



**AGH**

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej

---

## **Praca magisterska**

**Natalia Milaniak**

Kierunek: **fizyka medyczna**

Specjalizacja: **Techniki obrazowania i biometria**

Badanie procesu biodegradacji  
substytutów tkanki kości gąbczastej  
wytwarzanych metodą szybkiego  
prototypowania.

Promotor pracy: dr inż. Maciej Śniechowski

**Kraków, wrzesień 2016**



Oświadczam, świadomy(-a) odpowiedzialności karnej za poświadczenie nieprawdy, że niniejszą pracę dyplomową wykonałem(-am) osobiście i samodzielnie i nie korzystałem(-am) ze źródeł innych niż wymienione w pracy.

.....

(czytelny podpis)

## Recenzja Opiekuna

## Recenzja Recenzenta

*Chciałam złożyć serdeczne podziękowania mojemu promotorowi  
**dr. inż. Maciejowi Śniechowskiemu** za przyjęcie mnie pod swoje  
skrzydła i zadanie tematu pracy, który był nie tylko fascynujący, ale  
również przyszłościowy i może rzucić nowe światło nasze na  
rozumienie polimerów, jako substytutów tkanki kostnej.*

*Dziękuję również mojej **Mamie i Siostrze**, które zawsze we mnie  
wierzyły i dbały o dobre warunki dla mnie w trakcie pisania pracy.*

## Spis treści

1. Wprowadzenie .....	9
2. Skróty .....	10
3. Tkanka kostna (Źródło [14]) .....	11
3.1 Struktura (Źródło [14]) .....	11
3.2 Skład chemiczny <sup>[14]</sup> .....	13
3.3 Właściwości mechaniczne (Źródło [11]) .....	13
3.4 Wzrost i modelowanie tkanki kostnej (Źródło [14]) .....	16
4. Przygotowanie żywicy .....	18
5. Drukarka 3D (Źródło [15]) .....	20
5.1 Materiały .....	21
5.1.1 Właściwości chemiczne i fizyczne .....	22
5.1.2 Parametry drukarki .....	23
6. Szkło i urządzenia laboratoryjne .....	25
7. Eksperyment .....	26
8. Materiały I metody .....	32
8.1 Morfologia włókien .....	32
8.2 Właściwości mechaniczne – Moduł Young’a (Źródło [11]) .....	33
8.3 Spektroskopia UV-VIS (Źródło [18]) .....	38
10. Wyniki .....	45
10.1 Tempo degradacji, degradowalność i rzeczywisty czas degradacji .....	46
10.2 Morfologia włókien .....	48
10.3 Właściwości mechaniczne .....	54
11.3.1 Masa .....	60

11.3.3 Rozmiary .....	66
10.4 Spektroskopia UV-VIS .....	72
11.4.1 Rusztowania z różnych mieszanek żywicznych.....	74
11.4.2 Degradacja rusztowań w czasie.....	76
11. Wnioski.....	83
12. Literatura.....	85
13. Spis ilustracji.....	87
14. Spis tabel.....	88



## 1. Wprowadzenie

W związku z coraz większym zapotrzebowaniem na materiały biodegradowalne i biozgodne w inżynierii biomedycznej i implantologii, temat związany z tworzeniem kompozytów polimerowych, które zastąpią te tytanowe jest coraz częściej poruszany. Głównym celem badań jest stworzenie implantów, które będą doskonale imitować żywą tkankę kostną, będą biodegradowalne i ich produkty rozpadu nie będą szkodliwe dla organizmu. Powinny one pełnić funkcję rusztowania dla komórek kościotwórczych i ustępować im miejsca w przebiegu osteogenezy. Ich właściwości mechaniczne i fizyczne miałyby jak najbardziej przypominać te tkanki kostnej.

Dzięki nowoczesnym metodom badań i technologiom uzyskanie takich implantów jest już tylko kwestią czasu.

Celem pracy magisterskiej jest: przygotowanie, pomiar parametrów, degradacja, ponowny pomiar i analiza wyników, polimerowych rusztowań przygotowanych metodą szybkiego prototypowania.

Praca została podzielona na 3 główne części. Pierwsza to wstęp teoretyczny, w którym przedstawione są informacje na temat tkanki kostnej i jej właściwości, a następnie prezentowane są składniki mieszanki żywicznej stosowanej do wykonania rusztowań z uwzględnieniem zawartości procentowej. W drugiej części przybliżony jest przebieg eksperymentu wraz z przedstawieniem metod wykorzystywanych w poszczególnych jego etapach. W trzecim segmencie referowane są wyniki pomiarów. Ostatnim elementem pracy jest rozdział, w którym wyczerpująco przedstawione są wnioski wraz z unaocznieniem przyszłych zastosowań.

## 2. Skróty

BAPO – bis acyl phosphine oxide

CT – computed tomography

DVE – divinyl ester

FBS – fetal bovine serum

HA - hydroxyapatite

PEGDA – polyethylene (glycol) diacrylate

W oznaczaniu próbek:

BW – utwardzane bez wody

W – utwardzane w wodzie

P1 – porowatość na poziomie 76%

PBS - phosphate-buffered saline

Z1 – podstawowa mieszanka żywiczna

Z2 – mieszanka żywiczna z hydroksyapatytem

### 3. Tkanka kostna (Źródło [14])

Tkanka kostna (*textus osseus*) jest rodzajem tkanki łącznej, w której w istocie podstawowej znajdują się sole mineralne, co nadaje jej twardość, sztywność i wytrzymałość na odkształcenia. Tkanka kostna ma charakterystyczną organizację przestrzenną, tworząc kość (*os*). Kości ze względu na sztywność odgrywają rolę ochronną dla narządów wewnętrznych oraz rolę dźwigni, do których się przyczepiają mięśnie. Ta ostatnia właściwość pozwala na ruchy jednych części ciała względem innych. Ponadto tkanka kostna jest ważnym rezerwuarem  $\text{Ca}^{2+}$ .

W skład tkanki kostnej wchodzi:

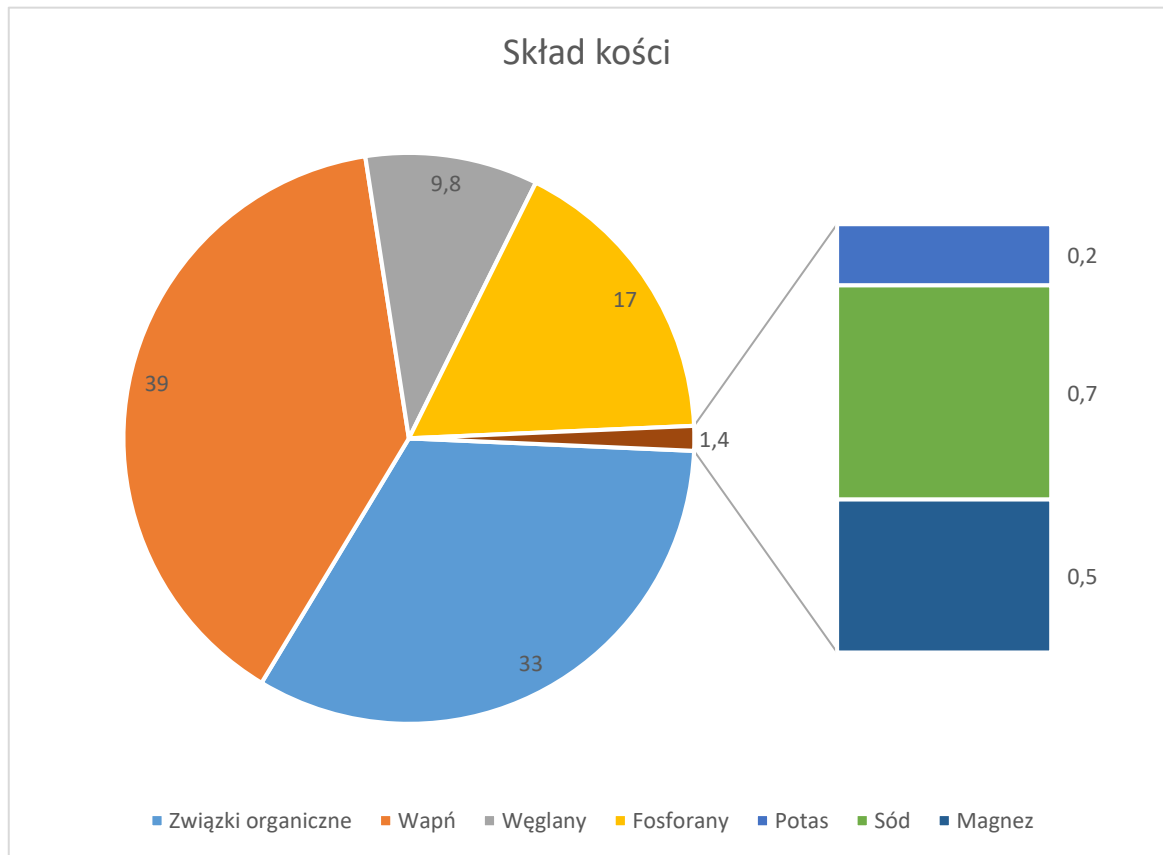
- komórki – osteoblasty, osteocyty i osteoklasty, które stanowią ok. 5% masy tkanki kostnej;
- istota międzykomórkowa składająca się z części organicznej – osteoidu, stanowiącej ok. 25% masy tkanki, i części nieorganicznej – soli mineralnych, stanowiącej 60–70% masy tkanki.

#### 3.1 Struktura (Źródło [14])

Tkanka kostna grubowłóknista, czyli splotowata (*textus osseus rudifibrosus*). Jest pierwszym rodzajem tkanki kostnej pojawiającym się w rozwoju kości, w życiu płodowym i w pierwszym okresie życia pozapłodowego. U człowieka dorosłego ten rodzaj tkanki występuje w miejscach przyczepów ścięgien do kości, w wyrostkach zębodołowych, błędniku kostnym, szwach kości czaszki, a także w czasie reperfekcji uszkodzeń kości. Kość grubowłóknista pojawia się również w przebiegu wielu chorób kości. W tkance kostnej grubowłóknistej jest stosunkowo wiele osteocytów i osteoidu w porównaniu z substancją nieorganiczną. Charakterystyczną cechą tej tkanki jest występowanie włókien kolagenowych w grubych pęczkach, które mają nieregularny przebieg. Stąd wywodzi się nazwa tkanki – kość grubowłóknista. Tkanka kostna drobnowłóknista, czyli blaszkowata (*textus osseus parallelifibrosus seu lamellosus*). Jest dojrzałą formą tkanki kostnej, która wchodzi w skład kości długich i płaskich. Zbudowana jest z blaszek kostnych, o grubości 3–7  $\mu\text{m}$ , w których skład wchodzi pojedyncze włókna kolagenowe o grubości 1–4  $\mu\text{m}$  (stąd nazwa drobnowłóknista)

zbudowane z kolagenu typu I. Ponadto w skład blaszek kostnych wchodzi osteoid i minerał kości. Wyróżnia się dwa rodzaje tkanki kostnej drobnowłóknistej: kość gąbczastą i kość zbitą. Kość gąbczasta (*os spongiosum*) składa się z blaszek kostnych, tworzących zazwyczaj beleczki, których kształt i wielkość zależą od kierunków działania sił na kość. Przestrzenie między beleczkami wypełnia szpik kostny (*medulla ossium*). Kość gąbczasta znajduje się w nasadach (*epiphyses*) i przynasadach (*metaphyses*) kości długich oraz wypełnia wnętrze kości płaskich. Wewnątrz beleczek, w jamkach kostnych, leżą osteocyty, które łączą się z innymi komórkami za pośrednictwem wypustek cytoplazmatycznych biegnących w kanalikach kostnych. Na powierzchni beleczek mogą się znajdować nieliczne osteoblasty i osteoklasty. Kość zbita (*os compactum*) jest zbudowana z blaszek kostnych, które wypełniają objętość tkanki, stwarzając warunki dużej wytrzymałości na działanie sił mechanicznych. Wchodzi w skład zewnętrznych warstw kości płaskich oraz znajduje się w trzonach kości długich (*diaphyses*). Podstawowym składnikiem strukturalnym i czynnościowym tkanki kostnej zbitej jest osteon, czyli system Haversa. Jest to układ 4–20 (zwykle 6 lub mniej) blaszek kostnych, podobnych do rurek, które leżą jedne w drugich. Blaszkę tę noszą nazwę blaszek systemowych i mają grubość 3–7  $\mu\text{m}$ . Włókna kolagenowe poszczególnych blaszek systemowych układają się równolegle do siebie i zwykle spiralnie w stosunku do osi długiej blaszki. W sąsiadujących ze sobą blaszkach kierunek włókien odchyła się o pewien kąt. Najbardziej zewnętrzna warstwa osteonu nie zawiera kanalików kostnych, jest uboga we włókna kolagenowe i nosi nazwę linii cementowej. W środku osteonu znajduje się kanał o średnicy ok. 50  $\mu\text{m}$ , zwany kanałem Haversa, najczęściej zawierający włosowate naczynie krwionośne i nerw. Naczynia krwionośne różnych osteonów łączą się między sobą za pośrednictwem bocznych odgałęzień, które biegną w poprzek kości zbitej, w kanałach Volkmanna. Na granicy przylegających do siebie blaszek kostnych znajdują się wkłęsnięcia, które tworzą jamki kostne, zawierające osteocyty. Przez blaszki kostne, począwszy od kanału Haversa ku obwodowi osteonu, przechodzi promieniście wiele kanalików kostnych, w których się znajdują wypustki osteocytów. Przestrzenie tkanki kostnej zbitej między osteonami są wypełnione przez blaszki kostne międzysystemowe. Kość zbita pokryta jest od strony zewnętrznej kilkoma blaszkami podstawowymi zewnętrznymi, a od strony jamy szpikowej – blaszkami podstawowymi wewnętrznymi.

### 3.2 Skład chemiczny<sup>[14]</sup>



Rysunek 1. Skład kości (Źródło [10])

Główne związki wchodzące w skład tkanki kostnej:

- związki organiczne (osseomukoid i osteoalbuminoid): 30-50%
- związki nieorganiczne (mieszanina soli wapniowych): 30-35%
- woda: 15-40%

### 3.3 Właściwości mechaniczne (Źródło [11])

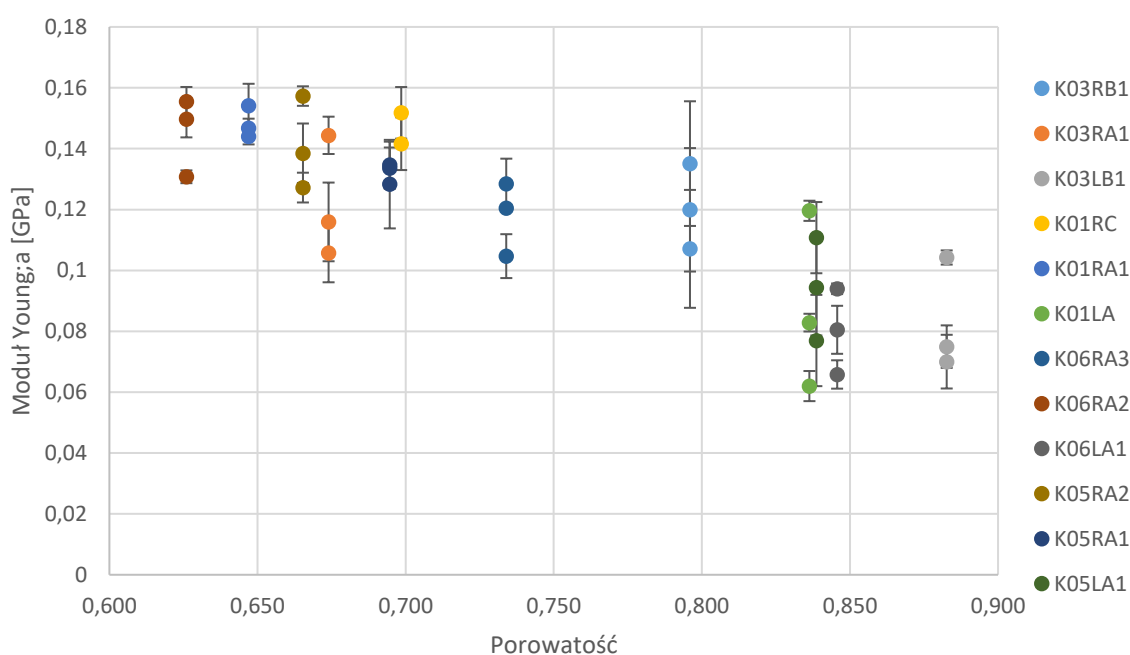
W mojej pracy inżynierskiej zajmowałam się między innymi wyznaczeniem właściwości mechanicznych kości gąbczastej. Zestawienie tych pomiarów znajduje się w tabelce poniżej.

Tabela 1. Wartości modułu Young'a w zależności od porowatości kości. (Źródło [11])

Porowatość	Moduł Young'a [MPa]	Odchylenie standardowe [MPa]	BV/TV	Nazwa kości	Kierunek
<b>0,796</b>	120,25	22,26	0,204	K03RB1	1
	138,16	16,64		K03RB1	2
	107,15	17,69		K03RB1	3
<b>0,674</b>	122,55	11,95	0,326	K03RA1	1
	141,47	15,04		K03RA1	2
	113,78	8,33		K03RA1	3
<b>0,883</b>	69,27	8,94	0,117	K03LB1	1
	105,29	6,32		K03LB1	2
	73,79	7,54		K03LB1	3
<b>0,699</b>	142,10	12,73	0,302	K01RC	2
	151,44	2,52		K01RC	3
<b>0,647</b>	150,48	7,31	0,353	K01RA1	1
	145,49	5,53		K01RA1	2
	142,83	1,02		K01RA1	3
<b>0,836</b>	117,46	7,47	0,164	K01LA	1
	77,04	4,47		K01LA	2
	57,04	10,10		K01LA	3
<b>0,734</b>	106,23	6,60	0,266	K06RA3	1
	121,36	3,65		K06RA3	2
	131,48	14,95		K06RA3	3
<b>0,626</b>	152,47	11,99	0,374	K06RA2	1
	133,39	4,58		K06RA2	2
	151,76	10,63		K06RA2	3
<b>0,846</b>	69,66	8,05	0,154	K06LA1	1
	80,06	7,71		K06LA1	2

	90,27	9,13		K06LA1	3
<b>0,665</b>	140,04	10,34	0,335	K05RA2	1
	125,46	10,98		K05RA2	2
	152,16	12,81		K05RA2	3
<b>0,695</b>	124,56	19,12	0,305	K05RA1	1
	139,31	12,92		K05RA1	2
	130,71	16,25		K05RA1	3
<b>0,839</b>	113,40	11,14	0,161	K05LA1	1
	76,32	15,90		K05LA1	2
	76,35	13,62		K05LA1	3

Zależność Modułu Young'a od porowatości

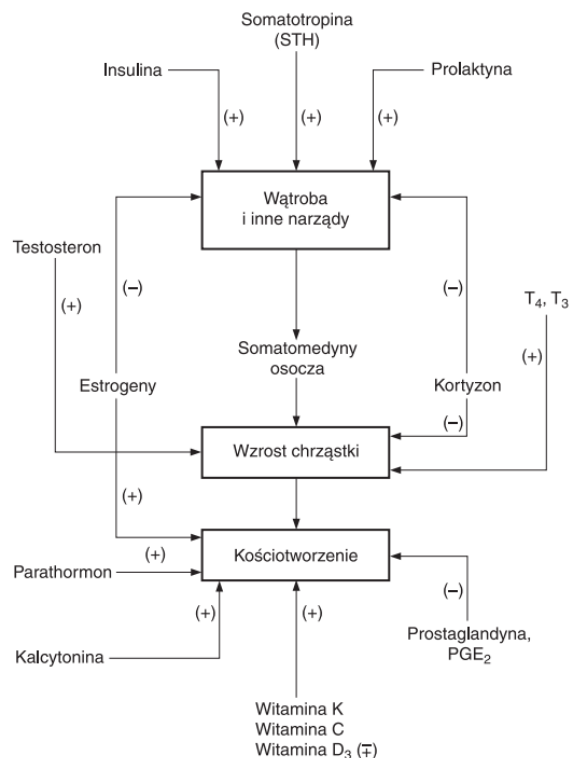


Wykres 1. Zależność modułu Young'a w zależności od porowatości danej kostki. (Źródło [11])

### 3.4 Wzrost i modelowanie tkanki kostnej (Źródło [14])

Kości długie rosną na długość dzięki stałym podziałom komórek chrząstki w tej części płytki nasadowej, która jest skierowana ku nasadzie. Natomiast w części płytki nasadowej skierowanej ku trzonowi kości następuje niszczenie chrząstki i odkładanie kości. W ten sposób płytka nasadowa przesuwa się, nie zmieniając swojej grubości, a jej przemieszczanie wyznacza tempo wzrostu kości na długość. U kobiet ok. 18. roku życia i u mężczyzn ok. 20. roku życia następuje połączenie nasady z trzonem wskutek zaniku płytki nasadowej. Hamuje to wzrost szkieletu. Zwiększanie średnicy kości, czyli wzrost kości na szerokość, odbywa się dzięki odkładaniu kości przez osteoblasty okostnej z jednoczesnym jej niszczeniem od strony jamy szpikowej. Wzrost kości płaskiej powstającej na podłożu łącznotkankowym odbywa się na jej obwodzie. Biorą w nim udział osteoblasty powstające z tkanki mezenchymatycznej ciemiączek (*fonticuli*). W ten sposób zwiększa się kość płaska, wzrastając promieniście w wielu kierunkach. Ciemiączka stopniowo zmniejszają się, zanikając przed 2. roku życia. Między kośćmi płaskimi pozostają wąskie rozstępy (*suturæ*), wypełnione tkanką łączną właściwą, w której obrębie zachodzi kościotworzenie w miarę zwiększającej się jamy czaszki. Około 30. roku życia następuje ostateczne zarośnięcie szwów i wytworzenie kościostrostu (*synostosis*). Wzrost kości płaskiej na grubość odbywa się przez nakładanie kości z udziałem osteoblastów okostnej od strony zewnętrznej z jednoczesnym niszczeniem kości przez osteoklasty od strony przeciwnej. Taki sam mechanizm prowadzi do zmian krzywizny kości płaskich między urodzeniem a pokwitaniem.



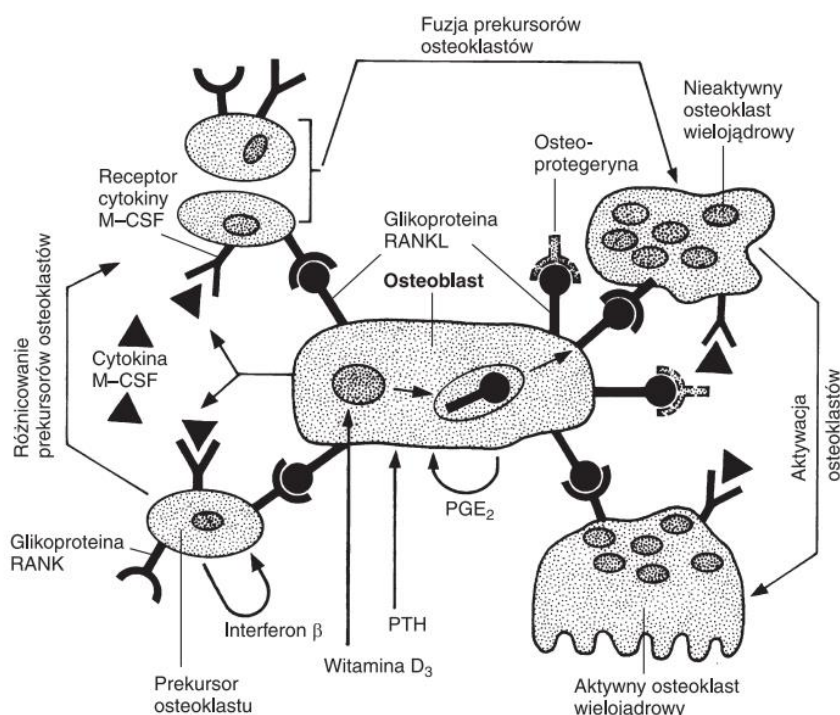


Rysunek 2. Związki inicjujące i zatrzymujące kośćotworzenie. (Źródło [14]).

U człowieka dorosłego ok. 10% masy kostnej jest wymieniane w ciągu roku. Oznacza to, że w ciągu ok. 10 lat składniki kośćca są wymieniane w 100%. U dzieci, szczególnie w ciągu dwóch pierwszych lat życia, proces wymiany składników kości jest jeszcze bardziej intensywny i wynosi ok. 50% rocznie. Wiąże się to z przybieraniem przez dziecko pozycji ortostatycznej oraz rozpoczęciem chodzenia. Proces takiej wymiany składników kości nosi nazwę modelowania kości. Modelowanie kości usuwa drobne jej uszkodzenia oraz dostosowuje jej budowę do zmieniających się obciążeń działających na kość. Modelowanie kości jest wynikiem harmonijnego współdziałania prekursorów osteoklastów z osteoblastami, w wyniku, czego dochodzi do niszczenia, a następnie odbudowy kości w nowym kształcie. Współdziałanie osteoklastów i osteoblastów odbywa się za pośrednictwem ich błonowych glikoprotein – RANK i RANKL.

Związanie tych glikoprotein w czasie bezpośredniego współdziałania prekursorów osteoklastów z osteoblastami prowadzi do syntezy czynnika transkrypcji c-Fos, który uaktywnia geny potrzebne do różnicowania osteoklastów i ich aktywacji. Niekiedy c-Fos pobudza syntezę cytokiny – interferonu  $\beta$ , który na drodze autokrynii hamuje różnicowanie i aktywację osteoklastów. Ponadto osteoblasty produkują

osteoprotegerynę, która wiąże się z ich błonową glikoproteiną RANKL, zapobiegając jej wiązaniu z glikoproteiną RANK prekursorów osteoklastów. Zapobiega to także różnicowaniu i aktywacji osteoklastów. W zależności, zatem od bezpośredniego współdziałania prekursorów osteoklastów z osteoblastami oraz wpływu cytokin i witaminy D<sub>3</sub> dochodzi do różnicowania i fuzji prekursorów osteoklastów (osteoklastogenezy) i powstawania wielojądrowych osteoklastów. Takie osteoklasty są następnie aktywowane i rozpoczynają niszczenie kości, co jest warunkiem rozpoczęcia modelowania kości.



Rysunek 3. Inicjowanie procesu modelowania kości. (Źródło [14])

#### 4. Przygotowanie żywicy

Proces przygotowania mieszanki żywicznej był wykonany samodzielnie w proporcjach i składnikach dobranych do optymalnych wartości elastyczności końcowego produktu.

Wykonano 2 mieszanki żywiczne, w celu dokonania porównania między właściwościami elastycznymi a podobieństwem do tkanki kostnej.

Mieszanka Z1 jest typową mieszanką do tworzenia żywicy o dobrych właściwościach elastycznych.

Została ona przygotowana z następujących materiałów w podanych proporcjach:

*Tabela 2. Przygotowanie mieszanki Z1.*

Material	Zawartość %	Masa substancji [g]
DVE	89,21	82
PEGDA	9,25	8,5
BAPO	1,49	1,367
SUDAN I	0,05	0,046
SUMA	100	91,91

W celu stworzenia rusztowań przypominających tkankę kostną, dodano do podstawowej mieszanki Z1 HA, w proporcjach podanych w tabeli 3.

*Tabela 3. Przygotowanie mieszanki Z2.*

Material	Zawartość %	Masa substancji [g]
DVE	74,04	75,8
PEGDA	8,20	8,4
BAPO	1,23	1,26
SUDAN I	0,08	0,084

HA	16,45	16,84
SUMA	100	102,38



Rysunek 4. Pojemnik z przygotowaną mieszanką Z2. (Źródło własne)

## 5. Drukarka 3D (Źródło [15])

Do wykonania rusztowań kostnych z tak przygotowanych mieszanek wykorzystano drukarkę B9 Creator, która wykorzystuje metodę drukowania DLP.

Technika DLP (Digital Light Processing) W technice DLP poszczególne warstwy drukowanego modelu są tworzone poprzez utwardzanie fotopolimeru światłem. Światło to jest emitowane przez specjalnie przystosowany projektor. Przygotowany wcześniej symulacyjny model jest dzielony na cienkie warstwy, które następnie są wyświetlane na panelu i utwardzane przez określony czas. Czas potrzebny na utworzenie jednej warstwy modelu w tej technice waha się od kilku do kilkunastu sekund i jest uzależniony od rodzaju stosowanej żywicy, parametry najlepiej dobrać indywidualnie, obserwując, czy dany czas naświetlania jest wystarczający do stworzenia pojedynczej warstwy. Po stworzeniu modelu, wybraniu ilości cienkich warstw, na które się dzieli oraz czasu naświetlania łatwo przewidzieć czas, w jakim struktura zostanie wydrukowana.

Urządzenie ma możliwość drukowania struktur rzędu mikrometrów, co jest bardzo istotne w przypadku tworzenia rusztowań na podstawie tkanki kostnej.

B9 Creator ma możliwość tworzenia obiektów w trzech różnych rozdzielczościach ( $70\ \mu\text{m}$ ,  $50\ \mu\text{m}$ ,  $30\ \mu\text{m}$ ) w zależności od zadanej odległości między stolikiem roboczym a projektorem światła. Im mniejszy dystans tym większa rozdzielność. Wybierając jednakże wysoką rozdzielność, należy zdawać sobie sprawę z utraty wielkości pola roboczego ( $104 \times 75,6\ \text{mm}$ ;  $96 \times 54\ \text{mm}$ ;  $57,6 \times 32,4\ \text{mm}$ ). W związku z tym drukowanie dużych modeli wiąże się z utratą dobrej rozdzielczości.

### 5.1 Materiały

Materiałami stosowanymi do wytworzenia rusztowań są DVE, PEGDA, BAPO, SUDAN I i HA.

PEGDA jest najczęściej wykorzystywanym monomerem do tworzenia mieszanek do zastosowań dentystycznych.

DVE ma szerokie zastosowanie, jako crosslinker<sup>1</sup> przy procesach polimeryzacji.

BAPO w tej mieszance pełni funkcję fotoinicjatora, bez którego nie doszłoby do fotopolimeryzacji.

HA jest dodawany do mieszanki żywicznej w celu zwiększenia podobieństwa rusztowania do tkanki kostnej, której jest ważnym składnikiem.

SUDAN I – azobarwnik<sup>2</sup> nadający rusztowaniu pomarańczową barwę.

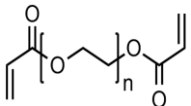
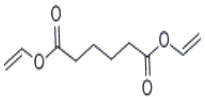
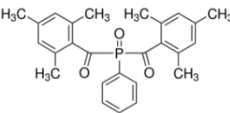
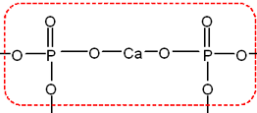
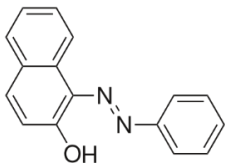
---

<sup>1</sup> Crosslinker – substancja inicjująca proces sieciowania, czyli powstania trójwymiarowej sieci nadcząsteczkowej

<sup>2</sup> Azobarwnik - organiczne związki chemiczne z grupy azozwiązków, stosowane jako barwniki na skalę przemysłową

### 5.1.1 Właściwości chemiczne i fizyczne

Tabela 4. Wybrane właściwości składników mieszanki żywicznej.

Nazwa	Wzór chemiczny	Wzór strukturalny	Gęstość	Temperatura topnienia	Masa cząsteczkowa [Da]	Stan skupienia
PEGDA	$[-CH_2-CH_2-O-]_n-$		1,117		508	Ciecz
DVA	$C_{10}H_{14}O$		1	28	198,22	Ciecz
BAPO	$[(CH_3)_3C_6H_2CO]_2P(O)C_6H_5$			135	418,46	Proszek
HA	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$		3,14		1004,6	Proszek
SUDAN I	$C_{16}H_{12}N_2O$			131	248,28	Proszek

### 5.1.2 Parametry drukarki



*Rysunek 5. Drukarka 3D B9Creator. (Źródło [15])*

Odpowiednie ustawienie parametrów drukarki jest niezbędne w celu uzyskania materiałów o wybranych właściwościach i trwałości. W zależności od rodzaju żywicy długość naświetlania tak pierwszych warstw jak i kolejnych była różna. Wynika to z odmiennych zdolności do polimeryzacji danej mieszanki żywicznej.

Do przygotowania rusztowań z mieszanki żywicznej Z1 parametry drukowania zawarto w tabelce 5.

Tabela 5. Parametry drukarki użyte przy wytwarzaniu rusztowań z mieszanki Z1

Parametr	Uwagi	Wartość
Base	Czas utwardzania pierwszych warstwy	1,2s
Over	Czas naświetlania kolejnych warstw	0,1s
Attach layers	Liczba warstw utwardzanych najdłużej (fundament)	2
A base		10s
A over		0,724s
Unsupported Pixel Multiplier		0,800
Shutter open speed		80%
Shutter close speed		80%
Pre Exposure Delay (Settle)		0,200s
Pre Exposure Delay (Kick)		0,200s
Post Release Delay (Breathe)		0,300s
CZAS DRUKOWANIA	Podczas 1 sesji drukowano 12 kostek 1mmx1mmx1mm	1 godz. 44 min

W przypadku drukowania rusztowań z mieszanki żywicznej Z2 parametry te należało nieco zmienić, ze względu na obecność HA.



Tabela 6. Parametry drukarki użyte przy wytwarzaniu mieszanki żywicznej Z2.

Parametr	Uwagi	Wartość
Base	Czas utwardzania pierwszych warstw	4s
Over	Czas naświetlania kolejnych warstw	0,2s
Attach layers	Liczba warstw utwardzanych najdłużej (fundament)	2
A base		25s
A over		0,724s
Unsupported Pixel Multiplier		0,800
Shutter open speed		80%
Shutter close speed		80%
Pre Exposure Delay (Settle)		0,200s
Pre Exposure Delay (Kick)		0,200s
Post Release Delay (Breathe)		0,300s
CZAS DRUKOWANIA	Podczas 1 sesji drukowano 12 kostek 1mmx1mmx1mm	3 godz. 15 min

## 6. Szkło i urządzenia laboratoryjne

Do przeprowadzenia eksperymentu niezbędne było też podstawowe szkło i urządzenia laboratoryjne.

Tabela 7. Szkło i urządzenia laboratoryjne

Nazwa	Przeznaczenie	Uwagi
Probówki	Do przeprowadzenia eksperymentu	Pojemność 10ml – z zatyczkami
Zlewki, kolby	Do przygotowania preparatów	Pojemność 1l
Bagietki	Do mieszania	
Pipety	Do odmierzania	Pojemności 1 i 5ml
pH-metr	Kontrola pH	Automatyczny
„Inkubator”	Utrzymanie temperatury 37°C	
Waga laboratoryjna	Kontrola zmian masy rusztowania	Dokładność 0,001gm
Wstrząsarka	Dokładne wymieszanie roztworu	100rpm
Mieszadło magnetyczne		3000rpm
Suszarka	Do osuszania preparatu	
Suwmiarka	Do mierzenia rusztowań	Dokładność 0,01mm

## 7. Eksperyment

Celem pracy jest wykonanie rusztowań polimerowych, zbadanie ich właściwości, przeprowadzenie procesu degradacji, analiza wyników i porównanie ich z parametrami tkanki kostnej gąbczastej.

Eksperymenty zostały przeprowadzone na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH.

- I. Pierwszym krokiem było wykonanie mieszanki żywicznej i decyzja odnośnie jej składu. Procedura została przedstawiona w rozdziale 4 i 5.
- II. Wykonano serię rusztowań z mieszanki żywicznej Z1 oraz Z2 o porowatości rzędu 76%.
- III. Rusztowania zostały wstawione do lampy UV na 3 dni celem utwardzenia.
  - a) Rusztowania z mieszanki Z2 utwardzano w wodzie.
  - b) Rusztowania z mieszanki Z1 utwardzano w wodzie (rusztowania oznaczone W) oraz bez wody (rusztowania oznaczone BW) w celu porównania właściwości rusztowań w zależności od metody utwardzania.

Tabela 8. Porównanie rusztowania polimerowego z wycinkiem kości. (Źródło własne)

Rusztowanie polimerowe	Wycinek kości udowej krowy mlecznej
	



Rysunek 6. Wydrukowane i oznaczone próbki. . (Źródło własne)

- IV. Wykonano rusztowania z mieszanki żywicznej o różnej porowatości celem zaobserwowania różnic w tempie degradacji w zależności od grubości beleczek (rusztowania oznaczone GR). Próbki te utwardzano w wodzie.

Tabela 9. Oznaczenia rusztowań gradientowych wraz z porowatością.

Nazwa	% porowatości
GR1	76,1
GR2	71,87
GR3	65,81
GR4	48,95
GR5	45,75
GR6	38,17
GR7	33,65



Rysunek 7. Wydrukowane i ustawione według zmniejszającej się porowatości rusztowania polimerowe. (Źródło własne)

V. Wykonano pomiary masy, rozmiarów i modułu Young'a każdego z rusztowań.



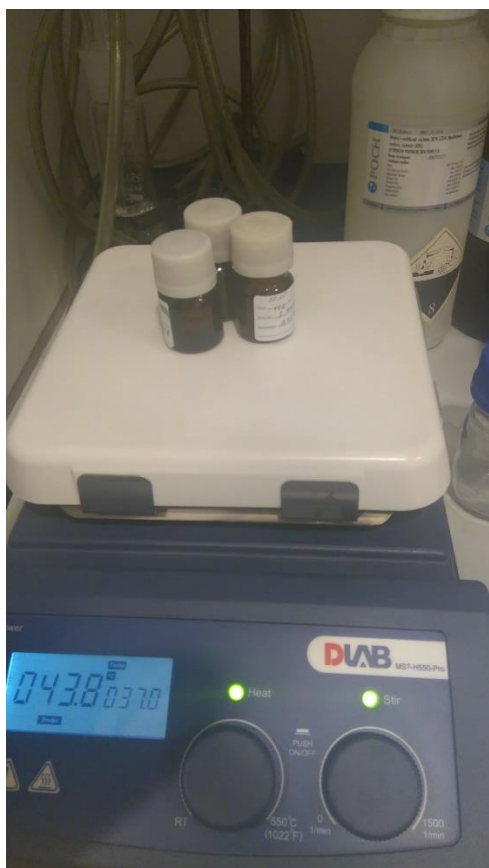
Rysunek 8. Wykorzystywana waga laboratoryjna. .(Źródło własne)

- VI. Rusztowania zostały oczyszczone wodą destylowaną, natomiast probówki zostały wysterylizowane alkoholem etylowym.
- VII. Rusztowania wstawiono do roztworów 0,05M NaOH oraz 1M NaOH (4ml roztworu) celem zaobserwowania różnic w tempie degradacji.



Rysunek 9. Próbkę przygotowane do wstawienia do buteleczek. (Źródło własne)

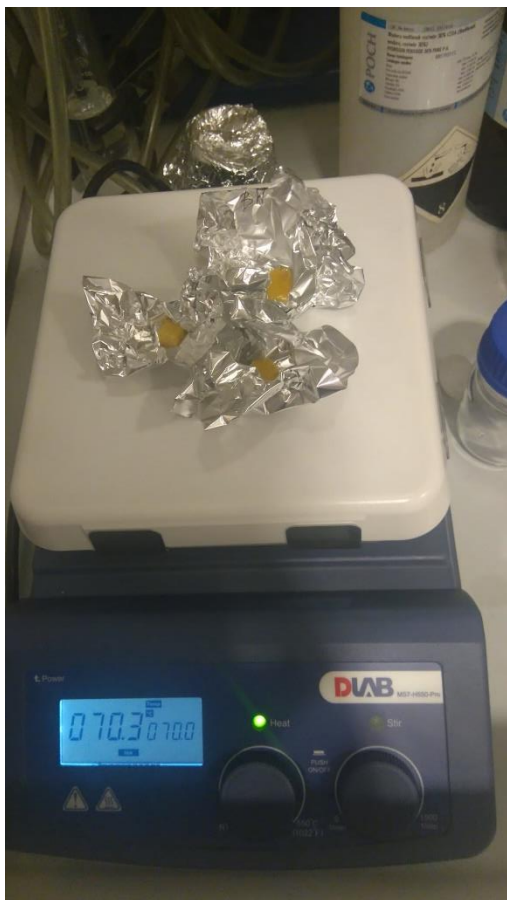
Rysunek 10. Próbkę na mieszadle magnetycznym z funkcją sterowania temperaturą i obrotami mieszadłą. (Źródło własne)



VIII. Przygotowane próbki zostały umieszczone na mieszadle magnetycznym. Obroty ustawiono na 300/min, temperaturę na 37°C.

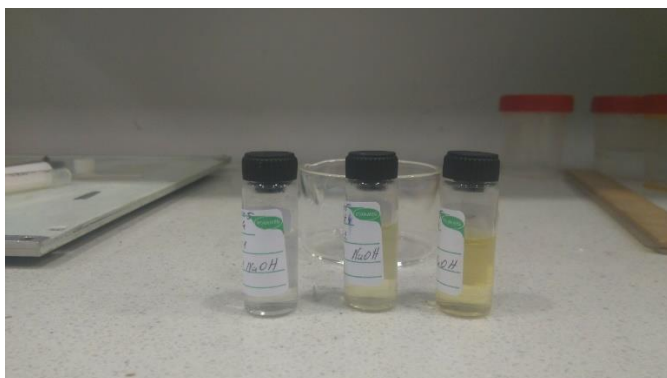


- IX. Po ustalonym czasie, rusztowania zostały wyciągnięte z roztworu, opłukane wodą destylowaną i umieszczone na 1 dzień do suszenia w temperaturze 70°C.



Rysunek 11. Rusztowania suszone w temperaturze 70°C. .(Źródło własne)

- X. Pozostały roztwór został przelany do szklanych probówek i oznaczony celem późniejszej analizy spektroskopowej.



Rysunek 12. Pozostały roztwór po przeprowadzonej degradacji. .(Źródło własne)

## 8. Materiały I metody

### 8.1 Morfologia włókien

W celu bezinwazyjnego zbadania morfologii rusztowań skorzystano z mikroskopu Dino Lite.

AM2111 Dino-Lite Basic Dino-Lite USB jest prostym mikroskopem, który pomimo swoich małych rozmiarów i łatwości stosowania jest bardzo dobrym narzędziem o wysokiej rozdzielczości (640x480). Posiada oświetlenie LED, twardą kompozytową obudowę i powiększenie rzędu 10~70x and 200x.



Rysunek 13. Urządzenie DinoLite na podstawie. Źródło [22]



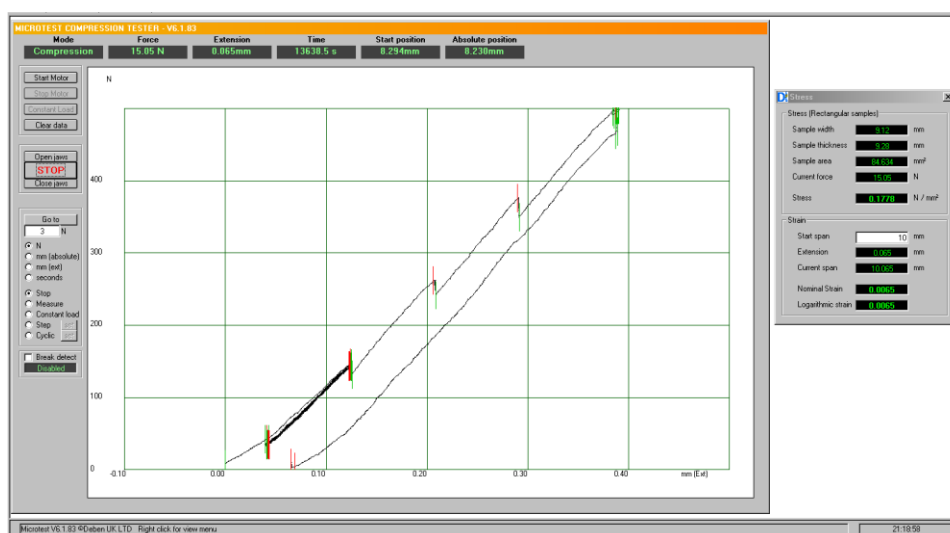
Rysunek 14. Mikroskop DinoLite. (Źródło [22])



## 8.2 Właściwości mechaniczne – Moduł Young’a (Źródło [11])

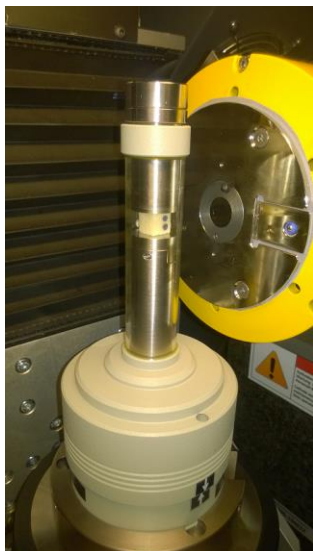
Wyznaczanie modułów Younga kości polegało na poddaniu jej fragmentu statycznej próbie ściskania. W pomiarach wykorzystano miniaturową maszynę wytrzymałościową firmy Deben CT500<sup>3</sup>. Jest to maszyna umożliwiająca zarówno ściskanie jak i rozciąganie badanego materiału z maksymalną siłą 500N. Urządzenie wyposażone jest w sterownik wraz z oprogramowaniem umożliwiającym sterowanie eksperymentem.

Okno główne programu sterującego maszyną przedstawiono na rysunku 16. Program pracuje pod kontrolą systemów Windows XP/7.0 /8.0 i umożliwia sterowanie wszystkimi parametrami maszyny. Możliwa jest zmiana prędkości odkształcenia, zatrzymanie i przełączenie w tryb utrzymywania stałej siły lub odkształcenia a także wykonywanie testów zmęczeniowych typu cyclic. Wszystkie dane zapisywane są do plików w celu późniejszej analizy.



Rysunek 15. Przebieg próby ściskania. (Źródło własne)

<sup>3</sup> Odnośnik do strony producenta: <http://deben.co.uk/products/mxct-in-situ-holders-testing-stages/ct500-500n-in-situ-tensile-stage-mxct-applications/>



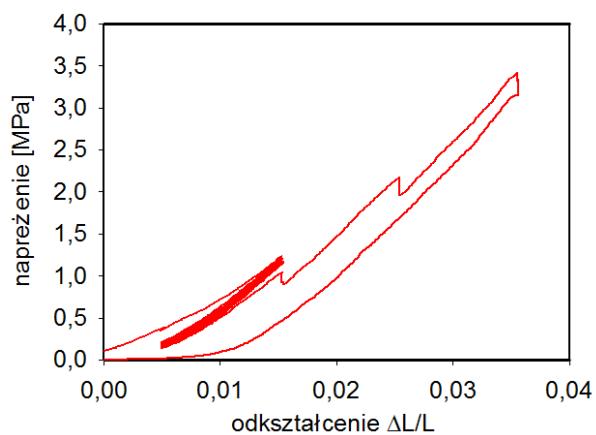
Rysunek 16. Maszyna wytrzymałościowa umieszczona wewnątrz tomografu wraz z próbką kości. (Źródło własne)

Przebieg wykonywanego eksperymentu był następujący:

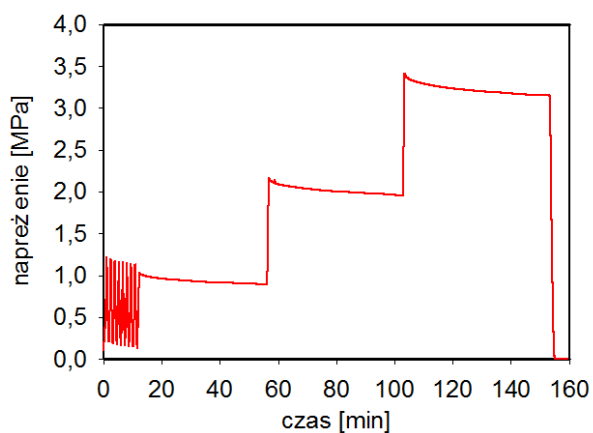
- 1) Próbką była umieszczana w maszynie a następnie zaciskano szczęki tak, aby dokonać wstępnego ściśnięcia próbki. Na tym etapie maksymalne naprężenie nie przekraczało ustalonej wartości  $0.11\text{MPa}$ . Odległość między szczękami maszyny wyznaczała początkową wysokość próbki.
- 2) Próbką była ściskana do wartości odkształcenia  $1.5\%$
- 3) Właściwe pomiary tomograficzne wykonywano dla wartości odkształcenia  $3.5\%$ .
- 4) Po wykonaniu ostatniego pomiaru odpuszczono zadane naprężenie do wartości zerowej.

Przykładowy wynik pomiaru w postaci zależności pomiędzy naprężeniem a odkształceniem oraz naprężeniem w funkcji czasu przedstawiono na wykresie 2 oraz 3. Widoczne są wszystkie etapy podczas pomiaru. Początkowo wartość siły ustawiono na  $3\text{N}$ . Następuje przyrost naprężenia do wartości odkształcenia  $1.5\%$ . Wzrost naprężenia nie następuje jednak liniowo, co jest wynikiem niewłaściwego kontaktu pomiędzy próbką a uchwytem maszyny. Nieobciążone rusztowanie może nie przylegać prawidłowo do uchwyty. W celu ustabilizowania powierzchni kontaktu próbkę kilkakrotnie obciążono a następnie zwolniono obciążenie. W wyniki kilkakrotnego obciążania powierzchnia kontaktu stabilizuje się i nieznacznie zmienia się odpowiedź materiału - zmienia się nachylenie krzywej. W każdym z cykli nachylenie jest stałe, co świadczy o

ustabilizowaniu się powierzchni kontaktu. Po osiągnięciu maksymalnego odkształcenia 3.5% naprężenie zmniejszono do zera.



Wykres 2. Przebieg statycznej próby ściskania dla próbki.  
Zależność naprężenia w funkcji odkształcenia.



Wykres 3 Przebieg statycznej próby ściskania dla próbki.  
Zależność naprężenia w funkcji czasu.

Na podstawie danych z maszyny wytrzymałościowej wyznaczono moduły Younga dla każdej z próbek ściskanej w 3 (lub 2) różnych kierunkach. Moduł Younga jest wyliczany z nachylenia krzywej ściskania w zakresie sprężystym. Zależność tę opisuje prawo Hooke'a.

$$\sigma = E\varepsilon, \quad (1)$$

$$\frac{F}{S} = E \frac{\Delta l}{l_0}, \quad (2)$$

gdzie:

$\sigma$ -napreżenie (stress) [Pa]

$\varepsilon$  - odkształcenie (strain) [bezwymiarowe]

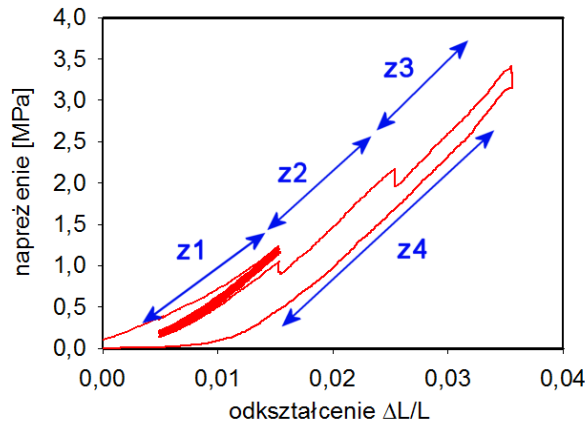
$F$ -siła [N]

$S$ -pole przekroju [m<sup>2</sup>]

$\Delta l$  - wydłużenie [mm]

$l_0$  - wysokość próbki [mm]

Pole przekroju wyznaczone zostało na podstawie pomiarów suwmiarką, natomiast pozostałe wartości takie jak  $\Delta l$ ,  $l_0$  oraz  $F$  otrzymano z maszyny wytrzymałościowej. Na rysunku poniżej przedstawiono zależność naprężenia w funkcji odkształcenia dla jednej z próbek. W wyniku tak przeprowadzonego testu otrzymano kilka przedziałów, w których zachowanie się kości jest liniowe i dla każdego z nich wyznaczono moduł Younga - Rysunek poniżej.



Rysunek 8-3. Przebieg testu wytrzymałościowego wraz z zaznaczonymi zakresami, które posłużyły do wyznaczenia modułu Younga.

W pierwszym zakresie, wybierano ostatni cykl (najbardziej miarodajny gdyż jest już ustalony kontakt między uchwytem a powierzchnią próbki), następnie wybierano te odcinki, w których nachylenia jest stałe oraz odcinek z3, w którym naprężenie zmniejszono do zera. Dla każdego z przedziałów wyliczono nachylenie z wykorzystaniem metody regresji liniowej. Otrzymano 3-4 wartości nachylenia prostej, która to jest równocześnie modułem Young'a. Skonfrontowano wyniki ze sobą, by sprawdzić ich prawidłowość. Jeżeli 3 pierwsze nachylenia zgadzają się w granicach błędu z nachyleniem 4, to oznacza, że nie została przekroczona granica sprężystości i nie zaszły nieodwracalne zmiany w strukturze rusztowania. Zdarzyły się przypadki nieodwracalne zniszczenia próbek, wynikało to z braku informacji o siłach, jakie można przyłożyć do kostki z danego materiału. Każde rusztowanie było ściskane w przynajmniej dwóch prostopadłych kierunkach w celu zbadania anizotropii modułu Younga (kierunek Z, – wzdłuż którego odbywało się drukowanie próbki oraz kierunek Y wybrany arbitralnie). Otrzymane wartości dla danej kości ściskanej w jednym kierunku podłużyły to wyznaczenia średniego modułu Younga w danym kierunku według zależności:

$$\bar{\lambda} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \lambda_i, \quad (3)$$

gdzie:

$n$  - liczba przedziałów, z których wyznaczono nachylenie

Odchylenie standardowe dla wartości średniej wyliczono z zależności:

$$s(\bar{\lambda}) = \sqrt{\frac{\sum (\bar{\lambda} - \lambda_i)^2}{n - 1}}, \quad (4)$$

gdzie :

$n$  – liczba otrzymanych nachyleń.

$\bar{\lambda}$  – wartość średnia uzyskanych wyników.

$\lambda_i$  – kolejny wynik pomiarów.

### 8.3 Spektroskopia UV-VIS (Źródło [18])

#### Wprowadzenie do spektroskopii UV/VIS

Spektroskopia w nadfiolecie, oraz świetle widzialnym UV/VIS (Ultraviolet/Visible Spectroscopy) jest jedną z metod stosowanych w badaniach struktury związków organicznych. Wykorzystywany do badań w tej spektroskopii jest obszar widma promieniowania elektromagnetycznego od 200 nm – 780 nm. Długość fali w tym obszarze podajemy najczęściej w nanometrach ( $1\text{ nm} = 10^{-9}\text{ m}$ ). Obszar promieniowania nadfioletowego UV rozciąga się od 100-380 nm. Wyróżnia się daleki ultrafiolet (długość fali 100-200 nm) oraz bliski ultrafiolet – (długość fali 200-380 nm). Dla celów chemii organicznej interesujący jest zakres bliskiego nadfioletu (bliski UV), natomiast daleki nadfiolet (próżniowy UV) dostępny jest dzięki zastosowaniu próżni (ze względu na absorpcje powietrza w tym obszarze). Stosuje się również podział ze względu na działanie na człowieka. Oznacza się, jako UV-A, promieniowanie o długości fali 320-380 nm. Promieniowanie UV-A przyspiesza procesy starzenia uszkodzając włókna kolagenowe w skórze. Długoletnia ekspozycja na duże dawki promieniowania UV-A może powodować zmętnienie soczewki, czyli zaćmę. Promieniowanie z zakresu 280-320 nm, tzw. UV-B, powoduje wytwarzanie witaminy D w skórze. Najbardziej niebezpieczne dla ludzkiego organizmu jest promieniowanie UV-C (długość fali 200-280 nm). Długa ekspozycja na działanie UV-C ma związek ze zwiększoną częstością występowania nowotworów skóry np. czerniaka. Widzialna część widma rozciąga się od 380nm do 780nm.

Energia pochłaniana w obszarze nadfioletu odpowiada przejściu elektronowemu ze stanu podstawowego, o niższej energii do stanu wzbudzonego o wyższej energii. Pochłaniana energia jest kwantowana tzn. odpowiada ściśle różnicy pomiędzy poziomami energetycznymi. Im mniejsza różnica energii pomiędzy poziomami tym większa długość fali promieniowania zaabsorbowanego:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}, \quad (5)$$

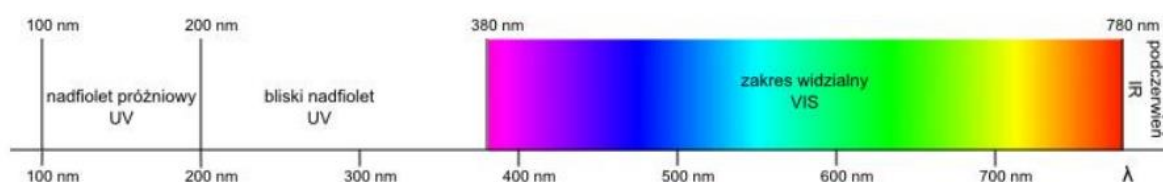
gdzie:

$h = 6,62 \times 10^{-34} \text{ [J} \times \text{s]}$  stała Plancka

$c = 3 \times 10^8 \text{ [m/s]}$  prędkość światła

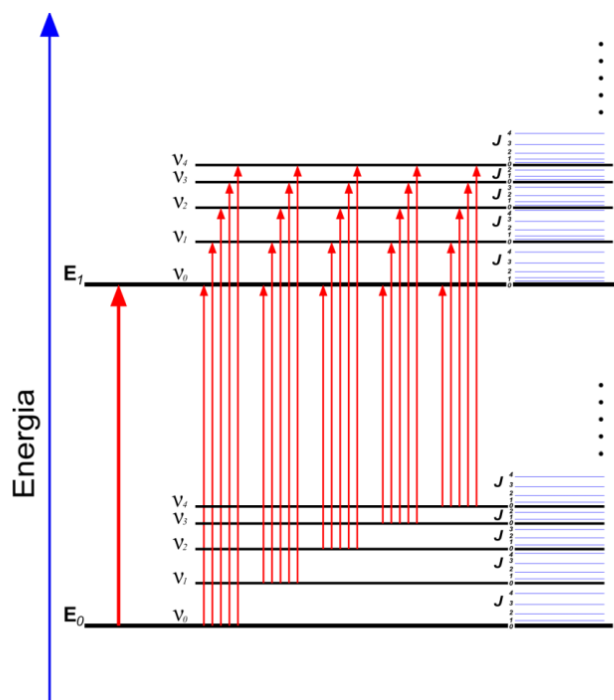
$\nu$  - częstotliwość [ $\text{s}^{-1}$ ]

$\lambda$  długość fali [nm].



Rysunek 17. Widmo promieniowania elektromagnetycznego charakterystyczny dla UV/VIS. (Źródło [18])

Widmo w obszarze UV/VIS nazywane jest elektronowym widmem absorpcyjnym, jednakże ściśle biorąc jest ono widmem elektronowo-oscylacyjno-rotacyjnym. Energia cząsteczki jest sumą energii elektronowej, oscylacyjnej i rotacyjnej. Poziomy energetyczne odpowiadające poszczególnym stanom przedstawiono na **wykresie 4**.

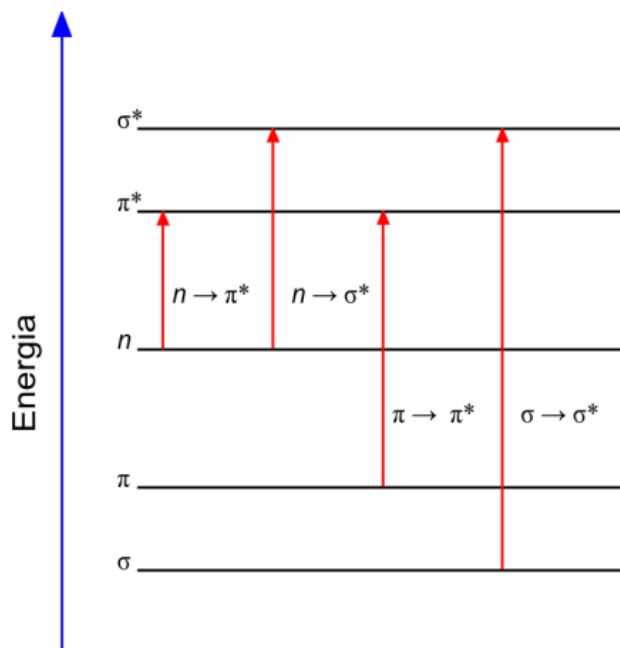


Wykres 4. Diagram poziomów energetycznych w cząsteczce. (Źródło [18])

Ponieważ przejściu elektronowemu towarzyszą przejścia z określonej sekwencji podpoziomów oscylacyjnych i rotacyjnych do odpowiedniej ich kombinacji w stanie wzbudzonym, widmo składa się z pasm absorpcyjnych, a nie pojedynczych linii.

W związkach organicznych absorpcja promieniowania w obszarze UV/VIS wywołuje zmiany stanów energetycznych elektronów walencyjnych (spektroskopia widm elektronowych), powoduje ona przeniesienie elektronu z jednego orbitalu na inny o wyższej energii **wykres 5**. Możemy wyróżnić tu przejścia związane z przeniesieniem elektronów wiązań pojedynczych  $\sigma$ , wielokrotnych  $\pi$  oraz elektrony wolnych par elektronowych  $n$ . Elektrony te mogą ulegać wzbudzeniu przechodząc na orbitale antywiązące  $\sigma^*$  lub  $\pi^*$  o wyższej energii. Widmo w nadfiolecie obserwuje się, gdy energia promieniowania elektromagnetycznego odpowiada energii odpowiedniego przejścia elektronowego. Pobudzenie elektronów  $\sigma$  wymaga największej energii, odpowiadającej światłu ultrafioletowemu o krótkiej długości fali (daleki ultrafiolet). Najczęściej obserwujemy przejścia związane z przeniesieniem elektronów  $\pi$  oraz  $n$ , związane z absorpcją promieniowania z obszaru bliskiego nadfioletu. W praktyce spektroskopia UV/VIS ogranicza się do układów sprzężonych, których przejścia elektronowe związane są z absorpcją promieniowania z zakresu 200 – 380 nm.





Wykres 5. Klasyfikacja przejść elektronowych (Źródło [18])

Widmo UV/VIS przedstawiane jest w postaci zależności absorbancji  $A$  od długości fali promieniowania  $\lambda$  (nm). Absorbancja wiązki promieniowania monochromatycznego przechodzącej przez jednorodny roztwór substancji jest wprost proporcjonalna do stężenia roztworu  $c$  i do grubości warstwy absorbującej (długości kuwety)  $l$  (prawo Lamberta-Beera):

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot l, \quad (6)$$

gdzie:

$I_0$  – natężenie promieniowania padającego na próbkę,

$I$  – natężenie promieniowania po przejściu przez próbkę

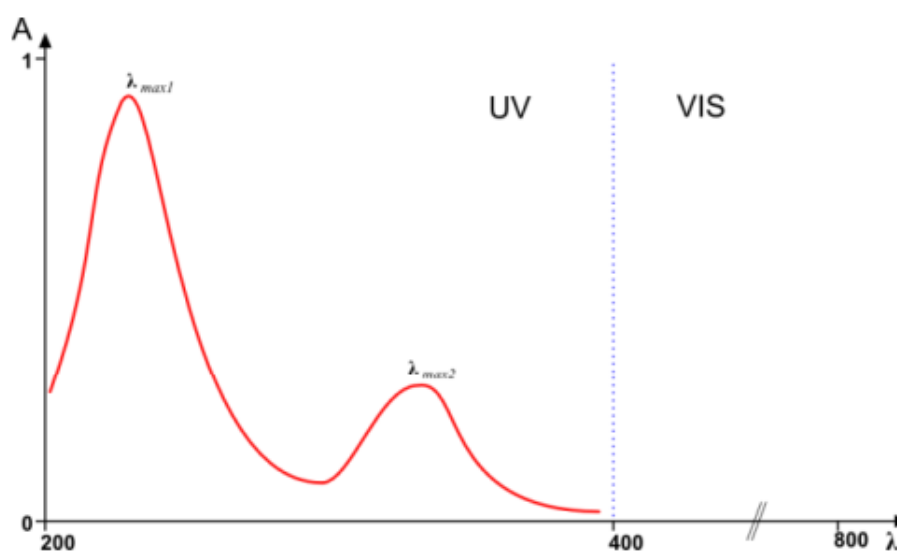
$\varepsilon$  – współczynnik absorpcji

$l$  – długość drogi optycznej

$c$  – stężenie roztworu

Absorbancja w starszej literaturze nazywana była absorpcją lub ekstynkcją.

Przy stosowaniu wyżej podanego wzoru wartości mogą być podawane w dowolnych jednostkach. Jeżeli jednak stężenie podawane jest w jednostkach mol/l, a grubość warstwy w centymetrach cm, to współczynnik absorpcji nazywamy molowym współczynnikiem absorpcji  $\epsilon$  lub współczynnikiem ekstynkcji (ekstynkcją)  $\epsilon$ . Widmo prezentowane jest w ten sposób, że linia podstawowa znajduje się na dole wykresu, absorpcji promieniowania odpowiada pasmo skierowane do góry wykresu. Widma UV/VIS rejestrowane są przeważnie dla związków w postaci gazowej lub w roztworze.



Wykres 6. Przykładowe widmo UV/VIS (Źródło [18])

Pasmo w widmach UV/VIS definiuje się, określając długość fali ( $\lambda_{\max}$ ), która odpowiada maksimum absorpcji. Drugim charakterystycznym parametrem widma UV/VIS jest intensywność absorpcji promieniowania, którą określamy podając wartość molowego współczynnika absorpcji  $\epsilon$ , dla długości fali  $\lambda_{\max}$ .

W omawianiu widm posługujemy się pojęciami:

Chromofor – grupa atomów odpowiedzialna za selektywną absorpcję elektronową w zakresie 180- 800 nm

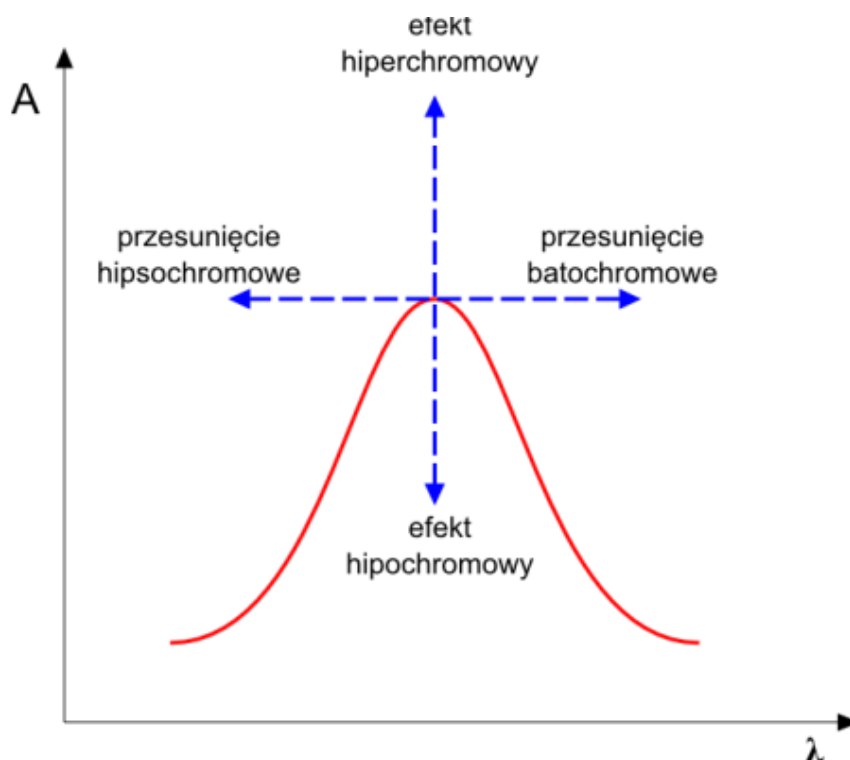
Auksochrom – grupa atomów, podstawnik, która przyłączona do chromoforu wpływa na położenie, a także na natężenie maksimum absorpcji

Przesunięcie batochromowe – przesunięcie pasma absorpcyjnego w kierunku fal dłuższych.

Przesunięcie hipsochromowe – przesunięcie pasma absorpcyjnego w kierunku fal krótszych.

Efekt hiperchromowy – podwyższenie natężenia pasma absorpcji.

Efekt hipochromowy - obniżenie natężenia pasma absorpcji.



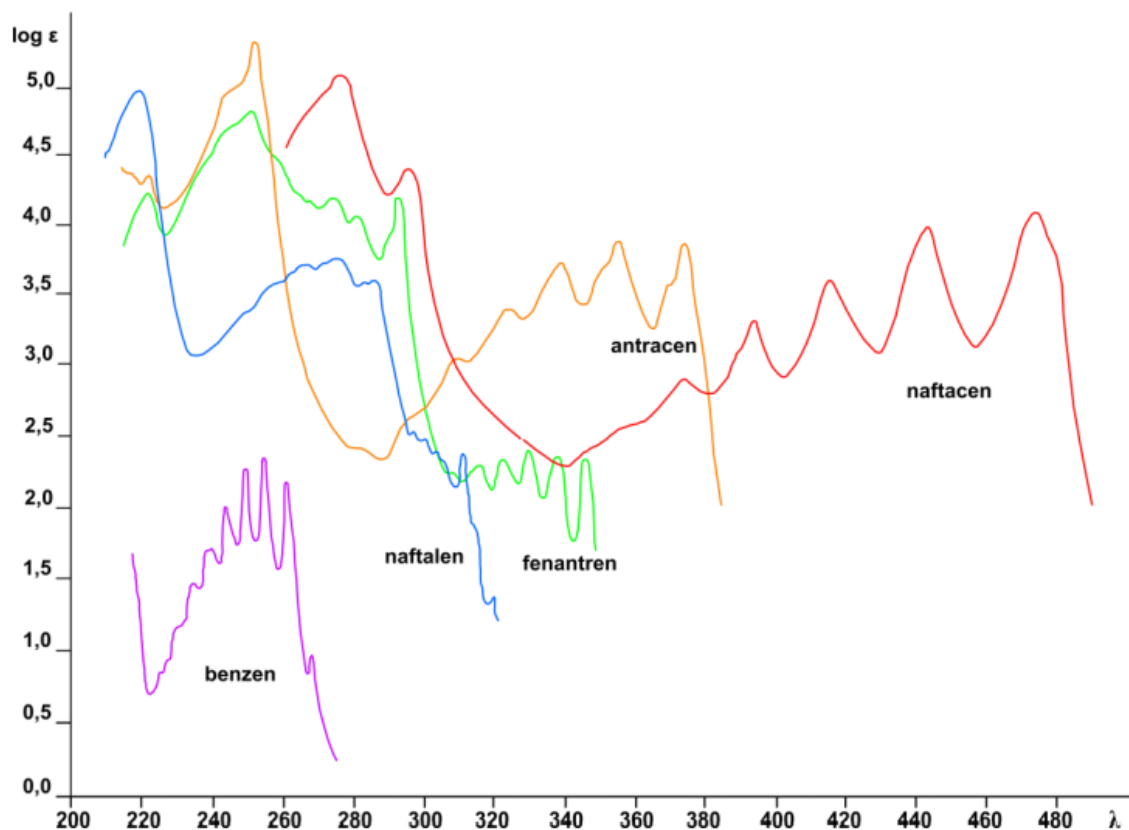
Wykres 7. Wyjaśnienie pojęć (Źródło [18])

Zastosowanie spektroskopii do ustalania struktury związków organicznych

Strukturę związków organicznych ustala się wykorzystując różne rodzaje spektroskopii, głównie spektroskopię IR oraz NMR. Natomiast widma UV/VIS zwykle pomocniczo służą do potwierdzenia, bądź wykluczenia obecności chromoforów w cząsteczce. Spektroskopia UV/VIS jest również wykorzystywana do określania wzajemnego położenia tych grup. Brak pasm absorpcyjnych odpowiadających danemu chromoforowi wyklucza jego obecność w związku. Natomiast obserwacja pasm charakterystycznych dla danego chromoforu nie przesądza o jego obecności w cząsteczce. Zdolność związku organicznego do pochłaniania promieniowania nadfioletowego zależy od jego struktury elektronowej. Właściwie wszystkie związki organiczne absorbują promieniowanie z

zakresu UV. Jednakże do badań użyteczne są związki, dla których częstość promieniowania zaabsorbowanego leży w bliskim nadfiolecie, co w praktyce.

Korzystając ze spektroskopii UV/VIS łatwo zidentyfikować związki zawierające sprzężony układ wiązań wielokrotnych, w tym związki aromatyczne (Wykres 8).



Wykres 8. Widmo UV/VIS związków aromatycznych (Źródło [18])

## 10. Wyniki

W celu analizy tempa degradacji i degradowalności wykonano 7 testów.

Tabela 10. Wykaz wykonywanych testów.

Test	Temperatura	Ilość obrotów na min	Czas inkubacji	Roztwór	Testowane rusztowania
1	37	300	4 dni	0,05M NaOH	0WP1Z2, 2WP1Z1, 3BWP1Z1
2	37	300	6 dni	0,05M NaOH	2WP1Z2, 3WP1Z1, 4BWP1Z1
3	37	300	4 dni	1M NaOH	5WP1Z2, 5WP1Z1, 1BWP1Z1
4	37	300	1 dzień	1M NaOH	8WP1Z2, 9WP1Z1
5a	37	300	1 dzień	1M NaOH	9BWP1Z1,
5b	37	300	3 dni	0,05M NaOH	12WP1Z2, 9WP1Z1
6	37	300	12 dni	1M NaOH	7WP1Z1
7	37	300	9 dni	0,05M NaOH	6BWP1Z1

## 10.1 Tempo degradacji, degradowalność i rzeczywisty czas degradacji<sup>(Źródło [13])</sup>

Zdefiniowanie pojęcia „polimer degradowalny” stanowi pewną trudność, ponieważ w zasadzie wszystkie związki wielkocząsteczkowe w warunkach użytkowania stopniowo ulegają procesom starzenia. Zatem należy wprowadzić pewnie dodatkowe kryteria, pozwalające na rozróżnienie polimerów degradowalnych od niedegradowalnych. Jednym z parametrów jest stosunek czasu degradacji polimeru ( $t_p$ ) do czasu życia człowieka ( $t_h$ ).

$$D = \frac{t_p}{t_h} \quad (7)$$

Polimer określa się jako degradowalny, gdy  $D \rightarrow 0$ , natomiast niedegradowalny gdy  $D \rightarrow \infty$ .

W naszym przypadku lepszym było by określenie stosunku czasu degradacji polimeru ( $t_p$ ) do czasu regeneracji tkanki kostnej ( $t_k$ ).

$$D = \frac{t_p}{t_k} \quad (8)$$

W związku z tym, że chcemy, aby rusztowanie było zastępowane przez tkankę kostną to degradacja nie może być zbyt szybka, ale polimer powinien ustępować osteocytom. Oznacza to, że będzie się dążyć do tego, aby stosunek ten wynosił  $<1-3$ ). Czas regeneracji tkanki kostnej w zależności od stopnia uszkodzenia wynosi od 3-9 miesięcy.

W celu poprawnego rozumienia jak przebiega proces degradacji w warunkach fizjologicznych wykorzystano dane z innych publikacji i zebrano na wykresie.

Warunki fizjologiczne w warunkach in-vitro uzyskuje się stosując mieszaną PBS i FBS.

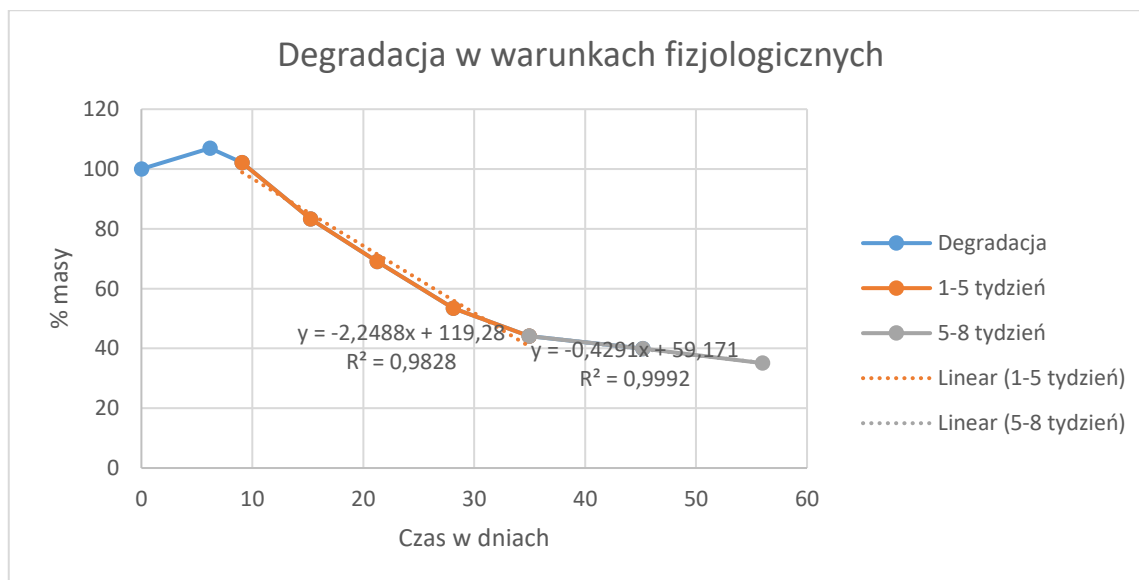
Przygotowanie PBS wygląda następująco:

Tabela 11. Skład PBS

Związek	Ilość do dodania (1x)	Końcowa koncentracja (1x)	Ilość do dodania (10x)	Końcowa koncentracja (10x)
H <sub>2</sub> O (koniecznie destylowana)				
HCl				
NaCl	8g	137mM	80g	1,37M
KCl	0,2g	2,7mM	2g	27mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44g	10mM	14,4g	100mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24g	1,8mM	2,4g	18mM

Rozpuścić reagenty w 800mL wody. Dostroić pH do 7.4 używając HCl. Dopełnić wodą do 1l. Końcowe koncentracje, do których będzie się dążyć zostały podane w tabeli 15.

Uzyskane dane dotyczą rusztowań o podobnym kształcie, rozmiarach i składzie. Dzięki temu można przełożyć degradację w przyspieszonych warunkach na warunki fizjologiczne. Wykonane to zostało poprzez porównanie nachyleń linii trendu poszczególnych pomiarach. Kolejne wyniki będą przedstawiane w odniesieniu do rzeczywistej degradacji w warunkach fizjologicznych.



Wykres 9. Degradacja rusztowań polimerowych w warunkach fizjologicznych (Źródło [16])

W przypadku degradacji w warunkach fizjologicznych ogólny trend prezentuje się jak ten na wykresie 14. Początkowy wzrost masy rusztowania polimerowego wynika z

pochłonięcia przez nich wody z otoczenia. Następnie następuje równomierny spadek masy od 8 dnia do 5 tygodni inkubacji do 44% początkowej masy. W późniejszym okresie spadek masy jest coraz mniejszy i w 8 tygodniu osiąga 35%.

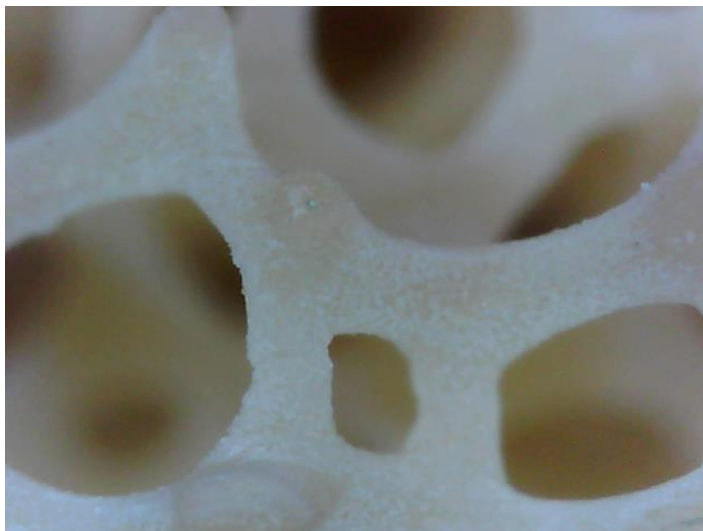
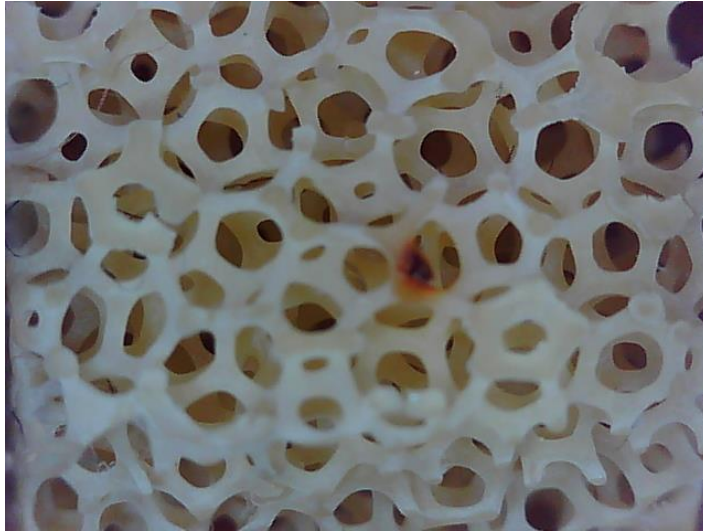
## 10.2 Morfologia włókien

Przy użyciu mikroskopu DinoLite przeprowadzono analizę morfologiczną rusztowań polimerowych. Zdjęcia wykonano z powiększeniem 50 i 200razy. Wyniki przedstawiono w tabelach poniżej.

*Tabela 12. Rusztowanie Z2 (Źródło własne)*







*Tabela 13. Rusztowanie Z1 utwardzane bez wody. (Źródło własne)*

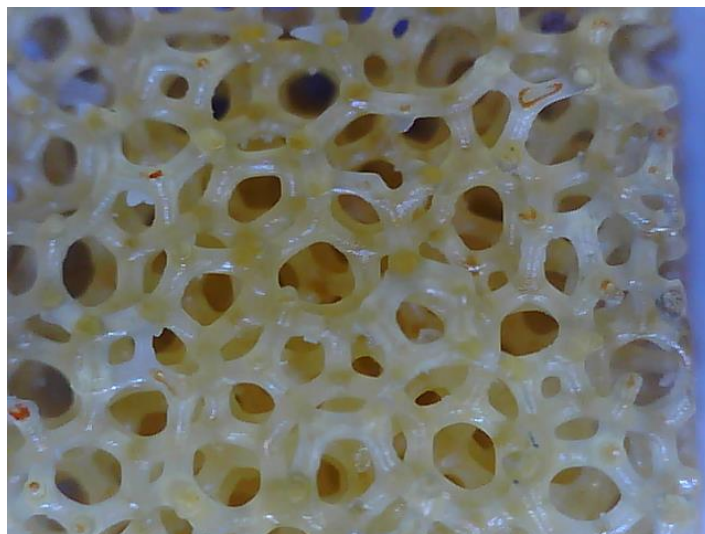
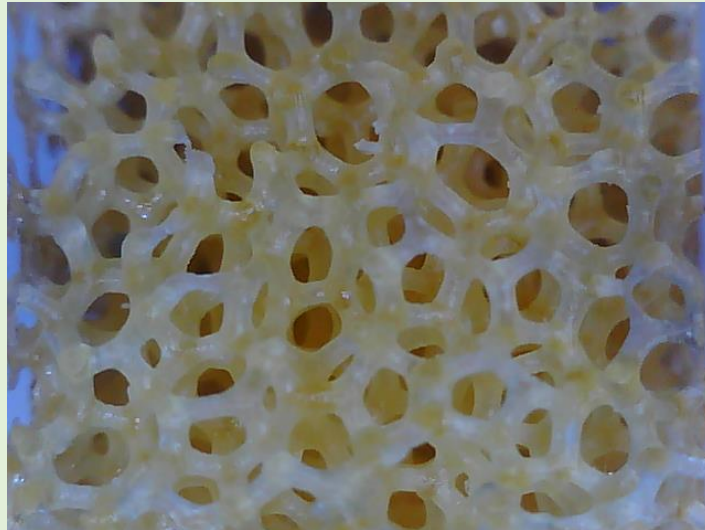
**Rusztowanie z mieszanki żywicznej Z1 utwardzane bez wody**



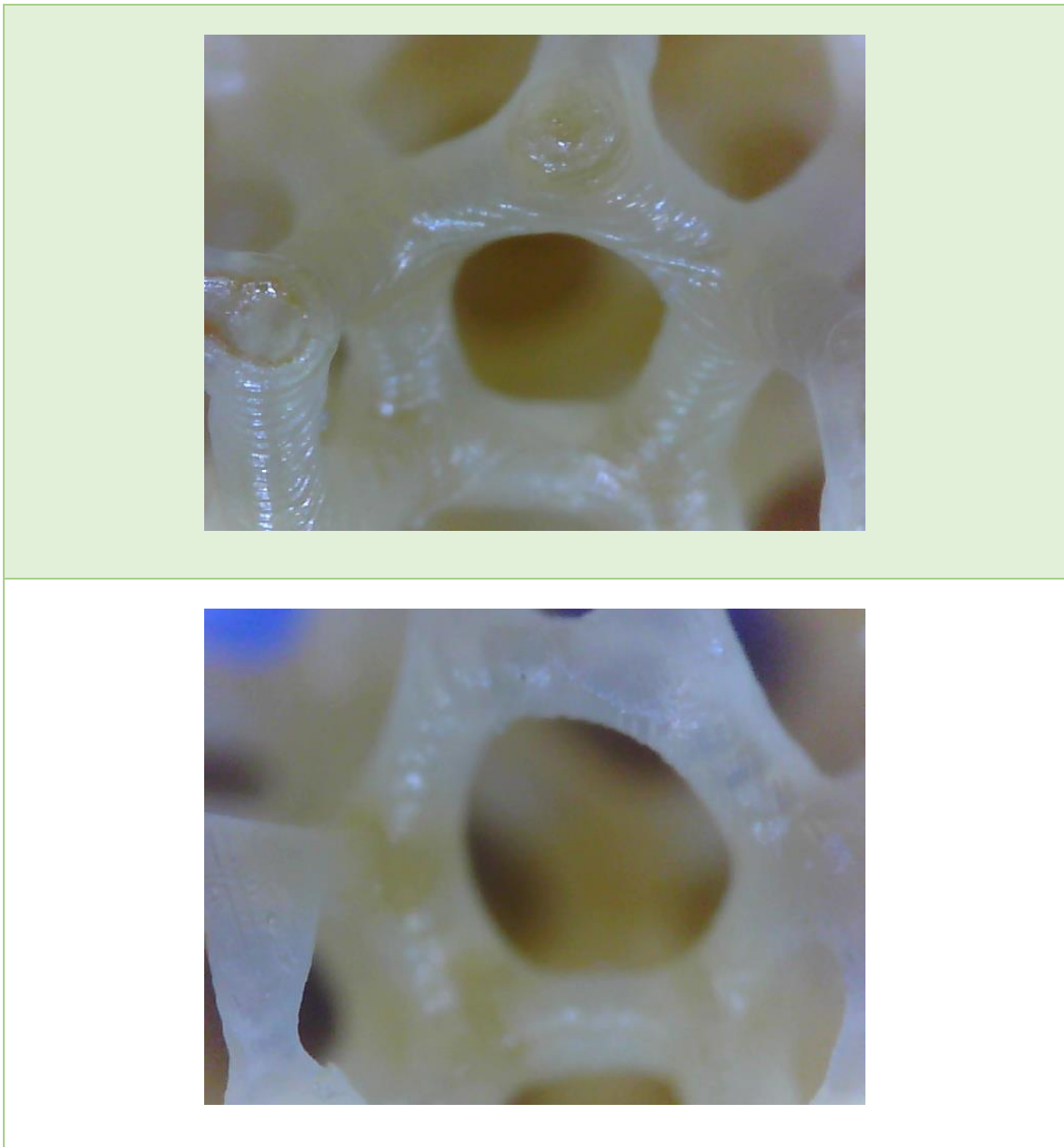


Tabela 14. Rusztowanie Z1 utwardzane w wodzie. (Źródło własne)

### Rusztowanie z mieszanki żywicznej Z1 utwardzane w wodzie







Morfologicznie struktury te są bardzo podobne do tkanki kostnej gąbczastej. Brakuje jedynie pewnej anizotropii w układzie beleczek. Struktura kości nie jest dokładnie izotropowa, co daje jej unikalne właściwości. Porowatość i grubość beleczek jest natomiast zadowalająca (z wyjątkiem rusztowania typu Z2).

W ramach tego eksperymentu ta izotropowość nie jest przeszkodą, co więcej ułatwia równomierne utwardzenie pod lampą UV.

Widać natomiast różnice pomiędzy tymi trzema rusztowaniami.

Na rusztowaniach HA, widać kryształki związku i jego beleczki są o wiele cieńsze od beleczek pozostałych dwóch rodzajów, wynika to zapewne z trudności z fotopolimeryzacją mieszanki z ciężkimi kryształkami HA, co za tym idzie porowatość jest nieco większa niż wynikałoby to z modelu, na podstawie, którego struktura została stworzona. Należy to brać pod uwagę przy drukowaniu kolejnych rusztowań z zastosowaniem HA.

Rusztowanie BW (utwardzane bez wody) i W (utwardzane z wodą) mają podobną grubość beleczek, jednak w wyniku naświetlania w innych warunkach zmieniły nieco kolor względem siebie. BW są bardziej przezroczyste, natomiast W mętne. Wynika to z reakcji zachodzących pod wpływem światła UV na polimer. Jeżeli w otoczeniu rusztowania znajduje się woda zostaje ona przyłączona i zmienia nieco parametry próbki.

### 10.3 Właściwości mechaniczne

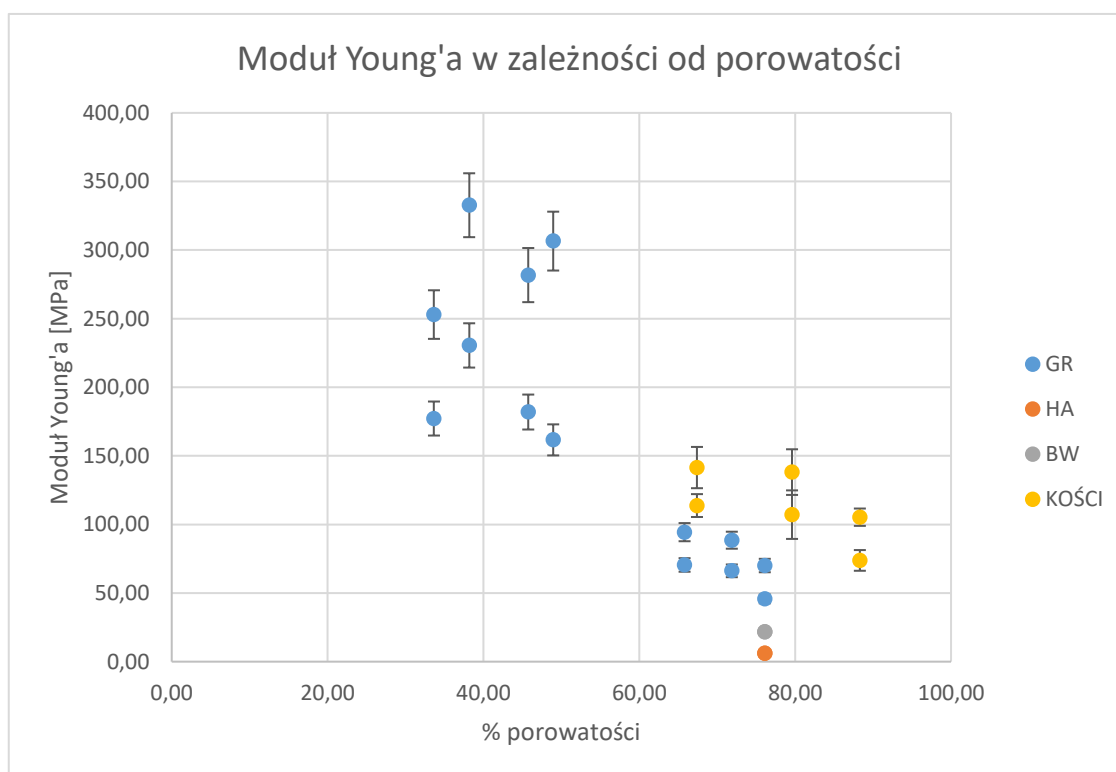
Analizę właściwości mechanicznych rusztowań należy rozpocząć od porównania ich do właściwości kości gąbczastej. W tabelce poniżej zebrano te informacje.

Tabela 15. Zebrane wartości modułu Young'a dla rusztowań polimerowych i tkanki kostnej. (Źródło [11])<sup>4</sup>

Nazwa	Moduł Younga	Odchylenie standardowe	Porowatość %
GR1_Y	70,06	4,90	76,10
GR1_Z	45,71	3,20	76,10
GR2_Y	88,52	6,20	71,87
GR2_Z	66,20	4,63	71,87
GR3_Y	94,38	6,61	65,81
GR3_Z	70,49	4,93	65,81
GR4_Y	161,65	11,32	48,95
GR4_Z	306,55	21,46	48,95
GR5_Y	181,95	12,74	45,75
GR5_Z	281,77	19,72	45,75
GR6_Y	230,50	16,13	38,17
GR6_Z	332,69	23,29	38,17
GR7_Y	177,21	12,40	33,65

<sup>4</sup> Odnośnik do pracy magisterskiej Mateusza Machniaka  
<https://misio.fis.agh.edu.pl/media/misiofiles/0af6f4c2e8df6aeac16966b39a2d349b.pdf>

<b>GR7_Z</b>	252,98	17,71	33,65
<b>HA_Y</b>	6,10	0,43	76,10
<b>HA_Y</b>	6,10	0,43	76,10
<b>BW_Y</b>	21,76	1,52	76,10
<b>BW_Z</b>	21,76	1,52	76,10
<b>K03RB1</b>	138,16	16,64	79,60
<b>K03RB2</b>	107,15	17,69	79,60
<b>K03RA1</b>	141,47	15,04	67,40
<b>K03RA2</b>	113,78	8,33	67,40
<b>K03LB1</b>	105,29	6,32	88,30
<b>K03LB2</b>	73,79	7,54	88,30

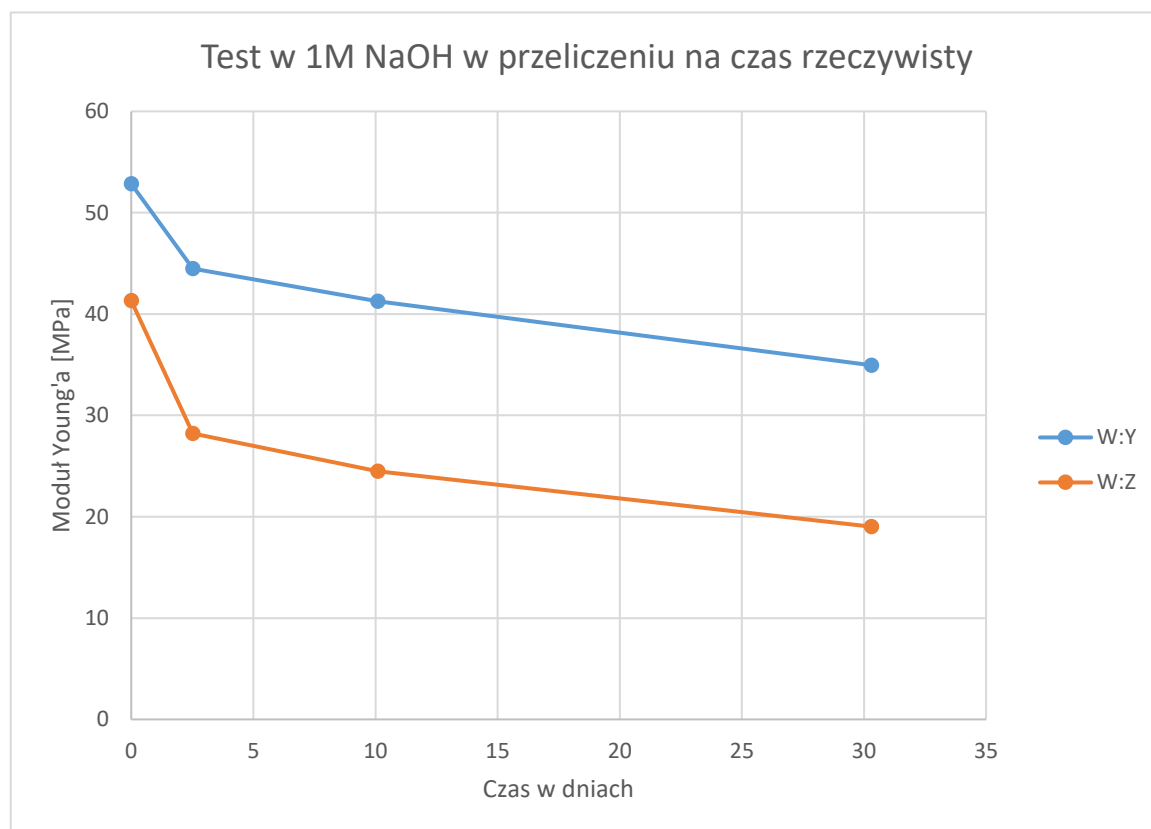


Wykres 10. Wykres zależności modułu Young'a od porowatości. (Źródło [11])

Najlepszym dopasowaniem co do wartości Modułu Young'a w stosunku do tych samych wartości tkanki kostnej charakteryzują się rusztowania WZ1 (utwardzane w wodzie, stworzone z mieszanki Z1). Rusztowania BW i HA mają dużo niższe wartości Modułu Young'a przy danej porowatości. Rusztowanie typu HA, mimo większego powinowactwa do tkanki kostnej pod względem składników, nie wykazuje odpowiednich właściwości mechanicznych. Należy natomiast zwrócić uwagę na fakt, że dopierając różne zawartości procentowe HA, można manipulować wartością modułu Young'a rusztowania.

Następnie analizowano wartość modułu Young'a w zależności od czasu i od inkubacji w roztworze NaOH o różnym stężeniu związku.

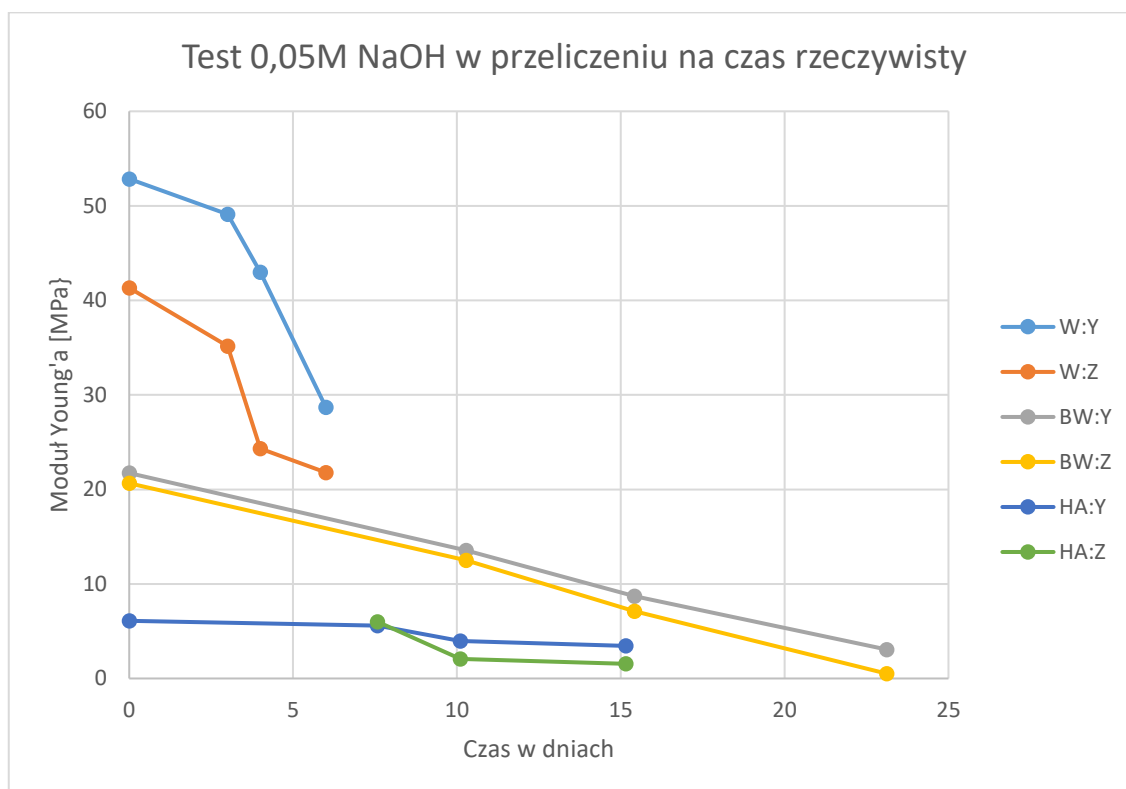
Zdecydowano się na badania rusztowań w roztworze zarówno 0,05M NaOH jak i 1M NaOH, ponieważ rusztowania Z1 nie wykazywały (jak się spodziewano) większych różnic w masie, rozmiarach i właściwościach mechanicznych, nawet po długich czasach inkubacji, dlatego podjęto się zwiększenia stężenia roztworu.



Wykres 11. Zmiana modułu Young'a w czasie w roztworze 1 MNaOH w przeliczeniu na czas rzeczywisty..

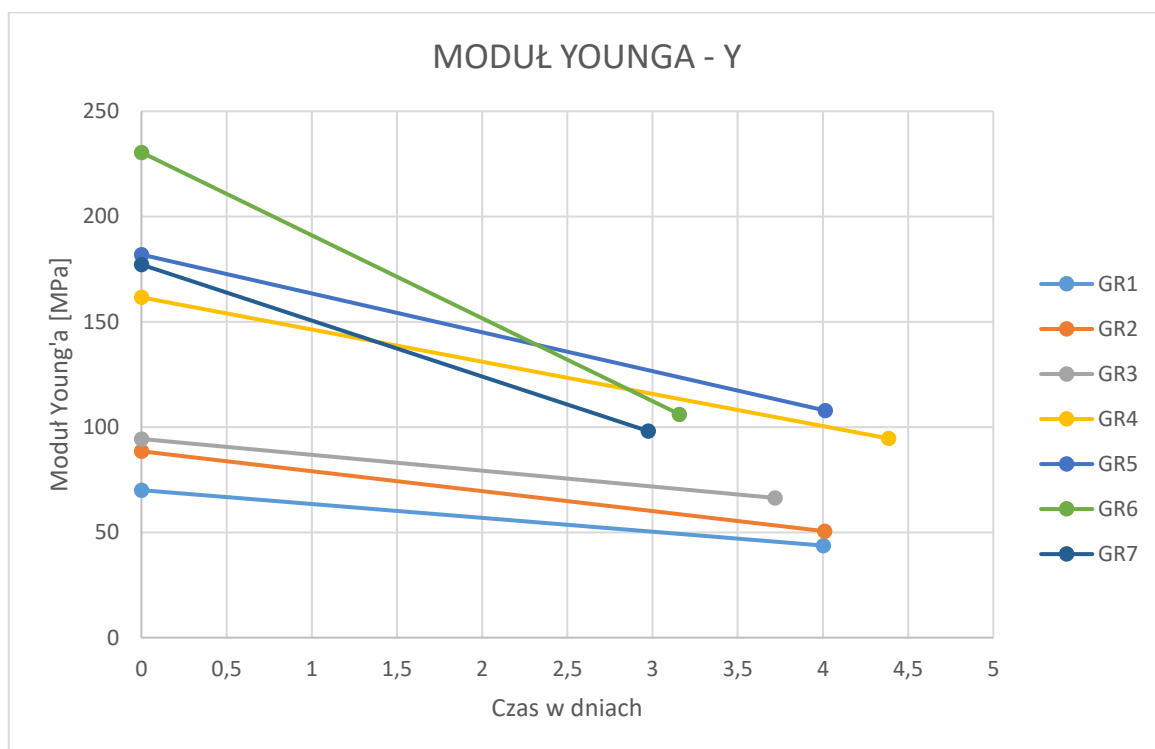
W przypadku kostki typu WZ1 w 1M NaOH zmiana właściwości mechanicznych odbywa się podobnie w obu kierunkach. Jest to powolny spadek wartości modułu Young'a do 40-50% początkowej wartości w 12 dniu.





Wykres 12. Zmiana modułu Young'a w czasie 0,05 MNaOH w przeliczeniu na czas rzeczywisty..

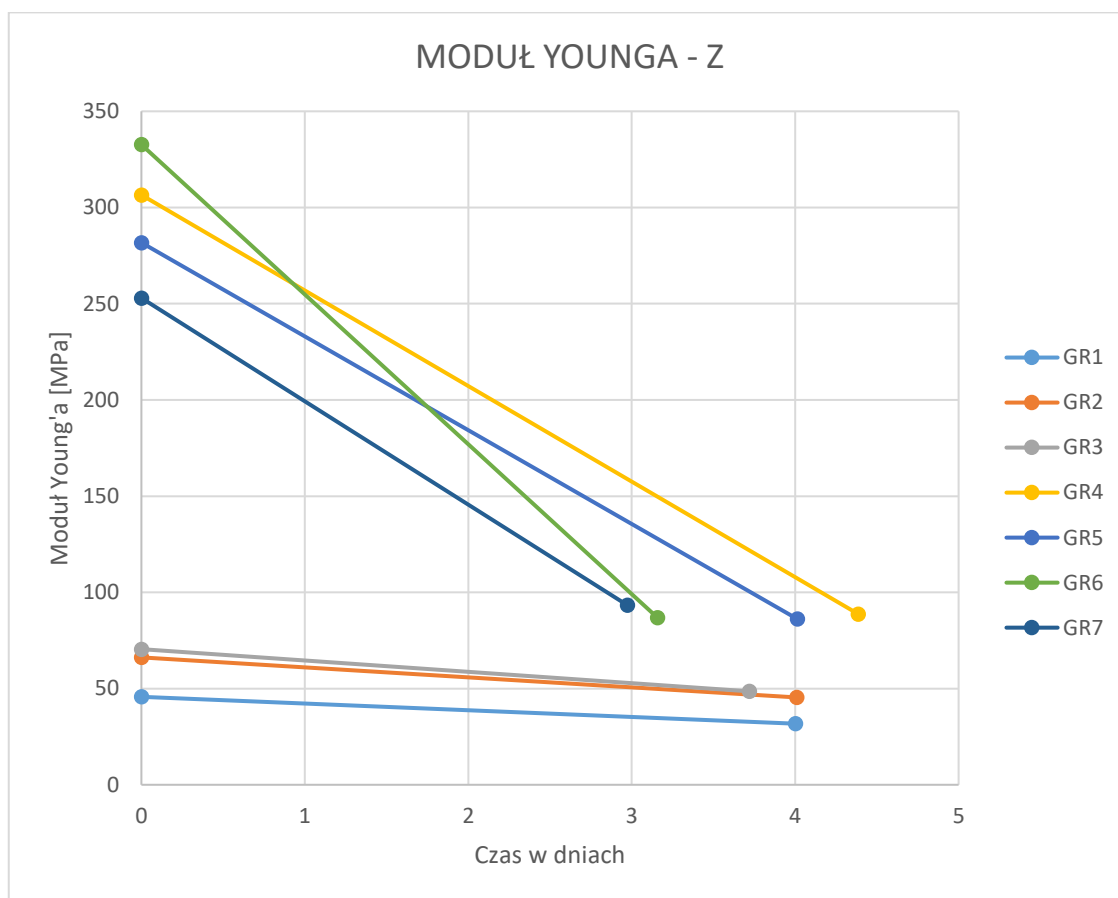
W eksperymencie z 0,05M NaOH rusztowanie typu WZ1 traci swoje właściwości mechaniczne nieco gwałtowniej. Próbkę typu BWZ1 po 9 dniach wykazują bardzo niskie wartości modułu Young'a, rzędu kilki MPa. Rusztowanie WZ2 mimo stabilnych wartości modułu Young'a w przebiegu eksperymentu nadal są one zbyt niskie, by utrzymać pozostałą część tkanki kostnej w warunkach fizjologicznych.



Wykres 13. Zmiana modułu Young'a w czasie 1MNaOH dla rusztowań gradientowych, kierunek Y w przeliczeniu na czas rzeczywisty...

Wykonanie kostek gradientowych udowodniło, że mimo zmniejszenia porowatości (a co za tym idzie zwiększenia ilości materiału w rusztowaniu nie pociąga za sobą równomiernego zwiększenia trwałości materiału.

Tworzą się w tym wypadku dwie grupy rusztowań o porowatości  $< 50\%$  i  $> 50\%$ . Te powyżej  $50\%$  mają dużo większą wartość modułu Young'a, jednak nie ma w nich tendencji, im mniejsza porowatość tym większy moduł Young'a. W drugiej grupie natomiast, gdzie wartości modułu Young'a są niższe widać zależność porowatości od właściwości mechanicznych.

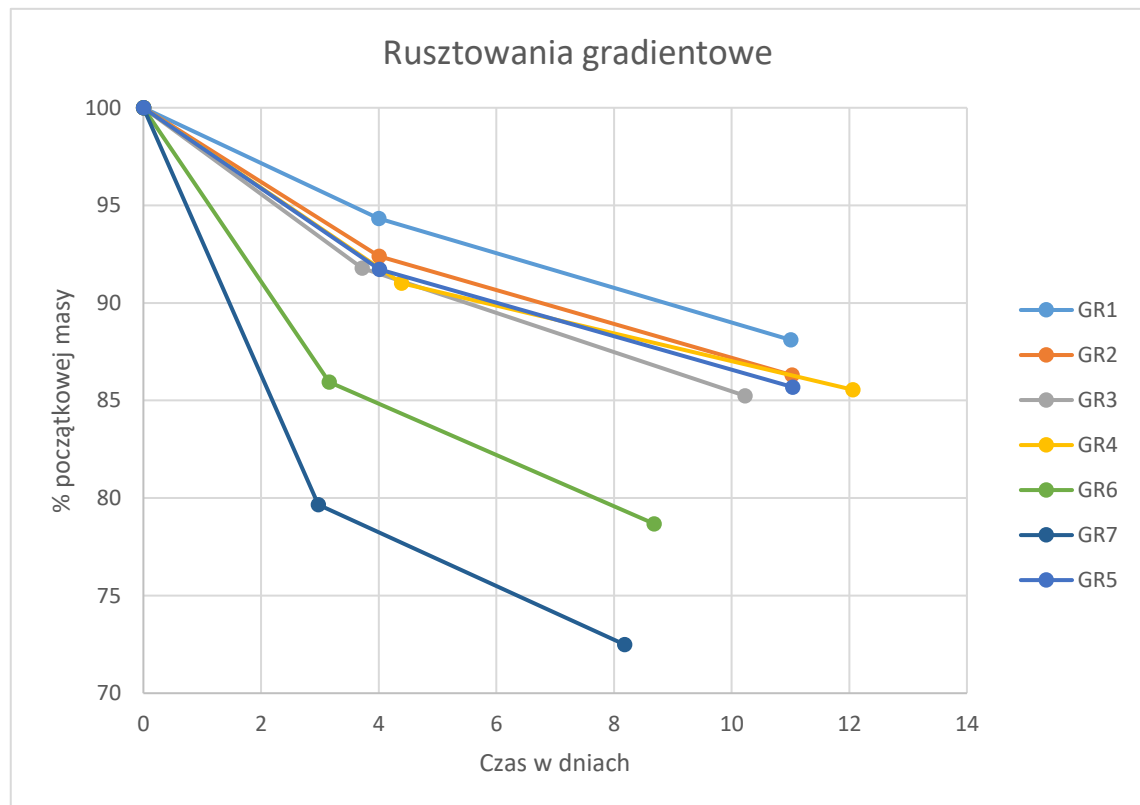


Wykres 14. Zmiana modułu Young'a w czasie 1MNaOH dla rusztowań gradientowych, kierunek Z w przeliczeniu na czas rzeczywisty...

Największymi wartościami modułu Young'a charakteryzują się kostki GR6 oraz GR4, natomiast po 3,4 dniach w roztworze 1M NaOH rusztowania GR4-GR7 dążą do tej samej wartości modułu Young'a około 90MPa-100MPa.

### 11.3.1 Masa

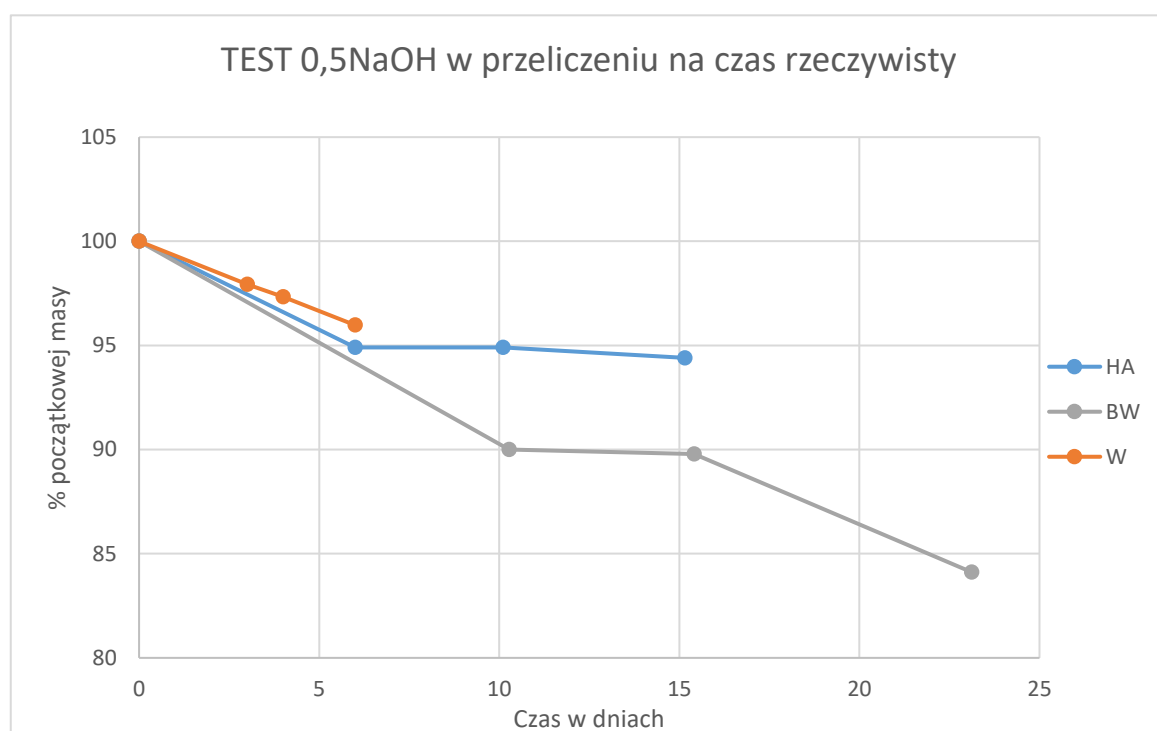
#### 11.3.1.1 Rusztowania gradientowe



Wykres 15. Zmiana masy rusztowań gradientowych.

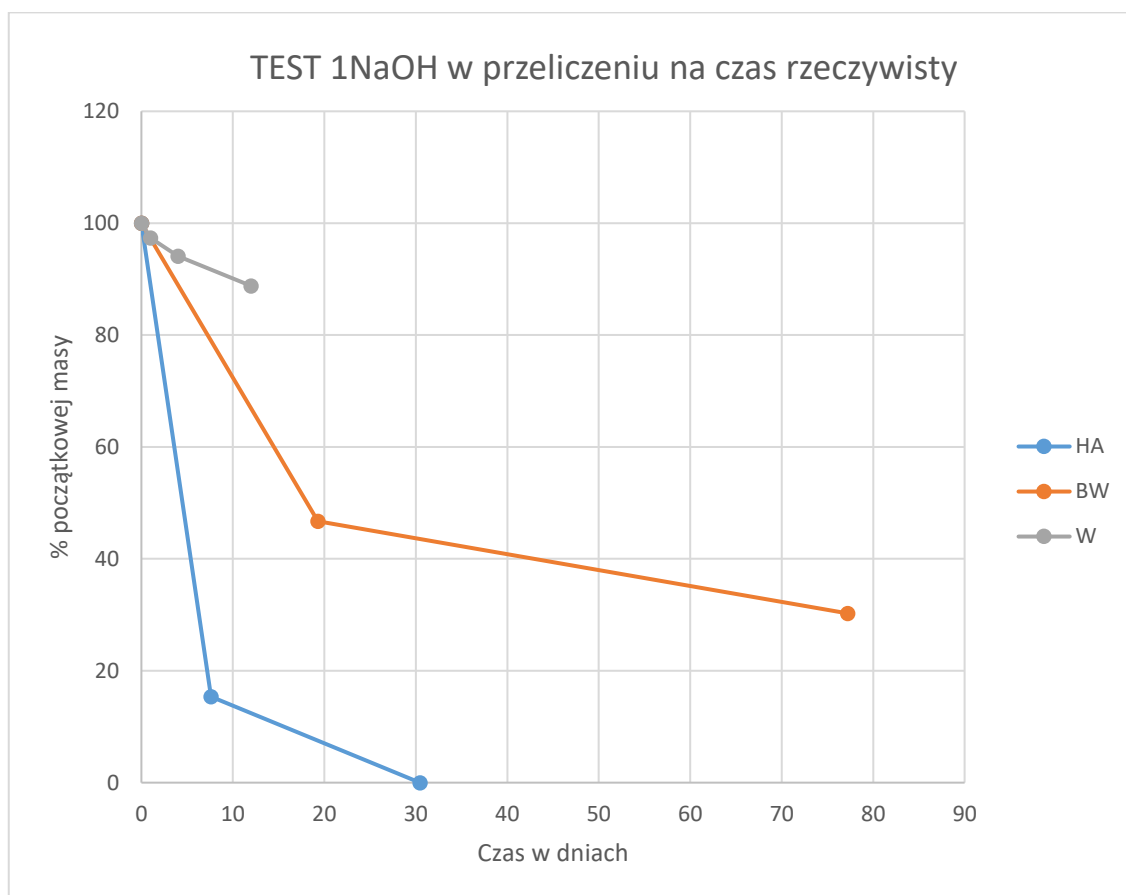
W przypadku zmian masy rusztowania gradientowe zachowują się zupełnie niezgodnie z oczekiwaniami. Im mniejsza porowatość tym szybciej spada masa. Wynika to zapewne z tego, że nie zostały one odpowiednio utwardzone, ze względu na grube beleczki, przez co wewnątrz pozostało miękkie i szybko degradowało.

### 11.3.1.2 Rusztowania przygotowane z różnych mieszanek żywicznych



Wykres 16. Zmiana masy w czasie w roztworze 0,05NaOH w przeliczeniu na czas rzeczywisty..

Zgodnie z oczekiwaniami, rusztowanie z dodatkiem hydroksyapatytu degraduje szybciej niż to z żywicy Z1. Widać również różnice pomiędzy próbkami typu W i BW. Te utwardzane w wodzie są dużo trwalsze.



Wykres 17. Zmiana masy w czasie w roztworze 1MNaOH w przeliczeniu na czas rzeczywisty.

W teście z 1M NaOH potwierdziły się obserwacje z testu 0,05M NaOH. Szybciej jednak tym razem degradowała kostka typu WZ2.

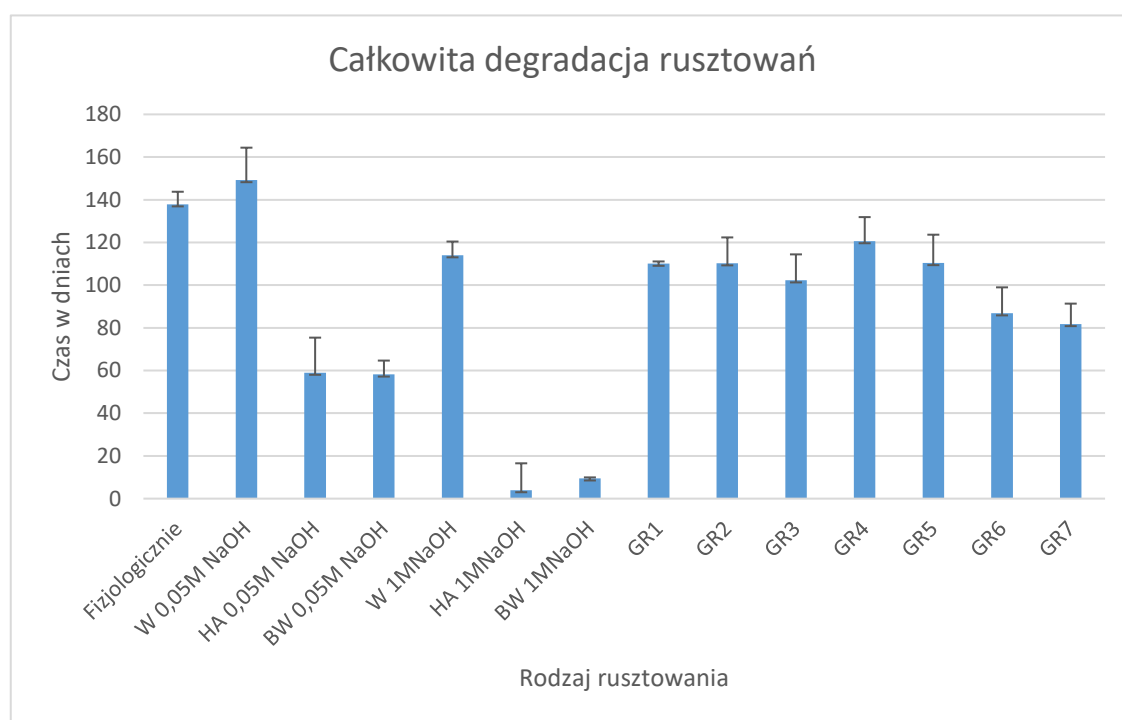
Dobrano następnie linię trendu do każdej serii pomiarów i porównano z tą, która jest sztandarowa dla degradacji w warunkach fizjologicznych i przewidziano jak szybko nastąpi całkowita degradacja danego rusztowania. Informacje zebrano w tabelce.

Tabela 16. Porównanie czasu degradacji.

Warunki	Czas całkowitej degradacji [dni]	Niepewność [dni]	Czas całkowitej degradacji [h]	Niepewność [h]
Fizjologicznie	53	6	1278	141
	138	15	3309	364
W 0,05M NaOH	149	16	3582	394
HA 0,05M NaOH	59	6	1416	156

<b>BW 0,05M NaOH</b>	58	6	1396	154
<b>W 1MNaOH</b>	114	13	2737	301
<b>HA 1MNaOH</b>	4	0,3	96	11
<b>BW 1MNaOH</b>	10	1	228	25
<b>GR1</b>	110	12	2641	291
<b>GR2</b>	110	12	2646	291
<b>GR3</b>	102	11	2455	270
<b>GR4</b>	121	13	2895	318
<b>GR5</b>	110	12	2649	291
<b>GR6</b>	87	10	2084	229
<b>GR7</b>	82	9	1963	216

Celem lepszego zobrazowania wyników przygotowano wykres kolumnowy.



Wykres 18. Różnica w degradacji rusztowań w zależności od rodzaju rusztowania i stężenia NaOH.

Zwrócono również uwagę na to, w jakim stopniu NaOH przyspiesza proces degradacji w przypadku poszczególnych próbek.

Tabela 17. Przyspieszenie degradacji w roztworze NaOH

Warunki	Czas całkowitej degradacji [dni]	Przyspieszenie degradacji
<b>Fizjologicznie</b>	138	
<b>W 0,05M NaOH</b>	149	-8%
<b>HA 0,05M NaOH</b>	59	57%

<b>BW 0,05M NaOH</b>	58	58%
<b>W 1MNaOH</b>	114	17%
<b>HA 1MNaOH</b>	4	97%
<b>BW 1MNaOH</b>	10	93%
<b>GR1</b>	110	20%
<b>GR2</b>	110	20%
<b>GR3</b>	102	26%
<b>GR4</b>	121	13%
<b>GR5</b>	110	20%
<b>GR6</b>	87	37%
<b>GR7</b>	82	41%

Wartość -8% sugerująca, że brak przyspieszenia degradacji w przypadku rusztowania WZ1 w roztworze 0,05M NaOH wynika z podobnego tempa rozpadu w obu roztworach. Próbkę WZ1 wykazują się niezwykłą trwałością i wolną degradacją.

Podobnie jak w wypadku wartości modułu Young'a, najlepszym przybliżeniem degradacji w warunkach fizjologicznych jest wykorzystanie rusztowania typu WZ1.

Rusztowanie HA rozkłada się dużo szybciej w roztworze 1MNaOH niż w roztworze 0,05M NaOH, podobnie rusztowanie BWZ1, wystarczy 4-10 dni do całkowitej degradacji.

Ciekawym aspektem jest zwrócenie uwagi na to, że wybór metody utwardzania ma niebagatelne znaczenie dla trwałości rusztowania.

Próbki typu WZ1 są dużo bardziej wytrzymałe od tych samych BWZ1.

Można w tym miejscu wrócić do tematu tempa degradacji omówionego w rozdziale 11.3.

Wyniki zebrano w tabelce.

*Tabela 18. Wyznaczenie degradowalności*

<b>Rusztowanie</b>	<b>Całkowita degradacja (NaOH) [dni]</b>	<b>Całkowita degradacja (w warunkach rzeczywistych) [dni]</b>	<b>Niepewność [dni]</b>	<b>D</b>
<b>W</b>	149	149	10	1,66
<b>BW</b>	85	106	7	1,18
<b>HA</b>	33	41	3	0,46
<b>GR1</b>	110	138	12	1,53
<b>GR2</b>	110	138	12	1,53
<b>GR3</b>	102	128	11	1,42

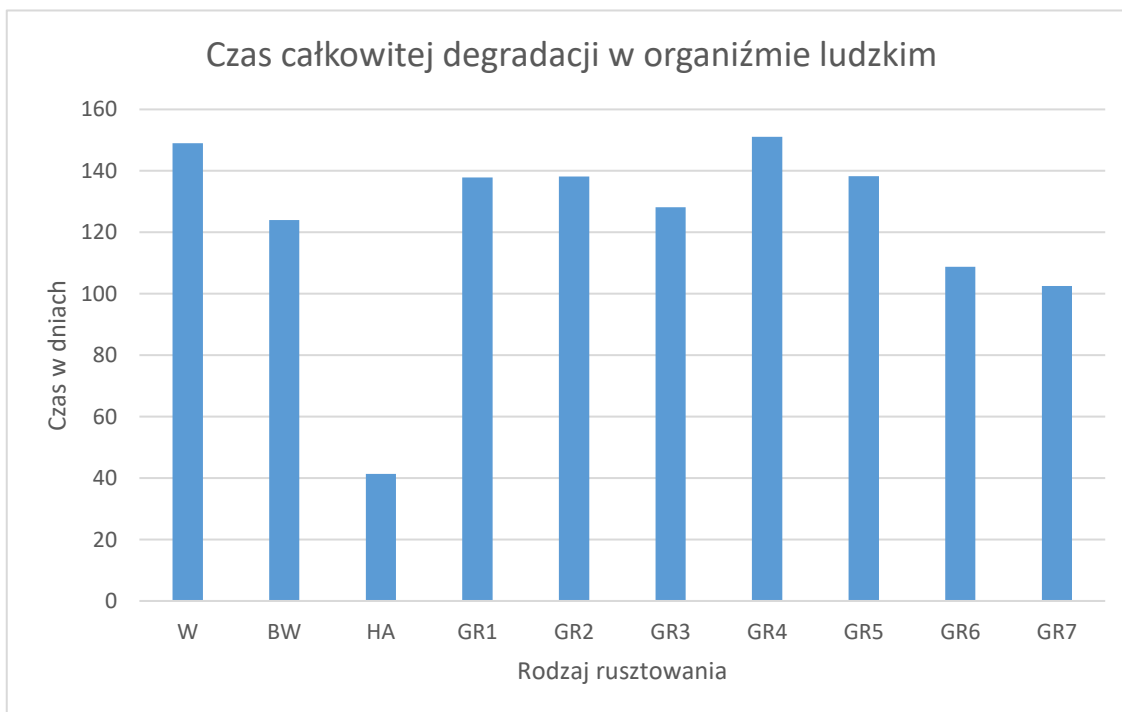


<b>GR4</b>	121	151	13	1,68
<b>GR5</b>	110	138	12	1,54
<b>GR6</b>	87	109	10	1,21
<b>GR7</b>	82	102	9	1,14

Tabela 19. Wyznaczenie biodegradowalności.

Rusztowanie	Całkowita degradacja (NaOH) [h]	Całkowita degradacja (w warunkach rzeczywistych) [h]	Niepewność [h]	D
<b>W</b>	3576	3576	250	1,66
<b>BW</b>	2040	2556	179	1,18
<b>HA</b>	792	992	69	0,46
<b>GR1</b>	2641	3309	291	1,53
<b>GR2</b>	2646	3316	291	1,53
<b>GR3</b>	2455	3076	270	1,42
<b>GR4</b>	2895	3627	318	1,68
<b>GR5</b>	2649	3319	291	1,54
<b>GR6</b>	2084	2611	229	1,21
<b>GR7</b>	1963	2460	216	1,14

Tabela 20. Rzeczywisty czas degradacji poszczególnych rusztowań.



W związku z tym, że użycie roztworu 1M NaOH daje przyspieszenie degradacji rzędu 90% dla rusztowań typu BWZ1 oraz WZ2, wyniki ich zostały pominięte.

Docelowo tempo degradacji powinno wynosić  $D = \langle 1;3 \rangle$

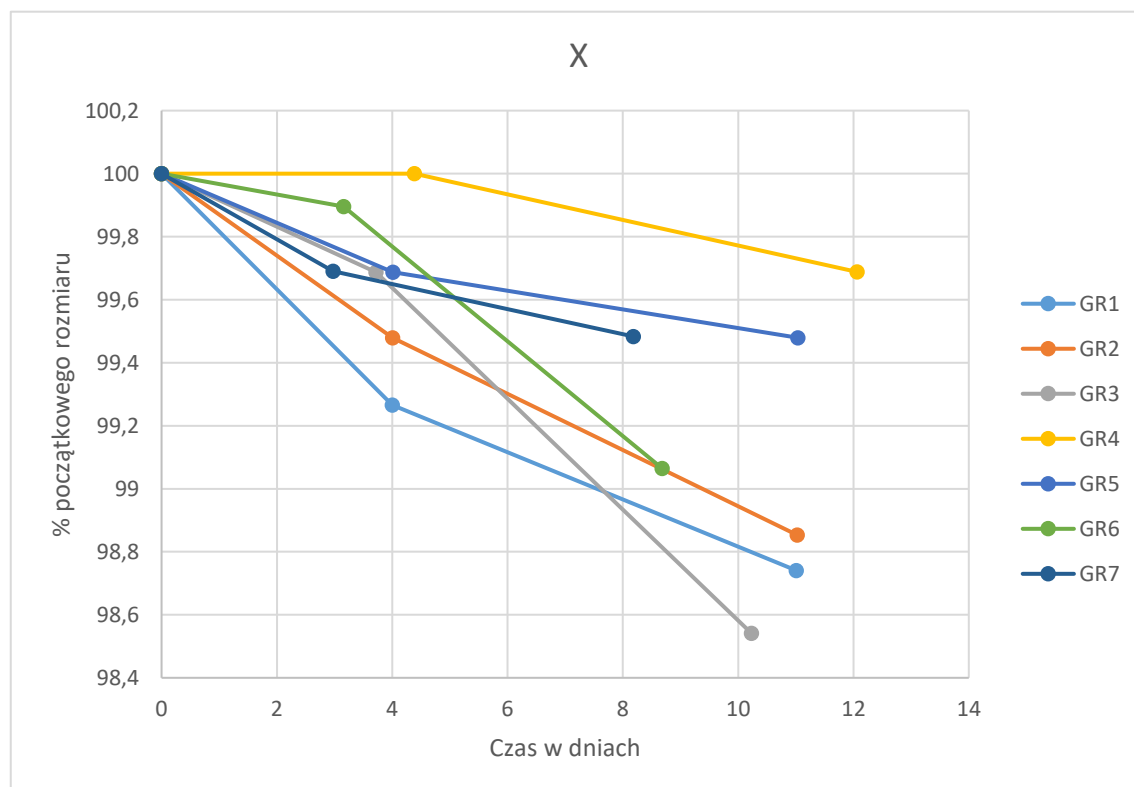
Z danych zawartych w tabelce 18 wynika, że jedynie rusztowanie typu WZ1. Próbkę typu BWZ1 i WZ2 degradują dużo szybciej. Osteocyty, a konkretnie osteoblasty nie byłyby w stanie nadrobić narastania za znikające rusztowanie.

Kolejnym interesującym aspektem jest fakt, że rusztowanie typu BWZ1 degraduje się szybciej niż pozostałe dwa (przynajmniej w wypadku roztworu 0,05M), co znowu zwraca uwagę na sposób utwardzania, jako narzędzie do manipulacji właściwościami materiału.

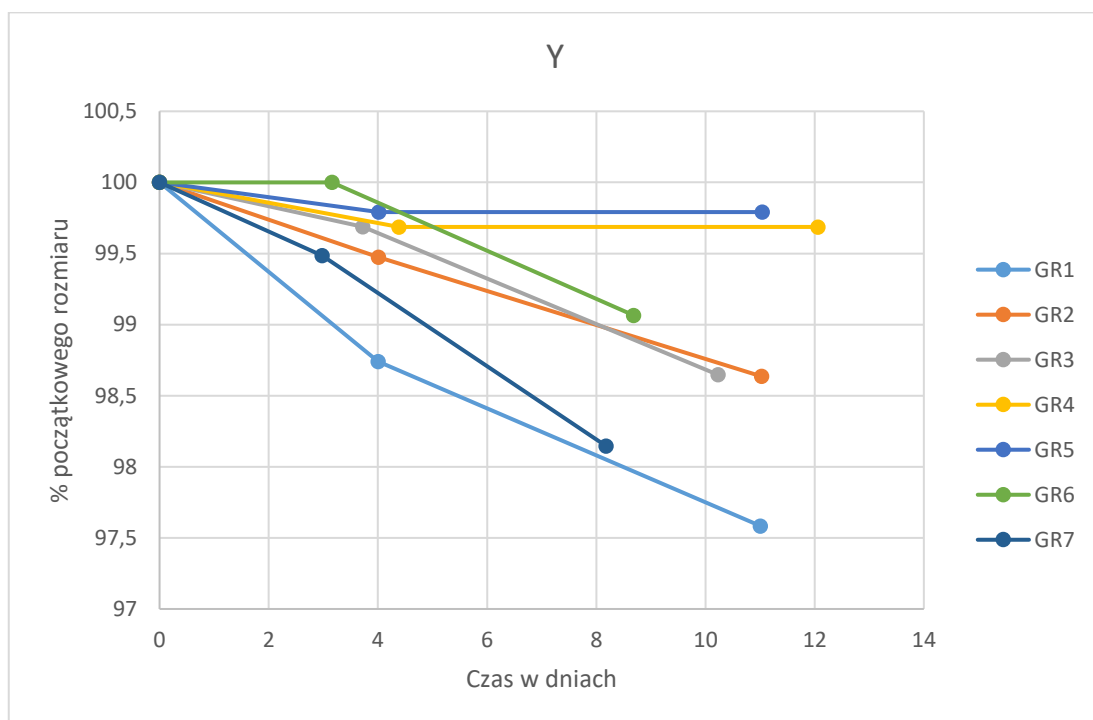
Ciekawie również zachowują się rusztowania o małej porowatości. Spodziewano się, że będą one najtrwalsze i będą najdłużej degradować, okazało się jednak inaczej. Najdłuższym czasem degradacji charakteryzuje się rusztowanie GR4. Powodem takiej sytuacji może być to, że w przypadku zbyt grubych beleczek kostnych zwykle utwardzanie w lampie UV może być niewystarczające i wewnątrz próbki pozostają rejonu nadal miękkie, które bardzo szybko rozkładają się w roztworze NaOH.

### 11.3.3 Rozmiary

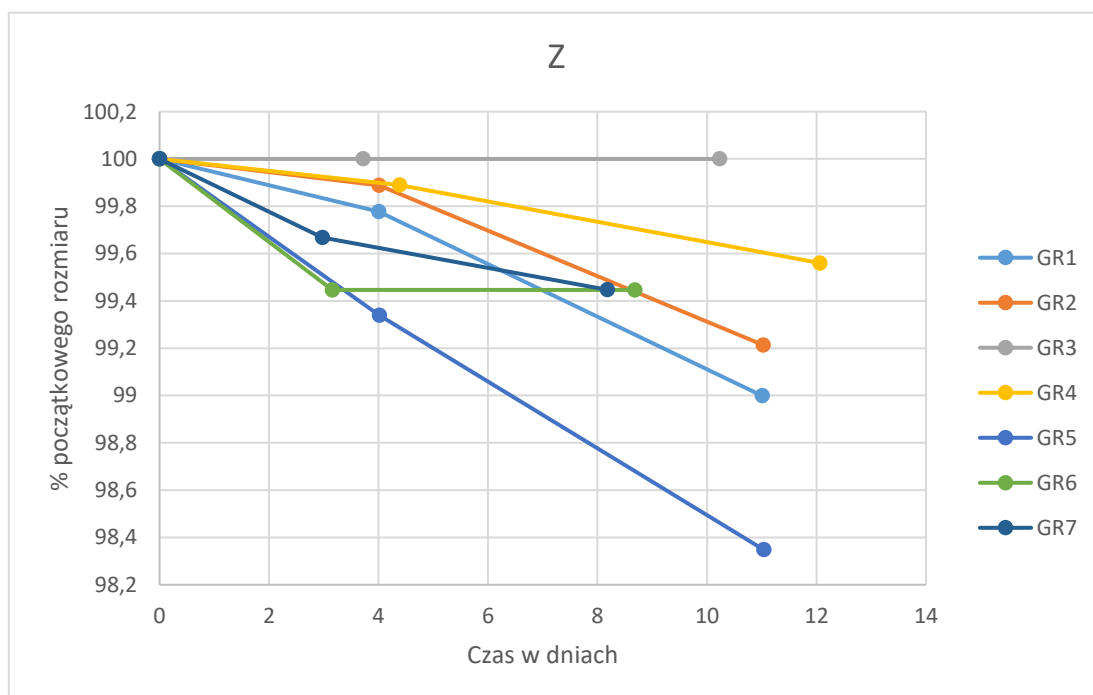
#### 11.3.3.1 Rusztowania gradientowe



Wykres 19. Zmiana rozmiarów rusztowań gradientowych w kierunku X w przeliczeniu na czas rzeczywisty.



Wykres 20. Zmiana rozmiarów rusztowań gradientowych w kierunku Y w przeliczeniu na czas rzeczywisty.

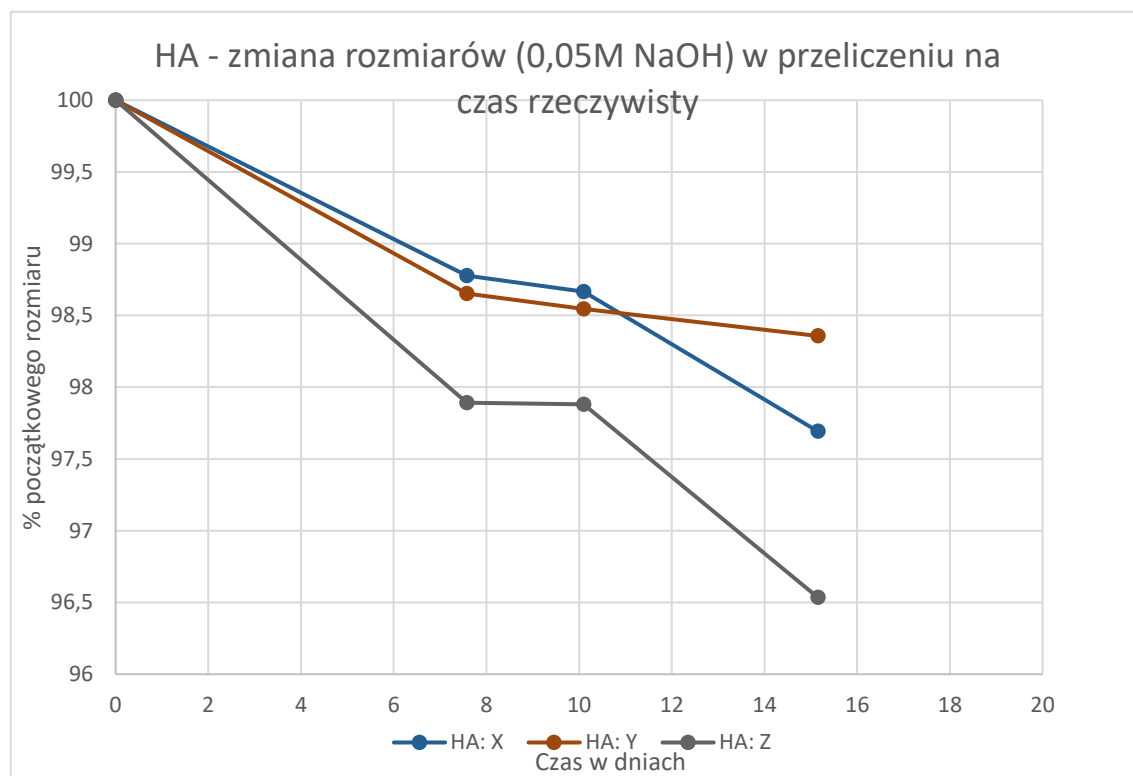


Wykres 21. Zmiana rozmiarów rusztowań gradientowych w kierunku Z w przeliczeniu na czas rzeczywisty.

W przypadku rusztowań gradientowych w 1MNaOH, nie obserwuje się żadnej ciekawej tendencji do zmian rozmiarów, wynika to z faktu, że próbki mogą być nierównomiernie

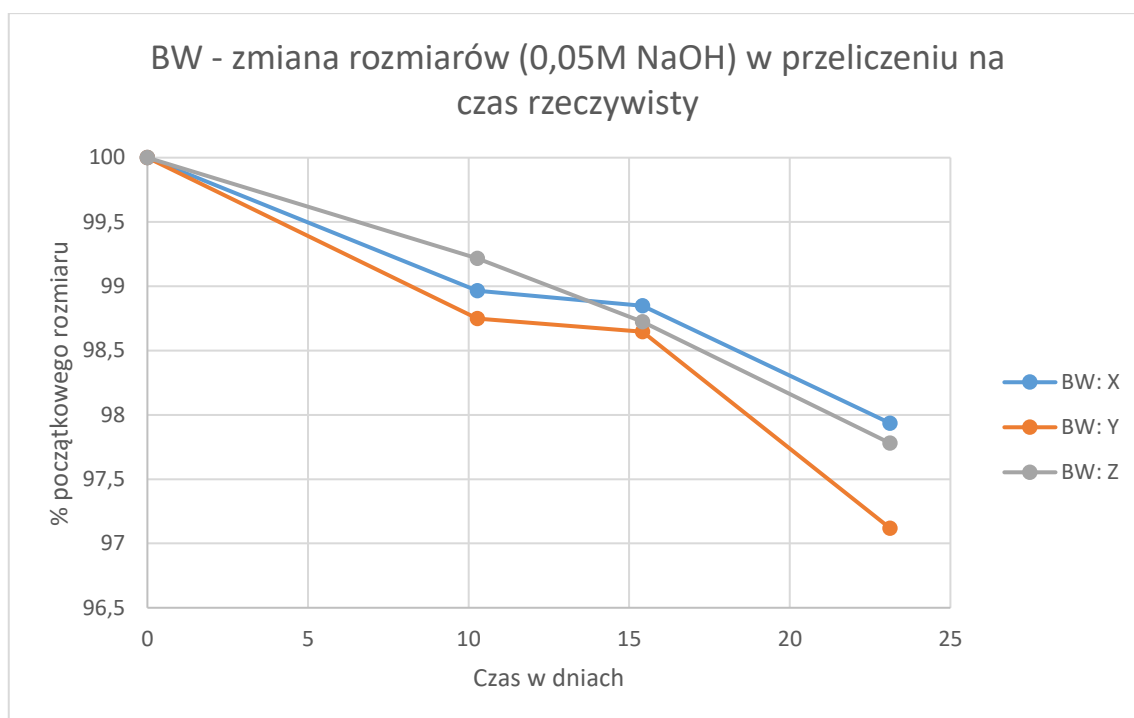
naświetlone lub pływać na powierzchni cieczy zanim się całkowicie zanurzą i przez to niepewność w pomiarach zmiany długości.

### 11.3.3.2 Rusztowania przygotowane z różnych mieszanek żywicznych



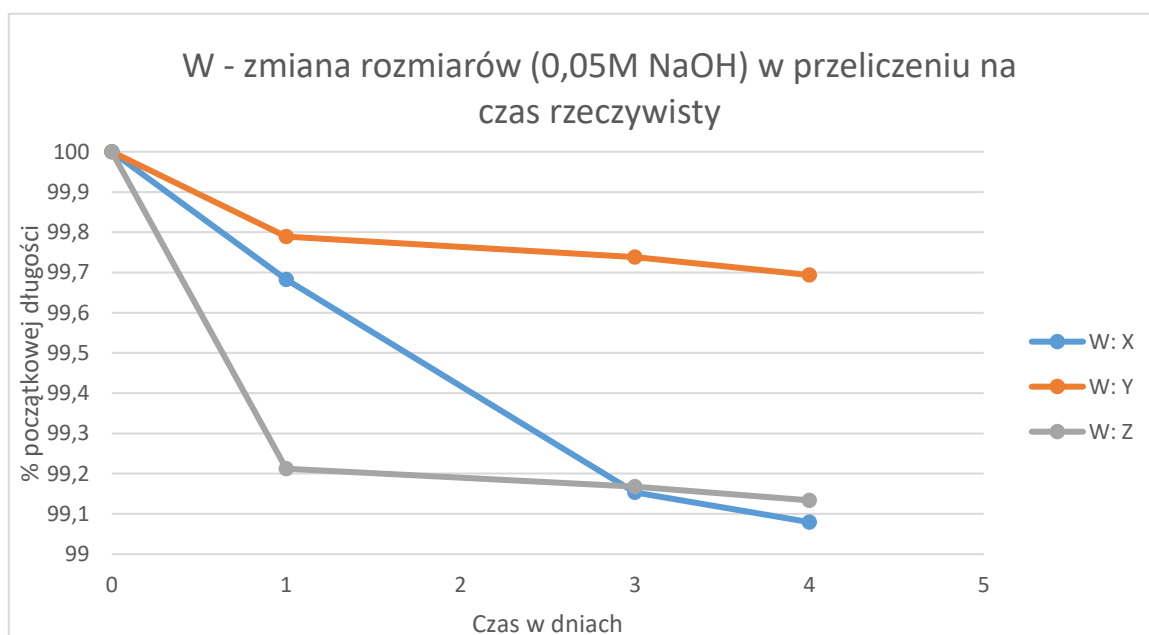
Wykres 22. Zmiana rozmiarów rusztowania typu WZ2 w przeliczeniu na czas rzeczywisty.

W przypadku rusztowań typu WZ2 obserwuje się idealne odwzorowanie budowy takiej próbki. Na początku degraduje warstwa hydroksyapatytu, stąd stromy spadek rozmiarów. Po dojściu do wewnętrznej części beleczek, które w swym składzie mają mniejsze stężenie hydroksyapatytu obserwujemy plateau. Natomiast w najgłębszych warstwach beleczek mogło nie dojść do całkowitego utwardzenia polimeru i znowu obserwuje się gwałtowny spadek rozmiarów.



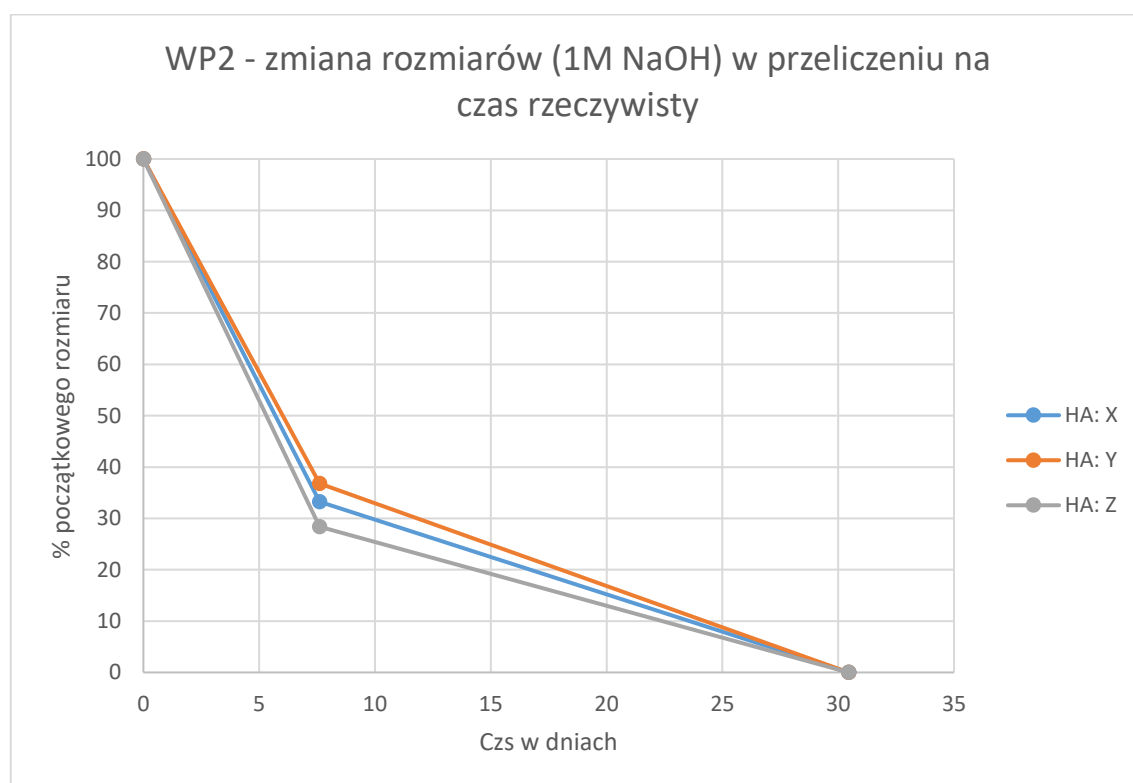
Wykres 23. Zmiana rozmiarów rusztowania typu BWZ1 w przeliczeniu na czas rzeczywisty..

Nieco łagodniejszy, ale podobny przebieg zmiany rozmiarów obserwuje się w przypadku rusztowania typu BWZ1. Po początkowym gwałtownym spadku, następuje powolny bardziej stabilny spadek długości.



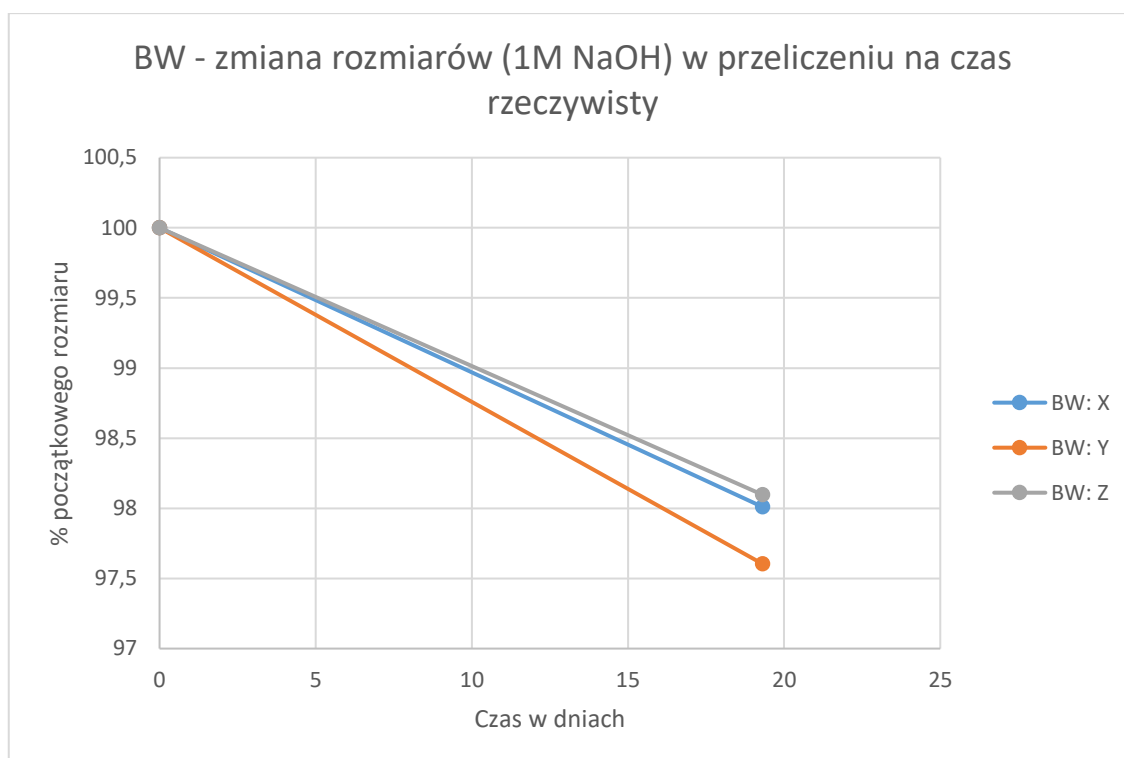
Wykres 24. Zmiana rozmiarów rusztowania typu WZ w przeliczeniu na czas rzeczywisty..

W przypadku rusztowań typu WZ1 największy i najbardziej gwałtowny jest spadek długości Z, jest to kierunek, wzdłuż którego rusztowania są drukowane. Interesujące jest też to, że zmiany długości wzdłuż kierunków X i Y są takie różne. W związku z tym, że kostki są drukowane wzdłuż Z, pozostałe 2 kierunki powinny być izotropowe i zachowywać się podobnie. Może to wynikać z kierunku badania promieniowania UV, bądź ustawienia kostki podczas utwardzania.



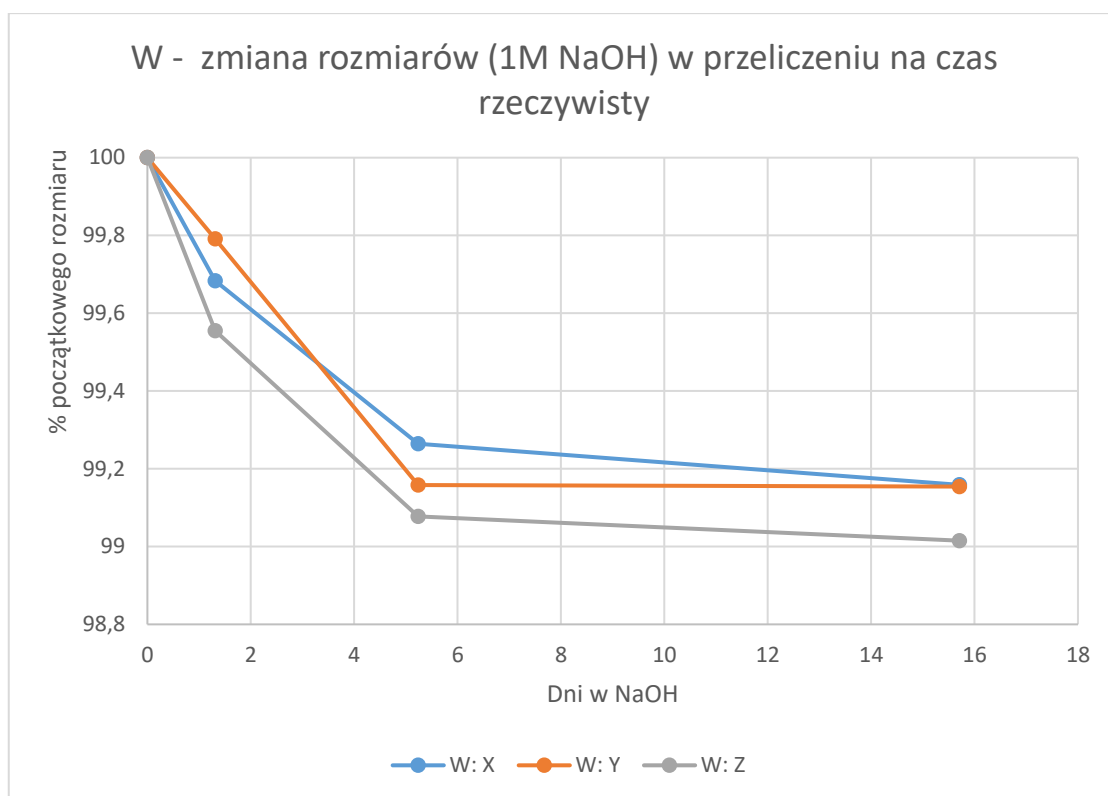
Wykres 25. Zmiana rozmiarów rusztowania typu WZ2 roztwór 1MNaOH w przeliczeniu na czas rzeczywisty.

Dla rusztowania typu WZ2 przebywanie w roztworze 1MNaOH dłużej niż 3 dni doprowadza do całkowitej degradacji. Jest to jednak spadek przypominający ten w roztworze 0,05MNaOH z pominięciem ponownego gwałtownego spadku i nieco bardziej nachylonym plateau.



Wykres 26. Zmiana rozmiarów rusztowania typu BWZ1 roztwór 1MNaOH w przeliczeniu na czas rzeczywisty.

Ze względu na to, że w przypadku rusztowania BWZ1 zmierzone zostały jedynie 2 punkty w czasie ciężko cokolwiek powiedzieć o tendencji do zmian rozmiarów. Co ciekawe jednak to samo rusztowanie to swoje rozmiary zmniejszyło jedynie do poziomu 97% początkowych, to jego masa spadła do 33%. Oznacza to, że główny przebieg degradacji odbywa się od wewnątrz pozostawiając kadłub rusztowania. Wynika to z tego, że utwardzanie najbardziej zewnętrznych części rusztowania jest najefektywniejsze, natomiast wewnętrzne struktury mogą pozostać miękkie.



Wykres 27. Zmiana rozmiarów rusztowania typu WZ1 roztwór 1MNaOH w przeliczeniu na czas rzeczywisty.

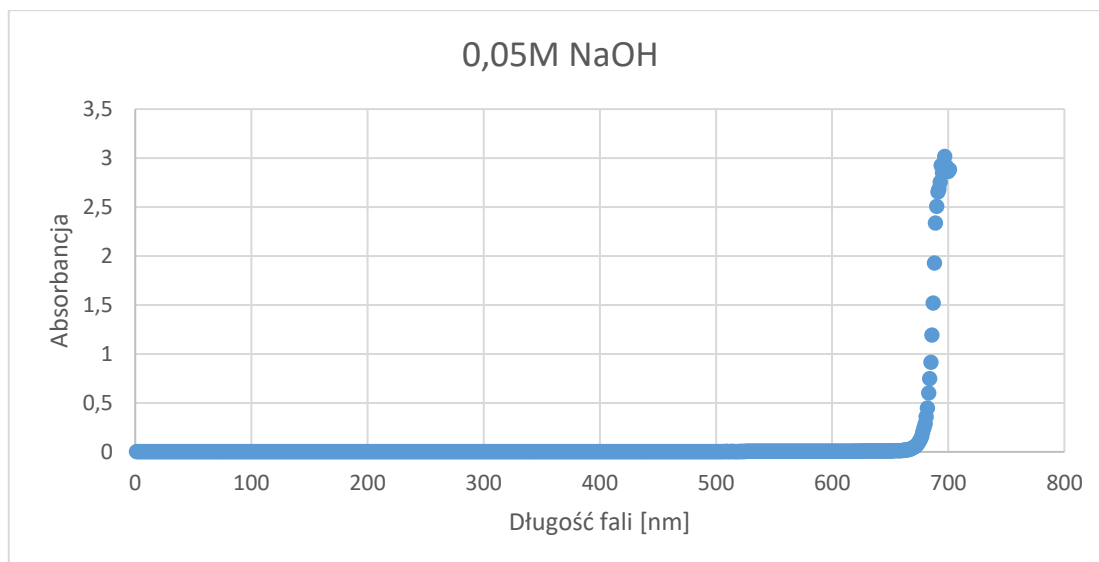
W przypadku rusztowania typu WZ1 w roztworze 1 NaOH obserwuje się gwałtowny spadek rozmiarów, a następnie plateau zmian. Wynika to z tego, że w tak mocno stężonych roztworach, te części rusztowania, które były najbardziej narażone na degradację zostały usunięte w pierwszych dniach, natomiast te dobrze utwardzone potrzebują więcej czasu na rozpad.

#### 10.4 Spektroskopia UV-VIS

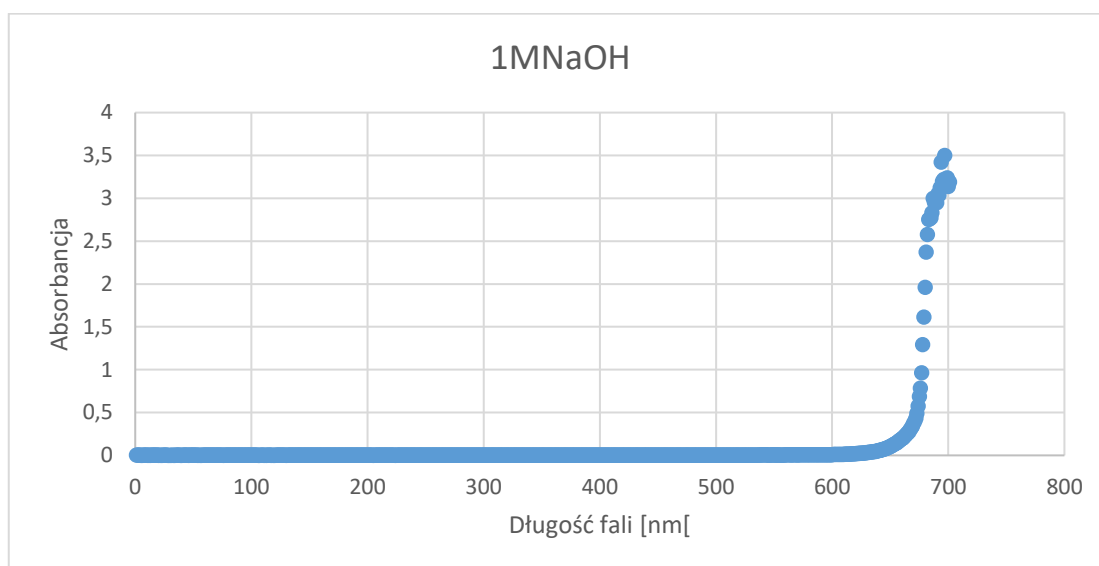
Celem zaobserwowania produktów rozpadu rusztowań wykorzystano Spektroskopię UV/VIS. Ciekawszym pod względem jakościowym byłby wybór Spektroskopii IR, gdyż w tym zakresie znajduje się większość maksimów absorpcji interesujących nas związków. Nie mniej jednak wykorzystanie tej metody wykazało również różnice w produktach rozpadu rusztowań.

Najpierw wykonano spektroskopię wykorzystywanego rozpuszczalnika NaOH, zarówno roztwór 0,05M jak też 1M.





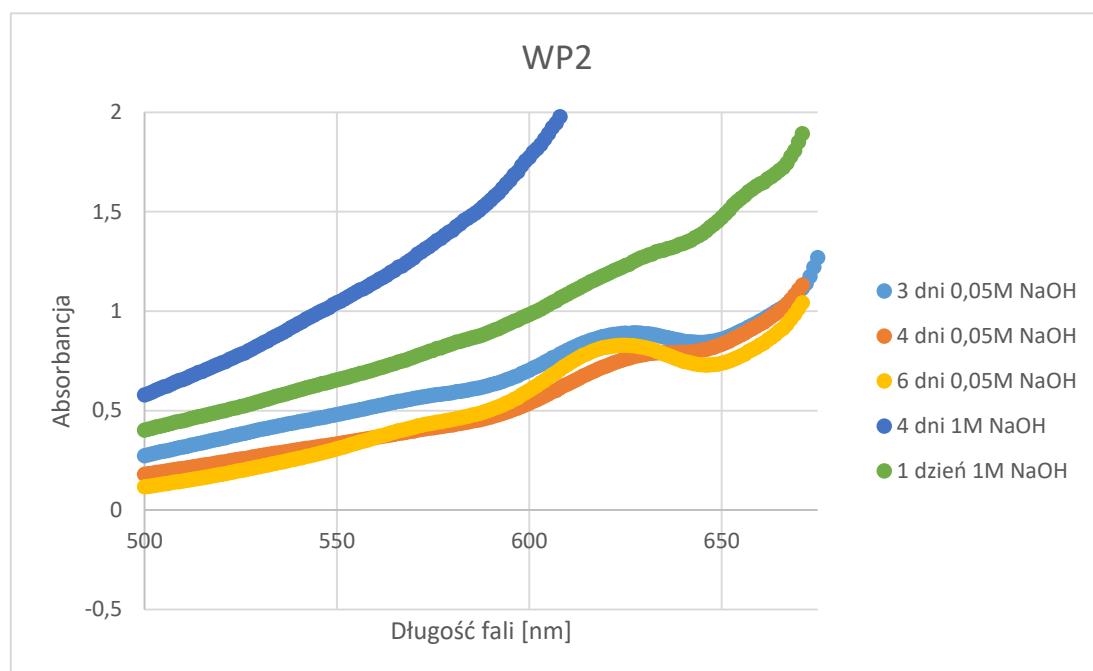
Wykres 28. Widmo 0,05M NaOH w zakresie UV/VIS



Wykres 29. Widmo 1M NaOH w zakresie UV/VIS

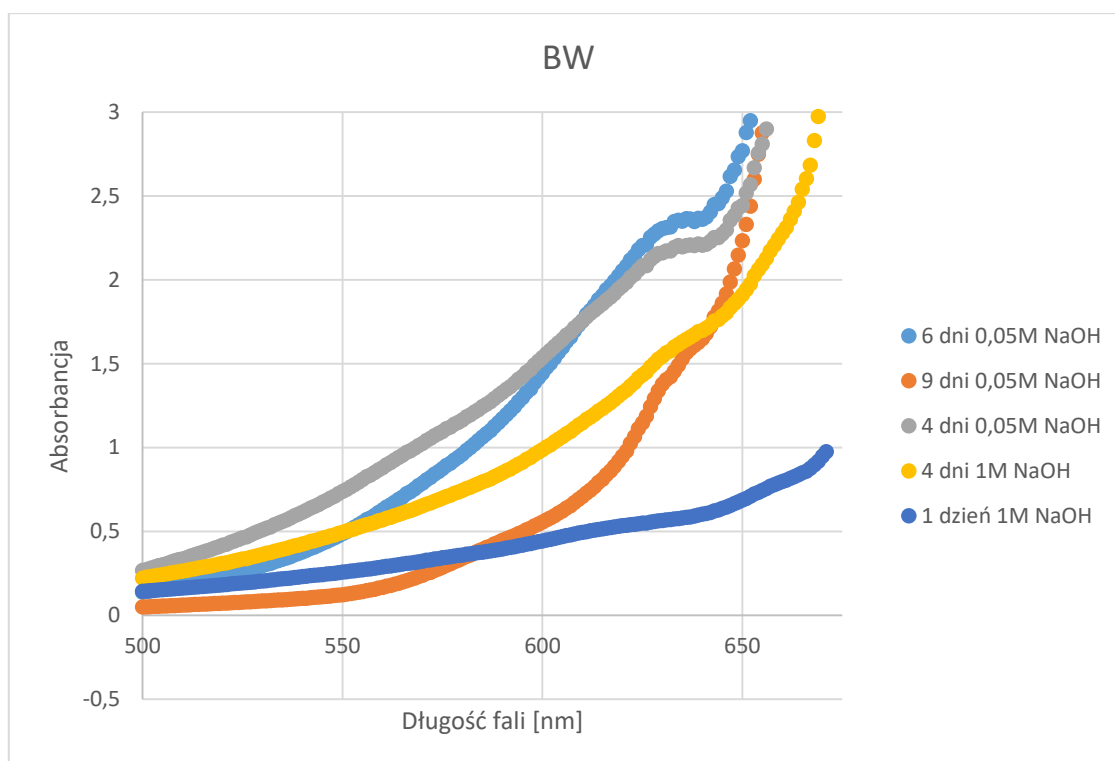
Oba roztwory mają maksimum absorbcji w okolicach 700nm.

#### 11.4.1 Rusztowania z różnych mieszanek żywicznych



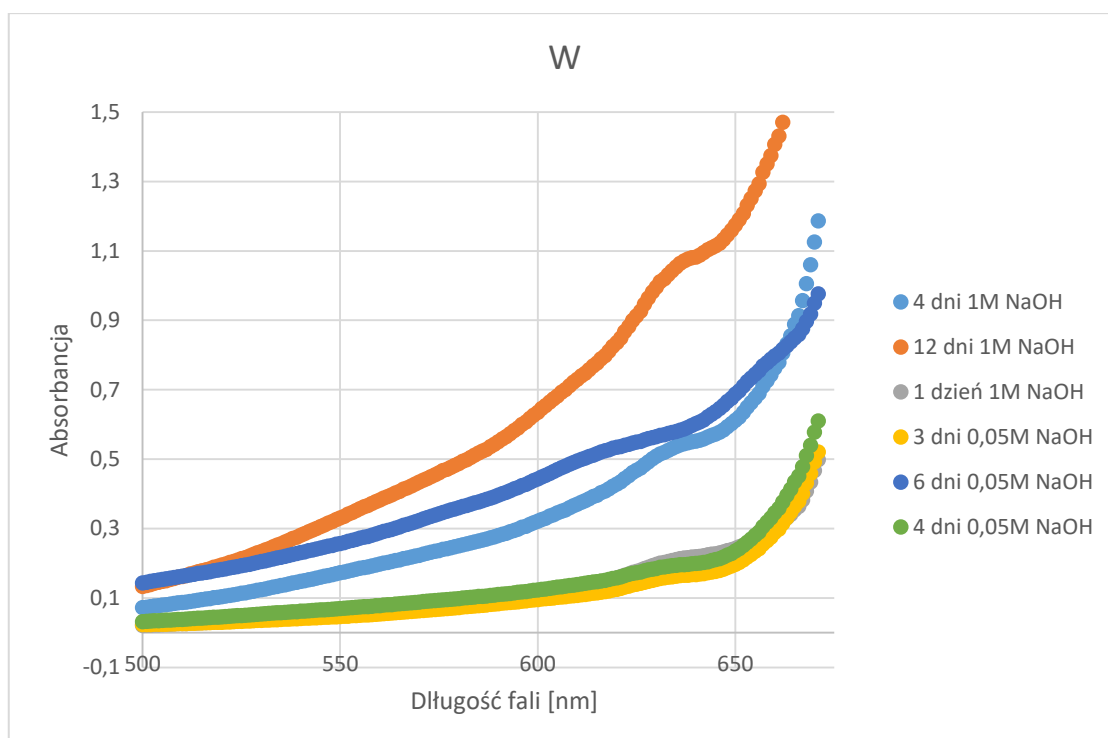
Wykres 30. Widmo rusztowań typu WP2.

W przypadku rusztowań degradowanych w roztworze 0,05M NaOH widać wyraźne 2 maksima absorpcji. Natomiast przy rozpadzie w 1M NaOH brak takiej tendencji. Widać jedynie powolny wzrost absorpcji do poziomu roztworu NaOH.



Wykres 31. Widmo rusztowań typu BWZ1.

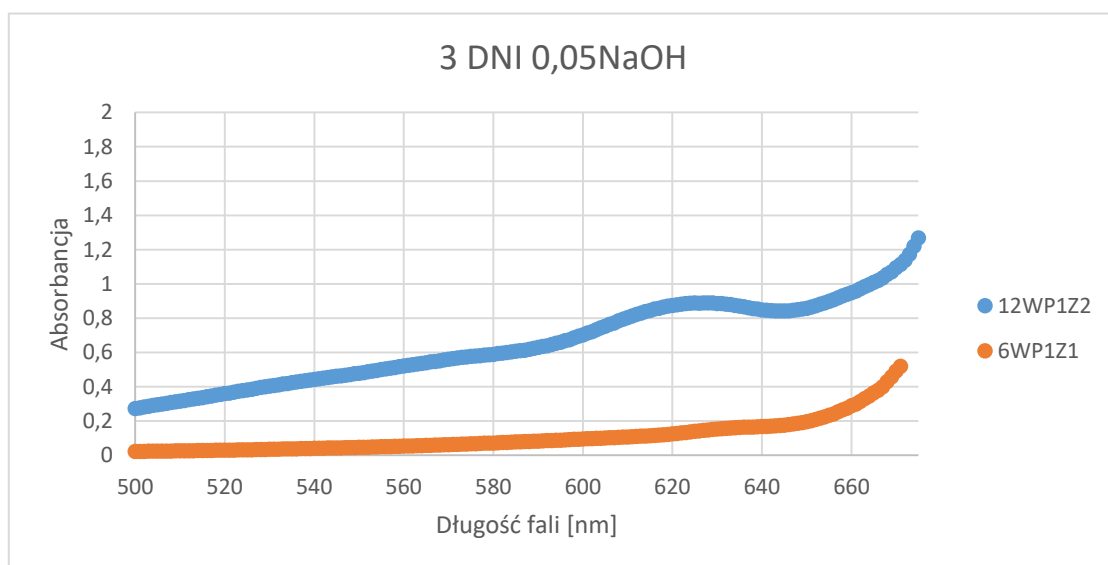
W przypadku degradacji w roztworze 1M NaOH, czyli, 1BWP1Z1 oraz 9BWP1Z1 nie występuje tak bardzo wyraźne maksimum absorpcji, wynika z tego, że im większe stężenie NaOH tym szybciej powstałe związki się rozpadają.



Wykres 32. Widmo rusztowań typu WZ1.

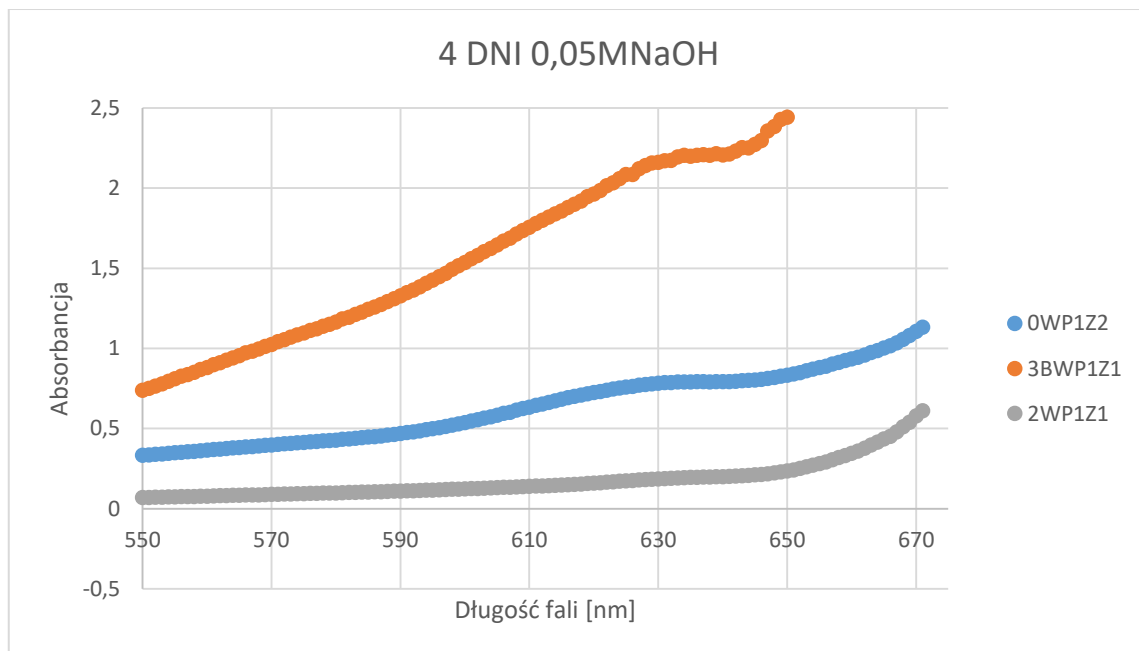
Rusztowania degradowane w 0,05M NaOH wykazują podobną absorbancję i wartość maksimum absorpcji. Natomiast te, które umieszczone były w 1M NaOH mają nieco przesunięte maksimum i większą wartość absorbancji. Wynika stąd, że w przypadku rusztowań utwardzanych w wodzie degradacja niektórych związków trwa dłużej.

#### 11.4.2 Degradacja rusztowań w czasie



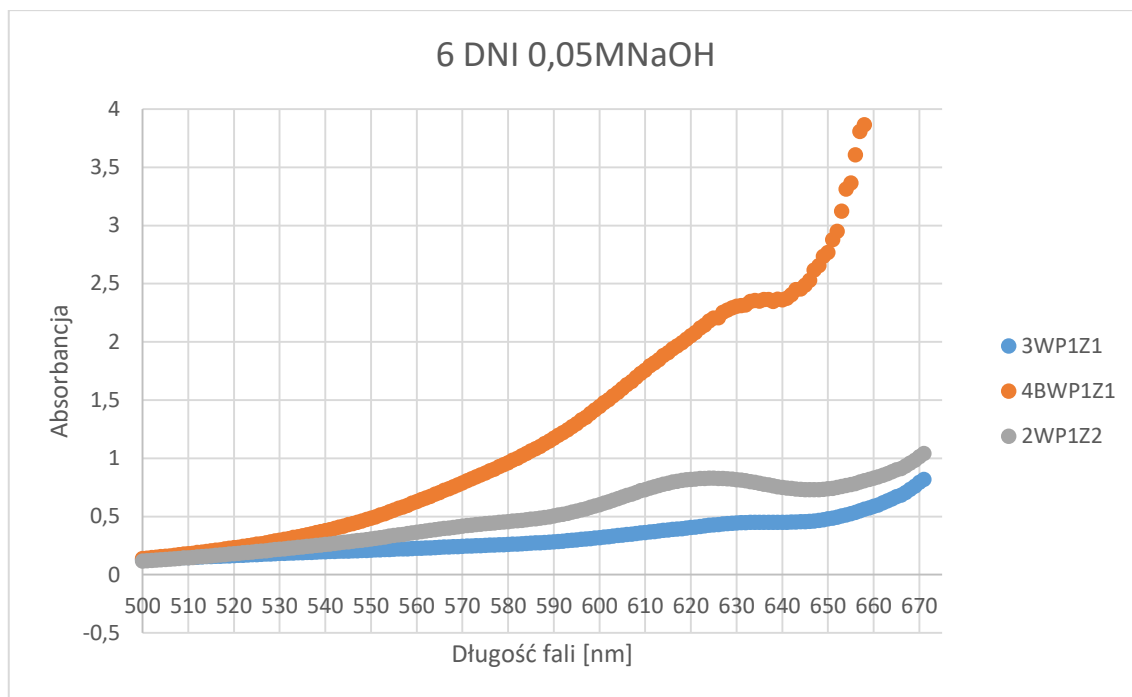
Wykres 33. Widmo produktów rozpadu po 3 dniach.

Po 3 dniach degradacji w 0,05M NaOH związki absorbujące z przedziału 620-630nm zostały w większej ilości oddane do roztworu przez rusztowanie typu WZ2. Warto zwrócić uwagę, że roztwór 12WP1Z2 został rozcieńczony, gdyż jego wartość absorpcji była zbyt wysoka.



Wykres 34. Widmo produktów rozpadu po 4 dniach.

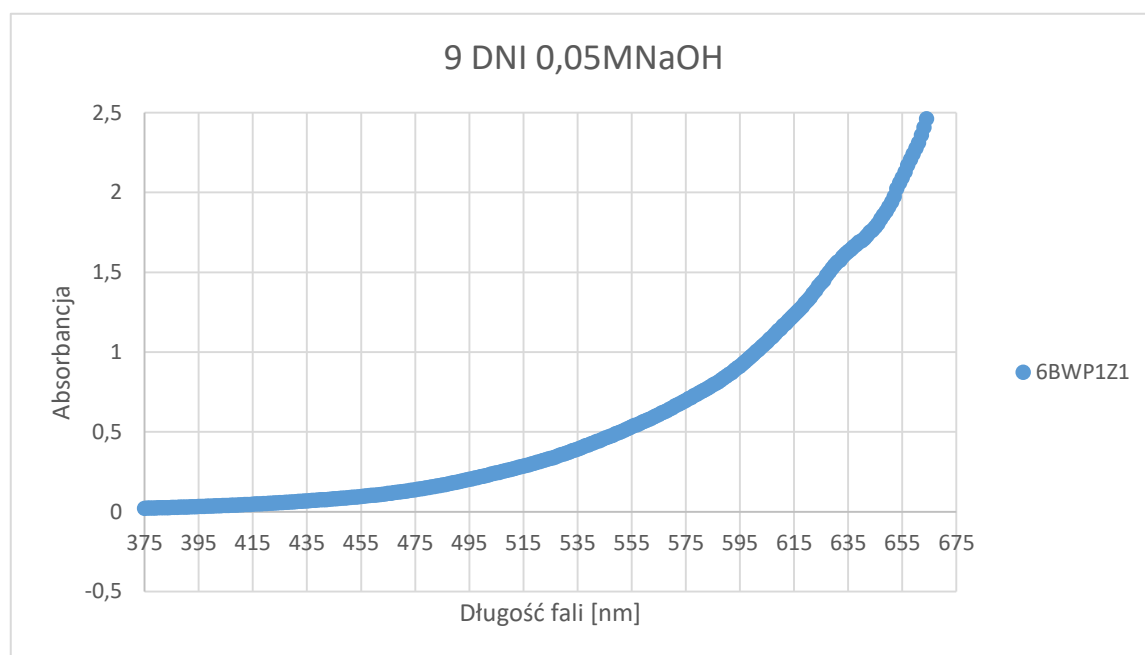
Po 4 dniach zdecydowanie więcej związków absorbujących z przedziału 620-630nm oddaje rusztowanie typu BWZ1, natomiast próbka typu WZ1 pozostaje zdegradowana w niewielkim stopniu z małą ilością pozostałości w roztworze.



Wykres 35. Widmo produktów rozpadu po 6 dniach.

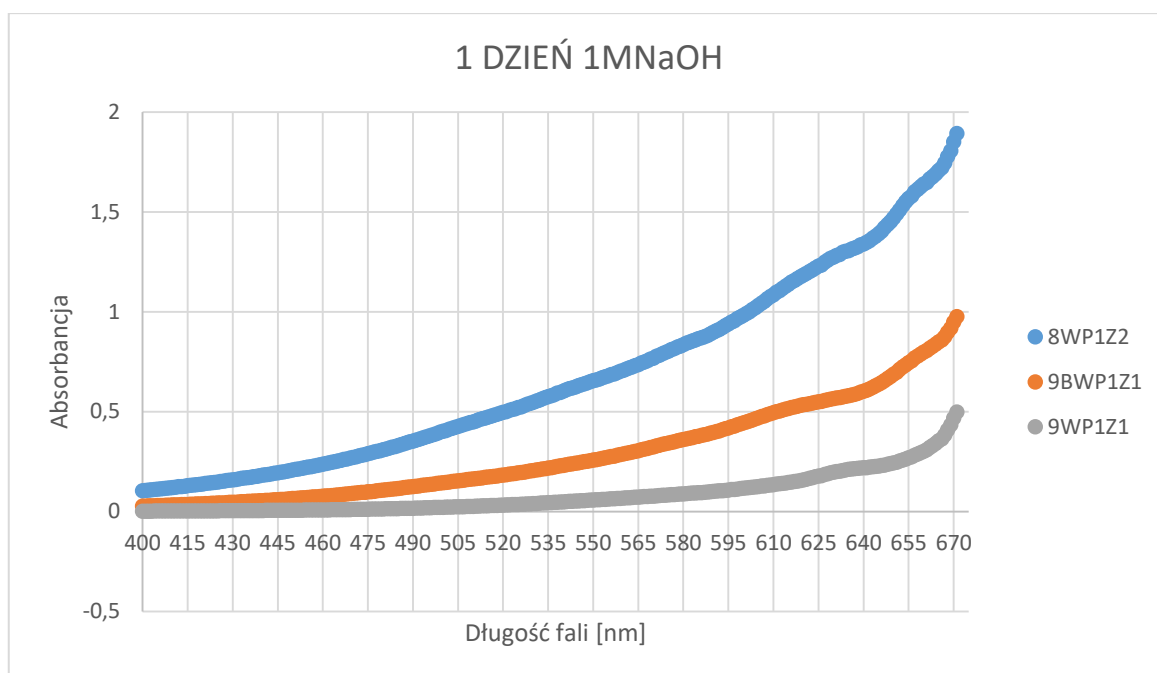
Po 6 dniach nadal obserwuje się najlepszą degradację dla rusztowania typu BWP1Z2. Brak znacznych różnic w rozpadzie próbki typu WZ1.

Wykres 36. Widmo produktów rozpadu po 9 dniach.



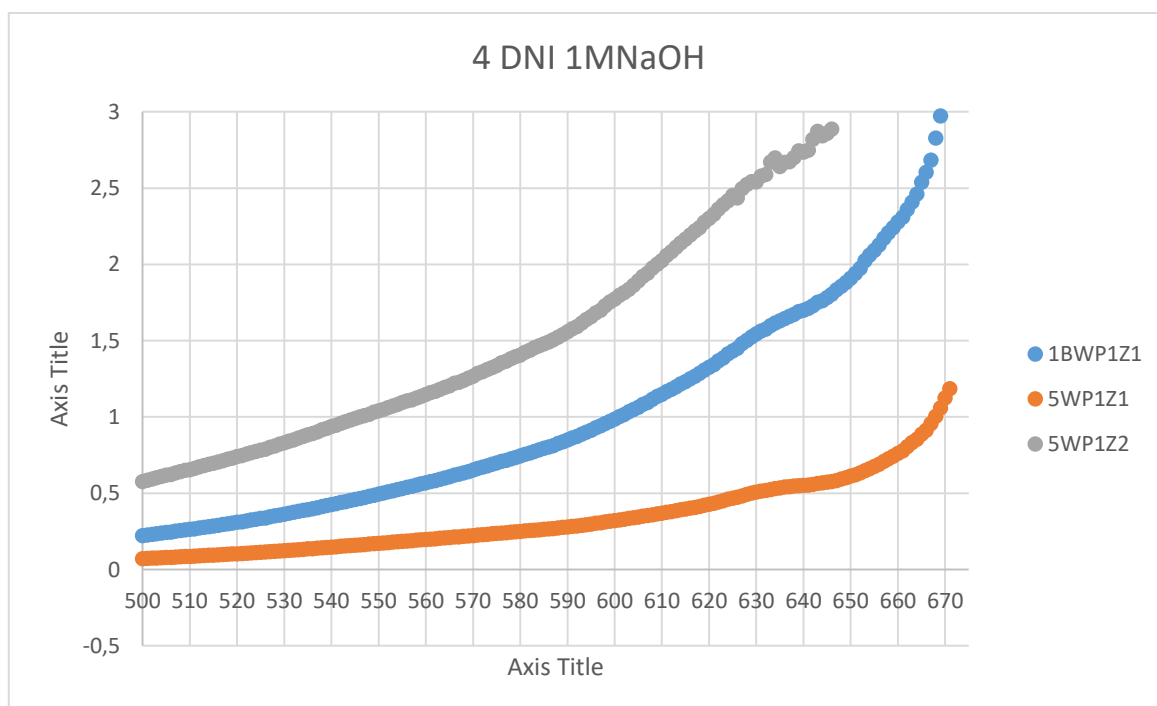
Po 9 dniach degradacji w roztworze 0,05M NaOH maksimum absorpcji dla rusztowania typu BWZ1 jest mniej zauważalne.

W przypadku degradacji w 1M NaOH wszystkie roztwory pozostałe po rusztowaniach typu BWZ1 oraz WZ2 należało dodatkowo rozcieńczyć, gdyż wartości absorbancji były zbyt wysokie.



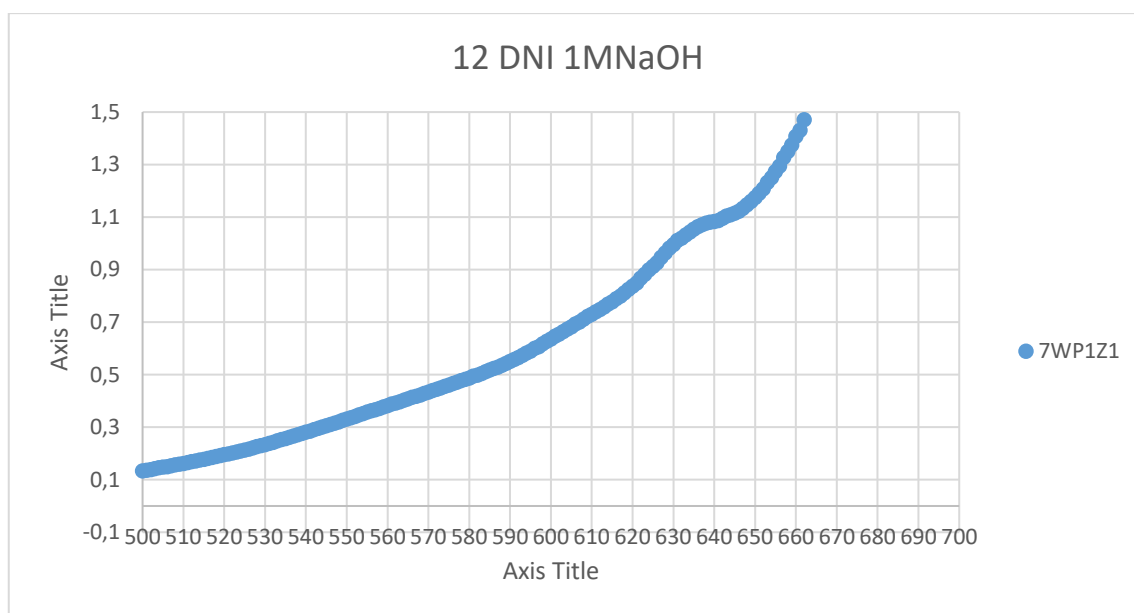
Wykres 37. Widmo produktów rozpadu po 1 dniu w 1M NaOH.

W przypadku degradacji w 1M NaOH maksima absorpcji są widoczne dla każdego rusztowania już po 1 dniu.



Wykres 38. Widmo produktów rozpadu po 4 dniach w 1M NaOH.





Wykres 39. Widmo produktów rozpadu po 12 dniach w 1MNaOH.

Dopiero po 12 dniach degradacji w 1M NaOH obserwuje się wyraźnie maksimum absorpcji dla rusztowania typu WZ1. Wynika stąd, że ta próbka jest najtrwalsza i najdłużej przebiega u niej degradacja.

Wszystkie dane zebrano w tabelce dla większej przejrzystości.

Tabela 21. Zebrane informacje o maksimach absorpcji.

Czas inkubacji	Nazwa	Długość fali [nm]	Długość fali [nm]
<b>12 DNI 1NAOH</b>	7WP1Z1	638	
<b>4 DNI 1NAOH</b>	5WP1Z1	635	
	1BWP1Z1	630	
	5WP1Z2	638	582
<b>1 DZIEŃ NAOH</b>	9WP1Z1	630	
	9BWP1Z1	620	
	8WP1Z2	628	580
<b>9 DNI 0,05MNAOH</b>	6BWP1Z1	628	
<b>6 DNI 0,05NAOH</b>	3WP1Z1	620	
	4BWP1Z1	630	
	2WP1Z2	620	570
<b>4 DNI 0,05MNAOH</b>	2WP1Z1	627	
	3BWP1Z1	630	
	0WP1Z2	626	580
<b>3 DNI 0,05MNAOH</b>	6WP1Z1	631	
	12WP1Z2	622	570

Wysokość głównego pik dla każdego z tych rodzajów rusztowań znajduje się w paśmie absorpcyjnym amoniaku. Natomiast drugi pik występujący jedynie w przypadku rusztowania typu HA jest przesunięte w kierunku krótszych fal, co odpowiada związkom cyjanku, najprawdopodobniej potasem, bądź wapniem z hydroksyapatytu.

## 11. Wnioski

Celem pracy magisterskiej było przygotowanie eksperymentu, przeprowadzenie go i analiza wyników. Główną barierą była nieznaczna ilość literatury traktująca o podobnych badaniach. Wiele analiz dokonywano z użyciem różnego rodzaju polimerów, natomiast rzadko zwracano uwagę na dodanie związków podobnych do tych występujących w kościach, czy też na sposób, w jakim próbki były utwardzane. W związku z tym zaproponowano 7 testów, które miały na celu przebadanie wszystkich możliwości i porównanie wszystkich możliwych konfiguracji.

Wykonano rusztowania z dwóch rodzajów żywicy Z1 – podstawowej oraz Z2 – z dodatkowej HA. Następnie żywice te utwardzano w świetle UV. Kostki z mieszanki Z1 podzielono na te, które utwardzane były w wodzie i te bez wody, celem stwierdzenia, czy wybór środowiska do utwardzania ma znaczenie ze względu na zmianę właściwości próbek.

Dodatkowo wykonano z mieszanki żywicznej Z1 serię rusztowań o różnej porowatości, aby ustalić, który jej poziom jest najbardziej przypominający tkankę kostną pod względem właściwości.

Eksperyment przeprowadzono w kontrolowanych i powtarzalnych warunkach pod nadzorem promotora. Dobieranie metod badań, czasu inkubacji, suszenia i ilości testów należało do piszącego pracę dyplomową. Po każdym etapie pracy został wykonany raport z przebiegu w celu kontrolowania danych.

Wyniki okazały się bardziej interesujące niż początkowo mogło się wydawać:

- Wybór środowiska do utwardzania w świetle UV danej próbki ma niebagatelny wpływ na właściwości mechaniczne rusztowania. Daje to możliwość manipulowania modułem Young'a danej kostki w zależności od indywidualnych potrzeb.
- Dodatek HA zwiększa powinowactwo implantu do tkanki kostnej obniża jednak wartość modułu Young'a i szybkości degradacji. Zawartość procentowa w

rusztowaniu daje pole do manewru w przypadku właściwości mechanicznych – zakres wartości modułu Young’a wynosi od 6MPa do 80MPa.

- Nie można zmniejszać porowatości struktury bez końca w celu zwiększenia trwałości i wytrzymałości rusztowania. W zadanych warunkach laboratoryjnych okazało się to nieskuteczne i minęło z celem. Problem w tym wypadku polega na trudności w równomiernym utwardzeniu tak zbitej struktury. Należy wziąć pod uwagę, aby zwiększyć czas utwardzania mniej porowatego rusztowania. Daje to jednak możliwość manipulowania wartością modułu Young’a w zakresie do 332MPa. Różny dodatek procentowy HA do zbitej struktury również jest możliwością, która daje możliwe szerokie spektrum wartości modułu Young’a.
- Spektroskopia wykazała, że w ramach upływu czasu polimery rozpadają poza swoimi monomerami, do związków typu: amoniak i cyjanki. Jeżeli chodzi o ich szkodliwość dla organizmu jest ona niska, gdyż tworzenie się tych związków wynika jedynie z obecności SUDANu I, który zawiera azot, a jest to związek, który był dodany w niewielkich ilościach do mieszanki.

Praca ta daje podstawy i nadzieje, na tworzenie w przyszłości implantów, które zostaną przygotowane indywidualnie dla danej osoby. Wraz z informacjami o gęstości kości osobnika i po pobraniu prekursorów osteoblastów do posiania na rusztowaniu, będzie można stworzyć idealny implant biodegradowalny jak również biozgodny i taki, który nie zostanie odrzucony przez pacjenta. Dzięki stworzeniu obrazu 3D ubytku kostnego, da to możliwość zamodelowania rusztowania doskonale wpasowującego się w jego miejsce. Następnie pobranie materiału do proliferacji osteoblastów i naniesienie ich na tak przygotowany model, będzie kwestią tygodni. Tak przygotowany implant będzie można wprowadzić do organizmu i obserwować jak w jego miejsce organizm tworzy nową kość.

## 12. Literatura

- 1) **Praca zbiorowa pod redakcją W. Zielińskiego i A. Rajcy; *Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych***, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne Warszawa 2000
- 2) **Red. M. Szafran i Z. Dega –Szafran, *Określanie struktury związków organicznych metodami spektroskopowymi. Tablice i ćwiczenia***. PWN 1988
- 3) **R. M. Silverstein, G.C. Bassler, *Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych***; PWN, Warszawa 1970
- 4) **R. M. Silverstein, F.X. Webster, D. J. Kiemle, *Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych***, PWN, Warszawa 2007
- 5) **L. A. Kazicyna, N. B. Kupletska, *Metody spektroskopowe wyznaczania struktur związków organicznych***, PWN 1976.
- 6) **Elise Morgan, Harun Bayraktar, Tony Keaveny, *Trabecular bone modulus-density relationships depend on anatomic site***, 2003
- 7) **Elias Sedlin & Carl Hirsh, *Factors affecting the determination of the physical properties of femoral cortical bone***, 1966
- 8) **Tiago Ferreira, Wayne Rasband, *ImageJ User Guide***, 2012
- 9) **Peter Zioupos, Richard B. Cook, John R. Hutchinson, *Some basic relationships between density values in cancellous and cortical bone***, 2008
- 10) **O'Mahony, A. M., i inni. *Anisotropic elastic properties of cancellous bone from a human edentulous mandible***. Clinical Oral Implants Research. 2000, 11, strony 415-421
- 11) **Natalia Milaniak *Praca inżynierska, Wyznaczanie stałych elastycznych kości gąbczastej na podstawie pomiarów tomograficznych***, Kraków 2015
- 12) **Ewa Andrzejewska, Agnieszka Marcinowska, Małgorzata Podgórska, *Polimery – Czasopismo***, Nr 5, Maj 2009
- 13) **Halina Kaczmarek, Krzysztof Bajer, *Polimery – Czasopismo***, Nr 10, Październik 2006
- 14) **W. Sawicki, *Histologia***, Wydawnictwo Lekarskie PWN, 2005

- 15) *B9 Creator v1.2 Visual Assembly Guide*, 2014
- 16) **Lisa E. Freed, Gordana Vunjak-Novakovic**, *Artykuł - Biodegradable Polymeric Scaffolds for Tissue Engineering*, BioTechnology, ResearchGate 1994
- 17) **Ewa Stodolak** *Praca Doktorska, Badania nad modyfikacją powierzchniową i wpływem włókien na materiał polimerowy i odpowiedź komórkową*, Kraków 2006
- 18) **Małgorzata Krasodomska**, *Zastosowanie spektroskopii UV/VIS w określaniu struktury związków organicznych*, Kraków 2008
- 19) **Vinayak Sant, Lisa Rohan**, *Artykuł - Nanofibrous composite scaffolds of poly(ester amides) with tunable physicochemical and degradation properties*, ResearchGate 2015
- 20) **M. Wozniak, Adrian Chlanda, Ewa Kijewska**, *Artykuł - Structural and Mechanical Characterization of Biomaterials for Tissue Engineering: Fibrous Scaffold - Quantitative Nano-Mechanical Mapping by Atomic Force Microscopy*, ResearchGate 2015
- 21) **Agnieszka Sobczak, Zygmunt Kowalski**, *Artykuł - Materiały hydroksyapatytowe stosowane w implantologii*, *Czasopismo techniczne*, Wydawnictwo Politechniki Krakowskiej
- 22) **Oficjalna strona internetowa firmy DinoLite** <http://www.dino-lite.com>
- 23) **Małgorzata Fleisher**, *Dezynfekcja, sterylizacja, antyseptyka*, <http://www.lekarski.umed.wroc.pl/sites/default/files/mikrobiologia/files/stomatologia/sterylizacja2012.pdf> [Dostęp 2012]

### 13. Spis ilustracji

Rysunek 1. Skład kości (Źródło [10]).....	13
Rysunek 2. Związki inicjujące i zatrzymujące kościotworzenie.(Źródło [14]).	17
Rysunek 3. Inicjowanie procesu modelowania kości.(Źródło [14]).....	18
Rysunek 4. Pojemnik z przygotowaną mieszanką Z2. (Źródło własne).....	20
Rysunek 5. Drukarka 3D B9Creator. (Źródło [15]) .....	23
Rysunek 6. Wydrukowane i oznaczone próbki. .(Źródło własne).....	27
Rysunek 7. Wydrukowane i ustawione według zmniejszającej się porowatości rusztowania polimerowe. .(Źródło własne) .....	28
Rysunek 8. Wykorzystywana waga laboratoryjna. .(Źródło własne) .....	29
Rysunek 9. Próbki przygotowane do wstawienia do buteleczek. .(Źródło własne) .....	30
Rysunek 10. Próbki na mieszadle magnetycznym z funkcją sterowania temperaturą i obrotami mieszadłą .(Źródło własne) .....	30
Rysunek 11. Rusztowania suszone w temperaturze 70°C. .(Źródło własne).....	31
Rysunek 12. Pozostały roztwór po przeprowadzonej degradacji. .(Źródło własne).....	31
Rysunek 13. Urządzenie DinoLite na podstawce. Źródło [22]) .....	32
Rysunek 14. Mikroskop DinoLite.(Źródło [22]) .....	32
Rysunek 15. Przebieg próby ściskania. (Źródło własne).....	33
Rysunek 16. Maszyna wytrzymałościowa umieszczona wewnątrz tomografu wraz z próbką kości. (Źródło własne) .....	34
Rysunek 17. Widmo promieniowania elektromagnetycznego charakterystyczny dla UV/VIS. (Źródło [18]) .....	39

## 14. Spis tabel

Tabela 1. Wartości modułu Young'a w zależności od porowatości kości. (Źródło [11]) .....	14
Tabela 2. Przygotowanie mieszanki Z1. ....	19
Tabela 3. Przygotowanie mieszanki Z2. ....	19
Tabela 4. Wybrane właściwości składników mieszanki żywicznej. ....	22
Tabela 5. Parametry drukarki użyte przy wytwarzaniu rusztowań z mieszanki Z1 .....	24
Tabela 6. Parametry drukarki użyte przy wytwarzaniu mieszanki żywicznej Z2. ....	25
Tabela 7. Szkło i urządzenia laboratoryjne .....	25
Tabela 8. Porównanie rusztowania polimerowego z wycinkiem kości.(Źródło własne)	26
Tabela 9. Oznaczenia rusztowań gradientowych wraz z porowatością. ....	28
Tabela 10. Wykaz wykonywanych testów. ....	45
Tabela 15. Skład PBS .....	47
Tabela 11. Rusztowanie Z2 (Źródło własne).....	48
Tabela 12. Rusztowanie Z1 utwardzane bez wody. (Źródło własne).....	50
Tabela 13. Rusztowanie Z1 utwardzane w wodzie. (Źródło własne).....	52
Tabela 14. Zebrane wartości modułu Young'a dla rusztowań polimerowych i tkanki kostnej. (Źródło [11]).....	54
Tabela 16. Porównanie czasu degradacji. ....	62
Tabela 17. Przyspieszenie degradacji w roztworze NaOH.....	63
Tabela 18. Wyznaczenie degradowalności .....	64
Tabela 19. Wyznaczenie biodegradowalności. ....	65
Tabela 20. Rzeczywisty czas degradacji poszczególnych rusztowań.....	65
Tabela 21. Zebrane informacje o maksimach absorpcji. ....	82