, fluorosilikonów, nitrylosilikonów, poliglikoli czy cieczy jonowych. Za pomocą chromatografii gazowej można dokonać orientacyjnej identyfikacji składników mieszaniny na podstawie czasów ich retencji. Czasem retencji nazywamy czas mierzony od momentu wprowadzenia analitu na kolumnę chromatograficzną do momentu pojawienia się maksimum stężenia konkretnego związku chemicznego – maksimum pików. Schemat urządzenia pokazano na rysunku 33.



Rysunek 33. Schemat chromatografu gazowego.

Jako gaz nośny najczęściej używany jest hel, argon, azot lub wodór. Wybór gazu powinien być dopasowany przede wszystkim pod kątem detektora. Na układ nastrokowy składa się membrana, która w trakcie pomiaru jest nakłuwana igłą specjalnej strzykawki chromatograficznej oraz odparowywacz, gdzie dochodzi do odparowania wszystkich składników badanej próbki. Odparowywacz stanowi najczęściej krótka, metalowa lub szklana rurka otoczona spiralą grzejną. Nastrzyk może zostać wykonany ręcznie lub automatycznie. W przypadku nastroku ręcznego wymagana jest specjalna strzykawka. Nastrzyk automatyczny wykonywany jest za pomocą autodozownika lub też autodozownika typu *headspace*, w którym próbka do analizy pobierana jest z nad powierzchni badanej substancji. W tym przypadku aparat nie musi być wyposażony w odparowywacz, ponieważ nastrokiwana próbka jest od razu w formie gazowej. Najistotniejszym elementem w układzie nastrokowym jest dozownik, który umożliwia wprowadzenie badanej próbki do strumienia gazu nośnego a następnie transport na kolumnę chromatograficzną. Wyróżnia się dozowniki typu *split* oraz *on-column*. W przypadku dozownika typu *split* analit pobrany do nastroku jest dzielony poprzez podział strumienia gazu trafiającego na kolumnę – trafia na nią tylko niewielka jej część. W dozownikach typu *on-column* cała próbka trafia na kolumnę od razu. Następnie kolumna jest ogrzewana, co powoduje odparowanie rozpuszczalnika a dalej składników badanej próbki. Kolejnym elementem chromatografu jest piec wewnątrz którego znajduje się zwinięta w pętlę kolumna. W kolumnie zachodzi właściwy proces rozdziału składników badanej mieszaniny. Wyróżniamy trzy typy kolumn: kolumny z wypełnieniem stałym, kolumny z wypełnieniem stało-ciekłym oraz kolumny kapilarne, które są obecnie spotykane najczęściej. Charakteryzują się średnicą od 0,2-0,6 mm i długością sięgającą kilkudziesięciu

metrów. Dzielią się na trzy podstawowe typy: PLOT, SCOT oraz WCOT. W kolejnym etapie substancje, które zostały rozdzielone na kolumnie chromatograficznej wykrywane są przez detektor, który reaguje na różnice we właściwościach fizykochemicznych pomiędzy czystym gazem nośnym a gazem zawierającym substancję eluowaną z kolumny. Występowanie takich różnic wiąże się z wygenerowaniem sygnału elektrycznego, który zostaje zarejestrowany za pomocą komputera, rejestratora bądź integratora. Wyróżnia się detektory nieselektywne zwane również uniwersalnymi, które reagują na wszystkie składniki analitu, detektory selektywne reagujące na konkretne grupy związków oraz detektory specyficzne reagujące na konkretny typ związku. Do najczęściej spotykanych zalicza się FID – typ selektywny wykrywający węglowodory i ich pochodne oraz TCD – typ uniwersalny. Inne to detektor argonowy, termojonowy czy płomieniowo-fotometryczny. Detektor FID do działania potrzebuje dwóch gazów – wodoru i powietrza. Wypływający z kolumny gaz nośny mieszany jest z wodorem a następnie kierowany przez dyszę do komory, poprzez którą przepływa powietrze. W komorze następuje spalenie wodoru z utworzeniem płomienia wodorowego. Komora wyposażona jest w dwie elektrody – dyszę palnika oraz pierścień (elektroda zbierająca). W przypadku kiedy do płomienia z kolumny doprowadzony jest tylko gaz nośny to wytwarzany jest stały prąd jonowy o bardzo małym natężeniu. Odpowiada on linii podstawowej na chromatografie. W momencie gdy do płomienia wodorowego wraz z gazem nośnym wprowadzona zostanie substancja bądź związek wymyty z kolumny to w układzie zaczyna płynąć prąd charakteryzujący się natężeniem proporcjonalnym do masy substancji wprowadzonej do płomienia. Na chromatografie pojawia się wtedy pik. Dzięki zróżnicowanym wielkościom dysz można kształtować odpowiedni płomień dla kolumn kapilarnych czy zmniejszać gromadzące się zanieczyszczenia, które powstają od wysokowrzących substancji wymywanych z kolumny.

W pracy posłużono się techniką GC-MS czyli chromatografią gazową sprzężoną ze spektrometrią masową. GC-MS jest jedną z tak zwanych dzielonych technik analitycznych. Jak sama nazwa wskazuje, w rzeczywistości są to dwie techniki, które łączą się w jedną metodę analizy mieszanin substancji chemicznych. Chromatografia gazowa rozdziela składniki mieszaniny, a spektroskopia masowa charakteryzuje każdy ze składników osobno. Łącząc obie techniki można ocenić zarówno jakościowo, jak i ilościowo roztwór zawierający wiele składników. Zasada działania jest następująca: w układzie nastrykowym następuje pobranie próbki. W kolejnym etapie faza ruchoma, którą stanowi gaz (na przykład hel, wodór) przenosi mieszaninę przez fazę stacjonarną transportując ją przez ogrzewaną kolumnę, w której dochodzi do rozdziału na poszczególne związki chemiczne, charakteryzujące się różnymi

stężeniami oraz czasem retencji. Czyste związki chemiczne trafiają do spektrometru masowego, który złożony jest z komory jonizacyjnej i przyspieszającej, analizatora oraz detektora. Otrzymany z niego sygnał jest analizowany przez odpowiednie oprogramowanie a wynikiem całego procesu jest chromatogram gazowy oraz widma masowe, które następnie można porównywać z sygnałami zawartymi w bibliotece widm masowych.

W badaniach korzystano z chromatografu gazowego firmy Shimadzu – GCMS-QP2010 Plus (rys.34), wyposażonego w kolumnę kapilarną ZB5 MSi o długości 30 m i średnicy 0,25 mm, z zastosowaniem prekolumny o długości 5 m.



Rysunek 34. Chromatograf gazowy Shimadzu – GCMS-QP2010 Plus

Do badań korzystano ze standardu (rys.35). W celu przygotowania materiału do badań należało odważyć odpowiednią masę próbek jak i przygotowanego standardu a następnie rozpuścić w THF. Identyfikację badanych związków prowadzono w oparciu o komputerową analizę porównawczą uzyskanych widm z biblioteką widm masowych JWS (John Wiley and Sons). Porównywano również widma masowe i czasy retencji związków badanych i związków modelowych. Temperaturę dozownika ustawiono na 250°C. Temperatura kolumny była zmieniana następująco od 60°C – (1 min izometrycznie), z szybkością 5°C/min do 210°C – (10 minut izometrycznie) i z szybkością 10°C/min do 280°C (15 min izometrycznie). Temperatura linii transferowanej wynosiła 250°C. Czas inkubacji wynosił 2 minuty a temperatura 40°C.

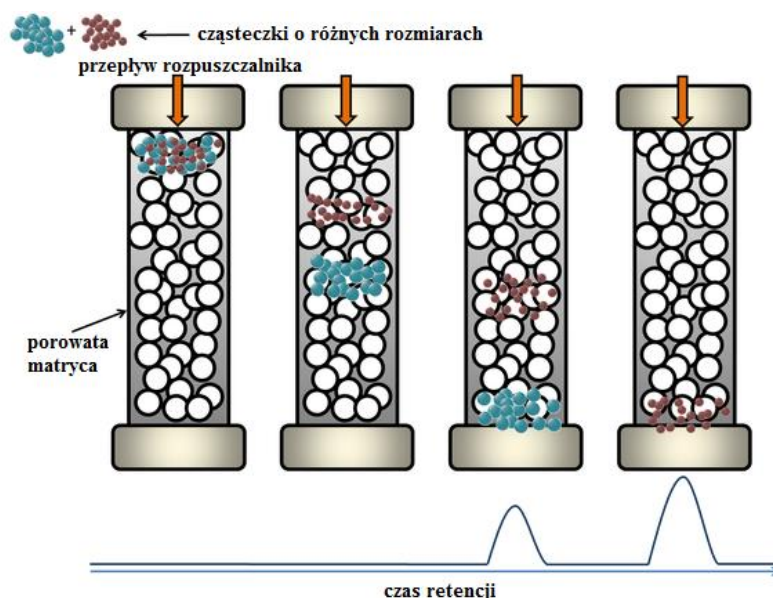


Rysunek 35. Standard betuliny

4.2.5. Chromatografia wykluczania

Chromatografia wykluczania – SEC dawniej nazywana również chromatografią żelową jest metodą, w której rozdział różnych związków zachodzi zgodnie z ich rozmiarem (objętością hydrodynamiczną). Mierzona jest skutecznością penetracji porów fazy stacjonarnej [157]. Znajduje szerokie zastosowanie w szczególności do określenia rozkładu masy cząsteczkowej mieszanin polimerów czy też w przypadku oczyszczania białek i wyodrębnienia frakcji o zadanym zakresie masy cząsteczkowej [158]. W zależności od polarności badanej substancji analizę chromatograficzną można prowadzić w warunkach liofilowych i hydrofilowych. Dla polimerów, typowym rozpuszczalnikiem w warunkach liofilowych jest THF, chloroform czy toluen. Wypełnienie kolumny SEC składa się z porowatej matrycy sferycznych cząstek, które nie mają reaktywności i właściwości adsorpcyjnych. Ziarna matrycy charakteryzują się średnicą od 5 do 10 mikrometrów. Próbkę przed nastrzyknięciem należy rozcieńczyć w tym samym rozpuszczalniku, jaki jest wykorzystywany w fazie ruchomej w celu uniknięcia oddziaływania sorpcyjnego, które może wystąpić pomiędzy cząsteczkami badanej substancji a matrycą (wypełnieniem kolumny). Po nastrzyknięciu próbki cząsteczki większe niż pory nie są w stanie dyfundować do cząstek matrycy, więc eluują najpierw, co pokazano na rysunku 36. Cząsteczki o wielkości od bardzo dużej do bardzo małej mogą penetrować pory w różnym stopniu w zależności od ich wielkości. Jeśli cząsteczka jest mniejsza niż najmniejsze z porów w matrycy, będzie w stanie wypełnić pory. Ze względu na to, że wszystkie cząsteczki podlegają jednocześnie zjawisku dyfuzji, małe cząsteczki, które znalazły się we wnętrzu porów wydostają się po jakimś czasie na zewnątrz a następnie są transportowane w kierunku wylotu

kolumny z wykorzystaniem fazy ruchomej. Czas w którym cząsteczki znajdują się wewnątrz porów jest proporcjonalny względem ich wielkości – im mniejsze cząsteczki tym dłuższy czas przebywania wewnątrz porów oraz ich późniejsze wymywanie. Próbki są eluowane izokratycznie (eluent – faza ruchoma charakteryzuje się niezmiennym składem), więc nie ma potrzeby używania różnych buforów podczas rozdzielania. Cząsteczki rozdzielone w taki sposób są więc uporządkowane względem swojej wielkości. W dalszym etapie następuje ich charakterystyka za pomocą detektora. Najczęściej spotykanym jest refraktometr różnicowy. W wyniku pomiarów otrzymywany jest chromatogram stanowiący rozkład masy polimeru w funkcji czasu retencji. Aby wyznaczyć średnią wartość oraz rozkład masy cząsteczkowej należy przeprowadzić kalibrację, która opiera się na analizie roztworu wzorcowego bądź roztworu wzorców o znanej masie cząsteczkowej. Do kalibracji wykorzystywane są odpowiednie polimery wzorcowe charakteryzujące się wąskimi frakcjami masy cząsteczkowej takie jak polisacharydy, polipeptydy czy też polistyreny. Wyniki otrzymane metodą SEC a konkretnie przypuszczalna masa cząsteczkowa, są zależne od użytych standardów i krzywej kalibracyjnej sporządzonej na ich podstawie. Dlatego też powinno się stosować standardy najlepiej z tego samego polimeru lub o zbliżonej objętości hydrodynamicznej tak, aby otrzymany wynik był najdokładniejszy.



Rysunek 36. Schemat działania SEC [159].

W pracy, badanie przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografu Shimadzu (rys. 37). Sprzęt wyposażono w dwie pompy typu LC-20AD, urządzenie do odgazowania – model DGU-20A3 oraz kolektor frakcji – model FRC-10A i detektor rozpraszania światła ELSD. Rozdzielenie faz następowało w kolumnie Shodex GPC – model Phenogel o średnicy ziarna $5\mu\text{m}$ i porowatości 500\AA o długości 300 mm i szerokości 7,8 mm. Jako eluent wykorzystany został THF, szybkość przepływu wynosiła $1\text{ cm}^3/\text{min}$. Objętość pojedynczego nastrzyku ustawiono na 100 μl . Proces prowadzono w temperaturze $40\text{ }^\circ\text{C}$. Kalibrację sporządzono na podstawie standardów polistyrenowych firmy Aldrich [160] dodatkowo w tabeli 9 zamieszczono masy cząsteczkowe zastosowanych standardów.

Tabela 9. Masy cząsteczkowe zastosowanych standardów polistyrenowych.

Masy cząsteczkowe standardów
MW 500
MW 2500
MW 5000
MW 9000
MW 17500
MW 30000
MW 50000



Rysunek 37. Chromatograf SEC firmy Shimadzu.

Materiały do badań odważono do fiolek, zalano rozpuszczalnikiem THF, w stężeniu 1mg/ml. Tak przygotowane próbki wytrząsano, a następnie przefiltrowano przy użyciu filtrów strzykawkowych z membraną z regenerowanej celulozy (RC) 0,45 μm .

4.2.6. FT-IR

Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera, znana również jako analiza FT-IR lub spektroskopia FT-IR, jest techniką analityczną stosowaną do identyfikacji materiałów organicznych, polimerowych, a w niektórych przypadkach również i nieorganicznych. Metoda wykorzystuje światło podczerwone do skanowania próbek testowych. Wyróżnia się trzy zakresy promieniowania podczerwonego w zależności od długości fali: podczerwień bliską – długość fali 0,8-2,5 μm , podstawową – długość fali 2,5 – 25 μm oraz podczerwień daleką w zakresie długości fal od 25 do 500 μm [161]. Badanie polega na wysłaniu przez urządzenie promieniowania podczerwonego w zakresie od 10000 do 100 cm^{-1} przez próbkę, przy czym część promieniowania jest pochłaniana, a część przepuszczana. Pochłonięte promieniowanie jest przekształcane przez cząsteczki próbki w energię rotacyjną i/lub wibracyjną. Powstały sygnał w detektorze ma postać widma złożonego z pasm, których położenie określone jest przez liczbę falową wyrażoną w centymetrach odwrotnych (cm^{-1} , jednostka jest proporcjonalna do energii drgań) i zwykle mieści się w zakresie od 4000 cm^{-1} do 400 cm^{-1} . Intensywność pasm wyraża się najczęściej przez transmitancję, która jest stosunkiem energii przepuszczanej przez próbkę do energii na nią padającej. Każda cząsteczka lub struktura chemiczna wytwarza niepowtarzalny widmowy odcisk palca, dzięki czemu analiza stanowi doskonałe narzędzie do identyfikacji chemicznej a zmiana charakterystycznego wzoru pasm absorpcyjnych wyraźnie wskazuje na zmianę składu materiału lub obecność zanieczyszczeń.

Istnieje wiele technik związanych z przygotowaniem oraz wprowadzeniem próbki do urządzenia. Początkowo w spektroskopii FT-IR posługiwano się metodą transmisji, co wiązało się z uczynieniem próbki półprzezroczystej dla lasera i energii w podczerwieni, obecnie można skorzystać ze znacznie bardziej zaawansowanych metod. Jedną z nich jest technika odbicia. Ze względu na możliwość skupienia i manipulowania wiązką padającą za pomocą optyki, polegamy na wariantach technik ATR. Technika ta polega na wykorzystaniu zjawiska wewnętrznego odbicia w celu propagowania energii padającej. Wiązka jest wprowadzana do przezroczystego dla podczerwieni materiału, charakteryzującego się dużym współczynnikiem załamania światła, (przykładowo diamentu) pod kątem umożliwiającym odbijanie wewnętrzne „odbicia” u dołu i u góry kryształu – promieniowanie nie wydostanie się z ośrodka, w którym

się porusza, aż do momentu opuszczenia kryształu po przeciwnej stronie. Próbka styka się z kryształem u góry (rys.38), tak że interakcja energii zachodzi w interfejsie kryształu i próbki, w którym znajdują się pozycje odbicia. Po wyprowadzeniu wiązki światła z ośrodka, w którym nastąpiło całkowite wewnętrzne odbicie, mierzona jest jej intensywności oraz wykonuje się pomiar widma w podczerwieni.



Rysunek 38. Interakcja wiązki podczerwieni z próbką po wprowadzeniu za pomocą techniki ATR [161].

Spektrometr FT-IR składa się ze źródła promieniowania, interferometru oraz detektora. Najważniejszym elementem układu jest interferometr. Najczęściej stosowanym jest interferometr Michelsona. W przypadku detektorów można wyróżnić detektor DLaTGS – nie wymagający chłodzenia zewnętrznego w celu uzyskania widma o dobrej jakości; detektor MCT, który znajduje zastosowanie w przypadku próbek mniejszych niż $50\ \mu\text{m}$ – cechuje go większa czułość jednakże wymaga zewnętrznego chłodzenia; czy też detektor MCT chłodzony ciekłym azotem (LN-MCT) odpowiedni dla próbek mniejszych niż $10\ \mu\text{m}$.

Do określenia grup funkcyjnych badanych materiałów korzystano ze spektrofotometru IRTracer-100 (rys.39), wyposażonego w detektor DLaTGS.



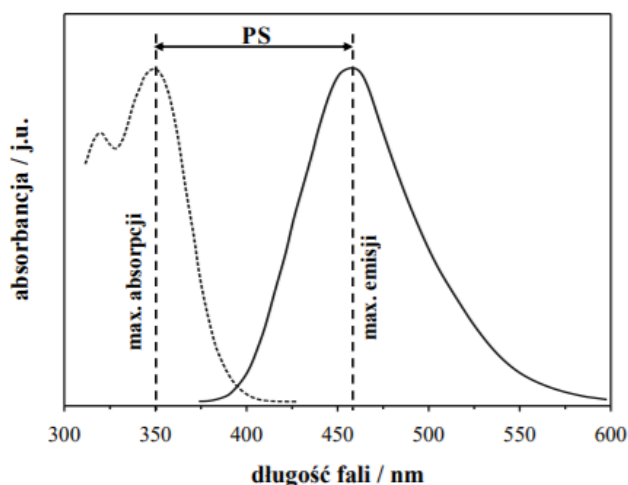
Rysunek 39. Spektrofotometr IRTracer-100

Pomiary wykonywane były w zakresie od 550 do 4000 cm^{-1} z wykorzystaniem przystawki ATR (diament/ZnSe) z następującymi parametrami: ilość skanów – 100, rozdzielczość – 4 cm^{-1} , wygładzanie – Happ-Genzel. Do badań wykorzystano materiały w postaci płytek i filamentów.

4.2.7. Spektrofluorymetria

Spektroskopia fluorescencyjna należy do metod spektroskopowych i jest stosowana do analizy właściwości fluorescencyjnych próbki poprzez określenie stężenia analitu, który się w niej znajduje. Technika jest szeroko stosowana do pomiaru związków w roztworze. Do jej zalet zalicza się szybkość pomiaru, prostotę oraz relatywnie niski koszt. Jej podstawę stanowi zjawisko fluorescencji, które związane jest z emisją promieniowania przez naświetlaną próbkę. Oddziaływanie fotonów z molekułami badanej próbki powoduje wzbudzenie elektronów walencyjnych a konkretnie ich przejście z orbitali stanu podstawowego do orbitali stanu wzbudzonego. Wzbudzone elektrony nie pozostają jednak zbyt długo w tym stanie – spontanicznie powracają do stanu podstawowego, który jest bardziej stabilny. Dla większości molekuł powrót ten związany jest z przekazaniem energii do cząsteczek rozpuszczalnika bądź innych cząsteczek znajdujących się w roztworze a w przypadku ciała stałego powstaje wygenerowany kwant drgania sieci zwany fononem. Jednakże, niektóre z wzbudzonych cząsteczek powracając do stanu podstawowego emitują nadmiar energii w postaci światła, co wiąże się z wcześniej wspomnianym zjawiskiem fluorescencji. Promieniowanie, które jest emitowane spontanicznie w procesie fluorescencji zanika gdy ustaje promieniowanie

wzbudzające. Emitowane światło charakteryzuje się większą długością fali niż światło pobudzające. Wynika to z utraty pewnej porcji energii na rzecz rozpuszczalnika (tym samym energia emitowanego światła jest niższa). Ponadto emitowane światło złożone jest z fal o różnej długości. Jest to związane z dużą ilością poziomów energii wibracyjnej stanu podstawowego na jakich może znaleźć się każda z cząsteczek ulegających zjawisku fluorescencji. Dla widma fluorescencyjnego, podobnie jak dla widma absorpcyjnego, można wyznaczyć maksimum fluorescencji. Jest to długość fali dla której obserwuje się najwyższą fluorescencję. Widmo fluorescencji złożone jest ze światła charakteryzującego się różną długością fal, które są zgrupowane wokół maksimum emisji. Ponadto długości fal emitowanego światła są większe od długości fali światła wzbudzającego. Różnica pomiędzy maksimum absorpcji a maksimum emisji nazywana jest przesunięciem Stokesa, które pokazano na rysunku 40.



Rysunek 40. Widmo absorpcyjne (linia przerywana) oraz emisyjne (linia ciągła) wraz z PS dla wodnego roztworu siarczanu chininy [162].

Mechanizm pomiaru jest następujący: wiązka o długości fali w zakresie od 180 do ~ 800 nm przechodzi przez roztwór w kuwecie. Następnie pod odpowiednim kątem mierzone jest światło emitowane przez próbkę. Jak wspomniano wcześniej można zmierzyć zarówno widmo wzbudzenia (światło absorbowane przez próbkę) i/lub widmo emisji (światło emitowane przez próbkę). Stężenie analitu istotnie wpływa na intensywności emisji. Istnieje kilka parametrów wpływających na intensywność i kształt widm. Podczas rejestracji widma emisji intensywność zależy od czynników takich jak: długość fali wzbudzenia, stężenie rozpuszczalnika analitu, długość ścieżki kuwety oraz własna absorpcja próbki.

Urządzenie do pomiarów składa się ze źródła światła, monochromatorów, komory próbek oraz detektora. Jako źródło promieniowania najczęściej wykorzystywane są lampy ksenonowe, wytwarzające widmo ciągłe w przedziale od 200 do 1400 nm. Światło jest dalej kierowane poprzez układ optyczny do pierwszego z monochromatorów - monochromatora wzbudzenia, umożliwiającego wybór określonej długości fali. Następnie przechodzi do komory z próbką, która zawiera fluorescencyjną kufkę wraz z roztworem badanego materiału. Kiedy promień światła wzbudzającego padanie na próbkę molekule zawartej tam substancji ulegną wzbudzeniu a niektóre spośród nich będą emitować światło. Światło emitowane w kierunku prostopadłym względem promienia padającego zostanie przeanalizowane z wykorzystaniem monochromatora emisyjnego. Analiza wiąże się zazwyczaj z pomiarem intensywności fluorescencji przy określonej długości fali.

Pomiary spektrometryczne zostały zarejestrowane z wykorzystaniem spektrofluorymetru Horiba Jobin Yvon Sepctrofluorometer FluoroMax – 4 (rys. 41), charakteryzującego się wysoką czułością pozwalającą na rejestrację zarówno widm emisyjnych jak i ekscytacyjnych, dla próbek będących w stanie ciekłym lub stałym. Wszystkie pomiary zostały wykonane w oparciu o wzbudzenie palnika ksenonowego o mocy 150 W wyposażonego w układ monochromatorów kołowych. Charakterystyka źródła światła pozwala na wykonywanie pomiarów w zakresie od 200 do 980 nm. Urządzenie wyposażono w detektor CCD wysokiej czułości – R928P pracujący w układzie zliczania fotonów 200 – 850 nm. Ponieważ badania nie były przeprowadzone w sferze całkowitej dokonano oznaczeń tylko i wyłącznie jakościowych bez analizy ilościowej. Analiz ilościowych nie prowadzono ze względu na charakterystykę próbki niepozwalającą na wykorzystanie sfery całkowitej.



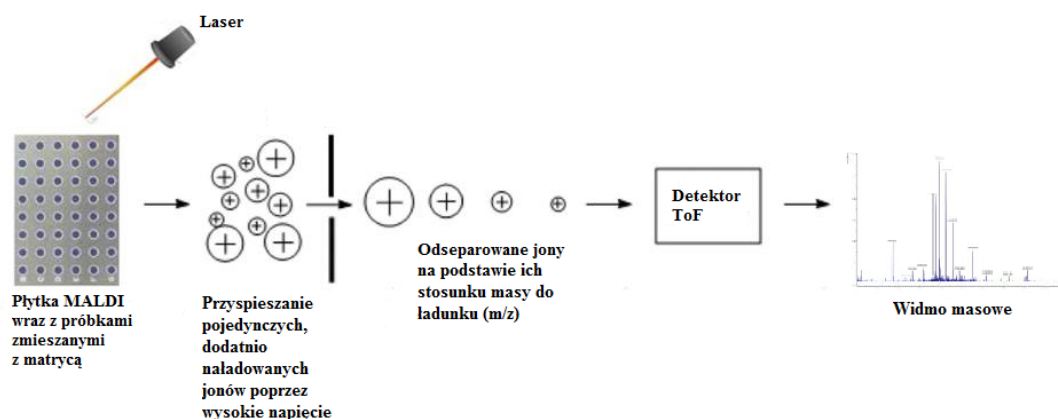
Rysunek 41. Spektrofluorymetr FluoroMax – 4

Do badań wykorzystano płytki oraz fragmenty filamentów z przygotowanych wcześniej materiałów.

4.2.8. Spektrometria mas MALDI-ToF

Spektrometria mas jest techniką analityczną, w której próbki jonizuje się w naładowane cząsteczki dzięki czemu można zmierzyć stosunek ich masy do ładunku (m/z). W spektrometrii mas MALDI-ToF źródłem jonów jest desorpcja/jonizacja laserowa wspomagana matrycą (MALDI), a analizatorem masy jest analizator czasu przelotu (ToF). Metoda należy do metod jonizacji miękkiej, w których tworzenie jonów nie prowadzi do znacznej utraty integralności próbki i jest przede wszystkim wykorzystywana do analizy biomolekuł, takich jak peptydy, lipidy, sacharydy lub inne organiczne makrocząsteczki.

Próbkę do analizy metodą MALDI-ToF przygotowuje się poprzez zmieszanie lub pokrycie jej roztworem pochłaniającym energię związku organicznego. Roztwór ten nazywany jest matrycą. Jako matrycę stosuje się zazwyczaj słabe kwasy organiczne, które dobrze absorbują promieniowanie UV takie jak DHB, α CHCA, kwas 2-aminobenzoowy czy też ditranol należący do polifenoli. W dalszym etapie matrycę wraz z nałożoną próbką należy wysuszyć w taki sposób, aby utworzyły warstwę jednorodną. Następnie próbka jest jonizowana w trybie automatycznym za pomocą wiązki laserowej. Desorpcja i jonizacja wiązką laserową generują pojedynczo protonowane (obecnie istnieje również możliwość jonizacji ujemnej) jony z analitów w próbce, które są następnie przyspieszane ze stałym potencjałem, przy czym oddzielają się one od siebie na podstawie ich stosunku masy do ładunku (m/z). Naładowane anality są następnie wykrywane i mierzone przy użyciu różnych typów analizatorów masy, takich jak kwadrupolowe analizatory masy, analizatory pułapek jonowych, analizatory czasu przelotu i inne. Do zastosowań mikrobiologicznych stosuje się głównie analizatory masy ToF. Podczas analizy MALDI-ToF stosunek m/z jonu jest mierzony przez określenie czasu potrzebnego do przebycia drogi od próbki do detektora, przy czym odległość pomiędzy próbką a detektorem jest znana. Na podstawie informacji o czasie przelotu generowane jest charakterystyczne spektrum (rys. 42), w którym na osi „x” przedstawione są jony posegregowane zgodnie z poszczególnymi wartościami m/z a na osi „y” ich intensywność.



Rysunek 42. Zasada działa MALDI ToF

Spektrometr masowy zbudowany jest z następujących elementów: źródło jonów (miejsce, gdzie atomy ulegają jonizacji i zostają przyspieszone w polu elektrycznym), analizator, w którym zachodzi proces separacji atomów oraz detektor. Metoda pozwala na szybką analizę badanych próbek oraz na wykonanie dużej ilości pomiarów w krótkim okresie czasu. Jednakże ze względu na koszt samego urządzenia jak i sposób przygotowania próbek jest ona nieco mniej popularna w porównaniu do metod chromatograficznych, które poza analizą jakościową umożliwiają również analizę ilościową.

W pracy badania przeprowadzono z wykorzystaniem spektrometru masowego MALDI ToF Axima Performance firmy Shimadzu (rys. 43) wyposażonego w 50Hz laser azotowy.



Rysunek 43. Spektrometr masowy MALDI ToF [163].

Analizie poddano otrzymaną po ekstrakcji Soxhleta betulinę jak i materiały w postaci filamentów i wydruków. Jako matrycę zastosowano Norharmane.

Badania przeprowadzono również w oparciu o podłoże grafitowe bez zastosowania matrycy. Każdą próbkę poddano trzykrotnej analizie, co związane było ze zminimalizowaniem błędów aparaturowego.

Przed przystąpieniem do pomiarów przygotowano roztwór matrycy w THF w stężeniu 10mg/ml. Po całkowitym rozpuszczeniu naniesiono 1,5µl matrycy na każdy spot i pozostawiono do wyschnięcia. Następnie przygotowano próbki materiałów. Z każdego rodzaju materiału – filamentów oraz wydruków pobrano fragment, który następnie odważono i rozpuszczono w THF w stosunku 2mg /ml. Tak przygotowane próbki poddano wytrząsaniu i naniesiono na spot z wcześniej przygotowaną warstwą matrycy. Podobnie jak w przypadku matrycy ilość próbki zdeponowanej wynosiła 1,5 µl, należało również pozostawić je do odparowania.

Na rysunku 44 przedstawiono płytkę na którą nakładano matrycę i próbki.



Rysunek 44. Płytkę pomiarowa do badań MALDI-ToF

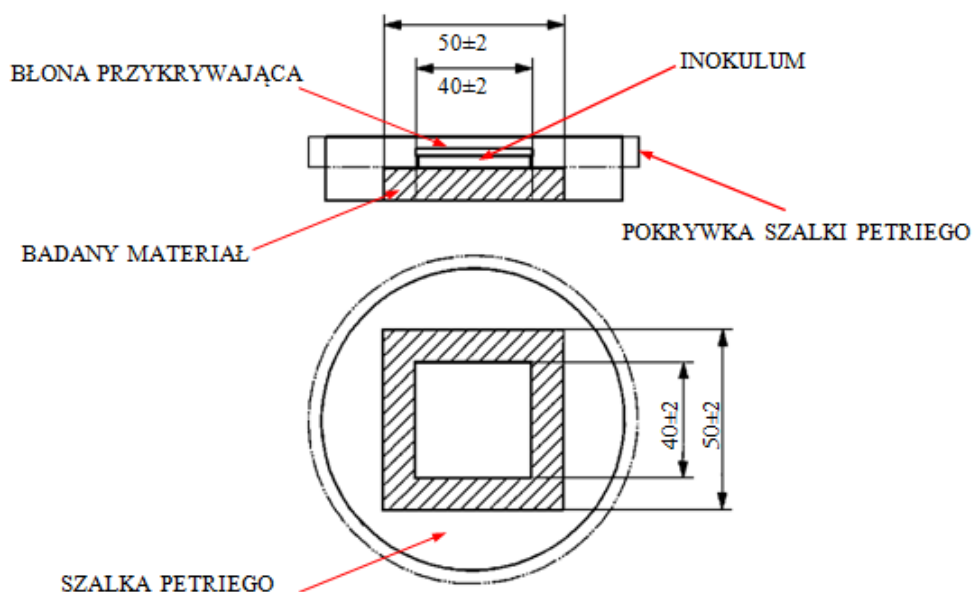
Po umieszczeniu płytki pomiarowej w aparacie wykonano kalibrację urządzenia poprzez zebranie danych z punktu kalibracyjnego zawierającego mieszaninę peptydów (MSCAL2 - ProteoMass™ Peptide MALDI-MS Calibration Kit, Aldrich, informacje o standardzie zawarto w załączniku 1). Kalibracja wykonywana była każdorazowo po umieszczeniu płytki w aparacie, a dopiero po jej wykonaniu przystępowano do właściwych pomiarów.

4.2.9. Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej

Do oceny działania przeciwdrobnoustrojowego tworzyw sztucznych poddanych obróbce przeciwbakteryjnej wykorzystuje się metodę opisaną w normie PN-EN ISO 22196:2007 [164]. Norma zakłada wykorzystanie dwóch linii bakteryjnych:

- Pałeczka okrężnicy (*Escherichia coli*)
- Gronkowiec złocisty (*Staphylococcus aureus*).

W pracy wykorzystano szczepy wzorcowe pałeczki okrężnicy ATCC 8739 (DSM 1576) oraz gronkowca złocistego ATCC 6538P (DSM 346). Do sporządzenia inokulum przeznaczono drobnoustroje dwukrotnie przesiane ze skosów agaru odżywczego. W tym celu przeprowadzono hodowlę w jałowym bulionie odżywczym aż do osiągnięcia proporcji 10⁵ komórek bakteryjnych na 1 ml bulionu. Przygotowane próbki badane i kontrolne, wyjałowione promieniami UV, umieszczono na dnie jałowych szalek Petriego. Na powierzchnię wylano 0,4 ml inokulatu, przy czym liczba żywych komórek bakterii w tej objętości wynosiła 5,3 x 10⁵ jtk/ml (*Escherichia coli*) i 6,8 x 10⁵ jtk/ml (*Staphylococcus aureus*). Próbki przykryto folią polipropylenową o wymiarach 40x40 mm i grubości 0,05 mm dla próbek z nanokrzemionką i nanosrebrem oraz o grubości 0,07 mm dla próbek z betuliną. Próbką referencyjną była płytką z bazowego PC. Czynności te wykonano w warunkach jałowych, w komorze laminarnej natomiast inkubację przeprowadzono przez 24h w komorze klimatycznej, zachowując odpowiednie warunki wilgotności i termiczne, tj. 35°C. Część próbek była hodowana przez 72 godziny w celu kontroli ewentualnej kontaminacji. Po inkubacji, próbki kontrolne i badane wypłukano roztworem neutralizującym z którego pobrano po 1 ml i zawieszono w 9 ml roztworu soli fizjologicznej. Z uzyskanych wypłuczyn wykonano serię dziesiętnych rozcieńczeń. Wykonano z nich posiewy w agarze, co posłużyło do policzenia ilości bakterii, na podstawie ilości wyrosłych kolonii po 48 godzinnej inkubacji. Schemat sposobu inokulacji przedstawiono na rysunku 45.



Rysunek 45. Schemat sposobu inokulacji zgodnie z normą [158].

Do określenia aktywności przeciwdrobnoustrojowej korzystano z równania:

$$R = (U_t - U_0) - (A_t - U_0) = U_t - A_t$$

gdzie:

R – aktywność bakteriobójcza

U_0 – średnia z logarytmu dziesiętnego liczby żywych komórek bakterii znajdujących się na próbkach kontrolnych bezpośrednio po inokulacji

U_t – średnia z logarytmu dziesiętnego liczby żywych komórek bakterii znajdujących się na próbkach kontrolnych po 24 godzinach inkubacji

A_t – średnia z logarytmu dziesiętnego liczby żywych komórek bakterii znajdujących się na próbkach badanych po 24 godzinach inkubacji

4.2.10. Ocena cytotoksyczności

W prezentowanej pracy cytotoksyczność oceniona została z wykorzystaniem testu SRB.

Test SRB to szybka, niedroga i czuła metoda kolorymetryczna do pomiaru cytotoksyczności indukowanej substancją potencjalnie bioaktywną zarówno w hodowlach komórkowych adherentnych, jak i zawieszonych w pożywce [165]. Test ten, po raz pierwszy opisany przez Skehana i współpracowników [166] został opracowany do stosowania w zorientowanym na choroby, dużym programie odkrycia leków przeciwnowotworowych National Cancer Institute. SRB jest jasnoróżowym barwnikiem aminoksantenowym z dwoma grupami sulfonowymi. W łagodnie kwaśnych warunkach wiąże się z grupami zasadowymi aminokwasów białkowych w komórkach utrwalonych w TCA (kwas trichlorooctowy). W ten sposób można określić stężenie białek, co jest równoznaczne z liczbą żywych komórek. Samo badanie można podzielić na cztery etapy: przygotowanie substancji badanej, inkubacja komórek z wybraną substancją, utrwalanie komórek i barwienie SRB oraz pomiar absorbancji [167]. Do jego zalet zalicza się prostotę oraz mniejszą wrażliwość na fluktuacje środowiska. Powtarzalność tego testu jest wysoka. Jednakże ważne jest uzyskanie i utrzymanie jednorodnej zawiesiny komórek. Należy unikać agregatów komórkowych aby uzyskać wysoką wydajności testu [168].

W pracy do oceny cytotoksyczności komórek korzystano z testu SRB (In Vitro Toxicology Assay Kit, Sulforhodamine B based; Sigma-Aldrich), wykonanego na fibroblastach mysich (komercyjnej linii komórkowej L-929). Hodowlę komórek prowadzono w butelkach hodowlanych Nunclon o powierzchni 25 cm², wyposażonych w filtry antybakteryjne (Nunc, Wiesbaden, Niemcy). Komórki inkubowano w medium hodowlanym w temperaturze 37°C, w warunkach mikroaerofilnych (atmosferze z 5% zawartością dwutlenku węgla). Po upływie doby zebrano eluat i poddano filtracji stosując jałowe filtry membranowe z celulozy octanowej (CA) (Cronus Sartorius), o wielkości porów 0,2 µm.

Procedura badania żywotności metodą SRB była zgodna z normą ISO 10993-5:2009 [169]. Test przeprowadzono zgodnie z wymaganiami i protokołem producenta. Do pomiarów absorbancji wykorzystano czytnik mikropłytek Wallac Victor 2 (Perkin Elmer, Massachusetts, USA).

V. Wyniki

5.1 Wyniki statycznej próby rozciągania

W tabelach 10-12 zaprezentowano wyniki statycznej próby rozciągania dla badanych materiałów.

W przypadku naprężania ze względu na większą czytelność wyników zastosowano jednostkę MPa, przeliczając uzyskane wyniki zgodnie z założeniem że 1MPa = 1000000 Pa.

Tabela 10. Wyniki statycznej próby rozciągania dla próbek z betuliną (1%).

Próbka (nr)	Szerokość próbki [mm]	Grubość próbki [mm]	F _M [N]	F _R [N]	σ _M [Mpa]	ε _M [%]	σ _B [Mpa]	ε _R [%]
1	10,19	4,33	2086,7	1995,0	47,3	4,4	45,2	4,1
2	10,15	4,33	2285,0	2215,0	52,0	5,3	50,4	5,1
3	10,58	4,36	2168,3	2105,0	44,3	4,9	43,0	4,7
4	10,57	4,56	2778,3	2778,3	57,6	8,0	57,6	8,0
5	10,44	4,45	2213,3	2141,7	47,6	5,1	46,1	4,8
6	10,54	4,58	2203,3	2115,0	45,6	4,7	43,8	4,4
7	10,25	4,41	2135,0	2033,3	47,2	4,5	45,0	4,3
8	10,20	4,33	1815,0	1710,0	41,1	3,6	38,7	3,3

Tabela 11. Wyniki statycznej próby rozciągania dla próbek z nanokrzemionką.

Próbka (nr)	Szerokość próbki [mm]	Grubość próbki [mm]	F _M [N]	F _R [N]	σ _M [Mpa]	ε _M [%]	σ _B [Mpa]	ε _R [%]
1	9,77	4,4	1105	1095	25,7	11,3	25,5	14
2	9,53	4,42	493,3	353,3	11,7	6	8,4	12
3	9,92	4,67	975	933,3	21	7	20,1	13,3
4	10,12	4,6	1111,7	968,3	23,9	8	20,8	12
5	10,26	4,34	1073,3	1015	24,1	10,7	22,8	10
6	9,83	4,71	673,3	626,7	14,5	8	13,5	12
7	10,19	4,3	1005	976,7	22,9	8,7	22,3	16
8	10	4,36	848,3	735	19,5	7,3	16,9	12
9	9,82	4,63	1081,7	948,3	23,8	8,7	20,9	16

Tabela 12. Wyniki statycznej próby rozciągania dla próbek z nanosrebrem.

Próbka (nr)	Szerokość próbki [mm]	Grubość próbki [mm]	F_M [N]	F_R [N]	σ_M [Mpa]	ϵ_M [%]	σ_B [Mpa]	ϵ_R [%]
1	10,82	4,24	990	918,3	21,6	7	20	16
2	11,13	4,2	1108,3	996,7	23,7	7,3	21,3	18
3	10,22	4,35	1480	1413,3	33,3	12	31,8	16
4	10,21	4,69	1260	1241,7	26,3	9,3	25,9	20
5	10,41	4,14	1435	1435	33,3	12,7	33,3	14
6	10,26	4,43	1443,3	1401,7	31,8	9,3	30,8	20
7	10,43	4,55	1441,7	1376,7	30,4	9,3	29	16
8	9,91	4,78	1115	1061,7	23,5	8	22,4	14
9	10,4	4,34	1631,7	1508,3	36,2	9,3	33,4	16

Na podstawie uzyskanych wyników obliczono również moduły Younga. Wyniki przedstawiono w tabeli 13.

Tabela 13. Moduł Younga wraz z wartością średnią dla poszczególnych próbek.

Próbka (nr)	Moduł Younga – Betulina (1%) [MPa]	Moduł Younga - Nanokrzemionka [MPa]	Moduł Younga - Nanosrebro [MPa]
1	1075,0	227,43	308,57
2	981,1	195,00	324,66
3	904,1	300,00	277,50
4	720,0	298,75	282,80
5	933,3	225,23	262,20
6	970,2	181,25	341,94
7	1048,9	263,22	326,88
8	1141,7	267,12	293,75
9	-	273,56	389,25
Średnia	971,8	248,0	312,0
Od. Std (σ)	119,9	40,46	36,69

Wykonanie statycznej próby rozciągania pozwoliło wyznaczyć moduł Younga dla poszczególnych materiałów. Moduł został wyznaczony w oparciu o siłę maksymalną, ze względu na trudności związane z pomiarem - używane urządzenie wyznaczało tylko tą wartość. W związku z brakiem możliwości zarejestrowania krzywych nie było możliwości ponownej interpretacji danych. Zakres sprężysty czyli stosowalności prawa Hooke'a oraz zakres

plastyczny w przypadku poliwęglanu nie odbiegają od siebie znacząco w związku z czym w dużym przybliżeniu można wykorzystać obliczoną wartość do porównań z innymi materiałami. W zależności od materiału moduł Younga wynosił odpowiednio: 971,8 MPa dla poliwęglanu z domieszką betuliny, 248 MPa dla poliwęglanu z domieszką nanokrzemionki oraz 312 MPa dla poliwęglanu z domieszką nanosrebra. Największą wartość odchylenia standardowego uzyskano dla próbek z betuliną. Uzyskane wyniki charakteryzują się niższymi wartościami modułu niż bazowe wartości uzyskane dla czystego poliwęglanu oraz są dużo wyższe niż wartości dostępne w literaturze dotyczące elementów chrzęstnych takich jak chrząstki tchawicy [170], gdzie moduł Younga kształtuje się na poziomie 0,012-0,02 MPa w zależności od wieku czy płci oraz w chrząstkach znajdujących się w kości udowej [171]. Należy jednak pamiętać, że do obliczeń wykorzystano F_m , więc rzeczywiste wartości modułu Younga badanych materiałów mogą być nieco niższe niż obliczone. W przypadku zastosowania badanych materiałów na rusztowania tkankowe należałoby popracować nad zmniejszeniem modułu Younga, tak aby jak najbardziej korelował z podanymi parametrami. Zmniejszenia modułu można dokonać poprzez osłabienie struktury materiału. Jednym ze sposobów jest wprowadzenie odpowiedniego plastyfikatora, który podobnie jak materiały bazowe musiałby charakteryzować się odpowiednią biokompatybilnością, gwarantującą brak występowania niekorzystnych zjawisk w organizmie człowieka.

5.2 Wyniki pomiarów twardości

W tabeli 14 zaprezentowano wyniki pomiarów twardości. W analizie pomiarów twardości należy wziąć pod uwagę fakt, że pomiary wykonywane były dla próbek wykonanych z użyciem technologii przyrostowej FDM. Uniemożliwia to więc porównanie uzyskanych wartości względem materiału litego, dla którego znaleziono dane literaturowe [172].

Porównując otrzymane wyniki próby twardości metodą Vickersa zaobserwowano niewielkie różnice w końcowych wartościach średnich, które wynosiły odpowiednio dla poliwęglanu z betuliną 14,2 HV, dla poliwęglanu z nanokrzemionką 14,7 HV i dla poliwęglanu z nanosrebrem 13,8 HV. Tak niewielkie różnice w wartościach dowodzą, że zastosowane domieszki wykazują podobny wpływ na twardość materiału bazowego.

Tabela 14. Wyniki pomiarów twardości dla betuliny, nanokrzemionki oraz nanosrebra wraz z obliczoną wartością średnią.

Próbka (nr)	Twardość - Betulina (1%) [HV]	Twardość - Nanokrzemionka [HV]	Twardość - Nanosrebro [HV]
1	14,2	14,5	13,5
2	14,3	14,8	13,2
3	14,1	15,0	14,1
4	13,9	14,7	14,7
5	14,3	15,1	13,4
6	13,9	14,8	14,8
7	14,4	15,1	13,6
8	14,3	13,9	12,9
9	14,5	14,3	14,1
10	14,5	14,4	13,4
Średnia	14,2	14,7	13,8
Od. Std (σ)	0,21	0,37	0,6

5.3 Wyniki próby udarności

W tabeli 15 przedstawiono obliczoną udarność oraz wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym dla poszczególnych próbek.

Tabela 15. Udarność obliczona dla poszczególnych próbek.

Próbka (nr)	Udarność - Betulina 1% [J/cm^2]	Udarność - Nanokrzemionka [J/cm^2]	Udarność - Nanosrebro [J/cm^2]
1	0,549	0,501	0,343
2	0,609	0,272	0,377
3	0,458	0,358	0,299
4	0,481	0,286	0,286
5	0,330	0,214	0,334
6	0,340	0,689	0,3112
7	0,420	-	-
Średnia	0,455	0,387	0,325
Od. Std (σ)	0,095	0,162	0,030

Po przeprowadzeniu próby udarności dla wytypowanych materiałów uzyskano następujące wyniki – średnia wartość udarności wynosiła kolejno dla poliwęglanu z betuliną – 0,455 J/cm², dla poliwęglanu z nanokrzemionką – 0,387 J/cm² a dla poliwęglanu z nanosrebrem – 0,325 J/cm². We wszystkich próbkach zaobserwowany został przełom kruchy (brak widocznego odkształcenia plastycznego). Może to świadczyć o małej udarności próbek materiałów poddanych badaniu i mieć związek z jakością wydruku. Na rysunku 46 przedstawiono przykładowe zdjęcie próbki bezpośrednio po przeprowadzonej próbie udarności.

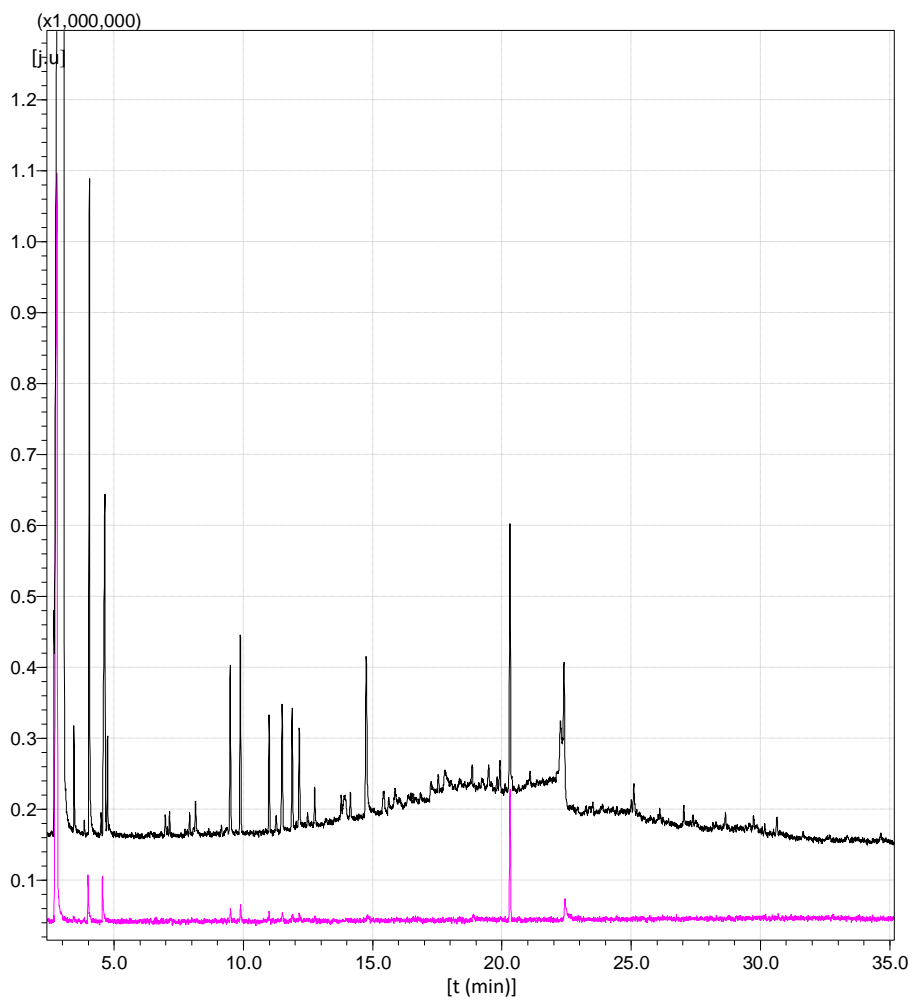


Rysunek 46. Próbka poliwęglanu z betuliną bezpośrednio po przeprowadzonej próbie udarności.

5.4 Wyniki chromatografii gazowej

Rysunek 47 przedstawia chromatogramy uzyskane dla betuliny otrzymanej w wyniku ekstrakcji ciągłej Soxhleta oraz dla standardu betuliny.

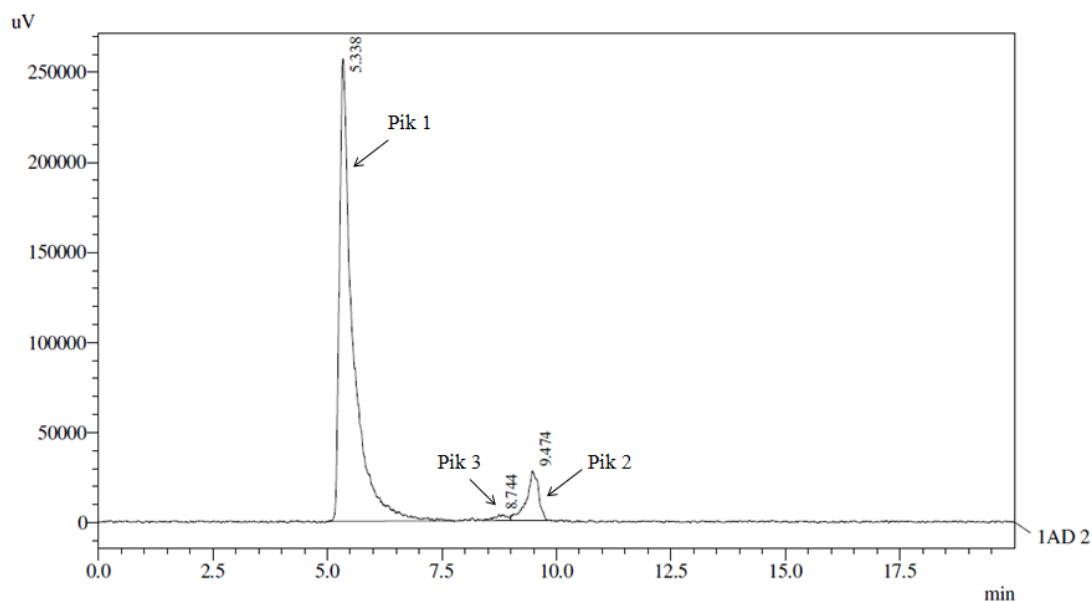
Na podstawie porównania z chromatogramem standardu betuliny dostarczonego przez Sigma Aldrich potwierdzono obecność betuliny otrzymanej metodą ekstrakcji ciągłej Soxhleta. Standard betuliny widoczny na chromatogramie nie jest sygnałem monomodalnym tylko składa się z dużej liczby sygnałów, a co za tym idzie można wnioskować, że sam standard nie jest chemicznie czysty.



Rysunek 47. Chromatogramy uzyskane dla betuliny otrzymanej w wyniku ekstrakcji ciągłej Soxhleta – kolor różowy oraz dla standardu betuliny - kolor czarny.

5.5 Wyniki chromatografii wykluczenia

Pomiary wykonano dla płytek z domieszką betulinową. Rysunki 48 – 50 przedstawiają uzyskane chromatogramy. W tabelach 16–18 zebrano otrzymane parametry dla poszczególnych próbek.

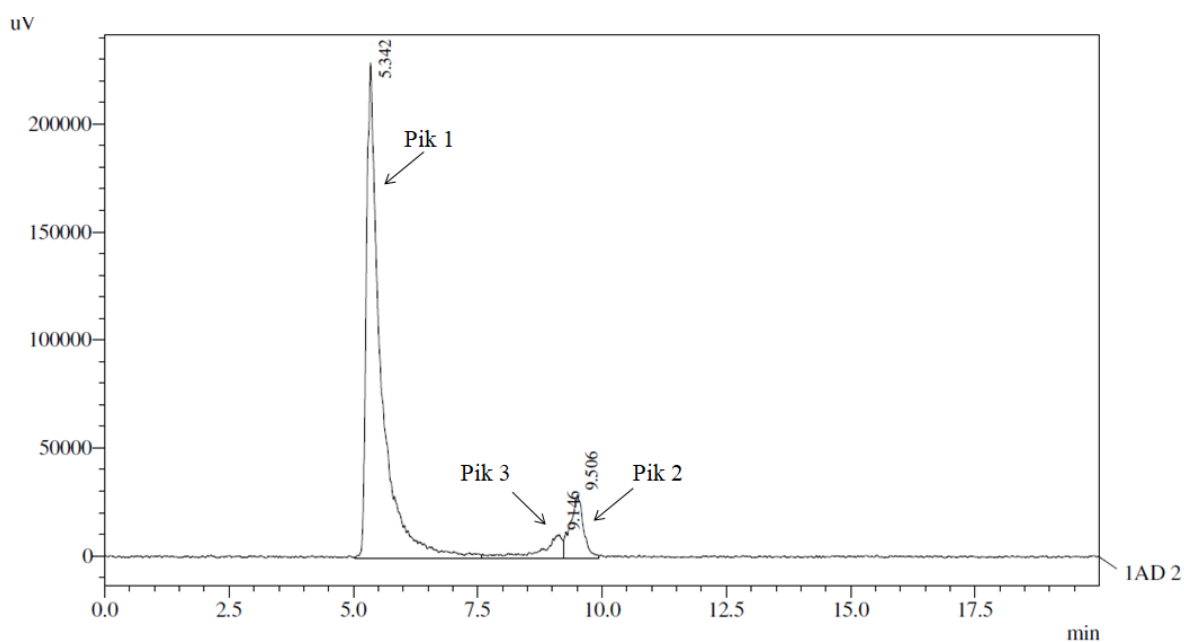


Rysunek 48. Chromatogram uzyskany dla płytki poliwęglanowej z 1% zawartością betuliny, gdzie pik 1 obrazuje poliwęglan, pik 2 to betulina a pik 3 to kwas betulinowy.

Wyniki GPC:

Tabela 16. Wyniki uzyskane dla płytki poliwęglanowej z 1% zawartością betuliny.

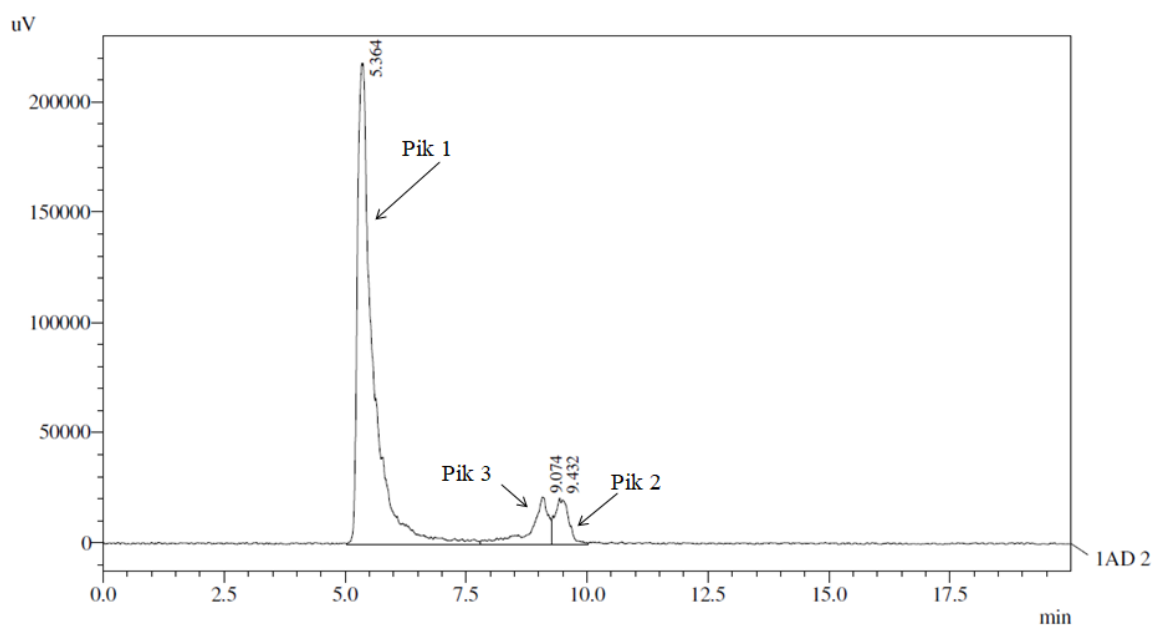
Parametr	Pik 1	Pik 2 - betulina	Pik 3
Średnia liczbowa masa cząsteczkowa (Mn) [u]	13528	430	202
Średnia wagowa masa cząsteczkowa (Mw) [u]	15587	440	208
Z – Średnia masa cząsteczkowa (Mz) [u]	16625	451	215
Z+1 – Średnia masa cząsteczkowa (Mz1) [u]	17262	463	223
Mw/Mn [u]	1,15219	1,02351	1,02905
Zawartość/udział %	90,2639	1,0615	8,6745



Rysunek 49. Chromatogram uzyskany dla płytki poliwęglanowej z 5% zawartością betuliny, gdzie pik 1 obrazuje poliwęglan, pik 2 to betulina a pik 3 to kwas betulinowy.

Tabela 17. Wyniki uzyskane dla płytki poliwęglanowej z 5% zawartością betuliny.

Parametr	Pik 1	Pik 2 - betulina	Pik 3
Średnia liczbowa masa cząsteczkowa (Mn)	13009	403	193
Średnia wagowa masa cząsteczkowa (Mw)	15548	511	198
Z – Średnia masa cząsteczkowa (Mz)	16710	702	202
Z+1 – Średnia masa cząsteczkowa (Mz1)	17367	933	206
Mw/Mn	1,19523	1,26905	1,02277
Zawartość/udział, %	84,6821	5,6202	9,6977



Rysunek 50. Chromatogram uzyskany dla płytki poliwęglanowej z 10% zawartością betuliny, gdzie pik 1 obrazuje poliwęglan, pik 2 to betulina a pik 3 to kwas betulinowy.

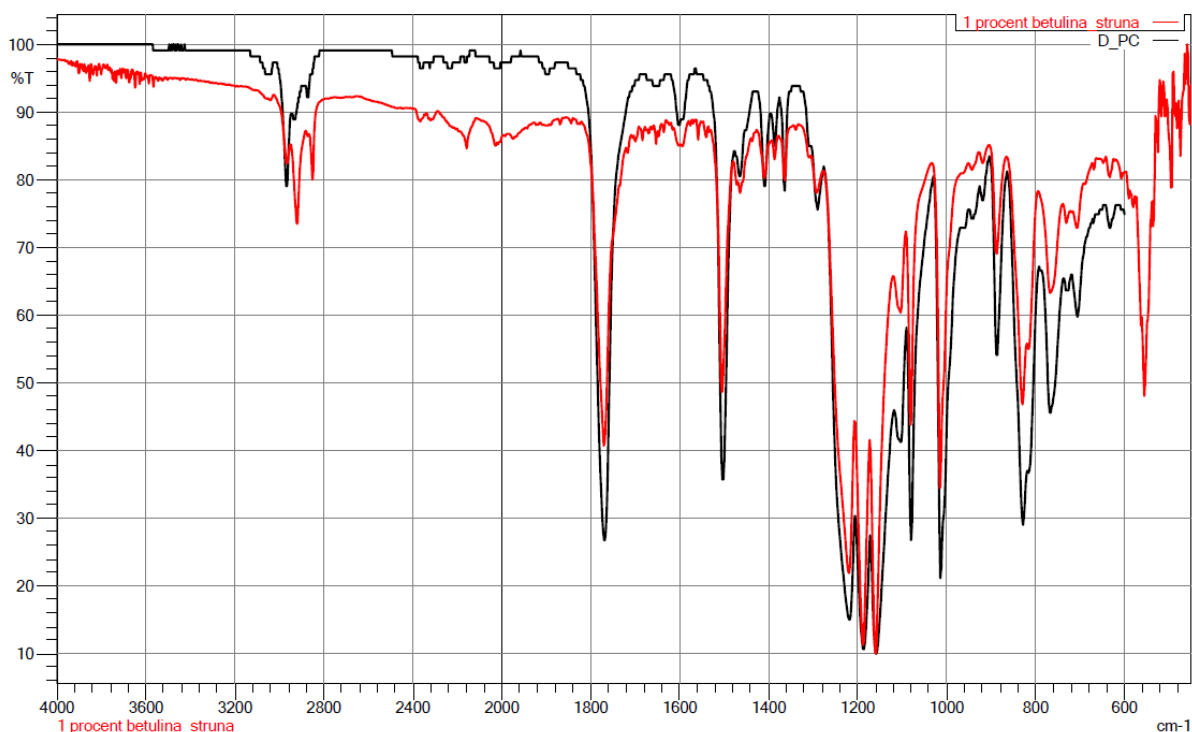
Tabela 18. Wyniki uzyskane dla płytki poliwęglanowej z 10% zawartością betuliny.

Parametr	Pik 1	Pik 2 - betulina	Pik 3
Średnia liczbowa masa cząsteczkowa (Mn)	12629	370	193
Średnia wagowa masa cząsteczkowa (Mw)	15509	435	197
Z – Średnia masa cząsteczkowa (Mz)	16704	545	201
Z+1 – Średnia masa cząsteczkowa (Mz1)	17363	692	205
Mw/Mn	1,22809	1,17516	1,02323
Zawartość/udział, %	83,4010	9,3322	7,2667

Analiza chromatograficzna pozwoliła na określenie składu ilościowego wytypowanych materiałów – były to próbki poliwęglanowe z domieszką betulinową. Na otrzymanych chromatogramach zaobserwowano trzy charakterystyczne piki, które odpowiadały odpowiednio: pik 1 – poliwęglan, pik 2 – betulina oraz pik 3 – kwas betulinowy. Wyniki jednoznacznie potwierdzają, że materiał do badań został wykonany prawidłowo. W zależności od próbki, w materiale po analizie potwierdzono odpowiednio 1, 5 oraz 10% domieszki betulinowej. Widoczny jest również kwas betulinowy, którego ilość oscyluje w okolicach 7-10%. Ze względu na osiągnięcie granicznego progu rozpuszczalności kwasu betulinowego jego stężenie nie zmienia się pomimo zmian stężenia dodanej betuliny.

5.6 Wyniki spektroskopii w podczerwieni FT-IR

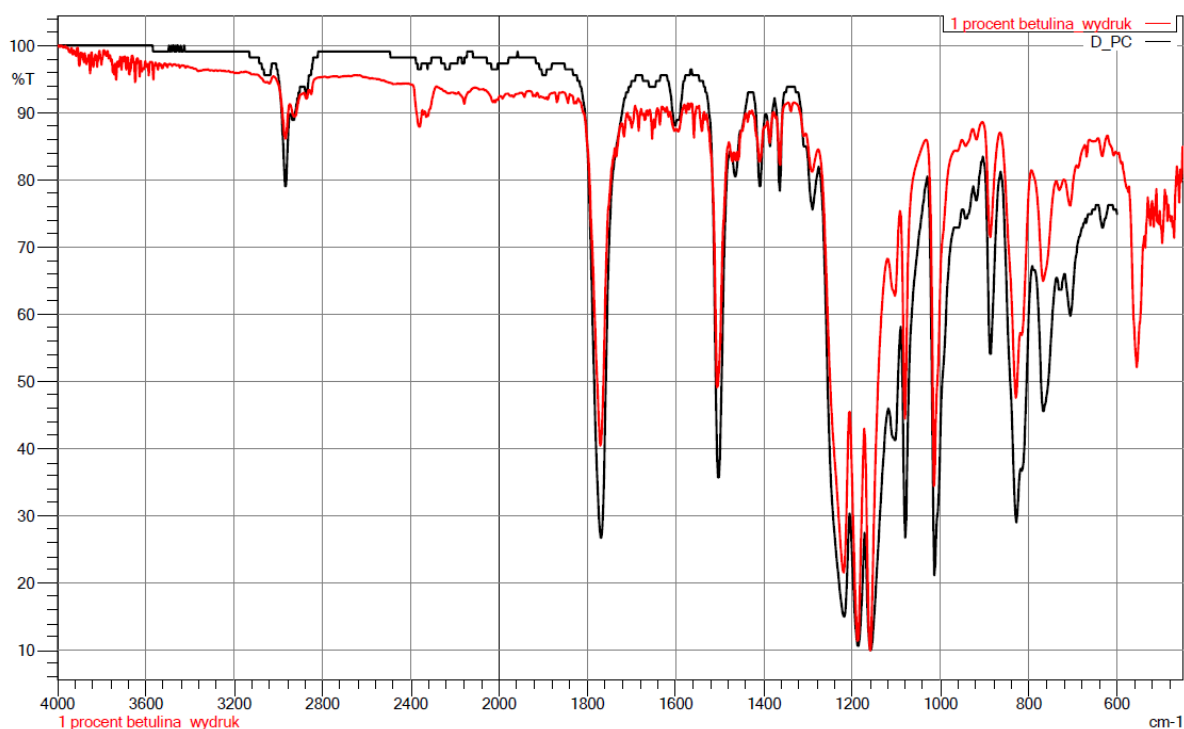
Na rysunkach 51–60 zaprezentowano otrzymane widma w zestawieniu z widmem otrzymanym na podstawie porównania widm dostępnych w stosownej bibliotece.



Rysunek 51. Widmo FT-IR uzyskane dla filamentu PC z 1% zawartością betuliny.

Tabela 19. Tabela zestawienia sygnału zarejestrowanego dla filamentu PC z 1% zawartością betuliny z wyodrębnieniem najistotniejszych pików, gdzie: Peak – lokalne maksimum, Intensity – intensywność bezwzględna, Corr. Intensity - intensywność względna, Base (H) - zakres pików wysoki, Base (L) – zakres pików niski, Area – pole powierzchni bezwzględne, Corr. Area - pole powierzchni względne.

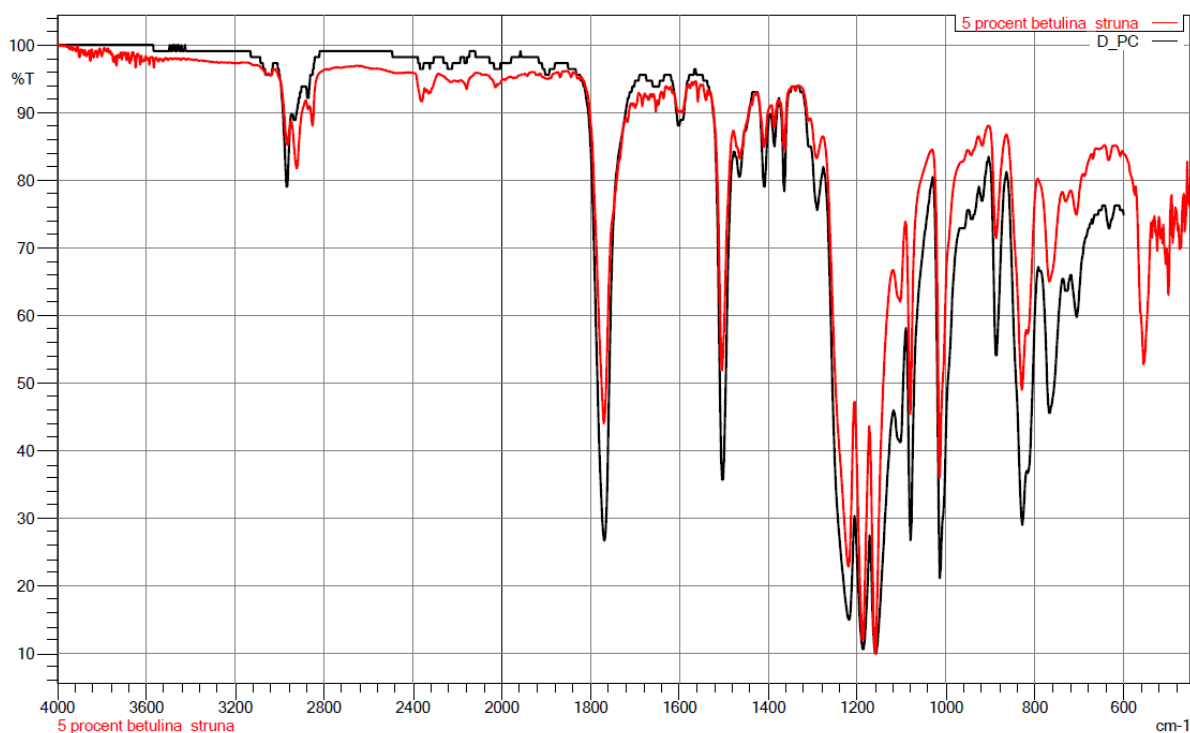
	Peak	Intensity	Corr. Intensity	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
1	555,49	92,79	3,33	561,28	538,13	108,229	39,394
2	767,66	95,98	2,95	794,67	738,73	135,164	75,689
3	829,39	92,53	3,08	866,03	819,74	168,769	43,932
4	887,25	97,19	3,19	904,61	866,03	34,557	48,907
5	1014,55	89,95	9,95	1033,84	966,33	201,337	190,482
6	1080,13	91,90	6,40	1091,70	1033,84	128,384	66,980
7	1159,21	84,82	7,92	1172,72	1120,64	463,607	149,292
8	1188,15	85,10	6,59	1207,43	1172,72	402,042	114,847
9	1219,01	87,31	5,99	1276,87	1207,43	524,036	238,463
10	1504,47	92,92	7,59	1531,47	1479,40	111,399	139,245
11	1770,65	91,25	8,85	1820,80	1735,93	238,951	263,833
12	2920,22	98,11	2,63	2949,15	2881,65	15,189	68,151



Rysunek 52. Widmo FT-IR uzyskane dla płytki poliwęglanowej z 1% zawartością betuliny.

Tabela 20. Tabela zestawienia sygnału zarejestrowanego dla płytki poliwęglanowej z 1% zawartością betuliny z wyodrębnieniem najistotniejszych pików, gdzie: Peak – lokalne maksimum, Intensity – intensywność bezwzględna, Corr. Intensity - intensywność względna, Base (H) - zakres pików wysoki, Base (L) – zakres pików niski, Area – pole powierzchni bezwzględne, Corr. Area - pole powierzchni względne.

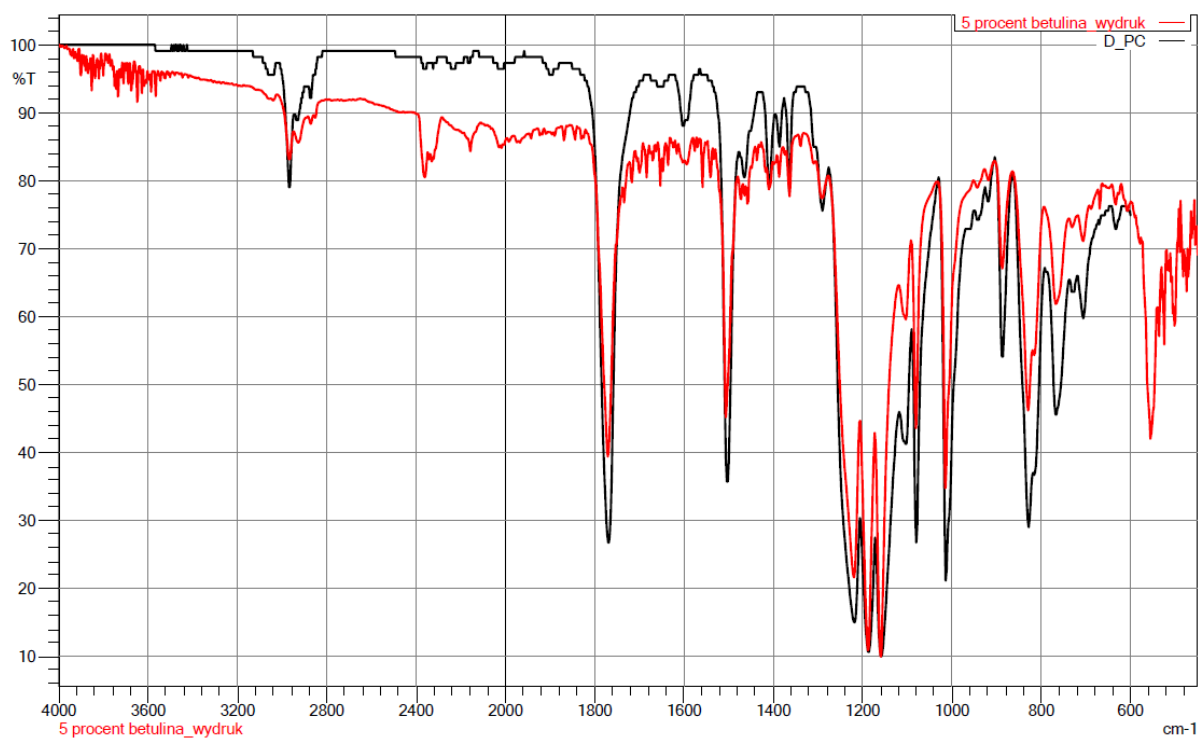
	Peak	Intensity	Corr. Intensity	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
1	555,49	87,64	7,66	572,85	538,13	304,641	141,828
2	815,88	89,22	1,33	819,74	794,67	178,643	11,193
3	829,39	86,13	5,32	864,10	819,74	337,998	82,641
4	1014,55	81,83	16,84	1031,91	966,33	419,554	324,423
5	1080,13	85,12	10,87	1091,70	1031,91	285,210	109,877
6	1159,21	73,75	13,03	1172,72	1120,64	828,030	244,938
7	1188,15	74,23	10,78	1205,51	1172,72	680,928	190,659
8	1219,01	77,57	10,32	1276,87	1205,51	977,813	399,870
9	1506,40	86,66	12,75	1529,55	1479,40	275,666	244,221
10	1770,65	83,79	15,56	1820,80	1737,86	490,197	458,518
11	2968,44	98,86	2,07	3024,38	2947,23	-49,394	46,334



Rysunek 53. Widmo FT-IR uzyskane dla filamentu PC z 5% zawartością betuliny.

Tabela 21. Tabela zestawienia sygnału zarejestrowanego dla filamentu PC z 5 % zawartością betuliny z wyodrębnieniem najistotniejszych pików, gdzie: Peak – lokalne maksimum, Intensity – intensywność bezwzględna, Corr. Intensity - intensywność względna, Base (H) - zakres pików wysoki, Base (L) – zakres pików niski, Area – pole powierzchni bezwzględne, Corr. Area - pole powierzchni względne.

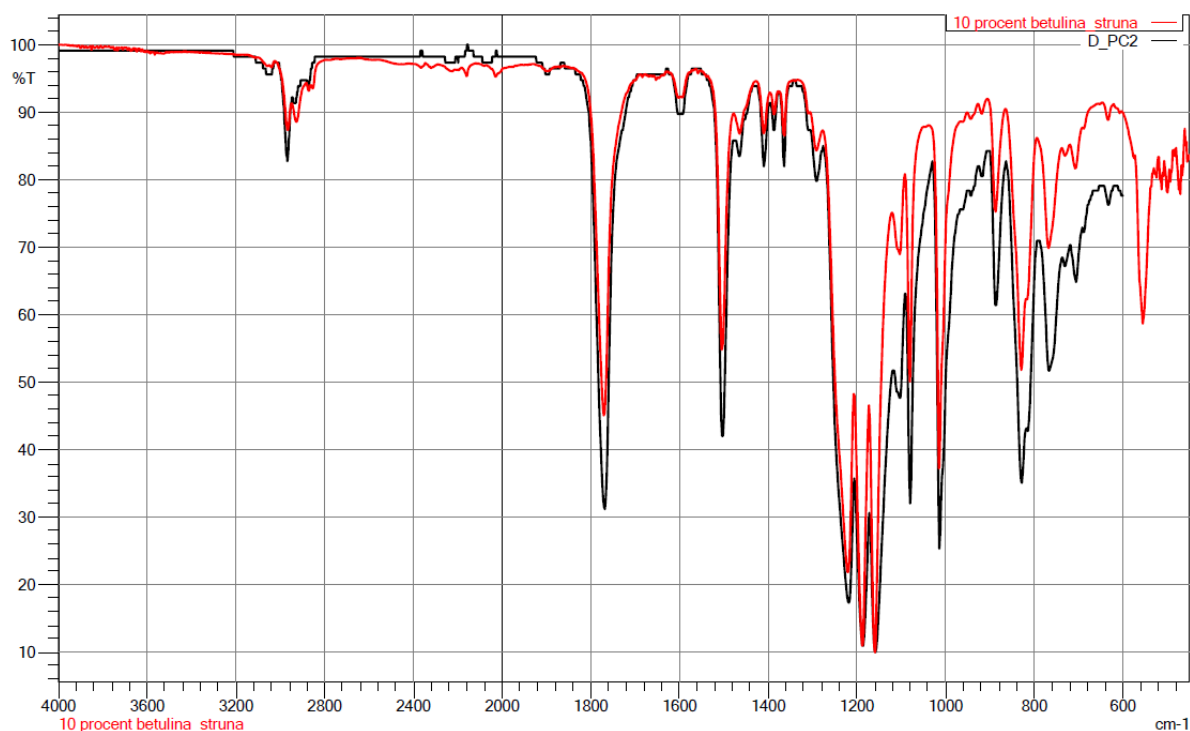
	Peak	Intensity	Corr. Intensity	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
1	499,56	88,94	3,49	503,42	491,84	97,399	15,433
2	555,49	85,15	8,70	572,85	538,13	379,786	166,731
3	767,66	89,66	5,24	792,74	738,73	404,225	128,269
4	815,88	86,83	1,36	819,74	792,74	244,971	5,742
5	829,39	83,78	5,55	864,10	819,74	421,677	82,031
6	887,25	92,02	5,90	904,61	864,10	178,648	93,349
7	1014,55	79,01	17,80	1031,91	950,90	624,981	367,628
8	1080,13	82,48	11,19	1091,70	1031,91	423,359	117,100
9	1103,28	88,56	3,30	1120,64	1091,70	291,462	48,671
10	1159,21	69,46	14,55	1172,72	1120,64	991,229	264,964
11	1188,15	70,21	12,22	1205,51	1172,72	787,490	212,992
12	1219,01	74,18	11,68	1276,87	1205,51	1140,455	451,922
13	1504,47	84,84	14,03	1529,55	1479,40	319,569	263,273
14	1770,65	81,95	17,71	1820,80	1720,50	647,488	614,704
15	2924,08	95,81	2,98	2949,15	2883,57	148,224	78,503



Rysunek 54. Widmo FT-IR uzyskane dla płytki poliwęglanowej z 5% zawartością betuliny.

Tabela 22. Tabela zestawienia sygnału zarejestrowanego dla płytki poliwęglanowej z 5% zawartością betuliny z wyodrębnieniem najistotniejszych pików, gdzie: Peak – lokalne maksimum, Intensity – intensywność bezwzględna, Corr. Intensity - intensywność względna, Base (H) - zakres pików wysoki, Base (L) – zakres pików niski, Area – pole powierzchni bezwzględne, Corr. Area - pole powierzchni względne.

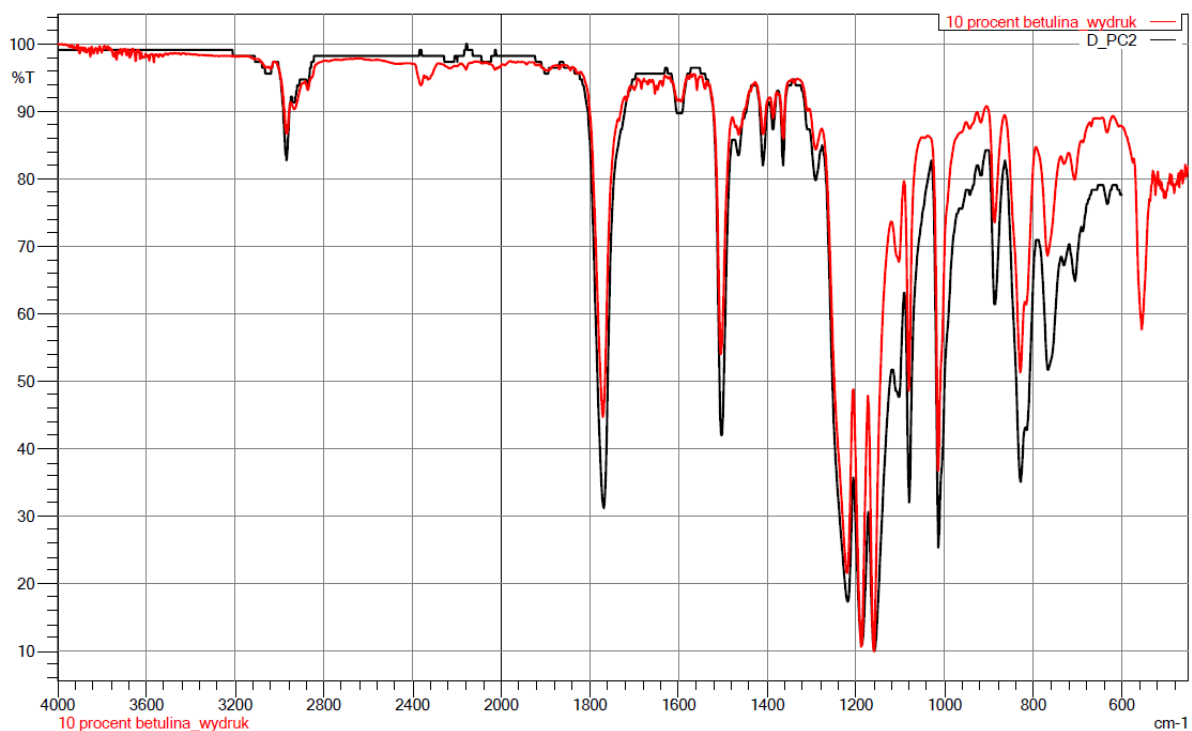
	Peak	Intensity	Corr. Intensity	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
1	555,49	92,06	4,74	572,85	540,06	190,956	88,275
2	829,39	92,89	2,89	864,10	819,74	164,063	42,799
3	1014,55	90,62	8,95	1033,84	950,90	215,762	182,189
4	1080,13	92,37	5,82	1091,70	1033,84	132,424	58,390
5	1159,21	85,71	7,60	1172,72	1118,71	435,640	133,121
6	1188,15	85,89	6,50	1205,51	1172,72	360,614	111,971
7	1219,01	88,01	5,92	1276,87	1205,51	500,723	227,408
8	1506,40	92,69	7,45	1529,55	1479,40	132,425	138,832
9	1770,65	91,54	8,52	1815,01	1737,86	234,799	249,976
10	2968,44	100,23	1,08	3024,38	2949,15	-97,050	22,430



Rysunek 55. Widmo FT-IR uzyskane dla filamentu PC z 10% zawartością betuliny.

Tabela 23. Tabela zestawienia sygnału zarejestrowanego dla filamentu PC z 10 % zawartością betuliny z wyodrębnieniem najistotniejszych pików, gdzie: Peak – lokalne maksimum, Intensity – intensywność bezwzględna, Corr. Intensity - intensywność względna, Base (H) - zakres pików wysoki, Base (L) – zakres pików niski, Area – pole powierzchni bezwzględne, Corr. Area - pole powierzchni względne.

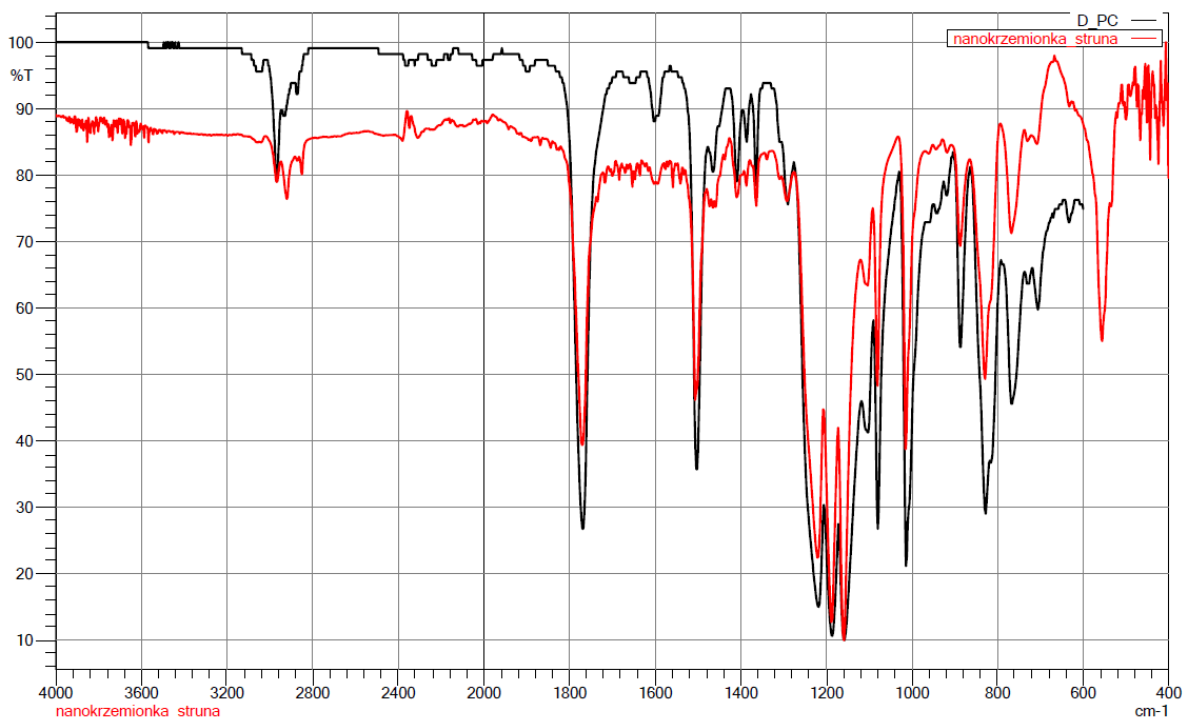
	Peak	Intensity	Corr. Intensity	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
1	555,49	82,80	12,06	572,85	530,42	470,268	248,714
2	767,66	88,39	7,78	794,67	738,73	402,629	188,259
3	829,39	79,38	8,76	864,10	817,81	531,361	145,474
4	887,25	91,08	8,00	906,54	864,10	166,148	126,059
5	1014,55	72,11	25,45	1037,70	966,33	628,356	458,357
6	1080,13	78,52	16,29	1091,70	1049,27	346,906	160,862
7	1103,28	87,94	4,78	1120,64	1091,70	289,128	70,483
8	1159,21	58,52	21,94	1172,72	1120,64	1210,648	371,994
9	1188,15	59,00	18,14	1207,43	1172,72	1107,638	315,864
10	1220,94	64,44	16,96	1276,87	1207,43	1505,284	627,210
11	1504,47	80,89	18,71	1537,26	1477,47	357,828	342,407
12	1770,65	76,02	25,23	1840,09	1701,21	707,485	883,260
13	2966,51	97,13	2,66	3024,38	2949,15	2,221	51,280



Rysunek 56. Widmo FT-IR uzyskane dla płytki poliwęglanowej z 10% zawartością betuliny.

Tabela 24. Tabelaryczne zestawienie sygnału zarejestrowanego dla płytki poliwęglanowej z 10 % zawartością betuliny z wyodrębnieniem najistotniejszych pików, gdzie: Peak – lokalne maksimum, Intensity – intensywność bezwzględna, Corr. Intensity - intensywność względna, Base (H) - zakres pików wysoki, Base (L) – zakres pików niski, Area – pole powierzchni bezwzględne, Corr. Area - pole powierzchni względne.

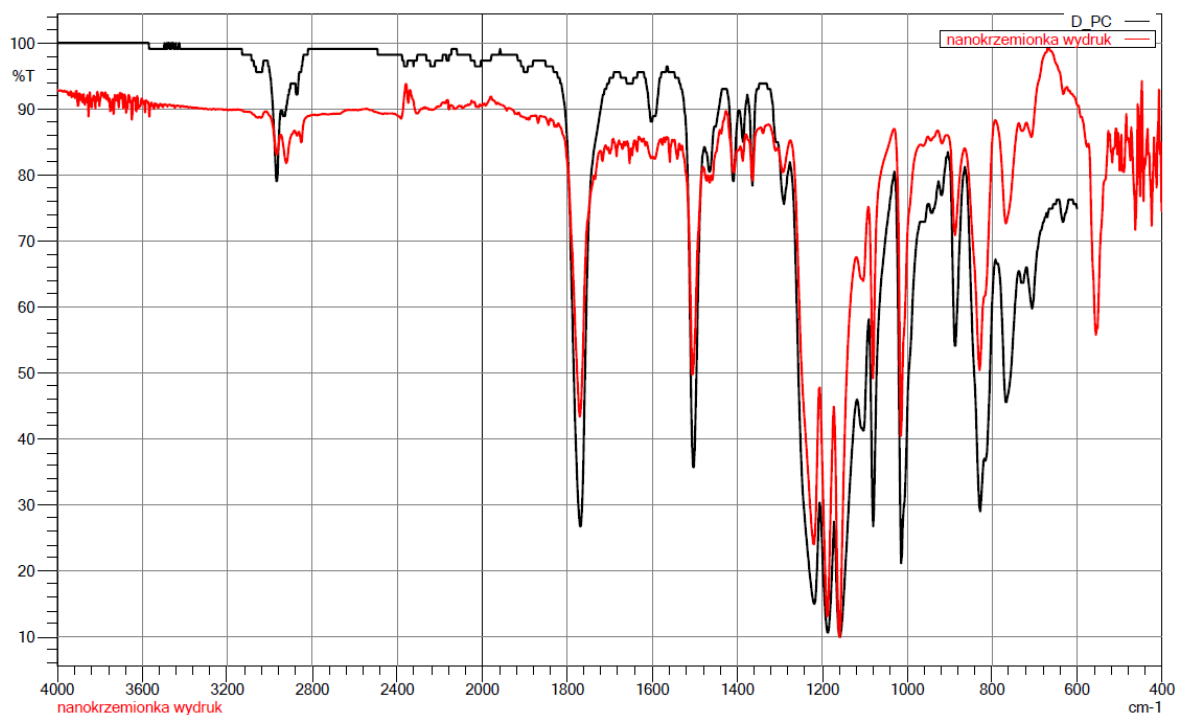
	Peak	Intensity	Corr. Intensity	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
1	555,49	68,70	18,15	572,85	538,13	790,281	334,006
2	767,66	77,57	12,54	794,67	736,80	875,058	301,175
3	829,39	63,52	13,37	864,10	819,74	946,198	203,087
4	887,25	81,58	13,50	904,61	864,10	413,716	211,934
5	1014,55	51,73	40,72	1037,70	950,90	1396,559	775,226
6	1080,13	61,35	26,71	1091,70	1051,20	704,742	267,103
7	1103,28	76,82	7,79	1120,64	1091,70	573,091	114,091
8	1159,21	30,00	36,18	1172,72	1120,64	2118,607	620,125
9	1188,15	30,51	30,59	1205,51	1172,72	1801,402	526,968
10	1219,01	39,43	28,01	1276,87	1205,51	2683,484	1055,555
11	1504,47	65,71	30,41	1531,47	1479,40	753,070	555,508
12	1770,65	58,16	38,19	1820,80	1735,93	1375,835	1110,420
13	2966,51	92,28	4,83	3024,38	2949,15	208,078	91,483



Rysunek 57. Widmo FT-IR uzyskane dla filamentu PC z domieszką nanokrzymionki.

Tabela 25. Tabelaryczne zestawienie sygnału zarejestrowanego dla filamentu PC z domieszką nanokrzymionki z wyodrębnieniem najistotniejszych pików, gdzie: Peak – lokalne maksimum, Intensity – intensywność bezwzględna, Corr. Intensity - intensywność względna, Base (H) - zakres piku wysoki, Base (L) – zakres piku niski, Area – pole powierzchni bezwzględne, Corr. Area - pole powierzchni względne.

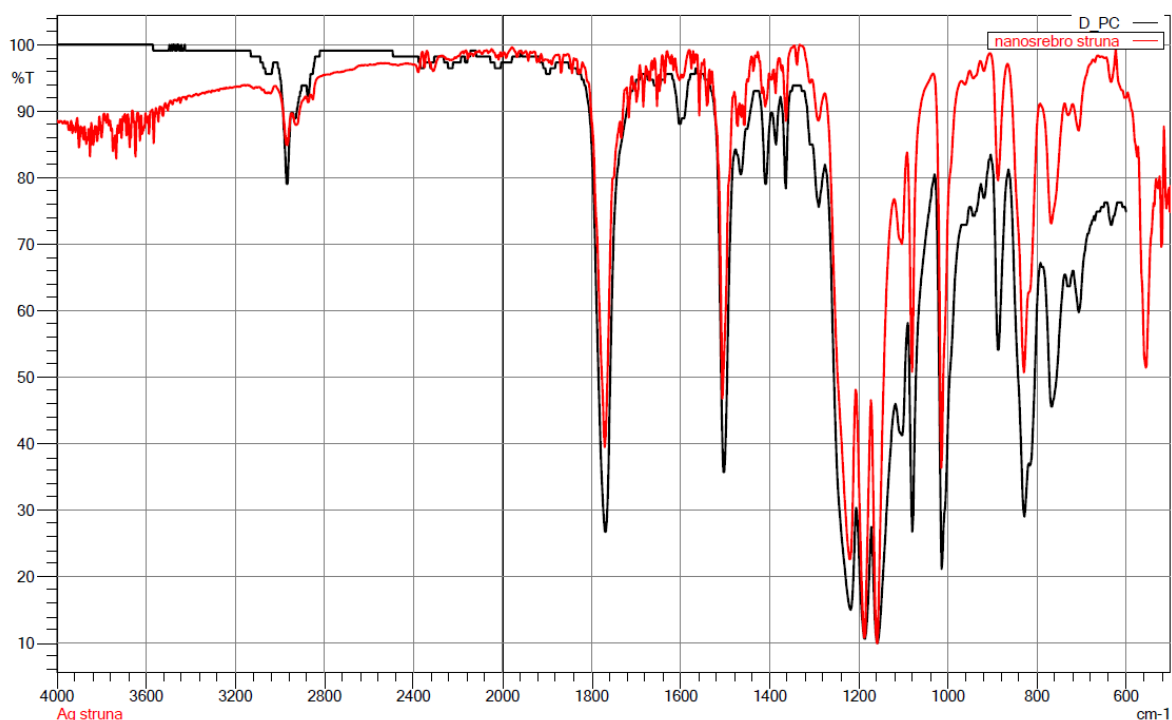
	Peak	Intensity	Corr. Intensity	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
1	555,49	90,08	8,80	617,22	538,13	153,450	181,281
2	767,66	96,08	5,91	794,67	736,80	38,414	153,163
3	829,39	87,98	13,20	866,03	794,67	349,008	432,712
4	887,25	95,36	5,21	908,47	866,03	56,287	80,935
5	1014,55	84,10	17,10	1031,91	970,19	243,695	307,470
6	1080,13	87,60	10,62	1091,70	1031,91	131,510	98,851
7	1159,21	73,50	14,20	1172,72	1120,64	778,017	254,762
8	1188,15	74,52	11,22	1207,43	1172,72	689,314	196,323
9	1220,94	78,08	10,85	1274,94	1207,43	888,369	407,727
10	1506,40	86,83	12,26	1529,55	1479,40	278,999	231,811
11	1770,65	84,33	14,86	1820,80	1737,86	480,179	438,043
12	2920,22	97,97	2,19	2949,15	2883,57	42,353	54,977



Rysunek 58. Widmo FT-IR uzyskane dla płytki poliwęglanowej z domieszką nanokrzemionki.

Tabela 26. Tabela zestawienia sygnału zarejestrowanego dla płytki poliwęglanowej z domieszką nanokrzemionki z wyodrębnieniem najistotniejszych pików, gdzie: Peak – lokalne maksimum, Intensity – intensywność bezwzględna, Corr. Intensity - intensywność względna, Base (H) - zakres pików wysoki, Base (L) – zakres pików niski, Area – pole powierzchni bezwzględne, Corr. Area - pole powierzchni względne.

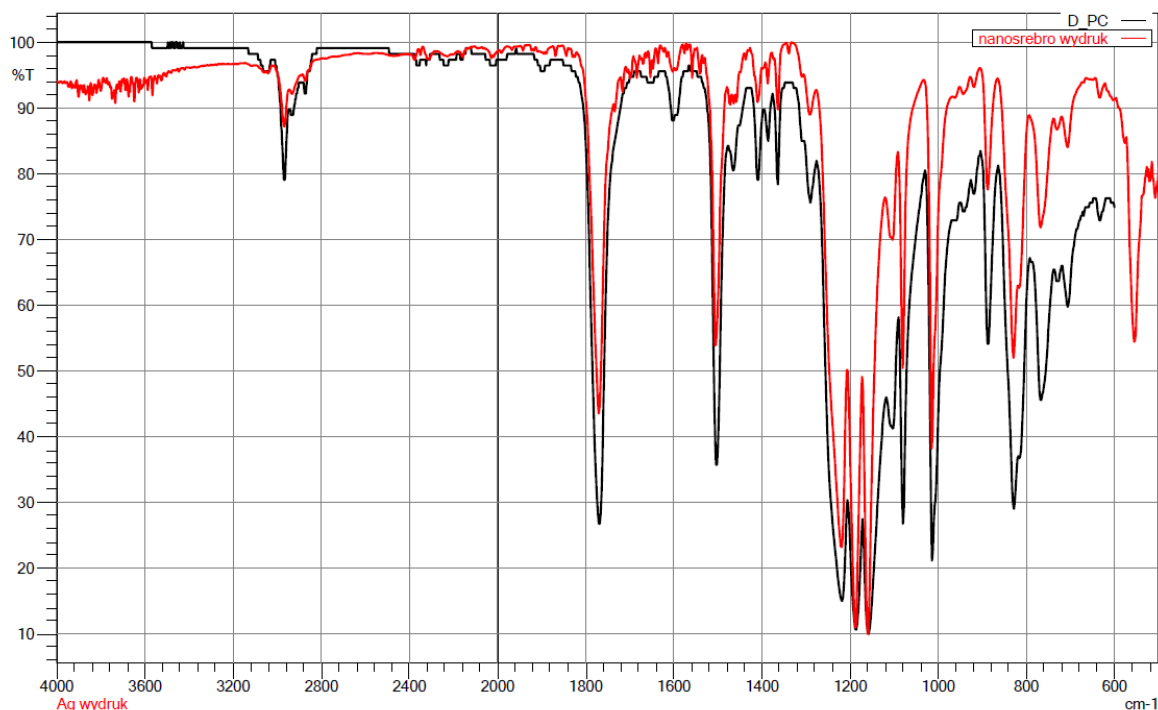
	Peak	Intensity	Corr. Intensity	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
1	551,64	90,88	0,79	553,57	526,56	105,475	-10,412
2	767,66	95,94	4,90	792,74	736,80	78,203	125,439
3	829,39	88,87	11,34	864,10	792,74	350,069	366,896
4	887,25	95,37	4,53	906,54	864,10	75,723	70,576
5	1014,55	85,70	14,59	1029,98	968,26	254,776	262,104
6	1080,13	88,48	8,97	1091,70	1029,98	175,809	90,788
7	1159,21	76,03	12,89	1172,72	1118,71	728,000	226,865
8	1188,15	77,00	10,54	1205,51	1172,72	589,050	181,952
9	1219,01	80,49	9,86	1274,94	1205,51	782,997	366,070
10	1504,47	88,67	10,49	1529,55	1479,40	239,042	197,666
11	1770,65	86,63	12,63	1820,80	1735,93	409,336	367,098
12	2922,15	98,85	1,44	2947,23	2883,57	17,438	37,394



Rysunek 59. Widmo FT-IR uzyskane dla filamentu PC z domieszką nanosrebra.

Tabela 27. Tabelaryczne zestawienie sygnału zarejestrowanego dla filamentu PC z domieszką nanosrebra z wyodrębnieniem najistotniejszych pików, gdzie: Peak – lokalne maksimum, Intensity – intensywność bezwzględna, Corr. Intensity - intensywność względna, Base (H) - zakres pików wysoki, Base (L) – zakres pików niski, Area – pole powierzchni bezwzględne, Corr. Area - pole powierzchni względne.

	Peak	Intensity	Corr. Intensity	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
1	555,49	93,28	5,07	572,85	538,13	149,298	92,536
2	767,66	97,07	3,15	792,74	738,73	65,983	78,766
3	829,39	93,16	7,59	866,03	792,74	191,503	247,182
4	887,25	98,21	3,22	904,61	866,03	-5,860	49,061
5	1014,55	90,65	10,31	1033,84	970,19	132,400	191,570
6	1080,13	93,18	6,18	1091,70	1033,84	59,352	58,879
7	1159,21	86,03	7,77	1172,72	1120,64	399,129	142,890
8	1188,15	86,18	6,37	1207,43	1172,72	372,136	114,268
9	1220,94	88,24	5,97	1276,87	1207,43	462,010	226,558
10	1506,40	92,47	8,36	1529,55	1479,40	111,525	152,627
11	1770,65	91,19	9,20	1820,80	1735,93	219,892	266,106
12	2968,44	99,14	1,03	3020,52	2947,23	-0,568	24,287

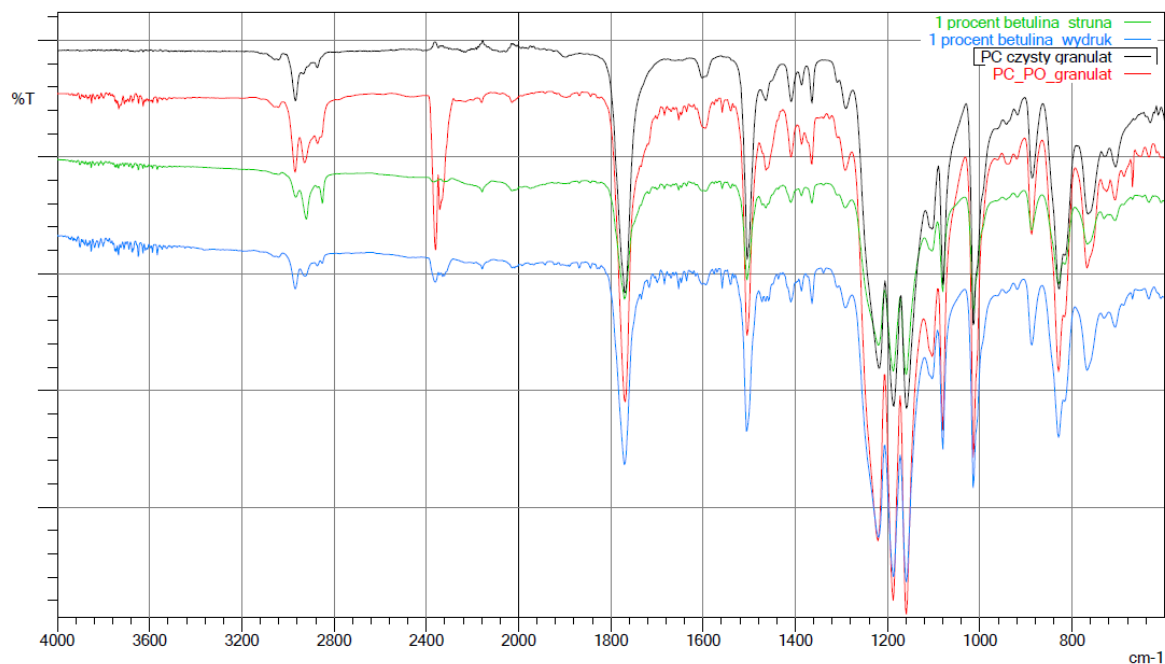


Rysunek 60. Widmo FT-IR uzyskane dla płytki poliwęglanowej z domieszką nanosrebra.

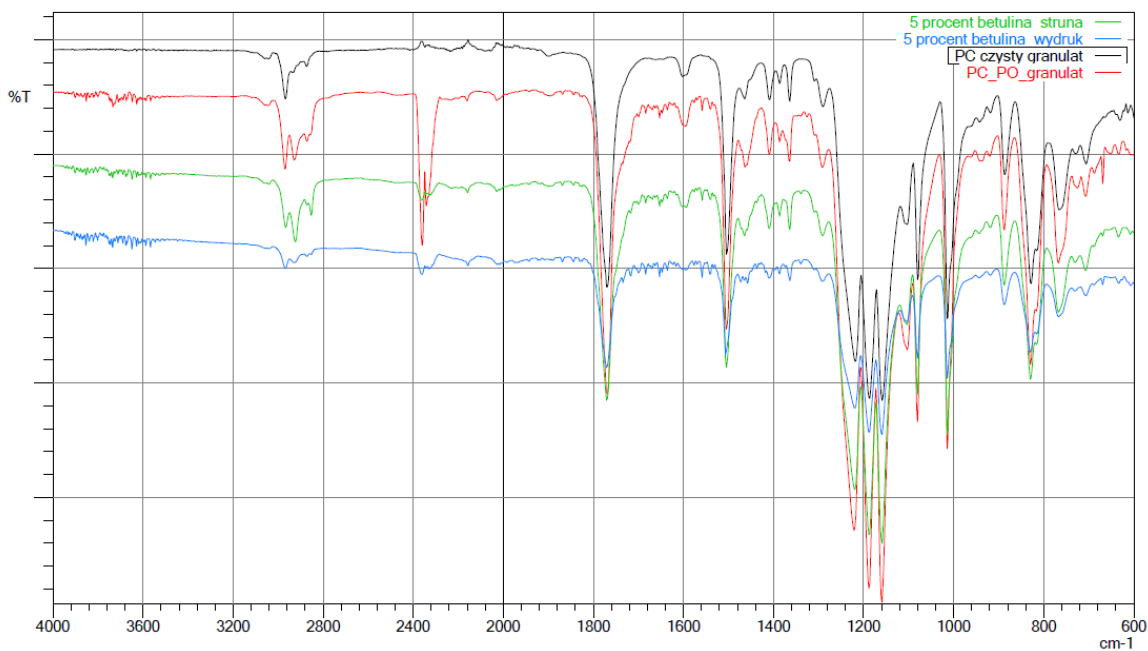
Tabela 28. Tabela zestawienia sygnału zarejestrowanego dla płytki poliwęglanowej z domieszką nanosrebra z wyodrębnieniem najistotniejszych pików, gdzie: Peak – lokalne maksimum, Intensity – intensywność bezwzględna, Corr. Intensity - intensywność względna, Base (H) - zakres pików wysoki, Base (L) – zakres pików niski, Area – pole powierzchni bezwzględne, Corr. Area - pole powierzchni względne.

	Peak	Intensity	Corr. Intensity	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
1	555,49	83,74	11,10	572,85	526,56	488,813	240,860
2	767,66	90,31	6,34	794,67	738,73	344,165	157,254
3	815,88	86,84	1,63	819,74	794,67	217,842	13,803
4	829,39	82,83	6,61	866,03	819,74	418,905	90,830
5	887,25	92,48	6,70	904,61	866,03	132,961	100,506
6	1014,55	77,62	20,86	1033,84	968,26	496,241	384,758
7	1080,13	82,24	13,22	1091,70	1033,84	322,849	132,404
8	1103,28	89,60	3,99	1120,64	1091,70	253,012	60,286
9	1159,21	66,98	17,42	1172,72	1120,64	998,089	315,238
10	1188,15	67,36	14,55	1207,43	1172,72	882,369	255,297
11	1219,01	71,96	12,84	1276,87	1207,43	1174,620	492,083
12	1506,40	83,55	15,72	1529,55	1479,40	336,891	297,350
13	1770,65	79,64	18,97	1820,80	1735,93	642,347	548,032
14	2968,44	96,10	2,56	3016,66	2945,30	139,422	62,073

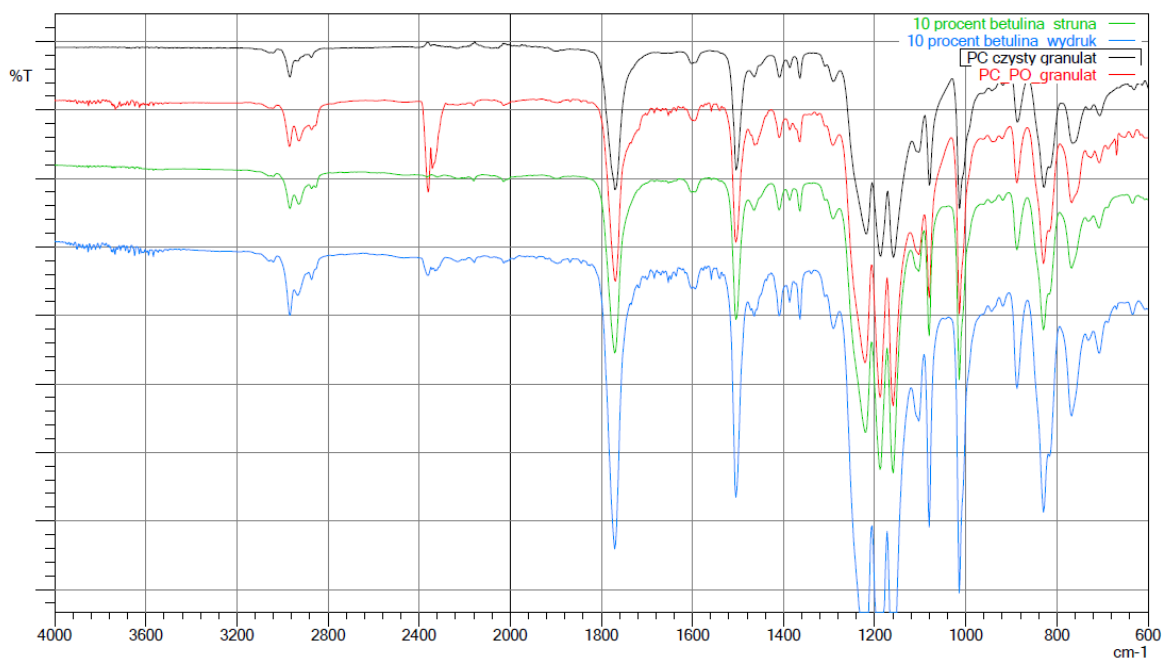
Dodatkowo wykonane zostało zestawienie widm czystego granulatu, granulatu z poliolem względem strun i wydruków z domieszkami. Widma przedstawiono na rysunkach 61-65.



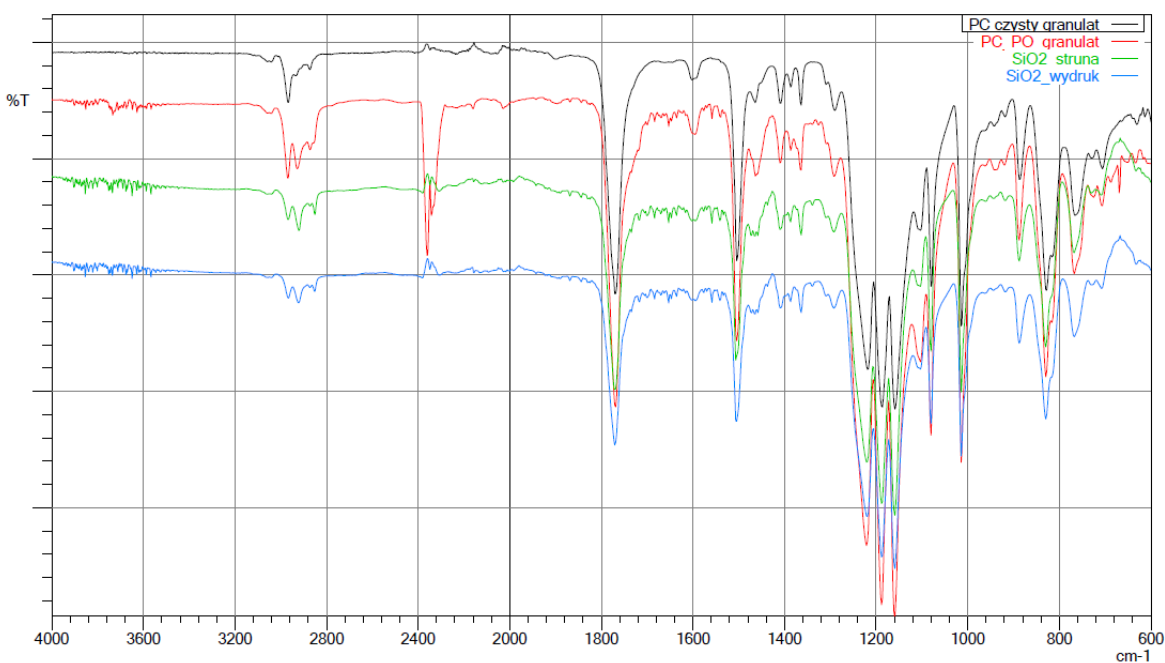
Rysunek 61. Zestawienie widm czystego granulatu PC, granulatu z poliolem (PO) względem struny i wydruku z betuliną w stężeniu 1%.



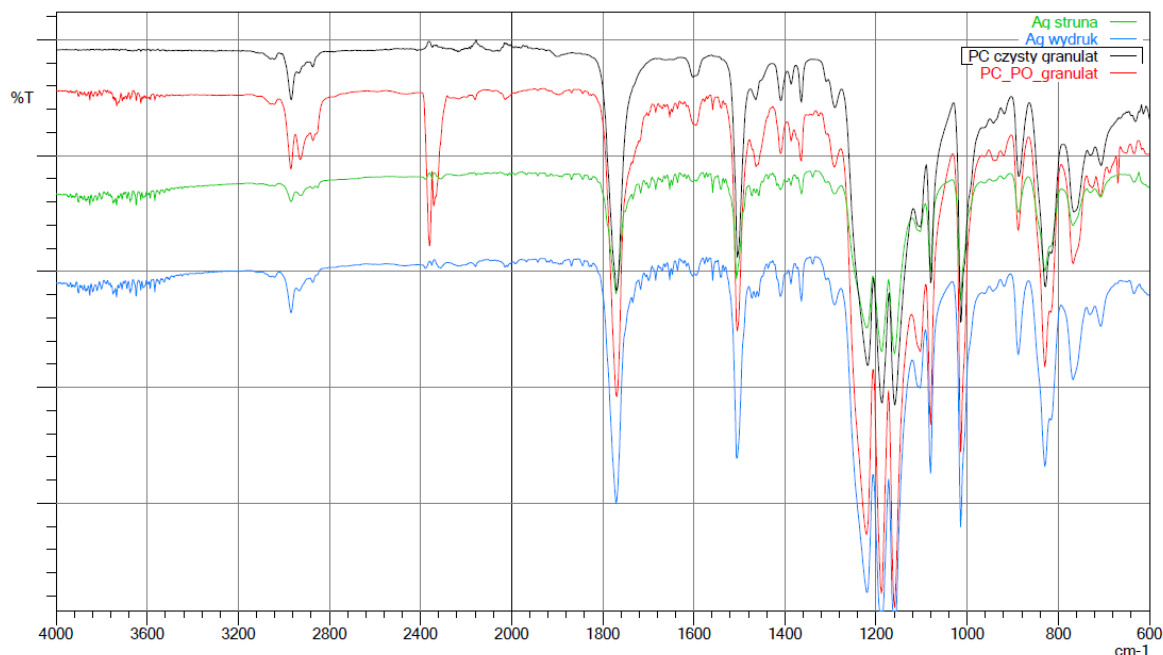
Rysunek 62. Zestawienie widm czystego granulatu PC, granulatu z poliolem (PO) względem struny i wydruku z betuliną w stężeniu 5%.



Rysunek 63. Zestawienie widm czystego granulatu PC, granulatu z poliolem (PO) względem struny i wydruku z betuliną w stężeniu 10%.



Rysunek 64. Zestawienie widm czystego granulatu PC, granulatu z poliolem (PO) względem struny i wydruku z nanokrzemionką.



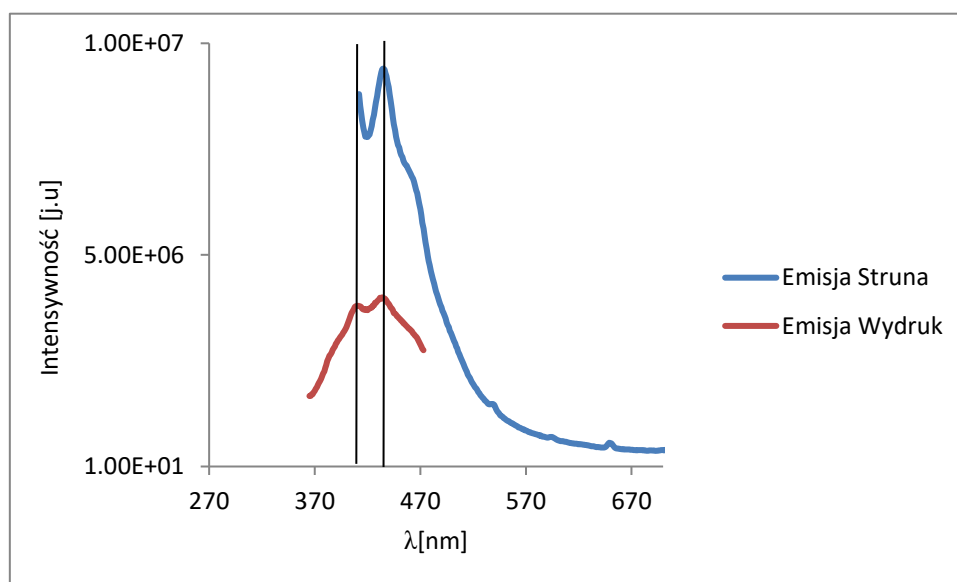
Rysunek 65. Zestawienie widm czystego granulatu PC, granulatu z poliolem (PO) względem struny i wydruku z nanosrebrem.

Badania z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni FT-IR przeprowadzone zostały w celu analizy składu chemicznego wytypowanych materiałów oraz sprawdzenia czy obróbka termiczna wpływa w jakiś sposób na trwałość materiału bazowego. Na widmach zaobserwowane zostały charakterystyczne dla poliwęglanu pasma – pasmo przy liczbie falowej 1750 cm^{-1} , które świadczy o obecności drgań rozciągających (C=O), pasma w zakresie od 1100 do 1300 cm^{-1} , które powiązane są z obecnością drgań rozciągających (C–O) oraz pasmo przy liczbie falowej 1500 cm^{-1} , które można powiązać z drganiami rozciągającymi (C=C). Pasma te są widoczne dla widm otrzymanych zarówno dla czystego filamentu z poliwęglanu, który poddany był jednej obróbce termicznej związanej z jego wytłoczeniem oraz dla wydruków (kolejna obróbka), co pozwala wnioskować o stabilności termicznej otrzymanych materiałów. Zakres liczby falowej $2850 - 3000\text{ cm}^{-1}$ powiązany jest z drganiami rozciągającymi (C–H). Nie udało się uchwycić pasm charakterystycznych dla domieszek, mimo licznie podejmowanych prób. Prawdopodobnie ma to związek ze zbyt małą zawartością procentową domieszek, jak również ograniczeniami sprzętowymi (rozdzielczość urządzenia). W przypadku domieszki betulinowej w stężeniu 5 i 10% widoczne powinny być pasma charakterystyczne, zwłaszcza przy liczbach falowych: 3471 , 3462 , 2968 , 2930 i 2866 cm^{-1} .

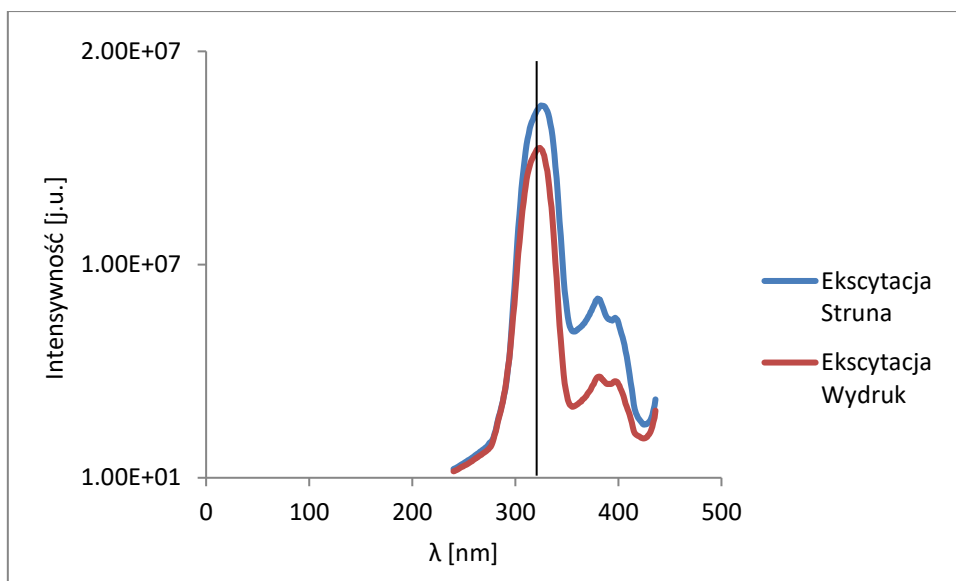
(związane odpowiednio z asymetrycznymi i symetrycznymi drganiami rozciągającymi OH, CH₃ i CH₂). Na otrzymanych widmach w obszarze 4000-3400 cm⁻¹ widoczne są pasma nałożone na siebie – w przypadku lepszej rozdzielczości i większym udziale domieszki najprawdopodobniej udałoby się je zidentyfikować. Podobnie jest w przypadku pasma, które powinno pojawić się w okolicach liczby falowej 1630 cm⁻¹, mającego związek z drganiami rozciągającymi C=C i CH₂ w końcowej grupie metylowej.

5.7 Wyniki spektrofluorymetrii

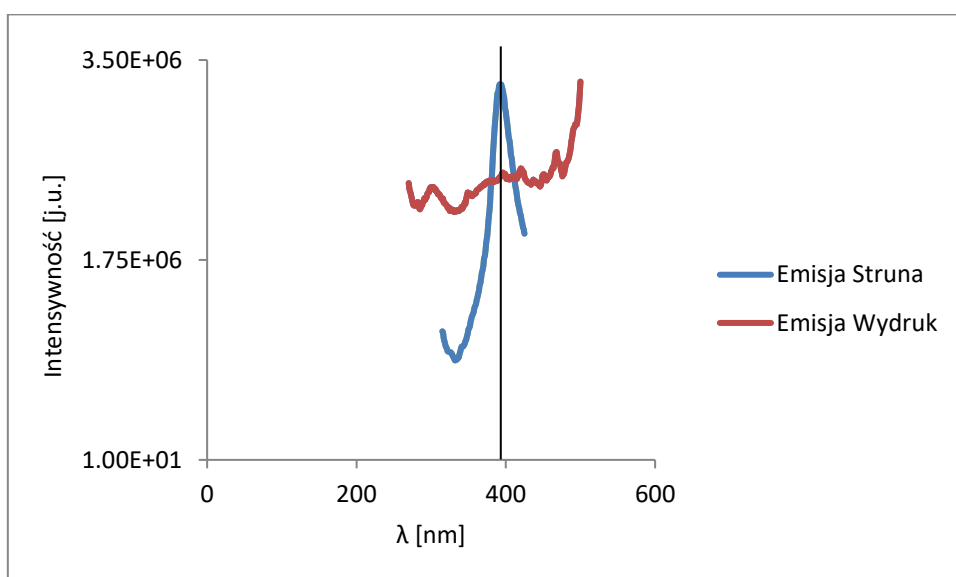
Na rysunkach 66 – 71 przedstawiono widma emisji oraz ekscytacji uzyskane dla poszczególnych próbek.



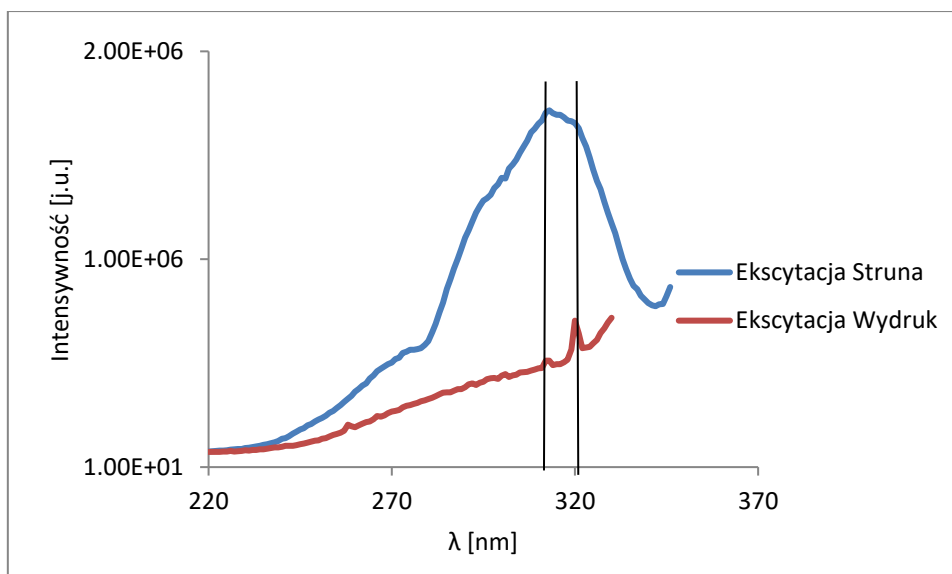
Rysunek 66. Widmo emisyjne uzyskane dla próbki z poliwęglanu z domieszką betuliny (1%).



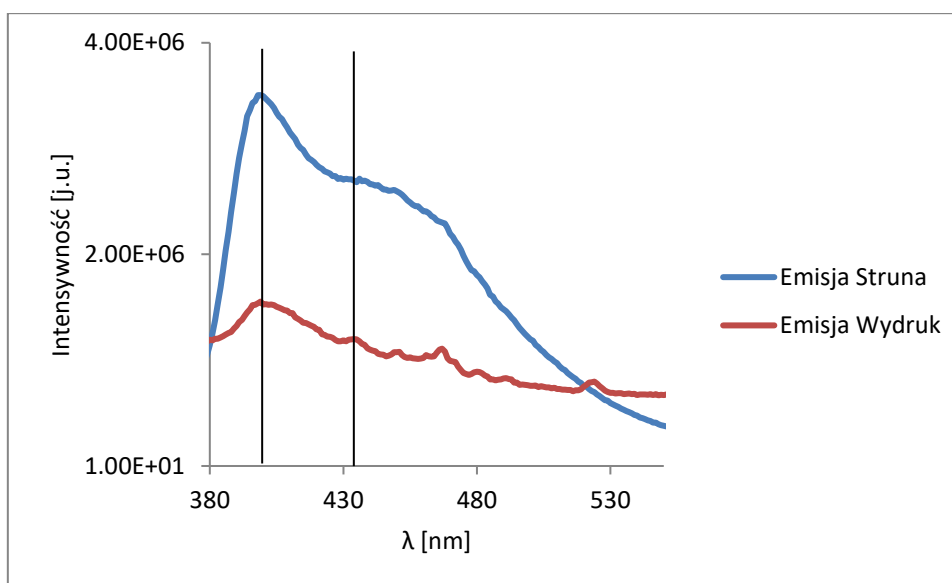
Rysunek 67. Widmo ekscytacyjne uzyskane dla próbki z poliwęglanu z domieszką betuliny (1%).



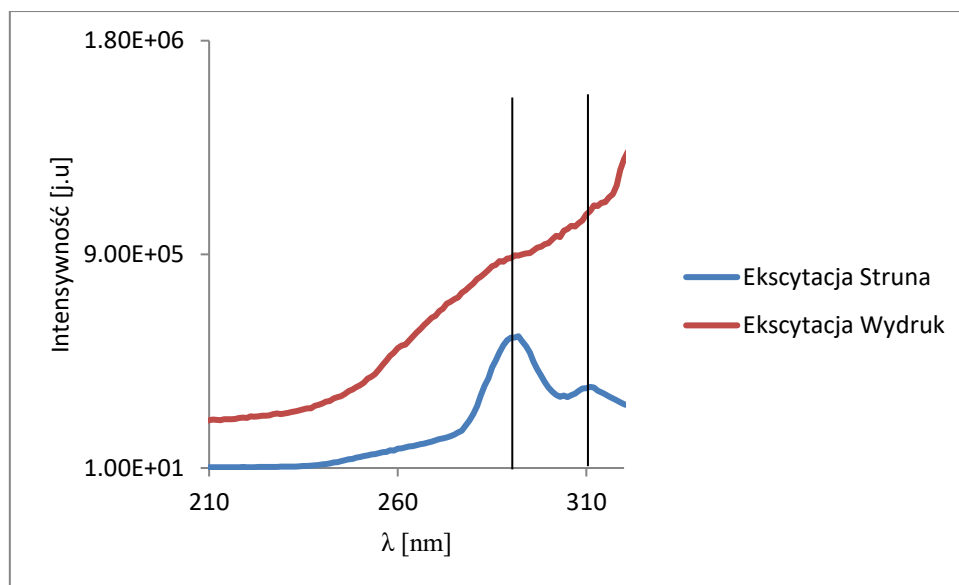
Rysunek 68. Widmo emisyjne uzyskane dla próbki z poliwęglanu z domieszką nanokrzemionki.



Rysunek 69. Widmo ekscytacyjne uzyskane dla poliwęglanu z domieszką nanokrzemionki.



Rysunek 70. Widmo emisyjne uzyskane dla poliwęglanu z domieszką nanosrebra.



Rysunek 71. Widmo ekscytacyjne uzyskane dla poliwęglanu z domieszką nanosrebra.

Emisję dla próbki filamentu z dodatkiem betuliny jak i wydruku badano w zakresie od 365 do 685 nm. Wzbudzenie nastąpiło przy długości fali 350 nm, maksimum ekscytacji zaobserwowano dla długości fali 410 nm. Ekscytację przeprowadzono poprzez wzbudzenie próbki w zakresie 240-436 nm. Maksimum absorpcji zaobserwowano dla długości fali 325 nm. Przesunięcie widma emisji w stosunku do widma absorpcji w kierunku dłuższych fal wynika z faktu, że fotony emitowanego promieniowania mają niższą energię (czyli dłuższą długość fali) w porównaniu z fotonami promieniowania wzbudzającego. Zjawisko to nosi nazwę przesunięcia Stokesa. Nie zaobserwowano również obecności dodatkowych maksimów lokalnych próbek po procesie obróbki cieplnej (wydruk płytki), co świadczy o stabilności przygotowanej domieszki betulinowej.

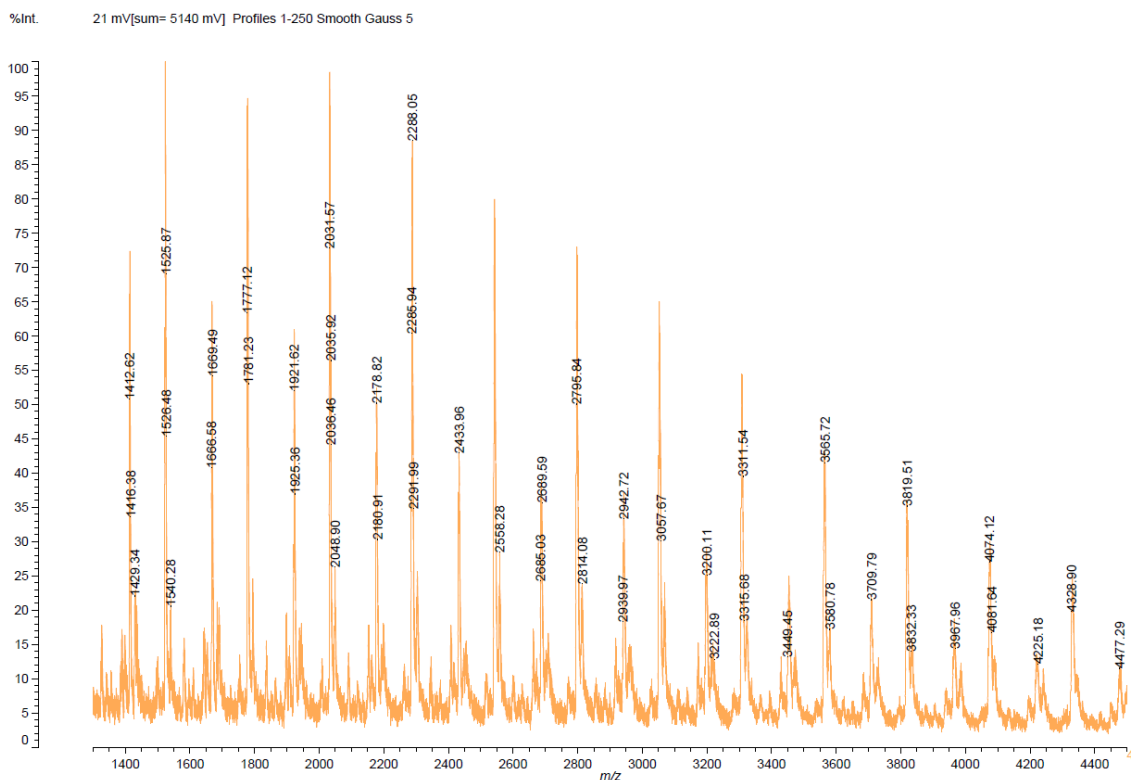
Emisję dla próbki filamentu z dodatkiem nanokrzemionki badano w zakresie 315 – 585 nm a dla wydruku w zakresie 270-500 nm. Wzbudzenie nastąpiło przy długości fali odpowiednio dla filamentu 258 nm a dla wydruku 300 nm. Maksimum ekscytacji zaobserwowano dla długości fali 394 i 494 nm. Badanie ekscytacji przeprowadzono poprzez wzbudzenie próbki w zakresie 195 – 346 nm (filament) i 200 – 330 nm (wydruk). Maksimum absorpcji miało miejsce przy długości fali 313 nm (filament) oraz 320 nm (wydruk). Podobnie jak w przypadku materiału z domieszką betuliny zaobserwowano przesunięcie Stokesa i brak dodatkowych maksimów lokalnych po procesie obróbki, które mogłyby świadczyć o braku stabilności termicznej uzyskanego materiału.

Emisja dla próbki z nanosrebrem była badana w zakresie 315-585 nm (filament) i 330 – 620 nm (wydruk). Wzbudzenie odnotowano odpowiednio dla długości fali 300 nm (filament) oraz 320 nm (wydruk). Maksimum ekscytacji miało miejsce dla długości fali 399 nm zarówno dla filamentu jak i wydruku. W przypadku badania ekscytacji zakresy wzbudzenia próbki były następujące: 184 – 324 nm (filament) i 200 – 330 nm (wydruk). Maksimum absorpcji wynosiło odpowiednio 292 nm dla filamentu i 321 nm dla wydruku. Na widmach zaobserwowano również przesunięcie Stokesa. Nie uwidoczniono dodatkowych maksimów lokalnych, które mogłyby wskazywać na brak stabilności termicznej wykonanych materiałów po obróbce cieplnej – wydruku płytek.

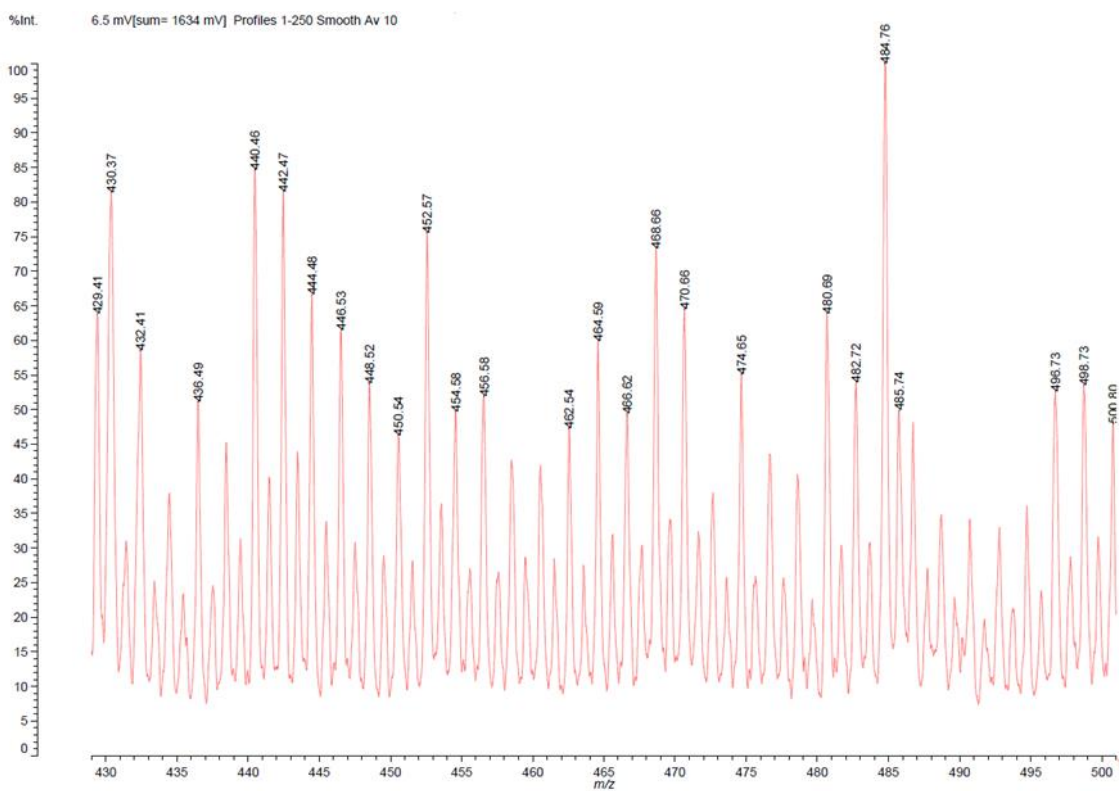
5.8 Wyniki spektrometrii mas MALDI-ToF

Na rysunkach 72-77 zaprezentowano otrzymane widma masowe dla czystego poliwęglanu i betuliny oraz każdego z otrzymanych materiałów zarówno dla filamentu jak i dla wydruku. Dodatkowo wykonano ich zestawienie.

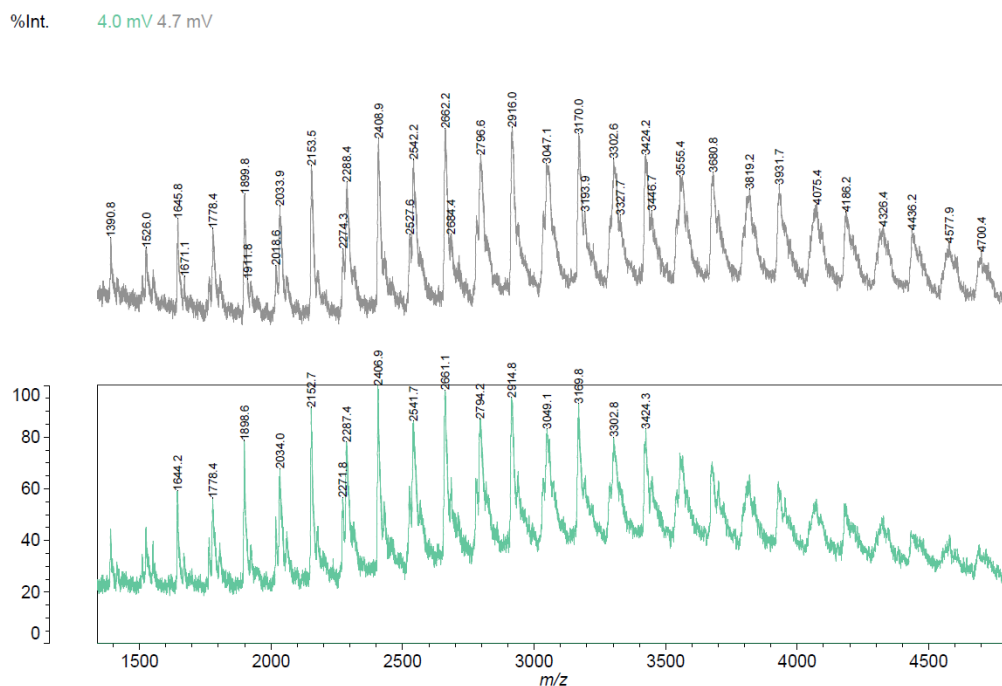
Na lewej osi zarejestrowano intensywność od 0 do 100 %. Ponieważ analizowano substancje o różnych mechanizmie jonizacji nie można porównać wyników ilościowo a jedynie jakościowo. Dodatkowo sam aparat, z którego korzystano do przeprowadzenia badań działa w sposób jakościowy - nie ma możliwości wykorzystania go do analiz ilościowych.



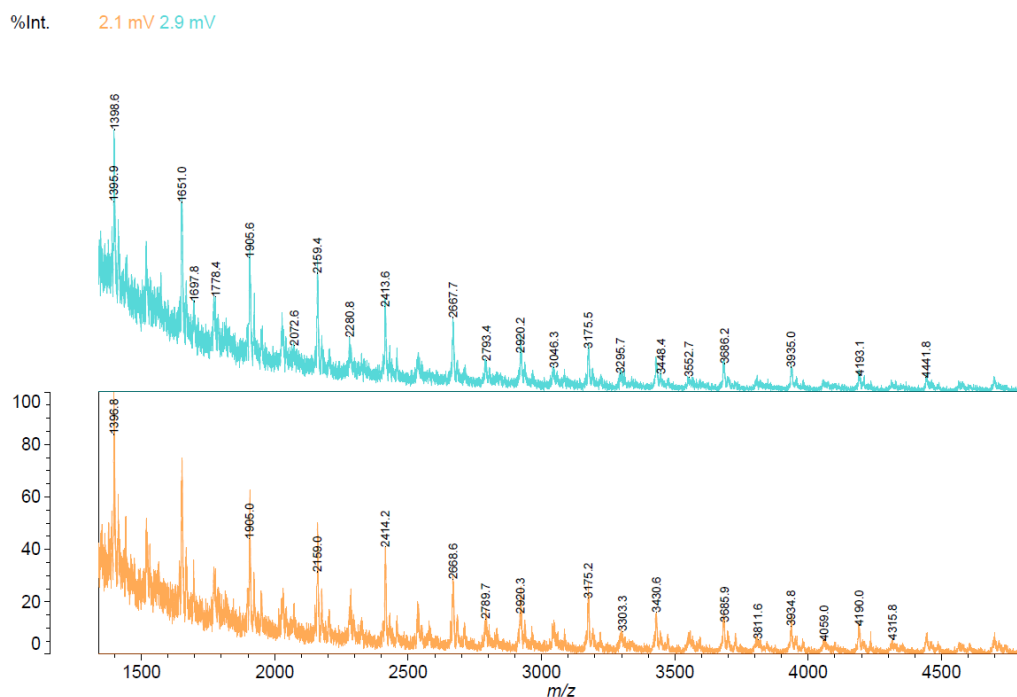
Rysunek 72. Widmo masowe otrzymane dla poliwęglanu



Rysunek 73. Widmo masowe otrzymane dla betuliny uzyskanej w wyniku ekstrakcji Soxhleta.

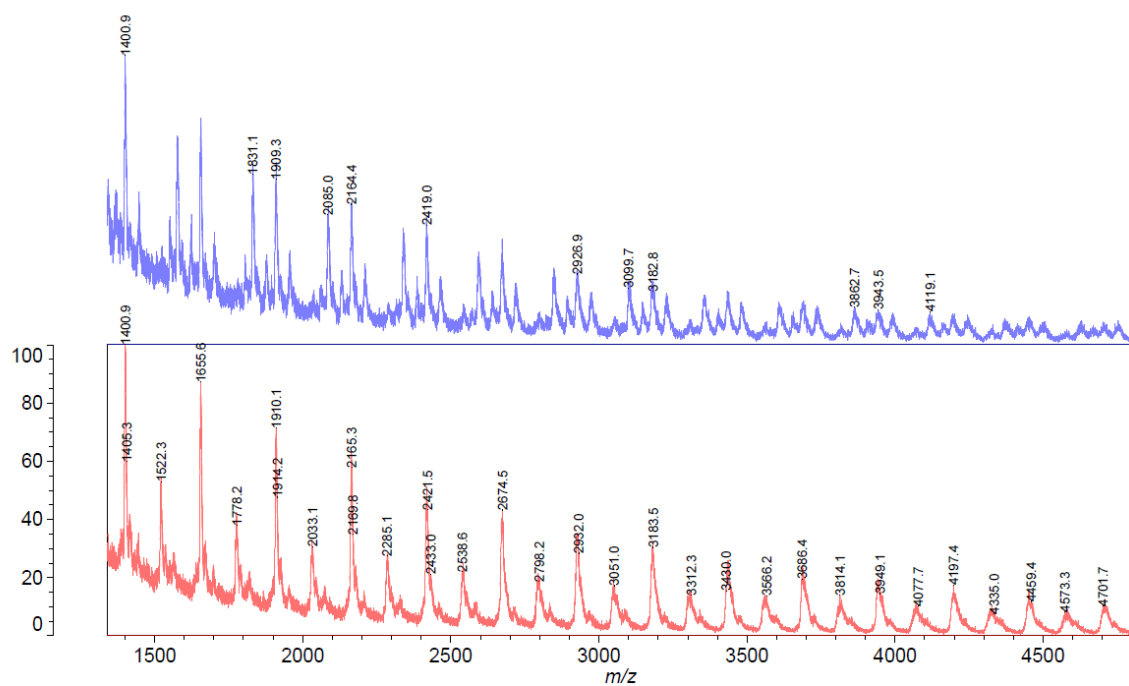


Rysunek 74. Widmo masowe otrzymane dla poliwęglanu domieszkowanego betulina. Kolorem szarym oznaczono widmo masowe otrzymane dla filamentu a zielonym dla wydruku



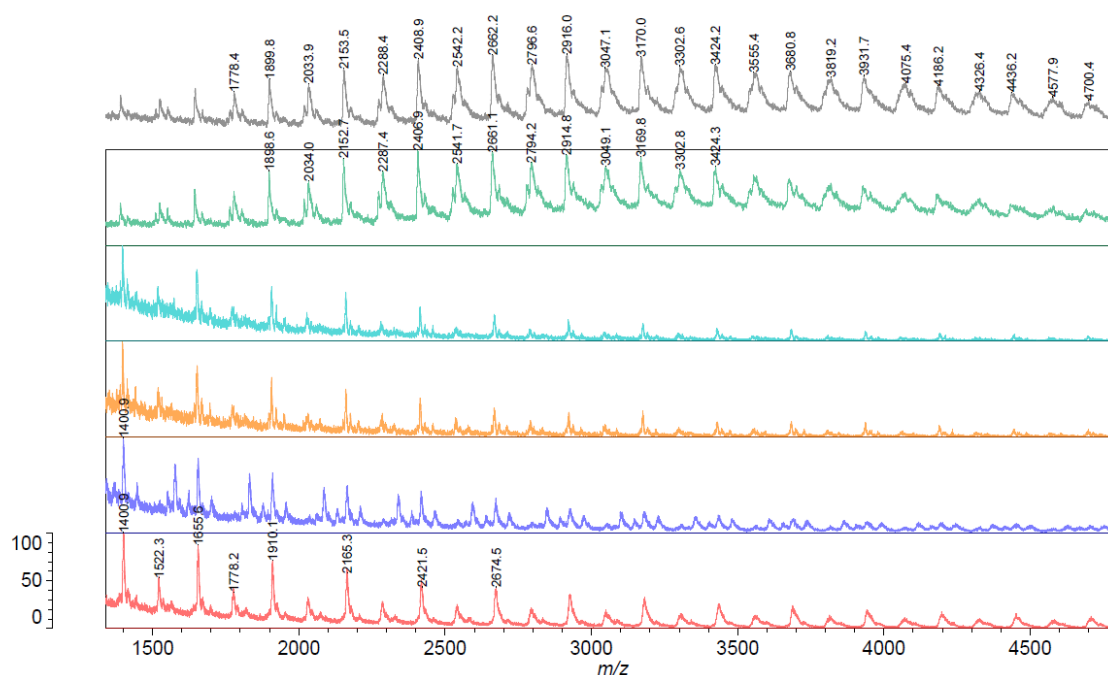
Rysunek 75. Widmo masowe otrzymane dla poliwęglanu domieszkowanego nanokrzemionką. Kolorem turkusowym oznaczono widmo masowe otrzymane dla filamentu a pomarańczowym dla wydruku.

%Int. 6.9 mV 4.3 mV



Rysunek 76. Widmo masowe otrzymane dla poliwęglanu domieszkowanego nanosrebrem. Kolorem niebieskim oznaczono widmo masowe otrzymane dla filamentu a czerwonym dla wydruku.

%Int. 6.9 mV 4.3 mV 2.1 mV 2.9 mV 4.0 mV 4.7 mV



Rysunek 77. Zestawienie otrzymanych widm masowych dla poszczególnych materiałów. Kolor szary – betulina filament, kolor zielony – betulina wydruk, kolor turkusowy – nanokrzemionka filament, kolor pomarańczowy – nanokrzemionka wydruk, kolor niebieski – nanosrebro filament, kolor czerwony – nanosrebro wydruk.

Na podstawie otrzymanych wyników i porównania tych otrzymanych dla filamentów jak i gotowych wydruków można wnioskować, że temperatura której jest poddawany filament w trakcie wydruku, nie wpływa na degradację materiału, gdyż nie zaobserwowano żadnych dodatkowych pików ani przesunięcia mas. Podobnie jest w przypadku obróbki termicznej w czasie produkcji filamentu. W celu całkowitego wykluczenia degradacji termicznej materiału, należy jednak wykonać badanie DSC.

Zauważano także, że widma z betuliną charakteryzują się najlepszą rozdzielczością, co może wynikać z zawartości kwasu betulinowego, który poprawił jonizację samego polimeru.

5.9 Wyniki oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej

W tabelach 29 – 35 przedstawiono uzyskane parametry dla poszczególnych próbek z różnym stężeniem betuliny względem szczepu *S. aureus* (DSM 346) oraz *E. coli* (DSM 1576). Uwzględniając budowę ściany komórkowej, różnice morfologiczne i fizjologiczne (między innymi związane z opornością na czynniki środowiskowe i lekoopornością) bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych są podstawą konieczności porównania reakcji przedstawicieli tych bakterii na badane czynniki bioaktywne.

Tabela 29. Wyniki otrzymane dla próbek z 1% domieszką betuliny względem szczepu *S. aureus* (DSM 346) w temperaturze 35 +/- 1°C wraz z obliczoną wartością parametru R.

Parametr	Próbka referencyjna bezpośrednio po inokulacji	Próbka badana bezpośrednio po inokulacji	Próbka referencyjna po 24 godzinach inkubacji	Próbka badana po 24 godzinach inkubacji
Średnia liczba żywych komórek bakterii jtk/cm ²	1,6x10 ⁴	1,6x10 ⁴	1,8x10 ⁴	1,5x10 ⁴
Logarytm dziesiętny liczby żywych komórek bakterii	U ₀ =4,20	A ₀ =4,20	U _t =4,25	A _t =4,17
$R=(U_t-U_0) - (A_t-U_0)=U_t - A_t$	<u>R_{24h}=0,08</u>			

Tabela 30. Wyniki otrzymane dla próbek z 5% domieszką betuliny względem szczepu *S. aureus* (DSM 346) w temperaturze 35 +/- 1°C wraz z obliczoną wartością parametru R.

Parametr	Próbka referencyjna bezpośrednio po inokulacji	Próbka badana bezpośrednio po inokulacji	Próbka referencyjna po 24 godzinach inkubacji	Próbka badana po 24 godzinach inkubacji
Średnia liczba żywych komórek bakterii jtk/cm ²	1,6x10 ⁴	1,6x10 ⁴	1,8x10 ⁴	6,0x10 ³
Logarytm dziesiętny liczby żywych komórek bakterii	U ₀ =4,20	A ₀ =4,20	U _t =4,25	A _t =3,77
$R=(U_t-U_0) - (A_t-U_0)=U_t - A_t$	<u>R_{24h}=0,48</u>			

Tabela 31. Wyniki otrzymane dla próbek z 10% domieszką betuliny względem szczepu *S. aureus* (DSM 346) w temperaturze 35 +/- 1°C wraz z obliczoną wartością parametru R.

Parametr	Próbka referencyjna bezpośrednio po inokulacji	Próbka badana bezpośrednio po inokulacji	Próbka referencyjna po 24 godzinach inkubacji	Próbka badana po 24 godzinach inkubacji
Średnia liczba żywych komórek bakterii jtk/cm ²	1,6x10 ⁴	1,6x10 ⁴	1,8x10 ⁴	5,9x10 ³
Logarytm dziesiętny liczby żywych komórek bakterii	U ₀ =4,20	A ₀ =4,20	U _t =4,25	A _t =3,77
$R=(U_t-U_0) - (A_t-U_0)=U_t - A_t$	<u>R_{24h}=0,48</u>			

Tabela 32. Wyniki otrzymane dla próbek z 1% domieszką betuliny względem szczepu *E. coli* (DSM 1576) w temperaturze 35 +/- 1°C wraz z obliczoną wartością parametru R.

Parametr	Próbka referencyjna bezpośrednio po inokulacji	Próbka badana bezpośrednio po inokulacji	Próbka referencyjna po 24 godzinach inkubacji	Próbka badana po 24 godzinach inkubacji
Średnia liczba żywych komórek bakterii jtk/cm ²	9,0x10 ³	9,0x10 ³	2,1x10 ⁴	1,3x10 ⁴
Logarytm dziesiętny liczby żywych komórek bakterii	U ₀ =3,95	A ₀ =3,95	U _t =4,32	A _t =4,25
$R=(U_t-U_0) - (A_t-U_0)=U_t - A_t$	<u>R_{24h}=0,07</u>			

Tabela 33. Wyniki otrzymane dla próbek z 5% domieszką betuliny względem szczepu *E. coli* (DSM 1576) w temperaturze 35 +/- 1°C wraz z obliczoną wartością parametru R.

Parametr	Próbka referencyjna bezpośrednio po inokulacji	Próbka badana bezpośrednio po inokulacji	Próbka referencyjna po 24 godzinach inkubacji	Próbka badana po 24 godzinach inkubacji
Średnia liczba żywych komórek bakterii jtk/cm ²	9,0x10 ³	9,0x10 ³	2,1x10 ⁴	2,0x10 ⁴
Logarytm dziesiętny liczby żywych komórek bakterii	U ₀ =3,95	A ₀ =3,95	U _t =4,32	A _t =4,30
$R=(U_t-U_0) - (A_t-U_0)=U_t - A_t$	<u>R_{24h}=0,02</u>			

Tabela 34. Wyniki otrzymane dla próbek z 10% domieszką betuliny względem szczepu *E. coli* (DSM 1576) w temperaturze 35 +/- 1°C wraz z obliczoną wartością parametru R.

Parametr	Próbka referencyjna bezpośrednio po inokulacji	Próbka badana bezpośrednio po inokulacji	Próbka referencyjna po 24 godzinach inkubacji	Próbka badana po 24 godzinach inkubacji
Średnia liczba żywych komórek bakterii jtk/cm ²	9,0x10 ³	9,0x10 ³	2,1x10 ⁴	1,7x10 ⁴
Logarytm dziesiętny liczby żywych komórek bakterii	U ₀ =3,95	A ₀ =3,95	U _t =4,32	A _t =4,23
$R=(U_t-U_0) - (A_t-U_0)=U_t - A_t$	<u>R_{24h}=0,09</u>			

Tabela 35. Zestawienie wyników wartości bakteriobójczej (R) dla wszystkich próbek

Rodzaj próbki	Wartość R dla <i>S. aureus</i> (DSM 346)	Wartość R dla <i>E. coli</i> (DSM 1576)
Płytki z 1% zawartością betuliny	0,08	0,07
Płytki z 5% zawartością betuliny	0,48	0,02
Płytki z 10% zawartością betuliny	0,48	0,09

Materiał z domieszką nanokrzemionki przebadano względem szczepu *E. coli* – ATCC 25922. Wyniki zaprezentowano w tabeli 36.

Tabela 36. Wyniki otrzymane dla próbek z domieszką nanokrzemionki względem szczepu *E. coli* (DSM 1576) w temperaturze 35 +/- 1°C wraz z obliczoną wartością parametru R. Średnia liczba żywych komórek bakterii 6×10^5 jtk/cm² w inokulum testowym.

Parametr	Próbka referencyjna bezpośrednio po inokulacji	Próbka badana bezpośrednio po inokulacji	Próbka referencyjna po 24 godzinach inkubacji	Próbka badana po 24 godzinach inkubacji
Logarytm dziesiętny liczby żywych komórek bakterii	U ₀ =4,22	A ₀ =4,22	U _t =4,91	A _t =3,34
$R=(U_t-U_0) - (A_t-U_0)=U_t - A_t$	<u>R_{24h}=1,57</u>			

W późniejszym etapie pracy wykonano również badanie względem szczepu *S.Aureus*. Wartość parametru R wyniosła **R_{24h}=1,1**.

Płytki z nanosrebrem badano zarówno względem szczepu *S. aureus* – ATCC 25923 jak i *E. coli* – ATCC 25922. Wyniki przedstawiono w tabeli 37 i 38.

Tabela 37. Wyniki otrzymane dla próbek z domieszką nanosrebra względem szczepu *S. aureus*– ATCC 25923 w temperaturze 35 +/- 1°C wraz z obliczoną wartością parametru R. Średnia liczba żywych komórek bakterii 6×10^5 jtk/cm² w inokulum testowym.

Parametr	Próbka referencyjna bezpośrednio po inokulacji	Próbka badana bezpośrednio po inokulacji	Próbka referencyjna po 24 godzinach inkubacji	Próbka badana po 24 godzinach inkubacji
Logarytm dziesiętny liczby żywych komórek bakterii	U ₀ =4,19	A ₀ =4,19	U _t =4,85	A _t =4,04
$R=(U_t-U_0) - (A_t-U_0)=U_t - A_t$	<u>R_{24h}=0,81</u>			

Tabela 38. Wyniki otrzymane dla próbek z domieszką nanosrebra względem szczepu *E. coli* – ATCC 25922 w temperaturze 35 +/- 1°C wraz z obliczoną wartością parametru R. Średnia liczba żywych komórek bakterii 6×10^5 jtk/cm² w inokulum testowym.

Parametr	Próbka referencyjna bezpośrednio po inokulacji	Próbka badana bezpośrednio po inokulacji	Próbka referencyjna po 24 godzinach inkubacji	Próbka badana po 24 godzinach inkubacji
Logarytm dziesiętny liczby żywych komórek bakterii	$U_0=4,44$	$A_0=4,44$	$U_t=5,58$	$A_t=4,82$
$R=(U_t-U_0) - (A_t-U_0)=U_t - A_t$	<u>$R_{24h}=0,76$</u>			

W tabeli 39 przedstawiono ocenę działania antybakteryjnego (parametr R) według normy ISO 22196:2007 [158].

Tabela 39. Ocena działania antybakteryjnego (parametr R) zgodnie z normą ISO 22196:2007

Wartość parametru R	% zabitych bakterii	Ocena
< 1,5	<96,8	Słabo
1,5 – 2,0	96,8-99,0	Dopuszczalnie
2,0 – 3,0	>99,0-99,9	Dobrze
> 3,0	>99,9	Doskonale

Na podstawie przeprowadzonych testów można stwierdzić, że badane próbki wykazują aktywność przeciwbakteryjną wobec szczepów *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*. Wartość R dla próbek z betuliną i nanosrebrem jest mniejsza niż 1 (1 log). W przypadku nanokrzemionki dla badanego szczepu *Escherichia coli* wartość ta jest większa od 1,5 (1,5 log), co jest najlepszym z uzyskanych wyników. Stopień właściwości hamujących wzrost analizowanych szczepów bakteryjnych jest ograniczony i niejednorodny. Można zatem rozpoznać tylko i wyłącznie działanie bakteriostatyczne dla badanych próbek. Zauważono również, że aktywność bakteriostatyczna polimerów domieszkowanych betuliną jest wyższa dla szczepów referencyjnych *S. aureus* niż dla *E. coli*. Ponadto dla próbek z betuliną wykazana aktywność przeciwbakteryjna nie zwiększa się wraz ze wzrostem stężenia betuliny z 5 do 10%.

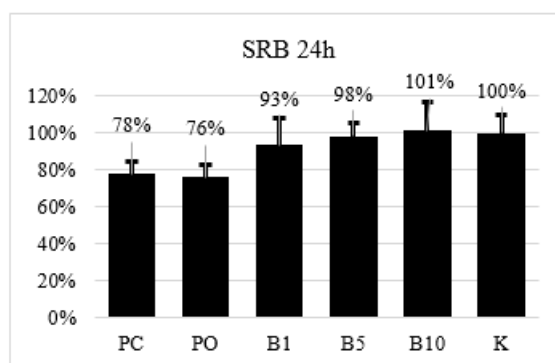
Przeprowadzone badania pozwalają wstępnie stwierdzić, że wytypowane materiały mogą być poddane dalszej analizie – w bardziej rozszerzonych badaniach celem zastosowania w konstruowaniu implantów lub w przypadku, kiedy wyniki takich badań będą niezadowolające to do wykorzystania materiału na urządzenia medyczne, będące w bezpośrednim kontakcie z pacjentem, jak np. endoskopy. Niezwykle cenne jest spostrzeżenie, że analizowane materiały nie tylko hamują wzrost mikroflory bakteryjnej, ale w dłuższym kontakcie nie zaobserwowano na ich powierzchni wytwarzania biofilmu. Ta cecha z medycznego punktu widzenia jest najistotniejsza.

Oczywiście jak wspomniano wyżej, przeprowadzone badania własne mają wartość analiz wstępnych. Dalej idące wnioski można by wysnuć w oparciu o testy na szczepach wyizolowanych bezpośrednio od pacjentów (nie referencyjnych) oraz ostatecznie o badania *in vivo*. Dopiero taki panel analiz mógłby mieć znaczenie kliniczne.

Niemniej, uwzględniając fakt, że badania takie musiałyby trwać wiele lat, wymagałyby szeregu zezwoleń Komisji Etycznych i Bioetycznych, zakres prezentowanych w niniejszej dysertacji badań ograniczono na kompozytach potencjalnie służących do produkcji implantów, a aspekt biomedyczny postanowiono ograniczyć do rutynowych badań wstępnych. Badania te postanowiono rzetelniej zaprojektować i wykonać w dalszej przyszłości.

5.10 Wyniki oceny cytotoksyczności

Na rysunku 78 przedstawiono otrzymane wyniki.



Rysunek 78. Wykres przedstawiający żywotność komórek określony jako procent żywych komórek w odniesieniu do kontroli (K) w poszczególnych grupach badanych. Legenda: B1 - komórki traktowane eluatem płytki polimerowej z poliolem domieszkowanej betulina w stężeniu 1%, B5 - komórki traktowane eluatem płytki polimerowej z poliolem domieszkowanej betulina w stężeniu 5%, B10 - komórki traktowane eluatem płytki polimerowej z poliolem domieszkowanej betulina w stężeniu 10%, PC - komórki traktowane eluatem płytki polimerowej bez betuliny i poliolem, PO - komórki traktowane eluatem płytki polimerowej bez betuliny z poliolem.

W przeprowadzonych badaniach żywotność komórek przedstawiona została jako procent żywych komórek w poszczególnych grupach badanych w odniesieniu do komórek kontrolnych (K). Zgodnie z wytycznymi żywotność powyżej 70% świadczy o braku działania cytotoksycznego. Testy wykazały, że betulina domieszkowana w stężeniach 1, 5 i 10% nie wykazuje działania cytotoksycznego względem mysich fibroblastów linii L-929. Zauważono, że im wyższe stężenie betuliny tym mniejsza cytotoksyczność. Najlepszy wynik osiągnięto dla materiału z betulina w stężeniu 10%, jednakże już 1% dodatek wystarcza, aby znacząco poprawić żywotność komórek.

Po przeanalizowaniu badań stwierdzono, że uzyskane wyniki wskazują na potencjalną aktywność przeciwwzapalną betuliny.

VI. Omówienie wyników badań

Założeniem zaprezentowanej tu pracy było wykonanie nowych materiałów domieszkowanych betulina, nanosrebrem i nanokrzemionką, a także weryfikacja, czy mogą one znaleźć zastosowanie w branży medycznej. Po przeanalizowaniu wyników badań i zestawieniu ich z dostępnymi danymi literaturowymi stwierdzono potencjalną przydatność badanych materiałów w założonym aspekcie. Jednakże bazując na informacjach, które zostały opublikowane w ciągu ostatnich kilkunastu lat nie sposób odrzucić konieczności przeprowadzenia dalszych badań, między innymi ze względu na możliwość migracji toksycznego BPA. W celu potwierdzenia możliwości zastosowania materiałów do konstrukcji rusztowania tkankowego trzeba uwzględnić w dalszych eksperymentach zminimalizowane lub całkowite zniwelowanie tego problemu. Ponadto, uwzględniając aspekty fizjologiczne, konieczne jest przede wszystkim przeprowadzenie badań *in vivo* w wytypowanych organizmach żywych. Tego typu obserwacje, dostarczyłyby większej ilości danych, uwzględniłyby również holistyczny pogląd na temat sensowności tych badań. Dopiero w przypadku osiągnięcia sukcesu w tym etapie, ostatecznie mogłyby być przeprowadzone badania kliniczne. Dodatkowo, dla wszystkich wykonanych materiałów, przed zastosowaniem materiałów do konstruowania implantów chrzęstnych lub kostnych, konieczne byłoby również wykonanie analizy DSC, potwierdzającej jednoznacznie brak degradacji termicznej.

Przeprowadzone badania własne przedstawione w rozdziale V dotyczące poliwęglanu domieszkowanego betulina wykazały, że betulina otrzymana na drodze ekstrakcji zawiera również w swoim składzie kwas betulinowy (rozdział V punkt 5.5). W tym przypadku, jest to korzystne, ze względu na właściwości samego kwasu betulinowego, o których wspomniano w przeglądzie literaturowym. Wytworzony materiał może być wykorzystywany w technologii przyrostowej FDM jako filament, co wykazano w rozdziale V w punkcie 5.6 oraz 5.7. Badanie właściwości przeciwdrobnoustrojowych przedstawione w rozdziale V w punkcie 5.9 plasuje ten materiał na trzecim miejscu spośród badanych, mimo to, uzyskane wyniki nie stanowią przeciwwskazania do dalszych badań. W przypadku materiału domieszkowanego betulina przeprowadzono również niezwykle istotną ocenę cytotoksyczności (rozdział V, punkt 5.10). Zaobserwowano, że najlepszymi właściwościami charakteryzuje się materiał z domieszką betuliny w stężeniu 10% podobnie jak miało to miejsce w badaniu aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

Podsumowując, otrzymane wyniki wraz z dostępnymi danymi literaturowymi sugerują, że przeprowadzone badania nie są wystarczające, aby jednoznacznie stwierdzić możliwość wykorzystania tego typu materiału na rusztowania tkankowe. Konieczne jest przeprowadzenie dalszych testów, w tym badań *in vitro* oraz *in vivo* według stosownych norm – przede wszystkim w oparciu o normę PN EN ISO 10993. Badania te musiałyby również uwzględnić reakcje systemu immunologicznego na opracowane materiały polimerowe. Do badań tych ze względu na uzyskane wcześniej wyniki, pod uwagę brany byłaby już tylko materiał domieszkowany z betulina w stężeniu 10%.

Badania własne przedstawione w rozdziale V wykazały, że poliwęglan domieszkowany nanokrzemionką, podobnie jak poliwęglan domieszkowany betulina, może być przetwarzany z zastosowaniem technologii przyrostowej FDM. Charakteryzuje się on dobrymi parametrami wytrzymałościowymi – najwyższą spośród uzyskanych twardością – średnia wartość wyniosła 14,2 HV oraz modułem Younga na poziomie 248 MPa. Nanokrzemionka, w przeciwieństwie do nanosrebra, nie tworzy aglomeratów niskoenergetycznych, co miało odzwierciedlenie w badaniach aktywności przeciwdrobnoustrojowej przedstawionych w rozdziale V w punkcie 5.9. Wytworzony materiał charakteryzuje się parametrem R większym od 1,5 (1,5 log) dla *E.coli*, co jest najlepszym uzyskanym wynikiem spośród badanych materiałów. Zgodnie z normą ISO 22196:2007 zabija ponad 96,8% bakterii i jego działanie jest oceniane jako „dopuszczalne”. Zauważono również, że materiał ten może wykorzystywany w druku 3D, bez pogorszenia czy zmiany jego właściwości, co potwierdziły badania spektrofluorometryczne oraz badania FT-IR opisane w rozdziale V punkcie 5.6 oraz 5.7. Na widmach FT-IR próbek, przed i po ekspozycji na wysoką temperaturę, nie pojawiły się nowe pasma absorpcji, które wskazywałyby na rozpad związków wielkocząsteczkowych. Można zatem pośrednio wnioskować, że próbki te są stabilne termicznie w zadanych warunkach temperaturowych.

Po przanalizowaniu wykonanych badań oraz danych literaturowych, podobnie jak w przypadku materiału domieszkowanego betulina, wskazane jednak byłyby dalsze badania, aby potwierdzić możliwość jego zastosowania do konstrukcji rusztowań.

Wyniki badań przedstawione w rozdziale V dotyczące poliwęglanu domieszkowanego nanosrebrem wykazały, że spełnia on podstawowe założenia pracy i nie ma znaczących przeciwwskazań do prowadzenia dalszych badań z jego wykorzystaniem. Przede wszystkim jest to materiał charakteryzujący się dobrymi parametrami wytrzymałościowymi – średnia wartość

twardości wynosi 13,8 HV a moduł Younga 312 MPa. Dodatkowo sam proces tworzenia kompozytu nie wpływa na jego stabilność termiczną, co zostało pośrednio potwierdzone w badaniach spektrofluorometrycznych i FT-IR przedstawionych w rozdziale V w punkcie 5.6 i 5.7. Co istotne, materiał ten może być wykorzystywany w technologii przyrostowej FDM jako filament i przy zastosowaniu reżimu temperaturowego nie przekraczającego 285°C na głowicy drukującej, nie traci swoich właściwości przeciwdrobnoustrojowych, co przedstawiono w badaniach w rozdziale V w punkcie 5.9. Na podstawie badań przedstawionych w tym rozdziale stwierdzono także, że materiał ten wykazuje słabsze właściwości przeciwdrobnoustrojowe niż poliwęglan domieszkowany nanokrzemionką oraz betuliną. Po analizie można przypuszczać, że ma to związek z powstaniem aglomeratów niskoenergetycznych, które przyczyniają się do słabszej aktywności przeciwdrobnoustrojowej niż wynikałoby to z przeglądu literaturowego.

Biorąc to wszystko pod uwagę w celu zastosowania wykonanego materiału w branży medycznej, a w szczególności na rusztowania tkankowe, należałoby przeprowadzić dalsze badania uwzględniające znalezienie sposobu poprawiającego rozłożenie nanosrebra w osnowie polimerowej. Dodatkowo wykorzystanie tak przygotowanego materiału wiązałoby się także z wykonaniem testów *in vitro* oraz *in vivo* zgodnie z obowiązującymi normami – przede wszystkim z normą PN EN ISO 10993.

VII. Wnioski

W pracy przedstawiono cztery hipotezy badawcze, które starano się zweryfikować w trakcie prowadzenia badań, jak i później, po analizie otrzymanych wyników i na bazie dostępnego przeglądu literaturowego. Poniżej zamieszczono hipotezy wraz z opracowanymi wnioskami.

Hipoteza 1

Wykorzystanie betuliny jako modyfikatora w materiałach polimerowych, w szczególności w poliwęglanach, poprawi właściwości przeciwdrobnoustrojowe materiału.

Wnioski:

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że oddziaływanie betuliny jak i kwasu betulinowego (ze względu na brak separacji składników po ekstrakcji ciągłej Soxleta) na badane szczepy bakterii wykazuje średnie działanie przeciwdrobnoustrojowe. Parametr R kształtuje się na poziomie od 0,02 do 0,48 w zależności od zastosowanego szczepu. Specyficzny układ chiralny betuliny jako triterpenu, ze względu na układ przestrzenny powoduje oddziaływanie antybakteryjne, jednakże nie jest ono tak duże, jak wstępnie zakładano.

Podsumowując, postawiona hipoteza była trafna - dodatek betuliny wpływa na poprawę właściwości przeciwdrobnoustrojowych.

Hipoteza 2:

Poliwęglan domieszkowany betuliną nie będzie wykazywał działania cytotoksycznego względem mysich fibroblastów.

Wnioski:

Po przeprowadzonych badaniach zgodnie z normą ISO 10993-5:2009 [169] nie wykazano działania cytotoksycznego względem mysich fibroblastów linii L-929. Stwierdzono, że zarówno płytka polimerowa jak i płytka polimerowa z czynnikiem chelatującym wykazują pewną aktywność biologiczną, która wpływa na żywotność komórek – zmniejszając ich liczebność. W przypadku płytek z domieszką betulinową zaobserwowano, że żywotność komórek kształtuje się na zdecydowanie wyższym poziomie. Najlepsze wyniki uzyskano dla płytek z betuliną o stężeniu 10%.

Reasumując, hipoteza została potwierdzona – nie stwierdzono działania cytotoksycznego względem badanej linii komórkowej.

Hipoteza 3:

Zastosowanie nanokrzemionki oraz nanosrebra jako dodatku, pozwoli na otrzymanie materiału o poprawionych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych.

Wnioski:

Przeprowadzone badania przedstawione w rozdziale V punkcie 5.9 potwierdziły, że podobnie jak w przypadku betuliny, nanokrzemionka jako domieszka oddziałuje ze ścianą/błoną komórkową bakterii. Parametr R wynosił 0,81 względem szczepu *S. aureus* i 1,57 dla bakterii *E. coli*. Jest to najlepszy rezultat uzyskany spośród wszystkich badanych materiałów. W przypadku nanosrebra uzyskane wyniki oscylowały na niższym poziomie niż zakładano $R < 1,5$. Pogłębiona analiza otrzymanego materiału wykazała, że doszło do częściowej aglomeryzacji domieszki, co może być przyczyną uzyskania gorszych właściwości przeciwdrobnoustrojowych. Na podstawie otrzymanych wyników wstępnie założono, iż nanosrebro nie jest w pełni wychwytywane przez poliol – wyłapywanie następuje tylko przez ramiona a nie przez cykl makrocząsteczki, co sprawia, że proces chelatowania jest niepełny. W materiale mogą się więc tworzyć niskoenergetyczne aglomeraty. W celu ich zlikwidowania rozważano zakwaszenie materiału w celu uzyskania bardziej jonowego charakteru mieszaniny. Pomysł ten po analizie został jednak odrzucony, ponieważ zakwaszenie mogłoby spowodować uszkodzenie struktury.

Zarówno w przypadku materiału z domieszką nanokrzemionki jak i nanosrebra zauważono poprawę właściwości przeciwdrobnoustrojowych, potwierdzającym tym samym postawioną hipotezę.

Hipoteza 4:

Zastosowanie metod takich jak chromatografia gazowa, chromatografia wykluczenia oraz analiz spektralnych wspomaganych metodami mikrobiologicznymi i analizą właściwości mechanicznych, pozwoli na wstępną ocenę materiałów pod kątem ich potencjalnego wykorzystania na rusztowania tkankowe.

Wnioski:

Przeprowadzone badania opisane w rozdziale V pozwoliły na wstępną ocenę przydatności wykonanych materiałów do zastosowań w branży medycznej, między innymi na implanty tkanek podporowych. Analiza wyników otrzymanych z wykorzystaniem chromatografii wykluczenia (rozdział V, punkt 5.5) wykazała, że nie zarejestrowano kolejnych pików przy dłuższych czasach retencji jak i pojawienia się krótkich łańcuchów polimerowych, co wstępnie może świadczyć o braku rozpadu termicznego a tym samym braku degradacji. Do uzyskania stuprocentowej pewności odnośnie braku degradacji termicznej, należałoby jednak wykonać badanie DSC. Wyniki uzyskane podczas badania chromatografii gazowej (rozdział V, punkt 5.4) wykazały brak pochodnych wielopierścieniowych węglodorów aromatycznych (WWA). Wskazuje to na brak uwalniania toksycznych lotnych związków organicznych (LZO) do fazy nadpowierzchniowej. W badaniach fluorymetrycznych (rozdział V, punkt 5.7) również nie zarejestrowano pojawienia się kolejnego sygnału, co mogłoby wskazywać na rozpad istniejących struktur. Nie zauważono także zmiany w przesunięcia Stokesa – jest ono stałe we wszystkich wartościach, co świadczy o tym, że nie pojawiają się nowe grupy funkcyjne, które miałyby niższe przejścia energetyczne. Wykonane materiały charakteryzują się również odpowiednimi dla implantów właściwościami mechanicznymi (rozdział V, punkty 5.1-5.3), wyższe wartości modułu Younga nie wykluczają możliwości dalszego ich badania pod kątem zastosowania na rusztowania tkankowe. Ze względu na obecność BPA w materiale bazowym, należy również przeprowadzić badania mające na celu sprawdzenie ewentualnej migracji tego składnika do organizmu ludzkiego i jego skutków ubocznych.

VIII. Podsumowanie

Głównym celem pracy była charakterystyka wykonanych materiałów bazujących na poliwęglanie z różnymi domieszkami, pod kątem możliwości zastosowania ich w branży medycznej, potencjalnie na rusztowania tkankowe. Do przygotowania próbek wykorzystano technologię przyrostową, co miało duży wpływ na analizę i interpretację otrzymanych wyników. Ze względu na ich warstwową budowę w pracy nie odnoszono się do danych literaturowych powiązanych z właściwościami mechanicznymi. W przypadku druku FDM, otrzymany materiał ma tendencję do wykazywania różnic w właściwościach mechanicznych w zależności od kierunku drukowania – charakteryzuje się anizotropią właściwości. Nie miało to wpływu na pozostałe badania: chromatograficzne, spektralne i mikrobiologiczne.

W przedstawionej rozprawie wykazano, że wykonane materiały, mogą być wstępnie uwzględnione w konstruowaniu rusztowań tkankowych, zakładając jednak wykonanie dalszych badań jednoznacznie wykazujących możliwość ich zastosowania na wspomniane rusztowania. W celu uzyskania pełnej informacji o ich przydatności, należy przeprowadzić badania interdyscyplinarne, włącznie z badaniami *in vivo* zgodnie z normą PN EN ISO 10993 oraz jak wspomniano wcześniej, wykonać badania związane z możliwością migracji BPA.

IX. Bibliografia

- [1] *Clinical Applications of Biomaterials. NIH Consens Statement 1982 Nov 1-3; 4(5):1-19.* 2016.
- [2] E. Stodolak-Zych, *Biomateriały, Nazewnictwo i definicje dotyczące problematyki biomateriałów.* Warszawa: Akademicka Oficyna Wydawnicza, 2016.
- [3] W. He and R. Benson, "Polymeric Biomaterials," *Handb. Polym. Appl. Med. Med. Devices*, pp. 55–76, Jan. 2014, doi: 10.1016/B978-0-323-22805-3.00004-9.
- [4] B. D. Ratner and S. J. Bryant, *Biomaterials: Where We Have Been and Where We Are Going*, vol. 6, no. 1. Warszawa, 2004.
- [5] I. Kulinets, *Biomaterials and their applications in medicine.* Woodhead Publishing Limited, 2014.
- [6] CAC Zavaglia and M. P. da Silva, "Feature Article: Biomaterials," *Ref. Modul. Mater. Sci. Mater. Eng. Elsevier*, 2016, doi: 10.1016/B978-0-12-803581-8.04109-6.
- [7] W. Cao and L. L. Hench, "Bioactive materials," *Ceram. Int.*, vol. 22, no. 6, pp. 493–507, 1996, doi: 10.1016/0272-8842(95)00126-3.
- [8] L. L. Hench, "Bioceramics: From Concept to Clinic," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 74, no. 7, pp. 1487–1510, 1991, doi: 10.1111/j.1151-2916.1991.tb07132.x.
- [9] S. M. Best, A. E. Porter, E. S. Thian, and J. Huang, "Bioceramics: Past, present and for the future," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 28, no. 7, pp. 1319–1327, 2008, doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2007.12.001.
- [10] G. U. Y. Daculsi, O. Laboux, O. Malard, and P. Weiss, "Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics," *J Mater Sci Mater Med*, vol. 14, no. 3, pp. 195–200, 2003.
- [11] D. Campoccia, L. Montanaro, and C. R. Arciola, "The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance," *Biomaterials*, vol. 27, no. 11, pp. 2331–2339, 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.11.044.

- [12] L. L. Hench and J. M. Polak, *Third-generation biomedical materials*, vol. 295, no. 5557. Warszawa, 2002.
- [13] S. Bhat and A. Kumar, “Biomaterials and bioengineering tomorrow’s healthcare,” *Biomatter*, vol. 3, no. 3, 2013, doi: 10.4161/biom.24717.
- [14] C. X. F. L. K. C. T. and T. C. L. Dietmar Werner Hutmacher, Jan Thorsten Schantz, “State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from abiomaterials perspective,” *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 1, no. 4, pp. 245–260, 2007, doi: 10.1002/term.
- [15] P. D. Dalton and T. Woodfi, “Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering,” *Bone*, vol. 32, no. 3, pp. 2004–2005, 2008, doi: 10.1002/jbm.a.31829.ELECTROSPINNING.
- [16] Z. Bakula, R. Stachowiak, J. Wiśniewski, L. Granicka, and J. Bielecki, “Immobilizacja komórek - Znaczenie biomedyczne,” *Postep. Mikrobiol.*, vol. 52, no. 3, pp. 233–245, 2013.
- [17] D. D. Hunter, N. Cashman, J. F. Sanes, R. Morris-valero, P. Adams, and W. Bullock, “An LRE (Leucine-Arginine-Glutamate) -dependent Adhesion of Neurons to S-laminin Mechanism,” *J. Neurosci.*, vol. 11, no. 12, pp. 3960–3971, 1991.
- [18] T. Y. Wang, K. F. Bruggeman, J. A. Kauhausen, A. L. Rodriguez, D. R. Nisbet, and C. L. Parish, “Functionalized composite scaffolds improve the engraftment of transplanted dopaminergic progenitors in a mouse model of Parkinson’s disease,” *Biomaterials*, vol. 74, pp. 89–98, 2016, doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.09.039.
- [19] M. J. Mahoney and W. M. Saltzman, *Transplantation of brain cells assembled around a programmable synthetic microenvironment*, vol. 19, no. 10. 2001.
- [20] N. Patel *et al.*, “Spatially controlled cell engineering on biodegradable polymer surfaces,” *FASEB J.*, vol. 12, no. 14, pp. 1447–1454, 1998, doi: 10.1096/fasebj.12.14.1447.
- [21] International Organization for Standardization, *Biologiczna ocena wyrobów medycznych - Część 1: Ocena i badanie w procesie zarządzania ryzykiem*. 2016.
- [22] A. Swinarew and J. Paluch, *Zastosowanie Biomateriałów Polimerowych w Inżynierii*

Biomedycznej. Kraków: Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów, 2018.

- [23] “PN – EN ISO 10993-9: 2010 Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 9: Ramowy plan identyfikacji i oznaczania ilościowego potencjalnych produktów degradacji.”
- [24] E. Stodolak-Zych, *Badanie procesów degradacji biomateriałów implantacyjnych*. Warszawa: Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, 2016.
- [25] “EN ISO 7405:2018 Stomatologia – Ocena biozgodności wyrobów medycznych używanych w stomatologii.”
- [26] “EN ISO 11979-5:2006 Implanty oftalmiczne – Soczewki wszczepialne – Część 5: Biokompatybilność.”
- [27] E. Miret, E. M. De Groene, and W. Klaffke, “Comparison of In Vitro Assays of Cellular Toxicity in the Human Hepatic Cell Line HepG2,” *J Biomol Screen*, vol. 11, no. 2, pp. 184–193, 2006.
- [28] T. Nakamura *et al.*, “Biodegradation and tumorigenicity of implanted plates made from a copolymer of epsilon-caprolactone and L-lactide in rat.,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 42, no. 4, pp. 475–484, 1998.
- [29] R. R. Tice *et al.*, “Single cell gel/comet assay: Guideline for in vitro and in vivo genetic toxicology testing,” *Environ. Mol. Mutagen*, vol. 35, pp. 206–221, 2000.
- [30] H. Czeczot and I. Rahden-Staroń, “Wybrane krótkoterminowe testy bakteryjne i na organizmach eukariotycznych stosowane do oceny genotoksyczności środowiskowych zanieczyszczeń chemicznych,” *Rocz. PZH*, vol. 48, pp. 317–336, 1997.
- [31] *Norma PN-EN ISO 10993-3:2014-12: Biologiczna ocena wyrobów medycznych - Część 3: Badania genotoksyczności, rakotwórczości i toksyczności reprodukcyjnej.*
- [32] D. Graça *et al.*, “Toxicity screening of a novel poly(methylmethacrylate)-Eudragit nanocarrier on L929 fibroblasts,” *Toxicol. Lett.*, vol. 276, pp. 129–137, 2017.
- [33] S. Florjańczyk, Z.; Penczek, “Chemia polimerów: praca zbiorowa. T. 1, Makrocząsteczki i metody ich otrzymywania.” pp. 293–304, 1995.

- [34] A. Stolarzewicz, *Metody syntezy polimerów i ich charakterystyka*. Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego, 2004.
- [35] D. Sęk and A. Włochowicz, *Chemia polimerów i polimery biodegradowalne*. Bielsko-Biała: Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej filii w Bielsku-Białej, 1996.
- [36] W. Danikiewicz, *Chemia Organiczna*. Warszawa, 1992.
- [37] K. Matyjaszewski and T. Davis, *Handbook of radical polymerization*. Canada: Wiley Interscience, 2004.
- [38] M. Niemczewska-Wójcik, “Wear mechanisms and surface topography of artificial hip joint components at the subsequent stages of tribological tests,” *Meas. J. Int. Meas. Confed.*, 2017, doi: 10.1016/j.measurement.2017.04.045.
- [39] A. de Leon and R. C. Advincula, *Conducting Polymers with Superhydrophobic Effects as Anticorrosion Coating*. Elsevier Inc., 2014.
- [40] M. Szwarc, “Living polymers,” *Nature*, vol. 178, no. 1168–1169, 1956.
- [41] A. Stolarzewicz, “Żyjąca polimeryzacja jonowa.” pp. 679–684, 2002.
- [42] J. Qui, B. Charleux, and K. Matyjaszewski, “Progress in controlled/living polymerization in aqueous media,” *Entomological News*, vol. 46. pp. 453–460, 2001.
- [43] L. G. Griffith, “Polymeric biomaterials,” *Acta Mater.*, vol. 48, pp. 263–277, 2000, doi: 10.1007/978-0-387-84872-3_3.
- [44] D. Banoriya, R. Purohit, and R. K. Dwivedi, “Advanced Application of Polymer based Biomaterials,” *Mater. Today Proc.*, vol. 4, no. 2, pp. 3534–3541, 2017, doi: 10.1016/j.matpr.2017.02.244.
- [45] S. Ramakrishna, J. Mayer, E. Wintermantel, and K. W. Leong, “Biomedical applications of polymer-composite materials : a review,” vol. 61, 2001.
- [46] L. S. Nair and C. T. Laurencin, “Biodegradable polymers as biomaterials,” vol. 32, pp. 762–798, 2007, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017.
- [47] W. Geurtsen, “BIOCOMPATIBILITY OF RESIN-MODIFIED FILLING

- MATERIALS,” *Crit Rev Oral Biol Med*, vol. 11, pp. 333–355, 2000.
- [48] E. Pamuła and B. Mielan, “Polimery niedegradowalne,” in *Inżynieria Biomeyczna Podstawy i Zastosowania, Tom 4 Biomateriały*, Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, 2016, pp. 340–344.
- [49] J. Z. Liang, “Melt strength and drawability of HDPE, LDPE and HDPE/LDPE blends,” *Polym. Test.*, vol. 73, no. December 2018, pp. 433–438, 2019, doi: 10.1016/j.polymertesting.2018.12.007.
- [50] D. L. P. Macuvele *et al.*, “Advances in ultra high molecular weight polyethylene/hydroxyapatite composites for biomedical applications: A brief review,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 76, pp. 1248–1262, 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.02.070.
- [51] M. J. Martínez-Morlanes, A. Terriza, F. Yubero, and J. A. Puértolas, “Characterization of highly crosslinked polyethylenes by colorimetry,” *Polym. Test.*, vol. 31, no. 6, pp. 841–847, 2012, doi: 10.1016/j.polymertesting.2012.06.005.
- [52] D. L. P. Macuvele *et al.*, “Advances in ultra high molecular weight polyethylene/hydroxyapatite composites for biomedical applications: A brief review,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 76, pp. 1248–1262, 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.02.070.
- [53] R. Siskey, H. Smelt, K. Boon-Celan, and M. Persson, “UHMWPE Homocomposites and Fibres,” in *Biomaterials Handbook (Third Edition)*, Elsevier Inc., 2016, pp. 398–411.
- [54] M. Boutinguiza, F. Quintero, A. Riveiro, R. Soto, J. Val, and R. Comesa, “Texturing of polypropylene (PP) with nanosecond lasers,” vol. 374, pp. 379–386, 2016, doi: 10.1016/j.apsusc.2016.01.206.
- [55] C. Tsou *et al.*, “Rendering polypropylene biocomposites antibacterial through modification with oyster shell powder,” *Polymer (Guildf)*, vol. 160, no. September 2018, pp. 265–271, 2019, doi: 10.1016/j.polymer.2018.11.048.
- [56] “<http://www.tworzywa.pwr.wroc.pl/pl/dydaktyka/polipropylen>.” .
- [57] L. Wenfeng, C. Lu, and L. Shengtao, “Review of electrical properties for polypropylene based nanocomposite,” *Compos. Commun.*, vol. 10, pp. 221–225, 2018.

- [58] ["http://www.tworzywa.org/artykuly,78167,1,ABC_wiedzy_o_polichlorku_winyly_cz_yli_czego_jeszcze_nie_wiesz_o_PVC."](http://www.tworzywa.org/artykuly,78167,1,ABC_wiedzy_o_polichlorku_winyly_cz_yli_czego_jeszcze_nie_wiesz_o_PVC) .
- [59] Y. Zhang, F. Zhang, Z. Yang, H. Xue, and D. D. Dionysiou, "Development of a new efficient visible-light-driven photocatalyst from SnS₂ and polyvinyl chloride," *J. Catal.*, vol. 344, pp. 692–700, 2016, doi: 10.1016/j.jcat.2016.10.022.
- [60] Y. Guo, M. F. Ozaydin, D. Wang, and H. Liang, "Friction heating and effect on tribological properties of soft polyvinyl chloride sliding against steel," *Eur. Polym. J.*, vol. 106, no. May, pp. 85–91, 2018, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2018.07.013.
- [61] R. Singh and D. Pant, "Polyvinyl chloride degradation by hybrid (chemical and biological) modification," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 123, pp. 80–87, 2016, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2015.11.012.
- [62] H. Al Salloum, J. Saunier, A. Tfayli, and N. Yagoubi, "Studying DEHP migration in plasticized PVC used for blood bags by coupling Raman confocal microscopy to UV spectroscopy," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 61, pp. 56–62, 2016.
- [63] E. Paz, F. Forriol, J. C. del Real, and N. Dunne, "Graphene oxide versus graphene for optimisation of PMMA bone cement for orthopaedic applications," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 77, pp. 1003–1011, 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.03.269.
- [64] R. Sharma, A. K. Pandey, N. Sharma, D. Sasmal, and P. K. Barhai, "Diamond like carbon films as a protective surface on PMMA for biomedical applications," *Surf. Coatings Technol.*, vol. 205, no. 7, pp. 2495–2502, 2010, doi: 10.1016/j.surfcoat.2010.09.054.
- [65] Y. Wang, Y. Zhang, H. Song, Y. Wang, T. Deng, and X. Hou, "Zinc-catalyzed ester bond cleavage: Chemical degradation of polyethylene terephthalate," *J. Clean. Prod.*, vol. 208, pp. 1469–1475, 2019, doi: 10.1016/j.jclepro.2018.10.117.
- [66] A. M. Al-Sabagh, F. Z. Yehia, G. Eshaq, A. M. Rabie, and A. E. ElMetwally, "Greener routes for recycling of polyethylene terephthalate," *Egypt. J. Pet.*, vol. 25, no. 1, pp. 53–64, 2016, doi: 10.1016/j.ejpe.2015.03.001.

- [67] C. Liu, C. Shi, S. Zhu, R. Wei, and C.-C. Yin, “Structural and functional characterization of polyethylene terephthalate hydrolase from *Ideonella sakaiensis*,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 508, no. 1, pp. 289–294, 2018, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.11.148.
- [68] J. Wang *et al.*, “The biomedical properties of polyethylene terephthalate surface modified by silver ion implantation,” *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms*, vol. 257, no. 1-2 SPEC. ISS., pp. 141–145, 2007, doi: 10.1016/j.nimb.2006.12.137.
- [69] A. Hadjizadeh, A. Ajji, and M. N. Bureau, “Preparation and characterization of NaOH treated micro-fibrous polyethylene terephthalate nonwovens for biomedical application,” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 3, no. 8, pp. 574–583, 2010, doi: 10.1016/j.jmbbm.2010.07.002.
- [70] A. Solanki, M. Das, and S. Thakore, “A review on carbohydrate embedded polyurethanes: An emerging area in the scope of biomedical applications,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 181, no. August 2017, pp. 1003–1016, 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.11.049.
- [71] M. Savaris, C. S. C. Garcia, M. Roesch-Ely, J. A. P. Henriques, V. dos Santos, and R. N. Brandalise, “Polyurethane/poly(D,L-lactic acid) scaffolds based on supercritical fluid technology for biomedical applications: Studies with L929 cells,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 96, no. October 2018, pp. 539–551, 2019, doi: 10.1016/j.msec.2018.11.054.
- [72] I. Dulińska-Molak, M. Lekka, and K. J. Kurzydłowski, “Surface properties of polyurethane composites for biomedical applications,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 270, pp. 553–560, 2013, doi: 10.1016/j.apsusc.2013.01.085.
- [73] H. M. C. C. Somarathna, S. N. Raman, D. Mohotti, A. A. Mutalib, and K. H. Badri, “The use of polyurethane for structural and infrastructural engineering applications: A state-of-the-art review,” *Constr. Build. Mater.*, vol. 190, pp. 995–1014, 2018, doi: 10.1016/j.conbuildmat.2018.09.166.
- [74] M. Marzec, J. Kucińska-Lipka, I. Kalaszczyńska, and H. Janik, “Development of polyurethanes for bone repair,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 80, no. July, pp. 736–747, 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.07.047.

- [75] Y. Li, G. A. Thouas, and Q. Z. Chen, “Biodegradable soft elastomers: Synthesis/properties of materials and fabrication of scaffolds,” *RSC Adv.*, vol. 2, no. 22, pp. 8229–8242, 2012, doi: 10.1183/16000617.0084-2016.
- [76] J. Wu *et al.*, “Micro-porous polyetheretherketone implants decorated with BMP-2 via phosphorylated gelatin coating for enhancing cell adhesion and osteogenic differentiation,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 169, no. May, pp. 233–241, 2018, doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.05.027.
- [77] M. Thomas and N. J. Lee, “Interlocking polyetheretherketone implant,” *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 45, no. 8, pp. 969–970, 2016, doi: 10.1016/j.ijom.2016.01.019.
- [78] S. Najeeb, M. S. Zafar, Z. Khurshid, and F. Siddiqui, “Applications of polyetheretherketone (PEEK) in oral implantology and prosthodontics,” *J. Prosthodont. Res.*, vol. 60, no. 1, pp. 12–19, 2016, doi: 10.1016/j.jpor.2015.10.001.
- [79] L. Ouyang *et al.*, “Smart release of doxorubicin loaded on polyetheretherketone (PEEK) surface with 3D porous structure,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 163, pp. 175–183, 2018, doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.12.045.
- [80] X. Zhao, D. Xiong, and Y. Liu, “Improving surface wettability and lubrication of polyetheretherketone (PEEK) by combining with polyvinyl alcohol (PVA) hydrogel,” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 82, no. January, pp. 27–34, 2018, doi: 10.1016/j.jmbbm.2018.03.014.
- [81] S. Ebnesajjad, “Applications of Polytetrafluoroethylene and Fluoropolymers,” *Fluoroplastics*, vol. 1, pp. 461–478, 2015, doi: 10.1016/B978-1-4557-3199-2.00021-5.
- [82] S. Ebnesajjad, “17 - Surface Treatment of Fluoropolymers for Adhesion,” *Fluoroplastics (Second Ed.*, vol. 1, pp. 564–588, 2015, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4557-3197-8.00017-1>.
- [83] Y. Wu *et al.*, “The degradation behavior and mechanism of polytetrafluoroethylene under low energy proton irradiation,” *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms*, vol. 430, no. April, pp. 47–53, 2018, doi: 10.1016/j.nimb.2018.06.005.

- [84] S. Ebnesajjad, "Fabrication Techniques for Fluoropolymers," *Non-Melt Process. Fluoroplastics*, vol. 1, pp. 290–298, 2000, doi: 10.1016/B978-188420784-6.50019-7.
- [85] A. Rahimi and P. Shokrolahi, "Application of inorganic polymeric materials. I. Polysiloxanes," *Int. J. Inorg. Mater.*, vol. 3, no. 7, pp. 843–847, 2001, doi: 10.1016/S1466-6049(01)00162-3.
- [86] J. R. Choi, A. Nilghaz, L. Chen, K. C. Chou, and X. Lu, "Modification of thread-based microfluidic device with polysiloxanes for the development of a sensitive and selective immunoassay," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 260, pp. 1043–1051, 2018, doi: 10.1016/j.snb.2018.01.102.
- [87] F. V. Drozdov, G. V. Cherkaev, and A. M. Muzafarov, "The Suzuki modification of functional polydimethylsiloxanes," *Mendeleev Commun.*, vol. 27, no. 6, pp. 570–571, 2017, doi: 10.1016/j.mencom.2017.11.010.
- [88] Z. Qian, D. Ross, W. Jia, Q. Xing, and F. Zhao, "Bioactive polydimethylsiloxane surface for optimal human mesenchymal stem cell sheet culture," *Bioact. Mater.*, vol. 3, no. 2, pp. 167–173, 2018, doi: 10.1016/j.bioactmat.2018.01.005.
- [89] T. Töpper, B. Osmani, and B. Müller, "Polydimethylsiloxane films engineered for smart nanostructures," *Microelectron. Eng.*, vol. 194, pp. 1–7, 2018, doi: 10.1016/j.mee.2018.02.029.
- [90] Y. Wang and D. J. Darensbourg, "Carbon dioxide-based functional polycarbonates: Metal catalyzed copolymerization of CO₂ and epoxides," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 372, pp. 85–100, 2018, doi: 10.1016/j.ccr.2018.06.004.
- [91] J. H. Kamps, C. Scheffler, F. Simon, R. van der Heijden, and N. Verghese, "Functional polycarbonates for improved adhesion to carbon fibre," *Compos. Sci. Technol.*, vol. 167, no. August, pp. 448–455, 2018, doi: 10.1016/j.compscitech.2018.08.035.
- [92] J. M. Karp, P. D. Dalton, M. S. Shoichet, and F. Cahn, "Scaffolds for tissue engineering, clinical use of porous scaffolds for tissue engineering of skin," *MRS Bull.*, no. April, pp. 301–306, 2003.
- [93] S. Mahira, A. Jain, W. Khan, and A. J. Domb, *Antimicrobial Materials — An Overview*,

no. 5. 2019.

- [94] C. R. Allan and L. A. Hadwiger, “The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition,” *Exp. Mycol.*, vol. 3, no. 3, pp. 285–287, 1979, doi: 10.1016/S0147-5975(79)80054-7.
- [95] Y. C. Chung and C. Y. Chen, “Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan,” *Bioresour. Technol.*, vol. 99, no. 8, pp. 2806–2814, 2008, doi: 10.1016/j.biortech.2007.06.044.
- [96] A. Guarnieri *et al.*, “Antimicrobial properties of chitosan from different developmental stages of the bioconverter insect *Hermetia illucens*,” *Sci. Rep.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–12, 2022, doi: 10.1038/s41598-022-12150-3.
- [97] A. Anitha *et al.*, “Chitin and chitosan in selected biomedical applications,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 39, no. 9, pp. 1644–1667, 2014, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2014.02.008.
- [98] P. T. S. Kumar, S. Abhilash, K. Manzoor, S. V. Nair, H. Tamura, and R. Jayakumar, “Preparation and characterization of novel β -chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 80, no. 3, pp. 761–767, 2010, doi: 10.1016/j.carbpol.2009.12.024.
- [99] J. A. Tree *et al.*, “Unfractionated heparin inhibits live wild type SARS-CoV-2 cell infectivity at therapeutically relevant concentrations,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 178, no. 3, pp. 626–635, 2021, doi: 10.1111/bph.15304.
- [100] J. Warren and F. Graham, “The Effect Of Heparin On The Growth Of Bacteria And Yeasts,” *J Bacteriol*, vol. 60, no. 2, pp. 171–174, 1950.
- [101] Y. Lianga and K. L. Kiick, “Heparin-functionalized polymeric biomaterials in tissue engineering and drug delivery applications,” *Acta Biomater.*, vol. 10, no. 4, pp. 1588–1600, 2014.
- [102] S. C. Shukla, A. Singh, A. K. Pandey, and A. Mishra, “Review on production and medical applications of ϵ -polylysine,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 65, pp. 70–81, 2012, doi: 10.1016/j.bej.2012.04.001.
- [103] H. T. Naghadeh, Z. Sharifi, S. Soleimani, Z. P. M. Jamaat, and S. Ferdowsi, “Efficacy

- of ϵ -poly-L-lysine as an antibacterial additive for platelets stored at room temperature,” *Iran. J. Med. Sci.*, vol. 42, no. 5, pp. 509–511, 2017.
- [104] J. Hoque *et al.*, “Broad spectrum antibacterial and antifungal polymeric paint materials: Synthesis, structure-activity relationship, and membrane-active mode of action,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 7, no. 3, pp. 1804–1815, 2015, doi: 10.1021/am507482y.
- [105] A. Matejuk *et al.*, “Peptide-based antifungal therapies against emerging infections,” *Drugs Future*, vol. 35, no. 3, pp. 197–217, 2010, doi: 10.1358/dof.2010.035.03.1452077.
- [106] I. Khan, K. Saeed, and I. Khan, “Nanoparticles: Properties, applications and toxicities,” *Arab. J. Chem.*, vol. 12, no. 7, pp. 908–931, 2019, doi: 10.1016/j.arabjc.2017.05.011.
- [107] D. Luo, X. Wang, C. Burda, and J. P. Basilion, “Recent development of gold nanoparticles as contrast agents for cancer diagnosis,” *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 8, 2021, doi: 10.3390/cancers13081825.
- [108] J. Gallo, N. J. Long, and E. O. Aboagye, “Magnetic nanoparticles as contrast agents in the diagnosis and treatment of cancer,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 19, pp. 7816–7833, 2013, doi: 10.1039/c3cs60149h.
- [109] M. J. Mitchell, M. M. Billingsley, R. M. Haley, M. E. Wechsler, N. A. Peppas, and R. Langer, “Engineering precision nanoparticles for drug delivery,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 20, no. 2, pp. 101–124, 2021, doi: 10.1038/s41573-020-0090-8.
- [110] H. Kumar *et al.*, “Antioxidant functionalized nanoparticles: A combat against oxidative stress,” *Nanomaterials*, vol. 10, no. 7, pp. 1–31, 2020, doi: 10.3390/nano10071334.
- [111] N. Shirin, B. Behzad, and I. Rana, “Nanotechnology in gene therapy for musculoskeletal regeneration,” in *Nanoengineering in Musculoskeletal Regeneration*, 2020, pp. 105–136.
- [112] E. Sánchez-López *et al.*, “Metal-based nanoparticles as antimicrobial agents: An overview,” *Nanomaterials*, vol. 10, no. 2, pp. 1–39, 2020, doi: 10.3390/nano10020292.
- [113] S. Sharmin, M. M. Rahaman, C. Sarkar, O. Atolani, M. T. Islam, and O. S. Adeyemi, “Nanoparticles as antimicrobial and antiviral agents: A literature-based perspective

- study,” *Heliyon*, vol. 7, no. 3, p. e06456, 2021, doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e06456.
- [114] L. Wang, C. Hu, and L. Shao, “The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 12, pp. 1227–1249, 2017, doi: 10.2147/IJN.S121956.
- [115] H. Palza, “Antimicrobial polymers with metal nanoparticles,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 1, pp. 2099–2116, 2015, doi: 10.3390/ijms16012099.
- [116] E. E. Totu, A. C. Nechifor, G. Nechifor, H. Y. Aboul-Enein, and C. M. Cristache, *Poly(methyl methacrylate) with TiO₂ nanoparticles inclusion for stereolithographic complete denture manufacturing – the future in dental care for elderly edentulous patients?*, vol. 59. Elsevier Ltd, 2017.
- [117] Z. Chen and Y. Sun, “N-halamine-based antimicrobial additives for polymers: Preparation, characterization, and antimicrobial activity,” *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 45, no. 8, pp. 2634–2640, 2006, doi: 10.1021/ie060088a.
- [118] C. Danciu *et al.*, “Betulin silver nanoparticles qualify as efficient antimelanoma agents in in vitro and in vivo studies,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 134, no. November 2018, pp. 1–19, 2019, doi: 10.1016/j.ejpb.2018.11.006.
- [119] S. C. Jonnalagadda, P. Suman, D. C. Morgan, and J. N. Seay, *Recent Developments on the Synthesis and Applications of Betulin and Betulinic Acid Derivatives as Therapeutic Agents*, 1st ed., vol. 53. Elsevier B.V., 2017.
- [120] X. Chen and H. J. Schluesener, “Nanosilver: A nanoproduct in medical application,” *Toxicol. Lett.*, vol. 176, no. 1, pp. 1–12, 2008, doi: 10.1016/j.toxlet.2007.10.004.
- [121] D. Gardini *et al.*, “Nanosilver: An innovative paradigm to promote its safe and active use,” *NanoImpact*, vol. 11, no. January, pp. 128–135, 2018, doi: 10.1016/j.impact.2018.06.003.
- [122] G. A. Sotiriou *et al.*, “Nanosilver on nanostructured silica: Antibacterial activity and Ag surface area,” *Chem. Eng. J.*, vol. 170, no. 2–3, pp. 547–554, 2011, doi: 10.1016/j.cej.2011.01.099.
- [123] Y. H. Hsin, C. F. Chen, S. Huang, T. S. Shih, P. S. Lai, and P. J. Chueh, “The apoptotic

- effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells,” *Toxicol. Lett.*, vol. 179, no. 3, pp. 130–139, 2008, doi: 10.1016/j.toxlet.2008.04.015.
- [124] R. Foldbjerg, P. Olesen, M. Hougaard, D. A. Dang, H. J. Hoffmann, and H. Autrup, “PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes,” *Toxicol. Lett.*, vol. 190, no. 2, pp. 156–162, 2009, doi: 10.1016/j.toxlet.2009.07.009.
- [125] S. M. Hussain, K. L. Hess, J. M. Gearhart, K. T. Geiss, and J. J. Schlager, “In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells,” *Toxicol. Vitro.*, vol. 19, no. 7, pp. 975–983, 2005, doi: 10.1016/j.tiv.2005.06.034.
- [126] L. Braydich-Stolle, S. Hussain, J. J. Schlager, and M. C. Hofmann, “In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells,” *Toxicol. Sci.*, vol. 88, no. 2, pp. 412–419, 2005, doi: 10.1093/toxsci/kfi256.
- [127] P. V Asharani, K. L. G. Mun, M. P. Hande, and S. Valiyaveetil, “Cytotoxicity and genotoxicity of silver in human cells,” *ACS Nano*, vol. 3, no. 2, pp. 279–290, 2009.
- [128] L. Guo, W. Yuan, Z. Lu, and C. M. Li, “Polymer/nanosilver composite coatings for antibacterial applications,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 439, pp. 69–83, 2013, doi: 10.1016/j.colsurfa.2012.12.029.
- [129] F. T. and W. A., “Nanosilver and global public health: International regulatory issues,” *Nanomedicine*, vol. 5, no. 4, pp. 617–632, 2010.
- [130] M. K. Bin Bakri, E. Jayamani, M. R. Rahman, and A. Kakar, *Improvement of epoxy nanocomposites on physical, morphology, and mechanical properties as well as fracture behavior with the addition of mesoporous silica/nano-silica*. Elsevier Ltd., 2018.
- [131] D. Napierska, L. C. J. Thomassen, D. Lison, J. A. Martens, and P. H. Hoet, “The nanosilica hazard: Another variable entity,” *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 7, pp. 1–32, 2010, doi: 10.1186/1743-8977-7-39.
- [132] G. Therapy, V. Vijayanathan, T. Thomas, and T. J. Thomas, “Current Topics DNA Nanoparticles and Development of DNA Delivery Vehicles for,” *Society*, vol. 41, no.

- 48, pp. 14085–14094, 2002.
- [133] I. I. Slowing, J. L. Vivero-Escoto, C. W. Wu, and V. S. Y. Lin, “Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, no. 11, pp. 1278–1288, 2008, doi: 10.1016/j.addr.2008.03.012.
- [134] M. N. V Ravi Kumar *et al.*, “Cationic silica nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency in vitro and in vivo.,” *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 4, no. 7, pp. 876–81, 2004, doi: 10.1166/jnn.2004.120.
- [135] J. Niu *et al.*, “Preparation and characterization of nanosilica copper (II) complexes of amino acids,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 358, no. 2, pp. 207–215, 2018, doi: 10.1016/j.jhazmat.2018.06.067.
- [136] J. Compston, “Bone histomorphometry,” in *Methods in Bone Biology*, 1998, pp. 177–197.
- [137] X. Lin, S. Patil, Y. G. Gao, and A. Qian, “The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration,” *Front. Pharmacol.*, vol. 11, no. May, pp. 1–15, 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.00757.
- [138] C. R. Ethier and C. A. Simmons, “Skeletal biomechanics,” in *Introductory Biomechanics From Cells to Organisms*, 2007, pp. 379–443.
- [139] R. Huiskes and B. van Rietbergen, “Biomechanics of bone,” in *Basic Orthopaedic Biomechanics and Mechano-biology*, Philadelphia: Williams & Wilkins, 2005, pp. 123–139.
- [140] X. E. Guo and S. A. Goldstein, “Is trabecular bone tissue different from cortical bone tissue?,” *Forma*, vol. 12, no. July, pp. 185–196, 1997.
- [141] D. . Carter and W. . Hayes, “The compressive behavior of bone as a two-phase porous structure,” *J. Bone Jt. Surg. (American Vol.)*, vol. 59, pp. 954–962, 1977.
- [142] J. D. Currey, “How well are bones designed to resist fracture?,” *J. Bone Miner. Res.*, vol. 18, no. 4, pp. 591–598, 2003, doi: 10.1359/jbmr.2003.18.4.591.

- [143] J. S. Mort, Y. Geng, W. D. Fisher, and P. J. Roughley, “Aggrecan heterogeneity in articular cartilage from patients with osteoarthritis,” *BMC Musculoskelet. Disord.*, pp. 1–10, 2016, doi: 10.1186/s12891-016-0944-8.
- [144] M. Frisen, M. Magi, L. Sonnerup, and A. Viidik, “Rheological analysis of soft collagenous tissue. part I: theoretical considerations,” *J. Biomech.*, vol. 2, pp. 13–20, 1969.
- [145] A. Marziyeh, E. Sahar, M. Vahid Pirhajati, and S. V. Fariborz, Keyhanfar Rajender, “Toxicity of silver nanoparticles on endometrial receptivity in female mice,” *Can J Physiol Pharmacol*, vol. 99(12), pp. 1264–1271, 2021, doi: 10.1139/cjpp-2021-0094.
- [146] Z. Ferdous and A. Nemmar, *Health Impact of Silver Nanoparticles : A Review of the Biodistribution and Toxicity Following Various Routes of Exposure*. 2020.
- [147] S. Kirk G, “Surface Charge-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 45, pp. 283–287, 2011.
- [148] A. Swinarew, S. Golba, J. Gabor, M. Łężniak, T. Flak, and M. Pawelak, “Sposób otrzymywania w skali przemysłowej polieterów o budowie gwiazdzistej oraz ich zastosowanie,” 2016.
- [149] “<https://www.sigmaaldrich.com/PL/pl/product/aldrich/730793>.” .
- [150] S. H. Masood, “Advances in Fused Deposition Modeling,” *Compr. Mater. Process.*, vol. 10, pp. 69–91, 2014, doi: 10.1016/B978-0-08-096532-1.01002-5.
- [151] *PN-EN ISO 527-1:2012. Tworzywa sztuczne. Oznaczanie właściwości mechanicznych przy statycznym rozciąganiu. Część 1: Zasady ogólne.* .
- [152] *PN-EN ISO 527-2:2012. Tworzywa sztuczne. Oznaczanie właściwości mechanicznych przy statycznym rozciąganiu. Część 2: Warunki badań tworzyw sztucznych przeznaczonych do prasowania, wtrysku i wytłaczania.* .
- [153] W. Biały, *Wybrane zagadnienia z wytrzymałości materiałów*. Warszawa: WNT, 2014.
- [154] T. Broniewski, J. Kapko, W. Płaczek, and J. Thomalla, *Metody badań i ocena właściwości tworzyw sztucznych*. Warszawa: WNT, 2000.

- [155] *PN-EN ISO 6507-1:2007. Pomiar twardości sposobem Vickersa. Część 1: Metoda badań.* .
- [156] *PN-EN ISO 148-1:2010 Metale -- Próba udarności sposobem Charpy'ego -- Część 1: Metoda badania.* .
- [157] K. Nagy and K. Vékey, "Separation methods," *Med. Appl. Mass Spectrom.*, pp. 61–92, 2008, doi: 10.1016/B978-044451980-1.50007-0.
- [158] M. Momotko, M. Daszkiewicz, and G. Boczka, "Metody detekcji stosowane w chromatografii wykluczania (ang. Size Exclusion Chromatography – SEC)," *Apar. Badaw. i Dydakt.*, vol. 3, pp. 159–170, 2016.
- [159] "https://www.szk.de/en/research/technicalfacilities/pruefverfahren1/spektroskopie1/4873.Gel-permeation-chromatography--GPC.html, dostęp w dniu 7.11.2019r." .
- [160] "https://www.sigmaaldrich.com/PL/pl/product/supelco/48937." .
- [161] "R. Mazurkiewicz, *Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych: praca zbiorowa*, Warszawa: Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, 1995.," .
- [162] "http://zama.chem.uw.edu.pl/ai/wp-content/uploads/sites/2/2020/03/skrypt-SF.pdf." .
- [163] "https://www.shimadzu.com/an/lifescience/maldi/performance.html, dostęp w dniu 14.11.2019r." .
- [164] "ISO 22196:2007 Plastics — Measurement of antibacterial activity on plastics surfaces."
- [165] V. Vichai and K. Kirtikara, "Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening," *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 3, pp. 1112–1116, 2006.
- [166] P. Skehan *et al.*, "New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening," *JNCI J. Natl. Cancer Institue*, pp. 1107–1112, 1990, doi: 10.5772/intechopen.105772.
- [167] E. Orellana and A. Kasinski, "Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to

- Investigate Cell Proliferation,” *Bio Protoc*, vol. 6, no. 21, 2016.
- [168] Ö. S. Aslantürk, “In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages,” in *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*, 2017.
- [169] “ISO 10993-5:2009 Biologiczna ocena wyrobów medycznych -- Część 5: Badania cytotoksyczności in vitro.”
- [170] F. Safshekan, M. Tafazzoli-Shadpour, M. Abdouss, M. B. Shadmehr, and F. Ghorbani, “Investigation of the mechanical properties of the human tracheal cartilage,” *Tanaffos*, vol. 16, no. 2, pp. 107–114, 2017.
- [171] “Mechanical Characterization of Femoral Cartilage Under Unicompartimental Osteoarthritis,” *Ing. Mecánica. Tecnol. y Desarro.*, vol. 4, no. 6, pp. 239–246, 2014.
- [172] C. Polymer and P. Pc, “Covestro Makrolon ® 2600 Polycarbonate,” pp. 1–5, 2015.

X. Spis rysunków

Rysunek 1. Schemat postępowania podczas oceny stopnia degradacji materiałów zgodnie z normą PN-EN ISO 10993-9 [23].	- 14 -
Rysunek 2. Budowa kopolimerów zbudowanych z dwóch monomerów – "X" i "Y"	- 21 -
Rysunek 3. Wzór strukturalny polietylenu.	- 25 -
Rysunek 4. Wzór strukturalny polipropylenu.	- 27 -
Rysunek 5. Wzór strukturalny poli(chlorku winylu).	- 28 -
Rysunek 6. Wzór strukturalny poli(metakrylanu metylu).	- 30 -
Rysunek 7. Wzór strukturalny poli(teraftalanu etylenu).	- 31 -
Rysunek 8. Wzór strukturalny poliuretanu.	- 32 -
Rysunek 9. Wzór strukturalny polieteroeteroketonu.	- 34 -
Rysunek 10. Wzór strukturalny poli(tetrafluoroetylenu).	- 35 -
Rysunek 11. Wzór strukturalny polisiloksanów.	- 36 -
Rysunek 12. Wzór strukturalny poliwęglanu.	- 38 -
Rysunek 13. Schemat otrzymywania poliwęglanu w wyniku reakcji syntezy BPA z fosgenem.	- 38 -
Rysunek 14. Wzór strukturalny betuliny.	- 43 -
Rysunek 15. Propoksyolat cyklicznego heksamery glicydolanu potasu z końcowymi grupami hydroksylowymi.	- 57 -
Rysunek 16. Wyniki badania MALDI-ToF otrzymanego polioliu.	- 58 -
Rysunek 17. Schemat poglądowy aparatu do ekstrakcji ciągłej Soxhleta, gdzie 1 – kolba kulista, 2 – ekstraktor, 3 – chłodnica zwrotna, 4 – rurka połączona z chłodnicą zwrotną, 5 – zamknięcie syfonowe.	- 59 -
Rysunek 18. Aparat Soxhleta wykorzystany do ekstrakcji betuliny.	- 59 -
Rysunek 19. Brzoza z gatunku <i>Betula pendula</i> z której pobrano korę do ekstrakcji.	- 60 -
Rysunek 20. Zdjęcie nanokrzemionki uzyskane za pomocą SEM	- 62 -
Rysunek 21. Analiza pierwiastkowa wykonana podczas badania SEM.	- 62 -
Rysunek 22. Rozkład cząsteczek nanosrebra przy stężeniu 0.02 mg/ml	- 64 -
Rysunek 23. Drukarka RepRap Mendel Max 1,5	- 67 -
Rysunek 24. a) Model próbki w programie Slic3r przedstawiający sposób prowadzenia ścieżek; b) wydrukowana próbka z poliwęglanu z 1% zawartością domieszki betuliny umieszczona w aseptycznym opakowaniu.	- 68 -

Rysunek 25. Zestawienie przekrojów mikrostruktur płytek z domieszkami odpowiednio Ag oraz Si.	- 68 -
Rysunek 26. Przykładowe zdjęcie mikrostruktury poliwęglanu z dodatkiem nanosrebra, na podstawie którego oszacowywano wielkość porów.	- 69 -
Rysunek 27. Prototypowe chrząstki krtani: a – chrząstki nalewkowate, b – chrząstka tarczowata, c – chrząstka pierścieniowata.	- 69 -
Rysunek 28. Wykres statycznej próby rozciągania [153].	- 71 -
Rysunek 29. Wymiary kształtek dla statycznej próby rozciągania [151].	- 72 -
Rysunek 30. Próbką z karbem V – kształtnym.	- 74 -
Rysunek 31. Próbką z karbem U – kształtnym.	- 75 -
Rysunek 32. Rodzaje przełomów: a) przełom rozdzielczy b) przełom kruchy c) przełom mieszany.	- 75 -
Rysunek 33. Schemat chromatografu gazowego.	- 77 -
Rysunek 34. Chromatograf gazowy Shimadzu – GCMS-QP2010 Plus.	- 79 -
Rysunek 35. Standard betuliny.	- 80 -
Rysunek 36. Schemat działania SEC [159].	- 81 -
Rysunek 37. Chromatograf SEC firmy Shimadzu.	- 82 -
Rysunek 38. Interakcja wiązki podczerwieni z próbką po wprowadzeniu za pomocą techniki ATR [161].	- 84 -
Rysunek 39. Spektrofotometr IRTracer-100.	- 85 -
Rysunek 40. Widmo absorpcyjne (linia przerywana) oraz emisyjne (linia ciągła) wraz z PS dla wodnego roztworu siarczanu chininy [162].	- 86 -
Rysunek 41. Spektrofluorymetr FluoroMax – 4.	- 87 -
Rysunek 42. Zasada działa MALDI ToF.	- 89 -
Rysunek 43. Spektrometr masowy MALDI ToF [163].	- 89 -
Rysunek 44. Płytką pomiarową do badań MALDI-ToF.	- 90 -
Rysunek 45. Schemat sposobu inokulacji zgodnie z normą [158].	- 92 -
Rysunek 46. Próbką poliwęglanu z betulina bezpośrednio po przeprowadzonej próbie udarności.	- 98 -
Rysunek 47. Chromatogramy uzyskane dla betuliny otrzymanej w wyniku ekstrakcji ciągłej Soxhleta – kolor różowy oraz dla standardu betuliny - kolor czarny.	- 99 -
Rysunek 48. Chromatogram uzyskany dla płytki poliwęglanowej z 1% zawartością betuliny, gdzie pik 1 obrazuje poliwęglan, pik 2 to betulina a pik 3 to kwas betulinowy.	- 100 -

Rysunek 49. Chromatogram uzyskany dla płytki poliwęglanowej z 5% zawartością betuliny, gdzie pik 1 obrazuje poliwęglan, pik 2 to betulina a pik 3 to kwas betulinowy.....	- 101 -
Rysunek 50. Chromatogram uzyskany dla płytki poliwęglanowej z 10% zawartością betuliny, gdzie pik 1 obrazuje poliwęglan, pik 2 to betulina a pik 3 to kwas betulinowy.....	- 102 -
Rysunek 51. Widmo FT-IR uzyskane dla filamentu PC z 1% zawartością betuliny.	- 104 -
Rysunek 52. Widmo FT-IR uzyskane dla płytki poliwęglanowej z 1% zawartością betuliny..	- 105 -
Rysunek 53. Widmo FT-IR uzyskane dla filamentu PC z 5% zawartością betuliny.	- 106 -
Rysunek 54. Widmo FT-IR uzyskane dla płytki poliwęglanowej z 5% zawartością betuliny..	- 107 -
Rysunek 55. Widmo FT-IR uzyskane dla filamentu PC z 10% zawartością betuliny.	- 108 -
Rysunek 56. Widmo FT-IR uzyskane dla płytki poliwęglanowej z 10% zawartością betuliny.-	- 109 -
Rysunek 57. Widmo FT-IR uzyskane dla filamentu PC z domieszką nanokrzemionki...	- 110 -
Rysunek 58. Widmo FT-IR uzyskane dla płytki poliwęglanowej z domieszką nanokrzemionki.	- 111 -
Rysunek 59. Widmo FT-IR uzyskane dla filamentu PC z domieszką nanosrebra.	- 112 -
Rysunek 60. Widmo FT-IR uzyskane dla płytki poliwęglanowej z domieszką nanosrebra.	- 113 -
Rysunek 61. Zestawienie widm czystego granulatu PC, granulatu z poliolem (PO) względem struny i wydruku z betuliną w stężeniu 1%.	- 114 -
Rysunek 62. Zestawienie widm czystego granulatu PC, granulatu z poliolem (PO) względem struny i wydruku z betuliną w stężeniu 5%.	- 114 -
Rysunek 63. Zestawienie widm czystego granulatu PC, granulatu z poliolem (PO) względem struny i wydruku z betuliną w stężeniu 10%.	- 115 -
Rysunek 64. Zestawienie widm czystego granulatu PC, granulatu z poliolem (PO) względem struny i wydruku z nanokrzemionką.....	- 115 -
Rysunek 65. Zestawienie widm czystego granulatu PC, granulatu z poliolem (PO) względem struny i wydruku z nanosrebrem.....	- 116 -
Rysunek 66. Widmo emisyjne uzyskane dla próbki z poliwęglanu z domieszką betuliny (1%).	- 117 -
Rysunek 67. Widmo ekscytacyjne uzyskane dla próbki z poliwęglanu z domieszką betuliny (1%).....	- 118 -

Rysunek 68. Widmo emisyjne uzyskane dla próbki z poliwęglanu z domieszką nanokrzemionki.....	- 118 -
Rysunek 69. Widmo ekscytacyjne uzyskane dla poliwęglanu z domieszką nanokrzemionki. .	- 119 -
Rysunek 70. Widmo emisyjne uzyskane dla poliwęglanu z domieszką nanosrebra.	- 119 -
Rysunek 71. Widmo ekscytacyjne uzyskane dla poliwęglanu z domieszką nanosrebra. .	- 120 -
Rysunek 72. Widmo masowe otrzymane dla poliwęglanu.....	- 122 -
Rysunek 73. Widmo masowe otrzymane dla betuliny uzyskanej w wyniku ekstrakcji Soxhleta.	- 122 -
Rysunek 74. Widmo masowe otrzymane dla poliwęglanu domieszkowanego betulina. Kolorem szarym oznaczono widmo masowe otrzymane dla filamentu a zielonym dla wydruku...	- 123 -
Rysunek 75. Widmo masowe otrzymane dla poliwęglanu domieszkowanego nanokrzemionką. Kolorem turkusowym oznaczono widmo masowe otrzymane dla filamentu a pomarańczowym dla wydruku.	- 123 -
Rysunek 76. Widmo masowe otrzymane dla poliwęglanu domieszkowanego nanosrebrem. Kolorem niebieskim oznaczono widmo masowe otrzymane dla filamentu a czerwonym dla wydruku.	- 124 -
Rysunek 77. Zestawienie otrzymanych widm masowych dla poszczególnych materiałów. Kolor szary – betulina filament, kolor zielony – betulina wydruk, kolor turkusowy – nanokrzemionka filament, kolor pomarańczowy – nanokrzemionka wydruk, kolor niebieski – nanosrebro filament, kolor czerwony – nanosrebro wydruk.	- 125 -
Rysunek 78. Wykres przedstawiający żywotność komórek określony jako procent żywych komórek w odniesieniu do kontroli (K) w poszczególnych grupach badanych. Legenda: B1 - komórki traktowane eluatem płytki polimerowej z poliolem domieszkowanej betulina w stężeniu 1%, B5 - komórki traktowane eluatem płytki polimerowej z poliolem domieszkowanej betulina w stężeniu 5%, B10 - komórki traktowane eluatem płytki polimerowej z poliolem domieszkowanej betulina w stężeniu 10%, PC - komórki traktowane eluatem płytki polimerowej bez betuliny i poliolem, PO - komórki traktowane eluatem płytki polimerowej bez betuliny z poliolem.....	- 133 -

XI. Spis tabel

Tabela 1. Rodzaje badań laboratoryjnych dotyczących oceny biogodności w zależności od klasyfikacji materiału [22].	- 13 -
Tabela 2. Odczynniki użyte do ekstrakcji betuliny.	- 61 -
Tabela 3. Proporcje składników blendy polimerowej z betuliną dla stężenia 1%.	- 65 -
Tabela 4. Proporcje składników blendy polimerowej z nanosrebrem.	- 65 -
Tabela 5. Proporcje składników blendy polimerowej z nanokrzemionką.	- 66 -
Tabela 6. Parametry druku dla wykonanych próbek.	- 67 -
Tabela 7. Wymiary kształtek dla statycznej próby rozciągania [148].	- 72 -
Tabela 8. Wymiary próbki z V – kształtnym karbem [156].	- 74 -
Tabela 9. Masy cząsteczkowe zastosowanych standardów polistyrenowych.	- 82 -
Tabela 10. Wyniki statycznej próby rozciągania dla próbek z betuliną (1%).	- 94 -
Tabela 11. Wyniki statycznej próby rozciągania dla próbek z nanokrzemionką.	- 94 -
Tabela 12. Wyniki statycznej próby rozciągania dla próbek z nanosrebrem.	- 95 -
Tabela 13. Moduł Younga wraz z wartością średnią dla poszczególnych próbek.	- 95 -
Tabela 14. Wyniki pomiarów twardości dla betuliny, nanokrzemionki oraz nanosrebra wraz z obliczoną wartością średnią.	- 97 -
Tabela 15. Udarność obliczona dla poszczególnych próbek.	- 97 -
Tabela 16. Wyniki uzyskane dla płytki poliwęglanowej z 1% zawartością betuliny.	- 100 -
Tabela 17. Wyniki uzyskane dla płytki poliwęglanowej z 5% zawartością betuliny.	- 101 -
Tabela 18. Wyniki uzyskane dla płytki poliwęglanowej z 10% zawartością betuliny.	- 102 -
Tabela 19. Tabelaaryczne zestawienie sygnału zarejestrowanego dla filamentu PC z 1% zawartością betuliny z wyodrębnieniem najistotniejszych pików, gdzie: Peak – lokalne maksimum, Intensity – intensywność bezwzględna, Corr. Intensity - intensywność względna, Base (H) - zakres pików wysoki, Base (L) – zakres pików niski, Area – pole powierzchni bezwzględne, Corr. Area - pole powierzchni względne.	- 104 -
Tabela 20. Tabelaaryczne zestawienie sygnału zarejestrowanego dla płytki poliwęglanowej z 1% zawartością betuliny z wyodrębnieniem najistotniejszych pików, gdzie: Peak – lokalne maksimum, Intensity – intensywność bezwzględna, Corr. Intensity - intensywność względna, Base (H) - zakres pików wysoki, Base (L) – zakres pików niski, Area – pole powierzchni bezwzględne, Corr. Area - pole powierzchni względne.	- 105 -
Tabela 21. Tabelaaryczne zestawienie sygnału zarejestrowanego dla filamentu PC z 5 % zawartością betuliny z wyodrębnieniem najistotniejszych pików, gdzie: Peak – lokalne	

maksimum , Intensity – intensywność bezwzględna, Corr. Intensity - intensywność względna, Base (H) - zakres pików wysoki, Base (L) – zakres pików niski, Area – pole powierzchni bezwzględne, Corr. Area - pole powierzchni względne.	106
Tabela 22. Tabelaryczne zestawienie sygnału zarejestrowanego dla płytki poliwęglanowej z 5% zawartością betuliny z wyodrębnieniem najistotniejszych pików, gdzie: Peak – lokalne maksimum, Intensity – intensywność bezwzględna, Corr. Intensity - intensywność względna, Base (H) - zakres pików wysoki, Base (L) – zakres pików niski, Area – pole powierzchni bezwzględne, Corr. Area - pole powierzchni względne.	107
Tabela 23. Tabelaryczne zestawienie sygnału zarejestrowanego dla filamentu PC z 10 % zawartością betuliny z wyodrębnieniem najistotniejszych pików, gdzie: Peak – lokalne maksimum, Intensity – intensywność bezwzględna, Corr. Intensity - intensywność względna, Base (H) - zakres pików wysoki, Base (L) – zakres pików niski, Area – pole powierzchni bezwzględne, Corr. Area - pole powierzchni względne.	108
Tabela 24. Tabelaryczne zestawienie sygnału zarejestrowanego dla płytki poliwęglanowej z 10 % zawartością betuliny z wyodrębnieniem najistotniejszych pików, gdzie: Peak – lokalne maksimum, Intensity – intensywność bezwzględna, Corr. Intensity - intensywność względna, Base (H) - zakres pików wysoki, Base (L) – zakres pików niski, Area – pole powierzchni bezwzględne, Corr. Area - pole powierzchni względne.	109
Tabela 25. Tabelaryczne zestawienie sygnału zarejestrowanego dla filamentu PC z domieszką nanokrzemionki z wyodrębnieniem najistotniejszych pików, gdzie: Peak – lokalne maksimum, Intensity – intensywność bezwzględna, Corr. Intensity - intensywność względna, Base (H) - zakres pików wysoki, Base (L) – zakres pików niski, Area – pole powierzchni bezwzględne, Corr. Area - pole powierzchni względne.	110
Tabela 26. Tabelaryczne zestawienie sygnału zarejestrowanego dla płytki poliwęglanowej z domieszką nanokrzemionki z wyodrębnieniem najistotniejszych pików, gdzie: Peak – lokalne maksimum, Intensity – intensywność bezwzględna, Corr. Intensity - intensywność względna, Base (H) - zakres pików wysoki, Base (L) – zakres pików niski, Area – pole powierzchni bezwzględne, Corr. Area - pole powierzchni względne.	111
Tabela 27. Tabelaryczne zestawienie sygnału zarejestrowanego dla filamentu PC z domieszką nanosrebra z wyodrębnieniem najistotniejszych pików, gdzie: Peak – lokalne maksimum, Intensity – intensywność bezwzględna, Corr. Intensity - intensywność względna, Base (H) - zakres pików wysoki, Base (L) – zakres pików niski, Area – pole powierzchni bezwzględne, Corr. Area - pole powierzchni względne.	112

Tabela 28. Tabelaaryczne zestawienie sygnału zarejestrowanego dla płytki poliwęglanowej z domieszką nanosrebra z wyodrębnieniem najistotniejszych pików, gdzie: Peak – lokalne maksimum, Intensity – intensywność bezwzględna, Corr. Intensity - intensywność względna, Base (H) - zakres pików wysoki, Base (L) – zakres pików niski, Area – pole powierzchni bezwzględne, Corr. Area - pole powierzchni względne.	113 -
Tabela 29. Wyniki otrzymane dla próbek z 1% domieszką betuliny względem szczepu <i>S. aureus</i> (DSM 346) w temperaturze 35 +/- 1°C wraz z obliczoną wartością parametru R. ...	126 -
Tabela 30. Wyniki otrzymane dla próbek z 5% domieszką betuliny względem szczepu <i>S. aureus</i> (DSM 346) w temperaturze 35 +/- 1°C wraz z obliczoną wartością parametru R. ...	127 -
Tabela 31. Wyniki otrzymane dla próbek z 10% domieszką betuliny względem szczepu <i>S. aureus</i> (DSM 346) w temperaturze 35 +/- 1°C wraz z obliczoną wartością parametru R. ...	127 -
Tabela 32. Wyniki otrzymane dla próbek z 1% domieszką betuliny względem szczepu <i>E. coli</i> (DSM 1576) w temperaturze 35 +/- 1°C wraz z obliczoną wartością parametru R.	128 -
Tabela 33. Wyniki otrzymane dla próbek z 5% domieszką betuliny względem szczepu <i>E. coli</i> (DSM 1576) w temperaturze 35 +/- 1°C wraz z obliczoną wartością parametru R.	128 -
Tabela 34. Wyniki otrzymane dla próbek z 10% domieszką betuliny względem szczepu <i>E. coli</i> (DSM 1576) w temperaturze 35 +/- 1°C wraz z obliczoną wartością parametru R.	129 -
Tabela 35. Zestawienie wyników wartości bakteriobójczej (R) dla wszystkich próbek ..	129 -
Tabela 36. Wyniki otrzymane dla próbek z domieszką nanokrzemionki względem szczepu <i>E. coli</i> (DSM 1576) w temperaturze 35 +/- 1°C wraz z obliczoną wartością parametru R. Średnia liczba żywych komórek bakterii 6×10^5 jtk/cm ² w inokulum testowym.....	130 -
Tabela 37. Wyniki otrzymane dla próbek z domieszką nanosrebra względem szczepu <i>S. aureus</i> – ATCC 25923 w temperaturze 35 +/- 1°C wraz z obliczoną wartością parametru R. Średnia liczba żywych komórek bakterii 6×10^5 jtk/cm ² w inokulum testowym.....	130 -
Tabela 38. Wyniki otrzymane dla próbek z domieszką nanosrebra względem szczepu <i>E. coli</i> – ATCC 25922 w temperaturze 35 +/- 1°C wraz z obliczoną wartością parametru R. Średnia liczba żywych komórek bakterii 6×10^5 jtk/cm ² w inokulum testowym.....	131 -
Tabela 39. Ocena działania antybakteryjnego (parametr R) zgodnie z normą ISO 22196:2007-	131 -

XII. Załączniki

1. Standard do kalibracji MALDI – ToF

Product Information

ProteoMass™ Peptide MALDI-MS Calibration Kit

Catalog Number **MSCAL2**
 Store at Room Temperature

TECHNICAL BULLETIN

Product Description

This kit provides a range of standard peptides for the purpose of calibrating and testing matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometers, regardless of the instrument manufacturer. High purity, low alkali metal solvents and a recrystallized matrix are supplied. Whether you are a user new to the interpretation of mass spectrometric data or an experienced biochemist running high throughput experiments for proteomics analysis, this kit is ideally designed to provide standards for most peptide applications.

Examples of applications:

1. Calibration of the MALDI instrument:
 - A combination of peptides provides good calibration across the typical mass range of tryptic digestion fragments (800–3,000 Da) in reflectron mode.
 - Angiotensin II and P₁₄R provide multiple post source decay (PSD) fragment ions for calibration of PSD data.
2. Tuning of the MALDI Instrument:
 - Combinations of peptides allow for optimization of resolution in reflectron and linear modes.
3. Sensitivity:
 - Sensitivity of the instrument may be tested by using a dilution series of a peptide provided by the kit in the mass range of interest.

Components

The standards supplied in the kit may also be purchased individually using the listed catalog numbers. ProteoMass™ Peptide & Protein (Catalog Number MSCAL1) and ProteoMass Protein (Catalog Number MSCAL3) MALDI-MS Calibration Kits are also available.

Standard Peptides

2 × 10 nmoles of the standard peptides are supplied in 1.5 ml clear tubes.

Catalog No. [CAS number]	Product	(M+H) ⁺ Monoisotopic
B4181 [23815-87-4]	Bradykinin fragment 1-7	757.3997
A8846 [68521-88-0]	Angiotensin II (human)	1,046.5423
P2613	P ₁₄ R (synthetic peptide)	1,533.8582
A8346 [53917-42-3]	ACTH fragment 18–39 (human)	2,465.1989
I6154 [30003-72-6]	Insulin oxidized B chain (bovine)	3,494.6513

Masses were calculated based on NCBI¹ sequences using NIST standard atomic weights and isotopic masses.²

Matrix

8 × 10 mg of the recrystallized matrix are supplied in 2.0 ml amber tubes.

Catalog No. [CAS number]	Product	Common Name
C8982 [28166-41-8]	α-Cyano- 4-hydroxycinnamic acid	α-cyano CHCA

Solvents

Solvents are supplied in high density polyethylene bottles.

Catalog No. [CAS number]	Product	Amount
T3443 [76-05-1]	0.1% Trifluoroacetic acid (TFA) solution	30 ml
A8596 [75-05-8]	Acetonitrile (ACN)	30 ml
T3693 [76-05-1]	1% Trifluoroacetic acid (TFA) solution	4 ml

Storage/Stability

The kit is stored at room temperature and is shipped at ambient temperature.

The matrix, after reconstitution in solvent, is stable for approximately one week at room temperature, if protected from light.

Peptide stock solutions can be frozen in aliquots, but should not be subjected to more than 3 freeze-thaw cycles. Standards are recommended for use for no longer than one month after reconstitution.

Precautions and Disclaimers

All the standards have been tested on the Shimadzu Biotech Kompact SEQ and AXIMA-CFR to meet certain performance criteria in selected modes of positive ion MALDI mass spectrometric analysis (linear, reflectron, or PSD). This does not preclude the use of these standards in other modes (i.e., negative ion mode) or with instruments made by other manufacturers. These criteria are only a guideline and not a guarantee of performance on other instrument manufacturers' systems. Performance varies depending on the age and maintenance of the instrument in addition to the manufacturer's own specifications.

Handling Dilute Peptide Solutions

Care is required in the preparation of a dilution series of peptides due to their nature to bind to surfaces. Therefore, it is recommended to use a new pipette tip for each dilution to avoid carryover. In addition, the most dilute solutions (100 and 10 fmol/ μ l) will remain useful for only one day, as the sample becomes adsorbed onto the tube surface. The nature of MALDI mass spectrometry excludes the precoating of tubes and tips with bovine serum albumin or fetal calf serum. It is possible to include in the solvents one of a highly limited group of detergents, such as 0.1% octyl- β -D-glucopyranoside (Catalog Number O9882),^{3,4} to stabilize the solutions, but some affect on the performance of the standards in MALDI mass spectrometry may be observed.

Preparation Instructions

Preparation of solvents

- The 0.1% TFA solution is provided ready for use in the preparation of all the standard solutions, except bradykinin and insulin oxidized B chain.
- Mix 5 ml of the 0.1% TFA and 5 ml of ACN to give a solution of 50% ACN in 0.05% TFA. This solvent is used in the preparation of bradykinin and insulin oxidized B chain solutions, and the matrix.

Preparation of standard stock solutions

Note: The user is provided with two options in the preparation of standard solutions depending on preference. Each standard can be prepared as a stock solution of 100 or 10 pmol/ μ l. Sufficient volume of the 0.1% TFA solution is provided for five preparations of 10-fold serial dilution to 10 fmol/ μ l in each option.

- For a stock solution of 100 pmol/ μ l, dissolve the contents of each standard tube in 100 μ l of the appropriate solvent. (Bradykinin and insulin oxidized B chain are dissolved in the 50% ACN with 0.05% TFA solution. The remaining standards are dissolved in the 0.1% TFA solution.)
- For a stock solution of 10 pmol/ μ l, dissolve the contents of each standard tube in 1,000 μ l of the appropriate solvent.
- Store frozen – recommended to be used for 1 month with a maximum of 3 freeze-thaw cycles before discarding.

Preparation of solutions for sensitivity analysis

Serially dilute any of the 100 pmol/ μ l or 10 pmol/ μ l stock solutions with the appropriate solvent to produce the following working solutions for sensitivity testing.

Initial Concentration	μ l stock solution	μ l solvent	Working Solutions
100 pmol/ μ l	10 μ l	90 μ l	10 pmol/ μ l
10 pmol/ μ l	10 μ l	90 μ l	1 pmol/ μ l
1 pmol/ μ l	10 μ l	90 μ l	100 fmol/ μ l
100 fmol/ μ l	10 μ l	90 μ l	10 fmol/ μ l

Preparation of solutions for calibration

Beginning with the 100 pmol/ μ l or 10 pmol/ μ l stock solutions, prepare a calibration mixture by combining appropriate peptides for the mass range of interest and dilute to a suitable concentration. Typical calibration solution concentrations range between 1–10 μ M (pmol/ μ l) for each component. Higher concentrations of larger molecular mass species in the peptide mixtures may be necessary to optimize signal intensities across the mass range of interest. For the best mass accuracy, bracket the mass range of interest and, when possible, use three to four peptides for calibration. Serially dilute as described above if desired.

Preparation of MALDI Matrix

Dissolve the contents of a 10 mg tube of matrix in 1 ml of the 50% ACN in 0.05% TFA solution. For best performance, once in solution, the matrix should be stored in the dark and used for 1 week, then discarded. Using the 50% ACN in 0.05% TFA solvent, the α -cyano-4-hydroxycinnamic acid forms a nearly saturated solution at room temperature. Some residual crystals may be visible in the matrix solution. The ACN concentration can be adjusted to suit individual preferences. A mixture of 70% ACN and 30% of the 0.1% TFA solution is often used.

Procedure

MALDI sample preparation and application to the target

The following methods are provided for the preparation of standards or samples with the matrix for application to the MALDI target. These are general guidelines and not all solvents recommended for the different techniques are supplied with the kit. Typical molar ratios of sample to matrix are between 1:100 and 1:10,000.

Sample Preparation Method 1:

Commonly referred to as the dried-droplet method, this method is based on the original MALDI experiments and remains the most commonly used method in the mass spectrometry community.⁵

1. Transfer 10 μ l of the matrix solution to a small tube.
2. Add 1–10 μ l of the standard/sample to the tube containing the matrix and vortex.
3. Apply 0.5–2 μ l of the resulting mixture onto the MALDI target and allow to dry.
4. Once the liquid has evaporated, the target is ready for analysis.

Sample Preparation Method 2:

Referred to as the overlayer (or two-layer) method, this method is believed to produce a more homogenous sample spot and to improve resolution and mass accuracy, especially for peptides and proteins.⁶⁻⁹

First layer solution (matrix only)

1. A concentrated (10–50 mg/ml) solution of the matrix is prepared in methanol or acetone for fast evaporation (solvent not supplied).

Second layer solution

1. Prepare a 3–10 mg/ml solution of the matrix in a solvent system with an approximate 2:1 ratio of water (or 0.1% TFA solution) to organic solvent (methanol or ACN).
2. Transfer 10 μ l of the matrix solution from step 2 to a small tube.
3. Add 1–10 μ l of the standard/sample to the tube containing the matrix and vortex.

Sample deposition

4. Apply 0.5–2 μ l of the first layer solution (matrix only) to the MALDI target and allow it to dry and form a fine crystalline layer.
5. Apply 0.5–2 μ l of the second layer solution on top of the crystalline layer and allow to dry. The solvent system used in the second layer solution must not fully dissolve the first layer upon application.
6. Once the liquid has evaporated, the target is ready for analysis.

Sample Preparation Method 3:

An alternative method of sample preparation, which eliminates the mixing of the sample with the matrix prior to application to the MALDI target (recommended by Shimadzu Biotech).

1. Apply 0.5 μ l of matrix solution to the sample deposit area or well of the MALDI target. Remove excess matrix after 1 to 2 seconds and discard. Allow the target surface to dry.
2. Apply 0.5 μ l of the standard/sample solution to the sample deposit area.
3. While the sample deposit is still wet, add a further 0.5 μ l of matrix and allow to dry passively.
4. Once all the standards and samples have been applied and allowed to dry, the target is ready for analysis.

Product Profile

Product	NCBI ¹ Reference (ExpASY Reference) ¹⁰	Formula (M+H) ⁺
Bradykinin fragment 1-7	N/A	C ₃₅ H ₅₃ N ₁₀ O ₉
Angiotensin II	ANGT_HUMAN (P01019)	C ₅₀ H ₇₂ N ₁₃ O ₁₂
P ₁₄ R	N/A	C ₇₆ H ₁₁₃ N ₁₈ O ₁₆
ACTH fragment 18-39	COLI_HUMAN (P01189)	C ₁₁₂ H ₁₆₆ N ₂₇ O ₃₆
Insulin oxidized B chain	INS_BOVIN (P01317)	C ₁₅₇ H ₂₃₃ N ₄₀ O ₄₇ S ₂

Results

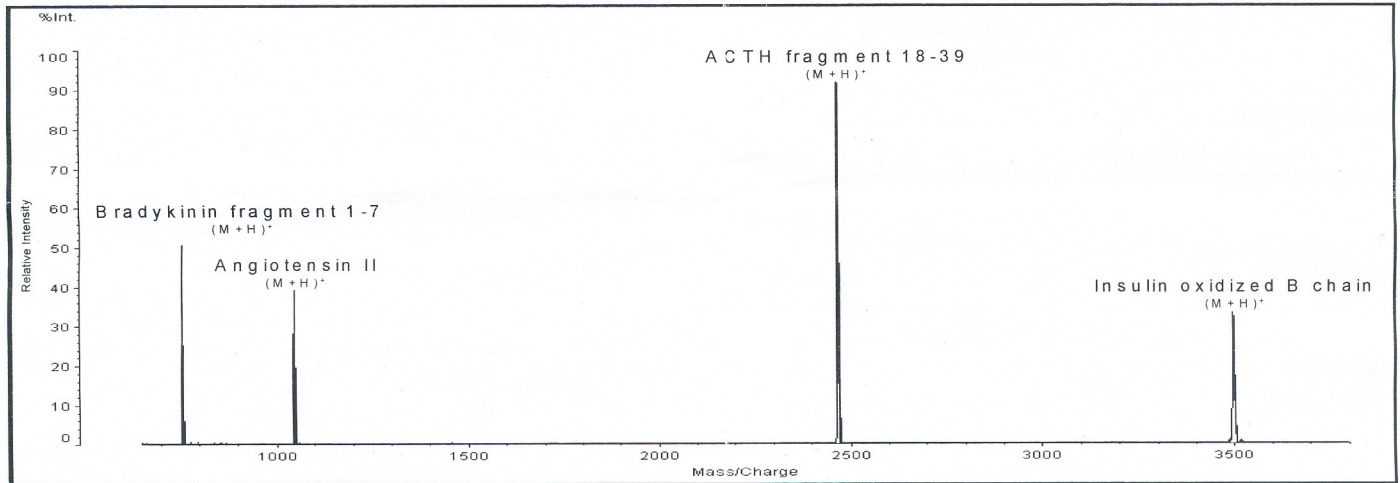


Figure 1. MALDI mass spectrum of a peptide calibration solution containing 1.5 μM bradykinin fragment 1-7, 1.0 μM angiotensin II, 0.5 μM ACTH fragment 18-39, and 2.0 μM insulin oxidized B chain. A 10 μl aliquot of the peptide solution was mixed with 10 μl of a 10 mg/ml α -cyano solution. 0.8 μl of the resulting solution was spotted onto the MALDI target. Data was acquired using a Shimadzu Biotech Kompact SEQ system in the linear positive ion mode. Note: 1 μM = 1 pmol/ μl .

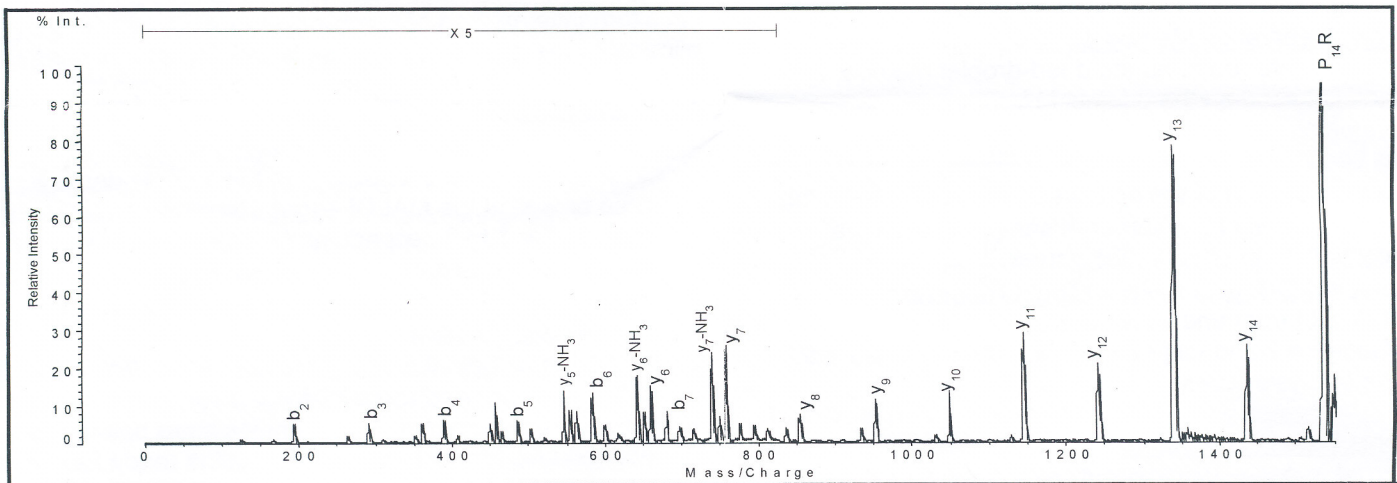


Figure 2. Post Source Decay analysis of P_{14}R using α -cyano as the MALDI matrix. Data was acquired on a Shimadzu Biotech AXIMA-CFR system in reflectron positive ion mode. PSD data compliments of Shimadzu Biotech.

References

1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=protein>
2. <http://physics.nist.gov/PhysRefData/contents.html>
3. Vorm, O. et al., 41st ASMS Conference Proceedings, 621, (1994).
4. Sutton, C. W. et al., Electrophoresis, **16**, 308-316, (1995).
5. Karas, M. and Hillenkamp, F., Anal. Chem., **60**, 2299-2301, (1988).
6. Dai, Y. et al., Anal. Chem., **68**, 2494-2500, (1996).
7. Dai, Y. et al., Anal. Chem., **71**, 1087-1091, (1999).
8. Edmondson, R. D. and Russell, D. H., J. Am. Soc. Mass Spectrom., **7**, 995-1001, (1996).
9. Onnerfjord, P. et al., Rapid Commun. Mass Spectrom., **13**, 315-322, (1999).
10. <http://www.expasy.org/>

Proteomass is a trademark of Sigma-Aldrich® Co. LLC.

GL,DXP,HAH,MAM,LKB 08/11-1

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc.

Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.