

Akademia Górniczo – Hutnicza im. Stanisława Staszica
w Krakowie
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
Katedra Biomateriałów

PRACA DOKTORSKA

Ewa Stodolak

Badania nad modyfikacją powierzchniową i wpływem włókien na
materiał polimerowy i odpowiedź komórkową

Promotor pracy

dr hab. inż. Marta Błażewicz, prof. AGH

Kraków 2006

Pani dr hab. inż. Marcie Błazewicz, promotorowi niniejszej pracy składam podziękowania za; pomoc merytoryczną okazaną w trakcie jej realizacji, cierpliwość podczas opracowywania i przychylną atmosferę stworzoną w czasie studiów doktoranckich

Dziękuję również prof. dr hab. inż. Stanisławowi Błazewiczowi za cenne uwagi i wskazówki udzielone w trakcie powstawania i analizy pracy doktorskiej.

Wszystkim tym osobom, bez których pomocy, obecności i nastawienia praca ta nie mogłaby powstać – serdecznie dziękuję.

Szczególne podziękowania należą się dwóm osobom, których cierpliwość życzliwość i wrażliwość sprawiły, że nadal pamiętam o tym, co ważne - za to, że były, za to, że trwały i za to, że są ...

Spis treści

Wprowadzenie.....	5
Indeks skrótów stosowanych w pracy	7
1. Materiały dla zastosowań medycznych	9
1.1 Wstęp.....	9
1.2 Materiały o zastosowaniu medycznym	10
1.3 Kompozyty naturalne - kość.....	14
1.4 Biomimetyczne kompozyty kostne	15
2. GBR – sterowana regeneracja kości. Materiały kompozytowe w GBR.....	18
2.1 Wprowadzenie	18
2.2 Technika GBR	18
2.3 Materiały wykorzystywane w membranach GBR	19
2.4 Membrany kompozytowe.....	21
2.5 Gradientowe materiały membranowe	23
3. Rola powierzchni w inżynierii biomateriałów	24
3.1 Wprowadzenie	24
3.2 Powierzchnia – ujęcie fizyczne i fizykochemiczne	25
3.3 Parametry opisujące powierzchnię	26
3.3.1 Tekstura powierzchni	27
3.3.2 Skład chemiczny powierzchni	27
3.3.3 Zwilżalność	28
3.3.4 Swobodna energia powierzchniowa.....	29
3.4 Techniki analizy powierzchni.....	30
3.5 Wpływ parametrów powierzchni na odpowiedź komórkową	31
4. Modyfikacja powierzchni biomateriałów	34
4.1 Wprowadzenie	34
4.2 Możliwości modyfikacji powierzchni	34
4.3 Przegląd metod modyfikacji powierzchni.....	35
4.3.1 Metody biologiczne: immobilizacja biomolekuł na powierzchni	37
4.3.2 Metody immobilizacji.....	37
4.3.3 Metody chemiczne i fizykochemiczne modyfikacji powierzchni.....	38
4.3.4 Reakcje chemiczne	40
4.3.5 Szczepienie (ang. <i>grafting</i>)	40
4.3.6 Osadzanie plazmowe	40
4.3.7 Osadzanie filmów metodą LB.....	41
4.3.8 Monowarstwy samoorganizujące się (ang. <i>self-assembled monolayers</i>)	41
4.3.9 Wzornikowanie (ang. <i>patterning</i>)	41
5. Zjawiska zachodzące na granicy faz: komórka – materiał	42
5.1 Wprowadzenie	42
5.2 Adsorpcja białek	43
5.4 Wytworzenie wiązań komórka – biomateriał	44
5.5 Ograniczenia teorii DLVO w układach biologicznych	46
5.6 Termodynamika powierzchni a adhezja komórek	46
5.7 Wpływ parametrów termodynamicznych na adhezję komórek.....	47
6. Oddziaływanie komórka – materiał. Metody badania biogodności materiałów	49
6.1 Wprowadzenie	49
6.2 Hodowle komórkowe w inżynierii biomateriałów.....	50
6.2.1 Linie komórkowe	51
6.2.2 Linie komórkowe wykorzystywane w badania biomateriałów kostnych.....	53

6.3 Komórka jako wskaźnik biokompatybilności powierzchni. Metody badań struktur komórkowych w inżynierii biomateriałów	54
6.3.1 Metody badań adhezji.....	54
6.3.2 Metody badań proliferacji.....	55
6.3.3 Metody badań zdolności sekrecyjnych komórek	56
7. Zjawisko adhezji osteoblastów do powierzchni biomateriału.....	58
7.1 Wprowadzenie	58
7.2 Błona komórkowa i jej rola w adhezji komórki na powierzchni badanej	58
7.3 Mechanizmy adhezji komórek do powierzchni materiału	60
Cel i zakres pracy	62
Metody badań.....	65
1 Badania właściwości powierzchni	65
1.1 Profilometria	65
1.2 Zwilżalność powierzchni.....	65
1.3 Energia powierzchniowa	66
1.4 Spektroskopia w podczerwieni FTIR - ATR	66
1.5 Mikroskopia sił atomowych AFM	67
2 Mikrostruktura powierzchni	67
2.1 SEM.....	67
2.2 Mikroskop optyczny.....	67
3 Biostabilność.....	68
3.1 Zmiany pH	68
3.2 Zmiany przewodnictwa	68
4 Badania mechaniczne.....	68
4.1 Badania wytrzymałości wybranych kompozytów	68
4.2 Badanie odkształcalność powierzchni, odporność na deformacje	68
5 Badania termograwimetryczne (DTA/TG)	69
6 Badania strukturalne-jądrowym rezonansem magnetycznym (NMR).....	69
7 Badania różnicową kolorymetrią skaningową (DSC).....	70
8 Ubytki masy i zmiany grubości membran kompozytowych	70
9 Oznaczenia udziału objętościowego porów w kompozytach membranowych	70
10 Oznaczenie rozwinięcia powierzchni BET	71
11 Wielkość cząstek.....	71
12 Charakterystyka biologiczna	71
12.1 Badania biogodności polimeru syntetycznego PTFE/PVDF/PP	71
12.2 Działanie cytotoksyczne terpolimeru PTVE/PVDF/PP	71
12.3 Działanie cytotoksyczne polimeru i materiałów kompozytowych	72
13 Badania odpowiedzi komórkowej.....	72
13.1 Oznaczenia żywotności komórek –test MTT	72
13.2 Oznaczanie ilości kolagenu – metoda ELISA	73
13.3 Badania proliferacji komórek do powierzchni materiałów.	73
13.4 Adsorbcja integryn receptorowych: β -aktyna.....	73
13.5 Badanie inkorporacji DNA – test BrdU	74
13.6 Przeżywalność (aktywność enzymatyczna) komórek MG 63 – metoda XTT.....	74
1. Charakterystyka polimeru PTFE-PVDF-PP	75
1.1 Wprowadzenie	75
1.2 Dane podstawowe o PTFE-PVDF-PP.....	75
1.2.1 Badania spektroskopowe	77
1.2.2 Badania NMR	77
1.2.3 Badania termiczne	78

1.2.4 Właściwości mechaniczne	78
1.3 Normowa ocena cytotoksyczności materiału	79
1.4 Badania degradacji materiału PTFE-PVDF-PP	81
1.4.1 Badanie zmian przewodnictwa jonowego i pH.....	82
1.4.2 Badania FT IR/ATR	83
1.5 Metody sterylizacji materiału	83
1.5.1 Sterylizacja promieniowaniem ultrafioletowym	84
1.5.2 Sterylizacja plazmowa	84
1.5.3 Analiza powierzchni polimeru poddanego sterylizacji	84
1.5.3-1 Zwilżalność powierzchni	84
1.5.3-2 Spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni	85
1.5.3-3 Topografia powierzchni – mikroskopia sił atomowych.....	85
1.6 Podsumowanie	87
2. Kompozyty włóknisto polimerowe.....	88
2.1 Wprowadzenie	88
2.2 Wytworzenie materiałów kompozytowych.....	88
2.2.1 Włókna węglowe.....	88
2.2.2 Otrzymywanie kompozytów polimerowo - włóknistych	89
2.3 Badanie parametrów powierzchni.....	91
2.3.1 Badania mikrostruktury kompozytów	91
2.3.2 Badania topografii powierzchni	92
2.3.3 Zwilżalność, energia powierzchniowa	95
2.3.4 Badania elastyczności powierzchni.....	97
2.3.5 Podsumowanie	99
2.4 Badania biologiczne materiałów kompozytowych	100
2.4.1 Badania biogodności materiałów kompozytowych.....	100
2.4.2 Badanie proliferacji komórek kostnych MG-63	101
2.4.3 Aktywność metaboliczna komórek MG 63	104
2.4.4 Podsumowanie	105
3. Kompozyty hybrydowe.....	107
3.1 Wprowadzenie	107
3.2 Wytworzenie kompozytów hybrydowych.....	107
3.2.1 Alginian sodu	108
3.2.1-1 Badania termiczne.....	109
3.2.1-2 Badania spektroskopowe FT IR	109
3.2.2 Morfologia fazy włóknistej - włókna z alginianu sodu, włókna węglowe	110
3.2.3 Otrzymywanie kompozytów hybrydowych.....	113
3.3 Badanie parametrów powierzchni kompozytów hybrydowych.....	114
3.3.1 Badania mikrostruktury materiałowe kompozytów	115
3.3.2 Badania topografii powierzchni	116
3.3.3 Zwilżalność, energia powierzchniowa	116
3.3.4 Podsumowanie badań powierzchniowych.....	118
3.4 Badania wytrzymałościowe kompozytów hybrydowych.....	118
3.5 Badania biologiczne kompozytowych materiałów hybrydowych	121
3.5.1 Badanie cytotoksyczności materiałów kompozytowych	121
3.5.2 Badania oddziaływania komórek fibroblastów i osteoblastów.....	122
3.5.3 Proliferacja komórek MG-63	123
3.5.3 Przeżywalność komórek MG-63	126
3.5.5 Adhezja komórek MG-63	126
3.5.6 Podsumowanie	128

4. Membranowe materiały kompozytowe dla zastosowań medycznych.....	129
4.1 Wstęp.....	129
4.2 Otrzymywanie kompozytów membranowych.....	130
4.2.1 Membrany kompozytowe – wstępne badania fizyczne.....	132
4.2.1-1 <i>Test przepuszczalności membran kompozytowych</i>	133
4.2.1-2 <i>Zmiany zwilżalności powierzchni w trakcie procesu usuwania porogenu</i>	134
4.3 Charakterystyka powierzchni membran.....	135
4.3.1 Badanie zwilżalności powierzchni: kąt, energia powierzchniowa.....	135
4.3.2 Charakterystyka powierzchni kompozytów –FT IR/ATR.....	136
4.3.3 Badanie mikrostruktury powierzchni membran kompozytowych	138
4.3.4 Porowatość, rozwinięcie powierzchni materiałów membranowych.....	142
4.3.5 Podsumowanie badań fizykochemicznych powierzchni	142
4.4 Badanie odpowiedzi komórkowej na powierzchnie materiałów kompozytowych..	142
4.4.1 Aktywność komórek MG-63. Test BrdU	143
4.4.2 Proliferacja komórek linii MG-63	144
4.4.3 Podsumowanie	146
Wnioski.....	147
Literatura.....	148

Wprowadzenie

Badania nad wytwarzaniem nowych materiałów przeznaczonych do zastosowań medycznych stanowią od szeregu lat popularny kierunek badań. Niniejsza praca pozostaje w nurcie zagadnień związanych z otrzymywaniem nowych materiałów implantacyjnych, szczególnie tych, które przeznaczone są do zastosowań w chirurgii kostnej. Praca dotyczy poszukiwania nowych, oryginalnych włóknistych materiałów kompozytowych przeznaczonych do leczenia tkanek. Jednocześnie, oprócz charakteru aplikacyjnego, praca zawiera badania dotyczące właściwości powierzchniowych i biologicznych tworzyw kompozytowych. Celem, jaki postawiono sobie w pracy była odpowiedź na pytania: czy faza włóknista wprowadzana do kompozytu może wpływać na odpowiedź komórkową, które z parametrów tak zmodyfikowanej powierzchni są najważniejsze z punktu widzenia adhezji i morfologii komórek. Kolejnym zagadnieniem podjętym w pracy była odpowiedź na pytanie czy możliwa jest taka modyfikacja powierzchni kompozytu; przy zastosowaniu fazy włóknistej, która kierunkuje adhezję i proliferację komórek.

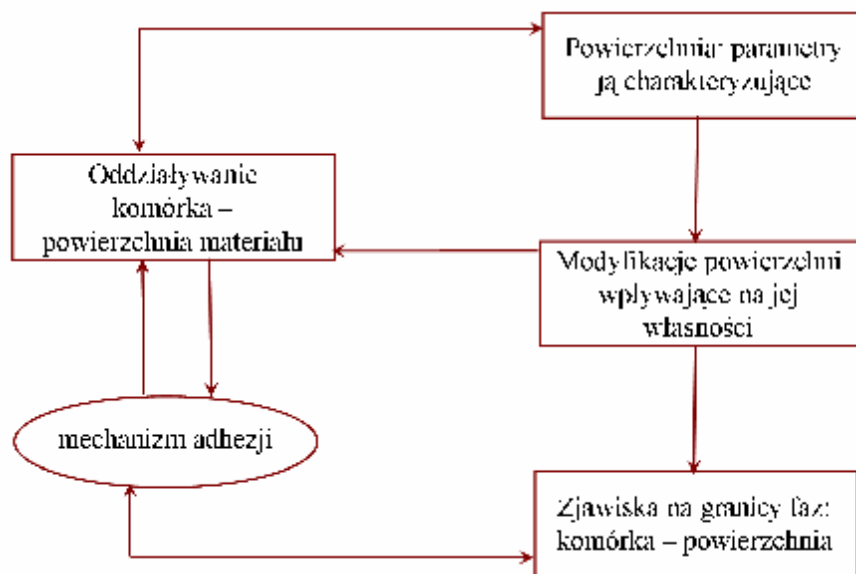
Sformułowany w ten sposób zakres pracy sprawił, że część literaturową podzielono tematycznie na dwie części. Pierwsza; dotyczy biomateriałów stosowanych w medycynie ze szczególnym uwzględnieniem grupy kompozytów oraz membran kompozytowych stosowanych do celów techniki GBR. Ta część literaturowa stanowi odniesienie do aplikacyjnego charakteru pracy, wytworzenia membranowych materiałów kompozytowych.

Druga część przeglądu literatury dotyczy wpływu powierzchni na odpowiedź komórkową. W miejscu tym skoncentrowano się nad zdefiniowaniem pojęcia powierzchni i parametrów, które ją charakteryzują (budowa chemiczna, zwilżalność, energia powierzchniowa). Na podstawie danych literaturowych wskazano, które z nich wpływają na procesy adhezji i proliferacji komórek na powierzchni implantów. Z literatury wiadomo, że parametry powierzchni można modyfikować nadając jej określone właściwości biologiczne.

Przegląd technik modyfikujących powierzchnię wraz z narzędziami umożliwiającymi śledzenie zmian budowy warstwy wierzchniej stanowią treść *Rozdziału 5*. Daje to czytelnikowi pewien obraz: czym można modyfikować powierzchnię i jaki ma to wpływ na odpowiedź komórkową.

Niezależnie od charakteru powierzchni, stopnia jej przygotowania sprawą kluczową z punktu widzenia odpowiedzi komórkowej są zjawiska na granicy faz: komórka – powierzchnia syntetyczna. Złożoność mechanizmów, jakie muszą poprzedzić proces adhezji i proliferacji sprawia, że natura zjawisk nie jest do końca znana. Znajomość struktury i zasad funkcjonowania komórki a także umiejętność stosowania narzędzi diagnostycznych (metod biochemicznych, immunochemicznych, *fluoroimmunochemiczne*) pozwala na określenie jej stanu czynnościowego a więc możliwości: adhezyjnych (osiadania, rozplaszczanie) i proliferacyjnych (podziałowych) a idąc dalej różnicowania się i migrowania komórek.

Analiza zachowania się komórek na powierzchniach syntetycznych umożliwia nie tylko wnioskowanie o odpowiedzi komórki w warunkach *in vivo*, ale przede wszystkim pozwala na kształtowanie powierzchni w takim kierunku by móc przewidywać lub stymulować ich zachowania tkanki a co za tym idzie otrzymywanie biozgodnych implantów o z góry zaplanowanych właściwościach biologicznych (Rys 1).



Rysunek 1. Schemat układu części literaturowej dotyczącej powierzchni i jej wpływu na odpowiedź komórkową w warunkach *in vitro*

Indeks skrótów stosowanych w pracy

ChS – siarczan chondroityny
ePTFE – poli(tertrafluoroetylen) ekspandowany
PGLA – kwas poligikolid
PLLA – kwas polimlekowy
PCL – polikaprolakton
PGA – kwas poligikolidowy
HA – kwas hialuronowy
Alg – alginianu
PSU – polisulfon
PU – poliuretan
PMMA – polimetakrylanmetylu
PE – polietylen
PP – polipropylen
HAp – hydroksyapatyt
TCP – fosforan triwapniowy
PGA/PLA- kopolimer poligikolid polilaktyd
PLA-co-PGA/PLA – kopolimer polilaktyd poligikolid modyfikowany polilaktydem
EDA – oddziaływania elektron-donor-akceptor
NHS – imid kwasu N-hydroksybursztynowego
SCA – skrobiowy octan celulozy
SPCL – skrobiowy polikaprolakton
PET – politereftalan etylenu
PEG – glikol polietylenowy
DVLO – teoria stabilności układów koloidalnych
PS TC – polistyren do hodowli komórkowych
PI – jodek propidyny
PVDF -polidifluorowiniliden
PTFE - politetrafluoroetylen
PA₆₆ – poliamid 66
Col – kolegen
PPM- produkty przemiany materii
GAG – glikozaminoglikany
ECM – macierz międzykomórkowa/zewnątrzkomórkowa
ECACC – Europejska Kolekcja Hodowlii Komórek
ATCC – Amerykańska Kolekcja Hodowlii Komórek
RGD – motyw peptydowy: Arg-Glic-Asp

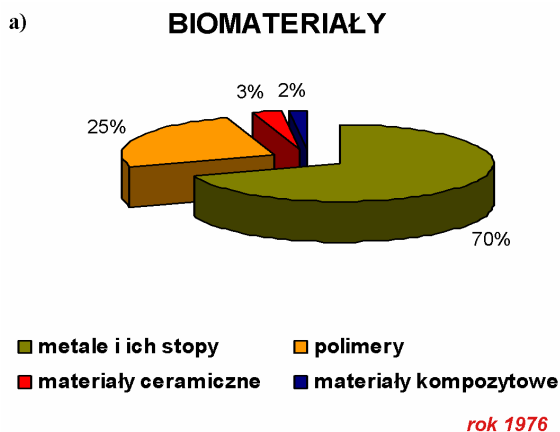
RGDS – motyw peptydowy: Arg-Glic-Asp-Ser
KRSR – motyw peptydowy: Liz-Arg-Ser-Arg
GRGD – motyw peptydowy: Glic-Arg-Glic-Asp
ALP – fosfataza alkaiczna
OP – osteopontyna
OC – osteokalcyna
XTT - wodorotlenek 2,3-bis (2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenyl)-5-[(fenylamino) karbonyl]-2H-tetrazolu, test – barwna redukcja soli tetrazolowej
MTT - bromek 3-(4,5-dimetyltriazol-2-yl)-2,5-difenylnitrotetrazolu, test – barwana reakcja soli tetrazolowej
ELISA – (*enzyme-linked immunosorbent assay*) test immunoenzymosorbcyjny
ATP - adenozyntrofosforan
ER – retikulum endoplazmatyczne
TB/PBS – błękit trypanu w buforze fosforanowym
PBS – bufor fosforanowy
ICAM – cząsteczki adhezji międzykomórkowej
FAK – kinaza płytki przylegania
Ser – kinaza serynowa
TGF-β – transformujący czynnik wzrostu -β
DGEA – motyw łańcucha polipeptydowego koal genu
LGIP - motyw łańcucha polipeptydowego lamininy
BMP – morfogenetyczne białko kości
TNF – czynnik martwicy nowotworów
Brd-U - bromodezoksyurydyna
XPS (ESCA) – spektroskopia fotoelektronów
SIMS – spektrometria mas jonów wtórnych
FTIR-ATR – spektroskopia w podczerwieni z Transformacją Fouriera
STM – tunelowy mikroskop skaningowy
SEM – elektronowy mikroskop skaningowy
UV-Vis – spektrofotometria w zakresie ultrafioletu i zakresu widzialnego
CT – tomografia komputerowa
MIR – rezonans magnetyczny
WW – warstwa wierzchnia
GBR – sterowana regeneracja kości
GTR – sterowana regeneracja tkanek
CVD – metoda osadzania par związków chemicznych
CF – włókna węglowe

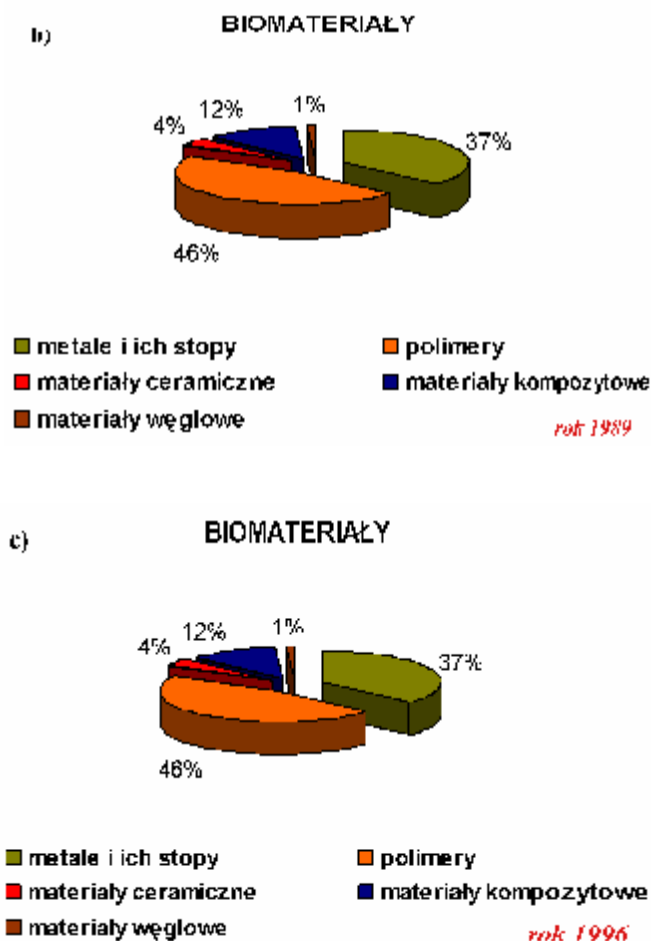
1. Materiały dla zastosowań medycznych

1.1 Wstęp

Do wytwarzania implantów medycznych stosuje się materiały, które ze względu na pochodzenie można podzielić na materiały naturalne i syntetyczne ¹. Materiały naturalne to takie, które otrzymuje się bezpośrednio lub przy udziale nieskomplikowanego procesu ekstrakcji, izolacji lub separacji biomateriału ze źródeł naturalnych: roślinnych lub zwierzęcych. Należą do nich głównie, biopolimery i małocząsteczkowe związki organiczne i nieorganiczne. Do materiałów sztucznych (syntetycznych) należą zarówno proste jak i złożone związki otrzymane na drodze typowego procesu technologicznego.

Inna klasyfikacja materiałów stosowanych w medycynie opiera się na podziale materiałów ze względu na charakter chemiczny i strukturę ². Uwzględniając powyższe kryterium biomateriały można podzielić na cztery podstawowe grupy: metale, polimery, materiały ceramiczne i materiały kompozytowe. Dynamiczny rozwój inżynierii biomateriałów, poszukiwanie nowych biokompatybilnych substancji i tworzyw mogących zastąpić uszkodzone tkanki i narządy sprawił, że na przestrzeni ostatniego dwudziestolecia nastąpiła zmiana proporcji w zakresie stosowanych biomateriałów ^{1 2}. O ile do końca lat 50-tych największą popularnością w medycynie cieszyły się materiały metaliczne i ich stopy (Rys. 1a) o tyle przez lata następnym powodzeniem cieszyły się polimery (Rys. 1b). Rozwój medycyny regeneracyjnej sprawił, że wymagania stawiane materiałom przeznaczonym dla leczenia tkanek i narządów w zakresie ich biofunkcyjności stały się bardzo wysokie. Udział materiałów kompozytowych w odniesieniu do wszystkich materiałów stosowanych w medycynie, stale rośnie (Rys. 2c). Jest to związane z coraz wyższym zestawem wymagań stawianych nowoczesnym materiałom implantacyjnym.





Rysunek 2. Udział materiałów implantacyjnych stosowanych w medycynie na przestrzeni ostatnich 30 lat (wg danych)

1.2 Materiały o zastosowaniu medycznym

Blisko 90% biomateriałów, z których wytwarzane są implanty medyczne otrzymuje się przetwarzając materiały jednofazowe: polimery, ceramikę czy metale. Współczesna medycyna jak i nauki z nią współdziałające (a więc: biologia, chemia, inżynieria materiałowa) ściśle współpracują ze sobą, aby wytworzyć materiał dostosowany pod względem funkcji i właściwości do miejsca uszkodzenia. Wiadomo, że biomateriał musi odznaczać się dobrą tolerancją tkankową, wysoką biogodnością, a także określonymi wymaganiami mechanicznymi (moduł sprężystości, odkształcenie, wytrzymałości) i użytkowymi (łatwość sterylizacji, dopasowanie kształtu).

Równie istotnymi z punktu widzenia biokompatybilności materiału są parametry powierzchni tworzyw implantacyjnych³. Ścisłe dopasowanie właściwości chemicznych, fizycznych (teksturalnych) powierzchni implantu w połączeniu z biologiczną zgodnością a nawet

umiejętnością stymulacji regenerującej się tkanki, zwiększa szansę na lepszą akceptację implantu w warunkach *in vivo*.

Największą popularnością wśród materiałów stosowanych w medycynie cieszą się polimery. Jest to grupa materiałów o szerokim spektrum właściwości chemicznych, fizycznych i materiałowych. Polimery mogą być przetwarzane w dowolne formy: proste i bardziej skomplikowane, łatwo przyjmują postać stałą, włóknistą. Mogą przyjmować postać filmów, tkanin a także żeli. Niestety duża część materiałów polimerowych posiada niezadowalające właściwości mechaniczne z punktu widzenia medycyny (wytrzymałość, moduł sztywności) ².

Polimery resorbowalne jakkolwiek użyteczne i niewymagające powtórnej interwencji chirurgicznej powodować mogą przedłużające się stany zapalne (degradacją materiału polimerowego). Niektóre polimery (np. PEG, PMMA, biopolimery: HA, Alg) charakteryzują się brakiem stałej objętości w środowisku biologicznym (efekt pęcznienia), inne w sprzyjających warunkach zdolne są do uwalniania niespolimeryzowanych merów lub monomerów, działając tym samym toksycznie na tkanki ³.

Polimery stabilne (PTFE, PP, PE, PSU, PU), które nie ulegają degradacji w warunkach środowiska biologicznego, wymagają albo stałej kontroli ich zachowania albo ponownej procedury chirurgicznej po zakończeniu procesu regeneracji ⁴.

Biomateriały metaliczne w postaci np. stopu kobaltowo-chromowego, stali nierdzewnej, tytanu i powłok tytanowych narażone są w środowisku biologicznym na procesy korozyjne. Niektóre z produktów degradacji metali mogą wywoływać alergie (np. chrom, nikiel) ⁵. Metale charakteryzują się właściwościami mechanicznymi znacznie przewyższającymi właściwości mechaniczne tkanki. Dotyczy to głównie modułu sprężystości, zdolności do przenoszenia obciążeń, stąd realne niebezpieczeństwo powstania efektu przeszywnienia (przeniesienia całego obciążenia na implant z pominięciem tkanki). Zastosowanie implantów metalicznych stwarza dodatkowe problemy ze strony praktycznej, przede wszystkim ograniczając możliwość zastosowania medycznych metod diagnostycznych takich jak tomografia komputerowa (CT), czy rezonans magnetyczny (MRI) ⁶.

Wysoka biogodność ceramiki z tkanką kostną spowodowała wzrost zainteresowania materiałami ceramicznymi w zastosowaniach medycznych. Dobre wyniki badań *in vitro* a także obiecujące wyniki badań *in vivo*, odporność na korozję stawiały tę grupę materiałów wśród jednej z najbardziej perspektywicznych. Jednakże parametry mechaniczne ceramiki; a więc kruchość (niska odporność na kruche pękanie), niewielka odkształcalność w kontakcie z tkankami organizmu żywego, niska wytrzymałość a także niski moduł Waibulla (niezawodność) sprawiły, iż obecnie stanowi ona częściej dodatek nadający implantom bioaktywność (HAp, TCP) w kontakcie z tkanką kostną, niż samodzielny materiał implantacyjny ^{7 8 9}. Ceramika korundowa i cyrkonowa należy do grupy biomateriałów intertynych. Charakteryzuje się lepszymi, w porównaniu do bioceramiki apatytowej, parametrami mechanicznymi (tarcie lub zużycie) i wyższą wytrzymałością na zginanie, a

także odpornością chemiczną. Niestety powierzchnie materiałów inertnych odznaczają się niską zdolnością do adhezji, stąd szybko oddzielają się od tkanki, błoną tkanki włóknistej. Zapobiega ona rozpoznaniu implantu jako ciała obcego, ale jednocześnie nie pozwala na trwałe wytworzenie złącza biomateriał – tkanka¹⁰.

Jak widać żadna z opisanych grup materiałowych nie jest w stanie sprostać wymaganiom stawianym materiałom dla współczesnej medycyny. W związku z tym poszukuje się nowych rozwiązań: materiałów, które łączyłyby w sobie optymalne parametry mechaniczne, chemiczne i biologiczne (Tabela 1).

Tabela 1 . Właściwości materiałów istotne dla zastosowania go w dziedzinie inżynierii biomedycznej.

Czynnik	Opis właściwości		
	<i>chemiczne/ biologiczne</i>	<i>fizyczne</i>	<i>mechaniczne</i>
1 poziom właściwości materiałowych	budowa chemiczna (struktura)	gęstość	moduł sprężystości, moduł ścinania, liczba Poissona, granica plastyczności, wytrzymałość na rozciąganie i ściskanie
2 poziom właściwości materiałowych	adhezja	topografia, tekstura, chropowatość	twardość, moduł sztywności wytrzymałość na zginanie
wymagania specjalne (aplikacyjne)	biofunkcyjność, bioinertność, bioaktywność, biodegradacja	kształt, geometria, wł. elektryczne, wł. magnetyczne, wsp. roz. cieplanej, wsp. załamania światła,	odporność na zmęczenie, odporność na pękanie, , odporność na ściernie, umowna granica plastyczności, udarność, wsp. sprężystości poprz.
wytwarzanie, obróbka	powtarzalność, jakość, łatwość sterylizacji, niezawodność		

Takim rozwiązaniem materiałowym wydają się być kompozyty, składające się, z co najmniej dwóch materiałów o odmiennych właściwościach. Materiały kompozytowe o zastosowaniu medycznym pozwalają na uzyskanie optymalnych parametrów mechanicznych. Składniki kompozytu pozostają w pewien sposób niezależne a widoczne granice faz ułatwiają ich identyfikację. Własności takiego materiału muszą być odmienne od własności każdej z faz składowych i są uzależnione od udziałów objętościowych tych faz¹¹.

Istnieją trzy podstawowe typy materiałów kompozytowych w zależności od zastosowanego wzmocnienia: dyspersyjnie, wzmacniane cząstkami lub wzmacnianie włóknami. Z punktu widzenia inżynierii biomateriałów można mówić o specjalnej grupie materiałów kompozytowych przeznaczonych do kontaktu z organizmem żywym (Rys 3)¹². W medycynie znajdują zastosowanie kompozyty konstrukcyjne modyfikowane cząstkami

(najczęściej fazą ceramiczną) lub materiały, które w swojej osnowie zawierają fazę włóknistą (kompozyty 1D, 2D, 3D i MD). W obydwu przypadkach większość własności materiałowych (głównie mechanicznych) można zaprojektować dobierając odpowiednie udziały objętościowe poszczególnych składników¹³.



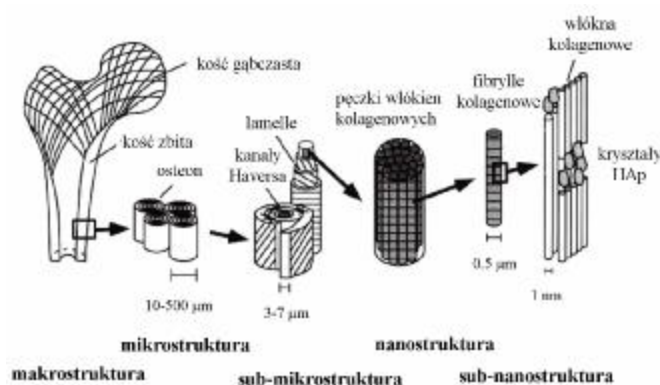
Rysunek 3. Podział kompozytów ze względu na postać fazy wzmacniającej wg A. Toginini

Obiecującą grupą materiałów kompozytowych są kompozyty resorbowalne. Są to układy złożone z resorbowalnej osnowy wzmacniane fazą, która również ulega degradacji. Znajomość czasu resorpcji każdej z faz umożliwia projektowanie materiału, w którym matryca polimerowa ulega szybszej degradacji niż faza wzmacniająca, np. włókna^{2 12}. Pozostały trójwymiarowy szkielet włóknisty stanowi rusztowanie dla komórek narastającej tkanki i ułatwia neowaskularyzację, sam ulegając stopniowej degradacji. Kompozyt resorbowalny - resorbowalny (np. PGA/PLA, PLA-co-PGA/PLA, PLLA/P(L/DL)LA) nie wymaga powtórnej ingerencji chirurgicznej. Niestety w obszarze wytwarzania, materiał taki stwarza wiele problemów. W procesie otrzymywania kompozytu istnieje możliwość uszkodzenia fazy wzmacniającej przez osnowę. Stąd włókna lub cząstki pokrywa się cienkimi filmami (z innego tworzywa) niwelującymi wpływ osnowy na fazę zbrojącą^{12 13}. Innym zabiegiem stosowanym w celu wykorzystania właściwości polimerów i łatwości ich łączenia jest otrzymywanie kompozytów, w których w osnowę resorbowalną wprowadza się polimer stabilny w postaci włókien, siatek, tkanin, wiskersów. W ten sposób degradujący się materiał osnowy odsłania strukturę trójwymiarowego rusztowania (ang. *scaffold*), na którym zatrzymują się komórki tkanki i rozpoczyna się proces odbudowy uszkodzonego miejsca.

1.3 Kompozyty naturalne - kość

Duża część tkanek budujących żywe organizmy organizacją struktury przypomina kompozyt. Tkanka kostna, zębina, tkanka chrzęstna, skóra są przykładami kompozytów naturalnych¹⁴. Fazą ciągłą jest w nich matryca organiczna, w której rozproszone są cząstki (np. apatytowe) lub/i włókna (np. kolagen), a najczęściej obie z tych faz jednocześnie.

Kość to materiał kompozytowy o anizotropii własności mechanicznych. Zdolność tę zawdzięczają zróżnicowanej, hierarchicznej strukturze, a także specyficznemu połączeniu elementów włóknistych (kolagen typu I i typu IV) z cząstkami mineralnymi (hydroksyapatyt) rozmieszczonymi w osnowie organicznej (macierz międzykomórkowa: GAG, proteoglikany, białka niekolagenowe: BMP)¹⁵. Właściwości mechaniczne włóknisto – krystalicznego układu kompozytowego, jakim jest kość zbita, wspomagane są przez wielopoziomową strukturę hierarchiczną. Organizacja tej struktury jest następująca: włókna kolagenowe skręcone względem siebie tworzą fibrylle, te z kolei skupione są w pęczki włókien budujących lamelle. Koncentrycznie ułożone lamelle otaczają kanały Haversa, które odżywiają i natleniają kość – tworząc strukturę osteonu (podstawowa jednostka budulcowa kości zbitiej, Rys 4).



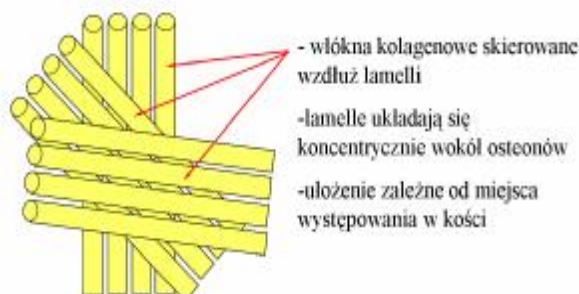
Rysunek 4. Hierarchiczna organizacja tkanki kostnej (kość długa) wg *J-Y Rho*

Budowę kości można rozpatrywać w skali makro (kość zbita i gąbczasta), w skali mikro i submikro (osteony z widocznymi kanałami Haversa), a także w skali nanometrycznej, gdzie widoczne są pęczki włókien kolagenowych poprzątkane cząstkami apatytu. Zróżnicowane ułożenie włókien kolagenowych, odmienne w każdej z sąsiadujących warstw (zmienny kąt ułożenia włókien kolagenowych względem siebie) zapewnia kościom bardzo dobre właściwości mechaniczne (Rys 5)¹⁶.

Struktury te układają się w kości w określonym porządku: od strony zewnętrznej kości (okostnej) warstwy blaszek układają się równolegle opasując cały obwód kości (blaszki podstawowe zewnętrzne, blaszki generalne) a od strony wewnętrznej, czyli jamy szpikowej znajdują się blaszki podstawowe wewnętrzne, rozmieszczone koncentrycznie^{6 17}.

Wewnętrzna budowa kości przystosowana jest zarówno do przenoszenia dużych obciążeń jednorazowych, jak i cyklicznych obciążeń o mniejszej amplitudzie. Na obciążenia cykliczne kość, jako aktywna, żywa tkanka reaguje, dzięki zintensyfikowanej cyrkulacji płynów odżywczych, zwiększeniem masy i wzrostem grubości ³.

Hierarchiczna budowa kości zapewnia wysoka odporność na obciążenia dynamiczne, wytrzymałość na zrywanie i ściskanie. Złamanie ma miejsce w momencie, gdy przerwane zostaną wszystkie poziomy organizacji kości: pojedyncze włókna kolagenowe, fibrylle kolagenowe, pęczki włókien kolagenowych poukładanych koncentrycznie wokół osteonów. Oprócz tego musi dojść do zniszczenia macierzy międzykomórkowej, w której oprócz włókien znajdują się cząstki HAp ¹⁸.



Rysunek 5. Ułożenie włókien kolagenowych w kości zbitej

1.4 Biomimetyczne kompozyty kostne

Jedną z dróg poszukiwania biogodnych implantów są prace nad tzw implantami biomimetycznymi. W przypadku tworzyw przeznaczonych do regeneracji tkanki kostnej biomimetyzm polega na tworzeniu kompozytów zawierających; bądź fazy zbliżone składem chemicznym do składników kości, bądź też komponenty o geometrii zbliżonej do struktury kości ¹⁹.

Początkowo biomimetyzm w wytwarzaniu implantów kompozytowych prowadził jedynie do konstruowania kompozytów zawierających w swym składzie hydroksyapatyt o parametrach zbliżonych do apatytu kostnego. Materiały implantacyjne zawierające bioaktywne fosforany występowały najczęściej w postaci warstw (kompozyty warstwowe) lub wtrąceń o różnej dyspersji cząstek nieorganicznych ²⁰. Biomateriały te weszły do praktyki klinicznej i na ogół cieszą się dobrą opinią zwłaszcza z punktu widzenia właściwości biologicznych ²¹. Niestety wiele z nich, szczególnie tych zawierających substancje bioaktywne (HAp, TCP, CaCO_3) posiada wady, wynikające głównie ze słabej adhezji warstwy ceramicznej nanoszonej na implanty (głównie metaliczne) lub braku wystarczającej ilości wiązań chemicznych pomiędzy grupami fosforanowymi a osnową kompozytu (metale, polimery). Stąd wciąż poszukuje się nowych rozwiązań zaspokajających wymagania nowoczesnej medycyny implantacyjnej.

Naśladując kompozycję naturalną tkanki kostnej najczęściej łączy się bioaktywny apatyt w postaci cząstek z matrycą organiczną ²². Kompozyty takie ze względu na niewielki udział

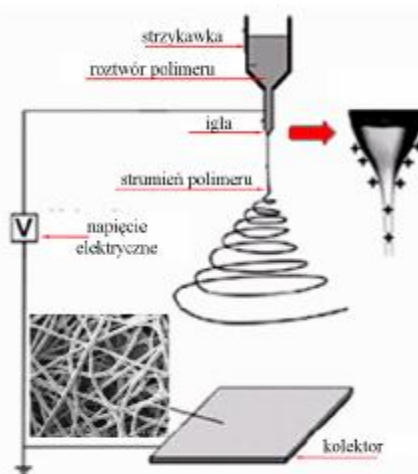
fazy krystalicznej (max 40% wag.), wielkość cząstek jak i nierównomiernie rozproszczenie HAp nie dokładnie odwzorowywały naturalną strukturę kości. Zastosowanie matrycy polimerowej: HAp/PMMA, HAp/PSU, HAp/PE o silnie hydrofobowym charakterze i niewielkim udziale wiązań polarnych nie gwarantuje wytworzenia silnego chemicznego wiązania na granicy faz (głównie słabe wiązania van der Waalsa). Tym samym biomateriały charakteryzują się na ogół niskimi parametrami wytrzymałościowymi ²³.

Nową obiecującą drogą otrzymywania implantów kompozytowych jest wprowadzenie w hydrofilową osnowę (np. PA₆₆) polimerową cząstek HAp o rozmiarach zbliżonych, do tych występujących w naturalnej tkance (50x25x4 nm), co powoduje poprawę parametrów mechanicznych kompozytu (wielkość porównywalna z wartością wytrzymałości w naturalnej kości). Związane jest to z rodzajem oddziaływań chemicznych pomiędzy cząstkami n-HAp a matrycą polimerową (PA₆₆), gdzie powstaje szereg wiązań mieszanych: kowalencyjno-jonowych (pomiędzy grupami karboksylowymi a jonami wapnia czy fosforu) a także wiązania wodorowe i oddziaływania bliskiego zasięgu ²⁴.

Nową generacją tworzyw biomimetycznych stosowanych do leczenia ubytków kostnych są materiały, w których podobieństwo do tkanki kostnej nie ogranicza się jedynie do obecności w ich składzie hydroksyapatytu, ale polega na podobieństwie geometrycznym zarówno na poziomie mikro- jak i nanostrukturalnym. Kompozyty takie stanowią połączenie bioaktywnej krystalicznej fazy apatytowej o rozmiarach nanometrycznych (n-HAp) z fazą włóknistą (struktury trójwymiarowe, ang. *scaffold* - 3D) w osnowie silnie hydrofilowego polimeru (n-HAp/PLLA, n-HAp/Col).

Niestety, nanokompozyty otrzymywane na drodze typowej technologii włókienniczej (przędzenie) na ogół, nie posiadają odpowiednich parametrów mechanicznych. Związane jest to ze zjawiskiem aglomeracji cząstek nanometrycznych w roztworze polimerowym, co skutkuje otrzymywaniem włókien o zróżnicowanej średnicy i wytrzymałości ²⁵.

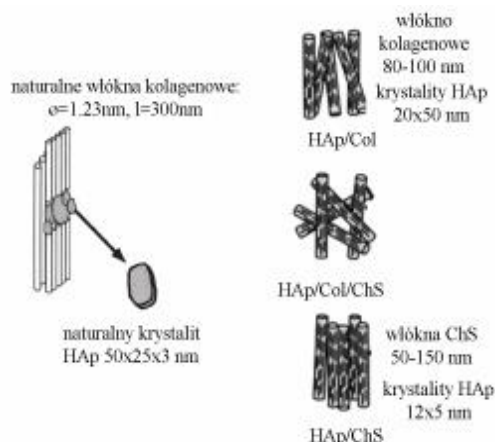
Zastosowanie metody elektroprzędzenia pozwala na otrzymanie trójwymiarowych struktury nanometrycznych włókien kompozytowych będących połączeniem nano-hydroksyapatytu i biodegradowalnej osnowy polimerowej (Rys. 5). Najczęściej stosowane są w tym celu polimery PLLA, P(L/DL)LA, PCL lub ich kopolimery. Tak wytworzone układy są konstrukcją przypominają kość, i wykazują przy tym dobre właściwości biologiczne (wysoką adhezję do powierzchni biomateriału i proliferację komórek kostnych). Obecność n-HAp przyspiesza proces różnicowania się osteoblastów i mineralizację nawet w warunkach *in vitro*. W przypadku metody elektroprzędzenia średnice włókien można dopasowywać



Rysunek 5. Wytwarzanie nanokompozytów włóknistych metodą elektroprzędzenia

eksperymentalnie regulując napięcie, stężenie i lepkość polimeru (nie gwarantuje to jednak wysokiej powtarzalności procesu) ^{26 27 28}.

Kość nie jest jedynie połączeniem fazy włóknistej z krystaliczną, jej składnikami są także związki organiczne wchodzące w skład substancji międzykomórkowej (glikoproteiny, glikozaminoglikany GAG). Odgrywają one kluczową rolę w regulacji zachowania osteoblastów (prolifracja i różnicowanie się komórek) ^{29 30}, inicjują adhezję (powinowactwo glikoprotein do tworzenia kompleksowych połączeń z interynami błony komórkowej), ułatwiają rozplaszczanie a tym samym stymulują procesy namnażania się komórek kostnych i chrzęstnych. W procesach regeneracji ubytków istotny jest moment rozpoczynający proces naprawy, stąd w badaniach nad materiałami biomimetycznymi, coraz częściej wykorzystuje się składniki ECM (np. siarczan chondroityny ChS, fibronektynę FN). Badania nad nanokompozytami n-HAp/Col, n-HAp/ChS, n-HAp/Col/ChS, otrzymanymi metodą strącania wykazują, że materiały te różnią się ułożeniem i wielkością aglomeratów hydroksyapatytu we włóknie (50x20 nm w n-HAp/Col, 12x5 nm w n-HAp/ChS, w naturalnej tkance wielkość krystalitów HAp waha się w granicach 40-20x5x2,5 nm) ³¹. Zachowanie to przypisuje się odmiennej strukturze chemicznej kolagenu i siarczanu chondroityny (ChS). W każdym z przypadków orientacja kryształów n-HAp zależy od możliwości wytworzenia wiązań chemicznych pomiędzy kolagenem a n-HAp lub siarczanem chondroityny a n-HAp. Obecność nowo powstałych wiązań chemicznych w strukturze tłumaczy wyższe właściwości mechaniczne nanokompozytów (najwyższe w przypadku n-HAp/Col/ChS) ³². Składniki układu charakteryzują się udokumentowaną biogodnością, jednakże metoda otrzymywania nanokompozytu jak i sposób jego formowania mogą wpływać na właściwości biologiczne tych materiałów.



Rysunek 6. Porównanie nanokompozytu naturalnego (kość ludzka) z danymi eksperymentalnymi nanokompozytów biomimetycznych: HAp/Col, HAp/ChS.

2. GBR – sterowana regeneracja kości. Materiały kompozytowe w GBR

2.1 Wprowadzenie

Ideą towarzyszącą konstrukcji implantów biomedycznych jest otrzymywanie wszczepów o parametrach chemicznych, fizycznych, geometrycznych zbliżonych do parametrów naturalnych tkanek. Podejście takie jak, już wspomniano wcześniej ma zapewnić pożądaną reakcję komórek a w efekcie końcowym regenerację uszkodzonej tkanki ^{33 34 35}.

Inną drogą poszukiwania nowych tworzyw implantacyjnych do leczenia chorych tkanek i ich ubytków jest technika sterowanej regeneracji tkanki, GTR (ang. *guided tissue regeneration*). Celem tej metody jest stymulacja komórek do szybszej i efektywnej regeneracji i odbudowy uszkodzonej tkanki. U podstaw metody leży przygotowanie odpowiedniego wszczepu, którego parametry chemiczne, fizyczne i biologiczne wywołują z góry zaplanowaną, reakcję komórek. Materiały stosowane do GTR to przede wszystkim różnego rodzaju membrany (2D) oraz układy przestrzenne - membrany 3D. Projektowanie materiałów dla techniki GTR opiera się na analizie reakcji żywych komórek na określonej topografii materiału w skali: mikrometrycznej, nanometrycznej a także odpowiedzi komórek na skład chemiczny powierzchni (rodzaj i ilość grup funkcyjnych) obecność immobilizowanych makromolekuł zarówno naturalnych (takich jak: białka, polisacharydy) jak i syntetycznych (np. surfaktanty) ³⁶.

Umiejętne stosowanie techniki GTR to sterowanie odpowiedzią komórkową przez dobór odpowiednich parametrów materiałowych, w której największą rolę przypisuje się porowatości, topografii i budowie chemicznej materiału.

2.2 Technika GBR

Szczególnym przypadkiem techniki sterowanej regeneracji tkanki (GTR), odnoszącym się do kierunkowej regeneracji tkanki kostnej jest sterowana regeneracja kości (ang. *guided bone regeneration*), zwana potocznie techniką GBR ^{37 38}. Stosowana jest ona w stomatologii: przy ubytkach powstałych po ekstrakcji zęba, parodontozie, a także w chirurgii twarzoczaszki (ubytki zuchwy, przegrody nosowej), chirurgii plastycznej.

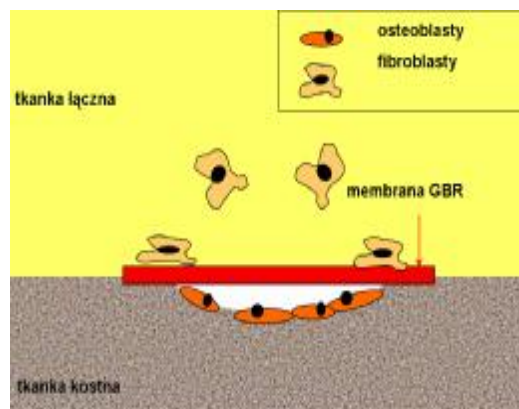
Główną ideą sterowanej regeneracji kości jest wykorzystanie membrany rozdzielającej dwie tkanki: zdefektowaną tkankę kostną od otaczającej tkanki łącznej. Membrana GBR ma za zadanie z jednej strony: ochronę ubytku kostnego i indukcję w jego wnętrzu procesów adhezji, proliferacji i różnicowania się komórek tkanki kostnej. Z drugiej strony powinna stanowić barierę dla napływających komórek fibroblastycznych do miejsca defektu. Obecność fibrocytów i fibroblastów nie jest zjawiskiem korzystnym, komórki te odpowiedzialne są za

wydzielanie substancji macierzy międzykomórkowej takich jak: glikozaminoklikany (GAG) czy prekursor włókien kolagenowych ³⁷.

Efekt obecności fibroblastów w miejscu uszkodzenia jest pojawienie się otoczki łącznotkankowej, co spowalnia procesy osteoindukcji i osteointegracji ³⁹. Funkcje membrany GBR przedstawia Rys 7.

Skuteczna separacja międzytkankowa przy jednoczesnym zachowaniu zdolności przepuszczania: substancji odżywczych, gazów, produktów przemiany materii to zadania, jakie stawiane są w pierwszej kolejności materiałom membranowym wykorzystywanym w technice GBR ⁴⁰. Biomateriał taki powinien

charakteryzować się kontrolowaną porowatością, odpowiednio przygotowaną powierzchnią, z której jedna strona wpływałaby na proliferację osteoblastów a druga charakteryzowałaby się biozgodnością z komórkami tkanki łącznej. Biofunkcyjność membrany gwarantuje odpowiednia wytrzymałość i elastyczność materiału a także poręczność medyczna (prosta sterylizacja, możliwość formowania dowolnych kształtów) ⁴¹. Technika sterowanej regeneracji kości znana jest od końca 60-tych jednakże prace związane z poszukiwaniem optymalnych rozwiązań w zakresie wytwarzania membran trwają nadal.



Rysunek 7. Idea techniki sterowanej regeneracji kości GBR

2.3 Materiały wykorzystywane w membranach GBR

Podstawowym problemem, dotyczącym wytwarzania materiałów membranowych jest nie tylko kontrola procesu rozdziału (substancji, komórek), ale przede wszystkim ich trwałość w środowisku *in vivo* ⁴². Współistnieją ze sobą dwie równoważne tendencje. Jedna z nich ukierunkowana jest na zastosowanie materiałów stabilnych, nieresorbowalnych, inertnych dla środowiska tkankowego i druga nastawiona na wykorzystanie materiałów biodegradowalnych lub resorbowalnych ⁴³.

Podstawową zaletą stosowania materiałów stabilnych są ich bardzo dobre właściwości biologiczne, ponieważ są to polimery stosowane od lat w medycynie np.: politetrafluoroetylen (PTFE). Są to materiały biozgodne, biostabilne, charakteryzujące się niską energią powierzchniową. PTFE stosowany jest jako biomateriał na protezy naczyń krwionośnych, siatek otrzewnowych, błon przeciwwzrostowych ⁴⁴ ⁴⁵ ⁴⁶. W sterowanej regeneracji kości wykorzystuje się modyfikowany politetrafluoroetylen tzw: e-PTFE, Gore-Tex[®]. Pierwszy z nich: e-PTFE (ekspandowany PTFE), otrzymuje się w wyniku specjalnego procesu sieciowania struktury i poddawaniu jej dodatkowemu rozprężeniu (ekspandowanie). W ten

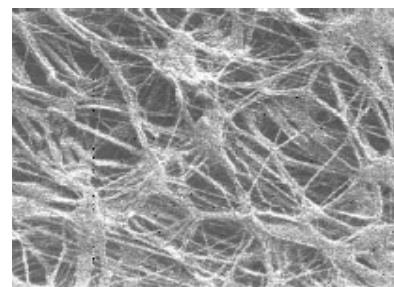
sposób materiał polimerowy zachowuje równomierną porowatość, a także gęstość, uzyskując dobrą przyczepność (mimo naturalnej niskiej energii powierzchniowej i niskiej skłonności do adhezji).

Membrany z Gore-Texu (Rys. 9) otrzymuje się poprzez kontrolowane przynajmniej dwukierunkowe rozciąganie cienkiej folii teflonowej i natychmiastowej jej wprasowywanie w inny polimer. Najczęściej tą matrycą są polimery typu Dacron® lub Nylon® charakteryzujące się już własnym splotem. Dzięki procesowi zaprasowywania teflonu w matrycy, w teflonie tworzą się samorzutnie pory. W obu przypadkach otrzymuje się struktury porowate, w których rozmiar porów kontroluje się odpowiednim naprężaniem i rozprężaniem PTFE (Rys 8).

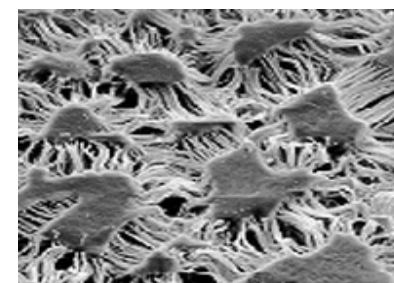
Membrany GBR wykonane z polimerów stabilnych wymagają ponownej interwencji chirurgicznej w miejscu ich zastosowania. Wysoka elastyczność e-PTFE, stwarza niebezpieczeństwo dysfunkcji membrany, a więc niedochowania separacji komórek tkanki kostnej i łącznej. Membrany z e-PTFE lub jego pochodnych mają skłonność do obluzowywania się i zapadania utrudniając w ten sposób regenerację uszkodzonej kości^{47 48}.

Drugą rodziną membran stosowanych w sterowanej regeneracji kości są polimery naturalne (głównie kolagen np.: Bio-Gide®), lub polimery syntetyczne: bioresorbowalne lub/i biodegradowalne (Guidor®, Resolut®, Vicryl®)^{42 47 48}. Najważniejszą ich zaletą jest określony czas trwałości membrany (czas degradacji polimeru) w miejscu stosowania a zatem brak konieczności powtórnej operacji i usuwania wszczepu.

Badania trwałości polimerów biodegradowalnych (PGLA, PLLA, PCL) prowadzone w warunkach *in vitro* nie zawsze pokrywają się z czasem degradacji uzyskiwanym w warunkach organizmu żywego. W takim wypadku materiał implantacyjny zamiast pobudzać tkankę kostną do szybszej regeneracji, opóźnia efekty odbudowy wzmagając przy tym niekorzystne stany zapalne⁴⁹. Badania porównawcze nad tymi trzema grupami materiałów (naturalnym Bio-Gide®, resorbowalnym Resolut®, Vicryl® i stabilnym e-PTFE) wykorzystywanymi w sterowanej regeneracji kości wskazują, że stan zapalny pojawiający się w pierwszej dobie implantacji jest rzeczą naturalną niezwiązaną z typem materiału membrany⁴². Materiały wykonane z naturalnego kolagenu (Bio-Gide®) bardzo szybko ulegają degradacji w warunkach *in vivo* podrażniając produktami degradacji otaczające tkanki. Utrzymujący się stan zapalny zanika po miesiącu a w miejscu biomateriału pojawia się cienka warstwa włókien kolagenowych izolująca pozostałość implantu.



Rysunek 8. Mikrofotografia SEM ekspandowanego PTFE (ePTFE)



Rysunek 9. Mikrofotografia SEM tworzywa handlowego Gore-Tex

Czas degradacji materiałów biodegradowalne typu Vicryl® (PLA/PGA) nie jest stały, i zależy od miejsca wszczepu i cech osobniczych organizmu^{50 51}. Mimo, dowiedzionej badaniami, biozgodności resorbowalnego kopolimeru PLA/PGA wykonana membrana bardzo szybko otacza się torebką łącznotkankową, która nie zanika nawet po całkowitej resorpcji biomateriału. Implantacja membrany wykonanej z kopolimeru PGA-TMC (Resolut®) powoduje natychmiastowe pojawienie się włóknistej tkanki łącznej w połączeniu z wysokim odczynem zapalnym. Podrażnienie utrzymuje się nawet po degradacji materiału (16-24 tygodnie). Materiały membranowe wykonane ze stabilnego e-PTFE wykazują wprawdzie krótki i łagodny stan zapalny, ale wywołują wzmożoną sekrecję protokolagenu i pojawienie się cienkiej łącznotkankowej warstwy kolagenowej otaczającej membranę^{40 42}.

Trudny do precyzyjnego wyznaczenia czas degradacji materiałów polimerowych w warunkach in vivo, stwarza niebezpieczeństwo utrzymywania się stanu zapalnego w tkankach sąsiadujących z defektem, i wpływa na czas odtworzenia się uszkodzonej tkanki i jej neowaskularyzację (w zależności od rozmiaru defektu regeneracja tkanki kostnej trwa 2-6 miesięcy)^{52 53}.

2.4 Membrany kompozytowe

Jednofazowe membrany otrzymywane z tworzyw stabilnych czy też resorbowalnych charakteryzują się zbyt niską wytrzymałością, co znacznie ogranicza pole ich zastosowań. Membrana wykonana z polimeru często zapada się do wnętrza ubytku, uniemożliwiając regenerację uszkodzonej tkanki kostnej⁵⁴. Drugim poważnym zarzutem stawianym membranom polimerowym są trudności z zamocowaniem membrany (zafiksowaniem) na granicy defektu. Podobnie jak w przypadku klasycznych tworzyw implantacyjnych również membrany stosowane do sterowanej regeneracji tkanek otrzymuje się w postaci wieloskładnikowych kompozycji materiałowych. Pozwala to na konstrukcję membran biofunkcyjnych spełniających wymagania stawiane im przez medycynę.

Membrany wykonane z materiałów kompozytowych pozwalają na modyfikację szeregu cech materiałowych w zależności od doboru ilości, postaci i jakości składników kompozytu^{47 54 55}. W tym przypadku możliwe jest sterowanie parametrami mechanicznymi (tj. wytrzymałość, sztywność – moduł Younga), parametrami fizykochemicznymi odpowiedzialnymi za przyczepność materiału do tkanki a także za adhezję i proliferację tkanek graniczących z implantem.

Nowa generacja membran GBR to połączenia kompozytowe materiałów stosowanych i wykorzystywanych z powodzeniem w innych dziedzinach inżynierii biomateriałów. Najczęściej w celu poprawy wytrzymałości materiału do osnowy polimerowej wprowadza się drugą fazę - zwaną fazą wzmacniającą. Membrany z PTFE wzmacniane tytanem odznaczają się odpowiednią sztywnością (brak efektu zapadania się) niestety są przyczyną lokalnych

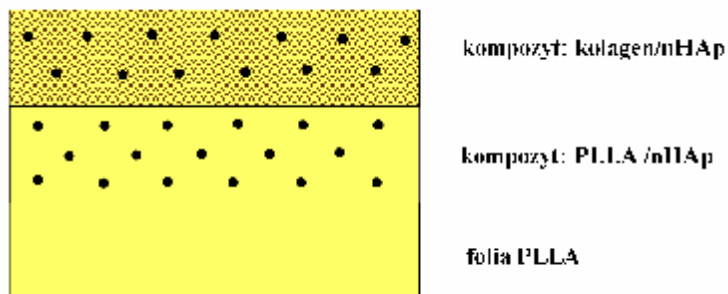
podrażnień; szczególnie na granicy implantu ⁴⁷. Laminat wykonany z perforowanych folii tytanowych powlekanych PTFE, zachowuje pożądaną sztywność, jest na trwałe fiksowany z kością szpilkami tytanowymi. Niestety podczas zamocowywania elementy te mogą działać podrażniając a w skrajnych wypadkach destrukcyjnie na błonę śluzową (stomatologia) lub okostną (kość, chirurgia twarzoczaszki) ⁵⁶. Lepszą przyczepność z ścianami tkanki kostnej okalającej defekt uzyskuje się stosując polimerowe kompozyty włókniste. Polimerowa faza włóknista modyfikowana jest węglanem wapnia (PCL/CaCO₃) w celu poprawy biozgodności i przyspieszenia osteointegracji z naturalną tkanką kostną. Materiał włóknisty wpływa w tym wypadku nie tylko na usztywnienie membrany, ale dzięki zastosowanym komponentom naśladuje strukturę naturalnej tkanki (udział włókien o średnicach: mikro-, submikro-, nanometrycznych), wzmagając adhezję i proliferację osteoblastów ⁴¹ ⁵⁷. Innym rodzajem modyfikatora matrycy polimerowej (PLA, PLA/PGA) wpływającym na bioaktywność membran GBR są cząstki ceramiczne: HAp, TCP. W prowadzenie do osnowy resorbowalnego PLA nano-HAp wpływa na wzrost wytrzymałości i osteokonduktywność kompozytu. Problemem pozostaje nadal sprawa degradacji materiału zależna od metabolizmu pacjenta i brak elastyczności układu (przesztywnienie) ⁵⁸. Nowym rozwiązaniem w dziedzinie sterowanej regeneracji kości było zastosowanie materiałów membranowych przygotowywanych tuż przed implantacją tzw. membran *in situ*. Powierzchnię kompozytów PLA/n-HAP lub PLA/ β -TCP pokrywano tuż przed implantacją czynnikami wzrostu kości (BGF) lub nanoszono na nią płytki krwi połączone z czynnikiem BGF (ang. *bone growth factor*) ⁵⁹ ⁶⁰. Kontrolowany czas resorpcji kompozytów membranowych (24 tyg. test *in vivo*) uzyskano stosując jako osnowę: termoplastyczny kopolimer PGLC modyfikowaną β -TCP. Niestety w trakcie testów *in vitro* obserwowano znaczne obniżenie wytrzymałości membran PLGC/ β -TCP, których wytrzymałość zależy od trwałości wiązań TCP z grupami karbonylowymi, C=O w środowisku biologicznym ³⁷.

W fazie badań pozostają materiały membranowe oparte o bioresorbowalny polimer naturalny, jakim jest alginianu sodu. Materiał ten nie ma formy typowej membrany rozgraniczającej defekt kostny od tkanki łącznej. Alginian wprowadzany jest w miejsce uszkodzenia w postaci roztworu, a następnie zestalany (żelowany) przy zastosowaniu 3% CaCl₂. W ten sposób uzyskuje się dobre przyleganie biomateriału do ścian ubytku i pewną separację tkanki kostnej od tkanki łącznej. Poprawę możliwości regeneracyjnych tkanki kostnej można stymulować obecnością w roztworze NaAlg antybiotyków lub czynników wzrostu. Badania histopatologiczne wykazały, że wprowadzenie do ubytku biopolimeru utrwalanego chlorkiem wapnia powoduje minimalny stan zapalny, wokół membrany nie pojawia się otoczka łącznotkankowa a obecność BGF przyspiesza osteosyntezę. Wadą membrany, z NaAlg jest jej bardzo niska wytrzymałość (~ 32 kPa), która ogranicza stosowanie materiału do niewielkich uszkodzeń tkanki kostnej ⁶¹.

2.5 Gradientowe materiały membranowe

Nowością w dziedzinie stosowanych biomateriałów membranowych GTR, jest zastosowanie konstrukcji gradientowych, typu FGM (tzw. *functional gradient material*). Tworzywa określane mianem biomateriałów gradientowych stanowią połączenie materiałów różniących się jednym lub wieloma właściwościami materiałowymi między sobą (np. gradient degradacji i/lub gradient bioaktywności). Implanty FGM mogą stanowić jedynie zestawienie biomateriałów o zróżnicowanej strukturze chemicznej.

Materiały FGM otrzymywane są najczęściej na drodze łączenia warstw, z których każda charakteryzuje się innymi właściwościami. Taka kompozycja materiału wydaje się być skuteczną metodą otrzymania materiału spełniającego praktycznie wszystkie z postawionych wymogów membran GBR/GTR (trwałości/degradacji, aktywności, sztywności czy w końcu łatwość fiksacji). Przykładem takiego rozwiązania konstrukcyjnego jest membrana złożona z trzech warstw: mineralizowanego kolagenu, modyfikowanego n-HAp, warstwy kompozytu n-HAp/PLLA i czystej folii polimerowej oraz folii PLLA (Rys 10). Pierwsza z warstw ulega szybkiej resorpcji (kolagen/n-HAp). Zapewnia wysoką biogodność a biomimetyczna struktura włóknista z cząstkami ceramicznymi o rozmiarach nanometrycznych ułatwia i przyspiesza odbudowę uszkodzonej tkanki. Druga warstwa (PLLA/n-HAp) odgrywa rolę przejściową i charakteryzuje się dłuższym czasem degradacji. Trzecia z nich, folia polimerowa PLLA, odpowiada za utrzymanie odpowiedniej sztywności membrany (nadaje właściwości mechaniczne)⁵⁸.



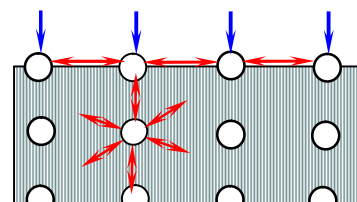
Rysunek 10. Schemat membrany GTR/GBR wykonanej metodą gradientowych materiałów funkcjonalnych (FGM)

Metoda konstrukcji membran gradientowych GTR/GBR stwarza nowe możliwości, jeśli chodzi o przygotowanie materiałów (praktycznie każdą z warstw można modyfikować w zależności od potrzeb) i wzajemnego ułożenia (związanego z funkcją, jaką warstwy te mają pełnić).

3. Rola powierzchni w inżynierii biomateriałów

3.1 Wprowadzenie

Powierzchnia ciała stałego charakteryzuje się odmienną strukturą a zatem innymi właściwościami niż materiał (wnętrze materiału). Różnice budowy spowodowane są przede wszystkim odrębnym stanem energetycznym powierzchni (zwanej tu również warstwą wierzchnią, WW) względem wnętrza materiału. Atomy z pierwszych kilku warstw atomowych (atomy warstwy wierzchniej) są w innym stanie równowagi niż te znajdujące się we wnętrzu materiału (Rys 11). Lokalne zmiany parametrów sieci atomowej powodują: zmianę wartości sił międzyatomowych a tym samym zmianę własności fizykochemicznych WW⁶².



Rysunek 11 Układ siły działających na atomy wewnątrz materiału i na jego powierzchni.

Pomimo licznych badań prowadzonych nad wpływem powierzchni biomateriału na odpowiedź komórkową do tej pory nie udało się sprecyzować, które z czynników są najistotniejsze w zrozumienia interakcji pomiędzy komórką a materiałem. Wiele prac poświęcono wpływowi chropowatości powierzchni biomateriału, zwilżalności, strukturze chemicznej, krystaliczności, dyfuzji powierzchniowej (cząstek lub defektów np.; na powierzchni ziaren, warstw) czy ładunkowi powierzchniowemu. Najbardziej obiecującymi wynikami wydają się te badania, które dotyczyły wpływu: topografii, zwilżalności, składu chemicznego i energii powierzchniowej na oddziaływanie pomiędzy komórką a powierzchnią materiału⁶³.

Sprecyzowanie właściwości powierzchni biomateriału takich jak topografia, energia powierzchniowa i/lub zwilżalność pozwalałaby z jednej strony osiągnąć oczekiwaną odpowiedź ze strony środowiska biologicznego a z drugiej, znajomość tych parametrów i dawałaby podstawy do umiejętnego sterowania właściwościami warstwy wierzchniej i wykorzystywania jej do kierunkowego zachowania komórek na powierzchni, biomateriału (np. przyspieszanie adhezji i proliferacji osteoblastów przy jednoczesnym opóźnianiu tych procesów u fibroblastów – membrany GTR/GBR).

W rozdziale zostaną scharakteryzowane parametry powierzchni wpływające na odpowiedź: komórek tkanki łącznej: osteoblastów i fibroblastów; a także metody badawcze służące do analizy powierzchni.

3.2 Powierzchnia – ujęcie fizyczne i fizykochemiczne

W ujęciu fizycznym, pod pojęciem powierzchni rozumie się rzeczywisty obraz budowy ciała stałego rozpatrywany w skali mikro- lub makro-, który jest efektem jej nieciągłości wynikającej z obecności szczelin, porowatości i innych nieregularności struktury⁶⁴.

Fizykochemiczne ujęcie problemu powierzchni wzbogacone jest o wpływ oddziaływań ze strony środowiska zewnętrznego na powierzchnię materiału. Mówi się tu o heterogenicznej strefie rozciągającej się pomiędzy dwiema fazami ciągłymi (ciało stałe - gaz lub ciało stałe - ciecz), które zachowuje swoją odrębność pod względem budowy i właściwości. Atomy, cząsteczki, jony WW są rozmieszczone inaczej niż wewnątrz ciała stałego a zatem znajdują się w odmiennym stanie energetycznym, w porównaniu do atomów warstw głębszych⁶⁵. Stąd też atomy na powierzchni mają większą energię potencjalną; każde zetknięcie powierzchni ciała stałego z drugą fazą: gazem lub cieczą, wyzwała procesy prowadzące do zmniejszenia tej energii. Szybkość procesów adsorpcji na powierzchni jest dużo większa niż adsorpcja i dyfuzja atomów, jonów czy cząstek do wnętrza materiału. W wyniku odmiennej budowy WW, procesy zmieniające powierzchnię materiału zachodzą samoistnie (kontakt z inną fazą) lub mogą być indukowane sztucznie (modyfikowanie powierzchni materiału prowadzące do zmiany mikrostruktury lub/i składu chemicznego, *Rozdział 4*).

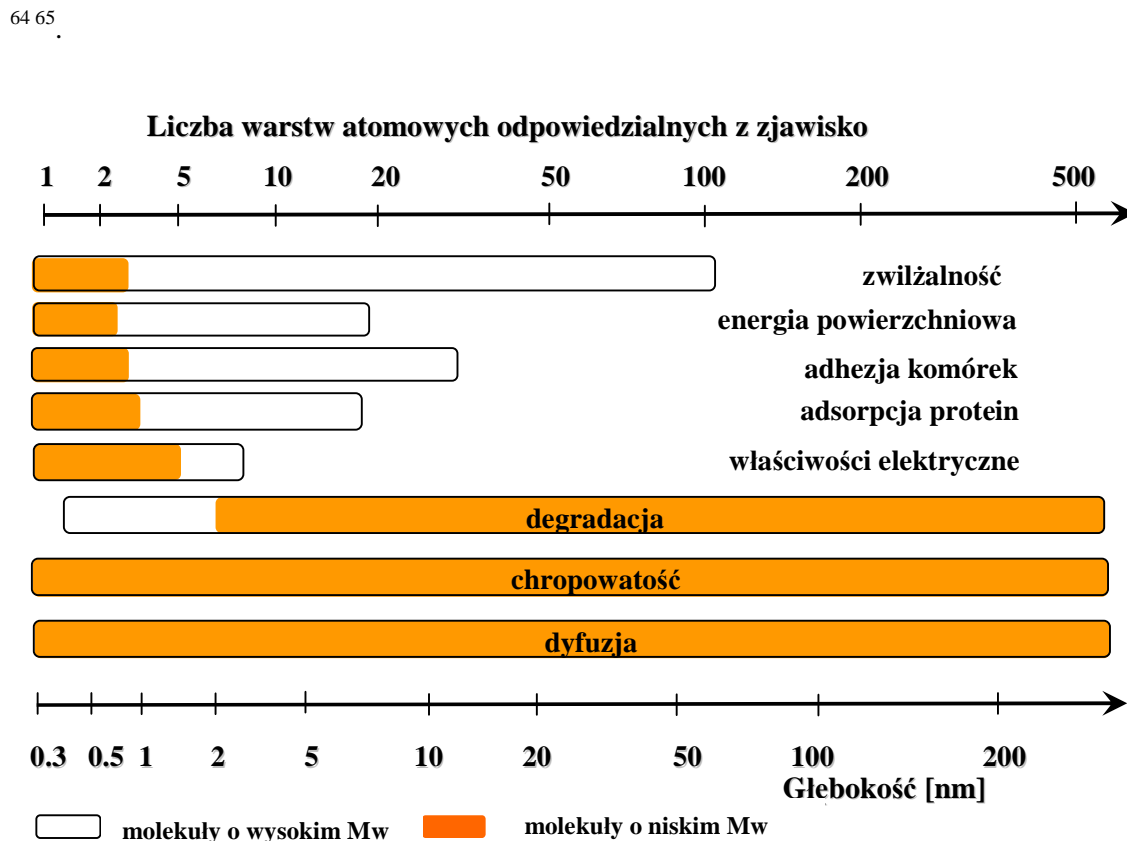
W inżynierii tworzyw sztucznych a także w metalurgii znane jest pojęcie warstwy wierzchniej⁶⁶. Mianem tym określa się warstwę materiału ograniczonego powierzchnią, ale również ją obejmującego oraz część materiału wgłąb powierzchni (2-3 warstwy atomowe). Warstwa wierzchnia (WW) wykazuje odmienne cechy fizyczne i chemiczne niż materiał podstawowy a jej rzeczywista grubość zależy od skali obserwowanego zjawiska (a więc od obserwatora i narzędzia, jakim się posługuje). Do takiego traktowania powierzchni jako warstwy wierzchniej materiału skłania się również Buddy D. Ratner sugerując, że powierzchnia (vs warstwa) zależy od rodzaju materiału: np. dla złota wynosi 0.5-2 nm ale już dla polimerów jej grubość wynosić może 10-100 nm (w zależności od masy cząsteczkowej polimeru)⁶⁴. Niepowtarzalny charakter warstwy powierzchniowej biomateriałów jest również efektem zanieczyszczenia środowiska zewnętrznego, dlatego warstwę tą należy wyszczególnić i podawać jej cechy oddzielnie, niezależnie od innych, opisujących wnętrze materiału⁶⁷.

3.3 Parametry opisujące powierzchnię

Charakterystyka powierzchni możliwa jest po określeniu wielkości opisujących jej stan, należą do nich ⁶⁴:

- topografia/tekstura powierzchni,
- skład chemiczny (na poziomie: atomowym, submolekularnym lub makromolekularnym)
- niejednorodność w płaszczyźnie równoległej do powierzchni (np. domenowość)
- niejednorodność w płaszczyźnie prostopadłej do powierzchni (np. gradientowość)
- krystaliczność

Uwzględniając fizykochemiczną definicję terminu powierzchnia, a także fakt, że rozważania, dotyczyć będą zjawisk zachodzących na powierzchni materiałów polimerowych (tj modyfikacja powierzchni, zjawiska adsorpcja protein i adhezji komórek) termin powierzchnia będzie używany wymiennie z pojęciem warstwa wierzchnia. Mianem tym określa się tu głębokość materiału do 100 warstw atomów lub maksymalnej głębokości 0,5 μm (Rys 12) ⁶³

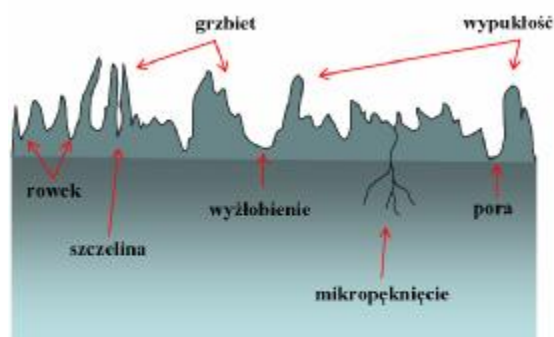


Rysunek 12. Efekty i właściwości powierzchniowe tworzyw sztucznych.

3.3.1 Tekstura powierzchni

Nieregularności powierzchni mające postać wyźłobień, rowków, wypukłości, spękań rys, porów określa się mianem tekstury materiału (Rys. 13) ⁶⁸. Jeśli ich wielkość i rozłożenie na powierzchni biomateriału zostanie sprecyzowane mówi się wtedy o topografii powierzchni ⁶⁹. Ze względu na kształt, rozmiar i sposób otrzymywania chropowatości powierzchni, nieregularności warstwy wierzchniej zostały pogrupowane w sześć klas. Pierwsza z nich, zwana klasą makro-nierówności związana jest z błędami powstałymi w trakcie wytwarzania biomateriału i dotyczy zmian w profilu gładkości widocznych gołym okiem w warstwie wierzchniej. Klasa druga to tzw. falistość powierzchni, dla której zachowana jest zasada dysproporcji głębokości oraz odległości nierówności. Jeśli różnica stosunków pomiędzy wzniesieniami a obniżeniami powierzchni jest 5÷100 krotnie większa wtedy w zależności od kształtu chropowatości mówi się o 3, 4 albo 5 klasie chropowatości. I tak, klasa trzecia to nierówności typu rowkowatego, czwarta określa zagięcia powierzchni rysy, wyspy, spiralności powstałe w trakcie oczyszczania. Klasa piąta to chropowatości wynikające ze struktury krystalicznej powierzchni materiału ⁶⁷.

Specjalnym rodzajem nierówności powierzchni, charakteryzującym topografię materiału jest jego porowatość. Zabieg ten może być działaniem celowy polegającym na wypłukiwaniu porogenu (cukier, sól, skrobia krystaliczna), tkaniu włókien, spiekaniu (wypalaniu) jednej z faz. Jednocześnie porowatość może być konsekwencja obróbki laboratoryjnej powierzchni materiału przez: nanoszenie warstw, osadzanie filmów lub immobilizację molekuł ⁷⁰. Porowatość



Rysunek 13. Zespół nierówności charakteryzujących teksturę / topografię powierzchniowych

materiału bywa często rozpatrywana jako oddzielny parametr, charakteryzujący struktury trójwymiarowych rusztowań dla komórek i tkanek (*3D scaffold*) istotnych z punktu widzenia inżynierii tkankowej.

3.3.2 Skład chemiczny powierzchni

Rozpatrywane powierzchnie biomateriałów kontaktowane są z roztworami wodnymi. Na etapie badań laboratoryjnych (*in vitro*) są to media hodowlane (roztwory wodne z jonami soli, substancji odżywczych i antybiotyków), w późniejszym czasie badań - *in vivo*, są to płyny tkankowe, krew (wodne roztwory soli z elementami morfotycznymi). W tym kontekście istotnym z punktu widzenia oddziaływania ze środowiskiem biologicznym jest

obecność na powierzchni biomateriału odpowiednich wiązań chemicznych zapewniających jej właściwości polarne ^{63 64}. Charakter polarny warstwy wierzchniej materiału gwarantują ugrupowania bądź cząstki o budowie asymetrycznej, z częściowo przesuniętym ładunkiem elektrycznym. W zależności od struktury materiału, na powierzchni pojawiają się siły oddziaływań dążące do utworzenia wiązań chemicznych z molekułami lub/i jonami roztworu. Najsilniejszymi z nich są oddziaływania jonowe (siła wiązania rzędu 10-20 kcal/mol) i oddziaływania międzycząsteczkowe (wiązania wodorowe o sile 3-7 kcal/mol). Rzadziej pojawiają się oddziaływania elektrostatyczne lub będące efektem wewnątrzcząsteczkowego przenoszenia elektronu (oddziaływania typu: donor-akceptor).

Drugim rodzajem wiązań wytwarzanych na powierzchni biomateriału są oddziaływania (wiązania) van der Waalsa. Należą one do oddziaływań słabych (energia wiązania 1-2 kcal/mol) i zachodzą pomiędzy wszystkimi typami atomów. Związane są z pojawieniem się chwilowych fluktuacji chmury elektronowej (chwilowe dipola) i występują w każdym materiale. Oddziaływania van der Waalsa odpowiadają także za przyciąganie się cząsteczek niepolarnych ⁷¹.

3.3.3 Zwilżalność

Polarne powierzchnie biomateriałów w roztworach wodnych oddziałują z molekułami rozpuszczalnika - wody ⁷². Bliskość grup polarnych (karboksylowych, hydroksylowych itp) ściśle wyznacza zachowanie powierzchni w kontakcie z środowiskiem biologicznym. Podstawową, bo najsilniejszą, jest interakcja pomiędzy wodą a kwasem Lewisa (cząsteczka lub miejsce na powierzchni, gdzie występują atomy pozbawione pary elektronowej, z tzw. luka elektronowa) lub zasadową grupą funkcyjną (NH_2 , COOH , COC , OH) będącą donorem elektronów. Drugim rodzajem oddziaływań pomiędzy hydrofilową powierzchnią a roztworem, są oddziaływania międzycząsteczkowe, do których należą: siły międzyjonowe, siły van der Waalsa, oddziaływania EDA (elektronowo-donorowo-akceptorowe) i oddziaływania mostkowe (tlenowe, wodorowe). Tę złożoną sytuację powierzchni dobrze zwilżanych komplikuje dodatkowo niejednorodna budowa powierzchni materiału. Stąd w większości przypadków, określenie hydrofilowość powierzchni jest tylko pewną wartością uśrednioną ⁷³.

Zachowanie powierzchni hydrofobowej zdeteminowane jest przez obecność w warstwie wierzchniej organicznych łańcuchów alifatycznych lub związków aromatycznych zbudowanych z grup: $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$. W środowisku wodnym cząstki rozpuszczalnika oddziałują z łańcuchami organicznymi tylko dzięki pojawiającym się siłą van der Waalsa. Praktycznie brak jest oddziaływań donor - elektron i akceptor – elektron. Za materiały zupełnie niezwilżalne uznaje się np. polimery typu: PTFE, PP, PE. Na ich powierzchni dobrze adsorbują polimery silnie hydrofilowe (typu dekstran). Struktura tych polimerów odznacza się

wysokim udziałem grup hydroksylowych, zdolnych do szybkich ruchów rotacyjnych a tym samym intensywniejszego tworzenia sił dyspersyjnych odpowiedzialnych za powstawanie chwilowych dipoli i dipoli indukowanych (siły Londona)^{72,73}.

3.3.4 Swobodna energia powierzchniowa

Z pojęciem zwilżalności powierzchni blisko związana jest energia powierzchniowa. Korelacja tych dwóch wielkości dowodzona była przez wielu autorów^{74, 75}. Obecnie uważa się, iż energia powierzchniowa jest parametrem bardziej precyzyjnym niż zwilżalność. Daje możliwość odpowiedzi na pytanie, o względną wielkości składowych: polarnej i niepolarniej⁷³. Zgodnie z fizykochemiczną definicją swobodna energia powierzchniowa (γ) jest równa pracy potrzebnej do utworzenia nowej jednostki powierzchni (S). Wielkość tą opisuje zależność:

$$\gamma = \sigma - S(\partial\gamma/\partial S) \quad (1.1)$$

Pojawiająca się w równaniu wielkość σ to napięcie powierzchniowe. Siła styczna do danej powierzchni działająca na jednostkę długości. Jeśli założyć, że: $\partial\gamma/\partial S = 0 \rightarrow \gamma = \sigma$, przy $S \neq 0$. Warunek ten jest spełniony, gdy adsorpcja na granicy faz lub potencjał chemiczny każdego ze składników układu są równe zeru⁷⁶.

Standardowo, sytuację powstawania nowej powierzchni rozpatruje się podczas rozdziału dwóch faz znajdujących się w równowadze. Swobodna energia powierzchniowa towarzyszy również procesowi tworzenia się nowej powierzchni. Jest procesem dwu etapowym gdzie w pierwszej fazie dochodzi do utworzenia nowej powierzchni, w której atomy przyjmują nowe położenie, faza druga to osiągnięcie stanu równowagi trwałej przez samorzutne zmiany położenia atomów. W cieczy oba te zjawiska zachodzą jednocześnie stąd można mówić o sytuacji: $\gamma = \sigma$, przy jednoczesnym $S \neq 0$. Konsekwencją takiego traktowania jest zamienne stosowanie napięcia powierzchniowego jako odpowiednika swobodnej energii powierzchniowej⁷⁵.

3.4 Techniki analizy powierzchni

Charakterystyka powierzchni materiału jest sprawą złożoną, podobnie jak sama struktura warstwy wierzchniej. Rozmiar i różnorodność zjawisk, jakie mają miejsce na powierzchni wymagają zastosowania różnych metod fizykochemicznych określających jej parametry ⁶⁴.

Tabela 2. Metody stosowane do charakterystyki powierzchni biomateriałów.

Metoda	Cel badania	Głębokość analizowanej powierzchni	Rozmiar powierzchni badanej	Czułość metody
Kąt zwilżania	zwilżalność, energia powierzchniowa, składowe energetyczne	3-20 Å	1 mm	zależy od składu chem.
Profilometria kontaktowa	topografia powierzchni, profile dwuwymiarowe (2D)	1-5 µm	10-50 µm	średnia
XPS (ESCA)	energia wiązań, rodzaje wiązań, grupy funkcyjne	10-259 Å	10- 150 µm	wysoka
SIMS	analiza cząsteczkowa, elementarna pierwszej warstwy badanej struktury, analiza jonów złożonych z grupy atomów oraz rejestracja izotopów pierwiastków	10 Å-1 µm	100 Å	b. wysoka
FTIR-ATR	rodzaje wiązań, grupy funkcyjne	1-5 µm	10 µm	wysoka
STM	lokalna gęstość stanów elektronowych, struktury atomowe, profil powierzchni skanowanej, topografia 3D (xyz)	5 Å	1 Å	b. wysoka
SEM	mikrostruktura powierzchni	5 Å	max 40 Å	wysoka

Dobór metody analizującej warstwę wierzchnią zależy od informacji, jakie obserwator chce uzyskać (energia powierzchniowa, zwilżalność, topografia, skład chemiczny, struktura). Obecne techniki badawcze pozwalają na charakterystykę materiału od kilku do 250 Å głębokości (XPS) i czułości do 0.1 at. % (SIMS). Zestawienie najpopularniejszych metod badawczych używanych do charakterystyki parametrów powierzchniowych uwzględniających głębokość analizy, rozmiar analizowanej powierzchni i czułość metody zawiera Tabela 2.

3.5 Wpływ parametrów powierzchni na odpowiedź komórkową

Wiele spośród doniesień naukowych pojawiających się w ostatnich latach dotyczy wpływu parametrów powierzchni na odpowiedź komórkową. Wyniki badań *in vitro* nie są jednoznaczne. Brak jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, który z czynników i w jakim stopniu decyduje o adsorpcji białek czy adhezji komórek⁷³. Wydaje się, że odpowiedź komórkowa jest sprawą złożoną zależną od: rodzaju materiału, modelu powierzchni i typu komórek wykorzystanych w trakcie doświadczenia.

Wiele rodzajów komórek reaguje na nierówności powierzchni, dotyczy to zarówno procesów adhezji jak i proliferacji. Czułe na chropowatość powierzchni są między innymi komórki: tkanki łącznej, nerwowej, mięśniowej a także komórki epitelium. Nierówności powierzchni biomateriału wpływają na syntezę i orientację macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) oraz organizację cytoszkieletu komórki a także na szybkość angiogenezy (procesy obserwowane *in vivo*)^{69 72}.

W przypadku fibroblastów i makrofagów stwierdzono, że wpływ na ich zachowanie ma budowa i skład chemiczny warstwy wierzchniej biomateriału. Tekstura materiału wpływa na adhezję i proliferację tych komórek w mniejszym stopniu. Badania prowadzone na powierzchniach inertnych (ceramika: Al_2O_3 , ZrO_2) wskazały, że w pierwszym etapie adhezji (1 dzień hodowli) jest ona największa na powierzchni gładkiej; o chropowatości rzędu 0,3-0,5 μm i a głębokość nierówności nieprzekracza 0,4 μm ⁷⁷. Affrossman *et. al.* stwierdzili, że osadzając fibroblasty na podłożu z blendy polimerowa PS/PBrS, reagują one nawet na obszary o chropowatości rzędu zaledwie kilkudziesięciu nanometrów (ok. 27 nm)⁷⁸. Najlepszym obszarem dla adhezji fibroblastów są powierzchnie o nierównościach $\leq 1 \mu\text{m}$ głębokości i $\geq 5 \mu\text{m}$ szerokości uwzględniające domenowy charakter (wyspowy, łatwy do osiągnięcia na powierzchniach metalicznych i polimerowych)^{78 79}.

Immobilizacja biomolekuł (motyw białkowy RGD, RGDS, KRSR, GRGD), których łańcuch polipeptydowi zawiera sekwencje aminokwasów obecną macierzy zewnątrzkomórkowej ECM (fibronektyna, kolagen) powoduje, że nawet bardzo gładkie powierzchnie hydrofobowych polimerów (PP, PE, PTFE) czy szkła stają się materiałami, do których adherują fibroblasty. Komórki te zdolne są do syntezy prekursorów macierzy zewnątrzkomórkowej, jeśli powierzchnia charakteryzuje się odpowiednią hydrofilowością (75-60⁰, dla polimerów biodegradowalnych PGLA, PLLA, PCL) lub wysokim udziałem składowej polarnej energii powierzchniowej⁸⁰. Wysoką adhezję fibroblastów obserwuje się również na powierzchniach polimerowych modyfikowanych chemicznie np. plazmą: H_2O , O_2 , N_2 . Wszędzie tam gdzie powierzchnia ulega niewielkiej modyfikacji i pojawiają się wiązania karbonylowe, aminowe, estrowe - fibroblasty adherują lepiej. Jest to prawdopodobnie związane z lepszą adsorpcją białek na powierzchni biomateriału a tym

samym z tworzeniem się dogodnych miejsc interakcji receptora integrynowego błony komórkowej fibroblastu z liganem białkowym.

Komórki kostne są wyraźnie czulszymi indykatorami zmian chropowatości powierzchni. Podobnie jednak jak w przypadku fibroblastów optymalna wielkość chropowatości powierzchni ani stan energetyczny powierzchni nie został precyzyjnie określony^{81 82 83}.

Doniesienia literaturowe informują, że na powierzchniach gładkich osteoblasty adherują losowo, nigdy nie osiągając maksymalnego rozplaszczania (standardowej wielkości ok. 50 μm). Nierówności poniżej 0,5 μm są dla nich praktycznie niezauważalne, chyba że nierównościami takimi są cząstki bioaktywne (HAp, TCP). Modyfikacja warstwy wierzchniej tytanu przez punktowe anodowanie (pory powierzchniowe o średnicy 30-100 μm) przyspiesza adhezję osteoblastów (trzykrotny wzrost populacji MG-63 po 3 dniach hodowli). Badania cytoszkieletu tych komórek wskazują na dużą powierzchnię kontaktu i wysoki poziom aktywatora osteogenezy – ALP (fosfataza alkaiczna)⁸⁴. Co więcej, w przypadku adhezji osteoblastów istotnym parametrem jest nie tylko obecność i rozmiar nierówności ale ich kształt. Heksagonalne nanometryczne pory otrzymane metodą μCP (ang. *microcontact patterning*) na powierzchni PLLA/PL(D/L)A stanowią dla komórek atrakcyjne miejsca przyczepu filopodiów (duża liczba miejsc przylegania, ang. *focal contacts*), mimo że w pierwszym etapie osiadania, przyrost populacji komórek zaadherowanych na powierzchni jest niewielki (wzrost o ok. 0,5%)⁸⁵. Z kolei tekstura materiału w postaci podłużnych rowków o rozmiarze mikrometrycznym (kompozyty 2D, polimerowo - węglowe) kierunkuje osiadanie i adhezję osteoblastów, populacja komórek na powierzchni wzrasta dwukrotnie już po jednym dniu kontaktu⁸⁶.

Równie ważną cechą powierzchni wpływającą na proliferację osteoblastów jest hydrofilowość / hydrofobowość materiału. Lepsze wyniki uzyskuje się kontaktując komórki z powierzchniami hydrofilowymi. Jednak zwilżalność ta musi być kontrolowana, materiały zbyt hydrofilowe, przypominające swą strukturą żele - obniżają adhezję komórek. Powierzchnia charakteryzująca się wysoką polarnością wpływa, na obniżenie adsorpcję białek ECM (silne oddziaływanie odpychające jednakowych grup polarnych pomiędzy białkiem a powierzchnią). Błona komórkowa osteoblastów jest strukturą silnie wyspecjalizowaną: dynamiczna struktura błony bardzo szybko grupuje integryny w miejscu gdzie na powierzchni znajdują się miejsca polarne⁸⁷. Wystarczy 30 min. kontaktu medium hodowlanego, w którym zawieszone są osteoblasty z powierzchnią hydrofobową (PSU, kąt zwilżania $\sim 82^\circ$) aby nastąpiło przegrupowanie receptorów błonowych i zorganizowanie miejsc adhezji. Po tym czasie osteoblast zaczyna proces rozplaszczania (ang. *spreading*) i formowania struktur cytoszkieletu. Dwa dni inkubacji przy odpowiednim dostarczaniu substancji odżywczych i czynników wzrostu (BGF) pozwalają na osiągnięcie konfluentnej warstwy komórek.

Związek pomiędzy zwilżalnością powierzchni (energia powierzchniowa) a jej topografią i wpływ tych parametrów na adhezję osteoblastów do powierzchni zbadano na

przykładzie PMMA. Składowa dyspersyjna energii powierzchniowej ($\sim 39 \text{ J/m}^2$) wpływająca na obniżenie adhezji do powierzchni gładkiej, jest tłumiona, jeśli komórki kostne kontaktowane są z powierzchnią chropowatą (średni poziom chropowatości $R_a \gg 1,2 \mu\text{m}$)⁸⁸⁸⁹. Badania nad adhezją osteoblastów do metalicznych podłoży typu Ti6Al4V wskazują jednak, że istotniejszym parametrem odpowiedzi komórkowej osteoblastów jest chropowatość. Wielkości R_a , R_t i S_{xy} wpływają w istotny sposób na adhezję komórek do wyżej wymienionych powierzchni⁹⁰.

Prolifrację komórek znajdujących się na powierzchni biomateriału można zwielokrotnić również poprzez dobór kształtu i wielkości porów. Dowiedziono, że optymalna wielkości porów stymulująca namnażania się osteoblastów waha się w granicach 75-200 μm . Natomiast przy zastosowaniu materiałów, w których wielkość porów wynosi 250 – 300 μm , uzyskuje się wysoką proliferację komórek włóknistej tkanki chrzęstnej⁶⁸.

Innym czynnikiem powierzchniowym wpływającym na adsorpcję białek i adhezję komórek są właściwości fizykochemiczne powierzchni. Powinowactwo powierzchni, domenowość ułożenia grup polarnych lub niepolarnych wpływa na rozkład i łatwość tworzenia się zogniskowanych miejsc przyczepu, zwanych często płytką przylegania (ang. *focal contact adhesion*). Gładkie powierzchnie tytanu lub powierzchnie trawione w niewielkim stopniu przyspieszają organizację aktyny i winikuliny, i bardzo szybko uruchamiają kaskadę sygnałów wewnątrzkomórkowych. Szybkość reakcji cytoszkieletu na powierzchnię materiału jest pochodną wpływu wszystkich parametrów powierzchniowych: energii powierzchniowej, chropowatości i budowy chemicznej powierzchni (zdolność do wytwarzania wiązań)⁹¹.

4. Modyfikacja powierzchni biomateriałów

4.1 Wprowadzenie

Powierzchnie materiałów implantacyjnych są niejednorodne. Heterogeniczność warstwy wierzchniej jest wyznacznikiem zachowania się komórek na powierzchni biomateriału. Atomy budujące warstwę wierzchnią są przyciągane przez atomy sieci wewnętrznej materiału a równocześnie oddziałują z atomami fazy sąsiedniej pozostającej w kontakcie z powierzchnią (np. cieczy lub gazu). Obecnie projektując materiały implantacyjne nie wystarczy skupić się jedynie na spełnieniu wymogów mechanicznych, użytkowych czy w końcu fizykochemicznych biomateriału. Równie istotnym, czasem wręcz ważniejszym zagadnieniem, wydaje się problem reakcji komórek docierających do powierzchni materiału.

Projektując materiał przeznaczony np. na główkę endoprotezy stawu biodrowego nie można skupić się jedynie na wymogach dotyczących jej właściwości mechanicznych i trybologicznych. Równie istotna jest sama powierzchnia implantu, która w tym wypadku powinna być gładka i jednorodna, pozbawiona pęknięć lub wtrąceń. Wytwarzając materiały przeznaczone na sztuczne naczynia krwionośne, nie wystarczy zadbać o ich właściwości użytkowe, stabilność, elastyczność czy wytrzymałość. Bardzo ważne są tu właściwości powierzchni: hydrofobowość, atrombogenność i gładkość, która chroni ją przed osiadaniem cząstek organicznych czy komórek. W końcu, przedstawione w jednym z rozdziałów poprzednich, materiały membranowe służące w technice GBR muszą charakteryzować się określoną przepuszczalnością, ale także powierzchnią, która kierunkuje odpowiedź komórek: z jednej strony stymuluje proliferację osteoblastów, a z drugiej, stanowi barierę dla komórek tkanki łącznej (fibroblasty).

Z powyższych przykładów wynika, że zadania stawiane przed powierzchnią biomateriału są różne, czasem przeciwstawne (wzrost adhezji osteoblastów, inhibitowanie proliferacji fibroblastów – membrany GBR) stąd ogromne zainteresowanie metodami modyfikacji powierzchni. Ich głównym zadaniem jest taka zmiana parametrów powierzchniowych, która kierunkuje w pożądaný sposób zachowanie się komórek.

4.2 Możliwości modyfikacji powierzchni

Powierzchnię materiałów można modyfikować metodami biologicznymi, chemicznymi i fizykochemicznymi. Pierwsze z nich opierają się na immobilizacji biomolekuł na powierzchni (w tym celu stosuje się polisacharydy np: alginiany, hiauroniany lub proteiny np fibryna, kolagen) lub na szczepieniu wybranych elementów białkowych lub samych aminokwasów (motwy RGD, glicyna, alanina ect) ⁹². Pozostałe dwie to metody modyfikacji powierzchni:

chemiczna i fizykochemiczna. Modyfikacja chemiczna dotyczy zmian strukturalnych powierzchni (trawienie, szczepienie, reakcje chemiczne na powierzchni). Modyfikacje fizykochemiczne dotyczą takich metod obróbki powierzchni w wyniku, których uzyskuje się zmianę tekstury materiału, wzrost/spadek chropowatości, zmianę zwilżalności bądź energii powierzchniowej (osadzanie, powlekanie, szczepienie)⁹³.

Wszystkie te zabiegi skierowane są na odpowiedź środowiska biologicznego, przyspieszające osiadanie komórek ich namnażania i odbudowę uszkodzonej tkanki. Dobór metody modyfikacji zależy od charakteru powierzchni materiału. Możliwości modyfikacji powierzchni przedstawiono na Rys 14.

4.3 Przegląd metod modyfikacji powierzchni

Ilość metod modyfikujących powierzchnię jest ogromna, podobnie jak nakłady na badania umożliwiające modyfikację powierzchni biomateriału. Ten fakt uświadamia, jak ważnym elementem w procesie wytwarzania biomateriału jest przygotowanie powierzchni do kontaktu z komórką (tkanką). Strefa modyfikowana powinna być dostatecznie cienka a otrzymywanie jej nie może wpływać na właściwości mechaniczne ani użytkowe (np. trwałość w warunkach *in vivo*) całego materiału^{93 94}. Jednocześnie warstwa zmodyfikowana nie może ulegać rozszczepieniu, pękaniu ani rozwarstwieniu, powinna być możliwie homogeniczna i szczelnie pokrywać powierzchnię, być trwała i funkcjonalna. Idealnym rozwiązaniem byłoby otrzymanie zmienionej powierzchni na grubość 1-10 Å. Podejmowane próby eksperymentalne dowiodły, że warstwy o tej grubości są trudne do przygotowania a dodatkowo wpływają na erozję materiału. Najcieńsze filmy, jakie udało się uzyskać drogą modyfikacji fizykochemicznej wahały się w granicach 25-50 Å, przy zastosowaniu modyfikacji biologicznej grubość osadzonej warstwy jest zależna od łańcucha immobilizowanej molekuly (ok. 10-30 Å). Reorganizacji powierzchni powinna być procesem dobrze poznany ze względu na dodatkowe efekty fizykochemiczne, jakie niesie za sobą: dyfuzja jonów, molekuł, rodników do wnętrza materiału, która może destabilizować jego strukturę, podobnie jak oddziaływania chemiczne związane ze zmianą orientacji łańcuchów (polimery, biomolekuly) czy reakcjami utworzeniem podsieci^{95 96 97 98}. Pokrywanie powierzchni nie może blokować ani zapobiegać naturalnym procesom, jakim poddany jest biomateriał.



powierzchnia wyjściowa, niemodyfikowana



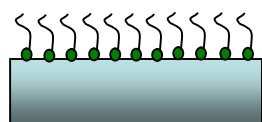
pokrywanie:

- szczepienie warstw lub adsorpcja
- metalizacja
- natryskiwanie płomieniowe lub elektrostatyczne



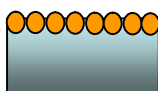
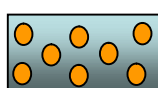
powierzchnie gradientowe:

- wzajemne przenikanie się sieci
- implantacja jonów
- szczepienie

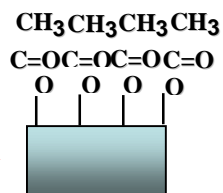
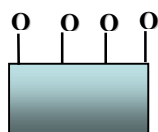


**samoorganizujące się monowarstwy (*self-assembled film*)
warstwy LB (*Laugmira – Blodgett film's*):**

- N-alkilosilany na krzemionce
- N-alkilosiarczany na złocie
- N-alkilofosforany na tytanie

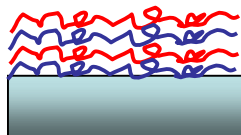


aktywowanie substancji czynnych



reakcje powierzchniowe:

- utlanianie
- silanizacja
- fluorowanie



wielowarstwowe filmy polielektrolitowe



modyfikowanie tekstury powierzchni:

- trawienie rozpuszczalnikami
- obróbka mechaniczna
- naświetlanie UV

Rysunek 14. Schemat najpopularniejszych metod modyfikacji powierzchni biomateriałów.

4.3.1 Metody biologiczne: immobilizacja biomolekuł na powierzchni

Do grupy biomolekuł, które mogą być unieruchamiane na powierzchni materiału zalicza się cząstki aktywne biologicznie takie jak: białka (albumina, kolagen, globulina) lub białka (enzymy, przeciwciała, antygeny), sacharydy (cukry proste, oligosacharydy, polisacharydy), lipidy (kwasy tłuszczowe, fosfolipidy, glikolipidy), środki farmaceutyczne (np. środki antytrombogeniczne, antybiotyki) a także nukleotydy i kwasy nukleinowe. Szczególnie obiecującym podłożem do immobilizacji są polimery, ze względu na obecne w ich strukturze rodzaje wiązań (gł. kowalencyjne) oraz łatwość ich modyfikacji. Ponadto materiały polimerowe można formować w dowolne kształty (filmy, membrany, włókna, rurki, struktury porowate, etc) dopasowane do miejsca i funkcji, jaką ma wykonywać wraz ze zmienioną biologicznie powierzchnią^{99 100 101}.

Modyfikowanie powierzchni biomolekułami poprawia ich biogodność, wpływa na jakość odpowiedzi komórkowej, przyspiesza procesy adhezji i proliferacji¹⁰². Zarówno białka jak i polisacharydy funkcjonalizują powierzchnię biomateriału. Korzyści, jakie płyną z unieruchamiania biomolekuł, dopasowanych do receptorów transbłonowych (białka np. motyw RGD) lub przyspieszających odtwarzanie się ECM (glikozaminoglikany, GAG) są następujące: po pierwsze uruchamiają one szlaki przekąźnikowe a po drugie aktywują czynniki wzrostu komórki^{1102 103 104}. Niektóre z białek immobilizowanych łączą się z czynnikami wspomagającymi np.: indukującymi angiogenezę¹⁰⁵, kierującymi wydłużenie neuronów¹⁰⁶ lub pobudzającymi różnicowanie się osteoblastów. Jeszcze inną rolę spełniają enzymy, które regulują procesy zachodzące na powierzchni. I tak unieruchamiając na powierzchni, biomateriału enzym z grupy lizyn, zapobiega się tworzeniu skrzepu, gdyż grupy ε-aminowe obecne w łańcuchu substancji rozpuszczają włókna fibrynowe¹⁰⁷.

4.3.2 Metody immobilizacji

Istnieją trzy podstawowe metody immobilizacji bioaktywnych molekuł na powierzchniach materiałów. Dwie z nich opierają się na podstawach fizycznych (adsorpcja fizyczne, pułapkowanie), trzecia to metoda chemiczna prowadząca do powstawania wiązań chemicznych¹⁰⁸. Wybór metody immobilizacji zależy od oczekiwanego efektu. Jeśli skutek unieruchomienia ma być przejściowy, krótkotrwały to preferowaną metodą będzie fizysorbcja. Jeśli natomiast skutek ma być długotrwały np. uwalnianie antybiotyku lub modyfikacja powierzchni polimeru biodegradowalnego to lepszą metodą jest chemiczne związanie biocząstki z podłożem. W ostatnim wypadku, bioaktywną warstwą wierzchnią można nie tylko zmieniać parametry powierzchniowe (zwilżalność, energię powierzchniową), ale także regulować procesy degradacji materiału¹⁰⁹. Powierzchnie polimerów inertnych (PP, PE, PTFE, PVDF) nieposiadające w łańcuchu kowalencyjnych wiązań –OH, –NH₂, –COOH, –SH muszą przed immobilizacją biomolekuł zostać poddane funkcjonalizacji powierzchni. W tym celu poddaje się je obróbce fizykochemicznej przez np. fotoszczepienie,

kopolimeryzację, szczepienie chemiczne (ozonowanie+szczepienie) ^{110 111}. Duże możliwości aplikacyjne daje grupa polimerów wytwarzające z łatwością wiązania wodorowe (PGE). Stąd często nazywane są polimerami związującymi (pętającymi) lub tzw. ramionami, do których przyłącza się związki o grupach przeciwnych (heterobiofunkcyjnych). Należą do nich pirydyl, imid kwasu maleinowego, disiarczek, imid kwasu N-hydroksybursztynowego (NHS). Odpowiednia odległość i ułożenie steryczne stwarza świetne warunki do immobilizacji szczególnie małych biomolekuł ^{112 113}.

Immobilizacja oparta o adsorbację fizyczną, jest wynikiem działania sił oddziaływania międzycząsteczkowego: van der Waalsa, dyspersyjnych Londona a także sił oddziaływania elektrostatycznego lub powinowactwa elektronowego ¹⁰⁸. Stąd czas efektywnego unieruchamiania jest ograniczony. Innym rodzajem zatrzymywania aktywnych biomolekuł jest tzw. pułapkowanie, zwane też mikrokapsułkowaniem. Częstka aktywna, najczęściej enzym lub przeciwciało, zostaje unieruchomiona na powierzchni a następnie pokryta płaszczem ochronnym (najczęściej biopolimerem). Siły oddziaływania są na tyle słabe, że enzym zostaje zatrzymany do czasu, kiedy znajdzie się w korzystniejszych warunkach środowiska (odpowiednia temperatura, pH, stężenie innych substancji) i ulegnie desorpcji ¹¹⁴. Fizorbcja jest prostą metodą immobilizacji pod warunkiem odpowiedniego przygotowania powierzchni lub też długotrwałego kontaktu z biocząstką aktywną. I tak unieruchomienie enzymu katalitycznego na powierzchni biopolimeru np.; skrobiowego octanu celulozy (SCA) czy skrobiowego polikaprolaktamu (SPCL) zależy od pH środowiska. Im bardziej alkaliczny roztwór (pH ~ 10) tym efektywniejsze przyłączanie enzymu, ale krótszy czas immobilizacji i szybsza jego desorpcja ¹¹⁵.

4.3.3 Metody chemiczne i fizykochemiczne modyfikacji powierzchni

Dobór odpowiedniej metody modyfikacji powierzchni uwarunkowany jest późniejszym zastosowaniem biomateriału. Jeśli implant przeznaczony jest do kontaktu z krwią to musi odznaczać się wysoką hemozgodnością w tym celu pokrywa się go np.; grupami oktadecylowymi (o wysokim powinowactwie do albuminy) lub plazmowo osadza hydrofobowe polimery fluorowęglowe. Aby poprawić adhezję i wzrost osteoblastów na powierzchni implantów przeznaczonych do regeneracji tkanki kostnej, stosuje się utlenianie powierzchni polimerów (PP, PS, PET), w celu obniżenia ich hydrofobowości; obróbkę plazmą (modyfikacja chropowatości) lub plazmowe osadzenie fluoropolimerów redukujące adhezję komórek endotelium. Kontrolę nad procesem adsorpcji protein osiąga się przez nanoszenie warstwy z PEG (redukcja hydrofobowości powierzchni, ze względu na wysoką zwilżalność polimeru) ⁹⁹. Podwyższenie trwałości materiałów a także poprawę odporności na korozję uzyskuje się przez zastosowanie technik implantacji jonów, anodyzacji albo osadzania z fazy gazowej (CVD). Tabela 4 zawiera główne metody modyfikacji chemicznej i fizykochemicznej.

Tabela 4. Metody modyfikacji powierzchni, i ich dobór w zależności od rodzaju materiału.

metoda/materiał	polimer	metal	ceramika	szkło
<i>Pokrycia połączone niekowalencyjne:</i>				
§ trawienie rozpuszczalnikami	✓	✓	✓	✓
§ osadzenie metoda Langmuira-Blodgetta	✓	✓	✓	✓
§ osadzanie parami (węgiel, metale, związki organiczne)	✓	✓	✓	✓
<i>Pokrycia połączone kowalencyjne:</i>				
§ szczepienie radiacyjne (γ)	✓	-	-	-
§ fotoszczepienie (UV, Vis)	✓	-	-	✓
§ osadzanie z fazy gazowej:				
Ø rozpylanie jonowe	✓	✓	✓	✓
Ø CVD	-	✓	✓	✓
Ø natrysk płomieniowy	-	✓	✓	✓
§ szczepienie chemiczne (ozonowanie+szczepienie)	✓	✓	✓	✓
§ silanizacja	✓	✓	✓	✓
§ immobilizacja molekuł	✓	✓	✓	✓
<i>Modyfikacja powierzchni przez:</i>				
§ trawienie wiązką jonów	✓	✓	✓	✓
§ implantacja jonów	-	✓	✓	✓
§ wymiana jonowa	✓	✓	✓	✓
§ wyładowanie koronowe	✓	✓	✓	✓
§ promieniowanie UV	✓	✓	✓	✓
§ obróbka plazmą	✓	✓	✓	✓
§ reakcje chemiczne:				
Ø utlenianie niespecyficzne (ozonowanie)	✓	✓	✓	✓
Ø modyfikacja grup funkcyjnych (utlenianie, redukcja)	✓	-	-	-
Ø reakcje przyłączenia (acetylacja)	✓	-	-	-
§ powłoki konwersyjne (anodowanie)	-	✓	-	-
§ obróbka mechaniczna (polerowanie)	✓	✓	✓	✓

4.3.4 Reakcje chemiczne

Modyfikacja powierzchni na drodze reakcji chemicznych jest metodą stosowaną od dawna w wielu dziedzinach techniki. W odniesieniu do zmian powierzchniowych biomateriałów reakcje chemiczne można podzielić na specyficzne i niespecyficzne⁹³. W wyniku reakcji specyficznych zmianie podlegają tylko określone rodzaj grup funkcyjnych (np. tylko grupy karbonylowe, C=O) na grupy o innym charakterze (karbonylowe na karboksylowe, C=O na COOH). Reakcje niespecyficzne dotyczą jednoczesnych zmian w różnych ugrupowaniach chemicznych budujących warstwę wierzchnią materiału. Przykładem jest tu utlenianie kwasem chromowym powierzchni PE lub silanizacja.

4.3.5 Szczepienie (ang. *grafting*)

Metody szczepienia promieniowaniem (np. γ , UV) polegają na przyłączaniu reaktywnych grup takich jak: -OH, -NH₂, -COOH lub molekuł, do powierzchni hydrofobowych lub powierzchni o wyjściowym charakterze obojętnym (inertnym)^{116 117}. W zależności od zastosowanego źródła promieniowania (a więc energii) można mówić o szczepieniu radiacyjnym, fotoszczepieniu i szczepieniu z użyciem wysokoenergetycznej wiązki elektronowej. W wyniku przyłożonej energii, wiązania chemiczne w warstwie wierzchniej materiału zostają zniszczone. Powstałe miejsca aktywne wystawione są na działanie monomerów aktywowanych przez obecne w atmosferze reakcyjnej pierwiastki, rodniki lub nadtlenki wytworzone w procesie promieniowania^{117 118}.

4.3.6 Osadzanie plazmowe

Metody modyfikacji plazmowej uważa się za najbardziej efektywne metody modyfikacji warstwy wierzchniej biomateriału. Niskie ciśnienie gazów (N₂, H₂, H₂O, NH₃) dyfundujących tylko do cienkiej warstwy przypowierzchniowej materiałów. Umożliwia uzyskanie jednorodnej warstwy aktywnych grup funkcyjnych¹¹⁹. Powłoki o różnym charakterze można uzyskać w tym samym aparacie zmieniając atmosferę. W przypadku osadzania polimerów rzadko uzyskuje się homogeniczną warstwę, częściej jest to mieszanina cząstek (np. naniesiona warstwa z PTFE jest mieszanina rozgałęzionych polimerów fluorowęglowych).

Zastosowanie tej metody w dziedzinie inżynierii biomateriałów jest ogromne. Forma obróbki plazmowej zwana trawieniem służy do sterylizacji, sieciowania cząstek na powierzchni. Drugi rodzaj modyfikacji powierzchni plazmą to osadzanie: warstw ochronnych lub warstw poprawiających adhezję i podnoszących biogodność. Często zabieg plazmowania stanowi tylko etap przejściowy w szczepieniu polimerów lub immobilizacji biomolekuł^{119 120}.

4.3.7 Osadzanie filmów metodą LB

Specyfika tej metody opiera się na zastosowaniu surfaktantów jako modyfikatorów powierzchni. Specyficzna budowa tych molekuł: polarna głowa i niepolarny ogon pozwala na jednorodne ułożenie na powierzchni wody. Materiał poddawany modyfikacji zostaje zanurzony do roztworu, na powierzchni, którego unoszą się cząstki środka powierzchniowo czynnego (surfaktanta). Osadzająca się warstwa (film fosfolipidowy) zostaje zagęszczony przez ruch bariery i równoczesne zanurzanie i wynurzanie płytki materiału modyfikowanego. Otrzymana warstwa może ulegać wewnętrznej polimeryzacji tuż po uformowaniu filmu (wytworzenie podwójnych wiązań pomiędzy grupami alkilowymi, $-C_nH_{2n+1}$) lub służyć do sieciowania innych molekuł^{121 122}.

4.3.8 Monowarstwy samoorganizujące się (ang. *self-assembled monolayers*)

Metodą modyfikacji powierzchni metalicznych, są warstwy samoorganizujące się: alkanotiole, n-alkilosilanów. Grupy SH lub SiH łatwo oddziałują z powierzchnią metalu tworząc trwałe wiązanie chemiczne, druga grupa funkcyjna znajdująca się na przeciwnym końcu łańcucha węglowego może być wykorzystywana do przyłączania innych molekuł¹²³. Zasada osadzania warstw SAMs jest podobna do osadzania filmów LB, z tą istotną różnicą, że powstający film SAMs jest przytwierdzony do podłoża (kowalencyjne wiązania chemiczne) a dodatkowo jest stabilizowany przez wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe i wiązania van der Waasa pomiędzy łańcuchami. Najlepszą stabilizację struktury SAMs uzyskuje się przy łańcuchach węglowodorowych nie dłuższych niż 24 grupy CH_2 , mówi się wtedy o strukturze quasikrystalicznej monowarstwy. Jest ona zdolna do pułapkowania, sieciowania innych molekuł takich jak białka czy elementy nukleotydów (zasady purynowe lub pirydynowe)¹²⁴.

4.3.9 Wzornikowanie (ang. *patterning*)

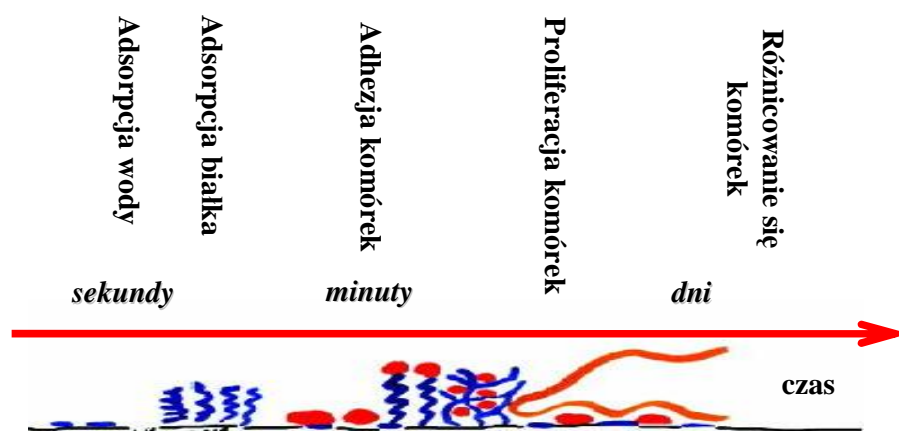
Jedną z nowszych metod modyfikacji powierzchni jest wzornikowanie (patterning). Bombardowanie wiązką jonów, punktowe naświetlanie laserowe czy nastrzykiwanie powierzchni, wpływają nie tylko na zmianę jej właściwości chemicznych, ale przede wszystkim modyfikują topografię powierzchni¹²⁵. Dzięki połączeniu wzornikowania z metodą SAMs uzyskuje się powierzchnie o zróżnicowanej zwilżalności (hydrofilowy PVA modyfikowany monowarstwą ω -alkanotiole)¹²⁶. Wzornikowanie stwarza ogromne możliwości nie tylko, jeśli chodzi o modyfikację powierzchni, ale także konstruowanie materiałów dla inżynierii genetycznej (materiały inteligentne). Zastosowanie tej metody modyfikacji powierzchni pozwala na kontrolę funkcji powierzchni a jej możliwości stosowania są praktycznie nieograniczone w związku z możliwością łączenia jej z innymi metodami (np. SAMs)^{125 126}.

5. Zjawiska zachodzące na granicy faz: komórka – materiał

5.1 Wprowadzenie

Przewidywanie i kontrola zjawisk zachodzących na powierzchni materiału implantacyjnego w trakcie eksperymentów *in vitro* jak i *in vivo* pozostaje wciąż tematem otwartej dyskusji naukowej. Szereg badań i doświadczeń wykonanych w celu określenia i opisanie natury zjawisk zachodzących na granicy faz komórka-materiał, nie jest w stanie udzielić jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, które z parametrów fizykochemicznych powierzchni są najważniejsze w pierwszym, a które w kolejnych etapach oddziaływań komórka materiał, co i w jakim stopniu wpływa na adhezję komórek. Pomimo bogactwa materiału literaturowego brak jest jednoznacznej teorii dotyczącej relacji pomiędzy komórką a powierzchnią biomateriału.

Opis zjawisk zachodzących na granicy faz jest niezwykle trudny ze względu na naturę zjawisk zachodzących w obszarach międzyfazowych takich jak: ciało stałe (powierzchnia biomateriału) – ciecz (krew – *in vivo*, medium hodowlane – *in vitro*) lub pomiędzy ciało stałe (powierzchnia biomateriału) – gaz (powietrze). Zjawiska mające miejsce na granicy faz determinowane są przez właściwości powierzchni. Kolejność reakcji następujących po sobie, po wprowadzeniu syntetycznej powierzchni do środowiska biologicznego jest następująca: zwilżanie wodą → adsorpcja białka → adhezja komórek. Czas trwania poszczególnych etapów wynosi od paru sekund do kilkudziesięciu minut (Rys 15).



Rysunek 15. Zjawiska zachodzące na granicy faz: komórka powierzchnia biomateriału

W niniejszym rozdziale przedstawiono trzy etapy zjawiska, jakie towarzyszy interakcji komórki z powierzchnią materiału syntetycznego. Wiadomo, że w pierwszej kolejności następuje zwilżenie powierzchni biomateriału wodą (preadsorpcja). Etap ten jest ściśle

powiązany z adsorpcją białek na powierzchni biomateriału. Obydwa zjawiska stanowią warunek nieodwracalny i konieczny do wytworzenia wiązań pomiędzy receptorami błonowymi komórki a powierzchnią materiału. Istota zjawiska znanego z chemii fizycznej dotyczącego oddziaływań na granicy faz: ciecz – ciało stałe tłumaczona jest w oparciu o teorię stabilności układów koloidalnych – DLVO (teoria Derjaguina, Landau, Vervy i Overbeck). W wyniku tych zjawisk generowana jest odpowiedź komórki a mianowicie: proliferacja, migracja, różnicowanie się a w przypadkach skrajnych (powierzchnie toksyczne) obumieranie komórek. Natura procesów zachodzących na granicy faz jest skomplikowana i na obecnym etapie wiedzy nie do końca wyjaśniona.

5.2 Adsorpcja białek

Mechanizm adsorpcji protein według niektórych autorów poprzedzony jest zwilżaniem materiału przez kontakt powierzchni z molekułami wody bądź jonami hydroksylowymi (OH^-) lub hydroniowymi (H_3O^+). Czas niezbędny do zajścia procesu penetracji i zwilżania to zaledwie ułamki sekund¹⁰⁷. Prawdopodobnie zależy on od środowiska zewnętrznego (łatwiejszy do osiągnięcia w warunkach *in vitro* niż *in vivo*). Istnienie etapu zwilżania zwanego też preadsorpcją jest kwestionowane przez niektórych badaczy. Powszechnie uważa się, że pierwszą, startową fazą w reakcji komórka – powierzchnia biomateriału jest adsorpcja białek^{127 128 129}. Warstwa organiczna (białkowa) zwana jest warstwą kontaktu, powoduje wzrost siły adhezji i powstanie, tzw. efektu siatki, czyli zajmowania wolnych, najbardziej dogodnych przestrzeni przez osadzające się komórki. Klasyczna teoria adhezji określa przebieg procesu jako kilkietapowy^{107 130 131}. Po pierwsze molekuły: aminokwasy, peptydy muszą natknąć się na powierzchnię (jest to etap konieczny do zainicjowania adhezji komórek na powierzchni biomateriału). Proces ten jest procesem odwracalnym, co oznacza że białka mogą być odczepiane od powierzchni, ale nie zachodzi ich denaturacja. Miejsca zdesorbowanych białek, zajmują inne, charakteryzujące się większym powinowactwem do powierzchni (tzw. efekt Vormanna). Białka przechodzą reorganizację geometryczną (zmianę ułożenia, skręcenia) łańcucha, która ma na celu: wzmocnić ich własną przyczepność do podłoża a jednocześnie uzyskać najbardziej sprzyjającą konformację, ułatwiającą wykrywanie jej przez receptory transbłonowe komórki (integryny).

Trudności z wyjaśnieniem istoty zjawiska adsorpcji białek na powierzchni badanego materiału a także z wytłumaczeniem zachowania samych makromolekuł (preferencje w adsorpcji, możliwość odłączenia się białka z powierzchni) związane są z niespecyficznym oddziaływaniem pomiędzy organiczną makromolekułą (białkiem) a zróżnicowanymi typami powierzchni. Badacze są jednomyślni w twierdzeniu, że kluczową rolę odgrywa tu sam typ powierzchni, do którego adsorbują białka^{132 133}. Niska, selektywna adsorpcja białek zależy od zwilżalność powierzchni i jej energii powierzchniowej¹³⁴. Hydrofobowa powierzchnia adsorbuje więcej fibronektyny niż powierzchnia hydrofilowa, ta druga jednak jest

powierzchnią bardziej efektywną - adsorpcja zachodzi tam szybciej a selektywne wiązanie fibronektyny przyspiesza adhezję komórkową ¹³⁵.

Celem przyspieszenia adsorpcji białek na powierzchniach hydrofobowych modyfikuje się je specjalnymi warstwami białkowymi (fibrynogen, kolagen) lub polisacharydowymi (kwas hialurynowy). Innym sposobem jest kontaktowanie powierzchni z medium hodowlanym wzbogaconym o kompleksy białkowe takie jak fibrynogen, albumina, immunoglobulina G, A lub M ^{136 137}. Kontrola nad procesem adsorpcji białek do powierzchni jest zadaniem trudnym., ze względu na tempo reakcji adsorpcji i desorpcji białek na powierzchniach biomateriałów ¹³⁸.

5.4 Wytworzenie wiązań komórka – biomateriał

Ten etap procesu adhezji można podzielić na dwa pomniejsze, zależne od kinetyki procesu: pierwszy z nich zwany adhezją odwracalną – polega na przyciąganiu przez siły elektrostatyczne komórek do powierzchni z zaadsorbowaną warstwą białkową. Drugi tzw nieodwracalny, bo wiążący ECM z błonami komórkowymi. Wzajemne relacje tych etapów zmieniają się w zależności od warunków środowiska i typu komórek poddawanych badaniu. Najszybciej zachodzi proces adhezji odwracalnej, pozostałe etapy są etapami wolniejszymi, opóźniającymi cały proces.

W pierwszym etapie adhezji najbardziej aktywnym typem oddziaływań są siły van der Waalsa i związane z nim oddziaływania hydrofobowe pomiędzy komórką a warstwą zaadsorbowanych białek na powierzchni. Im mniejsza odległość, tym większą rolę zaczynają odgrywać oddziaływania specyficzne receptorów białkowych wbudowanych w błony komórkowe, odpowiedzialne za adhezję nieodwracalną komórki (Rys 16). Interakcję komórka – materiał rozpatruje się w odniesieniu do klasycznej teorii koloidów teoria DLVO ^{139 140 141 142}. Zgodnie z założeniami teorii, na powierzchni cząstki (tu na powierzchni komórki) znajduje się silnia, związana z błoną komórkową i praktycznie nieruchoma, warstwa jonów powstających w efekcie polaryzacji komórki (warstwa Stera). Z nią skorelowana jest warstwa jonów o znaku przeciwnym, pochodzących z medium hodowlanego (lub z osocza), które często są shydratyzowane (warstwa Hemholtza). Dalej, znajduje się warstwa jonów ruchomych o ładunku różnoimiennym, których koncentracja zmniejsza się wprost proporcjonalnie względem odległości od powierzchni błony komórkowej (warstwa dyfuzyjna). Jony warstwy Stera oraz jony zewnętrznej warstwy Holmota są przytrzymywane na powierzchni komórki, podczas gdy jony warstwy dyfuzyjnej poruszają się swobodnie wraz z ruchem roztworu względem ciała stałego. Na granicy tych dwóch warstw jonów (ruchomej - dyfuzyjnej i nieruchomej związanej z błoną komórki), zwanej płaszczyzną poślizgu, występuje potencjał elektryczny zwany potencjałem elektrokinetycznym lub potencjałem Zeta (ζ). Jego wartość decyduje o zjawiskach powierzchniowych zachodzących na granicy faz: komórka – materiał ^{143 144}. Zjawiska te są

wynikiem występowania sił przeciwstawnych, wynikających z rozmieszczenia jonów wokół komórki. Atmosfera warstwy jonów wokół mikroorganizmu zbliżającego się do podłoża prowadzi do powstania sił odpychania (V_R) oraz sił przyciągania (V_A). Współistnienie sił przyciągania i odpychania opisane jest wzorem (1.2):

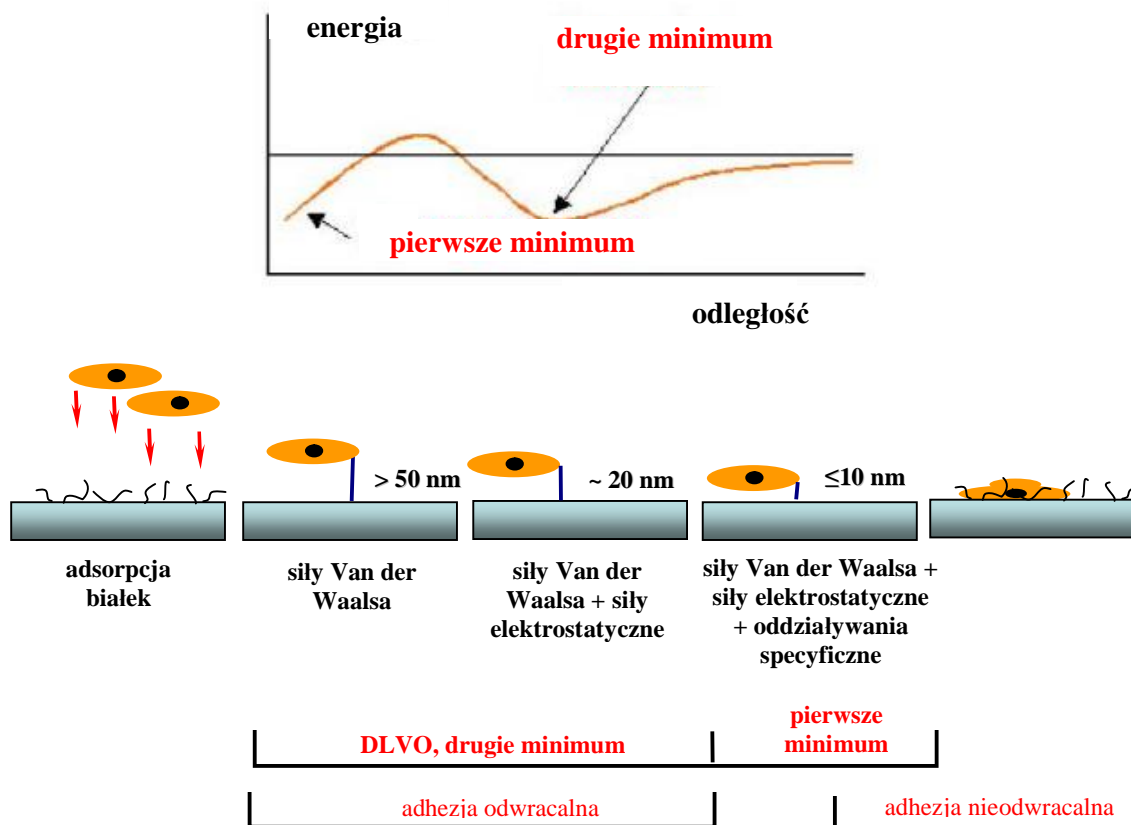
$$V_T = V_R + V_A \quad (1.2)$$

Gdzie: V_T – energia oddziaływania pomiędzy komórką a powierzchnią

V_R – energia odpychania (ang. *repulsion*)

V_A – energia przyciągania (ang. *attraction*)

W praktyce duża odległość pomiędzy powierzchnią z komórką powoduje, że siły odpychania zanikają wykładniczo, znacznie szybciej niż pojawiające się w ich miejsce siły przyciągania. Następuje niewielki niedobór energetyczny objawia się płytkim minimum (tzw. drugie minimum) w układzie energia-odległość (Rys. 16). Jeśli odległość komórka – powierzchnia materiału maleje, bariera sił odpychających zostaje pokonana i dochodzi do trwałego powiązania się komórki z powierzchnią. Stan ten jest stanem trwałym, nieodwracalnym związanym z specyficznym oddziaływaniem receptorów błonowych-integriny z powierzchnią materiału.



Rysunek 16. Rodzaje oddziaływań na granicy faz w ujęciu teorii DLVO

5.5 Ograniczenia teorii DLVO w układach biologicznych

Zastosowanie fizykochemicznej teorii koloidów do wyjaśnienia zjawisk zachodzących w układach biologicznych było możliwe dzięki założeniu, że komórki mają zawsze jednakową średnicę (kilka μm), otoczone są hydrofobową spolaryzowaną błoną komórkową o praktycznie niezmiennym ładunku powierzchniowym^{143 144}. Teoria ta może wyjaśniać silne i słabe oddziaływania prowadzące do utworzenia trwałego łącza komórka – powierzchnia, może być stosowana również do oddziaływań komórka-komórka^{145 146}. Niestety nie sprawdza się, gdy rozpatruje się rzeczywiste układy biologiczne. Żadna z znanych typów komórek nie jest sferą o gładkiej jednolitej powierzchni i równomiernie rozproszonym ładunku powierzchniowym. Konsekwencją tego jest zacieranie się wyznaczonej granicy pierwszego i drugiego minimum energetycznego sugerowanego w teorii DLVO. Komórka zbliżając się do powierzchni ulega deformacji, lekkiemu rozplaszczeniu, efekt zniekształcenia wzmacniany jest naturalnym pofałdowaniem błony komórkowej. Stąd nie możliwe jest utrzymanie stałych odległości pomiędzy powierzchnią komórki a podłożem i wynikających stąd różnic w rozkładzie sił i oddziaływań¹⁴⁷. Rozkład ładunków na powierzchni błony jest daleki od jednorodności. Lokalne, efekty elektrostatyczne na powierzchni błony mogą się znosić lub prowadzić do zmian konformacyjnych białek zaadsorbowanych na powierzchni, co dodatkowo utrudnia rozróżnienie granicy między pierwszym a drugim minimum¹⁴⁸.

5.6 Termodynamika powierzchni a adhezja komórek

Zjawiska zachodzące na powierzchni biomateriału tj: adsorpcji białek i adhezja komórek mogą być wspomagane charakterem podłoża. Powierzchnia kontaktu charakteryzowana przez zwilżalność, hydrofilowości / hydrofobowości oraz energię powierzchniową może przyspieszać opisane procesy lub wręcz działać na nie inhibitująco¹⁴⁹. Komórki, adherując do powierzchni, znajdują się w roztworze wodnym (medium hodowlanym). W takim układzie istnieją trzy powierzchnie międzyfazowe: komórka-medium, powierzchnia biomateriału-medium i komórka-powierzchnia biomateriału (Rys 17)¹⁵⁰. Jest to stan zbliżony do zależności między trzema powierzchniami rozdziału: kroplą cieczy, powierzchnią i powietrzem opisany przez równanie Younga-Dupre (1.3):

$$\sigma_{s/g} = \sigma_{c/s} + \sigma_{c/g} \cos \varphi \quad (1.3)$$

gdzie: $\sigma_{s/g}$ – energia powierzchniowa ciała stałego,

$\sigma_{c/s}$ – energia powierzchniowa na granicy ciało stałe i ciecz,

$\sigma_{c/g}$ – energia powierzchniowa cieczy,

φ – kąt zwilżania



Rysunek 17. Adhezja komórki (K) do powierzchni materiału (P) w medium hodowlanym (W) uwzględniająca granice rozdziału faz – **a**. Graficzne przedstawienie równania Younga-Dupre – **b**

Niestety to proste przełożenie teorii granic między fazowych (ciecz, ciało stałe, gaz) nie sprawdza się w przypadku środowiska biologicznego. Tu współlistnieją ze sobą medium (ciecz 1) powierzchnia (ciało stałe) i komórka (ze względu na obecność w strukturze 85% wody, traktowana jako ciecz 2) ¹⁵¹. Stąd praca adhezji (W_{12}) przypadająca na jednostkę powierzchni (energia powierzchniowa) jest oddziaływaniem między medium (α_1) a komórką (α_2). Zależność opisuje równanie (1.4)

$$W_{12} = \alpha_1 \cdot \alpha_2 \quad (1.4)$$

Uwzględniając obecność innych komórek w medium hodowlanym przytoczone równanie (1.4) należy rozszerzyć o człon opisujący oddziaływanie komórka – komórka (α_3). Praca adhezji uwzględniająca siły odpychania ma teraz postać równania ¹⁵² (1.5)

$$W_{12} = -(\alpha_1 - \alpha_3) \cdot (\alpha_2 - \alpha_3) \quad (1.5)$$

Rozpatrywanie układu powierzchni rozdziału w układzie innym niż trójfazowy ($\gamma_{s/g}$, $\gamma_{c/s}$, $\gamma_{c/g}$) jest dużo trudniejsze. Dodatkowym elementem utrudniającym właściwą ocenę energii swobodnej układu (pracy adhezji) są relacje pomiędzy komórkami, komórkami i medium hodowlanym, komórkami a powierzchnią, a w końcu sprzężone oddziaływania komórka-komórka-medium-powierzchnia ¹⁵². Kolejną trudnością jest struktura samej komórki z jej dynamicznie zmieniającą się błoną komórkową, która reaguje na powierzchnię materiału lokalnymi zmianami ¹⁴⁹ ¹⁵². Sama powierzchnia biomateriału również nie jest idealnym układem homogenicznym, co nie pozostaje bez wpływu na wytwarzanie miejscowych oddziaływań (polarnych, apolarnych, elektrostatycznych).

5.7 Wpływ parametrów termodynamicznych na adhezję komórek

Jako że kultury komórkowe stanowią trudny model laboratoryjny i interpretacyjny do potwierdzenia wpływu parametrów powierzchni takich jak hydrofobowość / hydrofilowość czy energia swobodna do wyjaśnienia niektórych mechanizmów (np. adhezji) modele bakteryjne ¹⁵³. Układ bakteria – powierzchnia jest modelem łatwiejszym w interpretacji ze względu na strukturę mikroorganizmu (sztywna, zdefiniowana powierzchnia ściany komórkowej). Różnice w rodzaju adhezji tej grupy organizmów wskazują, że istotnym parametrem powierzchni jest jej zwilżalność ¹³⁰. Adhezja bakterii termofilnych do

hydrofobowej powierzchni jest większa niż do powierzchni hydrofilowych. Przeciwnie zachowanie (wysoka adhezja do powierzchni hydrofilowej) wykazują bakterie halofilne. W przypadku wysokiego powinowactwa powierzchni materiału do bakterii, obserwuje się również przyspieszoną adsorpcję białek i szybkie wytwarzanie biofilmu ¹⁵⁴. Drugim parametrem wspomagającym proces adhezji jest swobodna energia powierzchniowa, która silniej wpływa na siłę wiązań drobnoustrojów z powierzchnią niż sama zwilżalność powierzchni ¹⁵⁵.

6. Oddziaływanie komórka – materiał. Metody badania biogodności materiałów

6.1 Wprowadzenie

Biozgodność jest podstawowym wymogiem dotyczącym materiałów przeznaczonych do leczenia tkanek. Pojęcie to, pomimo iż kluczowe w inżynierii biomateriałów, nie doczekało się do tej pory jednoznacznej definicji. Wyjaśnienie terminu biomateriały nie precyzują wszystkich cech i wymagań stawianych tej grupie materiałów. Jego interpretacja ogranicza się jedynie do określenia zadań, jakie biomateriał ten ma spełniać. Mówi się, że jest to materiał przeznaczony do współistnienia z biologicznymi systemami, stosowany do leczenia, diagnozowania, poprawiania lub zastępowania funkcji chorych tkanek czy narządów, lub też spełniania ich funkcji w organizmie ¹⁵⁵. Inne ze znanych definicji wskazują na dodatkowe ograniczenia biomateriału, np. określając go jako każdą substancję inną niż lek, która może być użyta w dowolnym czasie a której zadaniem jest uzupełnianie lub zastępowanie tkanek, narządów lub jego części ¹⁵⁶. Biomateriałami określa się również naturalne lub sztuczne materiały stosowane do wspomagania lub zastępowania funkcji żywych tkanek ⁶⁴.

Biozgodność od początku traktowana była jako dopełnienie definicji biomateriału. Termin ten miał uściślać zestaw cech materiałowych wymaganych ze względu na zadania, jakie stawia się materiałom o przeznaczeniu medycznym. Za biozgodny uważa się taki materiał, który wywołuje odpowiedź komórkową zgodną z przeznaczeniem (zastosowaniem w określonym celu: np. podporowym, wypełniającym, uzupełniającym, stymulującym wzrost, przebudowę uszkodzonej tkanki) ¹⁵⁶. Z drugiej strony za biozgodny uważa się materiał, który spełnia pewne niezbędne kryteria. Po pierwsze biomateriał musi być nietoksyczny (cytotoksyczny), nie może wywoływać alergii, powodować chronicznych stanów zapalnych, nie może być kancerogenny a tym bardziej genotoksyczny. Od biozgodnego materiału wymaga się określonej trwałości w środowisku biologicznym (uzależnionego od postawionego zadania), obojętności fizycznej i chemicznej w stosunku do tkanek otaczających implant, a także braku interakcji ze strony innych układów szczególnie immunologicznego czy krwionośnego. Pojęcie biogodności w literaturze coraz częściej łączy się z biobezpieczeństwem ^{157 158 159}. Jest to takie zachowanie materiału, które nie implikuje reakcji ubocznych, nie jest zagrożeniem dla jakichkolwiek struktur w organizmie a wręcz przeciwnie, może stymulować sąsiednie tkanki do przyspieszonej regeneracji.

Kolejnym podejściem do problemu biogodności i jej zdefiniowania było rozpatrywanie tego pojęcia, jako zespołu cech materiałowych, koniecznych ze względu na zastosowanie medyczne i oczekiwaną odpowiedź ze strony organizmu ^{160 161}. Zestaw parametrów wpływających na biogodność materiału to w głównej mierze budowa chemiczna

i jej dopasowanie do miejsca implantacji (skład, struktura), ale także: wytrzymałość, sprężystość, odporność na kruche pękanie, właściwości elektryczne i magnetyczne ¹⁸.

Ostatnie badania, nad biogodnością materiałów implantacyjnych rozszerzają pojęcie o zbiór cech fizykochemicznych charakteryzujących powierzchnię biomateriału ¹⁶². Należą do nich: gładkość/szorstkość powierzchni (tzw. chropowatość), ładunek powierzchniowy, ilość i jakość grup chemicznych, mikrostrukturę powierzchni, energie powierzchniową, topografię (Rys 18).

Ich znajomość daje możliwość prognozowania reakcji komórek i odpowiedzi tkanek na syntetyczny materiał. Aktualnie obserwuje się dynamiczny rozwój technik badawczych, które

w prosty i szybki sposób dostarczają informacji o rodzaju parametrów powierzchniowych decydujących o odpowiedzi komórkowej. Obok badań powierzchni (prezentowanych w *Rozdziale 4*), drugą grupą metod przeznaczonych do analizy biogodności powierzchni implantów są techniki stosowane do analizy zachowań żywych komórek w środowisku *in vitro*. Jest to grupa metod biologicznych, biochemicznych, immunochemicznych pozwalająca na szybką ocenę zachowania komórek w kontakcie z powierzchnią materiału ¹⁶³.

Metody te obejmują badanie adhezji, proliferacji i różnicowania się komórek, przy pomocy odpowiednich technik laboratoryjnych takich jak: barwienia, oznaczanie biochemiczne i immunochemiczne białek, kwasów nukleinowych czy enzymów. Wizualizacja wyników eksperymentu odbywa się przy zastosowaniu technik mikroskopowych (mikroskopy: optyczne, kontrastowo-fazowe, skaningowe, fluorescencyjne czy konfokalne).

Wyniki badań *in vitro* dotyczących reakcji komórka – powierzchnia materiału są pierwszym etapem badań biogodności. Informacji, jakich dostarcza, reakcja komórek na syntetyczne powierzchnie, stanowi podstawę do modelowania i projektowania biogodnych tworzyw implantacyjnych



Rysunek 18. Parametry decydujące o biogodności powierzchniowej biomateriału

6.2 Hodowle komórkowe w inżynierii biomateriałów

Materiały, które przeznaczone są dla zastosowań medycznych w pierwszej kolejności poddaje się badaniom chemicznym i fizykochemicznym. Jeśli dany biomateriał spełnia wymagania materiałowe związane z miejscem i funkcją, jaką ma spełnić w organizmie (mechaniczne, chemiczne), kolejnym krokiem określającym jego przydatność jest ocena biologiczna. Etapy badań biologicznych podane są w normie ISO 10993, 'Metody badań

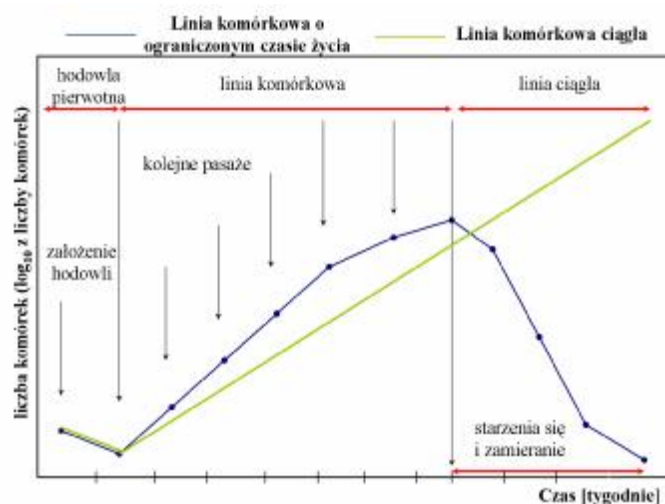
materiałów medycznych’ a także przez europejską Farmakopeę ¹⁶⁴. Dobór badań zależy od przeznaczenia biomateriału (miejsca i funkcji) oraz czasu leczenia/kontaktu z uszkodzoną tkanką. Badania działania cytotoksycznego i inne badania biologiczne (adhezja, proliferacja, różnicowanie się) prowadzi się na określonych liniach komórkowych zatwierdzonych, zarejestrowanych i przechowywanych w Europejskiej Kolekcji Hodowli Komórek (ECACC) lub w Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórek (ATCC) ¹⁶² ¹⁶⁵. Zastosowanie linii komórkowych pochodzących z tych dwóch źródeł związane jest z koniecznością standaryzacji metod badawczych, warunków hodowlanych, i możliwością wykonywania badań porównawczych. Wszystkie linie komórkowe przechodzą, co jakiś czas procedury identyfikacyjne (kontrolę przy pomocy izoenzymów, identyfikacja DNA) i kontrolę jakościową (na obecność mykoplazmy, bakterii, drożdży) ¹⁶³. Linie komórkowe muszą spełniać ściśle określone wymagania tak by zapewniać powtarzalność wyników. Pozytywny wynik badań *in vitro* nie jest testem ostatecznym i nie gwarantuje wprowadzenia materiału do zastosowań klinicznych.

Istnieją, bowiem wyraźne różnice w zachowaniu się komórek w hodowli (*in vitro*), w porównaniu z zachowaniem się tych samych komórek w tkance, w organizmie (*in vivo*). Kultury komórkowe są skutkiem wyizolowania ich z przestrzennego układu tkanki, i postacią, jaką najczęściej obserwuje się na powierzchni materiału to jedna warstwa komórek (ang. *monolayer*). Niezależnie od tego hodowle tkanek komórek naturalnych i genetycznie zmienionych (np. komórki rakowe) są układami modelowymi, które w sposób prosty i szybki dają możliwość bezpośredniego badania interakcji komórka – materiał, weryfikacji powierzchni pod względem przydatności w medycynie i diagnostyce. Pozytywny wynik metod *in vitro* jest pierwszym etapem, koniecznym do prowadzenia dalszych badań, szczególnie tych wymagających użycia zwierząt doświadczalnych i zgody Komisji Etycznej.

6.2.1 Linie komórkowe

Linie komórkowe stosowane w badaniach biomateriałów można podzielić na dwa podstawowe grupy: linie komórkowe ciągłe i linie komórkowe pierwotne ¹⁶⁵. Te drugie ze względu na trudność izolacji i trudności wynikające z uzyskania stałych warunków hodowli bywają stosowane dużo rzadziej. Uzyskanie linii komórkowej pierwotnej (ang. *finite cell lines*) a więc linii pochodzącej z normalnej diploidalnej (2n, o podwójnej liczbie chromosomów) tkanki mogą być hodowane tylko przez określony czas. Zdrową komórkę charakteryzuje ograniczony (zaprogramowany) czas życia, po którym ulega ona samobójczej śmierci, apoptozie (Rys 19). Określony czas życia (ang. *life-span*), gwarantuje tylko niewielką liczbę pasażów, uzależnioną od wieku osobnika, z którego pobrano eksplant. Jeśli linia komórkowa została wyprowadzona z komórek zarodków może przeżyć nawet do 60 pasażów jednak nie jest to regułą ¹⁶⁵ ¹⁶⁶. Po tym czasie, komórek nie da się już dłużej pasażować i linia komórkowa zamiera. Ograniczony czas życia hodowli nakłada na nią większą wrażliwość na warunki środowiskowe (skład medium hodowlanego, obecność substancji szkodliwych, właściwości

powierzchniowe). Drugą zmienną, jaką wprowadza się używając w testowaniu powierzchni syntetycznych osteoblastopodobnych linii pierwotnych, jest ich stan dojrzałości metabolicznej (czynnościowej). Młodsze komórki (2-8 pasaż) nastawione są na szybkie osiągnięcie dojrzałości i szybką proliferację, wolniej reagują na fizykochemię powierzchni materiału ¹⁶⁷. Najbardziej wiarygodnym wskaźnikiem w ocenie właściwości biologicznych, sztucznych powierzchni implantacyjnych, są komórki o ustabilizowanym metabolizmie (ok. 15-20 pasażu). Za pomocą białek transbłonowych (integryn) rozpoznają stan powierzchni i reagują na niego odpowiednim zachowaniem (rozpłaszczenie, proliferacja) ¹⁶⁸. Z tego względu linie komórkowe pierwotne, mimo że zależne od wielu zmiennych: własnych i środowiskowych, stanowią czuły indykator reakcji pomiędzy komórką a materiałem. Stosowane są na równi z liniami ciągłymi o usystematyzowanym genotypie (a tym samym i fenotypie) ^{167 168 169}.



Rysunek 19. Krzywa wyprowadzania i wzrostu linii komórkowych: o ograniczonym wzroście i linii ciągłych

Lepszym, bardziej perspektywicznym, (bo stabilnym genotypowo) narzędziem badawczym są linie komórkowe ciągłe (ang. *continuous cell lines*), ze względu na nieograniczony czas życia. Są to komórki nowotworowe izolowane z guzów, nazywane w literaturze jako tkankopodobne (np. osteoblastopodobne, nabłonkopodobne), wykorzystywane najczęściej w badaniach laboratoryjnych ze względu na nieskończoną zdolność do proliferacji (a więc możliwość nieskończonego pasażowania), niezakłócony metabolizm, stały genotyp (stały garnitur chromosomów), powtarzalność ^{169 170 171 172 173}. Schemat wyprowadzania linii komórkowej przedstawia Rys 20.

Komórkową linię ciągłą można uzyskać z linii pierwotnej pod warunkiem, że komórki spontanicznie lub indukowane (np. działaniem onkogenu) przejdą proces transformacji polegający na zmianie genotypu (mutacje chromosomowe) a w konsekwencji również fenotypu komórki (ogółu cech zewnętrznych) ^{165 169}. Zdolność linii komórkowej do transformacji wynika z niestabilności genetycznej. Proces zmian genomu wpływa na zatrzymanie dotychczasowego programu życiowego komórki, zahamowanie programowanej

śmierci komórki (apoptozy), czyli możliwość nieustannego namnażania się (prolifracji). Niektóre komórki są uodpornione na transformacje, nie mogą istnieć jako linia komórkowa ciągła. Należą do nich fibroblasty ludzkie (są one poliploidalne, posiadają z wielokrotny garnitur chromosomowy) ¹⁷⁴. Komórki nowotworowe (komórkopodobne) w hodowli stają się aneuploidalne (utrata jednego lub posiadanie dodatkowego chromosomu w garniturze), czyli zmutowane, tracąc zdolność do samoistnej apoptozy.



Rysunek 20. Schemat wyprowadzania linii komórkowej

Najpopularniejsze linie kostne komórkowe to MG-63 (izolowane z osteosarkomy ludzkiej), UMR, ROS (linie izolowane z osteosarkomy szczurzej), MC3T3E1, RCJ (linie izolowane z noworodków mysich), Saos2, hOBs 1.19 (izolowane z kości gąbczastej) ^{175 176}.

W zależności od typu informacji, jakie dostarczyć mają badaczowi – badania komórkowe (badania ekspresji genów, adhezji komórek, transdukcji sygnałów komórkowych) istnieje szereg modeli komórkowych *in vitro* dotyczących zachowania się komórek osteoblastopodobnych. Linie takie generowane są np. z osteosarkomy (komórek raka kości), kultur pierwotnych pochodzących z szpiku kostnego czy komórek okostnej lub też nietransformowanych linii kostnych komórek klonalnych ^{172 177 178}. Większość z istniejących kostnych linii ciągłych nie wykazuje zdolności do różnicowania się w warunkach *in vitro* (a więc typowej zmiany zachodzącej w warunkach *in vivo*: osteoblast → osteocyt → osteoklast) ^{174 175 179}.

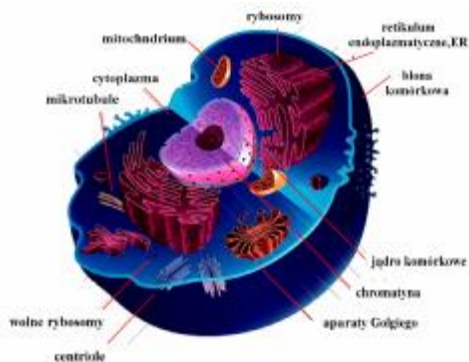
6.2.2 Linie komórkowe wykorzystywane w badania biomateriałów kostnych

W przypadku badań nad biomateriałami przeznaczonymi dla tkanki kostnej stosuje się linie komórek: osteoblastopodobnych i fibroblastopodobnych. Oba typy komórek występują

w tkance łącznej, budującej kość, a jednocześnie stanowią dobrą parę porównawczą: osteoblasty – typowa linia ciągła, fibroblasty – linia po transformacji spontanicznej, odpowiedzialna za wytwarzanie substancji macierzy międzykomórkowej (ECM)^{168 175 176 177}. Dojrzałe, aktywne fibroblasty produkują zasadnicze składniki tkanki łącznej takie jak glikozaminoglikany (GAG) i kolagen typu I. Pozytywne wyniki badań komórkowych z użyciem linii fibroblastów dostarczają informacji o zdolności powierzchni materiału do integracji z miękką tkanką łączną, łatwością neowaskularyzacji i minimalizacją negatywnych skutków implantacji takich jak: enkapsulacja biomateriału tkanką włóknistą^{180 181}. Doświadczenia *in vitro* z udziałem komórek tkanki kostnej dają odpowiedź o potencjalnych możliwościach osteointegracji materiału implantacyjnego z kością. Aktywne osteoblasty wykazują się łatwością syntezy elementów macierzy międzykomórkowej i umiejętnością kontroli mineralizacji ECM. Znajomość zachowania osteoblastów *in vitro* jest kluczem do zrozumienia wzrostu i regeneracji tkanki kostnej odtwarzającej się na powierzchni implantu^{181 182}.

6.3 Komórka jako wskaźnik biokompatybilności powierzchni. Metody badań struktur komórkowych w inżynierii biomateriałów

Praktycznie wszystkie z organelli komórkowych mogą stanowić źródło informacji o jej stanie a umiejętna interpretacja odpowiedzi komórkowej pozwala na diagnozę zachowania implantu w środowisku żywego organizmu (Rys 21). Dlatego komórkę często traktuje się jako specyficzną sondę biologiczną, używaną do interpretacji procesów adhezji, proliferacji i sekrecji komórki na powierzchni materiałów syntezy^{174 175}.



Rysunek 21. Schemat budowy wewnętrznej komórki zwierzęcej

6.3.1 Metody badań adhezji

Wszystkie organelli komórkowe zanurzone są w środowisku wewnętrznym, które tworzy złożony koloid wodny – cytoplazma. W niej rozmieszczone są także składniki cytoszkieletu: mikrotubule, mikrofilamenty i filamenty pośrednie. Cytoszkielet wraz z białkami mu towarzyszącymi tworzy sieć łączącą jądro komórkowe, organella oraz błonę cytoplazmatyczną¹⁸³ ^{Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.}. Odpowiada za utrzymanie kształtu oraz ruch komórki. Wpływa na przekazywanie sygnałów oraz zmiany morfologiczne zachodzące podczas proliferacji, różnicowania się i transformacji. Każda z klas włókien wchodzących w skład cytoszkieletu różni się morfologią oraz składem chemicznym^{183 184}. Fluorescencyjne

wybarwianie włókien cytoszkieletu (aktyny, tubuliny) pozwala na analizę kształtu komórek na powierzchni biomateriału a na tej podstawie interpretację dopasowania powierzchni do danej populacji komórek ¹⁸⁵.

Wykrywanie kształtu ilości i aktywności organelli komórkowych może odbywać się na drodze immunocytochemicznej jak i biochemicznej. Immunocytochemia posługuje się znakowanym przeciwciałem, które w sposób specyficzny lokalizuje i identyfikuje składniki komórki względem, którego są skierowane. Są to na ogół metody szybkie i skuteczne. Szczególnie sprawdzają się w diagnozowaniu antygenów powierzchniowych np. białek receptorowych typu integryny, kadheryny, selektyny. Dodatkowo metody te odznaczają się wysoką selektywnością w wykrywaniu receptorów organelli wewnętrznych (na zasadzie lokalizacji pary: antygen – przeciwciało) ¹⁸⁶. Tę relację wykorzystuje się np.; w metodzie Western blottingu, której zadaniem jest związania przeciwciała z określonym białkiem w celu identyfikacji jakościowej i ilościowej np. integryny powierzchniowej rodziny Ig z antygenem ant-Ig) ¹⁶⁵.

W metoda biochemicznych w celu identyfikacji aktywności określonego organelum komórkowego stosuje się reakcje charakterystyczne dla par enzym-substrat. I tak, obecność enzymów z grupy hydrolaz lub/i ligaz, które katalizują tworzenie się wiązań wodorowych i kowalencyjnych pomiędzy receptorem błonowym a białkiem zaadsorbowanym na powierzchni materiału syntetycznego potwierdza adhezję komórki ^{165 186}.

6.3.2 Metody badań proliferacji

Informacje o sekwencji aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym zawarte są w DNA. Jądro komórkowe (centrum decyzyjne komórki) steruje wszystkimi procesami życiowymi takimi jak kierunki metabolizmu czy podziały komórkowe. Stan przygotowania komórki do podziałów, objawia się przyspieszeniem metabolizmu i zwiększeniem objętości jądra (podwojenie ilości DNA). Podwojoną ilość kwasu dezoksyrybonukleinowego (charakterystyczna dla stanu tuż przed podziałem) diagnozuje się za pomocą testów określających poziom jądrowego DNA. Jednym z popularniejszych jest metoda Br-dU. Polega ona immunofluorescencyjnym oznaczeniu odpowiednich nukleotydów (uracylu, U) obecnych w DNA, w stanie spoczynkowym i tuż przed podziałem komórki. Im krótszy czas podwojenia ilości DNA jądrowego tym większa zdolność do proliferacji komórek ¹⁸⁷.

Inną metodą diagnozy aktywności metabolicznej komórki są biochemiczne oznaczenia enzymów jądrowych np. test XTT. Metody te świadczą o szybkim tempie metabolizmu i fazie przygotowań komórki do podziału (np. organizacja chromatyny w postaci chromosomów) ^{185 188}. Sprawny przebieg wielu reakcji biochemicznych zachodzących na terenie komórki możliwy jest dzięki energii zmagazynowanej w ATP a wytwarzanej w mitochondriach. Aktywność tych organelli określana jest za pomocą metod typu MTT służącej do badania poziomu enzymów mitochondrialnych (np. okstadazy mitochondrialnej).

Wysokie stężenie enzymu stanowi podstawę do określenia stanu pobudzenia metabolicznego komórki, charakterystycznego dla komórki w trakcie podziałów mitotycznych¹⁸⁹. Test MTT jest modyfikacją chemiczną testu XTT.

Możliwość zajścia w jednym czasie reakcji biochemicznych, teoretycznie wykluczających się ze względu na odmienne warunki inicjujące zajście reakcji, zapewniona jest dzięki strukturalom retikulum endoplazmatycznego, ER. W badaniach komórkowych analiza liczebności struktur typu ER i/lub mitochondriów wykrywana jest przy pomocy specyficznych barwień biochemicznych. Wysoki udział procentowy tych organelli w komórce (w odniesieniu do stanu początkowego) informuje o dobrej adaptacji powierzchni biomateriału w środowisku *in vitro*, którego następstwem jest przyrost populacji komórek na materiale (prolifracja)¹⁹⁰.

Innym rodzajem testów biochemicznych są metody określania stanu czynnościowego komórki. Niektóre, specyficzne enzymy pojawiają się w komórce w momencie jej gotowości podziałowej. Odpowiedzialne są, bowiem za transkrypcję DNA na mRNA (mitoza, etap G₀). Ich obecność w komórkach potwierdza możliwość namnażania się hodowli¹⁸⁷.

Za pomocą testów histochemicznych określa się poziom aktywność badanego enzymu, nie zaś sam enzym (jak w testach biochemicznych). Jako że reakcje te należą do grupy selektywnych: enzym obecny w komórce oddziałuje z wprowadzonym do medium hodowlanego, związkiem chemicznym dopasowanym sterycznie i chemicznie do miejsca aktywnego enzym (kompleksowa reakcja barwna: enzym – substrat). W taki sposób określone są enzymy oksoredukujące i ATP-azy, których stężenie wzrasta w jednym z etapów podziału mitotycznego - telofazie¹⁹¹.

Szybka i prosta metoda laboratoryjna służąca do określenia stopnia proliferacji komórek na powierzchni biomateriału są metody barwne opierające się na reakcjach immunochemicznych, fluorochemicznych lub biochemicznych. Wykorzystywane są do ilościowej analizy przyrostu populacji komórek na powierzchni względem powierzchni kontrolnej (PS TC, szkło). Barwienie błękitem trypanu (TB/PBS) lub jodkiem propidyny (PI) pozwala na identyfikację komórek martwych, które zaadsorbowały barwnik. Ilość komórek martwych (wybarwionych) do całkowitej ilości komórek sprzed barwienia, daje wskaźnik przeżywalności komórek na materiale. Przyrost populacji komórek w hodowli określany jest w kilku interwałach czasowych, najczęściej 1, 3, 5 i 7 dni¹⁹².

6.3.3 Metody badań zdolności sekrecyjnych komórek

Procesy adhezji i proliferacji komórek nie kończą zainteresowania badaczy materiałem implantacyjnym w warunkach *in vitro*. Poprawne przyleganie i namnażanie się komórek nie jest gwarantem, że odbudowa i narastanie uszkodzonej tkanki będzie zachodziło zgodnie z założeniami. Stąd zainteresowanie badaniami sekrecji komórek, które pozwalają przypuszczać o szybkości regeneracji tkanki w warunkach *in vivo*. Dopasowanie komórek do

powierzchni syntetycznej objawia się zdolnością do wydzielania białek lub enzymów aktywujących procesy stymulujące procesy odbudowy.

W przypadku komórek kostnych oznacza się poziom białek kostnych z grupy związanej z syntezą lub wiązaniem HAp. W literaturze fachowej noszą one nazwę markerów obrotu kostnego. Należą do nich fosfataza alkaiczna (ALP), osteopontyna (OP) i osteokalcyna (OC). Poziom białek wskaźnikowych (ALP, OP, OC) informuje o możliwości szybkiej mineralizacji tkanki kostnej (synteza kryształów HAp) ¹⁶⁰ ¹⁶² ¹⁶³.

7. Zjawisko adhezji osteoblastów do powierzchni biomateriału

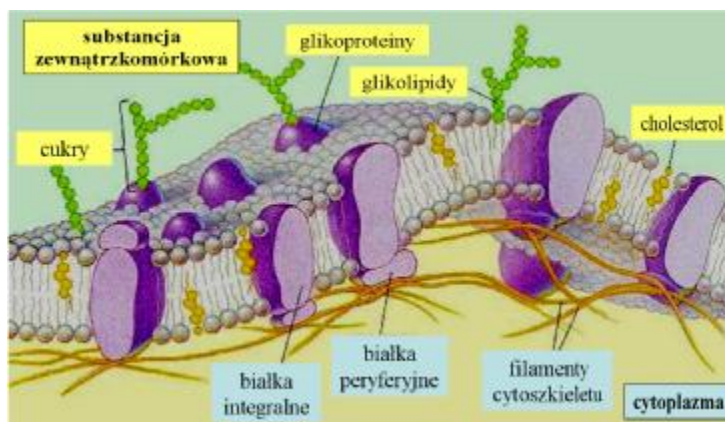
7.1 Wprowadzenie

Mechanizm adhezji komórki do powierzchni materiału syntetycznego nadal jest zjawiskiem nie do końca poznanym. Wiadomo, że rozpoznanie białek na powierzchni implantu przez receptory błonowe komórki uruchamia szlak przekaźników białkowych aktywujących zespół receptorów wewnątrzkomórkowych pobudzających cytoszkieletu do właściwej odpowiedzi ze strony komórki (rozpłaszczenia, obkurczenia się komórki na powierzchni materiału) ^{166 167 174}. W rozdziale tym przedstawiono budowę błony komórkowej ze szczególnym uwzględnieniem receptorów (integryny, selektyny, kadheryny), jako tych elementów, które rozpoczynają mechanizm aktywacji białek wewnątrz komórkowych i odpowiadają za rodzaj odpowiedzi komórkowej.

7.2 Błona komórkowa i jej rola w adhezji komórki na powierzchni badanej

Błona komórkowa (plazmolemma) jest niezbędnym składnikiem każdej żywej komórki. Funkcja i właściwości zapewnia błonie specjalna struktura ¹⁶⁰. Dwa podstawowe składniki strukturalne błony to: półpłynny żrąb białkowy (składający się z dwóch warstw lipidów: polarnej ‘głowy’ i hydrofobowego ‘ogona’) i mozaikowato rozmieszczone białka, z których większość posiada zdolność do dynamicznych przemieszczeń w obrębie błony. Dlatego plazmalema nazywana jest dynamiczną mozaiką (Rys 22) ¹⁹³. Pod względem fizycznym jest to układ charakteryzujący się wysoką przepuszczalnością dla wody, jonów a także związków niejonowych, które przechodzą przez nią tym łatwiej im bardziej rozpuszczalne są w tłuszczach (powinowactwo do budowy żrąb białko-lipidowego). Makromolekuły i związki wielkocząsteczkowe takie jak białka czy kwasy nukleinowe są praktycznie nie przepuszczalne ^{183 193}.

W błonie komórkowej znajdują się specjalne receptory pozwalające na rozróżnienie białek i komórek własnych, od białek i komórek obcych, zdolność ta ma kapitalne znaczenie w reakcjach układu immunologicznego i w wytwarzaniu się warstwy konfluentnej komórek na powierzchni biomateriału.



Rysunek 22. Schemat błony komórkowej - model płynnej mozaiki

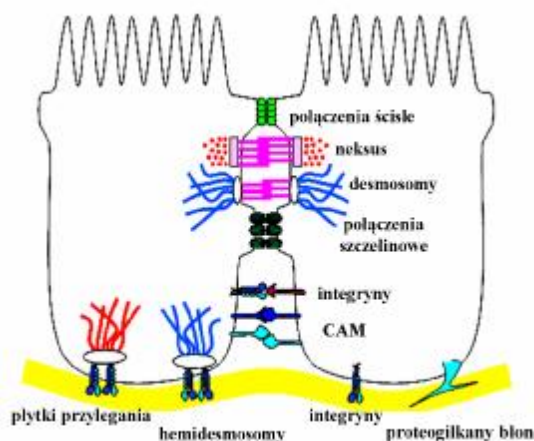
Plazmolema separuje wnętrze komórki od środowiska, ale jednocześnie odpowiada za łączenie sąsiednich komórek i wzajemne przekazywanie sobie informacji o środowisku za pomocą dwustronnej wymiany: jonów, cząsteczek i substancji aktywnych. Pierwotna wrażliwość błony komórkowej uzależniona jest od rozmieszczenia ładunków po obu stronach błony i wpływa na jej opór elektryczny pozostawiając błonę w stanie nieustannego spolaryzowania¹⁹³⁹³.

Czułość błon komórkowych zwiększona jest przez receptory – białka transbłonowe, umieszczone w błonie, które zdolne są do odbierania sygnałów. Odpowiedzią na bodźce zewnątrzkomórkowe mogą być reakcje ruchowe cytoszkieletu, (wzrost aktywności mikrofilamentów, filamentów pośrednich i mikrotubuli, odpowiedzialnych za skurcz lub rozszerzenia się komórki)¹⁹⁴.

Zachowanie pojedynczej komórki jest szybko odbierane przez inne organizmy z populacji komórek. Dobra komunikacja międzykomórkowa zapewniona jest dzięki złożonemu układowi połączeń i zależności biochemicznych i elektrochemicznych na granicach przylegania (Rys 23).

Systemy komunikacyjne budują: połączenia szczelne (stanowiące nieprzepuszczalną barierę dla związków niskocząsteczkowych), połączenia adhezyjne i desmosomy (służące do powiązania aktyny i filamentów pośrednich –

składników cytoszkieletu), połączenia szczelinowe (zapewniające wymianę jonów między komórkami, utrzymanie polaryzacji błony na odpowiednim poziomie), receptory immunopodobne (tzw. CAMs), selektyny, kadheryny, białka rodziny Ig. Najważniejszą ze względów czynnościowych i funkcjonalnych grupą połączeń są integryny, które mogą łączyć

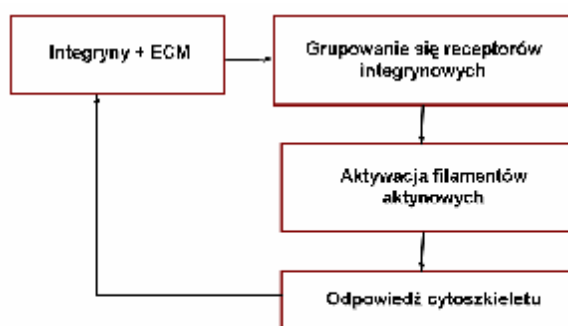


Rysunek 23. Typy złączy komórkowych: komórka-komórka, komórka-ECM

blonę komórkową samodzielnie lub wchodzić w interakcje z innymi strukturami tworząc tzw. skupiska adhezyjne (ang. *focal adhesion*) łączące aktywne, lub hemidesmosomy – wiążące filamenty pośrednie¹⁹⁵.

7.3 Mechanizmy adhezji komórek do powierzchni materiału

W normalnych komórkach prawidłowy proces adhezji jest podstawą takich procesów jak ruch komórki, komunikacja międzykomórkowa. Białka adhezyjne zaangażowane są w regulację procesów komórkowych takich jak: rozpoznawanie odpowiednich receptorów, procesy odpowiedzi immunologicznej organizmu (np. podczas zapalenia) czy procesy apoptozy. Typowy proces adhezji jest procesem dynamicznym, który można podzielić na dwie fazy: fazę zakotwiczenia komórki i fazę adhezji właściwej. Pierwsza z nich jest zdarzeniem szybki następującym już w momencie wiązania się błony z materiałem z zaadsorbowanymi wcześniej na powierzchni białkami. Fazy tej sprzyjają oddziaływania drugorzędowe: siły van der Waalsa jak i

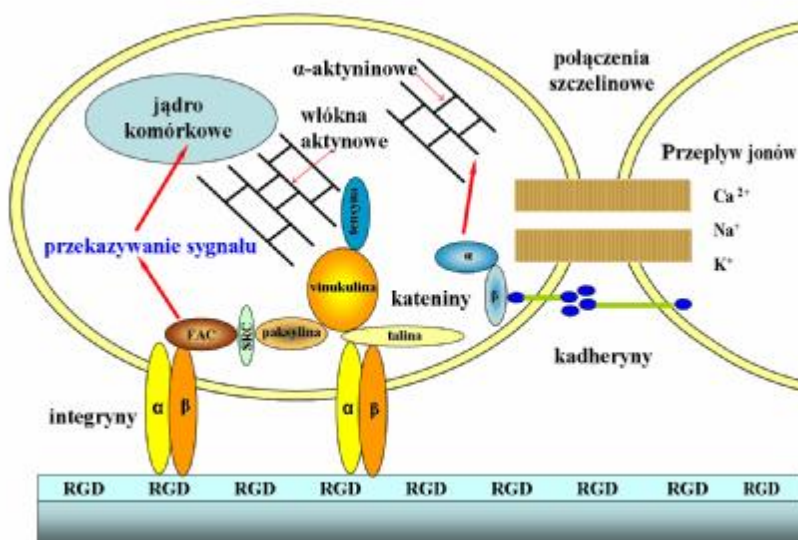


Rysunek 24. Sprzężenie zwrotne na szlaku sygnałów: komórka – materiał – komórka

skłonności do tworzenia wiązań wodorowych¹⁹⁴. Adhezja właściwa jest etapem dłuższym wymagającym od komórki zaangażowania się białek transbłonowych błony komórkowej, białek substancji międzykomórkowej (ECM) a w końcu białek cytoszkieletu^{166 194}. Do efektywnej adhezji dochodzi w momencie, gdy uruchomiony zostanie szlak przekazywania sygnałów białkowych pomiędzy zewnątrz komórki (ECM + białka transbłonowe: integriny) a wewnętrznym zespołem filamentów aktynowych (elementy cytoszkieletu) odpowiedzialnych za kształt komórki. Zgromadzenie się filamentów aktynowych i ich reakcja na sygnał zewnętrzny zostaje ponownie dostarczona do receptorów integrynowych, które odblokowują mechanizm zwrotny (Rys 24)¹⁶⁶.

Dokładny mechanizm oddziaływania białek wewnątrzcząsteczkowych nie jest znany. Przypuszcza się, że działa on według pewnego modelu sygnalizacyjnego zwanego kaskadą sygnałową^{166 195 196}. Uruchomienie mechanizmu komunikacyjnego następuje, gdy receptory integrynowe odkryje charakterystyczny motyw białkowy obecny w ECM (np. RGD), dochodzi w tym miejscu do grupowania integriny i wytworzenia płytki przylegania (ang. *focal adhesion contact*)^{166 1725}. Miejsca te są zdolne do kompleksowego aktywowania połączeń białkowych z cytoszkieletem wewnątrzkomórkowym (filamenty aktynowe). Wiadomo, że transbłonowe integriny połączone są z cząsteczkami macierzy

zewnątrzkomórkowej (ECM), a część strukturalna integryny zanurzona w cytoplazmie komórki związana jest z serią białek cytoszkieletu takich jak: winikulina, talina, α -aktyna, paksylina i tensyna (Rys 25). Białka te odpowiadają za wzajemne połączenie integryny (reagującej na środowisko zewnętrzne jak i powierzchnię) z F-aktyną (filamentami aktynowymi). Skupisko białek wewnątrzkomórkowych (aktywowanych w kolejności: integryna \rightarrow winikulina \rightarrow α -aktyna \rightarrow F-aktyna lub integryna \rightarrow talina \rightarrow paksylina \rightarrow tensyna \rightarrow α -aktyna \rightarrow F-aktyna) tworzy zwarty kompleks zwany płytką przylegania ¹⁹⁴ ¹⁹⁶ Błąd! Nie zdefiniowano zakładek.



Rysunek 25. Transdukcja sygnału na drodze: ECM-integryna-płytką przylegania

Cel i zakres pracy

W ostatnich dziesięciu latach, obserwuje się znaczny wzrost zainteresowania materiałami kompozytowymi, dla potrzeb medycyny. Zwłaszcza włóknisto/polimerowe kompozyty w coraz w większym stopniu wprowadzane są do zastosowań medycznych, zastępując implanty metaliczne stosowane w osteosyntezie.

Badania tworzyw kompozytowych, skierowane są przede wszystkim na właściwości mechaniczne oraz ich trwałość w środowisku biologicznym. W pracy postanowiono wyjść poza powszechnie przyjęte ramy i udowodnić, że łączenie ze sobą w tworzywo kompozytowe dwu lub więcej faz może być skuteczną drogą do otrzymywania biozgodnych materiałów. Badania zaprojektowano w ten sposób, aby wykazać, że włókniste tworzywa kompozytowe to nie tylko materiały o projektowalnych właściwości mechanicznych, ale tworzywa, które można w szerokim zakresie przygotowywać do wywoływania z góry zaplanowanej reakcji środowiska biologicznego.

Jak wiadomo o biozgodności materiałów implantacyjnych z tkanką kostną decyduje cały szereg chemicznych i fizycznych parametrów tworzywa. Dwa, spośród nich zdają się mieć podstawowe znaczenie a mianowicie; właściwości mechaniczne materiału oraz właściwości jego powierzchni. Dlatego w projektowaniu biozgodnych materiałów szczególną uwagę poświęca się analizie wytrzymałości oraz badaniom powierzchni implantów.

Zjawiska zachodzące na styku materii żywej oraz syntetycznego materiału stały się obecnie punktem wyjścia do wytwarzania biozgodnych materiałów. W literaturze znanych jest wiele metod nadających powierzchniom polimerów właściwości bioaktywne, które zapewniają optymalną, z punktu widzenia zastosowania, reakcje żywego środowiska. Szereg polimerów szczególnie biostabilnych, trwałych w środowisku biologicznym posiadających hydrofobowe powierzchnie poddaje się fizycznej lub fizykochemicznej modyfikacji powierzchni, aby otrzymać materiały wywołujące określone reakcje komórek. W tym celu polimery poddaje się obróbce radiacyjnej, promieniowaniem UV, poddaje się działaniu utleniającej plazmy a następnie prowadzi się implantacje jonów lub grup funkcyjnych, białek macierzy międzykomórkowej, nadając powierzchniom pożądane właściwości biologiczne.

W inżynierii biomateriałów opisywanych jest wiele metod funkcjonalizacji biologicznej materiałów syntetycznych, jednakże tylko nieliczne można przenieść na zastosowania praktyczne w dziedzinie implantologii, większość z nich znajduje zastosowanie w badaniach podstawowych lub jest przydatna w zakresie inżynierii genetycznej.

Teza pracy została sformułowana następująco; ***włóknista faza stanowiąca istotny element tworzywa kompozytowego stanowić może cenne narzędzie modyfikacji biologicznych parametrów powierzchni kompozytów.***

Przedmiotem badań był hydrofobowy terpolimer, zawierający politetrafluoroetylen, poliwiniliden (polimer o właściwościach piezoelektrycznych) oraz w niewielkich ilościach

polipropylen. Do polimeru wprowadzano fazę włóknistą w różny sposób rozprowadzając ją w objętości materiału. Zastosowano dwa rodzaje włókien: a mianowicie włókna węglowe i włókna wytworzone z alginianu sodu. Do przygotowywania próbek wykorzystywano zarówno włókna ciągłe, jak i krótkie, jak również cząstki i włókna o parametrach w zakresie ułamków mikrometra. W ten sposób z trzech materiałów wyjściowych (terpolimer, włókna węglowe i alginianowe) otrzymywano cały szereg tworzyw, różniących się mikrostrukturą powierzchni (topografia) i wielkością powierzchniowej, energii swobodnej.

W drugiej części pracy przeprowadzono badania odpowiedzi komórkowej na modyfikowane włóknami powierzchnie materiałów kompozytowych.

Trzecia część pracy powstała w oparciu o wyniki dwóch pierwszych i dotyczy otrzymywania wielofunkcyjnych membran dla sterowanej regeneracji tkanki kostnej.

Prace rozpoczęto od szczegółowej charakterystyki trzech podstawowych faz wykorzystywanych do wywarzania próbek. Przeprowadzono badania normowe zarówno polimeru jak i wytworzonych niego próbek, polegające na ocenie cytotoksyczności oraz trwałości materiałów w sztucznym środowisku biologicznym. W ten sposób zebrano podstawowe informacje o tworzywach kompozytowych niezbędne z punktu widzenia zastosowań medycznych. Wyniki zebrane w tej części pracy stanowiły punkt wyjścia do konstrukcji próbek wykorzystywanych w badaniach komórkowych *in vitro*.

Zaprojektowano i wytworzono materiały charakteryzujące się tą samą energią powierzchniową, różnią się natomiast topografią powierzchni. Drugą grupę stanowiły materiały przygotowane na bazie tych samych materiałów, które różniły się wielkością swobodnej energii powierzchniowej, natomiast posiadały podobny zakres chropowatości (podobną topografię powierzchni).

Przedmiotem badań były kompozyty o zbrojeniu 2D, mogące służyć do wytwarzania implantów przenoszących naprężenia. Badaniom poddano próbki kompozytowe (laminaty zbrojone włóknem węglowym), w których na różny sposób rozprowadzono włókna węglowe, zmieniając kąt, pod jakim krzyżowały się włókna w tkaninie węglowej oraz wytwarzając płytki, w których włókna były oddalone od powierzchni materiału na różne odległości.

Następna grupa były kompozytowe tworzywa hybrydowe. Badaniom poddano płytki kompozytowe, w których rozmieszczenie włókien było przypadkowe (3D, włókna krótkie) w tych materiałach, dodatkowo zmodyfikowano osnowę polimerową, niewielkimi ilościami włókien zdyspergowanymi do rozmiarów poniżej 1 mikrometra (setki nanometrów). W tym wypadku chodziło o skonstruowanie tworzyw kompozytowych przy udziale włókien (cząstek) o zróżnicowanych parametrach i geometrii. Zróżnicowanie wielkości i kształtu fazy modyfikującej polimer podyktowane było również faktem, że jak wiadomo z literatury komórki kostne w specyficzny sposób reagują na materiały o parametrach zbliżonych do rozmiarów faz budujących tkankę kostną.

Próbki kontaktowano z ludzką linią osteoblastyczną MG-63 i hFob 1.19 oraz fibroblastyczną linią HS-5. Przedmiotem badań były dwa podstawowe parametry a mianowicie proliferacja komórek oraz adhezja do powierzchni syntetycznego tworzywa.

Adhezja komórek do powierzchni biomateriału posiada kluczowe znaczenie, zwłaszcza w obszarze implantów kostnych. Wysoka adhezja komórek jest niezbędna w przypadku implantów kostnych, które powinny łączyć się z tkanką kostną w sposób pozwalający na jej szybkie wyleczenie.

Ostatnia część pracy, jak wcześniej wspomniano, dotyczy materiałów membranowych, do których wytwarzania wykorzystano dwa rodzaje włókien równocześnie tzn. do osnowy polimerowej wprowadzano włókna alginowe, które były zarówno porogiem jak i materiałem modyfikującym chemiczną budowę powierzchni, oraz włókna węglowe. Membrany (2D,3D) należą do grupy materiałów mających coraz większe znaczenie w leczeniu tkanki kostnej. Materiały membranowe (2D) znajdują zastosowanie do leczenia ubytków tkanki kostnej (GBR) w stomatologii i chirurgii kostnej natomiast membrany 3D stosowane są jako trójwymiarowe rusztowania (ang. *scaffold*) w inżynierii tkankowej. Z tym samym typem komórek kontaktowane były membrany wytworzone z polimeru i włókien alginowych. Wykonano dwa typy membran a mianowicie porowate płytki, które powstały w wyniku wypłukania rozpuszczalnego w wodzie alginianu sodu oraz membrany *in vivo* czyli takie, które zawierają nie wypłukany porogen alginowy. Te ostatnie stanowią typowy przykład implantu wielofunkcyjnego, ponieważ porogen ulega degradacji dopiero w warunkach środowiska biologicznego i może stanowić nośnik leku lub aktywnych biologicznie substancji, które wprowadzone do włókna alginowego zostają uwalniane do tkanek wspomagając ich leczenie.

Tak skonstruowana praca ma na celu z jednej strony przedstawienie oryginalnego podejścia do projektowania biozgodnych implantów i wykazania potencjalnych możliwości, jakie tkwią w obszarze wytwarzania implantów w oparciu o modyfikacje polimeru faza włóknistą, zaś z drugiej strony dostarczenia szeregu nowych faktów związanych z reakcją komórek osteoblastycznych, na powierzchnie tworzyw syntetycznych.

Metody badań

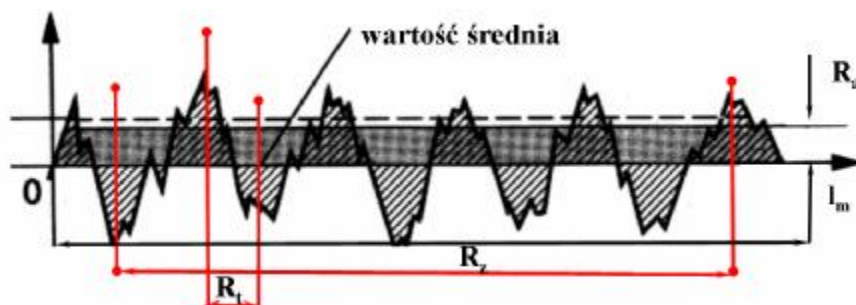
1 Badania właściwości powierzchni

1.1 Profilometria

Chropowatość powierzchni wykonanych tworzyw kompozytowych, zbadano przy użyciu profilometru T-500 firmy Hommelwerke (Niemcy). Pomiar ten polega na rejestracji nierówności powierzchni przez kontakt jej z igłą aparatu. Wynikiem badania jest profilogram, który opisują trzy podstawowe parametry chropowatości charakteryzujące powierzchnię (Rys 26): R_a – średnie arytmetyczne odchylenie profilu. Wartość ta określa chropowatości na odcinku pomiarowym l_m w odniesieniu do linii środkowej.

R_t – wysokość maksymalna pomiędzy najwyższym szczytem a najniższą doliną. Parametr ten przedstawia pionową odległość (zwaną głębokością profilu) pomiędzy maksimum a minimum nierówności powierzchni na odcinku pomiarowym l_m .

R_z – wysokość profilu chropowatości według dziesięciu ekstremów (zwaną szerokością profilu). Wielkość ta określa tzw. główny poziom bezwzględnej wartości pięciu najwyższych szczytów i najniższych dolin na odcinku pomiarowym l_m .

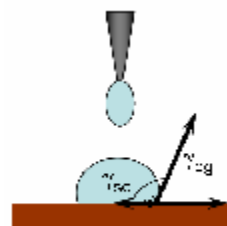


Rysunek 26. Obraz graficzny parametrów chropowatości: R_a , R_t , R_z , l_m

Badaniom chropowatości zostały poddane wszystkie próbki kompozytowe: (polimer/tkanina węglowa, polimer/krótkie włókna węglowe, polimer/włókna alginianowe), membrany kompozytowe i folia polimerowa. Materiały w kształcie pasków o wymiarach 1x2 cm umieszczano na stoliku profilometru i powtarzano pomiar 3-5 krotnie. Z otrzymanych wartości obliczone zostały wartości średnie i odchylenia standardowe wartości średniej.

1.2 Zwilżalność powierzchni

Hydrofobowość/hydrofilowość powierzchni wykonanych materiałów określono przeprowadzając badanie zwilżalności powierzchni metodą pomiarów bezpośrednich. Wielkość kąta zwilżania określa się przez pomiar kąta (θ) utworzonego między powierzchnią ciała stałego pod kroplą, a linią styczną do powierzchni



Rysunek 27. Interpretacja graficzna parametru θ , charakteryzującego zwilżalność powierzchni

kropki w punkcie jej kontaktu z powierzchnią (Rys 27). Zastosowaną cieczą pomiarową była woda o ultra wysokiej czystości (UHQ, PURE Lab, Vivendi Water). Pomiaru dokonano na aparacie DSA 10 Kruss w temperaturze pokojowej. Kąt zwilżania wyznaczono dla wszystkich rodzajów badanych materiałów kompozytowych, membran kompozytowych i czystego polimeru PTFE/PVDF/PP. Wyniki pomiarów kąta zwilżania stanowią średnią z 12 pomiarów i uwzględniają przedział ufności dla poziomu istotności $\alpha=0,05$.

1.3 Energia powierzchniowa

Swobodną energię powierzchniową dla wykonanych próbek (kompozyty, membrany kompozytowe, folie polimerowe) określono przy pomocy matematycznej analizy wyników bezpośrednich pomiarów kąta zwilżania dla wody (UHQ) i cieczy polarnej, jaką był diiodometan (Merckl, 14352-32). Do określenia wartości swobodnej energii powierzchniowej zastosowano metodę składowych dyspersyjnej i polarnej Owena-Wendta. Podstawą do wyznaczenia swobodnej energii powierzchniowej polimeru i kompozytów polimerowych jest układ równań:

$$\begin{cases} (\gamma_L^d)^{0.5} + 1.53(\gamma_S^d)^{0.5} = 7.80(1 + \cos\Theta_1) \\ (\gamma_L^d)^{0.5} + 0.22(\gamma_S^d)^{0.5} = 3.65(1 + \cos\Theta_2) \end{cases}$$

gdzie: Θ_1 – kąt zwilżania wody

Θ_2 – kąt zwilżania diiodometanem

Badania wykonano na aparacie DSA 10 Kruss w temperaturze pokojowej. Wyniki obliczeń swobodnej energii powierzchniowej zostały podane z uwzględnieniem przedziału ufności dla poziomu istotności 0,05.

1.4 Spektroskopia w podczerwieni FTIR - ATR

W celu stwierdzenia zmian spowodowanych sposobem przetwarzania polimeru syntetycznego PTFE/PVDF/PP przez: poddawanie go obróbce UV, plazmą niskotemperaturową a także łączenie go z innymi składnikami (włókna węglowe, włókna organiczne) materiały badano metodą spektroskopii absorpcyjnej z transformatą Furriera.

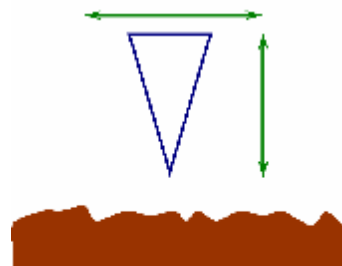
Badania prowadzone były metodą całkowitego wewnętrznego odbicia ATR (kąt padania 45° , 128 przebiegów) na kryształach ZnSe, w zakresie środkowej podczerwieni ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$) przy wykorzystaniu aparatu FTS Digilab-60 firmy BioRad. Zdolność rozdzielcza wynosiła 4 cm^{-1} . Technika refleksyjną śledzono zmiany chemii powierzchni folii i materiałów kompozytowych. Technika ATR FT IR wykorzystano w celu określenia stabilności materiałów kompozytowych w warunkach *in vitro*.

Techniką transmisyjną wykonano widma wyjściowych materiałów biopomierowych: alginianu sodu. Badanie wykonano na tym samym aparacie FTS Digilab-60, przygotowując pastylki materiału badanego w KBr. Badania przeprowadzono w zakresie środkowej podczerwieni $400-4500 \text{ cm}^{-1}$.

1.5 Mikroskopia sił atomowych AFM

Zastosowano mikroskop sił atomowych AFM (firmy Digital Instruments) w celu analizy powierzchni syntetycznego polimeru PTFE-PVDF-PP. Metodę zastosowano do analizy powierzchni po modyfikacji chemicznej: naświetlanie niskotemperaturową plazmą, promieniowaniem UV.

Badania przeprowadzono w trybie kontaktowym mikroskopu (Rys 28), w atmosferze powietrza, skanują powierzchnie próbki rzędu $5 \times 5 \mu\text{m}$ (przy czułości układu pomiarowego odchylenia igły: $<100 \text{ \AA}$). Wynikiem pomiaru było podanie podstawowych parametrów opisujących topografię powierzchni:



Rysunek 28. Zasada pomiaru parametrów powierzchni metodą AFM

Rms (Rq) – średnia kwadratowa profilu chropowatości (zwana szerokością profilu chropowatości), **Ra** – wielkość obrazująca średni zakres chropowatości (profil), **Rp** – profil gładkości powierzchni zakrzywionej, o odchyleniu od średniej chropowatości (gładkość dołka na powierzchni), **Ht** – średnia wysokość nierówności powierzchni, średni profil wysokości nierówności powierzchni

2 Mikrostruktura powierzchni

2.1 SEM

Mikrostruktura powierzchni tworzyw kompozytowych została zbadana za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego SEM JMS-5400 firmy JEOL (Japonia). Próbki do badań pokrywano cienką warstwą węgla. Badaniu poddano wszystkie rodzaje próbek kompozytowych oraz próbkę czystego polimeru PTFE-PVDF-PP. Celem potwierdzenia obecności frakcji submikronowych, mikrostrukturę włókien węglowych i włókien alginianowych a także proszku organicznego obserwowano pod mikroskopem skaningowym FEI Nova NanoSEM (USA).

2.2 Mikroskop optyczny

Zmiany w topografii powierzchni próbek kompozytowych udziałem fazy alginianowej (materiały membranowe): polimer syntetyczny/biopolimer oraz polimer syntetyczny/biopolimer/ włókno węglowe, śledzono przy użyciu mikroskopu optycznego do światła odbitego Nikon EPIPHOT 300 (Japonia).

3 Biostabilność

3.1 Zmiany pH

Zmiany stabilności tworzyw kompozytowych i folii polimerowej monitorowano przez pomiar pH. Pomiar wykonywany był na wyciągach wodnych i w roztworze symulującym środowisko żywego organizmu (płyn Ringera) uzyskanych z badanych materiałów i przeprowadzony został zgodnie z zaleceniami normy ISO 10993-12.

Wyciągi przetrzymywane były w cieplarni w temperaturze 37 °C, która odpowiadała ciepłocie ciała ludzkiego. Pomiaru dokonywano używając w tym celu mikrokomputerowego pH-metru CP-315M Elamtron (każdorazowo dokonując kalibracji urządzenia).

3.2 Zmiany przewodnictwa

Do badań przewodnictwa użyto wyciągów wodnych (środowiska agresywne). Przed każdym pomiarem przewodnictwa wyciągi studzono, do osiągnięcia temperatury pokojowej a następnie dokonywano pomiarów zmian przewodnictwa za pomocą konduktometru CC-315 Elmatron.

4 Badania mechaniczne

4.1 Badania wytrzymałości wybranych kompozytów

Badania właściwości mechanicznych układów kompozytowych z frakcją submikronową (**CP4**, **CP5**) i folii polimerowej (**CP0**), przeprowadzono przy wykorzystaniu maszyny wytrzymałościowej Zwick-1435 (Niemcy). Badania przeprowadzono w następujących warunkach:

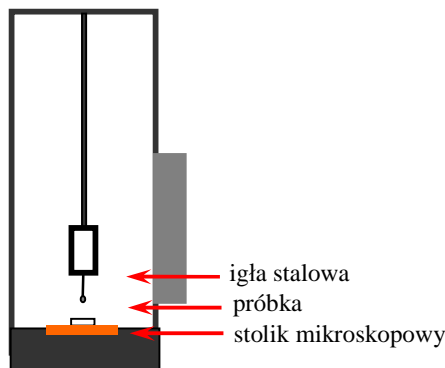
- szybkość rozciągania 400 mm/min,
- wielkość obszaru wydłużania 15 mm,

4.2 Badanie odkształcalność powierzchni, odporność na deformację

W celu określenia wpływu obecności włókna w osnowie polimerowej na odpowiedź komórkową wykonano cykl modelowych badań deformacji powierzchni. Metodę pomiaru opracowano na podstawie informacji o badaniu twardości tworzyw sztucznych metodą Rockwella (PN -93/C-89030/02).

Próbkę w postaci kompozytu z równolegle ułożonymi włóknami węglowymi (odległość między włóknem 0,5 cm) o grubości 0,5 cm umieszczono na stoliku mikroskopowym zamocowanym na uniwersalnej maszynie wytrzymałościowej Zwick 1435 (Rys 29). Badania dokonano w warunkach stałego obciążenia ($F=0,5N$) i przy stałej prędkości przesuwu igły ($v=2$ mm/min). Próbkę zamocowano na stoliku mikroskopowym a następnie obciążano igłą o zaoblonej końcówce ($d=1$ mm) przy każdorazowym przesuwie stolika mikroskopowego o 1 mm. Wynikiem badania było mierzone odkształcenie (odporność na deformację powierzchni) uzależnione od miejsca przyłożonego obciążenia. Analizę statystyczną otrzymanych wyników dokonano przy użyciu testu ANOVA. Otrzymane wyniki

pozwołyły na przygotowanie mapy odkształcalności próbki. Badania deformacji przeprowadzono również dla materiału polimerowego (płytki polimerowej, PTFE-PVDF-PP).



Rysunek 29. Układ pomiarowy zastosowany do badań odkształcalności powierzchni kompozytowej i folii polimerowej

5 Badania termograwimetryczne (DTA/TG)

Badania zmian masy polimerów: syntetycznego PTFE-PVDF-PP i organicznego NaAlg, prowadzono przy użyciu derywatografu typu C MOM Hungary w następujących warunkach:

- zakres temperatur 20-400°C,
- atmosfera obojętna (argon),
- szybkość ogrzewania 10°C/min,
- masa próbek ok. 20 mg,
- tygiel platynowy

Materiały badano w zakresie temperatur: 20 – 400°C dla biopolimeru i 20-600 °C dla polimeru syntetycznego.

6 Badania strukturalne-jądrowym rezonansem magnetycznym (NMR)

Identyfikacji struktury polimeru syntetycznego PTFE-PVDF-PP, dokonano na podstawie analizy widm: protonowego rezonansu magnetycznego ^1H NMR, fluorowego rezonansu magnetycznego ^{19}F NMR, węglowego rezonansu magnetycznego ^{13}C NMR. Jako rozpuszczalnika zastosowano deuterowanego acetonu (o charakterystycznych sygnałach: ^1H NMR 2.07 ppm, ^{13}C NMR 30.4, 204.1 ppm, ^{19}F NMR -111.2 ppm). Badania wykonano w Pracowni Magnetycznego Rezonansu Jądrowego w Zakładzie Chemii Organicznej, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego na aparacie NMR Varian, UNITY-Plus o częstotliwości 30-500 MHz.

7 Badania różnicową kolorymetrią skaningową (DSC)

Badania możliwych przemian fazowych powstałych w wyniku oddziaływania cząstek submikronowych z osnowa polimerową wykonano na tworzywach: włókno organiczne/polimer (CP5), włókno węglowe/polimer (CP4). Próbką odniesienia była folia polimerowa. Badania dokonano stosując aparaturę DSC 2010 firmy TA Instruments. Pomiar prowadzono w warunkach:

- prędkość ogrzewania	10 °C/min
- naważka	ok. 5 mg
- zakres temperatur	20-600 °C
- atmosfera	hel

8 Ubytki masy i zmiany grubości membran kompozytowych

Pomiary zmian masy prowadzono drogą bezpośredniego ważenia próbek po procesie wypłukiwania włókien lub proszku biopolimerowego (32h/80 °C). Badania prowadzono po uprzednim wysuszeniu próbek do stałej masy. Ubytek biopolimeru obliczono na podstawie zależności

$$\Delta m = (m_{\text{wypłukane}} / m_{\text{wyjściowe}}) * 100 \%$$

gdzie:

Δm – procentowy ubytek masy w membranie kompozytowej [%]

$m_{\text{wypłukane}}$ – masa próbki poddanej inkubacji w wodzie w temperaturze 100 °C przez 32h [g]

$m_{\text{wyjściowe}}$ – masa próbki wyjściowej, przed procesem wypłukiwania [g]

Zmiany grubości próbek kompozytowych przed i po procesie wypłukiwania z nich biopolimeru dokonano przy użyciu śruby mikrometrycznej PRE-C11 o zakresie pomiarowym 0-25 mm i dokładności 0,01mm. Pomiary grubości dokonano osuszeniu próbek do stałej masy. Zmianę grubości próbki obliczono na podstawie zależności:

$$\Delta t = (t_{\text{wypłukane}} / t_{\text{wyjściowe}}) * 100 \%$$

gdzie:

Δt – zmiana grubości membran kompozytowych po procesie wypłukiwania fazy biopolimerowej

$t_{\text{wyjściowe}}$ – grubość próbki przed procesem wypłukiwania biopolimeru [mm]

$t_{\text{wypłukane}}$ – grubość próbki po procesie wypłukiwania biopolimeru (warunki inkubacji: H₂O/32h/100 °C) [mm]

9 Oznaczenia udziału objętościowego porów w kompozytach membranowych

Oznaczenia udziału objętościowego porów powstałych w kompozytach polimer/włókna węglowe/biopolimer, dokonano na podstawie ilościowej analizy mikrofotografii z

Mikroskopu skaningowego Joel JSM-5400. Zastosowano jedną z odmian metod punktowych – metodę siatkową. Analizę obecności porów o średnicach submikronowych dokonano w oparciu o badania BET.

10 Oznaczenie rozwinięcia powierzchni BET

Do wyznaczenia rozwinięcia powierzchni spowodowanej obecnością frakcji submikronowej zastosowano pomiar adsorpcji par azotu (pomiar w temperaturze 77-78K). W tym celu użyto urządzenia do pomiaru powierzchni właściwej (Sorpty 1750). Badaniu poddano membranowe materiały kompozytowe po uprzednim wypłukaniu warstwy organicznej.

11 Wielkość cząstek

Pomiaru wielkości cząstek dokonano przy użyciu aparatu Nanosizer-ZS (firmy Malvern Instruments). Analizę rozkładu cząstek wykonano na układach: woda – włókna węglowe, izopropanol – włókna alginowe (lub izopropanol - proszek alginianowy). W celu dokładniejszego pomiaru zastosowano dezintegrator ultradźwiękowy

12 Charakterystyka biologiczna

12.1 Badania biogodności polimeru syntetycznego PTFE/PVDF/PP

Oceny biogodności materiału, folii polimerowych PTFE/PVDF/PP dokonano w Zakładzie Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów Akademii Medycznej we Wrocławiu. Wyniki cytotoksyczności były kluczowymi dla podjęcia dalszych badań nad modyfikacją polimeru innymi fazami: włóknista fazą węglową a także fazą organiczną.

12.2 Działanie cytotoksyczne terpolimeru PTVE/PVDF/PP

Badanie przeprowadzono w Pracowni Hodowli Komórkowych, Katedry Histologii i Embriologii Akademii Medycznej we Wrocławiu, zgodnie z normą PN-EN ISO 10993-5 'Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Badania cytotoksyczności: metody in vitro'. Badania przeprowadzono metodą bezpośredniego kontaktu z zastosowaniem wyciągów. Test biogodności prowadzono przez okres 24, 48 i 72 godzin inkubując hodowle komórkowe wraz z materiałem badanym w temperaturze 37 st. C, w atmosferze powietrza z dodatkiem, 5% CO₂. Ślepą próbą dla hodowli stanowiło medium komórkowe niekontaktujące się z materiałem. Zmiany ilościowe i morfologiczne, pod wpływem badanych materiałów, oceniono w odwróconym mikroskopie kontrastowo-fazowym. W celu określenia ilości martwych komórek zastosowano barwienie błękitem trypanu.

Badania przeprowadzono wykorzystując referencyjną linię komórkową fibroblastów mysich 3T3/Balb, otrzymanych z Banku Tkanek, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.

12.3 Działanie cytotoksyczne polimeru i materiałów kompozytowych

Dla porównania i potwierdzenia braku cytotoksyczności folii polimerowej, badania nad działaniem cytotoksycznym materiału (badania normowe zgodne z normą PN-EN ISO 10993-5 „Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 5: Badania cytotoksyczności: metody *in vitro*”) wykonano w Laboratorium Wirusologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej - PAN we Wrocławiu. Testy cytotoksycznego działania próbek wykonano metodą bezpośredniego kontaktu z jednowarstwową hodowlą komórek A549 w trybie 24 oraz 72 godzinach. Do badania wykorzystano linie komórek A549 – linia komórek nabłonkopodobnych ludzkiego raka płuc (ATCC CCL 185). Badaniu poddano wszystkie rodzaje materiałów wytworzonych na bazie polimeru PTFE-PVDF-PP i włóknistej fazy węglowej oraz włóknistej fazy organicznej (NaAlg).

Zmiany ilościowe i morfologiczne, pod wpływem badanych materiałów, oceniono po 24 i 72 godzinach w odwróconym mikroskopie kontrastowo-fazowym. W celu określenia ilości martwych komórek zastosowano barwienie z błękitem trypanu. Próba odniesienia dla badanych materiałów stanowił dołek komórkowy pozbawiony z materiału (TC PS).

13 Badania odpowiedzi komórkowej

Oznaczenia żywotności (przeżywalności) komórek i ilości wyprodukowanego przez nie białka: kolagenu typu pierwszego na powierzchniach badanych kompozytów przeprowadzono przy użyciu dwóch linii komórkowych: ludzkich osteoblastów hFOB 1.19, i fibroblastów ludzkich HS-5. Badania prowadzone były w Katedrze Immunologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Pozostałe badania odpowiedzi komórkowej prowadzono na linii osteoblastopodobnych ludzkich komórek MG 63 (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK). Badania komórkowe wytworzonych materiałów wykonano na Wydziale Fizjologii, Czeskiej Akademii Nauk w Pradze.

13.1 Oznaczenia żywotności komórek –test MTT

Oznaczenia żywotności (przeżywalności) komórek dwóch linii ludzkich: osteoblastów hFOB 1.19 i fibroblastów ludzkich HS-5 kontaktowanych z badanymi materiałami kompozytowymi przeprowadzono wykonując test MTT. Metoda ta oprócz oznaczenia przeżywalności komórek potwierdza informacje o biogodności materiału. Wykorzystuje ona metabolizm barwnika MTT (testu redukcji soli tetrazolowej) w mitochondriach żywych komórek (określa aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej).

Materiały badane formowane były w koliste próbki o średnicy 21 mm, które następnie sterylizowano UV. Przeżywalność komórek określana była po 7 dniach inkubacji. Do zawiesiny komórek znad powierzchni materiałów, dodawano soli tetrazolowej (barwnika MTT), tak powstałe roztwory inkubowano w cieplarni 210 min/37 st C. Tak powstałe zawiesiny roztworów komórek z barwnikiem badano spektrofotometrycznie (pomiar absorbancji promieniowania świetlnego o długości fali 570 nm) aparatem SUMAL PE 3

(Carl-Zeiss, Jena). Wynikiem pomiaru przeżywalności komórek jest procent komórek żywych kontaktowanych z materiałem w stosunku do kontroli.

13.2 Oznaczanie ilości kolagenu – metoda ELISA

Oznaczenie ilości kolagenu typu I dokonano przy użyciu testu ELISA. Badanie to, podobnie jak test MTT, jest badaniem potwierdzającym biogodność materiału. ELISA czyli test immunoenzymatyczny (immunoenzymosorbcyjny w fazie stałej), służy do wykrywania określonych białek (np. kolagenu typu I) na badanym materiale z użyciem przeciwciał monoklonalnych skoniugowanych z odpowiednim enzymem.

Podobnie jak w teście MTT oznaczenie przeprowadzono na osteoblastach hFOB 1.19 i fibroblastach HS-5. Poziom kolagenu określano po 7 dniach hodowli komórek kontaktowanych z materiałami badanymi. Wynikiem badania był pomiar ekstynkcji fali o długości 492 nm, wykonany dla każdej z badanych próbek kompozytowych oraz próbki odniesienia (referencja – zawiesina komórek niekontaktowana z materiałem), na spektrofotometrze SUMAL PE 3 (Carl-Zeiss, Jena). Z krzywej wzorcowej w układzie zależności: ekstynkcja od stężenia wyznaczonej dla sześciu różnych stężeń wzorca odczytano wartości ilości kolagenu typu pierwszego.

13.3 Badania proliferacji komórek do powierzchni materiałów.

Przygotowano osteoblasty wcześniej je namnażając (inkubacja w surowicy bydlęcej z dodatkiem antybiotyku, w temperaturze 37°C, atmosfera CO₂), licząc (barwienie błękitem trepanu i zliczanie żywych komórek w komorze Bürkera przed zasiedleniem. Wartość wynosiła 10 000 komórek/próbkę (17000 komórek/cm²) i pasażując. Materiał komórkowy umieszczano na kompozytach polimerowych w dołkach komórkowych i inkubowano w temperaturze 37°C, 98% wilgotności w atmosferze zawierającej 5% CO₂ na okres 1 i 3 dni. Po tym czasie komórki utrwalano; używając trypsyny w buforze fosforanowym. Całkowita ilość komórek zliczana była przy użyciu komory Bürkera, w mikroskopie optycznym (Axiophot, Zeiss). Wartość błędu wyznaczona została przy użyciu testu t-Studenta.

W celu wizualizacji zaadherowanych komórek na powierzchniach badanych materiałów posłużono się barwieniem fluorescencyjnym. Powierzchnie badanych materiałów przygotowano przemywając PBS i utrwalając przytwierdzone do powierzchni komórki etanolem a następnie wybarwiając PI (jodkiem propidolu). Obserwacje prowadzono w mikroskopie fluorescencyjnym IX 50 wyposażonym w kamerę cyfrową DP 70 (Olympus, Japan, obiektyw 10x i 20x).

13.4 Adsorbcja integrzyn receptorowych: b-aktyna

Adhezję komórek, rozplaszczanie, proliferację określono wykorzystując oznaczenie immunofluorescencyjne białek: b-aktyny. Barwienie to wykonano po 3 dniu hodowli, przytwierdzając materiał biologiczny do powierzchni badanych materiałów alkoholem

metylowym w obniżonej temperaturze (-20°C). Metodyka badania polegała na działaniu na komórki mieszaniną surowicy cielęcej i środka powierzchniowo czynnego a następnie inkubacji pierwotnej z antyciałami monoklinalnymi *anty- β aktyn*. Inkubacji wtórnej dokonano przy użyciu antyciał *anty-mouse IgG*. Obserwacje prowadzono w mikroskopie fluorescencyjnym IX 50 wyposażonym w kamerę cyfrową DP 70 (Olympus, Japan, obiektyw 10x i 20x).

13.5 Badanie inkorporacji DNA – test BrdU

Stopień proliferacji określano poprzez znakowanie komórek bromohexyurydyną (BrdU). Komórki zawieszone w medium hodowlanym pozbawionym czynników wzrostu i czynników typu EGF kontaktowano z materiałem badanym przez 48h. Następnie dodawano roztworu z czynnikiem Brd-U i inkubowano jeszcze przez 3h. Metoda polegała na wcieleniu do naturalnego DNA znacznik BrdU sprzęgano z monoklinalnym ciałem anty-BrdU i peroksydazą. Po ściągnięciu znakowanego czynnikiem medium hodowlanego, komórki unieruchamiano na powierzchni materiału. Zajście reakcji sprzęgania i powstanie kompleksu śledzono przez pomiar absorbancji przy długości fali 450 nm, używając w tym celu spektrofotometru SUMAL PE 3 (Carl-Zeiss, Jena).

13.6 Przeżywalność (aktywność enzymatyczna) komórek MG 63 – metoda XTT

Proliferacja komórek na powierzchniach badanych materiałów kompozytowych zbadano wykorzystując w tym celu metodę XTT. Badane materiały sterylizowano nieskotemeperturową plazmą (40°C , H_2O_2 , Sterrad 120, ASP, Johnson&Johnson). Przeżywalność komórek określono po 7 dniach inkubacji, po tym czasie materiał biologiczny utrwalano; używając trypsyny w buforze fosforanowym. Całkowita ilość komórek zliczana była przy użyciu komory Bürkera, w mikroskopie optycznym (Axiophot, Zeiss). Wartość błędu wyznaczona została przy użyciu testu t-Studenta. Do zawiesiny komórek znad powierzchni materiałów, dodawano pochodnej soli tetrazolowej (barwnika XTT), tak powstałe roztwory inkubowano w cieplarni 120 min/ 37°C . Zawiesinę wraz z komórkami i z barwnikiem badano spektrofotometrycznie (pomiar absorbancji promieniowania świetlnego o długości fali 490 nm) aparatem SUMAL PE 3 (Carl-Zeiss, Jena).

1. Charakterystyka polimeru PTFE-PVDF-PP

1.1 Wprowadzenie

Wszystkie materiały stanowiące przedmiot badań zostały wytworzone z polimeru syntetycznego na bazie teflonu. Tworzywem tym był terpolimer o wzorze PTFE-PVDF-PP. Badania rozpoczęto od określenia właściwości: mechaniczne (moduł Younga, odkształcenie, wytrzymałość na zrywanie) i termiczne (trwałość termiczne, temp. rozkładu) terpolimeru PTFE-PVDF-PP. Badania spektroskopowe (FT IR- techniką ATR, NMR: ^1H , ^{13}C , ^{19}F) pozwoliły na identyfikację struktury polimeru.

Analiza polimeru konieczna była ze względu na fakt, iż stanowił, on matrycę dla wytworzonych materiałów kompozytowych, a jednocześnie traktowany był jako materiał odniesienia w stosunku do wszystkich materiałów będących przedmiotem badań

Zarówno terpolimer jak i projektowane na jego bazie materiały kompozytowe przeznaczone są dla zastosowań i mają mieć zastosowanie medyczne wykonano testy cytotoksyczności i analizę procesu degradacji (stabilności) polimeru w środowisku biologicznym. Testy cytotoksyczności przeprowadzono zgodnie z normą: ISO 10993 'Biologiczna ocena wyrobów medycznych' na linii komórkowej fibroblastów mysich. Badania degradacji materiału przeprowadzono zgodnie z wymogami normowymi: ISO 10993 'Badania trwałości materiałów w środowisku *in vitro*'

Mając na uwadze przeznaczenie materiału oraz cel i zakres pracy (badanie odpowiedzi komórkowej na modyfikowane powierzchnie syntetyczne), dalszym krokiem było określenie wpływu sterylizacji na właściwości tworzywa. Sprawdzone było promieniowanie UV a także oddziaływanie terpolimeru z plazmą niskotemperaturową H_2O_2 na właściwości powierzchni terpolimeru.

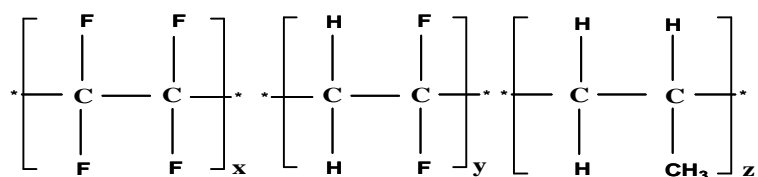
Znajomość parametrów polimeru przedstawionych w tej części pracy pozwoliła na zaprojektowanie szeregu układów kompozytowych o określonych właściwościach fizykochemicznych, mechanicznych i biologicznych.

1.2 Dane podstawowe o PTFE-PVDF-PP

W pracy wykorzystano fluoropochodny, terpolimer otrzymany na bazie politetrafluoroetylen (teflon, PTFE). Terpolimer zbudowany jest z trzech rodzajów merów, w których 56 % wagowych stanowi politetrafluoroetylen (PTFE), 27 % wagowych stanowi polidifluorowiniliden (PVDF) a pozostałą część polipropylen (PP). Wzór półstrukturalny polimeru, przedstawia Rys 30. Dane dotyczące terpolimeru podane przez producenta zebrano w Tabeli 5.

Tabela 5. Parametry charakteryzujące PTFE-PVDF-PP, podawane przez producenta (Aldrich Chemical Co Inc)

Nazwa handlowa	poly (tetrafluoroetylen –co– viniliden –co– propoylen) PTFE-PVDF-PP
Producent	Aldrich Chemical Comp. Inc (USA)
Numer katalogowy	454583
Gęstość [g/cm ³]	1,6
Rozpuszczalność	ketony, estry

**Rysunek 30.** Wzór półstrukturalny terpolimeru PTFE-PVDF-PP

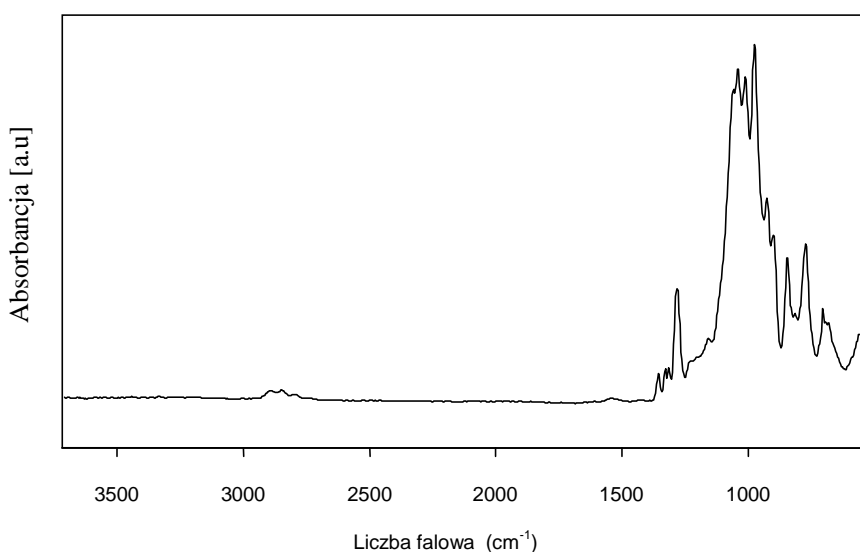
PTFE-PVDF-PP należy do grupy polimerów termoplastycznych, amorficznych o statystycznym rozmieszczeniu merów.

Ze względu na małe rozmiary atomu fluoru ($r_F=57$ pm), jego wysoką elektroujemność (wg. Allred-Rochow 4,10, Pauling 3,98) a co za tym idzie wysoką energię dysocjacji, kowalencyjnych wiązań C-F ($4,88 \cdot 10^5$ J/mol) polimery fluorowe charakteryzują się stabilnością termiczną i chemiczną. W makrocząsteczce teflonu $[-CF_2-CF_2-]$, brak jest wiązań polarnych mimo wysokiego momentu dipolowego (elektroujemność węgla $\mu_C=2,5$ eV, fluoru $\mu_F=4,0$ eV, $\mu_{dipol}=1,5$ eV), silnie polarnych wiązań C-F, momenty dipolowe wiązań C-F w strukturze polimeru znoszą się całkowicie ze względu na jego symetrię.

PVDF to polimer, który jest pochodną teflonu (PTFE), w którym dwa atomy fluoru zostały podstawione atomami wodoru. Charakteryzuje się wysoką energią powierzchniową, a tym samym niską zwilżalnością polimeru (polimer hydrofobowy). Wiązania C-H (obecne w PP, PVDF) są najsłabszymi wiązaniami w strukturze terpolimeru (energia wiązania rzędu 98 kJ/mol), a tym samym niższa energia dysocjacji ($4,15 \cdot 10^5$ J/mol). Wiązania te stanowią mogą miejsca reaktywne łańcucha polimerowego, w których następować może reakcja utlenienia wiązania C-H.

1.2.1 Badania spektroskopowe

Charakterystyki spektroskopowej terpolimeru PTFE-PVDF-PP dokonano na podstawie wyników analizy widm spektrometrii w podczerwieni FT IR, techniką ATR. W widmie tworzywa syntetycznego widoczne są charakterystyczne pasma pochodzące od: drgań rozciągających C-F ok. $1000\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$. Intensywność pasm w tym zakresie liczby falowej jest wynikiem nakładania się pasm odpowiedzialnych za rozciągające drgania szkieletowe wiązań C-C (ok. $1100\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$) a także drgania deformacyjne wiązania C-H (ok. $1100\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$). Pasma w zakresie ok. 890 cm^{-1} świadczy o obecności geminalnej grupy metylowej CH_3 (pochodzącej od meru polipropylenowego). Za pojawienie się pasma w zakresie liczby falowej $2850\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ odpowiadają drgania rozciągające C-H (Rys 31).



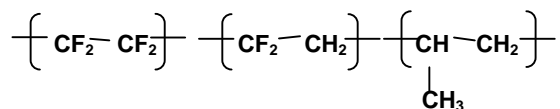
Rysunek 31. Widmo spektroskopowe PTFE-PVDF-PP (FT IR-ATR)

1.2.2 Badania NMR

Terpolimer będący przedmiotem pracy został poddany badaniom jądrowego rezonansu magnetycznego. Wykonano pomiar protonowego, węglowego i fluorowego rezonansu magnetycznego. Analiza zestawu widm NMR pozwoliła na przybliżenie i identyfikację statystycznego ułożenia merów w łańcuchu.

Traktując PTFE-PVDF-PP jako prosty alifatyczny układ łańcuchowy obliczono wielkość przesunięć chemicznych (δ). Na podstawie wykonanych obliczeń zgodnie z regułą Shoolery'ego (^1H NMR) a także danych dostępnych w *Tablicach spektroskopowych*, przyporządkowano sygnały (wartości przesunięć, δ) odpowiednim ugrupowaniom chemicznym w łańcuchu. Przez porównanie wielkości pola pod pikiem określono, który z układów merowych występuje z największą częstotliwością w łańcuchu PTFE-PVDF-PP.

Tą samą metodę zastosowano dla węglowego (^{13}C NMR) i fluorowego (^9F NMR) widma związku. Ustalono, że najczęściej występującą strukturą jest układ:



Rysunek 32. Struktura polimeru syntetycznego PTFE-PVDF-PP, ustalona na podstawie badań NMR

^{19}F NMR (w acetonie- d_6): $-\text{CF}_2-\text{CF}_2-$, $\delta = -92 \div -97$ ppm; $-\text{CF}_2-\text{CF}_2-\text{CF}_2$, $\delta = -110 \div -116$ ppm; $-\text{CH}_2-\text{CF}_2-\text{CH}_2$, $\delta = -119 \div -122$ ppm; $-\text{CF}_2-\text{CH}_2-$, $\delta = -122 \div -126$ ppm

^1H NMR (w acetonie- d_6):

$-\text{CF}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $\delta = 1,843 \pm 0,05$; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-$, $\delta = 1,353 \pm 0,05$;

^{13}C NMR (w acetonie- d_6):

$-\text{CH}_3$, $\delta = 37,04$ ppm; $-\text{CH}_2-$, $\delta = 43,13$ ppm; grupa sygnałów węglowych: atomy węgla o hybrydyzacji sp^3 : C-F, $\delta = 119,54 - 121,266$ ppm

Pozostałe konfiguracje łańcuch polimerowego PTFE-PVDF-PP różniące się rozmieszczeniem meru PVDF względem PP rozmieszczone są prawdopodobnie statystycznie.

1.2.3 Badania termiczne

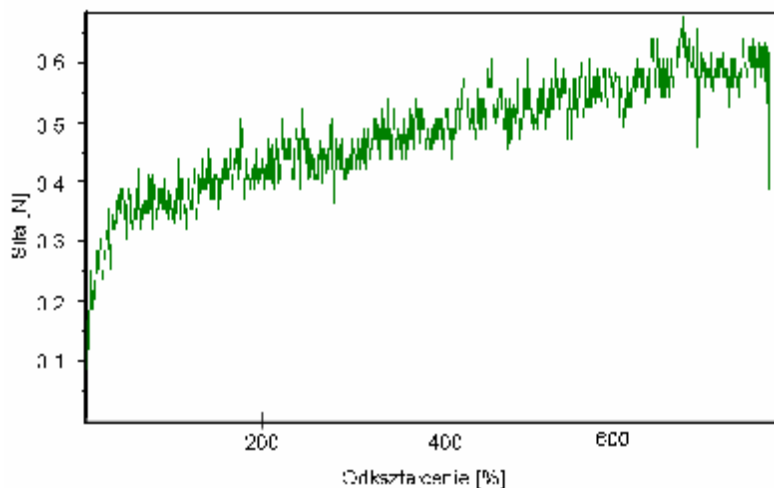
Badania termiczne terpolimeru określające jego temperaturę topnienia (rozkładu związku) ustalono na podstawie pomiarów różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) w przepływie helu. Wynosi ona $m.p = 476^\circ\text{C}$

1.2.4 Właściwości mechaniczne

Właściwości mechaniczne terpolimeru (wytrzymałość na rozciąganie, moduł sprężystości, odkształcenie), zbadano na uniwersalnej maszynie wytrzymałościowej wykonując test rozciągania. Próbkki do badań wytrzymałościowych otrzymano rozpuszczając polimer w acetonie (1:10), a następnie metodą odlewania otrzymywano materiał polimerowy w postaci folii (odparowywanie rozpuszczalnika w temperaturze pokojowej 20°C , 24h). Paski tworzywa o rozmiarach 5x20 mm mocowano w szczękach uniwersalnej maszyny wytrzymałościowej. Baza pomiarowa wynosiła 35 mm. Otrzymane wykresy w układzie siła - odkształcenie przedstawia Rys 33. Wyniki pomiarów zawiera Tabela 6.

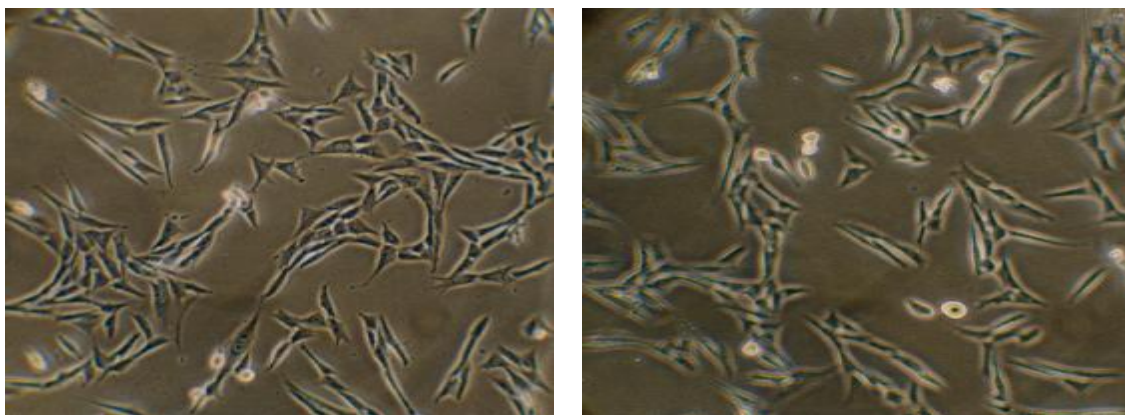
Tabela 6. Właściwości terpolimeru PTFE-PVDF-PP

Parametr PTFE-PVDF-PP	Zbadana wielkość
Wytrzymałość na rozciąganie [MPa]	0,57
Moduł sprężystości [MPa]	0,59
Wydłużenie przy zerwaniu [%]	700-750

**Rysunek 33.** Wykres w układzie siła-odkształcenie dla polimeru PTFE-PVDF-PP

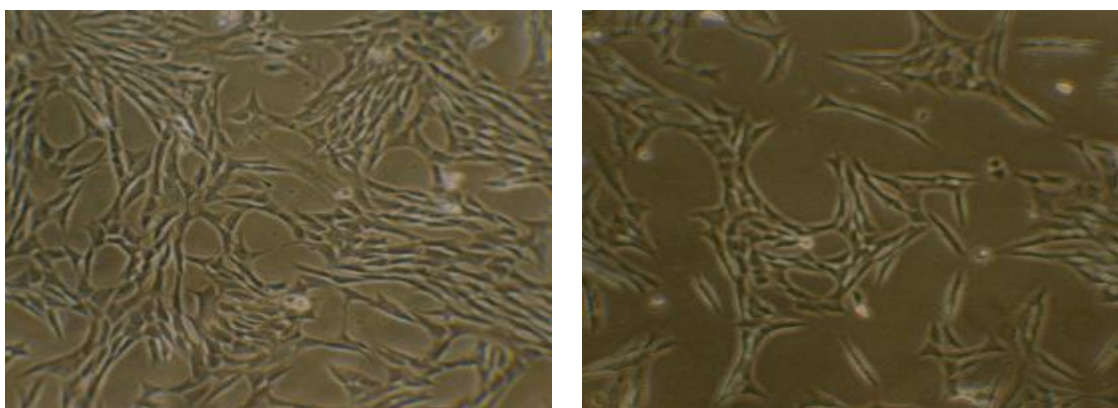
1.3 Normowa ocena cytotoksyczności materiału

Badania polimeru PTFE-PVDF-PP (**CP0**) kontaktowanego z komórkami linii fibroblastów mysich po 24 h hodowli nie wykazały jego cytotoksyczności. Wszystkie cechy morfologiczne komórek (kształt, wielkość, rozmieszczenie) na materiale i na próbie odniesienia były prawidłowe. Komórki przylegały do podłoża na całej powierzchni próbki. We wszystkich hodowlach stwierdzono obecność dzielących się komórek. Nie stwierdzono aglutynacji, wakuolizacji, oddzielania od podłoża ani lizy błon komórkowych. Proliferacja komórek w hodowlach kontrolnych i w próbach badanych była prawidłowa. Liczba komórek żywych, w hodowlach na folii polimerowej CP0 była istotnie wyższa (test $T=0,08$) od liczby żywych komórek w hodowlach kontrolnych (Rys 34).



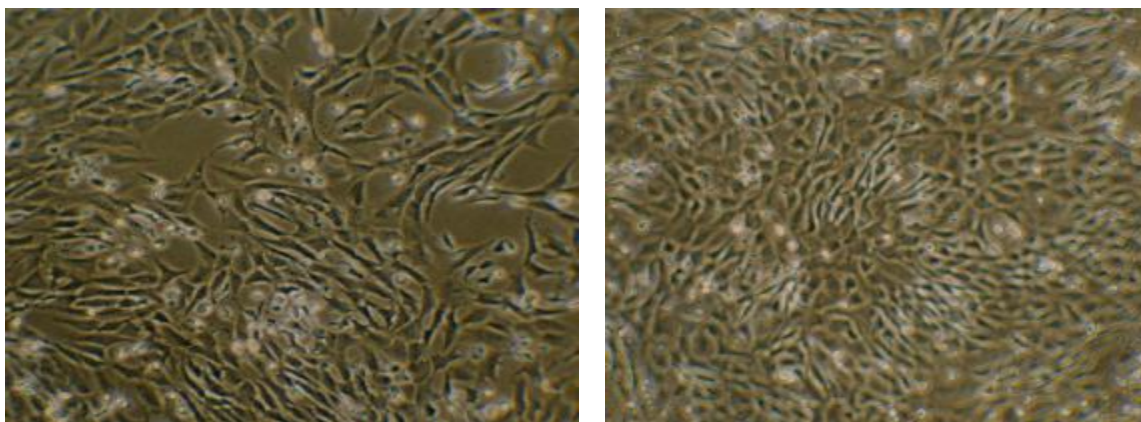
Rysunek 34. Hodowla fibroblastów po 24 godzinach: a-hodowla po kontakcie z próbkami folii PTFE-PVDF-PP, b-hodowla kontrolna bez kontaktu z materiałem

W hodowlach komórkowych po 48h kontakcie komórek z podłożem wykonanym z folii polimerowej (CP0) i w próbie kontrolnej nie stwierdzono zmian morfologicznych komórek. Zarówno proliferacja jak i organizacja kolonii komórkowych w obydwu próbach były prawidłowe. W żadnej z badanych hodowli nie zanotowano komórek martwych, natomiast liczba komórek żywych w kontakcie z folią CP0 była istotnie wyższa niż w hodowli kontrolnej (test T- 0,02) (Rys 35, Rys 37)



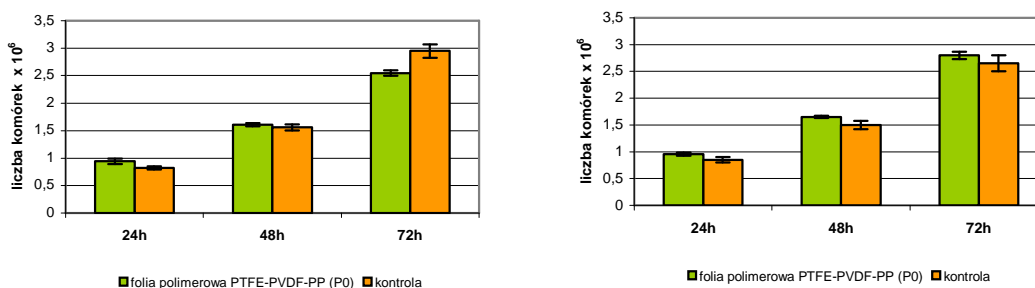
Rysunek 35. Hodowla fibroblastów mysich po 48 godzinach: a-hodowla komórek po kontakcie z próbkami z folii PTFE-PVDF-PP, b- hodowla kontrolna niekontaktowana z materiałem

Po 72 h kontakcie z folią CP0, w hodowlach komórkowych, i w hodowlach kontrolnych stwierdzono około 15% komórek okrągłych, odklejonych od podłoża. Pozostałe komórki w obydwu hodowlach miały prawidłowy kształt i cechy morfologiczne. Proliferacja komórek na powierzchni folii polimerowej (CP0) była niższa niż w próbie kontrolnej. Liczba komórek martwych po kontakcie z badanym materiałem jak i z kontrolą była identyczna (około 10%). Zachowanie to było spowodowane zużyciem składników odżywczych w płynie hodowlanym i związane z wysoką proliferacją komórek na powierzchni (Rys 36, Rys 37).



Rysunek 36. Hodowla fibroblastów po 72 godzinach hodowli: a-hodowla po kontakcie z folią polimerową PTFE-PVDF-PP, b - hodowla kontrolna, niekontaktowana z materiałem

We wszystkich ocenianych hodowlach komórkowych i we wszystkich przedziałach czasowych (24, 48, 72h) próbki materiału syntetycznego CP0 nie wykazywały działania cytotoksycznego.



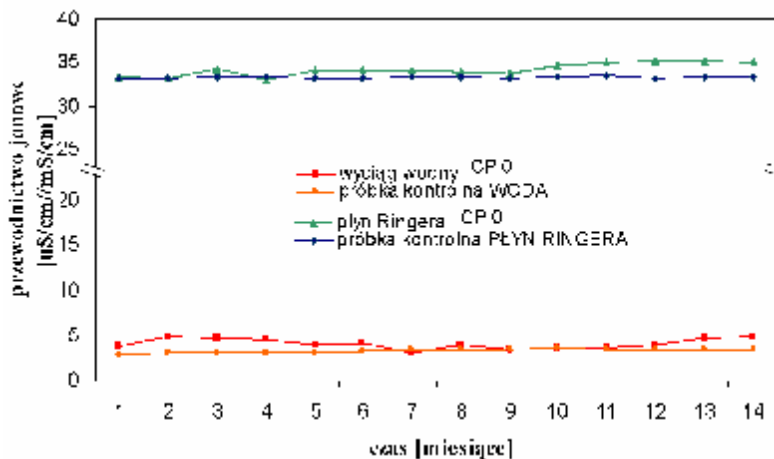
Rysunek 37. Całkowita liczba fibroblastów mysich po kontakcie z próbkami z folią polimerową PTFE-PVDF-PP (CP0). Liczba żywych fibroblastów mysich po kontakcie z próbkami z folią polimerową (CP0).

1.4 Badania degradacji materiału PTFE-PVDF-PP

Badania degradacji polimeru polegały na inkubacji folii PTFE-PVDF-PP w wodzie destylowanej oraz w wieloelektrolitowym płynie izotonicznym (płynie Ringera), zachowując 1% stężenie ekstraktu wobec materiału inkubowanego (1g badanego materiału na 10 ml płynu inkubacyjnego). Degradację materiału prowadzono w temperaturze 37 °C przez okres 14 miesięcy (w trakcie trwania doświadczenia zmieniano płyn inkubacyjny). Przedmiotem badań były zarówno ekstrakty inkubacyjne (pomiar zmian pH i przewodnictwa) jak i inkubowane folie polimerowe. Folie poddane inkubacji były analizowane w oparciu o metodę, ATR FT IR.

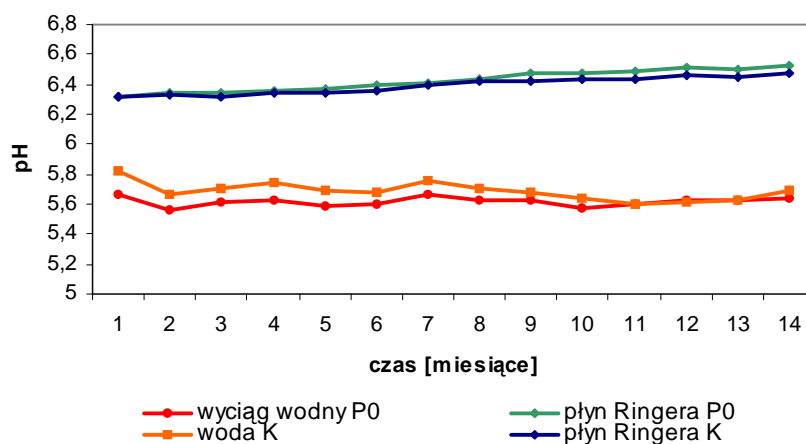
1.4.1 Badanie zmian przewodnictwa jonowego i pH

Stopień zmian wyciągów z folii polimerowej poddanej inkubacji w warunkach *in vitro* monitorowano przez zmiany przewodnictwa jonowego wyciągów i zmiany ich pH (Rys 38, Rys 39).



Rysunek 38. Wykres zmian przewodnictwa jonowego wyciągów wodnych i płynu Ringera po 14 miesiącach inkubacji.

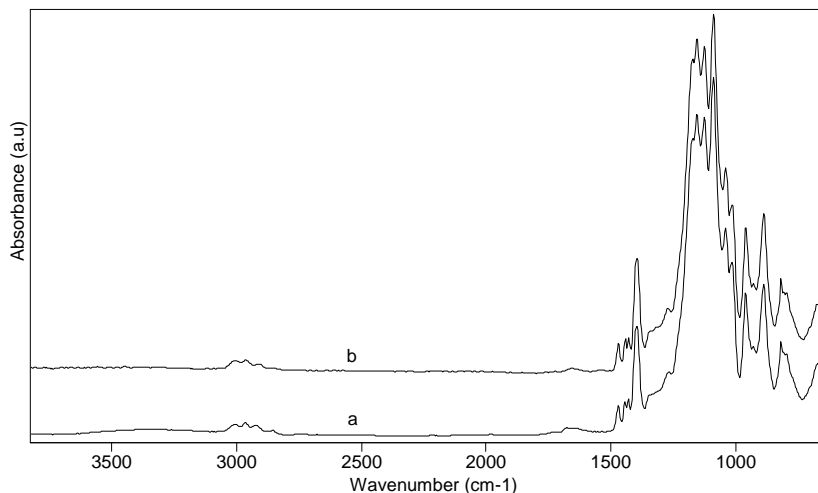
Wyniki doświadczenia wskazują, że polimer syntetyczny PTFE-PVDF-PP w warunkach symulujących żywy organizm jest tworzywem stabilnym. Materiał nie powoduje zmian w wartości pH płynu inkubacyjnego (woda, płyn Ringera) co zgodnie z wymaganymi badaniami normowymi ISO o wartości zmian pH wyciągów dla materiałów do zastosowań medycznych jest warunkiem koniecznym, dopuszczający je do kontaktu z żywym organizmem¹⁶⁴.



Rysunek 39. Wykres zmian pH wyciągów w czasie 14 miesięcy inkubacji

1.4.2 Badania FT IR/ATR

Badania degradacji uzupełniano pomiarami spektroskopowymi FTIR/ATR materiałów inkubowanych w wodzie i w płynie Ringera. Przed przystąpieniem do badań próbki przemywano wodą (UHQ) a następnie suszono na powietrzu (w temperaturze 20 °C) przez 24h. Badania wykonano po 6 i 12 miesiącach inkubacji. Wyniki pomiarów (niezmienione widma FT IR/ATR, świadczące o stabilności materiału) przedstawiono na Rys 40.



Rysunek 40. Widma spektroskopowe folii PTFE-PVDF-PP po 12 miesiącach inkubacji w wodzie (a) i w płynie Ringera (b).

W widmach analizowanych próbek, folii przed inkubacją jak i folii po inkubacji, niezależnie od czasu inkubacji (6 czy 12 miesięcy) nie obserwuje się zmian, brak jest różnic zarówno w położeniach pasm charakterystycznych jak i w ich intensywności.

Zarówno wyniki dotyczące monitorowania pH, jak i przewodnictwa jonowego wyciągów płynów inkubacyjnych a także badania FT IR folii polimerowych wykazują, że terpolimer PTFE-PVDF-PP należy do grupy materiałów stabilnych w środowisku biologicznym.

1.5 Metody sterylizacji materiału

Materiały implantacyjne podaje się sterylizacji celem wyjałowienia i pozbycia się drobnoustrojów ich form przetrwalnikowych. Czynnikiem sterylizującym jest energia dostarczana najczęściej w postaci promieniowania, w zakresie fal od podczerwieni do promieniowania jonizującego. Najczęściej stosowanymi metodami wyjaławiania są: sterylizacja w parze wodnej w autoklawie, promieniowaniem ultrafioletowym a także metody radiacyjne i plazmowe. Sterylizacja zwłaszcza tworzyw polimerowych może wpływać na materiał zmieniając ich budowę chemiczną powierzchni oraz modyfikując ich topografię.

Celem badania była analiza wpływu promieniowania ultrafioletowego (UV) oraz obróbki plazmą niskotemperaturową H₂O₂ na budowę powierzchni polimeru oraz jej topografię. Folię polimerową poddawano napromieniowaniu UV o długości fali 354 nm, lub

poddawano działaniu plazmy niskotemperaturowej (H_2O_2 , 40 °C/90 min). Próbki polimeru PTFE-PVDF-PP poddano następnie badaniom powierzchni wykorzystując w tym celu metodę spektroskopii w podczerwieni (techniką ATR) oraz badając zmiany w zwilżalności powierzchni (pomiar kąta zwilżania). Topografię powierzchni analizowano metodą mikroskopii sił atomowych, AFM (tryb kontaktowy).

1.5.1 Sterylizacja promieniowaniem ultrafioletowym

Wyjaławianie pod wpływem promieniowania ultrafioletowego ma na celu sterylizację powierzchni folii polimerowej. Próbkę PTFE-PVDF-PP umieszczono pod lampą rtęciową o długości fali 354 nm, na 24h. Tak otrzymaną folię polimerową (oznaczono jako **P1**), poddano dalszej analizie powierzchniowej. Jako próbkę odniesienia traktowano folię z polimeru PTFE-PVDF-PP nie modyfikowanego (**P0**).

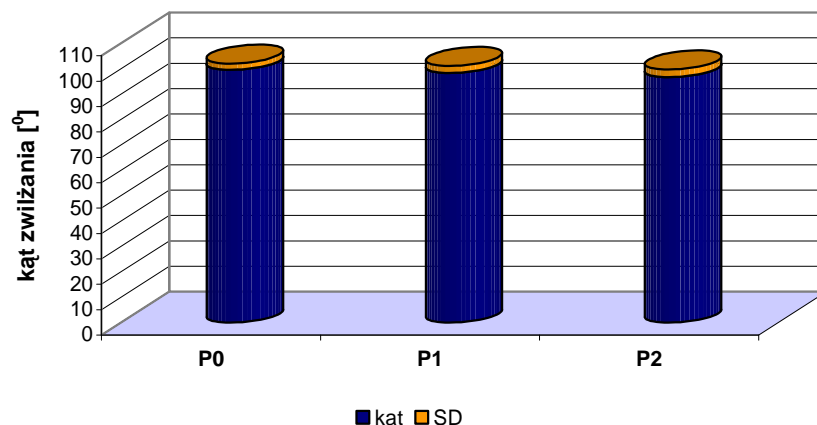
1.5.2 Sterylizacja plazmowa

Folię polimerową PTFE-PVDF-PP, poddawano obróbce plazmą niskotemperaturową. Materiał polimerowy umieszczano w opakowaniu sterylizacyjnym zaopatrzonym w identyfikator poprawnego przebiegu procesu sterylizacji (zmiana koloru świadczy o wysterylizowaniu materiału). Tak przygotowany materiał umieszczano w komorze sterylizacyjnej aparatu Sterrad 120 i poddano działaniu par nadtlenu wodoru w cyklu podwójnym: 2x45 minut. Materiał polimerowy poddany procesowi plazmowania oznaczono symbolem **P2**, i poddano dalszej analizie powierzchniowej. Próbką odniesienia stanowiła folia polimerowa, niemodyfikowana (**P0**).

1.5.3 Analiza powierzchni polimeru poddanego sterylizacji

1.5.3-1 Zwilżalność powierzchni

Zmiany fizykochemiczne powierzchni określono przez zbadanie zwilżalności powierzchni. Pomiar kąta zwilżania wykonano używając wody UHQ, zgodnie z procedurą opisaną w *Rozdziale Metody badań* (str. 65). Wartości średnie oraz przedziały ufności dla poziomu istotności $\alpha=0,05$ (Rys. 41) wskazują, że niemodyfikowana folia polimerowa (**P0**) charakteryzuje się wysoką hydrofobowością powierzchni (kąt zwilżania ok. 100 °). Żadna z zastosowanych metod wyjaławiania nie wpływa na wielkość kąta zwilżenia, ani na wartość energii powierzchniowej. Niewielkie odchylenia w wielkości kąta zwilżania powierzchni mieszczą się w granicach błędu statystycznego.



Rysunek 45. Wielkość zmian kąta zwilżania po sterylizacji UV (P1) i plazmą, H_2O_2 (P2)

1.5.3-2 Spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni

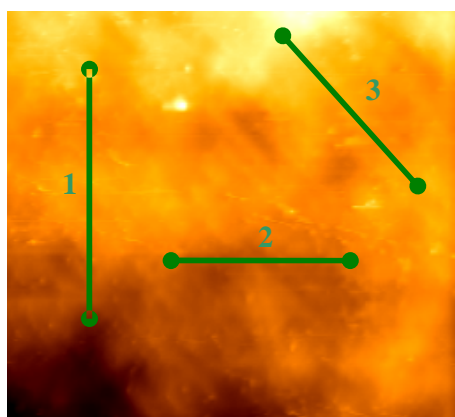
W widmach próbek polimeru poddanych działaniu promieniowania UV, P1 jak i poddanych działaniu plazmy niskotemperaturowej (P2) w odniesieniu do folii polimerowej nie zmieniają położenia pasm ani ich intensywności. Brak nowych pasm a także brak zmian w intensywności już istniejących świadczy o stabilności i trwałości materiału na zastosowane metody wyjaławiania.

1.5.3-3 Topografia powierzchni – mikroskopia sił atomowych

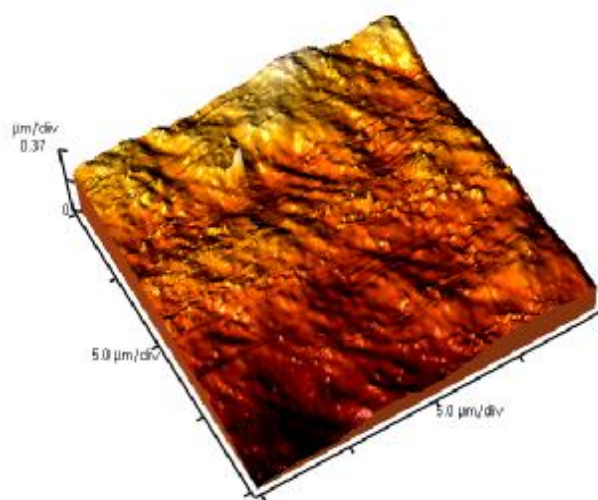
Badania topografii powierzchni prowadzono stosując mikroskop sił atomowych pracujący w trybie kontaktowym. Pomiarów parametrów chropowatości powierzchni (R_a , R_{ms} , R_p , H_t) a także obserwacje tekstury pod mikroskopem sił atomowych (2d, 3d) wskazały, że zastosowane techniki wyjaławiania prowadzą do nieznacznego obniżenia średniego poziomu chropowatości R_a . Obie folie polimerowe (P1 i P2) wykazują nierówności w skali nanometrów, przy czym obróbka plazmą prowadzi do ujednolicenia topografii powierzchni materiału syntetycznego (wielkości R_a i R_q są zbliżone na całej powierzchni, Tabela 7). Naświetlanie polimeru PTFE-PVDF-PP, promieniowaniem UV pozostawia powierzchnię o znacznych różnicach w średnim poziomie chropowatości (R_a waha się w granicach ok. 5-10 nm) i w profilu wysokości (R_{ms} wahania w granicach 20-35 nm). Uzyskany obraz powierzchni 3d wskazuje, że nie jest ona topograficznie jednorodna.

Brak jednolitej powierzchni polimeru uzyskany po naświetlaniu UV a tym samym, możliwy niezamierzony wpływ sterylizacji na odpowiedź komórkową był przyczyną, że do dalszych badań zastosowano sterylizację plazmową.

Tabela 7. Wielkości pomiarów parametrów tekstury techniką AFM, dla materiału **P2**

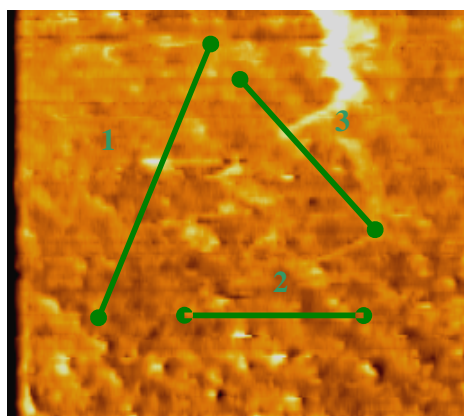


linia	Ra [nm]	Rms (Rq) [nm]	Rp [nm]	Ht [nm]
1	8,68	22,97	357,85	798,1
2	6,31	32,48	139,33	798,1
3	6,59	28,86	261,21	462,1

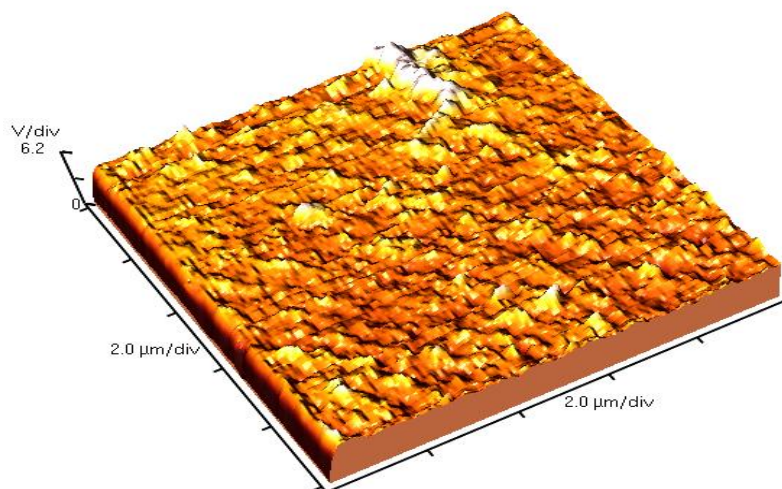


Rysunek 42. Tekstura folii polimerowej (**P2**) poddanej obróbce niskotemperaturową plazmą H_2O_2

Tabela 8. Wielkości pomiarów parametrów tekstury techniką AFM, dla materiału **P1**



linia	Ra [nm]	Rms (Rq) [nm]	Rp [nm]	Ht [nm]
1	6,81	18,72	278,54	688,1
2	7,18	23,84	139,33	529,7
3	6,37	48,46	261,21	612,2



Rysunek 43. Tekstura folii polimerowej (P1) poddanej obróbce promieniowaniem ultrafioletowym (356 nm)

1.6 Podsumowanie

Jak wynika z przeprowadzonych badań terpolimer, PTFE-PVDF-PP, zastosowany w pracy jest materiałem charakteryzującym się niską wytrzymałością na rozciąganie oraz wysokim odkształceniem przy zniszczeniu. Polimer jest trwały termicznie, a w temperaturze pokojowej znajdują się w stanie wysokiej elastyczności natomiast po podgrzaniu przechodzi w stan lepkopłynny (temp. 170-350 °C, temp. rozkładu polimeru 476 °C).

Z badań spektroskopowych (NMR, FT IR) wynika, że posiada on strukturę liniową lub liniowo-rozgałęzioną oraz charakteryzuje się brakiem wiązań poprzecznych sieciujących poszczególne łańcuchy. Wynikiem tego jest łatwość przenoszenia naprężeń pomiędzy wiązaniami nie prowadząca do zniszczenia struktury nawet pod wpływem przyłożonej siły.

Materiał polimerowy jest biozgodny, nie jest cytotoksyczny i trwały w środowisku *in vitro* (woda, płyn wieloelektroliwtowy).

2. Kompozyty włóknisto polimerowe

2.1 Wprowadzenie

Przedmiotem tej części pracy było otrzymanie grupy włóknistych, węglowych tworzyw kompozytowych o osnowie z terpolimeru PTFE-PVDF-PP a następnie zbadanie jak wprowadzenie włókien do syntetycznego polimeru, wpływa na odpowiedź komórkową.

Zaprojektowano i wytworzono trzy rodzaje materiałów kompozytowych, które różniły się sposobem rozprządzenia włókien węglowych w polimerowej osnowie oraz wzajemnym stosunkiem włókien węglowych do polimeru.

Łączenie biozgodnych składników w kompozyty funkcjonalne może wpływać na biozgodność materiału stąd badania rozpoczęto od oceny cytotoksyczności. Materiałem odniesienia była zbadana wcześniej folia polimerowa i polistyren (TC PS).

W kolejnych etapach pracy otrzymane materiały kompozytowe poddano analizie parametrów fizykochemicznych powierzchni (takich jak zwilżalność, energia powierzchniowa, chropowatość, odporność na deformacje). Następnie wytworzone kompozyty poddano badaniom *in vitro*, kontaktując je z linią osteoblastopodobnych komórek ludzkich (MG-63).

2.2 Wytworzenie materiałów kompozytowych

Modyfikacje terpolimeru prowadzono przy użyciu włókien węglowych. Materiał kompozytowy otrzymywano wprowadzając do osnowy syntetycznego terpolimeru PTFE-PVDF-PP, włókna węglowe w postaci tkaniny dwukierunkowej. Tak otrzymany materiał kompozytowy, został następnie poddany badaniom fizykochemicznym i biologicznym (w tym testom cytotoksyczności).

2.2.1 Włókna węglowe

Włókno węglowe w postaci tkaniny (2D) wytworzono z prekursora poliakrylonitrylowego, PAN poddając go obróbce termicznej. Prekursor poddano w pierwszej kolejności utlenianiu, proces prowadzono przez 5h do temperatury 240 °C, następnie karbonizowano w temperaturze 1200 °C. Postęp temperaturowy wynosił 5 °C/min. Włókna przetrzymywano w temperaturze końcowej przez 15 minut. Prekursor organiczny (Mavilon, Węgry) posiadał formę tkaniny o splocie płóciennym 50%/50%. Właściwości włókna elementarnego podane przez producenta zebrano w Tabeli 9.

Tabela 9. Właściwości włókien PAN (Mavilon, Węgry)

Parametr włókien PAN	Wartość
Ilość włókien elementarnych w wiązce	3000
Gramatura [g/m ²]	160
Rozwinięcie powierzchni [m ² /g]	0,7 ± 0,1

Parametry mechaniczne włókien węglowych oznaczano przy wykorzystaniu maszyny wytrzymałościowej Zwick 1435 (Tabela 10). Identyfikację powierzchniowych grup funkcyjnych przeprowadzono według metody Bohema (Tabela 11).

Tabela 10. Parametry mechaniczne włókien węglowych

Parametr włókien węglowych	Wartość
Średnica włókna elementarnego [μm]	7,02 ± 0,28
Wytrzymałość na rozciąganie [MPa]	300
Moduł sprężystości [GPa]	230

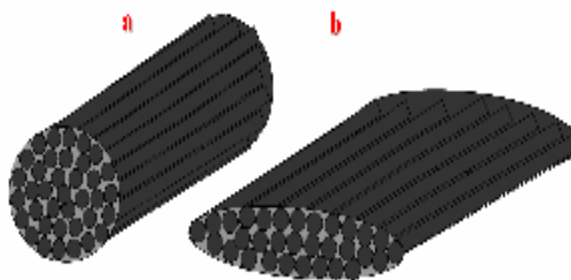
Tabela 11. Stężenie grup funkcyjnych na powierzchni włókien węglowych

Parametr włókien węglowych	Wartość
Stężenie kwasowych grup powierzchniowych [g jonów H ⁺ /g próbki]	6,78 x 10 ⁻⁵
Stężenie zasadowych grup powierzchniowych [g jonów OH ⁻ /g próbki]	4,41 x 10 ⁻⁴

2.2.2 Otrzymywanie kompozytów polimerowo - włóknistych

Charakterystyka materiałów wyjściowych: terpolimeru PTFE-PVDF-PP i włókien węglowych, pozwoliła na konstrukcję kompozytów: tkanina węglowa-polimer syntetyczny.

Materiał kompozytowy oznaczony jako **CP1**, stanowił płytkę, do której polimerowej osnowy wprowadzono jedną warstwę tkaniny węglowej o regularnym ułożeniu włókien (rowingu krzyżujące się

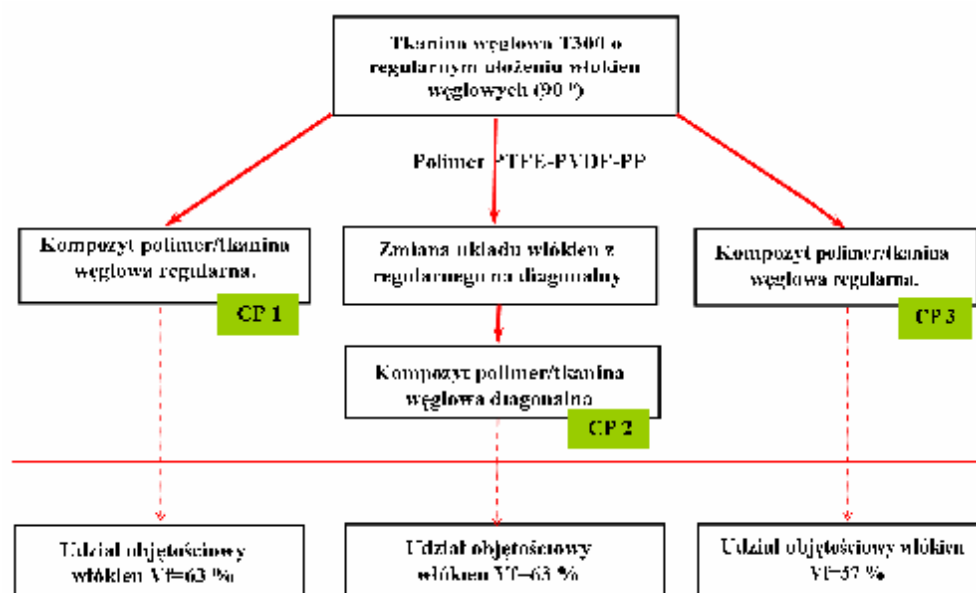


Rysunek 43. Przekroje rowingów w kompozycie CP1 (i CP3) oraz w kompozycie CP2 (po poddaniu tkaniny działaniu naprężeń stycznych)

pod kątem 90^0). Kompozyt **CP2** otrzymano wprowadzając do osnowy polimerowej tkaninę węglową, poddaną wcześniejszej modyfikacji geometrycznej. Zmiana ta polegała na spłaszczeniu poszczególnych rowingów w taki sposób jak przedstawiono na Rys 43. Kolejnym skutkiem modyfikacji była zmiana kąta pomiędzy krzyżującymi się rowingami, wiązki włókien w tym wypadku ułożone były pod kątem 60^0 (w materiale kompozytowym CP1 kąt pomiędzy wiązkami wynosił 90^0).

Trzeci rodzaj kompozytu z udziałem tkaniny 2D stanowił układ: tkanina o ‘regularnym’ ułożeniu włókien (jak w próbce, CP1), ale o zwiększonym udziale objętościowym osnowy polimerowej (3:1, polimer: włókna, względem próbek CP1 i CP2). Materiał ten nazywany został w dalszej części pracy, jako **CP3**.

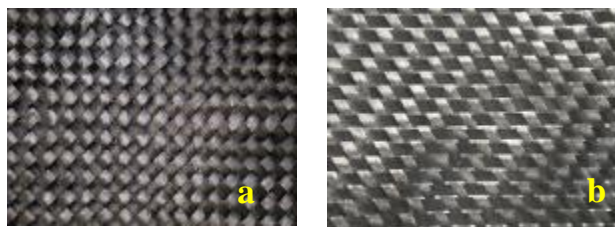
Każdy z rodzajów kompozytów przygotowywano identycznie. Tkaninę węglową pokrywano równomiernie roztworem polimeru syntetycznego i pozostawiano w celu swobodnego odparowania rozpuszczalnika przez 48h w temperaturze pokojowej. Schemat otrzymywania włóknistych kompozytów węglowych przedstawiony jest na Rys 44.



Rysunek 44. Schemat przygotowania kompozytów 2D tkanina węglowa polimer syntetyczny

W ten sposób otrzymano trzy rodzaje materiałów kompozytowych, różniących się topografią powierzchni: płytkę kompozytową **CP1**, w której bezpośrednio pod powierzchnią polimeru rozmieszczone były włókna węglowe (rowniugi krzyżujące się pod kątem 90^0 , Rys 45-a), następnie płytkę kompozytową **CP2**, w której wiązki włókien przecinały się pod kątem 60^0 (Rys 45-b). W tych dwóch płytkach zastosowano identyczny stosunek polimeru do fazy włóknistej. Trzecią płytkę kompozytową **CP3** wytworzono w ten sposób, że do otrzymania jej zastosowano inną ilość włókien (trzykrotnie mniejszą) w stosunku do ilości włókien, jakie

stosowano w dwóch poprzednich układach. Spowodowało to oddalenie fazy włóknistej od powierzchni kompozytu (w porównaniu z odległością od włókien obserwowaną w kompozytach CP1 i CP2).



Rysunek 45. Fotografia tk. regularnej – a (rovingi pod kątem 90^0), tk. skośnej - b (rovingi pod kątem 60^0)

Wszystkie trzy kompozyty różniły się między sobą topografią powierzchni (różny sposób ułożenia włókien w osnowie) oraz tym, że w zależności od próbki odległość włókna od powierzchni polimeru była zróżnicowana.

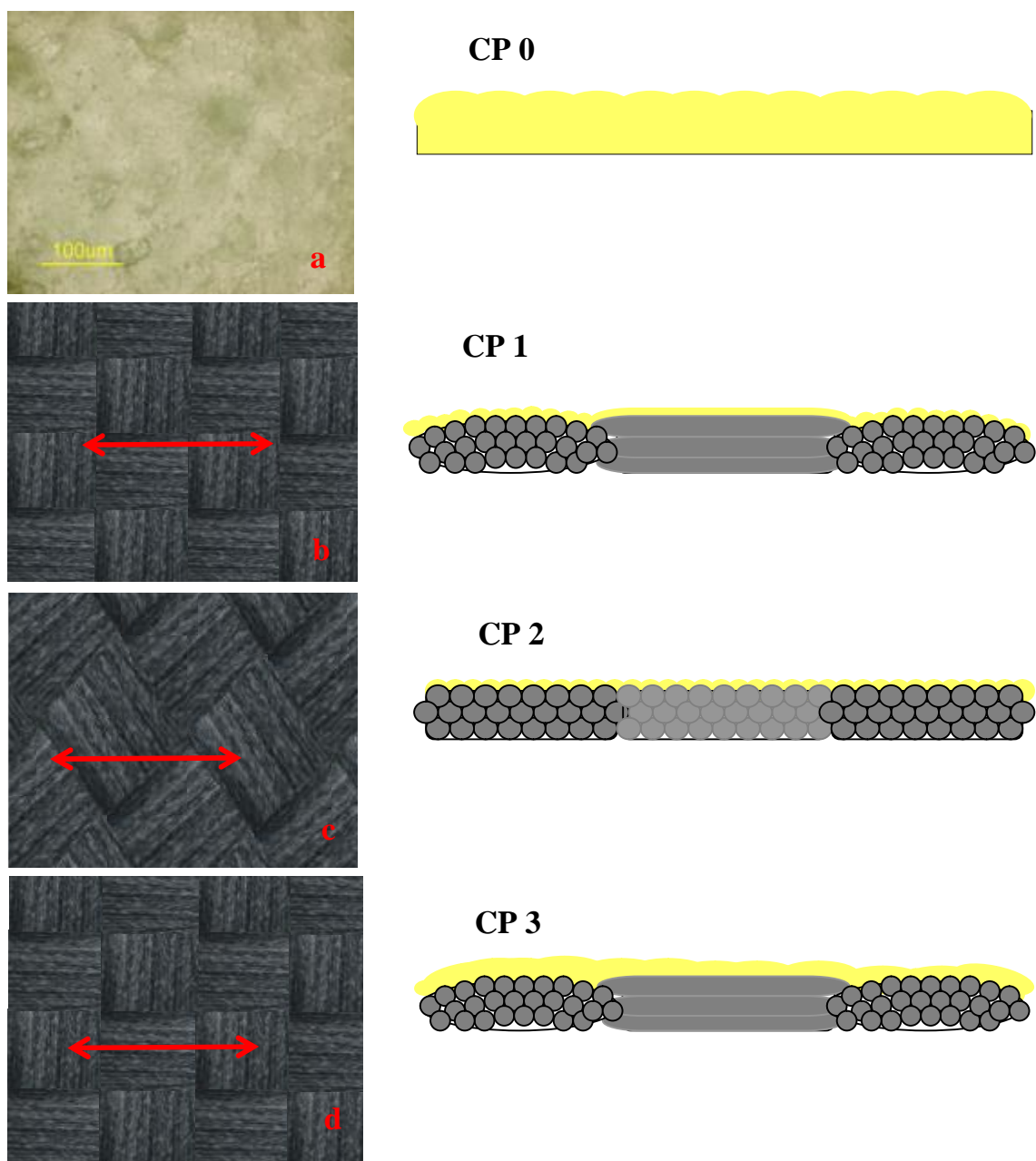
2.3 Badanie parametrów powierzchni

2.3.1 Badania mikrostruktury kompozytów

Mikrostrukturę powierzchni badanych materiałów kompozytowych obserwowano przy użyciu mikroskopu optycznego (Rys 46). Zawarta w osnowie polimerowej faza włóknista w postaci tkaniny węglowej (CP1, CP2, CP3) modyfikuje gładką i jednorodną powierzchnię folii polimerowej nadając jej fakturę tkaniny.

Mikrostruktura powierzchni kompozytów uzależniona jest od udziału objętościowego fazy włóknistej. Materiał oznaczony jako CP3, charakteryzuje się mikrostrukturą powierzchni o chropowatości, zbliżonej do folii polimerowej (Rys 46-a), ze względu na znaczne oddalenie powierzchni tkaniny od powierzchni materiału kompozytowego (ok. 60-65 μm). Największą niejednorodność powierzchni, wykazują kompozyty CP1 i CP2. Odległość włókna węglowego od powierzchni płytki kompozytowej nie jest taka sama w każdym miejscu, waha się w granicach 20-40 μm . Wielkości te oszacowano w oparciu o obserwacje mikroskopowe przekrojów materiałów kompozytowych.

Na Rys 46 przedstawiono zdjęcia makroskopowe (CP1, CP2, CP3) i mikrofotografię powierzchni terpolimeru (CP0) oraz modele ich przekrojów w miejscach zaznaczonych strzałką. Na schemacie przekroju kompozytu kolorem szarym oznaczono fazę włóknistą i jej rozmieszczenie w osnowie polimerowej. Kolorem żółtym oznaczono grubość warstwy polimeru naniesionego na tkaninę węglową (odległość fazy włóknistej od powierzchni rzeczywistej materiału kompozytowego).



Rysunek 46. Obrazy powierzchni i modele przekroju a - folii PTFE-PVDF-PP (powiększenie 200 razy). Fotografie kompozytów i modele przekrojów: b – tkanina węglowa o diagonalnym splocie / osnowa polimerowa PTFE-PVDF-PP (powiększenie 2 razy), c – tkanina węglowa o regularnym splocie / osnowa polimerowa PTFE-PVDF-PP, d – tkanina węglowa o regularnym splocie / osnowa polimerowa PTFE-PVDF-PP (o zmienionym stosunku objęściowym faz).

2.3.2 Badania topografii powierzchni

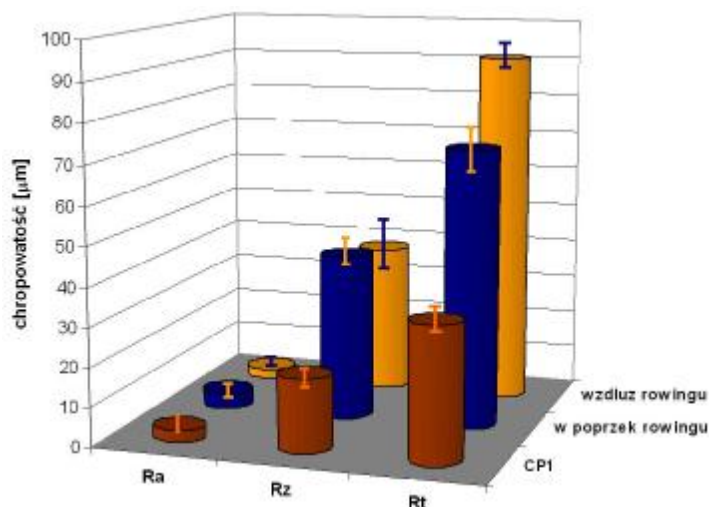
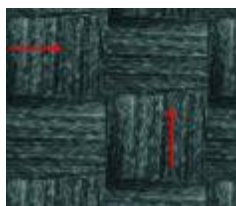
Charakterystykę topografii powierzchni materiałów kompozytowych, przeprowadzono na podstawie pomiarów chropowatości (profilogramy). Chropowatość powierzchni opisuje się przy pomocy trzech podstawowych parametrów: R_a określonego jako średni profil chropowatości, R_z opisujący rozmiar przestrzeni pomiędzy 10 punktami położonymi najbliżej

siebie. Wielkość R_t obrazująca odległość pomiędzy najniższym a najwyższym punktem na powierzchni.

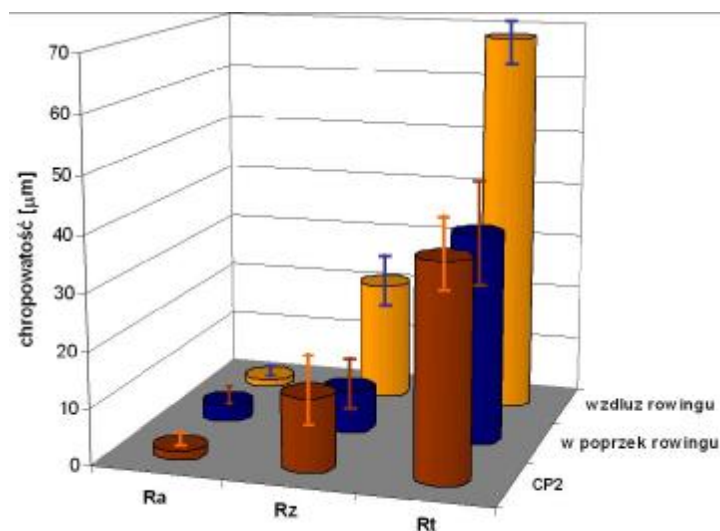
Pomiar w dwóch kierunkach: 'wzdłuż' i 'w poprzek' rowingu miał na celu wskazać potencjalne różnice w profilu chropowatości (szerokość, głębokość nierówności) pojedynczego rowingu węglowego w syntetycznej matrycy. Wyniki badań chropowatości materiałów kompozytowych wykazały różnice pomiędzy kompozytami z tkaniny węglowej różniącej się ułożeniem (skośny regularny) i kształtem rowingów (str. 89, Rys 43) w tkaninie. Kształt i rozmieszczenie rowingów wpływa na średni poziom chropowatości: najwyższą wartość R_a charakteryzuje się kompozyt **CP1** (R_a ok. 3 μm) o regularnym ułożeniu rowingów w tkaninie i ok. 63% objętościowych udziale objętościowym włókien. Kompozyt wzmacniany tkaniną o skośnym ułożeniu włókien **CP2** wykazuje niższą wartość średniego poziomu chropowatości R_a , mierzonej zarówno wzdłuż jak i w poprzek rowingu.

W oparciu o konstrukcję kompozytu (geometria ułożenia włókien, Rys 46, str 92) oraz wyniki pomiarów profilometrii, można stwierdzić, że topografia kompozytów wytworzonych na bazie tkaniny 2D, to zespół rowków biegnących pomiędzy włóknami węglowymi. Dane uzyskane z pomiarów chropowatości powierzchni dla kompozytu CP1 (Rys 47) ukazują, że średnia szerokość rowków (wartość R_z) wynosi ok. 40 μm natomiast głębokość zawiera się w granicach 30-100 μm (wartość R_t). Dla topografii kompozytu CP1 i CP2, modelowanej przez wprowadzona w osnowę polimerową tkaniny, istotnym jest element przeplatających się wiązek włókien węglowych. Przesunięcia rowingów w kierunku płaszczyzny prostopadłej do powierzchni kompozytu powodują, że warstwa pokrywająca włókna węglowe będzie mieć różną grubość. Na styku dwóch krzyżujących się rowingów warstwa polimeru będzie grubsza niż ta, która pokrywać będzie pozostałe miejsca tkaniny.

Topografia kompozytu CP2 różni się zarówno geometrią jak i rozmiarem rowków tworzonych przez włókna węglowe ułożone w rowingu i wprowadzone do osnowy polimerowej (Rys 43). Rowingu krzyżują się pod innym kątem niż w materiale CP1, stąd odmienna jest geometria rowków przyjmujących kształty płytsze i węższe. Fakt, że postać rowingów węglowych zmieniono przed wprowadzeniem tkaniny do osnowy polimerowej sprawił, że w efekcie otrzymano materiał o mniejszej chropowatości i prawdopodobnie o mniejszym zróżnicowaniu, jeśli chodzi o grubość warstwy polimeru pokrywającej tkaninę 2D (Rys 48).

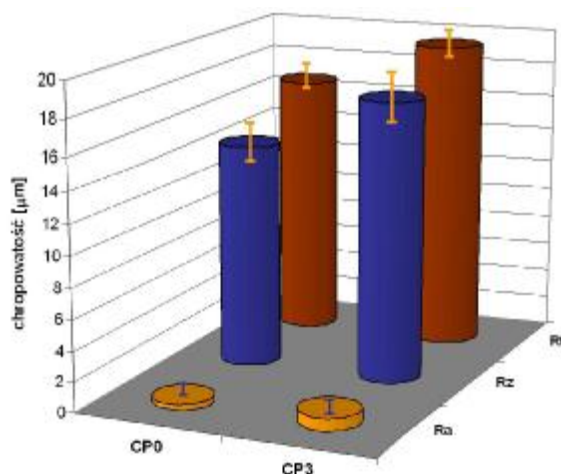


Rysunek 47. Średni poziom chropowatości kompozytu CP1 w zależności od miejsca pomiaru, wzdłuż włókien (1) lub w poprzek wiązki włókien (2).



Rysunek 48. Średni poziom chropowatości kompozytu CP2 w zależności od miejsca pomiaru, wzdłuż włókien (1) lub w poprzek wiązki włókien (2)

Folia polimerowa PTFE-PVDF-PP charakteryzuje się gładką powierzchnią o niskich wartościach średniej chropowatości (R_a ok. $0,4 \mu\text{m}$), podobny do poziomu chropowatości uzyskanego w materiale kompozytowym oznaczonym jako CP3. Pomimo wprowadzonej tam fazy włóknistej (tkanina 2D), odległość włókien od powierzchni jest wystarczająca by zniwelować wpływ włókien na topografię. Efekt gładkiej powierzchni uzyskano przez zmianę proporcji pomiędzy udziałem objętościowym faz i zwiększenie ilości polimeru (osnowy) w kompozycie CP3 (Rys 49).

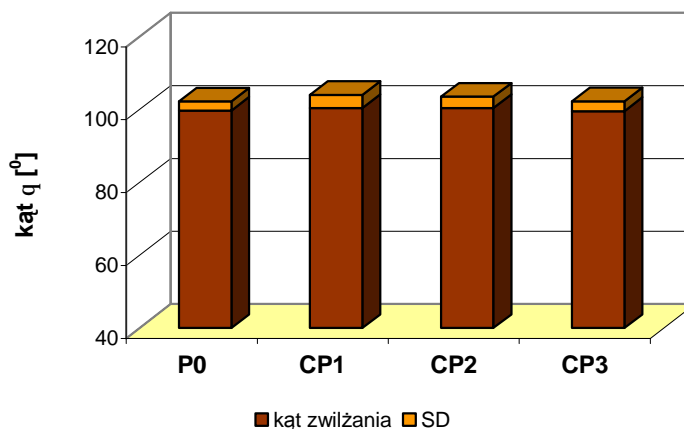


Rysunek 49. Parametry chropowatości powierzchni tworzyw P0 i CP3

2.3.3 Zwilżalność, energia powierzchniowa

Analizę fizykochemicznych właściwości powierzchni materiałów kompozytowych rozpoczęto od zdefiniowania jej zwilżalności. Wielkość kąta zwilżania jest jednym z istotnych parametrów powierzchniowych wpływających na odpowiedź komórkową. Cieczą zastosowaną do badań zwilżania była woda. Folia polimerowa PTFE-PVDF-PP, charakteryzuje się wysokim kątem zwilżania (ok. 100°), czyli powierzchnią silnie hydrofobową.

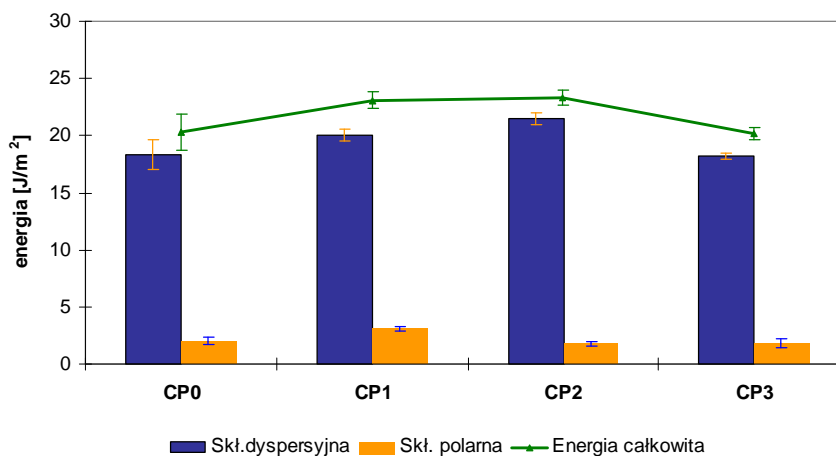
Wprowadzenie do osnowy polimerowej tkaniny węglowej nie powoduje zmian w wartości kąta zwilżania. Jeśli fazę włóknistą wprowadzi się w postaci tkaniny 2D to niezależnie od: ilości włókien (udziału objętościowego włókien: ok. 63% czy 37%), sposobu ich rozmieszczenia (równoległy - **CP1**, diagonalny - **CP2**) czy odległości włókno – powierzchnia kompozytu, wartości kąta zwilżania również nie ulegają zmianie (ok. 100°). Zestawienie wyników badania kąta zwilżania, wartości średnie oraz przedziały ufności dla poziomu istotności $\alpha=0,05$ przedstawia Rys 50.



Rysunek 50. Zmiany kąta zwilżania dla badanych próbek kompozytowych

Wiadomo, że im niższy kąt zwilżania materiałów, tym wyższa energia powierzchniowa. Ułożenie włókien w tkaninie węglowej 2D, nie ma wpływu na zwilżalność powierzchni, nie zmienia się również całkowita energia powierzchniowa materiałów kompozytowych.

Analiza energii powierzchniowej i jej składowych energetycznych: polarnej i dyspersyjnej stwierdza niewielkie różnice. Nieznacznie wyższą składową dyspersyjną charakteryzują się materiały CP1 i CP2, natomiast nieco niższą materiały kompozytowe CP3 i CP0. Zestawienie wyników dotyczących składowych energetycznych przedstawia Rys 51.

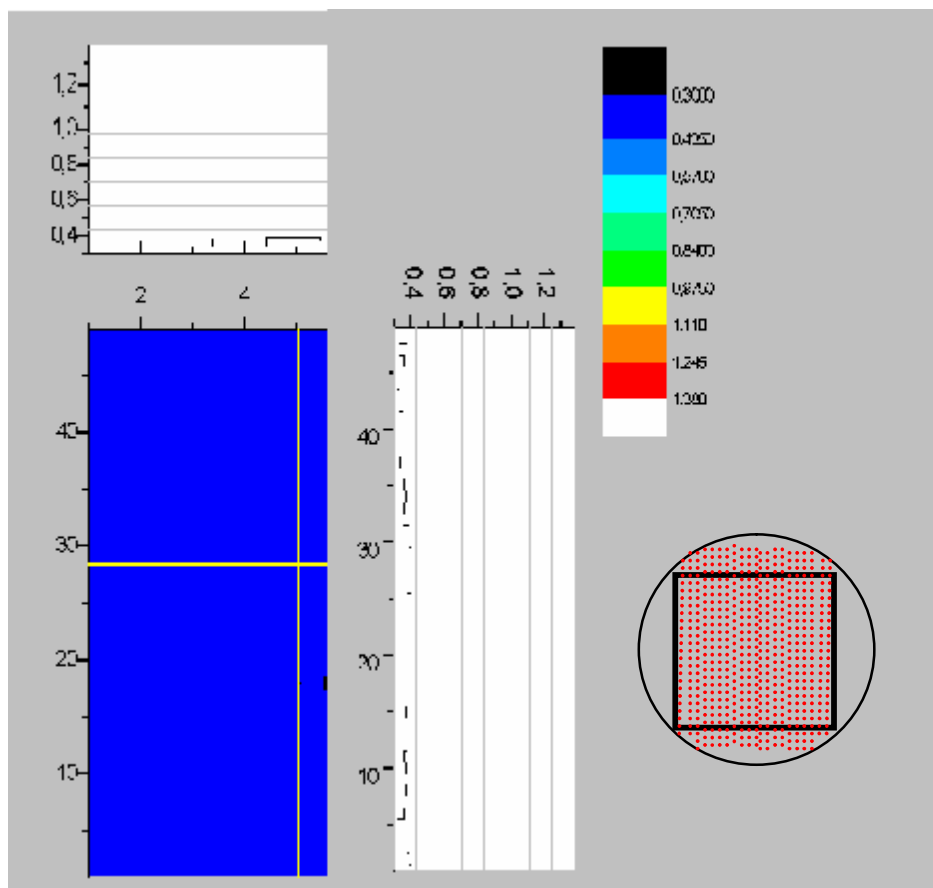


Rysunek 51. Zestawienie wartości składowych energetycznych: dyspersyjnej i polarnej dla badanych materiałów kompozytowych

2.3.4 Badania elastyczności powierzchni

Jak wynika z danych literaturowych parametrem, który powinien być uwzględniany w badaniach odpowiedzi komórkowej na tworzywa syntetyczne jest sztywność powierzchni materiału (ang. *stiffness*). W pracy ze względu na zastosowaną metodę pomiarową parametr ten nazwano twardością powierzchni i charakteryzować odporność na deformacje powierzchni pojawiającą się jako efekt działania siły. Uważa się, że w zależności od rodzaju komórek (komórki kostne, komórki naczyń krwionośnych) wykazują one uprzywilejowaną adhezję do powierzchni o twardości (sztywności) zbliżonej do tkanek, z jakich pochodzą.

Jak wynika z analizy właściwości powierzchni materiałów stanowiących przedmiot badań pracy, są one materiałami nie tylko o zróżnicowanej topografii ale również o zróżnicowanej twardości powierzchni. Wprowadzone do matrycy polimerowej włókna węglowe powodują, że sztywność powierzchni materiału ulega zmianie i zależy od odległości pomiędzy włóknom a powierzchnią kompozytu (grubością warstwy polimeru pokrywającego włókna węglowe). Badania przeprowadzono zgodnie z metodą opisaną w *Rozdziale: Metody badań* (str. 68). Wyniki badań twardości otrzymano z pomiaru odkształcenia powierzchni (odporności na deformacje) pod wpływem przyłożonej stałej siły ($F=0,5N$).

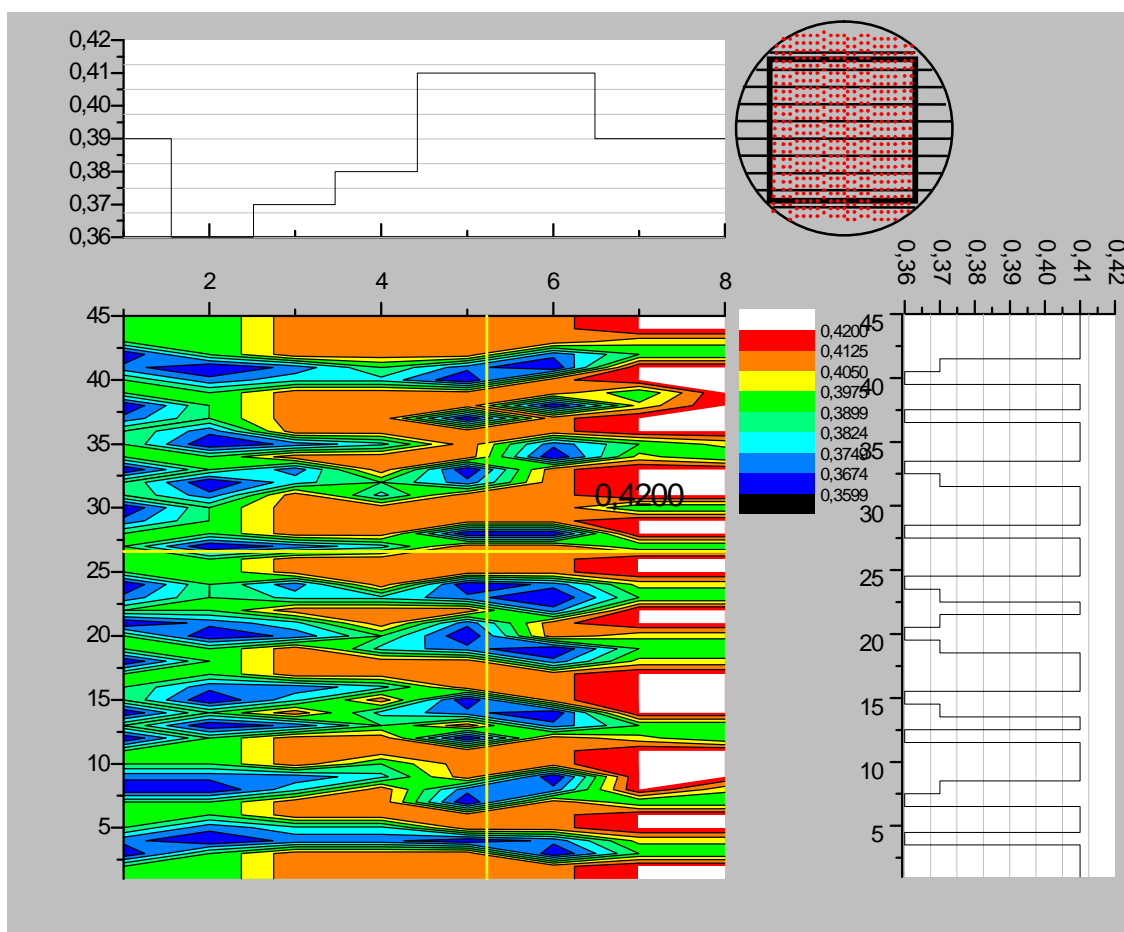


Rysunek 52. Mapa odkształcalności próbki referencyjnej. Polimer PTFE-PVDF-PP

Przedmiotem badań była czysta płytka polimerowa (CP0) i próbka modelowa (Rys 52). Ze względu na fakt, iż pozostałe materiały kompozytowe charakteryzowały się zróżnicowaną twardością, (bo różną odległością fazy włóknistej od powierzchni kompozytu) trudną do jednoznacznego opisu, postanowiono wykonać badania na materiałach modelowych. Celem badań przeprowadzonych na modelach było wykazanie jak zmienia się twardość materiału w zależności od grubości warstwy polimeru na włóknie, innymi słowy jak zmienia się twardość polimeru wraz z odległością od powierzchni włókna. Próbkę modelową do badań twardości powierzchni wykonano w ten sposób, że wiązki włókien (ok. 20 włókien elementarnych) oddalono od siebie na odległość 3 mm a następnie zalano polimerem, PTFE-PVDF-PP.

Badania prowadzono pokrywając siatką punktów pomiarowych materiał modelowy. Czujnik odkształcenia przykładano kolejno do obszarów, w których wstępowała wiązka włókien pokryta cienką warstwą polimeru oraz do miejsc w różny sposób oddalonych od włókien.

Wyniki badań przeprowadzonych na układzie modelowym oraz dla porównania na całej płytce polimerowej opracowano statystycznie (ANOVA) i przedstawiono w postaci map odkształcalności (Rys 52, Rys 53).



Rysunek 53. Mapa odkształcalności powierzchni modelu kompozytowego polimer-włókno węglowe (CP3).

Jak wynika z otrzymanych map odkształcalności powierzchni dla układu próbki modelowej twardość materiału zawiera się w przedziale $0,35 - 0,42 \mu\text{m}$ (Rys 53).

Najmniejsze wartości odporności na deformację otrzymano przykładając czujnik do obszarów z obecnym włóknem węglowym ($0,35 \mu\text{m}$), natomiast pomiędzy poszczególnymi wiązkami odporność ta zmieniała się w zakresie od $0,35$ do $0,42 \mu\text{m}$. Wartość odkształcenia wynosząca ok. $0,42 \mu\text{m}$ odpowiada odporności na deformację czystej płytki polimerowej (Rys 52).

Wyniki doświadczeń dotyczących badania odporności na deformację powierzchni w połączeniu z graficznymi modelami materiałów będących przedmiotem badań (CP1, CP2, CP3 i CP0) wykazują, że materiały te różnią się nie tylko topografią powierzchni, ale również twardością. Powierzchnie folii polimerowej wykazuje najmniejsza odporność na deformację, otrzymane wyniki wskazują, że dotyczy to całej powierzchni terpolimeru (Rys 52). Podobnie zachowuje się materiał kompozytowy CP3, jego powierzchnia charakteryzuje się także jednakową twardością, inną niż twardość zmierzona dla polimeru CP0. Twardość tę oszacowano i wynosi ona w przypadku próbki CP3 od $0,38-0,39 \mu\text{m}$ (odporność na deformację pod wpływem działania siły $0,5\text{N}$).

Z analizy modeli graficznych próbek CP1 i CP2 wynika, że próbkę CP2 cechuje niższą chropowatość w porównaniu z próbką CP1. Materiał CP2 ma przy tym wyższą i mniej zróżnicowaną twardość powierzchni w przeciwieństwie do próbki CP1.

Zastosowana metoda eksperymentalna pozwoliła na wyznaczenie zakresów deformacji powierzchni (odkształcalności) dla obszarów, w których włókna oddalone są w różny sposób od powierzchni kompozytu.

2.3.5 Podsumowanie

Badania powierzchni polimeru i wytworzonych układów kompozytowych wskazują, że za pomocą dwuwymiarowej tkaniny węglowej (2D) można modyfikować powierzchnię elastycznego polimeru PTFE-PVDF-PP nadając jej topografię odwzorowującą geometrię fazy włóknistej. Im większy jest udział polimeru tym mniejsze znaczenie dla chropowatości powierzchni ma obecna w kompozycji faza włóknista (kompozyt CP3 zbliżony parametrami chropowatości do folii CP0).

Wytworzone kompozyty nie różnią się wartością energii powierzchniowej ani wartościami składowych energetycznych. Wprowadzenie fazy włóknistej nie powoduje zmian chemicznych na powierzchni płytek kompozytowych.

Odległość włókna węglowego od powierzchni polimeru wpływa na twardość materiałów kompozytowych. Na tej podstawie sugerować można, że sterując sposobem wprowadzenia włókien w matrycę polimerową regulować można elastyczność powierzchni kompozytu.

2.4 Badania biologiczne materiałów kompozytowych

Materiały, które scharakteryzowano w podrozdziale poprzednim poddano badaniom biologicznym w warunkach *in vitro*. Rozpoczęto je od badań cytotoksyczności otrzymanych materiałów. Badania odpowiedzi komórkowej na powierzchnie wytworzonych kompozytów prowadzono przy zastosowaniu ludzkiej linii komórek kostnych MG-63. Metodykę zastosowaną w doświadczeniach przedstawiono w rozdziale: *Metody badań* (str. 74).

2.4.1 Badania biogodności materiałów kompozytowych

Ze względu na fakt, iż wytworzone materiały kompozytowe (CP1, CP2, CP3) poddane badaniom w tej części opracowania były układem dwóch tych samych faz (włókno węglowe w postaci tkaniny i terpolimer PTFE-PVDF-PP), badanie cytotoksyczności przeprowadzono na jednym z materiałów, CP1. Badanie z udziałem komórek linii A549 przeprowadzono metodą kontaktu bezpośredniego z jednowarstwową hodowlą komórek nabłonkopodobnych ludzkiego raka płuc w czasie 24 i 72 godzin. Wyniki badań działania cytotoksycznego wykonane dla materiału kompozytowego CP1 i dla folii polimerowej CP0 z zawiera Tabela 12.

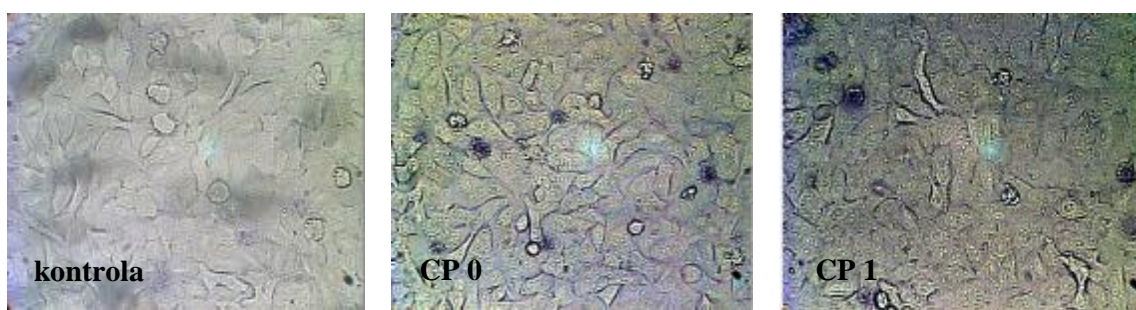
Zmiany ilościowe i morfologiczne komórek (powstałe pod wpływem badanych materiałów kompozytowych) kontaktowanych z powierzchnią materiału syntetycznego badano w odwróconym mikroskopie kontrastowo-fazowym. W celu określenia ilości martwych komórek zastosowano barwienie błękitem trepanu (TP/PBS).

Tabela 12. Wyniki badań cytotoksyczności dla wybranych układów kompozytowych po 24 h i 72 h kontakcie materiałów z komórkami.

MATERIAŁ	24h			72h		
	% komórek martwych	% komórek żywych	Całkowita liczba kom	% komórek martwych	% komórek żywych	Całkowita liczba kom
CP 0	1	99	5,1x10 ⁶	3	97	5,4x10 ⁶
CP 1	0	100	6,5 x10 ⁶	5	95	5,8 x10 ⁶
Kontrola hodowli	0	100	7,2 x10 ⁶	0	100	7,5 x10 ⁶

Nie zanotowano zmian morfologicznych komórek (po 24 h kontakcie) na powierzchni materiałów badanych ani na powierzchni próby kontrolnej. Odsetek komórek martwych na badanych materiałach wynosił max. 1% (CP0), na pozostałych materiałach nie stwierdzono komórek martwych a komórki żywe charakteryzowały się prawidłowym kształtem i zachowaniem (stany podziałowe komórek) (Rys 54). Po 72 godzinach inkubacji na

powierzchni materiału syntetycznego odnotowano max 5% martwych komórek (**CP1**) jakkolwiek miały one prawidłowy kształt i ściśle przylegały do podłoża. Nie stwierdzono aglutynacji, wolkuolizacji ani tym bardziej lizy błon komórkowych na powierzchni żadnego z badanych materiałów. Komórki żywe charakteryzowały się prawidłową morfologią: miały wrzecionowaty, wydłużony kształt oraz jednorodną cytoplazmę. Ponadto równomiernie przylegały do podłoża tworząc jednolitą, konfluentną warstwę.



Rysunek 54. Hodowla komórek nabłonkopodobnych kontaktowanych z próbkami P0-CP13 (opis w tabeli 1). Wynik po 72 godzinach inkubacji

Z badań cytotoksyczności materiałów kompozytowych wynika, że otrzymane układy kompozytowe są materiałami niecytotoksycznymi.

2.4.2 Badanie proliferacji komórek kostnych MG-63

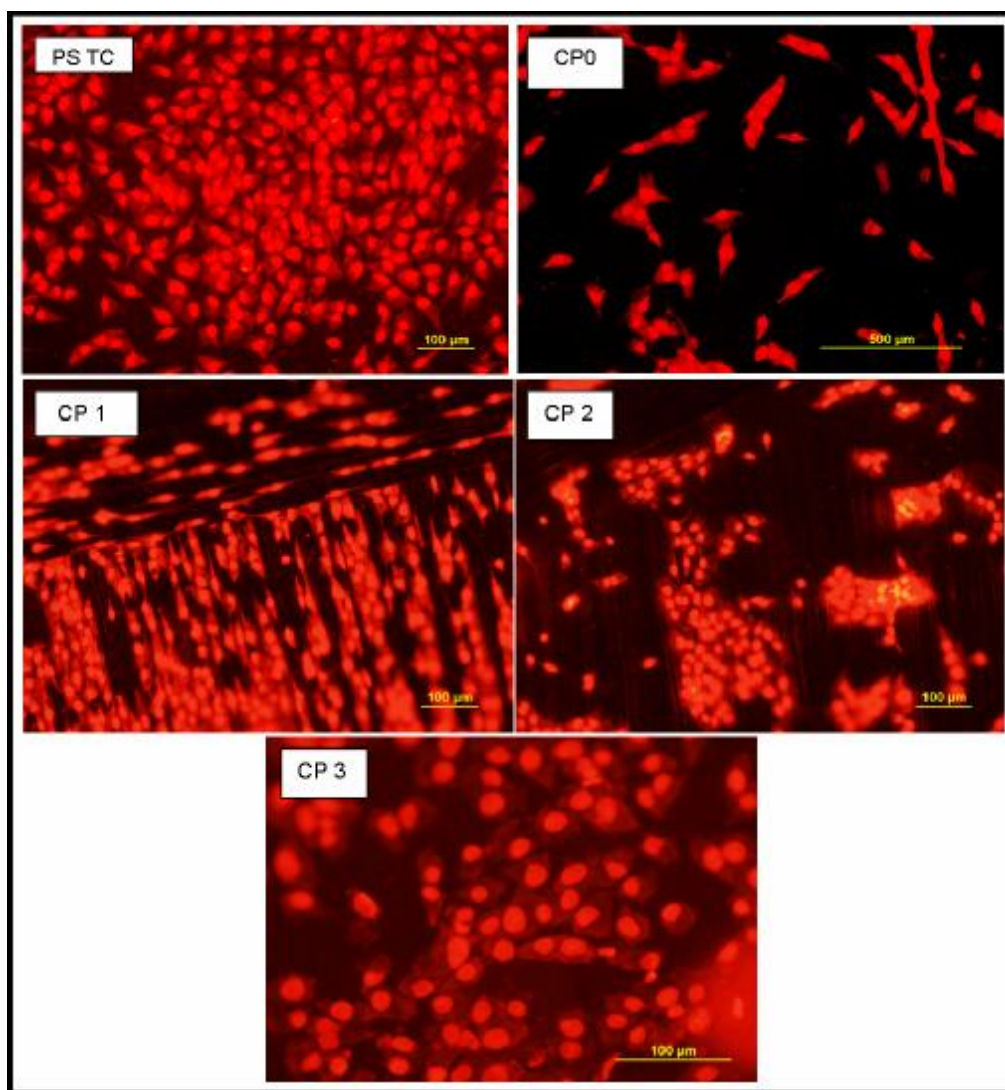
W tym etapie badań *in vitro* określono szybkość proliferacji komórek na powierzchniach kompozytów po jednym, trzech i siedmiu dniach inkubacji materiału z komórkami linii osteoblastów MG-63, zawieszonymi w medium hodowlanym. Po każdej zakończonej części eksperymentu (czyli po 1, 3 i po 7 dniu inkubacji) komórki zliczano, celem ustalenia stopnia namnożenia (prolifracji) i wykreślenia krzywej wzrostu populacji komórek MG-63.

Druga część eksperymentu opierała się na obserwacji morfologii komórek kostnych na powierzchniach badanych tworzyw syntetycznych. W tym celu zaadherowane na powierzchni materiału osteoblasty, utrwalano do dalszej obserwacji w mikroskopie fluorescencyjnym: w celu oceny kształtu, wielkości i rozmieszczenia komórek na powierzchniach badanych materiałów. Próbkę odniesienia dla hodowli osteoblastów stanowiła standardowa powierzchnia polistyrenu (TC PS). Na Rys 55 zestawiono obrazy komórek kostnych po 1 dniu hodowli w warunkach *in vitro* obserwowana na każdej z badanych powierzchni materiałów (CP0-CP3, i na materiałach kontrolnych: TC PS).

Hydrofobowa powierzchnia polimeru PTFE-PVDF-PP (CP0) powoduje, że osiadanie, rozplaszczanie a następnie proliferacja osteoblastów jest utrudniona. Komórki kostne kontaktowane z powierzchnią CP0 charakteryzują się wydłużonym wrzecionowatym

kształtem, często tworząc aglomeraty. Takie zachowanie sugeruje skłonność osteoblastów do obumierania (apoptozy).

Adhezja komórek z linii MG-63 do powierzchni materiałów kompozytowych: CP1, CP2 i CP3 jest dużo lepsza niż w przypadku folii polimerowej CP0. Na zdjęciach mikroskopowych (Rys 55) widoczne są komórki rozplaszczzone (ang. *spreading*) na powierzchni polimeru, co świadczy o dobrej tolerancji materiału przez komórkę (komórki cechują się dobrym rozplaszczaniem, co jest elementem koniecznym dla zwiększenia aktywności metabolicznej i przygotowania jej do kolejnych cykli podziałowych).

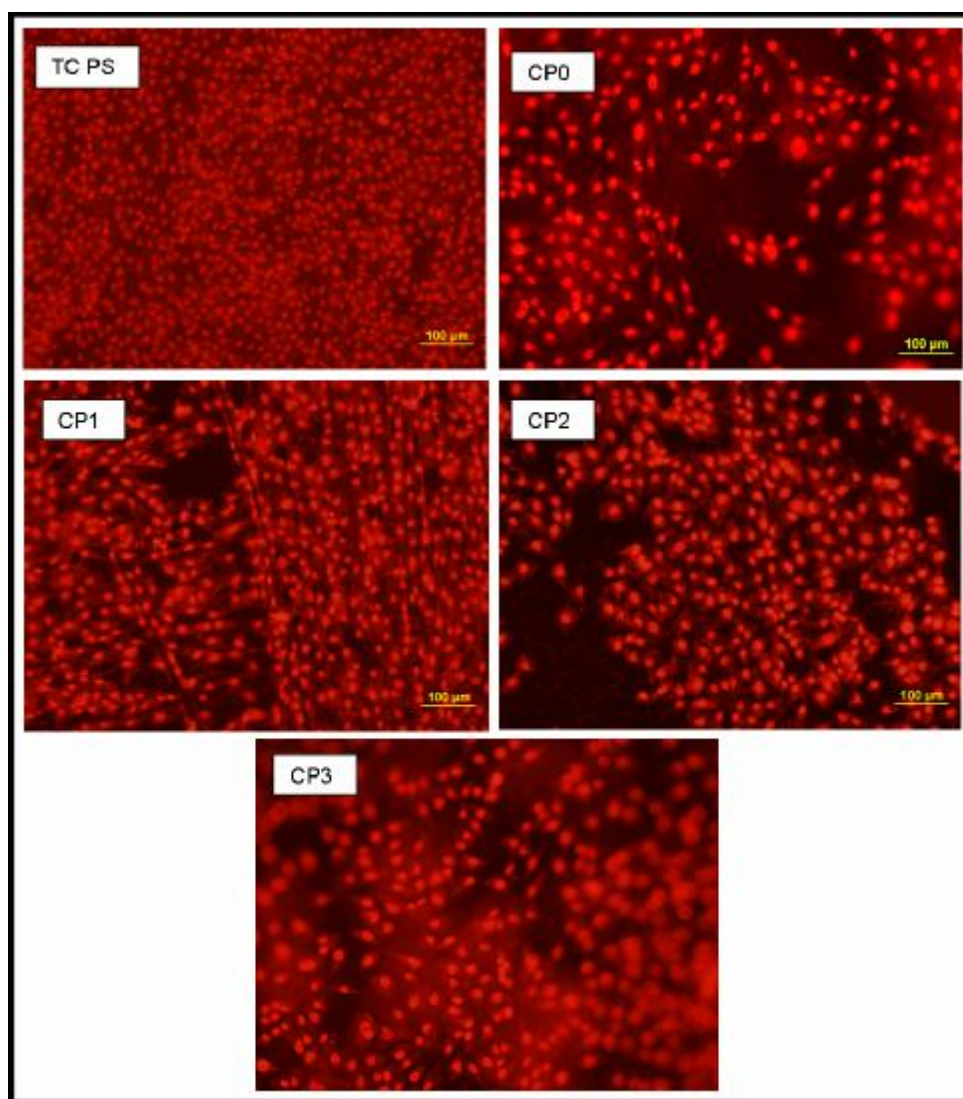


Rysunek 55. Morfologia MG-63 po pierwszym dniu hodowli w warunkach *in vitro*

Obserwacja morfologii komórek na powierzchni kompozytu CP3 wskazuje, że komórki zasiedlają ją w sposób równomierny, przyjmując postać rozplaszczoną, co świadczy o dobrym przyleganiu komórki do powierzchni (wysokiej adhezji). Komórki kostne znacznie słabiej

proliferują na powierzchniach kompozytów CP1 i CP2 w porównaniu do procesu proliferacji obserwowanym na powierzchniach: CP3 czy na kontroli, TC PS. Obserwacje mikroskopowe pozwalają jednak zauważyć, pewną regularność w sposobie układania się osteoblastów na powierzchniach badanych. Komórki osiadają wzdłuż włókien węglowych (CP1) a tendencja taka utrzymuje się przez wszystkie dni trwania eksperymentu. W żadnym z pozostałych typów badanych materiałów kompozytowych nie zaobserwowano kierunkowego osiadania komórek kostnych na powierzchni kompozytu.

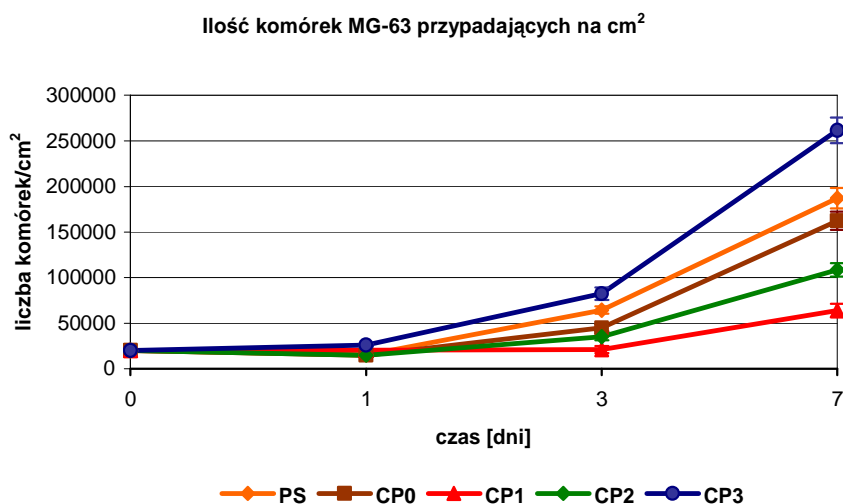
Po trzecim dniu hodowli komórki na powierzchniach wszystkich materiałów kompozytowych tworzą charakterystyczną warstwę (ang. *monolayer*). Powstanie warstwy świadczy na ogół o dobrej tolerancji materiału przez komórki, wysokiej proliferacji i dużej aktywności metabolicznej komórek. Na Rys 56 przedstawiono mikrofotografie powierzchni kompozytów i dwóch powierzchni odniesienia: TC PS po trzech dniach hodowli w warunkach *in vitro*.



Rysunek 56. Morfologia komórek MG-63 po 3 dniach hodowli *in vitro*

Proliferację komórek MG-63 w kolejnych dniach hodowli określono szacując ich liczbę przypadającą na cm kwadratowy powierzchni. Na Rys 57 zestawiono krzywe wzrostu komórek po 1, 3 i 7 dniach hodowli na wszystkich badanych powierzchniach.

Najniższa proliferacja komórek ma miejsce na płytkach kompozytowych CP1 i CP2. Krzywa wzrostu komórek wskazuje, że o ile w pierwszym dniu hodowli osteoblasty zasiedlają powierzchnię próbek kompozytowych i próbki kontrolnej (TC PS) w sposób bardzo zbliżony o tyle w kolejnych dniach hodowli (3 i 7) uwypuklają się różnice przemawiające za korzystniejszym oddziaływaniem powierzchni kompozytu CP3 na komórki osteoblastów. Przyrost populacji komórek jest tu największy, wyższy niż na próbie kontrolnej.

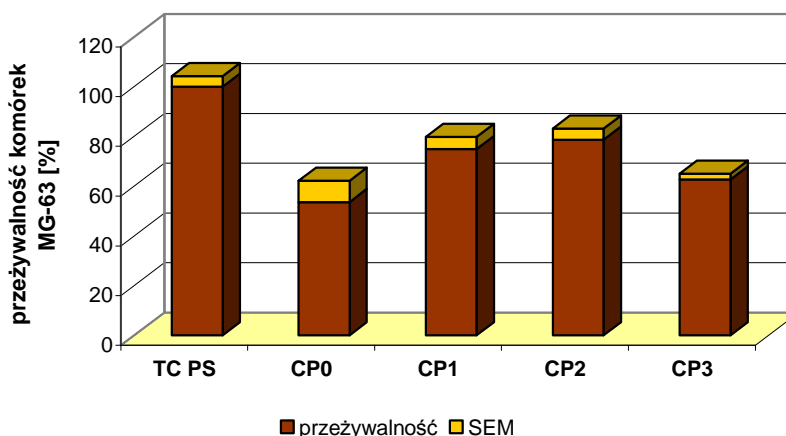


Rysunek 57. Krzywa przeżywalności komórek linii MG 63 na badanych powierzchniach materiałowych

2.4.3 Aktywność metaboliczna komórek MG 63

Oprócz badań dotyczących proliferacji komórek MG-63 na powierzchniach materiałów kompozytowych, przeprowadzono test XTT. Zastosowana metoda pozwala na określenie przeżywalności komórek (ang *viability*) w kontakcie z syntetyczną powierzchnią. W tym wypadku przedmiotem badań jest aktywność metaboliczna mierzona za pomocą stężenia enzymów jądra komórkowego, w którym następuje intensyfikacja procesów przygotowawczych (tzw. poprzedzających podział komórkowy).

Modyfikacja materiału fazą włóknistą wpływa na poprawienie aktywności metabolicznej komórek kontaktowanych z materiałem kompozytowym (Rys 58). Na każdej z powierzchni obserwuje się skłonność osteoblastów do wzmożonej stymulacji enzymów poprzedzających proces proliferacji (enzymy jądra komórkowego). W przypadku materiału kompozytowego oznaczonego symbolem CP1 (tkanina węglowa o 63% udziale fazy włóknistej) aktywność osteoblastów jest zbliżona do aktywności komórek na TC PS.



Rysunek 58. Aktywność enzymatyczna komórek MG 63 na powierzchniach kompozytów (po 7 dniach)

Pomiar aktywności metabolicznej określany często mianem testu przeżywalności świadczy o zdolności komórki do utrzymania swoich podstawowych procesów metabolicznych (biochemiczne procesy syntezy i rozkładu).

2.4.4 Podsumowanie

Badania biologiczne dowiodły, że materiały kompozytowe są układami o wysokiej biogodności. Komórki kostne kontaktowane z powierzchniami płytek kompozytowych: CP1, CP2, CP3 wykazują wysoką przeżywalność (test XTT), wyższą niż przeżywalność komórek na powierzchni folii PTFE-PVDF-PP.

Obecność włókien węglowych wprowadzonych do polimerowej matrycy wpływa na odpowiedź komórek kostnych warunkach *in vitro*. Włókna węglowe mogą nadawać powierzchni kompozytu określoną topografię, która wpływać będzie na kierunkową adhezję osteoblastów. Zarówno proliferacja komórek kostnych jak i ich aktywność enzymatyczna jest znacznie wyższa w kontakcie z kompozytem niż w przypadku czystego polimeru.

Obserwacje mikroskopowe morfologii i rozmieszczenie komórek na powierzchniach materiałów dowodzą, że osteoblasty mogą osiadać w sposób kierunkowy: wzdłuż linii włókien. Zachowanie komórek kostnych w kontakcie z powierzchnią badaną zależy od topografii powierzchni, od wielkości charakteryzujących wielkość i szerokość nierówności (rowki, dołki). Jednakże wyniki badań wskazują, że topografia powierzchni nie jest jedynym parametrem, który wpływa na adhezję i proliferację komórek kostnych do powierzchni. Najwyższą proliferację i najlepszą adhezję zaobserwowano na próbce CP3, której topografia jest zbliżona do próbki CP0, która z kolei odznacza się najgorszą adhezją i proliferacją.

Wyniki te wskazują, że adhezja osteoblastów do powierzchni syntetycznego tworzywa zależy od wielu czynników charakteryzujących syntetyczny materiał. Powierzchnie CP3 i CP0 posiadają zbliżoną topografię różnią się natomiast twardością powierzchni i

zapewne wieloma innymi właściwościami, o których decyduje obecność włókna w matrycy polimerowej. W oparciu o uzyskane wyniki badań można przypuszczać, że twardość powierzchni jest czynnikiem, który obok topografii, kąta zwilżania, energii powierzchniowej może mieć decydujący wpływ na zachowanie się komórek na powierzchniach materiałów syntetycznych.

3. Kompozyty hybrydowe

3.1 Wprowadzenie

Wyniki przedstawione w poprzedniej części opracowania, dotyczącej badania odpowiedzi komórkowej na powierzchnie układów kompozytowych zawierających włókna węglowe, sprawiły, że pracę postanowiono rozszerzyć o analizę kolejnej grupy materiałów kompozytowych. Fazą modyfikującą była w tym wypadku również faza włóknista jednakże mająca postać włókien krótkich.

Kompozytowe materiały włókniste wytworzono celem odpowiedzi na pytanie; czy i jak wpływa faza włóknista wprowadzona pod powierzchnię polimeru nie w postaci włókien ciągłych (tkanina 2D stosowana w *Rozdziale 2*) lecz w postaci włókien krótkich, równomiernie rozproszonych pod powierzchnią polimeru, na odpowiedź komórkową. Drugim pytaniem było określenie czy istotnym, z punktu widzenia odpowiedzi komórkowej, jest kształt i rodzaj fazy włóknistej. W tym celu obok włókien węglowych zastosowano włókna wykonane z biopolimeru: alginianu sodu.

Wytworzone na bazie włókien węglowych i włókien alginowych płytki kompozytowe poddano badaniom charakteryzującym właściwości fizykochemiczne powierzchni kompozytu takie jak: mikrostruktura powierzchni, jej topografia, zwilżalność, energia powierzchniowa. Materiały kompozytowe poddano badaniom mechanicznym określającym podstawowe parametry mechaniczne takie jak: wytrzymałość na zerwanie, odkształcenie, moduł sprężystości. Kompozyty poddano badaniom określającym aktywność komórek na powierzchniach syntetycznych, stopień ich proliferacji, adhezję do powierzchni. Badania wykonano na dwóch liniach komórkowych osteoblastów (MG-63, hFOB 1.19) i jednej fibroblastów (HS-5).

3.2 Wytworzenie kompozytów hybrydowych

Hybrydowe (zawierające włókna o różnych parametrach geometrycznych) tworzywa kompozytowe otrzymano przez połączenie biostabilnego polimeru, PTFE-PVDF-PP stanowiącego ośnoję kompozytu, z fazą włóknistą. W pierwszym przypadku jako fazy modyfikującej użyto krótkich włókien z polimeru naturalnego - alginianu sodu, w drugim modyfikatorem powierzchni terpolimeru były krótkie włókna węglowe.

3.2.1 Alginian sodu

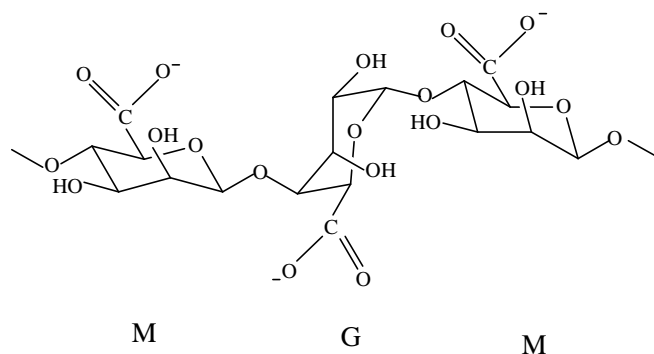
Do wytworzenia próbek będących przedmiotem badań, oprócz włókien węglowych w badaniach wykorzystano również włókna z alginianu sodu (NaAlg). Włókna NaAlg wytworzono w Katedrze Włókien Sztucznych, Wydziału Inżynierii i Marketingu Tekstyliów Politechniki Łódzkiej. Do procesu otrzymywania włóknistych materiałów alginowych, prekursorem alginowym był proszek biopolimerowy PROTANAL 60/20 (NovaMatrix FCM BioPolimer, Norwegia).

Parametry fizyko-chemiczne soli sodowej kwasu alginowego przedstawia Tabela 13.

Tabela 13. Właściwości alginianu sodu (NaAlg)

Nazwa handlowa	Alginian sodu
Lepkość η [cP]	100-150
Gęstość [g/cm ³]	120
pH (dla 1% r-ru, 20 °C)	6,5-7
Średnica włókna elementarnego [μm]	0,17 \pm 0,05
Ilość włókien elementarnych w wiązce	500
Wytrzymałość na zerwanie [Pa]	13,23
Wydłużenie [%]	8,55

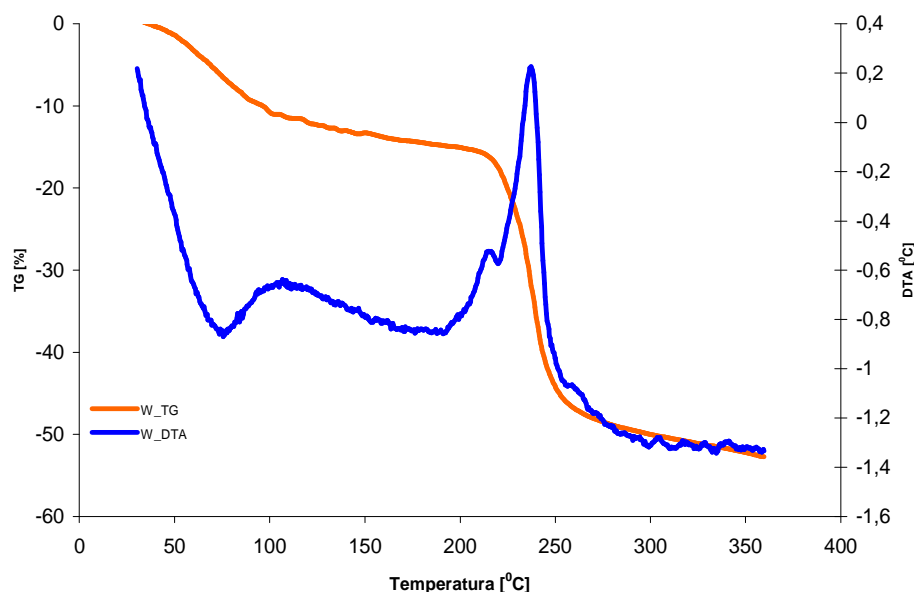
Pod względem chemicznym sole alginowe to łańcuchowe, nierozgałęzione biopolimery zawierający wiązanie β -1,4-glikozydowe pomiędzy monomerami: kwasu D-manuronowego i L-guluranowego. Ilość bloków M i G determinuje właściwości fizykochemiczne łańcucha biopolimerowego. Większy udział merów G zapewnia łatwość formowania żeli, natomiast połączenie MG z przewagą merów typu M wzmacnia elastyczność i giętkość łańcucha. W badaniach wykorzystano polisacharyd o zawartości: 65-75% reszt kwasu guluronowego (G) w łańcuchu, i zawartości reszt kwasu mannuronowego (M) ok. 25-35%. Struktura chemiczna biopolimeru przedstawiona jest na Rys.59.



Rysunek 59. Wzór półstrukturalny heteropolimerowego łańcucha alginianowego (Alg)

3.2.1-1 Badania termiczne

Przeprowadzono badania termiczne włókien NaAlg przy pomocy różnicowej analizy termicznej (DTA) i termogravimetrii (TG), (Derivatograph C, MOM). Wynik analizy przedstawiono na Rys 60. Jak wynika z krzywej DTA w przypadku włókien z alginianu sodu, pozabawienie makromolekuły biopolimeru cząsteczek wody następuje w temperaturze 76 °C, efektowi towarzyszy ubytek masy próbki (pierwsze przegięcie krzywej TG). Drugi efekt termiczny zaobserwowany na krzywej DTA związany jest z powstawaniem tlenku sodu, Na₂O (wyjściowe produkty to sól sodowa kwasu alginianowego, NaAlg) w temperaturze ok. 217 °C. Kolejny efekt egzotermiczny na krzywej DTA związany jest z rozkładem związku organicznego. Zachodzi on w temperaturze 228 °C i towarzyszy mu wyraźny spadek masy widoczny na krzywej TG.

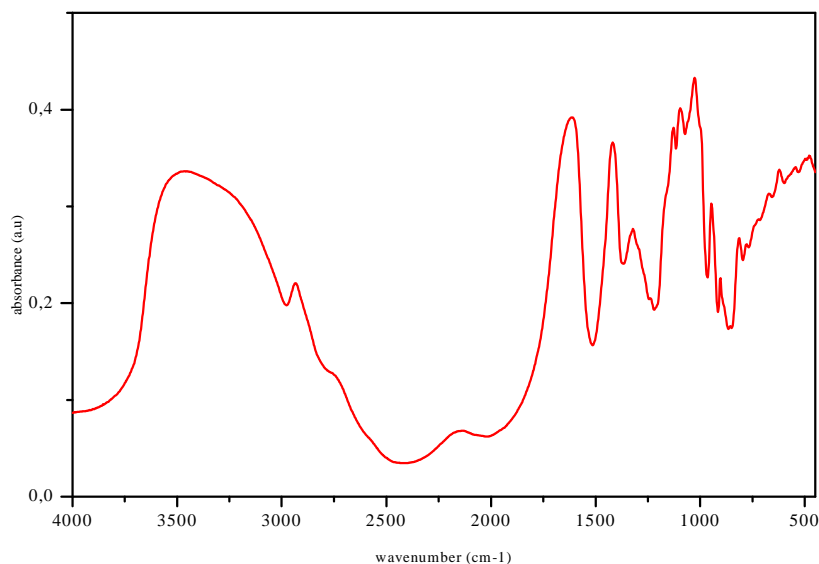


Rysunek 60. Wykres analizy termicznej TG/DTA dla włókien z alginianu sodu (W_TG/DTA)

3.2.1-2 Badania spektroskopowe FT IR

Do analizy powierzchni włókien organicznych NaAlg, zastosowano spektroskopie wibracyjną w podczerwieni – FT IR. Badania wykonano techniką transmisyjną (pastylki KBr). W otrzymanym widmie biopolimeru widoczne są pasma związane z drganiami rozciągającymi grup hydroksylowych OH, widoczne w zakresie liczby falowej 3200-3400 cm⁻¹. Pasma w zakresie ok. 1648-1730 cm⁻¹ świadczą o obecności grup karbonylowych, C=O (drżania rozciągające). Obecność pasma dla liczb falowych z przedziału: 1100-1350 cm⁻¹ odpowiada rozciągającym drżaniom szkieletowym wiązania C-C, a jego intensywność

wzrasta ze względu na nakładanie się pasm pochodzących od obecności mostków eterowych C-O-C i drgań deformacyjnych wiązań C-H (ok. 1100–1300 cm^{-1}). Widmo alginianu sodu przedstawia Rys. 61.

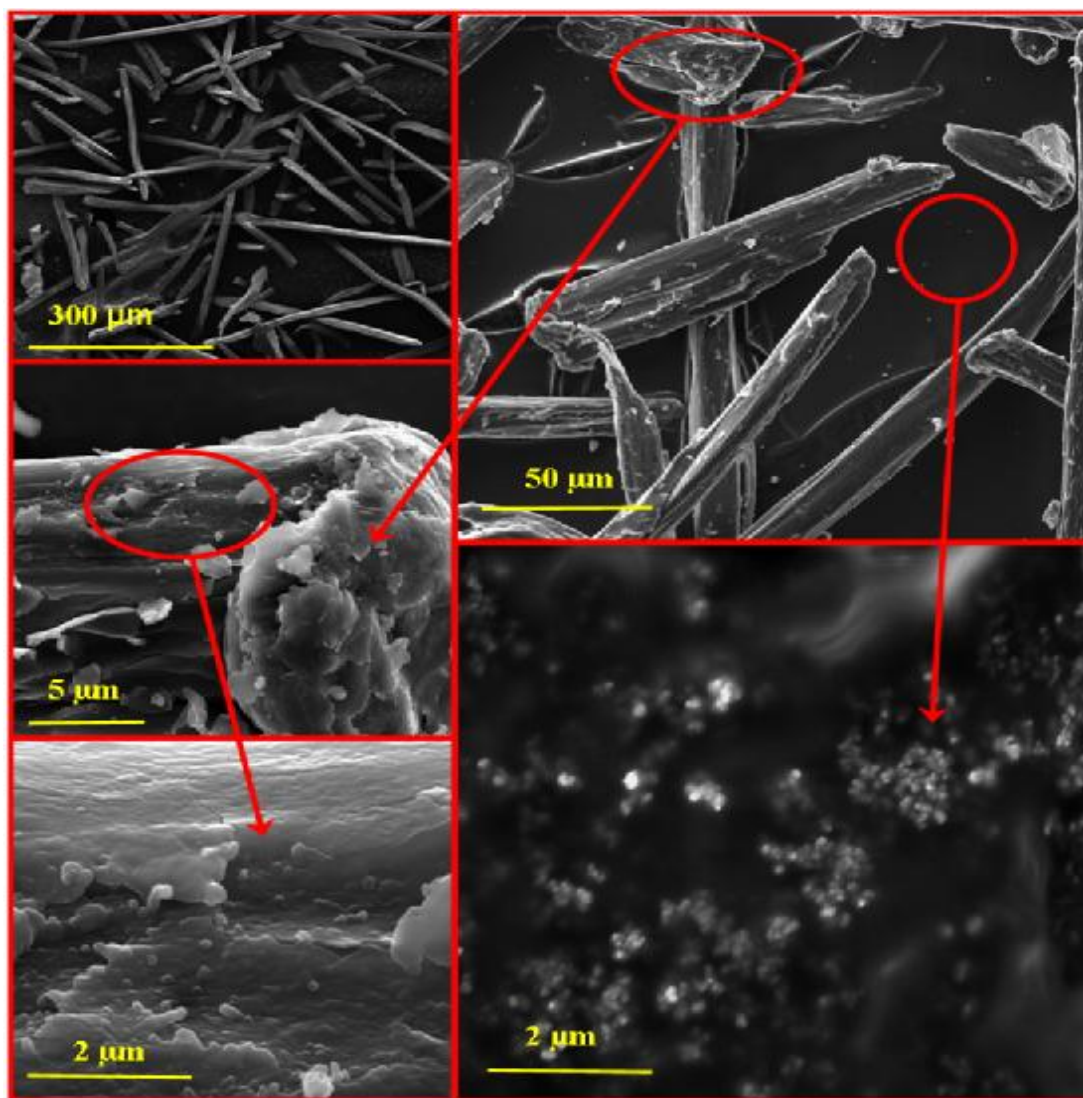


Rysunek 61. Widmo FT IR alginianu sodu (NaAlg), - transmisja KBr

3.2.2 Morfologia fazy włóknistej - włókna z alginianu sodu, włókna węglowe

Włókna alginowe podobnie jak włókna węglowe pochodzące z tkaniny 2D (wykorzystane w poprzedniej części pracy) poddano procesowi rozdrabniania, początkowo ręcznemu a następnie w młynku udarowo-wibracyjnym. Badania kształtu i wielkości rozdrobnionych włókien rozpoczęto od analizy średnicy włókna. W tym celu wykorzystano Lanometr, następnie pomiary uzupełniono stosując mikroskop skaningowy typu NanoSEM. Oprócz tego rozdrobnione włókna polimerowe i węglowe badano przy użyciu analizatora cząstek typu NanoSizer-ZS w zawiesinie izopropanolu. Te ostatnie badania dostarczyły informacji nie tylko o wielkości cząstek, lecz również o udziale poszczególnych frakcji.

Obrazy mikroskopowe włókien alginowych wykazują znaczną degradację włókien. Oprócz włókien długich o rozmiarach przekraczających znacznie 100 μm (długość włókna), obserwuje się włókna wyraźnie krótsze oraz widoczne przy znacznych powiększeniach nieregularne cząstki. Formy te na ogół przylegają do powierzchni włókien a ich rozmiary zawierają się w obszarze dziesiątych części mikrometra (wielkości określane dalej mianem submikronowych). Zdjęcia mikroskopowe zestawiono na Rys 62.

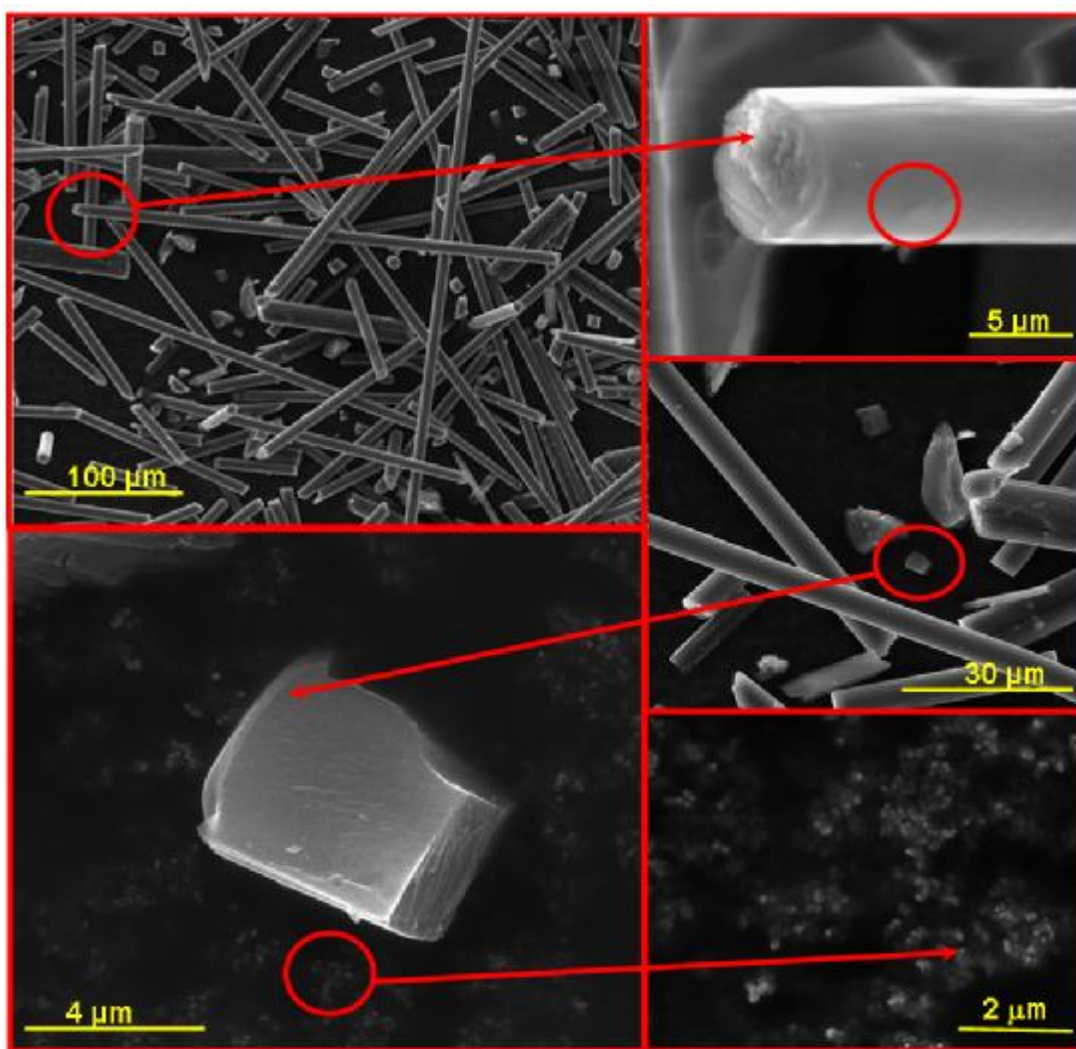


Rysunek 62. Morfologia biopolimeru: włókna z alginianu sodu (NaAlg)

Do modyfikacji terpolimeru wykorzystano także włókna węglowe, które scharakteryzowano w poprzednim rozdziale (str 88, *Rozdział 2*, podrozdział 2.2.1). Tkaninę wykorzystaną do konstrukcji płytek kompozytowych, rozdrobniono tak samo jak włóknistą fazę organiczną (mielenie w młynku udarowo – wibracyjnym).

Morfologia włókien węglowych jest inna niż włókien organicznych. Najlichnieszą grupę stanowią włókna mierzące setki mikrometrów (długość), jak również włókna krótsze, osiągające wielkość maksymalnie kilku mikrometrów. Widoczne w dużych powiększeniach cząstki włókien węglowych o regularnych krawędziach bocznych (Rys 63). Oprócz opisanych frakcji milimetrowej i submikrometrycznej, na obrazach mikroskopowych obecna jest frakcja cząstek, których rozmiary nie przekraczają 200 μm. O ile na powierzchni włókien alginowych widać liczne cząstki (produkty degradacji włókien) przylegające do powierzchni włókna organicznego. O tyle powierzchnia włókien węglowych nawet po rozdrobnieniu pozostaje

gładka. Produkty degradacji włókien węglowych nie mają skłonności do tworzenia aglomeratów w przeciwieństwie do rozdrobnionej fazy organicznej (Rys 63).



Rysunek 63. Morfologia fazy włóknistej: krótkie włókna węglowe I produkty ich degradacji

Analiza wielkości cząstek przeprowadzona za pomocą urządzenia, NanoSizer-ZS wykazała, że krótkie włókna węglowe różnią się wielkością i kształtem. Wśród nich można wyróżnić trzy frakcje włókien (cząstek będących produktami ich degradacji), natomiast we włóknistym materiale organicznym można wyróżnić dwie frakcje. Wyniki pomiarów zawiera Tabela 14.

Tabela 14. Zestawienie analizy rozkładu cząstek we włóknie węglowym i alginowym

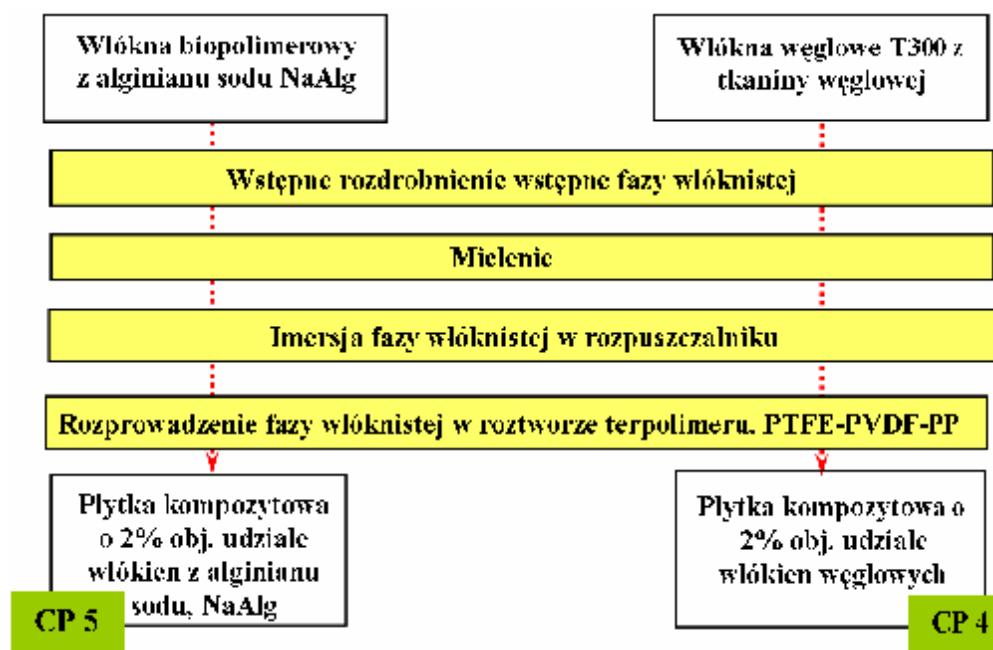
	I frakcja (milimetrowa)	[%]	II frakcja (submikronowa)	[%]	III frakcja (powyżej 100 nm)	[%]
włókna węglowe	d = $6,74 \pm 0,8 \mu\text{m}$ l = $1,2 \pm 0,25 \text{ mm}$	80	$\sim 0,53 \mu\text{m}$	12	$\sim 0,15 \mu\text{m}$	8
włókna alginowe	d = $0,17 \pm 0,05 \mu\text{m}$ l = $1,5 \pm 0,28 \text{ mm}$	95	$\sim 0,75 \mu\text{m}$	5	—	—

Średnica włókien alginowych jest znacznie mniejsza niż włókien węglowych, natomiast ich długości jak i procentowy udział frakcji I jest w obu przypadkach zbliżony. Podobne wnioski wyciągnąć można odnośnie frakcji II. Również w tym wypadku średni rozmiar cząstek jak i udział procentowy frakcji jest wyraźnie zbliżony do siebie. Badania przeprowadzone przy zastosowaniu urządzenia NanoSizer nie stwierdziły obecności cząstek alginowych w zakresie setek części nanometra (do $200 \mu\text{m}$). Wynik ten nie zgadza się z obserwacjami mikroskopowymi. Na mikrofotografiach widoczne są, bowiem cząstki o rozmiarach poniżej jednego mikrometra (Rys 62), przylegające do powierzchni włókien. Wydaje się, że tworzenie aglomeratów przez produkty degradacji włókien alginowych mogło wpłynąć na wynik, jaki uzyskano z pomiarów NanoSizer.

3.2.3 Otrzymywanie kompozytów hybrydowych

Kompozyty hybrydowe otrzymywano dwuetapowo. Celem pierwszego etapu było zapewnienie dobrej dyspersji wypełniacza włóknistego, stąd określoną ilość włókien poddano działaniu rozpuszczalnika, stosując płuczkę ultradźwiękową. Następnie do tak przygotowanej mieszaniny wprowadzano odpowiednią ilość polimeru PTFE-PVDF-PP, który za pomocą mieszadła ultradźwiękowego łączono z fazą włóknistą. Materiały kompozytowe pozostawiano do swobodnego odparowania rozpuszczalnika, przez 48h.

Schemat otrzymywania kompozytów z udziałem: krótkich włókien węglowych (oznaczonych dalej jako **CP4**) i z krótkim włóknem alginowym (oznaczonych dalej jako **CP5**) przedstawiony na Rys 64. W obu przypadkach kompozyty zawierały po 2% objętościowych udziału fazy włóknistej.



Rysunek 64. Schemat przygotowania kompozytów z włóknem krótkim: węglowym CP4 i biopolimerowym CP5.

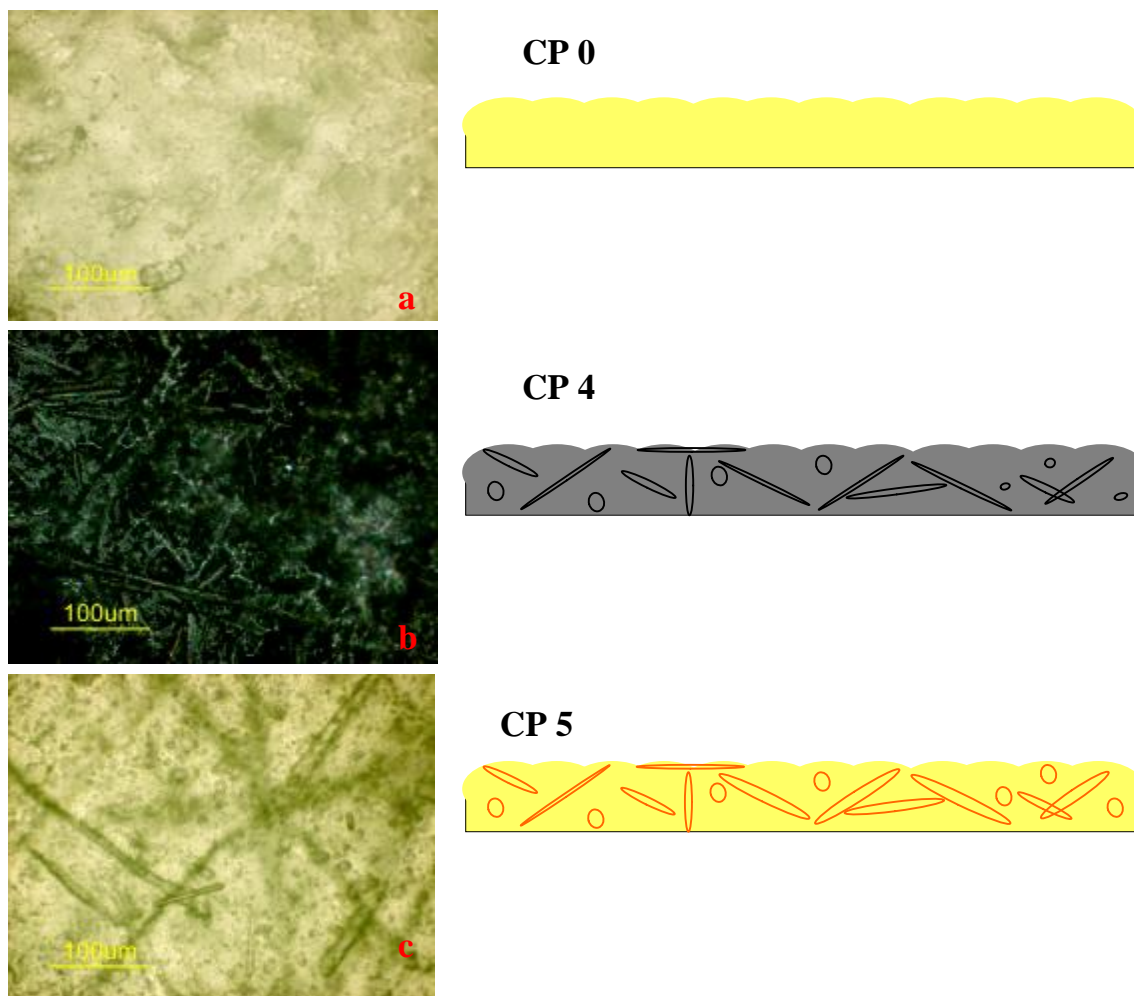
Otrzymane materiały scharakteryzowano ze względu na parametry powierzchni (mikrostruktura, topografia, zwilżalność, energia powierzchniowa). Zbadano właściwości mechaniczne kompozytów hybrydowych. W końcowej fazie eksperymentu zbadano odpowiedź komórkową na wytworzone płytki kompozytowe. Określono ich biogodność, przeżywalność, aktywność metaboliczną, proliferację. Badania te prowadzono na ludzkiej linii komórek kostnych MG-63 a równolegle wykorzystano dwie inne linie komórkowe: osteoblastów hFOB 1.19 i na linię fibroblastów HS-5.

3.3 Badanie parametrów powierzchni kompozytów hybrydowych

Charakterystykę powierzchni wytworzonych materiałów kompozytowych prowadzono równocześnie dla folii modyfikowanej włóknem węglowym (**CP4**) jak i dla płytki modyfikowanej włóknem alginowym (**CP5**). Jako materiał odniesienia traktowana była folia polimerowa z czystego terpolimeru PTFE-PVDF-PP (oznaczana jak i w rozdziale poprzednim jako materiał **CP0**).

3.3.1 Badania mikrostruktury materiałowe kompozytów

Mikrostrukturę powierzchni badanych materiałów kompozytowych CP4 i CP5 obserwowano przy użyciu mikroskopu optycznego (Rys 65). Powierzchnią najbardziej jednorodną odznaczała się folia polimerowa PTFE-PVDF-PP (CP0).



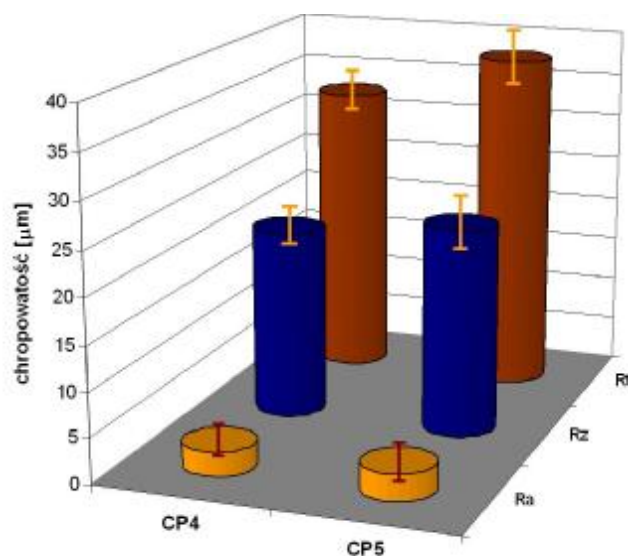
Rysunek 65. Mikrofotografie powierzchni i modele przekroju a - folii PTFE-PVDF-PP (powiększenie 200 razy). Fotografie kompozytów i modele przekrojów: b - krótkie włókno węglowe / osnowa polimerowa PTFE-PVDF-PP, c – krótkie włókno z alginianu sodu / osnowa polimerowa PTFE-PVDF-PP.

Wprowadzenie do polimeru syntetycznego, fazy włóknistej w postaci włókien węglowych lub włókien alginowych powoduje, że płaska powierzchnia polimeru ulega zniekształceniu, odwzorowując obecne w osnowie włókna różniące się rozmiarem, kształtem i ułożeniem pod powierzchnią terpolimeru. W płytkach kompozytowych oprócz nierówności spowodowanych obecnością włókien (pokrytych warstwą polimeru) znajdują się obszary o powierzchni gładkiej.

3.3.2 Badania topografii powierzchni

Charakterystykę topografii powierzchni materiałów kompozytowych, przeprowadzono podobnie jak poprzednio, na podstawie pomiarów chropowatości (profilogramy). Jako odniesienie traktowana była płytka (folia) polimerowa PTFE-PVDF-PP, o średnim poziomie chropowatości R_a ok. $0,4 \mu\text{m}$ (pomiar profilometrem kontaktowym). Topografia powierzchni kompozytów (opisywana przy pomocy wielkość parametrów R_a , R_t i R_z) modyfikowanych włóknem krótkim w niewielkim stopniu zależy od rodzaju włókna zastosowanego do modyfikacji powierzchni polimeru. Do modyfikacji wykorzystano, bowiem taki sam udział objętościowy fazy włóknistej zarówno włókna węglowe jak i włókna organiczne charakteryzowały się podobnymi parametrami geometrycznymi i stopniem rozdrobnienia włókien.

Poziom chropowatość powierzchni kompozytów CP4 jak i CP5 charakteryzują się zbliżonymi parametrami R_a , R_t i R_z (Rys 66).



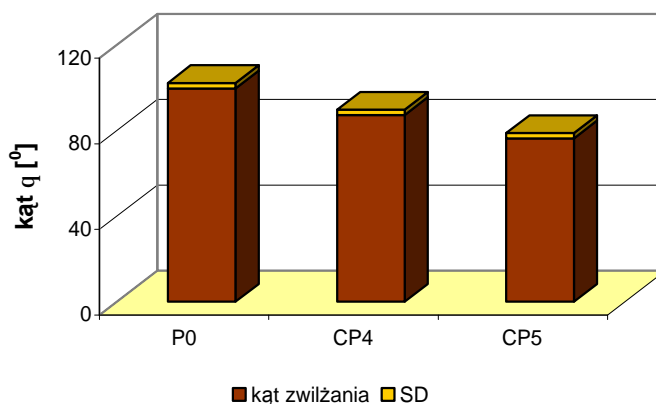
Rysunek 66. Parametry chropowatości powierzchni tworzyw: CP4, CP5

3.3.3 Zwilżalność, energia powierzchniowa

Pomiary kąta zwilżania na powierzchniach płytek kompozytowych oraz na powierzchni folii z PTFE-PVDF-PP wykonano zachowując identyczne warunki pomiarowe (woda UHQ, temp. 20°C , wilgotność powietrza).

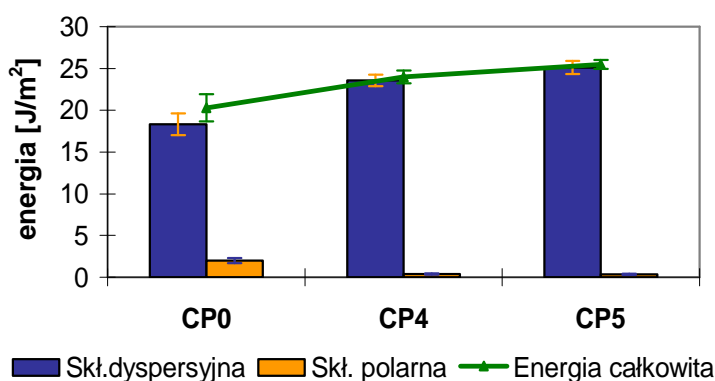
Kąt zwilżania powierzchni wytworzonych płytek kompozytowych: CP4, CP5 jest niższy niż wielkość kąta zmierzona na powierzchni terpolimeru. Większy spadek, co do wartości kąta zwilżenia uzyskuje się, gdy fazą modyfikującą hydrofobową osnowę są włókna

z biopolimeru (obniżenie kąta zwilżania, θ o ponad 20° względem folii z terpolimeru). Wartość kąta zwilżania jest niewiele wyższa dla materiału CP4, w porównaniu z płytką kompozytową CP5. Zestawienie wyników badania kąta zwilżania, wartości średnie oraz przedziały ufności dla poziomu istotności $\alpha=0,05$ przedstawia Rys 67.



Rysunek 67. Zmiany kąta zwilżania dla badanych próbek kompozytowych

Im niższy kąt zwilżania materiałów, tym wyższa energia powierzchniowa (Rys 68). Składowe energii powierzchniowej: polarna i dyspersyjna dla badanych materiałów wyznaczono metodą Owensa-Wendta. Wprowadzenie do polimeru włókien krótkich o wielkościach mikrometrycznych i submikrometrycznych prowadzi do obniżenia składowej polarnej energii powierzchniowej oraz wzrostu składowej dyspersyjnej w porównaniu do składowych energii badanych dla terpolimeru (CP0).



Rysunek 68. Zestawienie wartości składowych energii powierzchniowej: dyspersyjnej i polarnej dla badanych materiałów

3.3.4 Podsumowanie badań powierzchniowych

Wprowadzenie fazy włóknistej w postaci włókien krótkich modyfikuje gładką powierzchnię folii polimerowej, nadając materiałom kompozytowym mikrostrukturę powierzchni taką, jaką posiada rozproszona faza włóknista (wraz z jej kształtem rozmiarem i zdyspergowaniem w osnowie).

W przypadku modelowania topografii powierzchni nie ma znaczenia rodzaj zastosowanego włókna, ale przede wszystkim jego parametry geometryczne: kształt, rozmiar, udział objętościowy fazy modyfikującej i jej zdyspergowanie.

Zmiana kąta zwilżania obserwowana w wyniku modyfikacji fazą włóknistą zależy od rodzaju zastosowanego włókna i jest znacznie większa w przypadku włókien alginowych.

3.4 Badania wytrzymałościowe kompozytów hybrydowych

Zaprojektowane i wytworzone hybrydowe układy polimerowo-włókniste są typowymi materiałami kompozytowymi, które scharakteryzowano z punktu widzenia właściwości mechanicznych takich jak: wytrzymałość, moduł Younga czy odkształcenie przy zrywaniu. Badania mechaniczne przeprowadzono dla kompozytowych materiałów hybrydowych: CP4 i CP5, materiałem odniesienia był niemodyfikowany polimer PTEF-PVDF-PP. Ze względu na postać próbek (płytki kompozytowe) materiały poddano próbom rozciągania. Baza pomiarowa kompozytu, poddawana próbie wytrzymałościowej, wynosiła 15 mm.

Do modyfikacji matrycy polimerowej zastosowano 2% obj. fazy włóknistej. Teoria kompozytów zakłada, że gdy przekroczona zostanie minimalna objętości zawartość fazy modyfikującej ($V_f = V_{\min}$) to wytrzymałości tworzywa wzrasta. Objętość włókien, w której następuje rzeczywiste wzmocnienie osnowy, V_{kryt} wyznaczono na podstawie diagramu wykreślonego po uprzednim obliczeniu parametrów: $\hat{\sigma}_m$ (napężenie osnowy, przy którym następuje zniszczenie włókien), $\hat{\sigma}_c$ (wytrzymałość kompozytu). W żadnym z omawianych układów nie została przekroczona wartość krytyczna udziału objętościowego fazy włóknistej, brak efektu wzmocnienia układu ($V_f < V_{\text{kryt}}$). Obliczone parametry mechaniczne oraz wyniki pomiarów dotyczące czystej osnowy i dwóch rodzajów włókien wykorzystanych do wytworzenia kompozytów CP4 i CP5 zestawiono w Tabeli 15.

Tabela 15. Parametry charakteryzujące fazę włóknistą kompozytów CP4 i CP5

	CP 4	CP 5
ε_m [%]	726	726
ε_f [%]	1.5	0.5
σ_m [MPa]	0,356	0,356
σ_f [MPa]	1,176	0,76
σ_m' [MPa]	0,329	0,334
V_f [%]	2	2
V_{min} [%]	3,5	5
V_{kryt} [%]	15	56

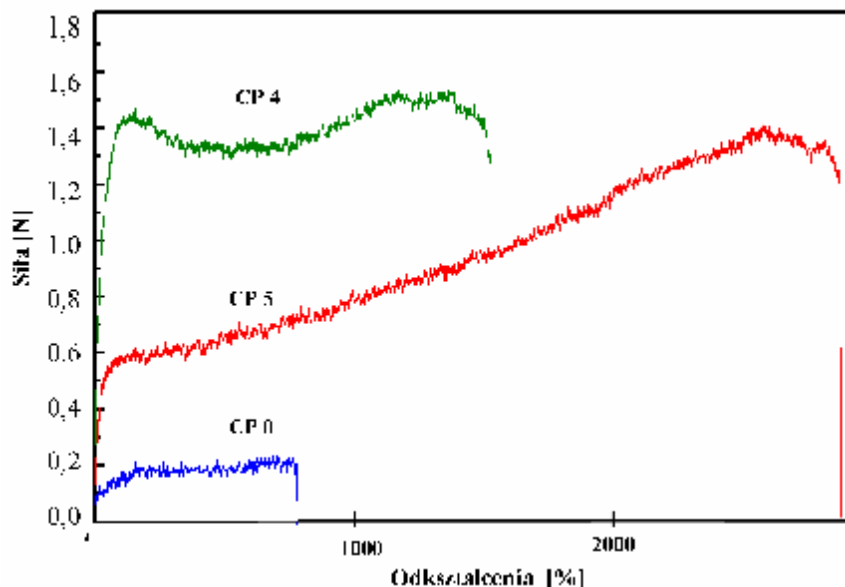
Wyniki wytrzymałości płytek kompozytowych CP4 i CP5 (Tabela 16) wskazują, że wartości maksymalnej siły zrywającej R_m są względem siebie zbliżone (dwukrotnie wyższe niż wytrzymałość czystego polimeru).

Najwyższym modułem Younga odznacza się materiał kompozytowy z udziałem włókna węglowego (CP4), jest on trójkrotnie wyższy w porównaniu z modułem terpolimeru. W przypadku kompozytu modyfikowanego włóknem organicznym (CP5) moduł sprężystości jest niższy niż ten sam parametr badany dla terpolimeru (Tabela 16).

Badane materiały kompozytowe charakteryzują się wysokim odkształceniem przy maksymalnej sile zrywającej - czterokrotnie wyższym w przypadku kompozytu CP5 i trójkrotnie wyższym w przypadku kompozytu CP4. Wartości pracy zniszczenia jest dwukrotnie wyższa dla materiałów kompozytowych w porównaniu z terpolimerem, PTFE-PVDF-PP. Kształt krzywych otrzymanych w trakcie testu zrywania materiału przedstawiono na Rys 16.

Tabela 16. Własności mechaniczne układów kompozytowych CP4, CP5 i folii polimerowej, P0.

Nazwa	R_m [MPa]	ε_{Fmax} [%]	E [MPa]	W [J]
CP 4	0.93 ± 0.13	1745.06 ± 59.65	1.69 ± 0.38	0.993 ± 0.047
CP 5	0.98 ± 0.06	2858.42 ± 39.48	0.28 ± 0.06	0.817 ± 0.056
P0	0.5 ± 0.06	726.32 ± 53.12	0.49 ± 0.14	0.409 ± 0.028



Rysunek 69. Krzywe w układzie siła-odkształcenie dla układów kompozytowych CP4 i CP5 oraz folii polimerowej (CP0)

Jak widać z wyników zawartych w Tabeli 16 i z przebiegu krzywych w układzie siła – odkształcenie, wpływ krótkich włókien zarówno węglowych jak i alginowych na matrycę polimerową ma złożony charakter (Rys 69).

Obecność włókien węglowych w polimerze powoduje, że kompozyty poddane obciążeniu w początkowej jego fazie zachowują się jak materiały sprężyste. Efekt ten jest związany jest najprawdopodobniej z oddziaływaniami powstałymi pomiędzy łańcuchem polimerowym a włóknami (włókna o wielkości w zakresie mikrometrów). Obecność fazy włóknistej w znacznym stopniu ogranicza deformacje polimeru (szczególnie widoczne w przypadku włókien węglowych). Po przekroczeniu określonej wartości siły, w obu próbkach obserwuje się odkształcenie plastyczne. W przypadku materiału kompozytowego CP5 (modyfikowanego włóknem alginowym) odkształcenie to jest bardzo duże, występuje przy niewielkiej sile (i niskiej prędkości rozciągania 20 mm/min). W takich warunkach odkształcenie materiału kompozytowego ulega czterokrotnemu zwiększeniu, w porównaniu z polimerem CP0 (Tabela 16, Rys 69). Zjawisko to - nadplastyczność materiału kompozytowego - związane jest z wewnętrznymi procesami porządkującymi strukturę kompozytu i oddziaływaniami cząstek o wielkościach poniżej mikrometra z łańcuchami polimerowymi. Fragmenty włókien wpływają na orientację łańcuchów polimerowych: osłabiając oddziaływania między nimi a jednocześnie ułatwiając ich wzajemne przesuwanie się.

3.5 Badania biologiczne kompozytowych materiałów hybrydowych

Zakres badań biologicznych wykonanych na kompozytach hybrydowych, rozpoczęto od testu cytotoksyczności. test potwierdzający biogodność wytworzonych materiałów. Dla potwierdzenia uzyskanych wyników badań biologicznych, Przeprowadzono badania przeżywalności (test MTT) i zbadano zdolność sekrecyjną (poziom wydzielanego kolagenu typu I), przez linie komórek kostnych hFOB 1.19 i linie komórek tkanki łącznej, fibroblastów (HS-5). Na linii komórkowej osteoblastopodobnej, MG-63 zbadana odpowiedź komórkową na wytworzone materiały. W zakresie badań mieściła się analiza adhezji i proliferacji komórek, określenie ich powierzchni przyczepu (barwienie β -aktyny) i przeżywalność (test XTT).

3.5.1 Badanie cytotoksyczności materiałów kompozytowych

Testom cytotoksyczności poddano dwa rodzaje wytworzonych materiałów kompozytowych: CP4 – terpolimer modyfikowany krótkim włóknem węglowym i kompozyt CP5 – terpolimer modyfikowany krótkim włóknem alginowym. Zastosowano metodę zgodną z wymaganiami normowymi ISO. Materiały badano metodą kontaktu bezpośredniego z jednowarstwową hodowlą komórek linii A549 w czasie 24 i 72 godzin. W celu określenia ilości martwych komórek zastosowano barwienie błękitem trepanu (TP/PBS). Wyniki badań działania cytotoksycznego wykonane dla materiału kompozytowego CP4 i CP5 oraz folii polimerowej CP0 z zawiera Tabela 17.

Tabela 17. Wyniki badań cytotoksyczności dla materiałów kompozytowych po 24 h i 72 h kontakcie z komórkami linii A549.

MATERIAŁ	24h			72h		
	% komórek martwych	% komórek żywych	Całkowita liczba kom	% komórek martwych	% komórek żywych	Całkowita liczba kom
CP 0	2	98	$5,3 \times 10^6$	1	99	$5,5 \times 10^6$
CP 4	0	100	$6,3 \times 10^6$	7	93	$4,9 \times 10^6$
CP 5	0	100	$5,3 \times 10^6$	4	96	$5,7 \times 10^6$
Kontrola hodowli	0	100	$6,8 \times 10^6$	0	100	$7,2 \times 10^6$

Na powierzchniach kompozytów: CP4 i CP5 nie zanotowano komórek martwych ani zmienionych morfologicznie, po 24h inkubacji, podobnie jak na powierzchni próby kontrolnej. Komórki żywe charakteryzowały się prawidłowym kształtem i równomiernym rozmieszczeniem na powierzchniach syntetycznych (Rys 70). Po 72 godzinach inkubacji na

powierzchni materiału syntetycznego CP4 odnotowano 7% martwych komórek, odsetek martwych komórek na powierzchni kompozytu CP5 wynosił 4%. Komórki martwe miały prawidłowy kształt i przylegały do podłoża. Nie stwierdzono aglutynacji, wolkuolizacji ani lizy błon komórkowych na powierzchni żadnego z badanych materiałów. Morfologia żywych komórek była prawidłowa: wrzecionowaty, wydłużony kształt i jednorodna cytoplazma. Przylegały do powierzchni materiału tworząc jednolitą, konfluentną warstwę.

Wyniki badań jednoznacznie wykazują, że dla wszystkie z badanych materiałów nie są toksyczne dla żywych komórek.

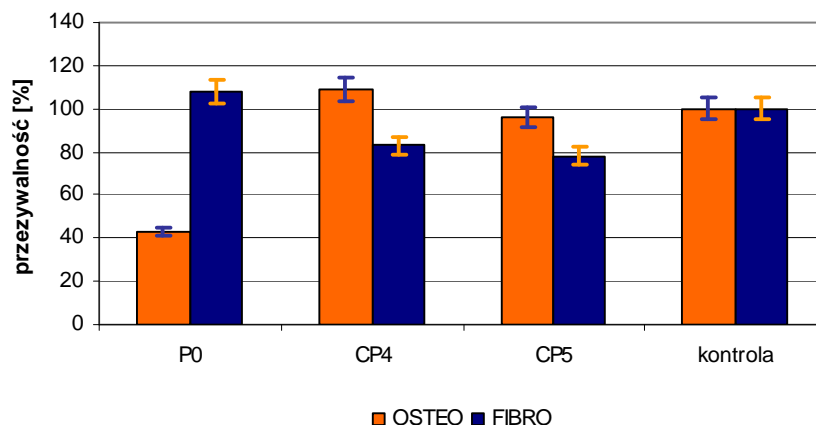


Rysunek 70. Hodowla komórek nablonkopodobnych kontaktowanych z próbkami CP0, CP4 i CP5 po 72 godzinach inkubacji.

3.5.2 Badania oddziaływania komórek fibroblastów i osteoblastów

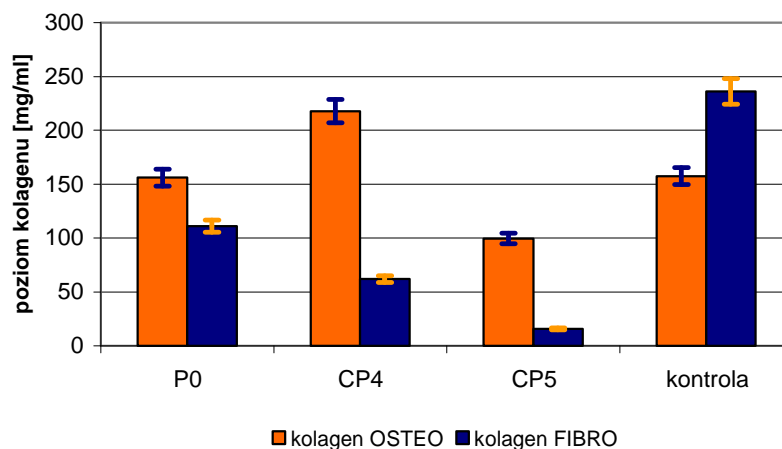
Badania rozpoczęto od analizy odpowiedzi komórkowej na powierzchnię kompozytów hybrydowych. Określono: przeżywalność komórek linii osteoblastów ludzkich hFOB 1.19. i fibroblastów HS-5 kontaktowanych z powierzchniami badanymi (test MTT) i poziom wydzielanego przez te komórki kolagenu typu I.

Najlepszą przeżywalność fibroblasty wykazują na gładkiej powierzchni polimeru (R_a ok. $0,4 \mu m$) o kącie zwilżania ok. 100° . Obniżenie wartości kąta otrzymane poprzez modyfikacje osnowy polimerowej fazą włóknistą powoduje wyraźny spadek przeżywalności tych komórek na powierzchniach CP4 i CP5 (Rys 71) a także wpływa na aktywność sekrecyjną komórek – niski poziom wydzielanego kolagenu typu I (Rys 72).



Rysunek 71. Przeżywalność komórek linii osteoblastów HS-5 i fibroblastów hFOB 1.19 (po 7 dniach hodowli)

Odmienność sytuacja ma miejsce w przypadku osteoblastów. Ich przeżywalności w kontakcie z badanymi powierzchniami (CP4, CP5), które charakteryzują się zbliżoną chropowatością powierzchni (R_a ok. 4 μm) i kątem zwilżania w zakresie 70-80°, jest zdecydowanie wyższa, lepsza niż w przypadku czystego polimeru (CP0). Najlepszą przeżywalnością i najwyższym poziomem produkowanego przez komórki kolagenu typu I wykazują się osteoblasty kontaktowane z powierzchnią materiału CP4 (Rys72).



Rysunek 72. Ilość kolagenu typu I produkowanego przez osteoblasty HS-5 i fibroblasty linii hFOB 1.19 (7 dni)

3.5.3 Proliferacja komórek MG-63

Do dalszej części badań wykorzystano linię osteoblastopodobnych komórek MG-63.

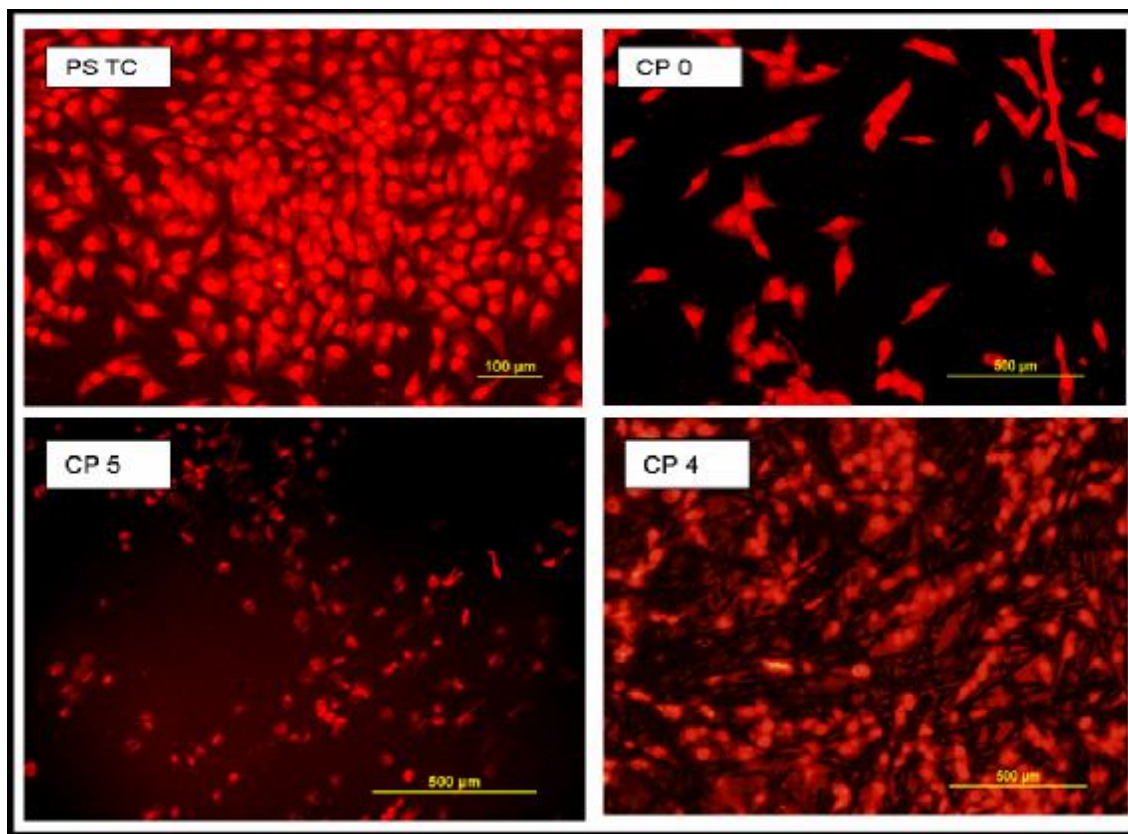
Poziom proliferacji komórek MG-63 na powierzchniach kompozytowych badano w trzech odstępach czasowych, po: 1, 3, i 7 dniu kontaktu osteoblastów z powierzchniami materiałów syntetycznych. Obserwację morfologii osteoblastów prowadzono po każdym z zastosowanych odstępów czasowych. Każdorazowo obliczano przyrost liczby komórek na badanych powierzchniach.

Ocena kształtu i wielkości komórek dokonano względem próby odniesienia, którą w badaniach komórkowych stanowiła powierzchnia polistyrenu (TC PS). Wyjściowa, niemodyfikowana powierzchnia polimeru: PTFE-PVDF-PP jest materiałem silnie hydrofobowym stąd w pierwszym dniu hodowli liczba komórek adherujących do powierzchni materiału była niewielka, a wrzecionowaty podłużny kształt świadczył o słabym przyleganiu osteoblastów do powierzchni polimeru (w konsekwencji prowadzącej do obumierania komórek).

Niezależnie od rodzaju fazy włóknistej wprowadzonej w stabilną osnowę na powierzchniach kompozytów obserwuje się komórki charakteryzujące się dobrym rozplaszczaniem, wysokim stopniem proliferacji, dużo wyższym niż stopień proliferacji notowany dla powierzchni kontroli (TC PS).

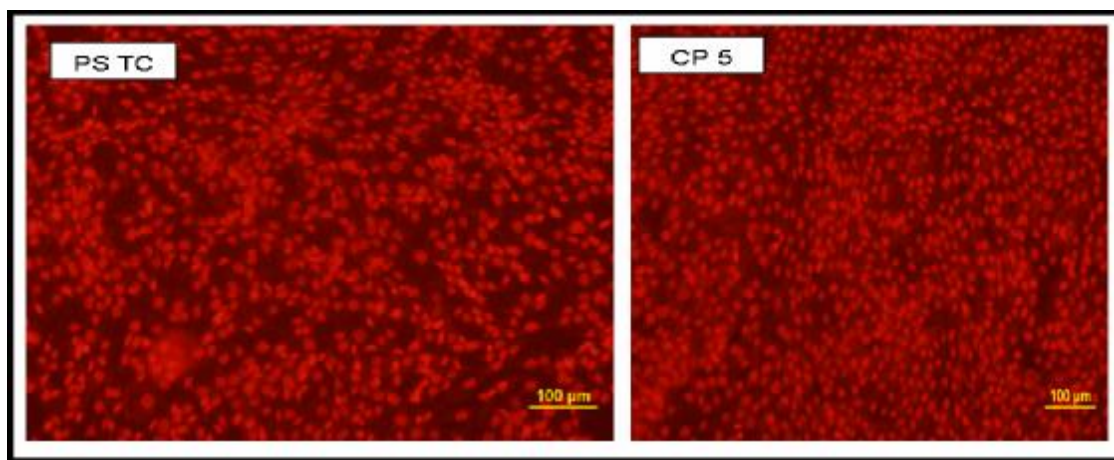
Osteoblasty na powierzchni kompozytu hybrydowego – CP4 (Rys 73), adherują w miejsca pomiędzy włóknami swoim kształtem przypominające komórki adherujące do kompozytu z długim włóknem węglowym (CP1, scharakteryzowanym w *Rozdziale 2*). W tym wypadku komórki tworzą nieregularne skupiska na tych fragmentach powierzchni, w których włókna nie są wyeksponowane na powierzchni a raczej umieszczone dalej od powierzchni polimeru.

Po pierwszym dniu hodowli, *in vitro* komórki kostne kontaktowane z powierzchnią kompozytu hybrydowego CP5 słabo adherowały do powierzchni materiału. Komórki zasiedlały powierzchnię nierównomiernie, ale charakteryzowały się dobrym rozplaszczaniem.



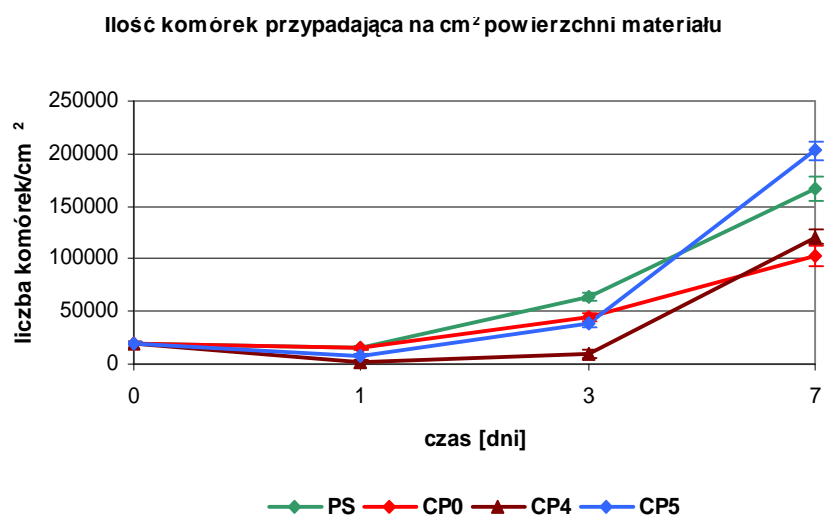
Rysunek 73. Morfologia MG 63 po pierwszym dniu hodowli w warunkach *in vitro*

Po trzecim dniu hodowli, komórki na powierzchniach wszystkich materiałów kompozytowych, tworzą charakterystyczną konfluentną warstwę. Zjawisko powstania jednolitej równomiernie pokrywającej powierzchnię warstwy komórek dowodzi wysokiej proliferacji i dużej aktywności podziałowej komórek. Mikrofotografie powierzchni kompozytów i powierzchni odniesienia: TC PS po trzech dniach hodowli w warunkach *in vitro* zawiera Rys 74.



Rysunek 74. Morfologia komórek MG 643 po 3 dniach hodowli *in vitro*, na materiale CP5 i próbie kontrolnej.

Stopień proliferacji osteoblastów z linii MG-63, w kolejnych dniach hodowli, określono za pomocą szacowania liczby komórek przypadających na cm kwadratowy powierzchni. Najwyższą proliferację odnotowano na powierzchni kompozytu: krótkie włókno organiczne – polimer (CP5), równie dobrze osteoblasty proliferują na kompozycie krótkie włókno węglowe – polimer (CP4). Najniższą proliferację komórek obserwuje się na folii z niemodyfikowanego terpolimeru (CP0).

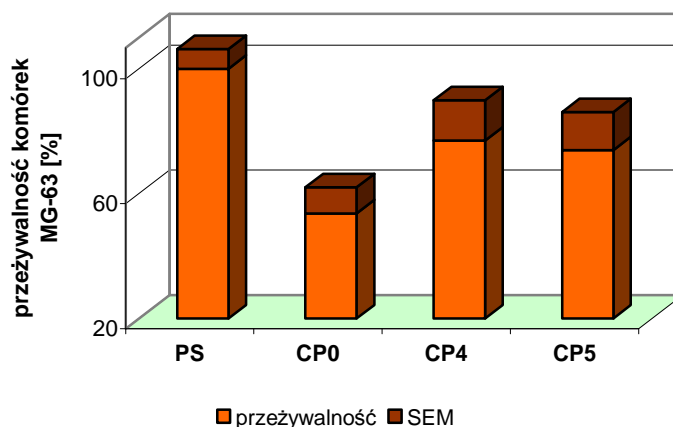


Rysunek 74. Krzywa przeżywalności komórek linii MG 63 na badanych powierzchniach materiałowych

3.5.3 Przeżywalność komórek MG-63

Poziom enzymów jądra komórkowego określono wykonując test XTT (modyfikacja testu MTT). Najwyższe stężenie enzymów produkowanych przez aktywne osteoblasty, odnotowano dla powierzchni próby kontrolnej, powierzchni polistyrenu (TC PS).

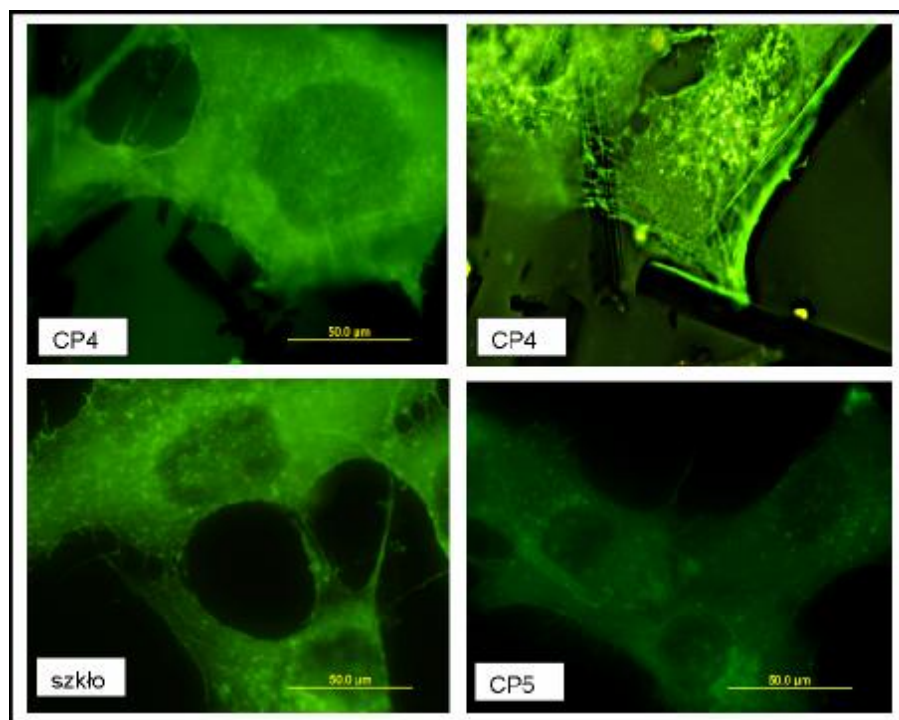
Kompozytowe materiały hybrydowe stanowiące przedmiot badań wykazują jednakową aktywność metaboliczną (identyczne stężenie enzymów) komórek kontaktowanych w powierzchniami CP4 i CP5. Jednocześnie obie z badanych powierzchni materiałów kompozytowych charakteryzują się dużo wyższą przeżywalnością komórek w odniesieniu do czystej, niemodyfikowanej powierzchni polimerowej, PTFE-PVDF-PP (Rys 75).



Rysunek 75. Aktywność enzymatyczna komórek MG 63 na powierzchniach kompozytów (metoda XTT, 4 dni)

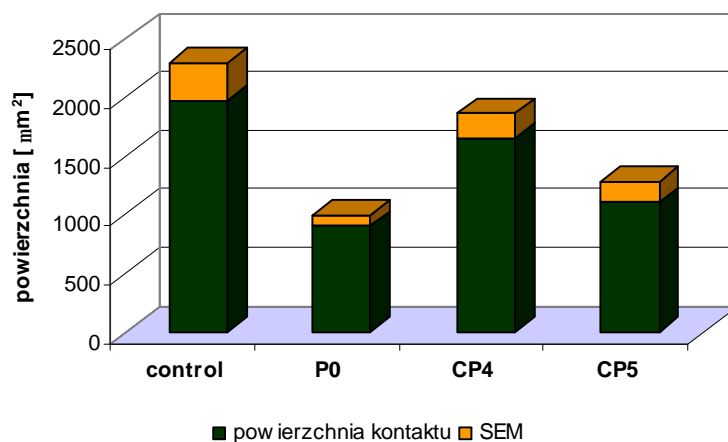
3.5.5 Adhezja komórek MG-63

Analiza adhezji komórek linii MG-63 do powierzchni materiałów badanych CP4 i CP5 wykonano metodą immunofluorescencyjnego barwienia białka błony komórkowej; β -aktyny. Obserwacje mikroskopowe wykazały liczne miejsca przyczepu (miejsca połączeń β -aktyny z powierzchnią wybarwione barwnikiem fluorescencyjnym) komórek linii MG-63 do powierzchni materiału (Rys 76).



Rysunek 76. Poziom β -aktyny na komórkach osteoblastów MG63, mikroskop fluorescencyjny (pow. 100x)

Obrazy otrzymane z mikrofotografii, przetworzono przy pomocy programu komputerowego ATLAS. Przeliczono ilość miejsc i powierzchnię kontaktu komórek zaadherowanych do powierzchni tworzyw kompozytowych (w formie końcowej podana w μm^2 powierzchni kontaktu przypadającej na komórkę). Próbę odniesienia stanowiła powierzchnia standardowego szkła (Rys 77).



Rysunek 77. Powierzchnia kontaktu: komórka-materiał uzyskana przez barwienie i detekcje β -aktyny

Morfologia komórek, na wszystkich badanych powierzchniach kompozytów jak i na szkłe, po trzech dniach inkubacji, jest bardzo podobna. Osteoblasty charakteryzują się dobrym rozplaszczaniem, nieregularnym kształtem i licznymi połączeniami międzykomórkowymi.

Wszystkie te cechy świadczą o dobrej adhezji komórek. Powierzchnia kontaktu pomiędzy komórką a podłożem syntetycznym jest najwyższa dla kompozytu CP4 (krótkie włókna węglowe w osnowie polimerowej). Powierzchnia kontaktu (mierzona po 3 dniach trwania eksperymentu) komórek adherujących do powierzchni kompozytu CP5 jest mniejsza. Jednakże w obu przypadkach zarówno kompozytu CP4 jak i CP5 powierzchnia przyczepu komórek do materiałów jest większa od powierzchni komórek adherujących do czystego polimeru i wielokrotnie niższa w porównaniu z próbką kontroli.

3.5.6 Podsumowanie

Wprowadzenie do osnowy polimerowej fazy włóknistej rozdrobnionej do rozmiarów cząstek w zakresie mikrometrów, której ilość nie przekraczała 2% objętościowych wpływa na właściwości fizykochemiczne i biologiczne materiałów kompozytowych. Faza włóknista zmienia zarówno parametry mechaniczne polimeru jak i parametry fizykochemiczne powierzchni (topografia, energia powierzchniowa, mikrostruktura).

Wyniki badań biologicznych uzyskane w tej części opracowania nie są jednoznaczne, i w dużej mierze uzależnione od obranej metody badawczej.

Obecność włóknistego modyfikatora wpływa ujemnie na biogodność powierzchni tworzywa kompozytowego kontaktowanego z fibroblastami (test MTT). Te same powierzchnie wpływają stymulująco na przeżywalność osteoblastów adherujących na powierzchniach kompozytów hybrydowych.

Obydwa tworzywa kompozytowe: zarówno to modyfikowane włóknem węglowym jak i to modyfikowane włóknem alginowym w zastosowanych testach *in vitro* z komórkami kostnymi (MG-63, HS-5) wykazują wysoką biogodność, niejednokrotnie wyższą od wyników uzyskanych na próbach kontroli (TC PS).

Wyniki przedstawione w opracowaniu wykazują, że włókno węglowe jest materiałem, które wprowadzone do polimeru wpływa na adhezję komórek kostnych do powierzchni tworzywa kompozytowego. Węglowa faza włóknista nadaje powierzchni polimerowej specyficzną topografię o zróżnicowanej chropowatości mieszczącej się w zakresie mikrometrów (20-40 μm), która sprzyja adhezji i stymuluje osteoblasty do aktywności metabolicznej i podziałowej. Z obserwacji mikroskopowych wynika, że komórki kostne adherują do obszarów posiadających określoną topografię: najlepiej adhezja do powierzchni zachodzi w pobliżu włókien, lecz nie na ich elementach wyeksponowanych na powierzchnię, które pokryte są najmniejszą warstwą polimeru.

Prolifercja osteoblastów na powierzchniach tworzyw kompozytowych jest wyższa niż na powierzchni polimeru. Osteoblasty proliferują najlepiej na powierzchni materiału modyfikowanego włóknem organicznym (prolifercja wyższa niż obserwowana na TC PS).

4. Membranowe materiały kompozytowe dla zastosowań medycznych

4.1 Wstęp

Jedną z perspektywicznych metod leczenia ubytków kostnych i chrzęstnych jest technika sterowanej regeneracji tkanki stosowana nie tylko w stomatologii, ale również w innych obszarach chirurgii kostnej. Ideą tej metody przedstawiono na wstępie pracy (*Rozdział 2, Część literaturowa*). Podstawowym problemem w obrębie tej dziedziny jest sterowanie odpowiedzią komórkową (fibroblastów a zwłaszcza osteoblastów) poprzez nadawanie materiałom określonych cech chemicznych i fizycznych.

W dwóch poprzednich częściach pracy wykazano, że we wprowadzanie w osnowę polimerową fazy włóknistej czy to w postaci włókien długich czy krótkich nadaje materiałowi określone właściwości biologiczne związane z reakcją komórek. Jak wiadomo wymagania stawiane implantom stosowanym w technice GTR nie dotyczą jedynie zagadnień związanych ze sterowaniem odpowiedzią komórkową ale również właściwościami materiałowymi takimi jak; wytrzymałość, elastyczność czy porowatość.

Ze względu na specyficzny charakter biomateriałów wykorzystywanych w technice GTR, porowatość implantów musi mieć charakter otwarty, pozwalający na transport masy (produkty przemiany materii, składniki odżywcze) w kierunku prostopadłym do powierzchni materiału. Dlatego też implanty stosowane w sterowanej regeneracji tkanek nazywa się membranami.

Sól sodowa kwasu alginowego jest materiałem rozpuszczalnym w roztworach wodnych, właściwości tej nie tracą ani formowane z niej cząstki ani też włókna.

W niniejszym rozdziale postanowiono wykazać, że zarówno włókna jak i cząstki alginianu sodu mogą stanowić porogen, który nadawać będzie materiałowi (polimerowemu lub kompozytowemu) pożądaną porowatość.

W pierwszej części rozdziału scharakteryzowano otrzymane membrany z punktu widzenia porowatości, przepuszczalności i powierzchni rozwinięcia. Zbadano kąt zwilżania oraz mikrostrukturę membran.

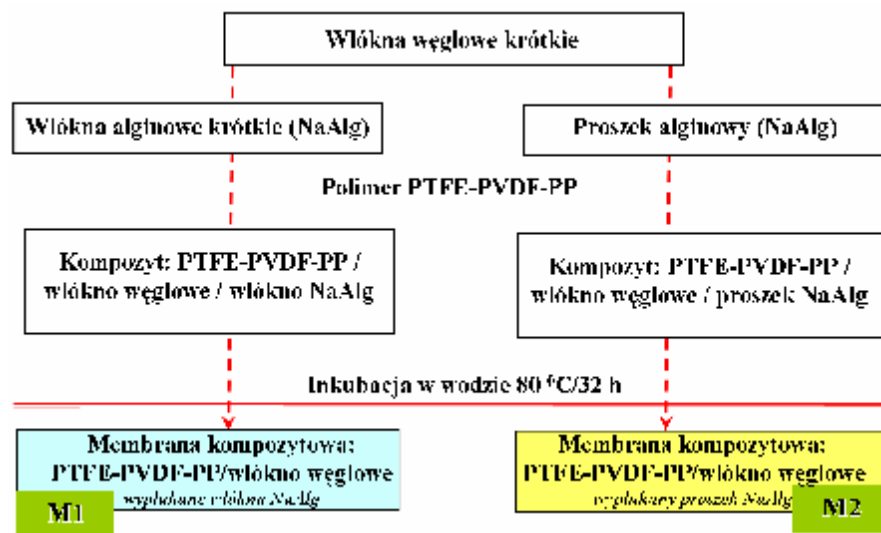
W drugiej części, poświęconej badaniom biologicznym wykazano, że otrzymane materiały są biogodne i w tym celu przeprowadzono badania przeżywalności oraz adhezji komórek na powierzchniach materiałów.

4.2 Otrzymywanie kompozytów membranowych

W pierwszej części eksperymentu otrzymano dwie grupy membran. Jedną z nich stanowiły materiały, które powstały przez usunięcie organicznego porogenu, jakim był alginianu sodu z polimeru zawierającego dodatkowo włókna węglowe (membrany kompozytowe) oraz takie, które otrzymano przez wypłukanie porogenu (NaAlg) z czystego polimeru. Membrany kompozytowe otrzymywano dwuetapowo: w pierwszym etapie wytworzono hybrydowy materiał kompozytowy złożony z krótkich włókien węglowych (charakterystyka fazy włóknistej w *Rozdziale 3*, str 109) i z krótkich włókien biopolimerowych (charakterystyka fazy włóknistej w *Rozdziale 3*, str 108).

Naważkę mieszaniny włókien węglowych i alginowych rozproszono w rozpuszczalniku i dyspergowano stosując płuczkę ultradźwiękową, na końcu wprowadzając polimer. W ten sam sposób przygotowano kompozyt, w którym oprócz krótkich włókien węglowych rozproszono biopolimer w postaci proszku NaAlg (prekursor włókien, o średniej wielkości cząstek 2-6 μm (NanoSizer – ZS, zawiesina izopropanolu)). Otrzymane w ten sposób materiały kompozytowe (zawierające 2% objętościowych fazy węglowej i 1% objętościowych biopolimeru) mające postać płytek suszono w celu odparowania rozpuszczalnika w powietrzu przez 48h. Materiały inkubowano w wodzie celem wypłukania alginianu i uzyskania struktury porowatej.

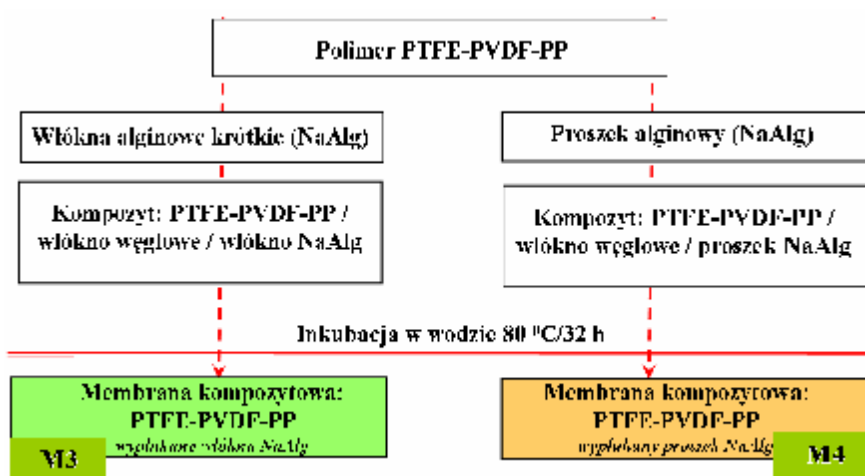
Efekt końcowym procesu inkubacji kompozytu węglowo-organicznego było rozpuszczenie i wymycie fazy organicznej i otrzymanie membranowych materiałów kompozytowych: membrany powstałej po wypłukaniu włókien alginowych nazywanej dalej materiałem **M1**, i membrany kompozytowej będącej wynikiem usunięcia porogenu w postaci proszku alginowego **M2**. Schemat wytworzenia membran kompozytowych przedstawia Rys 78.



Rysunek 78. Schemat otrzymywania kompozytowych materiałów membranowych M1 i M2

W podobny sposób przygotowano drugi rodzaj membran, które nie zawierały włókien węglowych. Alginian w postaci krótkich włókien wprowadzano do rozpuszczonego polimeru i rozprowadzano za pomocą ultradźwięków.

Taki samo postępowano w celu przygotowania materiału, gdzie fazą modyfikującą matrycę polimerową był proszek organiczny (prekursor włókien NaAlg). Otrzymane materiały mające postać płytek (folii) poddano odparowaniu rozpuszczalnika na powietrzu przez 48h. Proces otrzymywania membran kończył etap usuwania porogenu (inkubacji w wodzie), który prowadzono w roztworze wodnym przez 32h w temperaturze 80 °C. W ten sposób otrzymano membranę **M3** – powstałą po usunięciu włókien alginowych i membranę **M4** – z której usunięto proszek alginianu sodu. Schemat wytwarzania membran zawiera Rys 79.

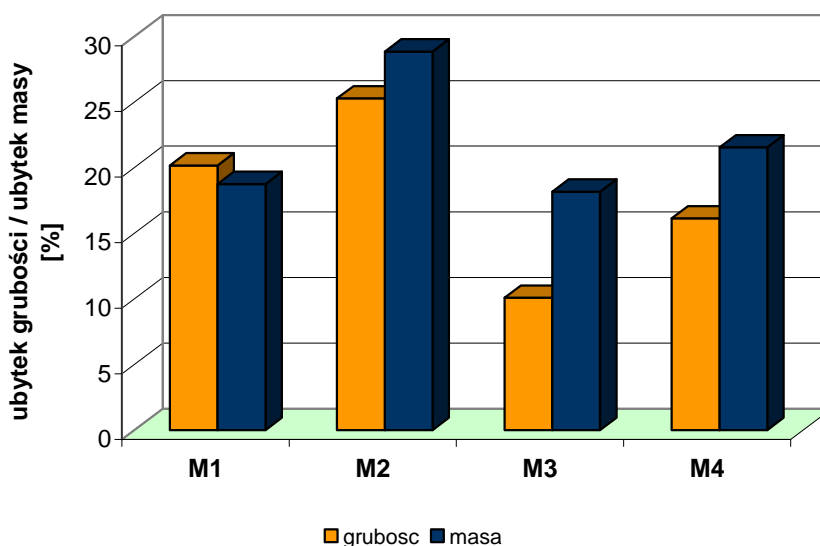
**Rysunek 79.** Schemat otrzymywania kompozytowych materiałów membranowych M3 i M4

Badania wytworzonych materiałów dotyczyły zarówno przebiegu procesu usuwania alginianu z matrycy polimerowych, jak i charakterystyki fizykochemicznej powierzchni dwóch grup membran (membrany kompozytowe (M1, M2) oraz polimerowe (M3 i M4). Monitorowano proces usuwania porogenu poprzez pomiar: ubytków masy próbek, zmianę zwilżalności powierzchni i zmiany przewodnictwa jonowego roztworu, w którym przebiegał proces usuwania porogenu. Dla otrzymanych materiałów membranowych przeprowadzono test przepuszczalności. Scharakteryzowano także mikrostrukturę, porowatość (rozmiar kształt porów).

4.2.1 Membrany kompozytowe – wstępne badania fizyczne

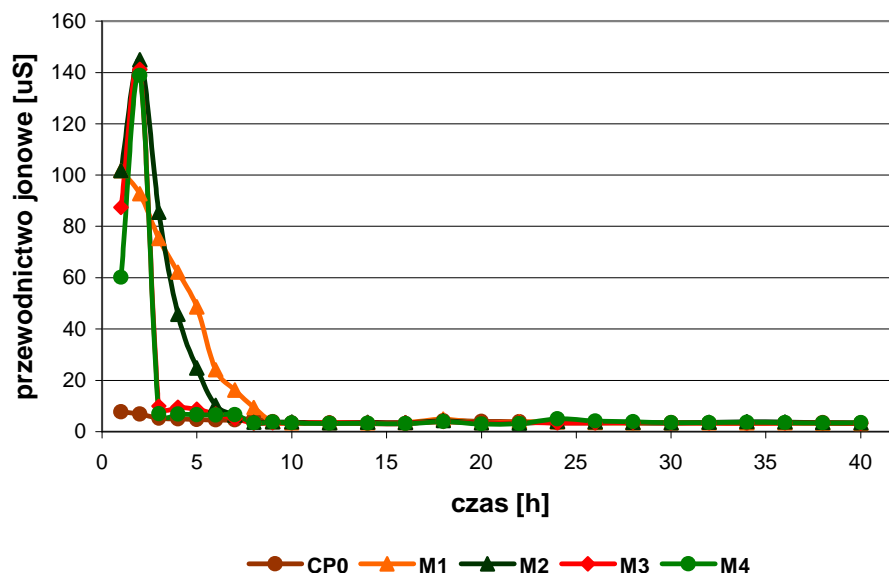
Badania materiałów membranowych rozpoczęto od analizy efektywności procesu wypłukiwania porogenu. W tym celu badano masę próbek przed i po procesie inkubacji, zmianę ich grubości mierzoną w takich samych warunkach, oraz przewodnictwo jonowe roztworu inkubacyjnego.

Jak widać z Rys 80 procentowy ubytek zarówno masy jak i zmiana grubości folii kompozytowej, poddanej procesowi wypłukiwania alginianu sodu (NaAlg), najefektywniej przebiegł w materiale M2 - kompozycie włókno węglowe-proszek biopolimerowy (spadek masy o ok. 30% względem kompozytu wyjściowego). Najmniejszy spadek masy określonej względem materiału wyjściowego notowano dla materiału M3, powstałego w trakcie usuwania z polimeru włókien alginowych. Ten sam udział fazowy biopolimeru (ok. 1%) efektywniej usuwany jest w kompozytach z udziałem włókna węglowego (M1 i M2) niż w kompozytach pozbawionych fazy węglowej (M3 i M4).



Rysunek 80. Zmiany grubości i ubytki masy w trakcie inkubacji kompozytów z udziałem biopolimeru NaAlg

Stopień wypłukiwania biopolimeru monitorowano przez pomiar przewodnictwa jonowego wody (Rys 81). Pomiar taki pozwolił na ocenę szybkości wymywania biopolimeru z układów kompozytowych przy zastosowanej temperaturze (80 °C). Proces usuwania porogenu jest efektywniejszy, jeśli zastosowany porogen organiczny ma postać proszku (materiały M2 i M4).

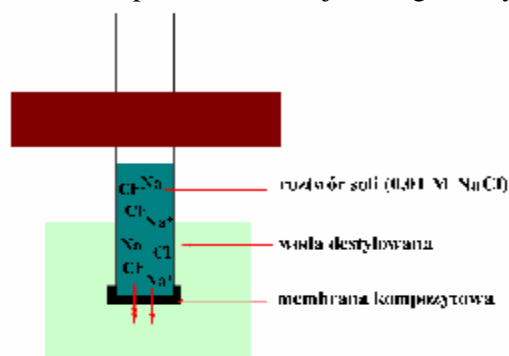


Rysunek 81. Zmiany przewodnictwa w trakcie otrzymywania membran kompozytowych, przez usuwanie porogenu alginianu sodu (NaAlg)

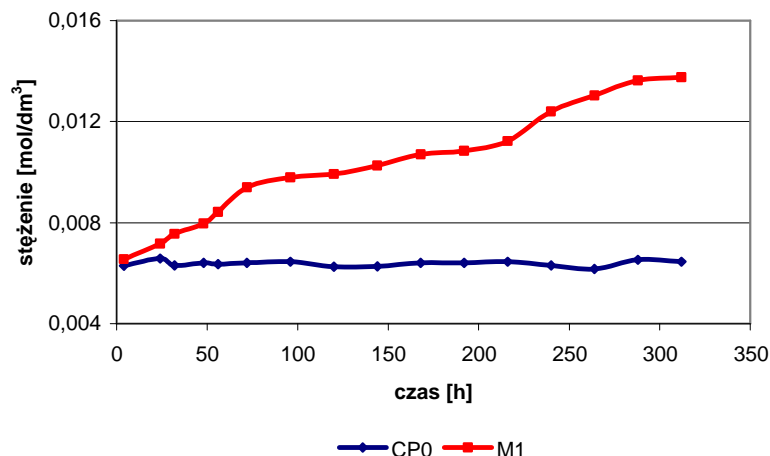
4.2.1-1 Test przepuszczalności membran kompozytowych

Test przepuszczalności membran określił możliwości migracji jonów przez barierę wykonaną z membrany kompozytowej **M1**. Zaprojektowano układ pomiarowy (Rys 82), w której w jednej z części umieszczono 0,01M roztwór NaCl, naczynie oddzielone membraną (M1) zanurzone w wodzie. Test opierał się na badaniu zmian przewodnictwa jonowego wody, do której migrowały jony: Na^+ i Cl^- poprzez badaną membranę. Próbką odniesienia stanowiła folia PTFE-PVDF-PP.

Badany materiał (M1) wykazuje się dobrą przepuszczalnością dla jonów sodu i chloru. W trakcie inkubacji obserwuje się wzrost stężenia jonów soli migrujących przez membranę (Rys 83). Folia polimerowa jest materiałem litym nieporowatym i nieprzepuszczającym jonów sodowych ani chlorkowych.



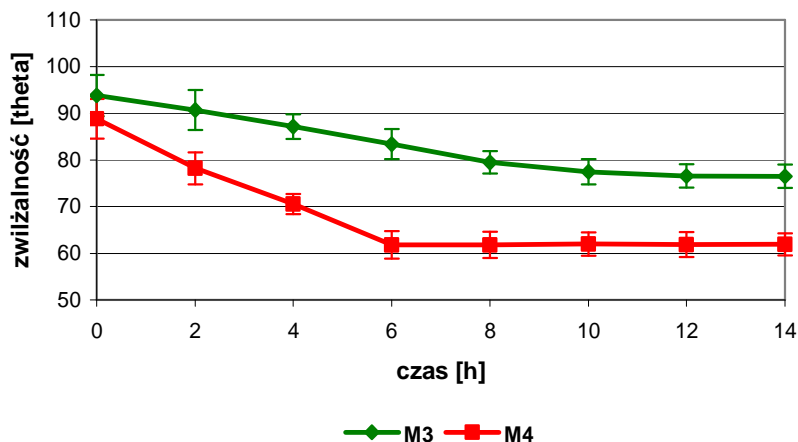
Rysunek 82. Układ pomiarowy do badania przepuszczalności membran kompozytowych



Rysunek 83. Zmiana stężenie jonów Na^+ i Cl^- , w zależności od zastosowanego materiału membranowego

4.2.1-2 Zmiany zwilżalności powierzchni w trakcie procesu usuwania porogenu

Wychodząc z założenia, że kilkugodzinna inkubacja materiałów kompozytowych w wodzie stosowana w celu nadania im porowatości może również prowadzić do modyfikacji chemicznej powierzchni materiału, przeprowadzono, badania kąta zwilżania. Analizy powierzchni membrany prowadzono w zależności od czasu inkubacji materiału. Wpływ czasu inkubacji na wielkość kąta zwilżania mierzonego na powierzchni membran przedstawia Rys 84.



Rysunek 84. Zmiany zwilżalności powierzchni kompozytów w trakcie wypłukiwania biopolimeru

Jak wynika z wykresu zamieszczonego na Rys 84 procesowi wymywania porogenu towarzyszy obniżenie kąta zwilżenia powierzchni polimeru. Największy spadek kąta obserwowany jest po 6 godzinach inkubacji. Powyżej tego czasu kąt zwilżenia nie ulega zmianie. Zwilżalność powierzchni materiału zależy od sposobu rozprowadzenia biopolimeru

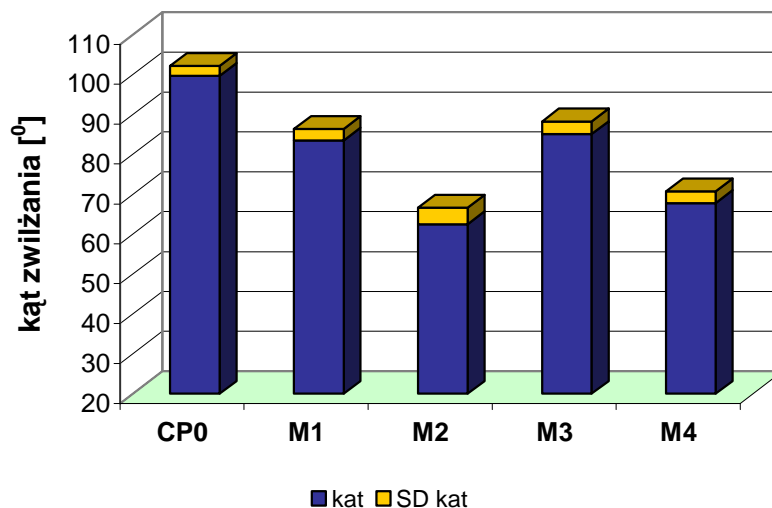
w materiale wyjściowym oraz jego postaci; spadek kąta jest wyższy w przypadku gdy porogiem był proszek z alginianu sodu.

4.3 Charakterystyka powierzchni membran

Materiały membranowe otrzymywane na drodze wytworzenia dwufazowych kompozytów a następnie usunięcia fazy porotwórczej poddano analizie parametrów powierzchni. W tym celu zbadano zwilżalności powierzchni a możliwe zmiany chemiczne zachodzące pod wpływem usuwania NaAlg określono stosując metodę spektroskopii w podczerwieni (FT IR/ATR).

4.3.1 Badanie zwilżalności powierzchni: kąt, energia powierzchniowa

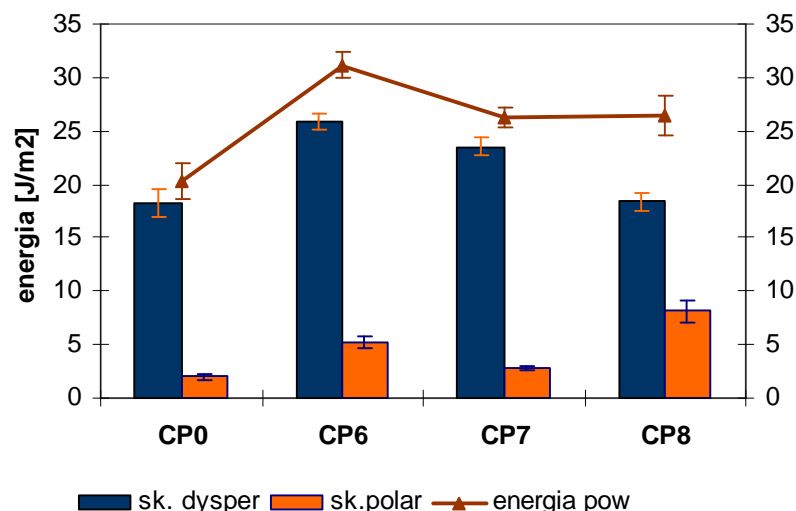
Wszystkie cztery membrany będące przedmiotem badań posiadają niższy kąt zwilżania niż hydrofobowy polimer (CP0, $\theta \sim 100^\circ$), z którego zostały wytworzone. Wielkość spadku kąta zwilżania uzależniona jest od postaci wprowadzonego biopolimeru: niższym kątem zwilżania charakteryzują się membrany otrzymane przez wypłukanie alginianu w formie proszku niż membrany, które powstały przez usunięcie organicznej fazy włóknistej (krótkie włókna NaAlg). Zestawienie wyników zwilżalności powierzchni (wartości średnie oraz przedziały ufności dla poziomu istotności $\alpha=0,05$) przedstawia Rys 85.



Rysunek 85. Wartość kąta zwilżania po 32h inkubacji materiałów kompozytowych w wodzie (80°C)

Pomiar energii powierzchniowej dokonany metodą Owensta-Wendta, wskazuje, że im wyższa zwilżalność powierzchni materiałów tym energia powierzchniowa maleje (Rys 86).

Najwyższy udział składowej polarnej charakteryzuje kompozytowy materiał membranowy M1. Składowa dyspersyjna jest najwyższa w przypadku kompozytu z obecną fazą organiczną w osnowie polimerowej M4.

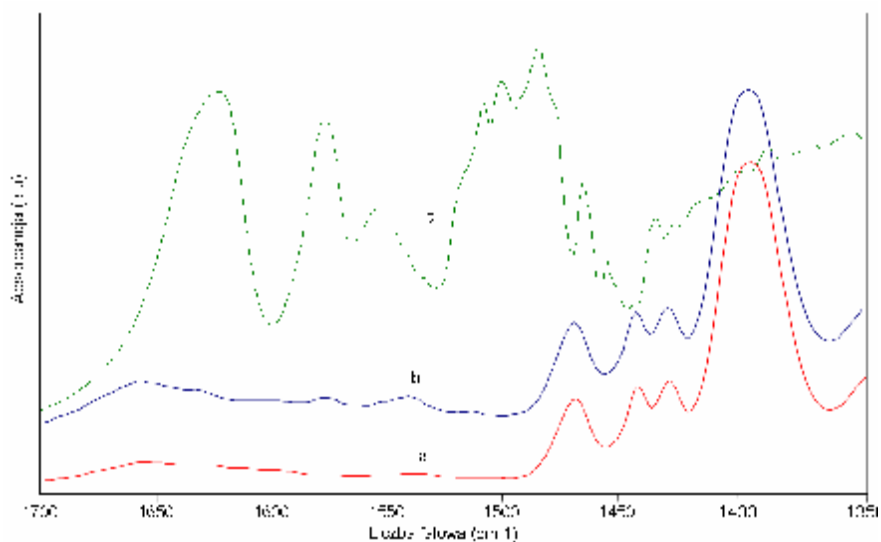


Rysunek 86. Wartości energii powierzchniowej (i jej składowych) dla badanych układów kompozytowych

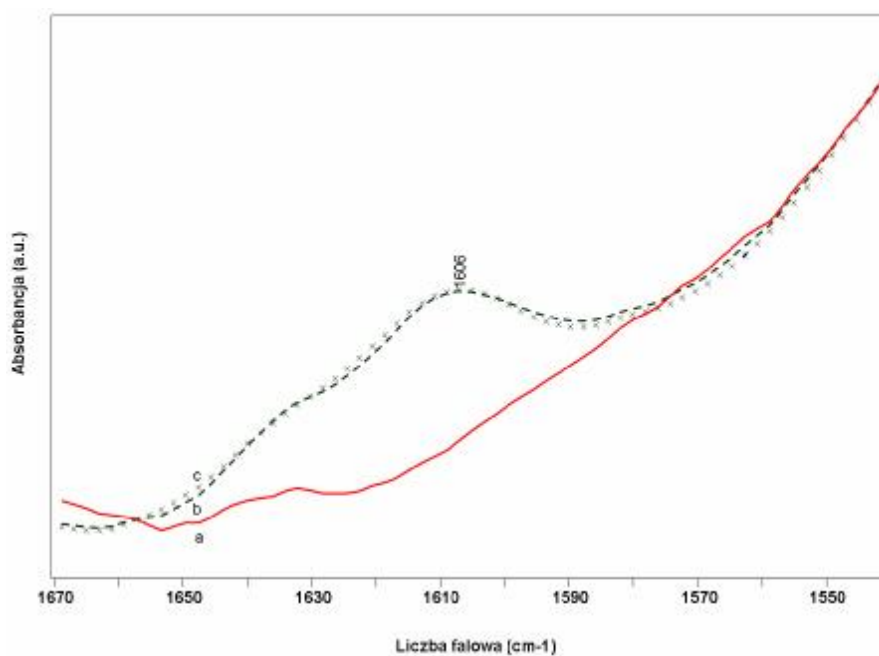
4.3.2 Charakterystyka powierzchni kompozytów –FT IR/ATR

Badania powierzchni membran przeprowadzono wykorzystując metodę spektroskopii w podczerwieni, stosując w tym celu technikę refleksyjną (ATR). Wykonano zestaw widm FT IR z różnych obszarów na powierzchni membrany. Przesuwano powierzchnię próbki względem kryształu pomiarowego (ZnSe) a otrzymane widma refleksyjne porównywano z widmem alginianu oraz widmem terpolimeru Rys 87.

Widma membran wykazywały znaczne podobieństwo do widma wyjściowego polimeru. Dokładna ich analiza pozwoliła na znalezienie subtelnych różnic sprowadzających się do obecności słabo intensywnych pasm widocznych w widmach membrany. Pasma te są widoczne zwłaszcza w zakresie od $1500 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ i występują w tych położeniach, w których obecne są najintensywniejsze pasma widma alginianu. Na Rys 88 zestawiano fragment widma membrany oraz widma polimeru, z którego została wykonana. Pasma w położeniu 1660 cm^{-1} , obecne w widmie membrany może być związane z grupami karbonyłowymi, C=O występującymi w alginianie sodu.



Rysunek 87. Zestawienie widm FTIR/ATR; a-terpolimer PTFE-PVDF-PP, b-terpolimer z cienką warstwą filmu biopolimerowego NaAlg, c-alginian sodu NaAlg



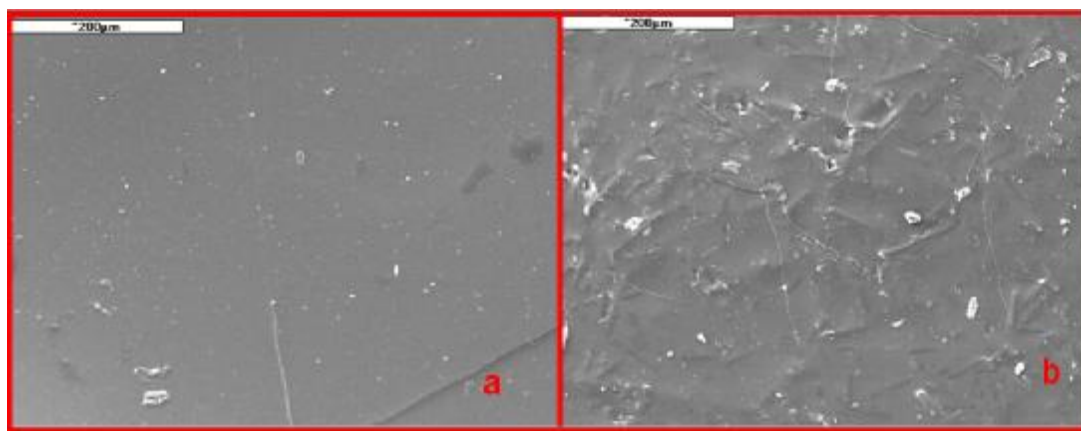
Rysunek 88. Widmo FTIR/ATR dla folii PTFE-PVDF-PP pokrywanej roztworem 0.01% NaAlg, (b) w odniesieniu do widm uzyskanych dla M1 (c) i CP0 (a).

Z badań w podczerwieni wynika, że w trakcie wypłukiwania alginianu sodu z matrycy polimerowej na powierzchni membrany prawdopodobnie adsorbuje się niewielka ilość polisacharydu (NaAlg) pokrywając ją cienką warstwą.

4.3.3 Badanie mikrostruktury powierzchni membran kompozytowych

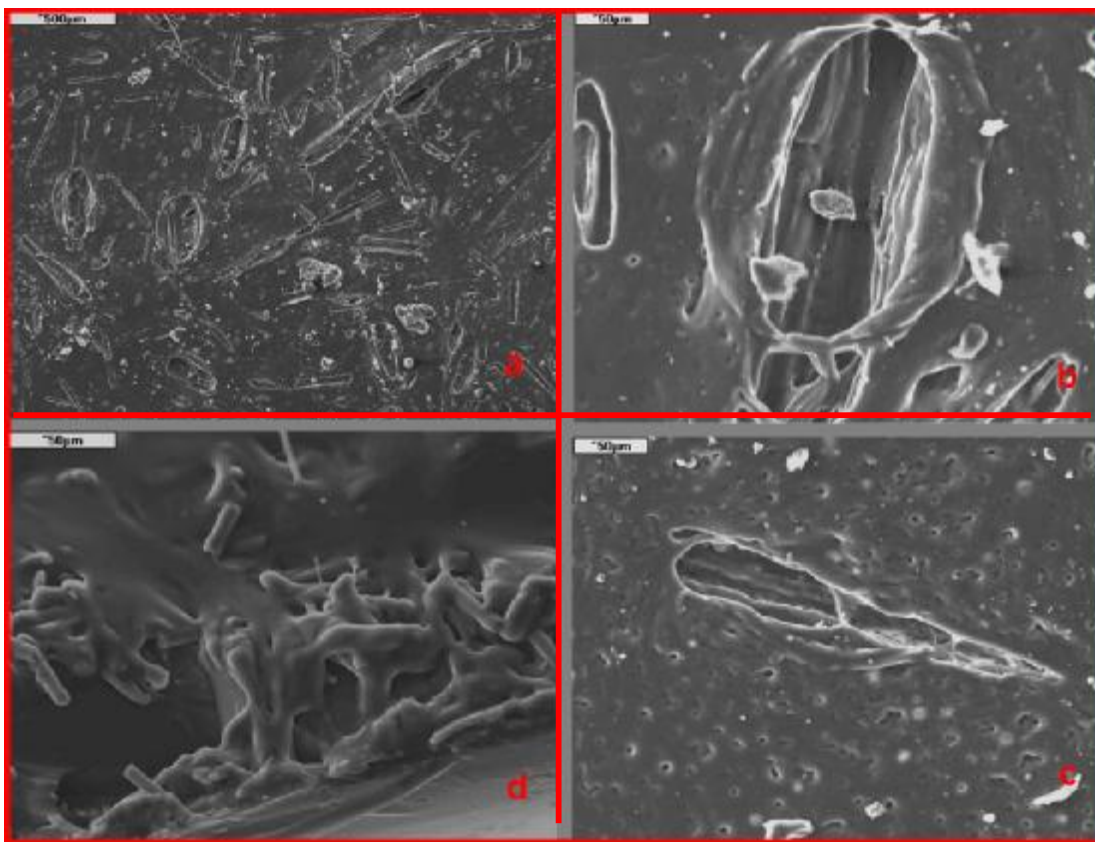
Badania mikrostruktury membran oraz dla porównania materiałów wyjściowych wykonano przy wykorzystaniu mikroskopu skaningowego. Obserwacje mikroskopowe poszczególnych membran potwierdziły, że zastosowana, dwuetapowa metoda otrzymywania membran kompozytowych sprawia, że lity dotąd materiał, uzyskuje porowatość.

Kształt, wielkość i rozmiar porów zależą od zastosowanej postaci porogenu: włókna, proszek biopolimerowy. Rozmieszczenie porów zależy również od obecności węglowej fazy włóknistej w osnowie syntetycznej (M1 i M2). Dla porównania zmian tekstury powierzchni po wprowadzeniu włóknistej fazy węglowej w osnowę PTFE-PVDF-PP, przedstawiono wyjściową teksturę folii polimerowej (CP0, Rys 89 a-b).



Rysunek 89. Mikrostruktura powierzchni folii polimerowej PTFE-PVDF-PP (a) oraz kompozytu z udziałem włóknistej fazy węglowej, prekursor membrany M1 (b)

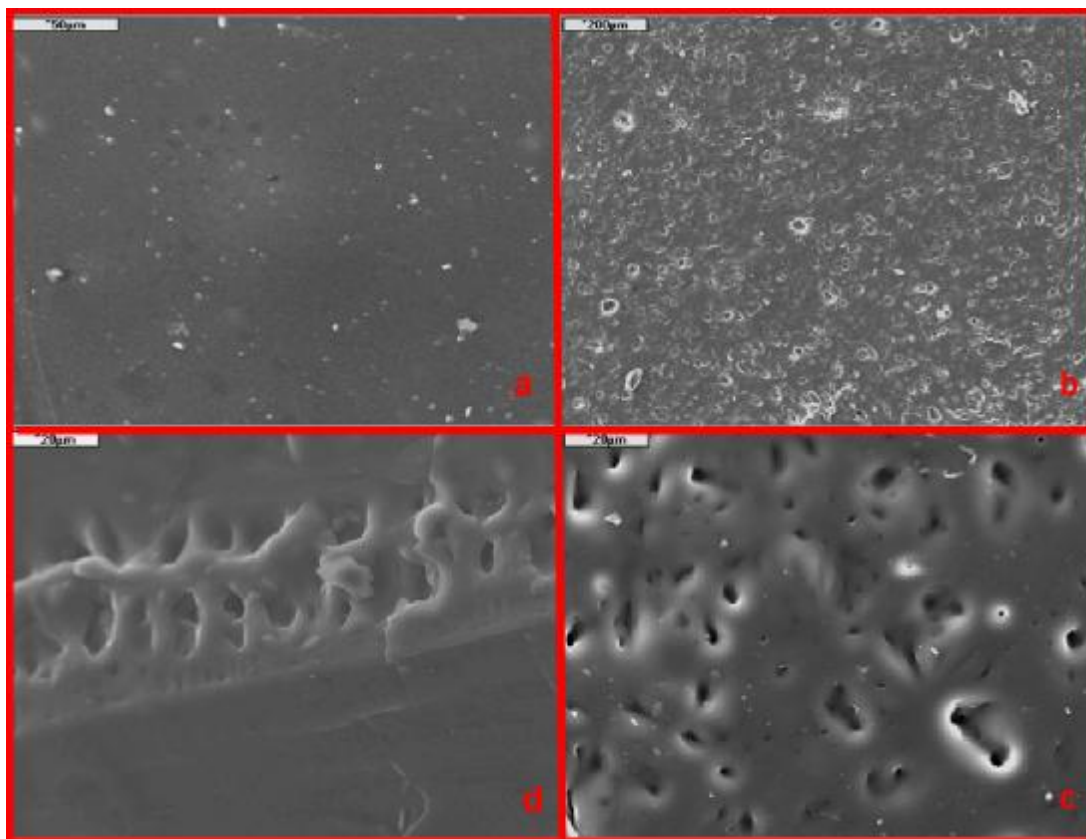
Dodatek biopolimeru w postaci włókien do materiału kompozytowego zmodyfikowanego wcześniej węglową fazą włóknistą wpływa na mikrostrukturę: podnosi chropowatość i niejednorodność powierzchni. Po etapie usuwania porogenu włóknistego (rozpuszczanie i wypłukiwanie włókien NaAlg), materiał membranowy charakteryzuje się mikrostrukturą wypukłą modelowaną przez włókna węglowe i mikrostrukturą typu rewersowego będącej odbiciem fazy włóknistej, uzyskanej przez jej wypłukanie (Rys 90 a-c).



Rysunek 90. Mikrofotografie powierzchni: membrany kompozytowej M1 (a,b,c). Przekrój przez membranę (d)

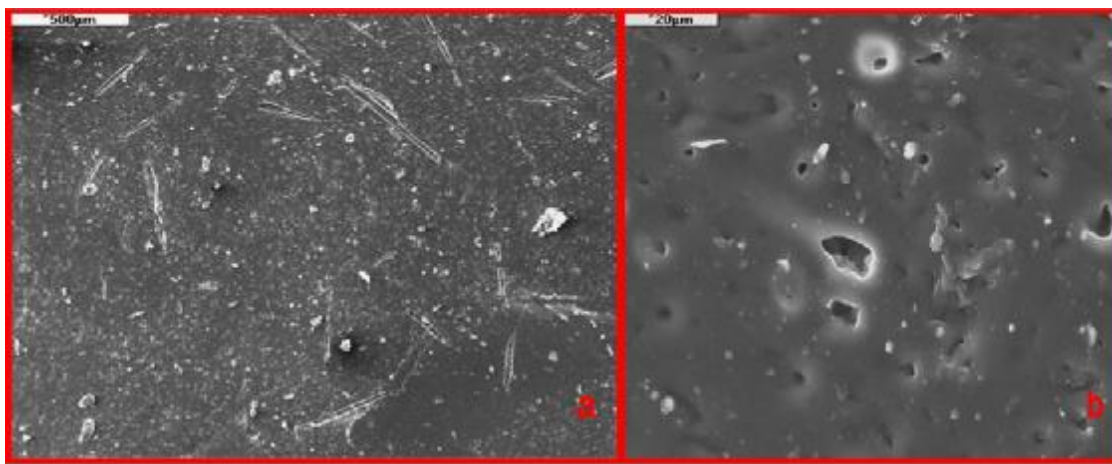
Jeśli porogiem jest alginianu sodu w postaci włókien, otrzymane pory są wydłużone, kształtem przypominające włókno (o średnicy podłużnej szacowanej na ok. 300 μm i średnicy poprzecznej szacowanej na 55-60 μm). Liczne są również pory okrągłe powstałe wskutek wymywania alginianu w postaci proszku powstającego w trakcie rozdrabniania włókien (ich średnica nie jest jednakowa szacuje się ją na ok. 1,5-7,5 μm (Rys 90).

W przypadku zastosowania jako porogenu, proszku soli sodowej kwasu alginowego, powierzchnie charakteryzują się jednorodnym rozkładem porów (Rys 91 a-b). Ich wielkość zależy od rozmiaru wyjściowego materiału biopolimerowego. Na powierzchni materiału membranowego M2 obecne są dwie frakcje porów: mniejsze o średnicy $1,12 \pm 0,75 \mu\text{m}$ i pory większe o średnicy $5,96 \pm 1,2 \mu\text{m}$. Kształt porów nie jest jednakowy a różnice w wielkości spowodowane są aglomeracją cząstek biopolimeru (wielkość cząstek proszku waha się od 500 – 5 μm).



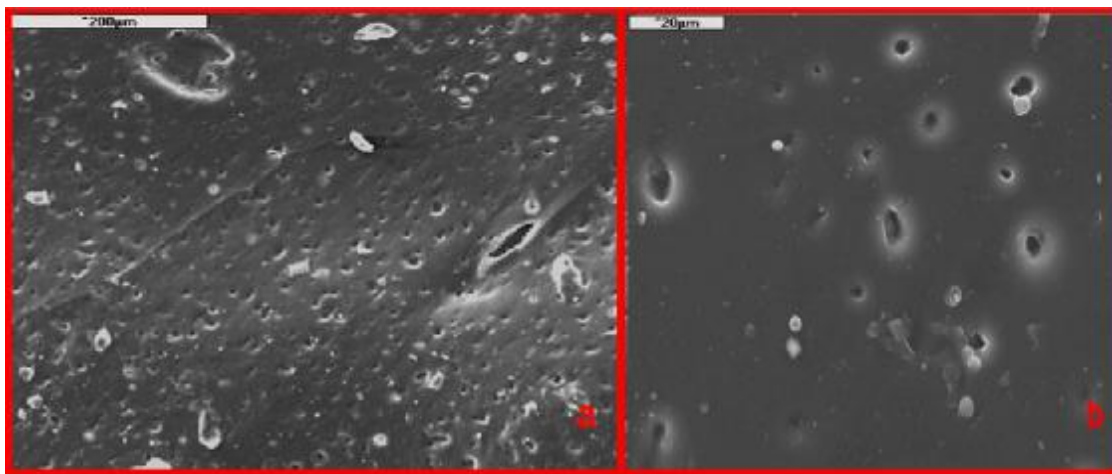
Rysunek 91. Mikrofotografie powierzchni: membrany kompozytowej M2 otrzymanej po usunięciu fazy z biopolimeru w postaci proszku NaAlg (a, b, c). Przekrój przez membranę (d)

Jeśli w osnowę syntetyczną wprowadzi się tylko jedną z faz: biopolimer w postaci włókien NaAlg, to otrzymana membranę M3, która odznacza się mniejszą w porównaniu do materiału modyfikowanego dodatkowo włóknem węglowym (M1) nierównością powierzchni (chropowatością mikroskopową), lecz zwiększona porowatością (dobra penetracja wody rozpuszczającej biopolimer w materiale M3). Na powierzchni materiału można wyróżnić trzy populacje porów o wielkościach mikrometrycznych: najmniejsza $d_1 = 1,56 \pm 0,59 \mu\text{m}$, średnią $d_2 = 7,32 \pm 1,25 \mu\text{m}$ i dużą $d_3 = 23,93 \pm 5,12 \mu\text{m}$. Mikrostruktura powierzchni membrany M3 przedstawiona jest na Rys 92.



Rysunek 92. Mikrostruktura membrany M3, włókno alginianowe - PTFE-PVDF-PP

Membrana powstała przez wypłukanie proszku biopolimerowego, M4, charakteryzuje się jednorodnym i równomiernym rozmieszczeniem porów i ich wielkością. Na powierzchni wyróżnić można dwie mikrometryczne populacje porów o średnicach: $d_1 = 1,12 \pm 0,37 \mu\text{m}$ i $d_2 = 5,96 \pm 1,59$. Kształt porów jest zróżnicowany, zależny od kształtu cząstek i aglomeratów proszku NaAlg (obecne pory kuliste, owalne i lejkowate). Mikrostrukturę powierzchni membrany M4 przedstawia Rys 93.



Rysunek 93. Mikrostruktura membrany M4 (proszek NaAlg - PTFE-PVDF-PP), a-dno szalki, b-góra szalki

4.3.4 Porowatość, rozwinięcie powierzchni materiałów membranowych

Obserwacje mikrostruktury powierzchni wskazały, że rozmieszczenie, wielkości i kształt porów znacznie różnią się od siebie. Analizę wielkości udziału porów dokonano przy zastosowaniu: metody siatki (ze zdjęć mikroskopowych) natomiast rozwinięcie powierzchni oceniano metodą BET. Wyniki zebrano w Tabeli 18.

Tabela 18. Wielkości porów i rozwinięcia powierzchni dla membran kompozytowych: M1, M2.

	Metoda siatki		BET
Nazwa próbki	Wielkość porów [μm]	Udział porów [%]	Rozwinięcie powierzchni [m ² /g]
M1	6,17±1,64	29,74±1,89	4,53±0,16
M2	4,12±0,96	31,09±1,41	5,72±0,65

Obie badane membrany charakteryzują się podobną porowatością i zbliżonym rozwinięciem powierzchni. Większe pory obserwuje się w przypadku, gdy porogiem były rozdrobione włókna alginowe, natomiast membrana otrzymana przez usuwanie proszku alginowego ma pory mniejsze, lecz charakteryzuje się wyższym rozwinięciem powierzchni.

4.3.5 Podsumowanie badań fizykochemicznych powierzchni

Przeprowadzone badania wykazały, że alginian sodu stanowić może porogen, który wykorzystać można do otrzymywania membran. Usuwanie porogenu na drodze rozpuszczania alginianu w środowisku wodnym, umieszczonego w matrycy polimerowej nadaje jej z jednej strony określoną porowatość zależną od geometrii cząstek organicznych z drugiej modyfikuje chemicznie powierzchnię membrany.

4.4 Badanie odpowiedzi komórkowej na powierzchnie materiałów kompozytowych

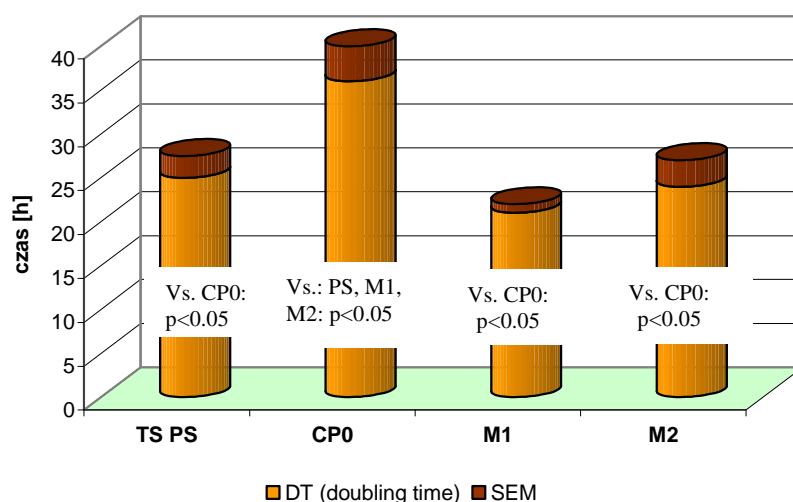
Materiały otrzymane w toku dwustopniowej obróbki poddano kontaktowi z linią osteoblastów ludzkich MG-63. Odpowiedź komórkową analizowano na podstawie badania aktywności podziałowej komórek na powierzchniach badanych sprawdzono w metodzie kontrolującej zdolności DNA do powielania się (inkorporacja DNA, test DT). Zbadano stopień proliferacji i przeprowadzono obserwację morfologii komórek na powierzchniach badanych materiałów (barwienie PI).

Badania przeprowadzono dla dwóch membran różniących się postacią porogenu: M1 (włókna NaAlg) i M2 (proszek NaAlg).

4.4.1 Aktywność komórek MG-63. Test BrdU

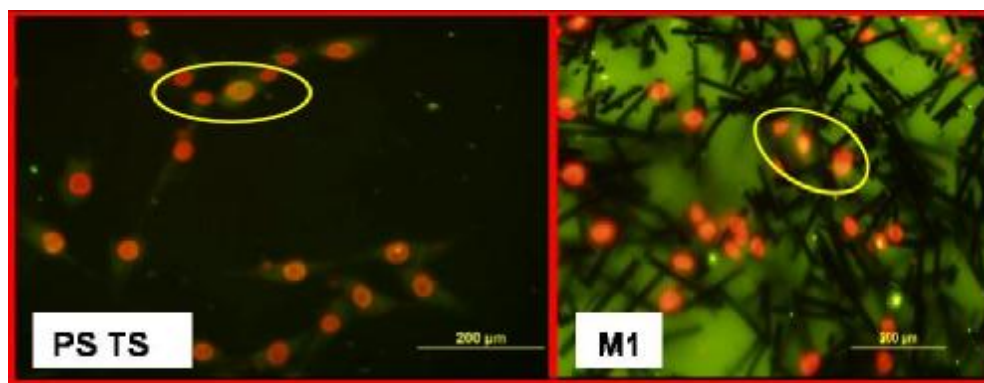
O zdolności komórek kostnych do proliferacji wnioskować można na podstawie testu BrdU. Metoda ta określa czas, w którym następuje podwojenie ilości DNA, następujący tuż przed podziałem mitotycznym komórki. Im krótszy czas potrzebny do syntezy materiału genetycznego osteoblastu, tym szybciej nastąpi proces podziałowy (mitoza) i tym szybciej dojdzie do powiększenia ilości komórek na powierzchni materiału. Do analizy danych zastosowano metodę statystyczną ANOVA. (poziom istotności 0,05).

Dla badanych materiałów M1 i M2 czas podwojenia ilości DNA jest niższy niż czas konieczny do podwojenia materiału genetycznego w komórkach kontaktowanych z powierzchnią folii polimerowej (Rys 94).



Rysunek 94. Czas potrzebny do powielenia ilości DNA, na powierzchniach badanych materiałów

Wizualną metodą detekcji podwojonego DNA w komórkach kostnych było zastosowanie barwienia jąder komórkowych. Stan komórki świadczący o podwojeniu łańcucha DNA jest obserwowany w mikroskopie fluorescencyjnym. Osteoblasty wybarwione na pomarańczowo są gotowe do rozpoczęcia cyklu podziałowego (Rys 95).

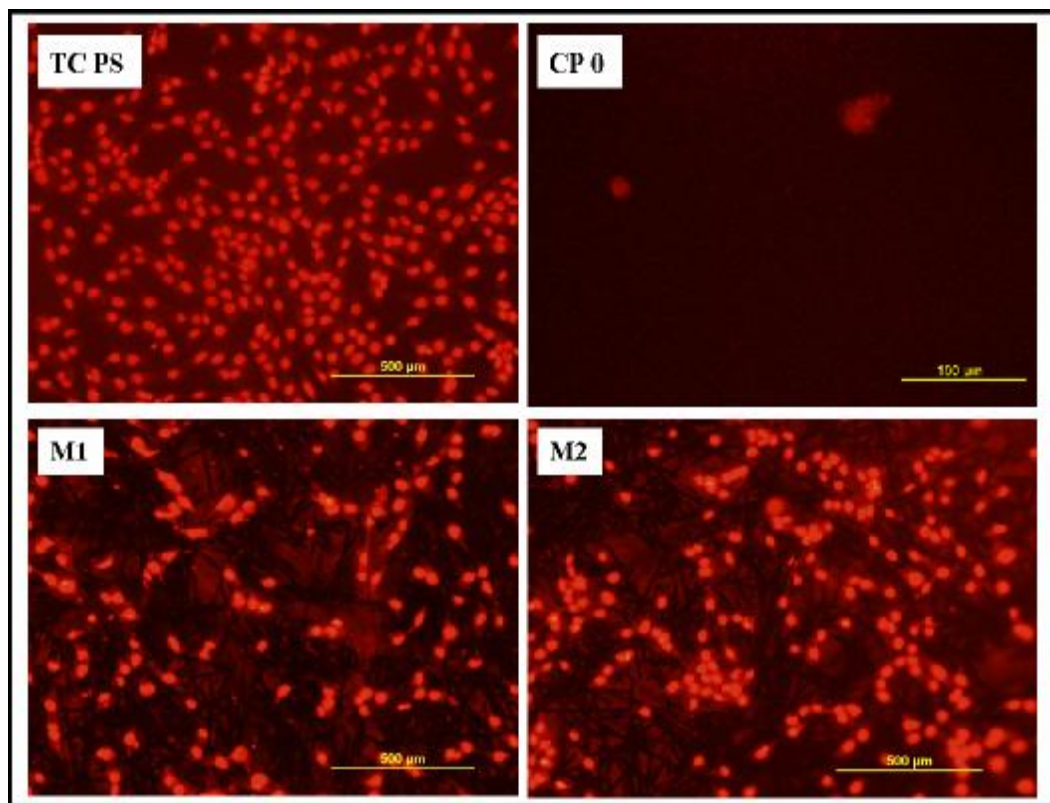


Rysunek 95. Osteoblasty o podwojonej ilości DNA, przygotowane do fazy podziałowej (zaznaczono obręczą)

4.4.2 Prolifерacja komórek linii MG-63

Stopień proliferacji komórek linii MG-63 prowadzono w trzech odstępach czasowych: po 1, 3 i 7 dniach, każdorazowo zliczano komórki na powierzchni syntetycznego materiału (badano przyrost populacji) a następnie prowadzono obserwacje mikroskopowe, określając kształt i morfologię osteoblastów. Badania przeprowadzono na dwóch membranach kompozytowych M1 i M2 oraz na samym polimerze.

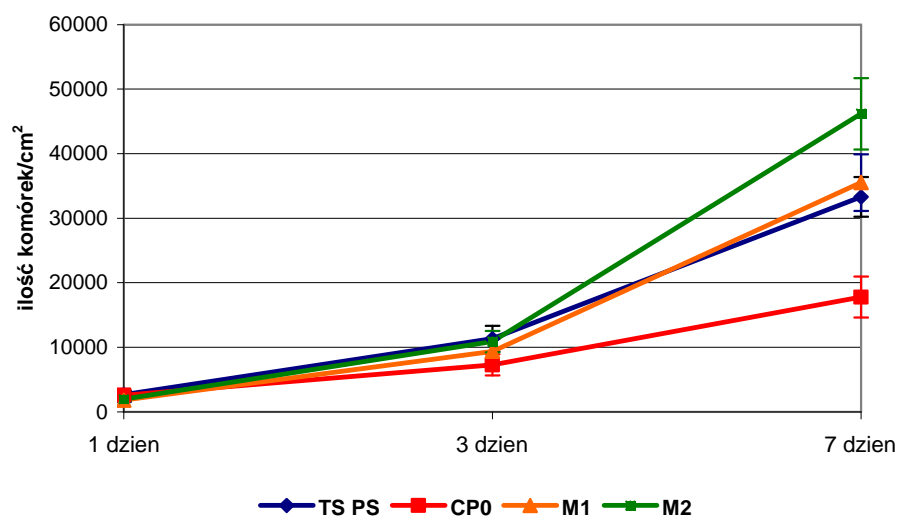
Po pierwszym dniu najlepsze wyniki otrzymuje się dla membrany M1 i M2 natomiast słabą adhezję obserwuje się na powierzchni folii polimerowej. Komórki adhezujące do powierzchni membran wykazują ponadto dobre rozplaszczanie i prawidłową morfologię, identyczną jak komórki na powierzchni TC PS (Rys 96).



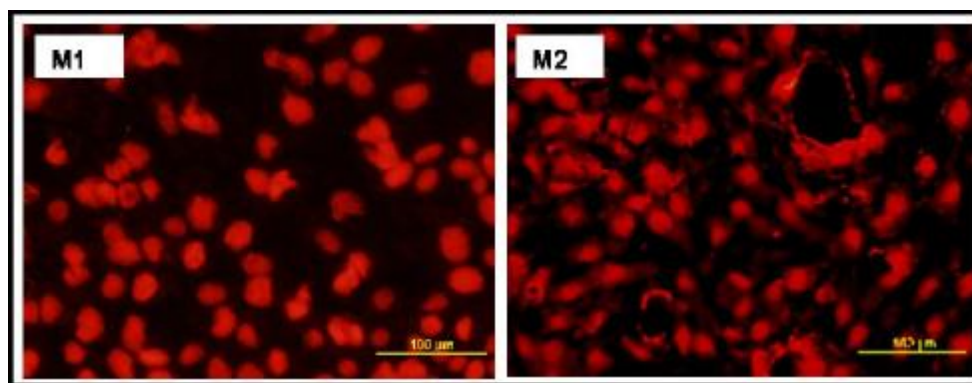
Rysunek 96. Morfologia komórek MG 63 po 24h inkubacji na powierzchniach badanych materiałów

Wprowadzenie do syntetycznej osnowy polimerowej, włóknistej fazy węglowej a dodatkowo włóknistej fazy organicznej (NaAlg), która jest jednocześnie porogiem inicjującym powstanie porów o różnym rozmiarze i kształcie nadaje materiałowi specyficzne parametry powierzchni zmodyfikowanej nie tylko mikrostrukturalnie, ale też chemiczne (warstwa alginianu niejednorodnie pokrywająca powierzchnię) poprawiające proliferację komórek MG-63 (Rys 97). Komórki proliferują bardzo aktywnie na materiałach

membranowych, adherując nie tylko na powierzchnie o topografii wypukłej (pomiędzy włókna węglowe), ale także w miejsca blisko porów (Rys 98).



Rysunek 97. Krzywe wzrostu komórek na badanych materiałach kompozytowych



Rysunek 98. Adhezja osteoblastów na materiałach membranowych CP8 i CP6.

Jak wynika z badań biologicznych membrany otrzymane na drodze wypłukiwania z matrycy polimerowej porogenu w postaci alginianu sodu posiadają dobre właściwości biologiczne. Charakteryzują się wysoką proliferacją wyższą niż obserwowana w próbce kontrolnej.

4.4.3 Podsumowanie

Uzyskane materiały membranowe, formowane na bazie polimeru syntetycznego PTFE-PVDF-PP, poprzez wprowadzenie w jego osnowę fazy rozpuszczalnej organicznej – alginianu sodu, stanowi nową metodę otrzymywania materiałów membranowych. Porowatość struktury można kontrolować poprzez wielkość cząstek i postać biopolimeru wprowadzanego do syntetycznej matrycy.

Obecność włókien węglowych modeluje topografię powierzchni (nadaje jej charakter wypukły) a organiczny porogen stanowi dodatkowe źródło nierówności o kształcie i rozmiarze zależnym od postaci fazy organicznej (wymywany materiał nadaje teksturze chropowatość wklęsłą).

Węglowa faza włóknista poprawia biozgodność materiału szczególnie w odniesieniu do komórek kostnych i zwiększa rozwinięcie powierzchni membrany. Alginianu sodu rozpuszczając się w środowisk wodnym adhezuje do powierzchni membrany pokrywając ją cienką warstwą. Zjawisko to może okazać się istotnym ze względu na budowę chemiczną polisacharydu (NaAlg) i jego zbliżone właściwości do glikozaminoglikanów (GAG) występujących naturalnie w macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM). Dowodem jest tu silna proliferacja komórek osteoblastopodobnych MG-63 na powierzchniach membran M1 i M2.

Wnioski

Wyniki, uzyskane w pracy wskazują, że włókniste fazy zarówno nieorganiczne jak i organiczne stwarzają nowe możliwości w zakresie sterowania biogodnością tworzyw implantacyjnych. Włókna wprowadzane do matrycy polimerowej, wykorzystane mogą być do nadawania powierzchniom tworzyw kompozytowych topografii, wpływającej na kierunkową adhezję i proliferację komórek kostnych.

Z badań materiałów zawierających włókna węglowe wynika że nie tylko topografia i energia powierzchniowa decyduje o odpowiedzi komórkowej. Wyniki badań odporności na deformację badanych próbek wskazują, że elastyczność powierzchni tworzywa (twardość) wydaje się być parametrem o istotnym znaczeniu w odpowiedzi komórkowej(adhezja do powierzchni)oraz, że parametr ten można w szerokim zakresie modyfikować przy zastosowaniu włókien węglowych. Włókna, zwłaszcza o rozmiarach poniżej mikrometra modyfikować mogą polimer na poziomie molekularnym prowadząc tym samym do zmiany energii powierzchniowej materiału a także zmianę jego właściwości mechanicznych.

Zastosowanie organicznych włókien alginowych do modyfikacji osnowy polimerowej poprawia biogodność materiałów z komórkami kostnymi. Polisacharydy w postaci włókien mogą być zarówno wykorzystane podobnie jak włókna węglowe, do nadawania określonej topografii materiałom kompozytowym, mogą być wykorzystywane jako biogodny porogen modyfikujący chemicznie polimer.

Kompozyty będące przedmiotem badań, oparte o osnowę stabilnego polimeru stanowić mogą materiał wyjściowy do konstrukcji implantów kostnych jak i membran GBR/GTR. Obecność włókien węglowych osnowie polimerowej wpływa na adhezję osteoblastów a że połączenie resorbowalnego alginianu sodu z stabilnym polimerem pozwala na modyfikację powierzchni tego ostatniego przez zmianę jego zwilżalności. Alginiany mogą wreszcie stanowić jak wykazano cenny biogodny, porogen który równocześnie tworzy podsieć porów, ale także modyfikuje hydrofobową powierzchnię polimerowej matrycy.

Otrzymane tworzywo pozbawione jest również niedogodności, jakie niesie ze sobą stosowanie czystego polisacharydu (tworzenie się żeli z obecnymi w warunkach roztworów wodnych - jonami wapnia znajdującymi się, szybka degradacja, obniżenie wytrzymałości materiału). Wprowadzenie alginianów w postaci włókien, których tylko niewielka część (fragmenty włókien, produkty ich degradacji) nie jest pokryte warstwą polimeru sprawia, że otrzymany implanty jest wielofunkcyjny. Cechuje go określona topografia, którą determinuje obecność włókna biopolimerowego, ale jednocześnie mogącego stanowić źródło dla uwalniających się leków lub innych aktywnych biomolekuł (ze względu na rozpuszczalność alginianów porowatość środowisku biologicznym).

Badania biologiczne dowiodły, że modyfikacja polimeru włóknem wpływa na odpowiedź komórek kostnych, co pozwala na potwierdzenie doniesień o wpływie fazy włóknistej (jako fazy o charakterze biomimetycznym) na odpowiedź komórkową.

Literatura

- ¹ M. Nałęcz, *Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna, tom 4*, S. Błażewicz, L. Stoch, *Biomateriały*, Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, Warszawa 2003
- ² Materiały Konferencyjne, *New developments on polymers for tissue engineering: replacement and regeneration*, Madeira, Portugal 2006
- ³ E. Wintermantel and J. Mayer, *Anisotropic biomaterials strategies and developments for bone implants*, in *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*, Prat – B, eds D. L. Wise, D. J. Trantolo, D. E. Actobelli, J. D. Yaszemski, J. D. Gresser and E. R. Schwarz, New York, Marcel Dekker 1995, pp 3-42
- ⁴ K. Rezwani, Q.Z. Chen, J.J. Blaker, Aldo Roberto Boccaccinia, *Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffold for bone tissue engineering*, *Biomaterials* 27 (2006) 3413-3431
- ⁵ K. Tayton and J. Bradley, *How stiff should semi-rigid fixation of the human tibia be?* *J Bone and Joint Surg*, 65-B, (1983) 312-315
- ⁶ R. Będziński, *Biomechanika inżynierska. Zagadnienia wybrane*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1997
- ⁷ S.M. Reaa, R.A. Brooks, S.M. Best, T. Kokubo, W. Bonfield, *Proliferation and differentiation of osteoblast-like cells on apatite-wollastonite/polyethylene composites*, *Biomaterials* 25 (2004) 4503-4512
- ⁸ P. Ducheyne, Q. Qui, *Bioactive ceramics: The effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function*, *Biomaterials* 20 (1999) 2287-2303
- ⁹ Allison A. Campbell, *Bioceramics for implant coatings*, *Materials Today*, 6 (2003) 26-30
- ¹⁰ Z. Święcicki; Interaction between ceramic material and bone tissue, *Szkło i Ceramika*, 6 (1993), 11-17
- ¹¹ C. Migliaresi, H. Alexander; *Composites*, Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen, Jack E. Lemons, *Biomaterials Science*, An Introduction to Materials in Medicine; 2nd edition, New York 2000
- ¹² E. L. Chaikof, H. Matthew, J. Kohn, A. G. Mikos, G. D. Prestwich, C. M. Yip, *Biomaterials and scaffolds in reparative medicine*, *Ann NY Acad Sci* 961 (2002) 96-105
- ¹³ B. Gesser, *About composite materials and their use in bone surgery*, *Injury, Int. J Care injured* 31 (2000) S-D48-53
- ¹⁴ D. Taylor, *Hard and soft tissue mechanics. Comprehensive structure Integrity*, Vol 9 Bioengineering, eds S. H. Teoh and Y-W. Mai, Elsevier Science Publisher UK 2003
- ¹⁵ J. Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, P. Zioupo, *Mechanical properties and the hierarchical structure of bone* *Medical Engineering & Physics* 20 (1998) 92-102
- ¹⁶ M. Tzaphlidou *The role of collagen in bone structure: An image processing approach Review*, *Micron* 36 (2005) 593-601
- ¹⁷ H. K. Genant, C. Gordon, Y. Jiang, F. Lang, M. Link, S. Majumdar; *Advanced Imaging of Bone Macro and Micro Structure*, *Bone* Vol. 25, No. 1, (1999) 149-152
- ¹⁸ J. D. Curry, *The mechanical adaptation of bones*, *Bone* 32 (1982) 276-182
- ¹⁹ J. Kikuschi, A. Ikeda, M. Hashizume, *Biomimetic Materials. Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, 96-102, ed. by Marcel Dekker, New York 2004
- ²⁰ P. Ducheyne, Q. Qiu, *Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function*, *Biomaterials* 20 (1999) 2287-2303
- ²¹ L. W. Peters, F. Lehmann, A. Schilling, K. Schwarz, M. Amling, *Biologically and chemically optimized composites of carbonated apatite and polyglycolide as bone substitution materials*, *J Biomed Mater Res* 54 (2001), 162-71
- ²² L. Lu, A. Mikos, *The importance of New processing techniques in tissue engineering*, *MRS Bull*, 21 (1996), 28-32
- ²³ A. Rus, M. Wei, C. Sorell, M. Dickson, A. Brantwood, B. Mitthope, *Sintering effects on the strength of hydroxyapatite*, *Biomaterials* 16 (1995) 409-415
- ²⁴ X. Wang, Y. Li, J. Wei, K. de Groot, *Development of biomimetic nano-hydroxyapatite/poly(hexamethylene adipamide) composites*, *Biomaterials* 23 (2002) 4787-4791
- ²⁵ T. Mikołajczyk, S. Rabiej, M. Boguń, *Analysis of structural parameters and influence of mechanical properties of PLLA fibres containing nanohydroxyapatite*, *Fibres & Textile in Eastern Europe*, 13-1 (49) 2005, 28-14
- ²⁶ X. M. Mo, C. Y. Xu, M. Kotaki, S. Ramakrishna, *Electrospun P(LL-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation*
- ²⁷ H. Fong, I. Chun, D. H. Reneker, *Beaded nanofibers formed during electrospinning process*, *Polymer* 40 (1999) 4585-4592

- ²⁸ B. H. Reneker, W. Khatapinan, A. Theron, E. Zussman, A. L. Yarin, Nanofiber garlands of PLC by electrospinning, *Polymer* 43 (2002) 6785 - 6794
- ²⁹ C. M. Stanford, M. Solursh, J. C. Kelner, Signification role of adhesion properties primary osteoblast-like cells in early adhesion events for chondroitin sulfate and dermatan sulfate surface molecules, *J Biomed Mater Res* 86 (1999) 345-352
- ³⁰ D. Modrowski, A. Lomri, P. J. Marie, Glicosaminoglycans bind granulocytemacrophage colony-stimulating factor and modulate its mitogenic activity and signaling in human osteoblastic cells, *J Cell Physiol* 177 (1998) 187-195
- ³¹ S. H. Rhee, Y. Suetsugu, J. Tanaka, Biomimetic configurational of hydroxyapatite nanocrystals on bio-organics, *Biomaterials* 22 (2001) 2843-2847
- ³² S. H. Rhee, J. Tanaka, Synthesis of a hydroxyapatite/collagen/chondroitin sulfate nanocomposite by a novel precipitation method, *J Am Ceram Soc* 21 (2001) 3261-3268
- ³³ Ditmar W. Huttmacher, *Scaffold in tissue engineering bone and cartilage*, *Biomaterials* 21 (2000) 2529 - 2543
- ³⁴ B.L. Seal et al, *Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration*, *Materials Science and Engineering Research* 34 (2001) 147-230
- ³⁵ Joanna S. Temenoff, Anonios G. Mikos, *Review tissue for regeneration of articular cartilage*, *Biomaterials* 21 (2000) 431-440
- ³⁶ T. Tanazaka, M. Assutan; *Guided Tissue Regeneration. Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, 456-482, ed. by Marcel Dekker, New York 2004
- ³⁷ M. Kikuchi, Y. Koyama, Y. Yoshihisa, Y. Imamura, T. Okada, N. Shirahama, *Development of guided bone regeneration membrane composed of β -tricalcium phosphate and poly (L-lactide-co-glycolide-co- ϵ -caprolactone) composites*, *Biomaterials* 25 (2004) 5979-5986
- ³⁸ A. Piattelli, A. Scarano, P. Russo, S. Matarasso, *Evaluation of guided bone regeneration in rabbit tibia using bioresorbable and non-resorbable membranes*, *Biomaterials* 17 (1996) 791-796
- ³⁹ Aslan M. Simsek G. Dayi E. *Guided Bone Regeneration (GBR) on healing bone defects: a histological study in rabbits*, *J. Contemp Dent Pract* 5 (2004) 1-7
- ⁴⁰ A. Piattelli, A. Scarano, M. Paolantonio, *Bone formation inside the material interstices of e-PTFE membranes: a light microscopical and histochemical study in man*, *Biomaterials* 17 (1996) 1725-1731
- ⁴¹ K. Fujihara, M. Kotaki, S. Ramakrishna, Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers, *Biomaterials* 26 (2005) 4139-4147
- ⁴² S. Zhao, E. M. Pinholt, J. E. Madsen, K. Donath, *Histological evaluation of different biodegradable and non-biodegradable membranes implanted subcutaneously in rats*, *J Cranio-Maxillofac Surg* 28 (2000) 116-122
- ⁴³ Jay P. Malmquist, *Successful Implant Restoration with the Use of Barrier Membranes*, *J Oral Maxillofac Surg* 57:1 114-116, 1999
- ⁴⁴ G. Biedrzyńska-Macyszyn, H. Majchrzak, M. Maliszewski, M. Tymowski, P. Lelek, *Próba zastosowania błony przeciwrostowej Gore-Tex w operacjach dyskopatii lędźwiowych*, *Neurol Neurochir Pol* 38 (2004) 271-277
- ⁴⁵ U. Klinge, B. Klosterhalfen, A. P. Öttinger, K. Junge, V. Schumpelick, *PVDF as a new polymer for the construction of surgical meshes*, *Biomaterials* 23 (2002) 3487-3493
- ⁴⁶ Materiały Konferencyjne, *4th International Congress of the Vascular Access Society, Expanded ePTFE Vascular Prostheses*, Berlin 2005
- ⁴⁷ F. Watziger, J. Lukasch, W. Millesi, C. Schopper, J. Neugebauer, D. Moser, R. Ewers *Guided bone regeneration with titanium membranes: A clinical study* *Br J Oral Maxillofac Surg* 38-4 (2000) 312-315
- ⁴⁸ W. Bruser, U. Breagger, N. P. Lang, S. Nyman, *Regeneration and enlargement of jaw bone using guided bone regeneration*, *Clin Oral Medical Research* 1 (1990) 22-32
- ⁴⁹ L. Sonder, E. V. G. Frandsen, D. Arnbjerg, K. Warren, T. Karring, *Effect of local metronidazole application on periodontal healing following guided tissue regeneration. Clinical findings*, *J Periodontol* 65 (1994) 914-920
- ⁵⁰ E. Sandenberg, C. Dahlin, A. Linde, *Bone regeneration by the osteopromotion technique using bioabsorbable membranes: an experimental study in rats*, *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 51 (1993) 1106-1114
- ⁵¹ Ditmar W. Huttmacher, M. B. Hurzeler, H. Schliephake, *A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications*, *J of Cranio-Maxillofacial Surgery* 11 (1996) 667-678
- ⁵² C. Schopper, D. Moser, F. Wanschitz, *Histomorphometric findings on human bone samples six months after bone augmentation of maxillary sinus with Aligipore*, *Int J Long Term Effect Med. Implants* 12 (1999) 365-370
- ⁵³ J. P. Schmitz, R.R. Lemk, G. Zardeneta, J. O. Hollinger, S.B. Milam *Isolation of Particulate Degradation Debris 1 Year After Implantation of a Luidor Membrane for Guided Bone Regeneration: Case Report*, *J Oral Maxillofac Surg* 32 (1998) 243-251
- ⁵⁴ A.K. Lundgren, L. Sennerby, D. Lundgren, *Guided jaw-bone regeneration using an experimental rabbit model*, *International J Oral Maxillofacial Surgery* 27 (1998) 135-140

- ⁵⁵ A. K. Lundgren, D. Lundgren, L. Sennerby, *Augmentation of intramembraneous bone beyond the skeletal envelope using an occlusive titanium barrier. An experimental study in the rabbit*, Clinical Oral Implants Research 6 (1995) 67-72
- ⁵⁶ L. D. Carlson –Mann C. G. Ibbott, R. B. Griemann, *Ridge augmentation with guided bone regeneration and GTAM case illustrations*, Probe, 30 (1996) 232-233
- ⁵⁷ H. Yoshimoto Y. M. Shin H. Terai, J. P. Vacanti, *A biodegradable nanofiber scaffold by eletrospinning and its potential for bone tissue engineering*, Biomaterials 25 (2004) 2077-2082
- ⁵⁸ J. A. Jansen J. E. de Ruiter, P.T. M. Jansen, Y. G. Paquay *Histological evaluation of biodegradable PLA/HAP membrane*, Biomaterials 16 (1995) 819-827
- ⁵⁹ C. Durucan, P. W. Brown, *Low temperature formation of calcium deficient hydroxyapatite-PLA/PGLA composite*, J Biomed Res 51 (2000) 717-725
- ⁶⁰ S. J. Lee, Y. J. Park, S. N. Park, Y. M. Lee, Y. J. Seol, Y. Ku, C. P. Chung, *Molded porous poly (L-lactide) membrane for guided bone regeneration with enhanced effect by controlled growth factor release*, J Biomed Res 55-3 (2001) 295-303
- ⁶¹ Y. Ueyama, K. Ishikawa, T. Mano, T. Koyama, H. Nagatsuka, K. Suzuki, K. Ryoke, *Usefulness as guided bone regeneration membrane of the alginate membrane*, Biomaterials 23 (2002) 2027-233
- ⁶² M. Żenkiewicz, *Adhezja i modyfikowanie warstwy wierzchniej tworzyw*, Wydawnictwo WT, Warszawa 2002
- ⁶³ J. D. Smart, *Bioadhesion, Encyclopedia of Biomaterials and Biomedicla Engineering*, 62-71, ed. by Marcel Dekker , New York 2004
- ⁶⁴ Buddy D. Ratner, Frederick J. Schoen, Allan S. Hoffman, Jack E. Lemons; *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. Surface properties and surface characterization of materials*, Elsevier Science & Technology Books, 40-62, 2nd 2002
- ⁶⁵ G. Starzyński, *Rola warstwy wierzchniej i jej modelowanie*, IPPT, PAN – wykład monograficzny
- ⁶⁶ Polska Norma: *Warstwa wierzchnia. Terminologia*, PN-87/M-04250
- ⁶⁷ S. Harding, S. Davis, M. Deacron, M. Fiebrig; *Biopolymer mucoadhesives*, Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 16 (1999) 41-85
- ⁶⁸ J. A. Jansen, A. von Recum; *Textured and porous materials; Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Elsevier Science & Technology Books, 218-224, 2nd 2002
- ⁶⁹ A. Curtis, C. Wilkinson; *Topographical control of cells*, Biomaterials 18(1997) 1573-1583
- ⁷⁰ R. Lanza, R. Langer, W. Chick, *Principles of Tissue Engineering*, San Diego 1997
- ⁷¹ C-J. Hsieh, *Studies on surface modification of materials for tissue engineering applications*, Phd – Thesis, National Tsing Hua University, Taiwan, 2002
- ⁷² C. J. Wilson, R. E. Clegg, D. J. Leaversly, M. J. Percy, *Modification of biomaterials – cell interaction by adsorbed proteins. Review*, Tissue Engineering 11, 1-2 (2005) 1-18
- ⁷³ M. J. Percy, *Characteristics of the Surfaces of Biomaterials*, MIT OpenCourseWare, Massatchusette Institute of Technology – Surface Summer Course 2004
- ⁷⁴ L. Sobczyk, *Chemia Fizyczna – praca zbiorowa*, Warszawa 1980, PWN
- ⁷⁵ R. Shuttleworth; *Physicochemical aspects of surface*, Proc. Phys. Soc 63 (1956) 444-462
- ⁷⁶ B. Jańczuk, *Wiadomości Chemiczne* 49 (1995) 5-8
- ⁷⁷ J. Martin, Z. Schwartz, T. Hummert, D. Schraub, J. Simpson, *Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells MG-63*, J Biomed Meter Res 29 (1995) 389–401
- ⁷⁸ S. Affrossman, G. Henn, S. A. O'Neill, R. A. Pethrick, M. Stamm; *Surface topography and composition of deuterated polystyrene–poly(bromostyrene) blends*, Macromolecules 29 (1996) 5010–5016
- ⁷⁹ M.J. Dalby, D. Giannaras, M.O. Riehle, N. Gadegaard, S. Affrossman, A.S.G. Curtis; *Rapid fibroblast adhesion to 27nm high polymer demixed nano-topography*, Biomaterials 25 (2004) 77–83
- ⁸⁰ X. F. Walboomers, H. Croes, L. A. Ginsel, J. A. Jansen; *Contact guidance of rat fibroblasts on various implant materials*, J Biomed Mater Res 47 (1999) 204–12
- ⁸¹ T. Webster, R. Doremus, W. Siegel, R. Bizios, *Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics*, Biomaterials 21 (2000) 1803-1810
- ⁸² T. Webster, R. Siegel, R. Bizios, *Osteoblast adhesion on nanophase ceramics*, Biomaterials 20 (1999) 1221-1227
- ⁸³ M. Dettin, M. T. Conconi, R. Gambaretto, A. Bagno, *Effect of synthetic peptides on osteoblast adhesion* Biomaterials 26 (2005) 4507-4515
- ⁸⁴ O. Zinger, K. Anselmeb, A. Denzer, P. Habersetzer, M. Wieland, J. Jeanfils, P. Hardouin, D. Landolt; *Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography*; Biomaterials 25 (2004) 2695–2711
- ⁸⁵ O.Zinger, G.Zhao, Z.Schwartz, J.Simpson, M.Wieland, D.Landolt, B. Boyan, *Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features*, Biomaterials 26 (2005) 1837–1847

- ⁸⁶ M. Blazewicz, B. Czajkowska, L. Bacakova, E. Pamula, S. Blazewicz; Effect of chemical and topographical features of biomaterials surface on cell response; ECM 2004
- ⁸⁷ M. C. Siebers, X. F. Walboomers, J. A. Jansen, Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review, Biomaterials 26 (2005) 137-146
- ⁸⁸ K. Matsuzaka, F. Walboomers, M. Yoshinari, T. Inoue, J. Jansen, The attachment and growth behavior of osteoblast-like cells on microtextured surfaces, Biomaterials 24 (2003) 2711-2719
- ⁸⁹ M. Lampin, R. Warocquier-Clerout, C. Legris, M. Degrange, *Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration*, J Biomed Mater Res 36 (1997) 99-108
- ⁹⁰ M. Ask, J. Lusmaa, B. Kasemo; *Preparation and surface spectroscopic characterization of oxide films on Ti6Al4V*, Appl Surf Sci, 35 (1988) 283-301
- ⁹¹ P. Vezeau, G. Koorbusch, R. Draughn, J. Keller, *Effects of multiple sterilization on surface characteristics and in vitro biologic responses to titanium*, J Oral Maxillofac Surg 54 (1996) 738-746
- ⁹² A. S. Hoffman, J. A. Hubbell; *Surface-immobilized biomolecules. Biomaterials Science*, An Introduction to Materials in Medicine, Elsevier Inc 2004, 225-232
- ⁹³ S. Wu, *Polimer interface and adhesion*, Introduction 13-45, Marcel Dekker, New York 1982
- ⁹⁴ Buddy D. Ratner; d, S. Allan Hoffman, F. J. Schoen, *Biomaterials Science*, An Introduction to Materials in Medicine, Elsevier Inc 2004, 67-80
- ⁹⁵ B. D. Ratler, S. C. Yoon, *Polyuretan surface: solvent and temperature induced structural rearrangements*, Polymer Surf. Dyn. 12 (1988) 137-152
- ⁹⁶ F. Garbassi, M. Morra, E. Occhiello, *Dynamics of macromolecules: a challenge for surface analysis*, Surf. Interface Anal. 14 (1989) 585-589
- ⁹⁷ G. A. Samorjai; *Modern concepts of surface science and heterogeneous catalysis*; J. Phys. Chem. 94 (1990) 1013-1023
- ⁹⁸ G. A. Samorjai; *The flexible surface. Correlation between reactivity and restructuring ability*; Langmuir 7 (1991) 3176-3182
- ⁹⁹ J. A. Hubbell; *Biomaterials in tissue engineering*; Bio/Technology 13 (1995) 565-576
- ¹⁰⁰ M. Winkelmann, J. Gold, R. Hauter, B. Kasemo, D. Spencer; *Chemically patterned, metal oxide based surfaces produced by photolithographic techniques for studying protein- and cell-surface interactions I: Microfabrication and surface characterization*, Biomaterials 24 (2003) 1133-1145
- ¹⁰¹ C.A. Scotchford, M. Ball, M. Winkelmann, J. Vörös, C. Csucs, D. Brunette; *Chemically patterned, metal-oxide-based surfaces produced by photolithographic techniques for studying protein- and cell-interactions. II: Protein adsorption and early cell interactions*, Biomaterials 24 (2003) 1147-1158
- ¹⁰² S. P. Massia J. A. Hubbell; *An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin $\alpha\beta$ – mediated fibroblast preading and 140 nm for focal contact and stress fiber formation*; J. Cell Biol. 114 (1991) 1089-1100
- ¹⁰³ D. J. Irvine, A. Mayes, L. G. Griffith; *Nano-clustering of RGD peptides at surface using comb thin films*; J Biomacromol, 2 (2001) 85-94
- ¹⁰⁴ K. C. Chang, D. A. Hammer; *Adhesive dynamics simulation of sialyl-Lewis(x)E-selectin-mediated rolling in a cell-free system*; Biophys. J. 79 (2000) 1891-1902
- ¹⁰⁵ A. H. Zisch, U. Schenke, J. Schanse; *Covalent conjugated VEG fibrin matrices for endothelialisation*, J. Controlled Release 12 (2003) 101-113
- ¹⁰⁶ S. E. Sakiyama-Elbert, A. Pantich, J. A. Hubbell, *Development of growth factor fusion proteins for cell triggered drug delivery*, XXI Conference of Federation of American Societies for Experimental Biology, FASEB 15 (2003) 1300-1302
- ¹⁰⁷ W. G. McClung, D. Clapper, A. Anderson, D. Babcock, J. Brash; *Interaction of fibrinolytic system proteins with lysine – containing surface*, J Biomed. Mater. Res. 66A (2001) 795-801
- ¹⁰⁸ B. Dunlap, *Immobilized Biochemical and Affinity Chromatography*, ed. Plenum, New York 1974
- ¹⁰⁹ S. W. Kim, J. Feijan; *Methods for immobilization of heparin in critical review in biocompatibility*, D. Williams, ed. CRC Press, Boca Raton FL (1985) 229-260
- ¹¹⁰ A. S. Hoffman; *A review of the use of radiation plus chemical and biochemical processing treatments to prepare novel biomaterials*, J. Phys Chem. 18 (1987) 323-342
- ¹¹¹ W. R. Gambatz, A. S. Hoffman; *Functionalization of polymeric films by plasma polymerization of allyl alcohol and allylamine*, J. App. Polymer Sci. 42 (1988) 285-303
- ¹¹² J. Koperek, *Soluble biomedical polymers*, Polymer Med. 7 (1977) 191-198
- ¹¹³ D. L. Hern, J. A. Hubbell; *Incorporation of adhesion peptides into nonadhesive hydrogel useful for tissue engineering*, J. Biomed Mater. Res. 39 (1998) 266-276
- ¹¹⁴ V.I. Dyukova, N.V. Shilova, O.E. Galanina, A.Yu. Rubina, N.V. Bovin, *Design of carbohydrate multarrays. Review*, Biochimica et Biophysica Acta 1760 (2006) 603–609
- ¹¹⁵ A. S. Costa, R. L. Reis, *Immobilization of catalase on the surface of biodegradable starch-based polymers as a way to change its surface characteristic*, J Mater Sci; Materials in Medicine 15 (2004) 335-342

- ¹¹⁶ B. D. Ratner, *Characterization of graft polymers for biomedical applications*, J. Biomed. Mater. Res. 14 (1980) 665-687
- ¹¹⁷ A. Hoffman, G. Schmer, C. Harris, W. Kraft; *Covalent binding of biomolecules to radioation – grafted hydrogel on inert polymer surface*, J. Biomed. Mater. Res. 42A (1983) 532-541
- ¹¹⁸ T. A. Hobbert, A. S. Hoffman; *Bovine plasma protein adsorption od radiation – grafted hydrogel based on hydroxyethyl methacrylate and N-vinyl-pirrolidone*; App. Chem. And Protein Interface, 12 (1975) 230-254
- ¹¹⁹ B. D. Ratner, A. Chilkoti, G. Lopez; *Plazma deposition and treatment for biomaterials application*, (1990) 463-516
- ¹²⁰ G. P. Lopez. B. D. Ratner; *Substrate temperature effects of film chemistry in plasma deposition of organics. Nonpolymerization precursor*, Langmuir 7 (1991) 766-773
- ¹²¹ P. Meller, R. Peters, H. Ringsdorf; *Microstructure and lateral diffusion in monolayers of polymerizable amphiphiles*, Colloid Polymer Sci, 267 (1989) 97-107
- ¹²² J. A. Heyward, D. Chapman ; *Biomembrane surface as models for polymer design: the potential for heamocompatibility*, Biomaterials 5 (1984) 135-142
- ¹²³ A. Ulman, *Self-assembled monolayers of alkyltrichlorosilanes: building blocks for future organic materials*; Adv. Mater. 2 (1990) 573-582
- ¹²⁴ E. Cooper, L. Parker, C. A. Scotchford, S. Downes, G. J. Leggett, T. L. Parker, *The effect of alkyl chain length and terminal group chemistry on the attachment and growth of murine 3T3 fibroblasts and primary human osteoblasts on self-assembled monolayers of alkanethiols on gold*, J Mater Chem 10 (2000) 133-139
- ¹²⁵ Y. Ito, *Surface micropatterning to regulate cell functions*, Biomaterials 20 (1999) 2333-2342
- ¹²⁶ T. Masuda, K. Inoue; *Novel photo reactive surface modification technology for fabricates devices*, Trans Am. Soc. Artif. Internal Organs 36 (1995) 161-164
- ¹⁰ E. A. Vogler, *Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces*, Adv Colloid and Interface Sci, 74 (1998) 69-117
- ¹²⁷ R. E. Baier, L. Weiss, *Demonstration of the involvement of adsorbed proteins in cell adhesion and cell growth on solid surface*, Adv Chem Ser 145 (1975) 300-307
- ¹²⁸ T. Jay, M. L. Groves, L. Dustin, *Supported planar bilayers in studies on immune cell adhesion and communication. Review*, Journal of Immunological Methods 278 (2003) 19– 32
- ¹²⁹ E. Andrew, Alan K. Howe, R. L. Juliano, *Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth*, The Journal of Cell Biology 23 (1999) 737-744
- ¹³⁰ D. Cunliffe, C. A. Smart, C. Alexander, E. N. Vulfson, *Bacterial adhesion at synthetic surfaces*, Appl. Environ. Microbiol. 65 (1999) 4995-5002
- ¹³¹ W. Norde, *Proteins at solid surface*, Phisical chemistry of biological interface, eds Baszkin-Nord, Marcel Dekker, New York 2000
- ¹³² L. Henrich, J. C. Voegel, P. Schaaf, *Direct observation of the anchoring process during the adsorption of fibrinogen on a solid surface by force – spectroscopy mode atomic force microscopy*, Proc Natl Acad Sci USA 96 (1999) 6705-6710
- ¹³³ W. G. Pitt, K. Park, S. L. Cooper, *Sequential protein adsorption and thrombous deposition on polimeric biomaterials*, J Colloid Interface Sci 111 (1986) 343-362
- ¹³⁴ F. Grinnel, M. K. Feld, *Fibronectin adsorption on hydrophobic and hydrophilic surface detected by antibody binding and analyzed during cell adhesion in serum-containing medium*, J Biol Chem 257 (1982) 4888-4893
- ¹³⁵ A. L. Koenig, V. Gambillara, D. W. Grainger, *Correlating fibronectin adsorption with endothelia cell adhesion and signaling on polymer substrates*, J Biomed Mater Res 64-A (2003) 20-37
- ¹³⁶ B. Lassem, M. Malmsten, *Competitive protein adsorption at plasma polymer surface*, J Colloid Interface Sci 186 (1997) 9-16
- ¹³⁷ J. D. Andrade, V. Hlady, *Protein adsorption and materials biocompatibility: a tutorial review and suggested mechanisms*, Adv Polym Sci 79 (1986) 3-63
- ¹³⁸ D. H. Napper, *Steric stabilization*, J Colloid Interface Sci 58 (1977) 390-407
- ¹³⁹ A. S. G. Curtis, *The cell surface – its molecular role in morphogenesis*, Logos Press, London (1967) 105-110
- ¹⁴⁰ P. Bongrand, *Ligand – receptor interaction*, Rep Prog Phys 62 (1999) 921-968
- ¹⁴¹ P. Bongrand, G. I. Bell, *Cell-cell adhesion: parameters and possibilities mechanisms*, *Cell Surface Dynamics: Concept and Models*, eds: Perelson AS, DeLisi, Wiegej FW, Marcel Dekker, New York 1984, 459-493
- ¹⁴² J. N. Israelchivili, *Intermolecular and surface forces*, Academic Press, New York 1991
- ¹⁴³ J. N. Merhrishi, *Molecular aspects of the mammalian cell surface*, Progr Biophys Mol Biol 25 (1972) 3-70
- ¹⁴⁴ G. V. Sherbet, *The biophysical characterization of the cell surface*, Academic Press, London 1978

- ¹⁴⁵ C. Capo, F. Garrouste, A. M. Benoliel, P. Bongrand, R. Depieds, *Nonspecific binding by macrophages: evaluation of the influence of medium – range electrostatic repulsion and short – range hydrophobic interaction*, *Immunol Commun* 10 (1981) 35-43
- ¹⁴⁶ Z. W. Yu, T. L. Calvert, D. Leckband, *Molecular forces between membranes displaying neutral glycosphingolipids. Evidence for carbohydrate attraction*, *Biochemistry* 37 (1998) 1540-1550
- ¹⁴⁷ J. C. Cyster, D. M. Shotton, A. F. Williams, *The dimension of the T lymphocyte glycoprotein leukosianin and identification of linear protein epitopes that can be modified by glycosylation*, *EMBO J* 10 (1991) 893-902
- ¹⁴⁸ J. Vitte, A. M. Benoliel, P. Emeric, P. Bongrand, A. Pierres, *Beta 1 integrin mediated adhesion may be initiated by multiple incomplete bonds, thus accounting for the functional importance of receptor clustering*, *J Biophys* 86 (2004) 4059-4074
- ¹⁴⁹ M. Morra, C. Cassinelli, *Bacterial adhesion to polymer surfaces: a critical review of surface thermodynamic approaches*, *J Biomater Sci Polymer Edn* 9 (1997) 55-74
- ¹⁵⁰ A. W. Adamson, *Physical chemistry of surface*, ed Wiley, New York 1976
- ¹⁵¹ P. Bongrand, C. Copo, J. L. Mege, A. M. Benoliel, *Surface physics and cell adhesion. In physical basis of cell-cell adhesion*, ed Bongrand, CRC Press, Boca Raton (1988) 91-123
- ¹⁵² C. J. van Oss, R. F. Giese, *The hydrophilicity and hydrophobicity of clay minerals*, *Clays and Clay Minerals*, 43 (1995) 474-477
- ¹⁵³ C. J. van Oss, *Hydrophobicity of biosurfaces – origin, quantitative determination and interaction energies*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 5 (1995) 91-110
- ¹⁵⁴ C. K. Bower, M. A. Daeschel, J. McGuire, *Protein antimicrobial barriers to bacterial adhesion*, *J Dairy Sci* 81 (1998) 2771-2778
- ¹⁵⁵ Y. Liu, J. H. Tay, *Detachment forces and their influence on the structure and metabolic behaviour of biofilms*, *World J Microbiol Biotechnol* 17 (2001) 111-117
- ¹⁵⁶ D. F. Williams, *Definition in Biomaterials, Progress in Biomedical Engineering*, ed D. F. Williams, Progress in Biomedical Engineering, Publ. Elsevier Amsterdam 1987
- ¹⁵⁷ T. V. Kumari, U. Vasudev, A. Kumar, B. Menon, *Cell surface interaction in the study of biocompatibility*, *Trends Biomater Artif Organs* 15-2 (2002) 37-41
- ¹⁵⁸ R. I. Juliano, S. Haskil, *Signal transduction from the extracellular matrix*, *J Cell Biol* 120 (1993) 577-585
- ¹⁵⁹ T. Groth, P. Flack, R. R. Miethke, *Cytotoxicity of biomaterials – basic mechanisms and in vitro test method. Review*, *ATLA* 23 (1995) 790-799
- ¹⁶⁰ G. E. Wnek, G. L. Bowlin, *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, Marcel Dekker Inc, New York 2004, 79-89
- ¹⁶¹ Scott A. Guelcher, J. O. Hollinger, *An Introduction to Biomaterials*, The Biomedical Engineering Series, Taylor & Francis Group 2002
- ¹⁶² G. M. Harbers, D. W. Grainger, *Cell-Material Interaction: Fundamental Design Issues for Tissue Engineering and Clinical Considerations*, The Biomedical Engineering Series, Taylor & Francis Group 2002
- ¹⁶³ J. A. Sharp, *Containers and techniques for tissue culture, An introduction to animal tissue culture*, The Camelot Press LTD, Southampton 3 (1997) 16-47
- ¹⁶⁴ Norma Europejska: PN-EN ISO 10993-5 'Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Badania cytotoksyczności: metody in vitro'
- ¹⁶⁵ S. Stokłosowa, *Hodowla komórek i tkanek*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004
- ¹⁶⁶ G. R. Owen, D. O. Meredith, I. Gwynn, R. G. Richards, *Focal adhesion Quantification – a new assay of material biocompatibility: Review*, *European Cells and Materials* 9 (2005) 85-96
- ¹⁶⁷ B. D. Boyan, T. W. Hummer, D. D. Dean, Z. Schwartz, *Role of material surface in regulating bone and cartilage cell response*, *Biomaterials* 17 (1996) 137-146
- ¹⁶⁸ M. J. Coeho, M. H. Fernandes, *Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation*, *Biomaterials* 21 (2000) 1095-1102
- ¹⁶⁹ D. Kudelska-Mazur, M. Lewandowska-Szumieł, G. Benke, M. Kowlaski, J. Kolender, *Pozyskiwanie osteoblastów ludzkich do badań biomateriałów in vitro*, *Inżynieria Biomateriałów* 41-42 (2004) 51-58
- ¹⁶⁹ U. Meyer, A. Büchter, H. P. Wiesmann, U. Joos D. B. Jones, *Basic reactions of osteoblasts on structured material surfaces*, *European Cell and Materials* 9 (2005) 39-49
- ¹⁷⁰ T. Yamaguchi, O. Kifor, N. Chattopadhyay, E. M. Brown, *Expression of extracellular calcium (Ca²⁺) sensing receptor in the clonal osteoblast-like cell lines, UMR-106 and SAOS-2*, *Biochem Biophys Res Commun* 243 (1998) 753-757
- ¹⁷¹ R. O. Oreffo, J. T. Triffitt, *Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics*, *Bone* 25 (1999) 5-9
- ¹⁷² E. H. Burger, J. Klein-Nulend, A. van der Plas, P. J. Nijweide, *Function of osteocytes in bone – their role in mechanotransduction*, *J Nutr* 125 (1995) 2020-2023

- ¹⁷³ L. F. Cooper, T. Masuda, P. K. Yliheikkilä, D. A. Felton, *Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part II. In vitro studies*, Int J Oral Maxillofac Impl 13 (1998) 163-174
- ¹⁷⁴ L. C. Baxter, V. Frauchiger, M. Textor, I. Gwynn, R. G. Richards, *Fibroblast and osteoblast adhesion and morphology on calcium phosphate surfaces*, European Cells and Materials 12 (2000) 1-16
- ¹⁷⁵ H. M. Elegandy, M. E. Norman, A. R. Keaton, C. T. Laurencin, *Osteoblast-like cell (MC3T3-E1) proliferation on bioerodible polymers: an approach towards the development of bone-bioerodible polymer composite materials*, Biomaterials 14 (1993) 263-269
- ¹⁷⁶ A. E. Grigoriadis, J. N. Heersche, J. E. Aubin, *Continuously growing biopotential and monopotent myogenic, adipogenic and chondrogenic subclones isolated from the multipotential RCJ 3.1 clonal cell line*, Dev Biol 142 (1990) 313-318
- ¹⁷⁷ D. B. Jones, H. Nolte, J. G. Scholubbers, E. Turner, D. Veltel, *Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast-like cells*, Biomaterials 12 (1991) 101-109
- ¹⁷⁸ R. Macenari, *The response of primary rat and human osteoblasts and an immortalization rat osteoblast cell line to orthopaedic materials: comparative sensitivity of several toxicity indices*, J Mat Sci: Mater Med 8 (1997) 105-111
- ¹⁷⁹ J. E. Aubin, *Advances in the osteoblast lineage*, Biochem Cell Biol 76 (1998) 899-910
- ¹⁸⁰ T. Rae, *Cell biochemistry in relation to the inflammatory response to foreign materials*, In Fundamental Aspects of Biocompatibility, ed Williams (1981) 159-181
- ¹⁸¹ R. G. Richards, *The effect of surface roughness on fibroblast adhesion in vitro*, Injury 27 (1996) S-3 38-43
- ¹⁸² D. M. Brunette, B. Chehroudi, *The effect of surface topography of mikromachined titanium substrate on cell behavior in vitro and in vivo*, J Biomech Eng 121 (1999) 49-57
- ¹⁸³ W. Lewiński, *Cytologia i Histologia. Wybrane zagadnienia z organografii*, Wydawnictwo OPERON 2002
- ¹⁸³ Chun-Min Lo, Hong-Bei Wang, Micah Dembo, Yu-li Wang, *Cell movement is guided by the rigidity of the substrate*, Biophys J, 79-1 (2000) 144-152
- ¹⁸⁴ S. Aznavoorian, Mary L. Stracke, J. Parsons, J. McClanahan, L. A. Liotta, *Integrin avb3 mediates chemotactic and haptotactic motility in human melanoma cells through different signaling pathways*, 271-6, (1996) 3247-3254
- ¹⁸⁵ M.J. Dalby, M.O. Riehle, H. Johnstone, S. Affrossman, A.S.G. Curtis, *In vitro reaction of endothelial cells to polymer demixed nanotopography*, Biomaterials 23 (2002) 2945-2954
- ¹⁸⁶ J. A. Litwin, *Hybrydocytochemia (Hybrydyzacja in situ)*, Podstawy technik mikroskopowych, Wyd. Collegium Medicum UJ 102-117
- ¹⁸⁷ Z. Darzynkiewicz, S. Bruno, G. Del Bino, W. Gorczyca, M. Hotz, P. Lassota, F. Traganos, *Features of apoptotic cells measured by flow cytometry*, Cytometry 13 (1992) 795-808
- ¹⁸⁸ M. B. Hansen, S. E. Nielsen, K. Berg, *Re-examination and further development of a precise rapid dye method for measuring cell growth/cell kill*, J. Immunol Method 119 (1989) 203-210
- ¹⁸⁹ I. M. Garredts, F. J. Zijlstra, J. A. Tak, I. L. Bonta, I. Beckmann, S. Ben-Efraim, *A comparison between two methods for measuring tumor necrosis factor in biological fluids*, Inflammation Research C (2005) 89-91
- ¹⁹⁰ Garncarczyk M, *Hormonal regulation of oestrogenformation by Leyding cells in vitro. Immunocytochemical approche*, Folia Biol 51 (2003), 181-188
- ¹⁹¹ Goraszczuk Ł. E, Bilińska B, Słomczyńska M, *Rozdzielanie i identyfikacja komórek. Niektóre techniki specjalne z użyciem hodowli komórek*, Hodowla komórek i Tkanek, Wydawnictwo PWN Warszawa 2004, 61-89
- ¹⁹² L. Bacakova, V. Stary, P. Glogar, *Adhesion and growth of cells in culture on carbon-carbon composites with different surface properties*, Eng Biomater 2 (1998) 13-15
- ¹⁹³ W. Lewiński, *Cytologia i Histologia. Wybrane zagadnienia z organografii*, Wydawnictwo OPERON 2002
- ¹⁹⁴ K. Anselme, *Osteoblast adhesion on biomaterials. Review*, Biomaterials 21 (2000) 667-681
- ¹⁹⁵ J. M. Anderson, *Mechanisms of inflammation and infection with implanted devices*, Cardiovasc Pathol 2 (1993) S33-41
- ¹⁹⁶ J. T. Parsons, *Focal adhesion kinase the first ten years*, J Cell Sci 116 (2003) 1409-1416