ZACHODNIOPOMORSKI UNIWERSYTET TECHNOLOGICZNY

Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej

Instytut Polimerów

Zakład Biomateriałów i Technologii Mikrobiologicznych

mgr inż. Agnieszka Piegat

„SYNTEZA I WŁAŚCIWOŚCI NANOSTRUKTURALNYCH UKŁADÓW POLIMEROWYCH DLA INŻYNIERII TKANKOWEJ”

Rozprawa doktorska

przygotowywana

pod kierunkiem

dr hab. inż. Mirosławy El Fray, prof.nzw.ZUT

Szczecin 2010

Podziękowanie

Pani Profesor dr hab. Mirosławie El Fray składam serdeczne podziękowania za rozbudzenie we mnie zainteresowania biomateriałami, za cenną pomoc w zgłębianiu wiedzy na ich temat okazaną cierpliwość i wiele życzliwości. Dziękuję również Kolegom i Koleżankom z Zakładu Biomateriałówi Technologii Mikrobiologicznych za wszelką pomoc i życzliwość.

Szczególne podziękowania składam zaś Mężowi, Córce i Rodzicom, bez wsparcia, wiary we mnie i cierpliwości, których ta praca nigdy by nie powstała.

Autorka

SPIS TREŚCI

1. Wprowadzenie 8
2. Część literaturowa 10
2.1 Kopolimery multiblokowe 10
2.1.1 Kopoli(estro-etery) 11
2.1.2 Kopoli(estro-estry) 13
2.1.3 Nanokompozyty o osnowie z elastomeru termoplastycznego 14
2.2 Materiały polimerowe w inżynierii tkankowej 16
2.2.1. Degradacja materiałów polimerowych 21
2.2.2. Nanocząstki w inżynierii tkankowej 24
2.2.3. Inżynieria tkankowa mięśnia sercowego 26
3. Cel pracy 29
4. Zakres pracy 31
5. Część eksperymentalna 32
5.1 Surowce i substancje pomocnicze stosowane do syntez 32
5.2 Synteza elastomerów termoplastycznych i nanokompozytów 32
5.3 Przygotowanie próbek do badań 34
5.4 Charakterystyka metod badawczych 35
6. Wyniki i dyskusja 44
6.1 Synteza multiblokowych elastomerów termoplastycznych 44
6.2 Właściwości fizyczne 45
6.3 Budowa chemiczna 46
6.4 Właściwości termiczne 58
6.5 Dynamiczna analiza termomechaniczna (DMTA) 66
6.6 Wpływ udziału nanonapełniacza na właściwości mechaniczne 68
6.7 Wpływ udziału nanonapełniacza na morfologię nanokompozytów polimerowych 71
6.8 Degradacja hydrolityczna układów nanostrukturalnych 76
6.8.1 Degradacja krótkoterminowa 76
6.8.2 Degradacja długoterminowa 79

6.9 Ocena biozgodności w testach komórkowych *in vitro* i *in vivo* 89
6.9.1 Testy biozgodności komórkowej *in vitro* 89
6.9.2 Testy biozgodności komórkowej *in vivo* 96
6.10 Możliwości zastosowania nanostrukturalnych materiałów w inżynierii tkanek miękkich 98
7. Wnioski 100
8. Spis literaturowy 102
Abstrakt 113

Spis oznaczeń i symboli stosowanych w pracy

AFM	–	*(atomic force microscopy)* mikroskopia sił atomowych
BD	–	1,4 – butanodiol
Δ Cp	–	pojemność cieplna
DLA	–	dimer kwasu linoleinowego (Pripol 1009)
DMT	–	tereftalan dimetylu
DMTA	–	dynamiczna analiza termomechaniczna
DP_H	–	stopień polikondensacji segmentu sztywnego
DSC	–	różnicowa kalorymetria skaningowa
ε_r	–	wydłużenie względne przy zerwaniu
E’	–	moduł zachowawczy
E”	–	moduł zachowawczy
E_{mod}	–	moduł Younge’a
EDX	–	*(energy dispersive X-ray spectroscopy)* spektrometria rentgenowska z dyspersją energii
ESI-MS	–	*(electrospray ionization mass spektrometry)* spektroskopia mas z jonizacją przez rozpylanie w polu elektrycznym
FIB	–	*(focused ion beam microscope)* skaningowy mikroskop jonowy
FT-IR	–	spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera
GE	–	glikol etylenowy
GLL	–	graniczna liczba lepkościowa
GPC	–	*(gel permeation chromatography)* chromatografia żelowa
HAp	–	hydroksyapatyt
h-ESCs	–	*(human-embrionic stem cells)* ludzkie embrionalne komórki macierzyste
^{1}H NMR	–	spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
Δ H_{c2}	–	zmiana entalpii związana z krystalizacją segmentów sztywnych
Δ H_{m2}	–	zmiana entalpii związana z topnieniem segmentów sztywnych
LDH	–	*(lactate dehydrogenase)* dehydrogenaza mleczanowa
m-ESCs	–	*(mouse-embrionic stem cells)* mysie embrionalne komórki macierzyste

M_H	–	masa molowa jednostki powtarzalnej segmentu sztywnego
M_S	–	masa molowa jednostki powtarzalnej segmentu giętkiego
PBA	–	poli(adypinian butylenu)
PBS	–	buforowane sole fosforanowe
PBuS	–	poli(bursztynian butylenu)
PBT	–	poli(tereftalan butylenu)
PCL	–	poli(ε-kaprolakton)
PEG	–	poli(glikol etylenowy)
PET	–	poli(tereftalan etylenu)
PGA	–	poli(kwas glikolowy)
PHA	–	poli(hydroksyalkaniany)
PHB	–	poli(3-hydroksymaślan)
PLA	–	poli(kwas mlekowy)
PTMO	–	oligo(1,4-oksytetrametylen)
PVC	–	poli(chlorek winylu)
rms	–	*(root-mean-squere)* średnie odchylenie kwadratowe chropowatości
σ_e	–	naprężenie przy granicy plastyczności
σ_r	–	naprężenie zrywające
SBF	–	symulowany płyn fizjologiczny
SEM	–	skaningowa mikroskopia elektronowa
SWCNT	–	nanorurki węglowe jednościenne
tanδ	–	mechaniczne tłumienie (tangens kąta stratności)
T_{c2}	–	temperatura krystalizacji segmentów sztywnych
T_{g1}	–	temperatura zeszklenia segmentów giętkich
T_{m2}	–	temperatura topnienia segmentów sztywnych
TCP	–	trójfosforan wapniowy
TEM		transmisyjna mikroskopia elektronowa
TiO_2	–	ditlenek tytanu
TPE	–	elastomery termoplastyczne
W_c, $W_{c,h}$	–	zawartość fazy krystalicznej odpowiednio całkowita lub w segmentach sztywnych polimeru

W_H, W_S	–	procentowa zawartość odpowiednio segmentów sztywnych lub segmentów giętkich
Θ_A, Θ_B	–	kąt wstępujący i zstępujący

1. Wprowadzenie

Korzystając z najpopularniejszej wyszukiwarki internetowej po wpisaniu hasła „nanotechnologia" otrzymałam zwrotnie ponad 131 000 wyników, jest wśród nich oczywiście odnośnik do największej internetowej encyklopedii, gdzie można przeczytać, iż nanotechnologia jest „*ogólną nazwą całego zestawu technik i sposobów tworzenia rozmaitych struktur o rozmiarach nanometrycznych (od 0, 1 do 100 nanometrów), czyli na poziomie pojedynczych atomów i cząsteczek*". Definicja ta wydaje się być niezwykle ubogą, nawet w połowie nieoddającą ogromu technik i dziedzin nauki skupionych wokół tego terminu. O nanotechnologii, nanomateriałach czy nanotechnikach można mówić nie tylko w przypadku nowoczesnych materiałów dla elektroniki czy motoryzacji, ale również, gdy jest mowa o najnowszych trendach w leczeniu nowotworów, terapii genowej czy inżynierii tkankowej. Dlatego też nanotechnologia, jako dziedzina interdyscyplinarna znalazła się w kręgu zainteresowań Komisji Europejskiej, o czym można przeczytać w broszurze wydanej w 2007 roku pt." Nanotechnologia. Innowacje dla świata przyszłości".

Dysponując coraz dokładniejszymi metodami badawczymi, umożliwiającymi obserwacje i badania w skali *nano*, inżynierowie muszą sprostać coraz to wyższym oczekiwaniom dotyczącym otrzymania materiałów zastępujących i naśladujących żywe tkanki. Dodatkowo niezwykle zaawansowane badania nad mechanizmem adsorpcji białek na powierzchni biomateriałów [1–3] oraz modyfikacją powierzchni pod kątem określonego zastosowania, dostarczają szeregu informacji pomocnych przy projektowaniu takich materiałów [4,5]. Wśród biomateriałów, materiały polimerowe odgrywają coraz większą rolę we współczesnym życiu. Cały czas są tworzone nowe lub ulepszane już istniejące materiały polimerowe, zwłaszcza do zastosowań biomedycznych, w tym dla inżynierii tkankowej. Obecnie na rynku dostępne są już produkty inżynierii tkankowej mające zastępować bądź regenerować funkcje naturalnych tkanek, narządów, których przykłady przedstawiono w tabeli 1.1.

Jak wynika z poniższej tabeli, obecnie na rynku spośród produktów inżynierii tkankowej dostępne są głównie substytuty skóry, ze względu na stosunkową prostą budowę tej tkanki. Dlatego też opracowywanie nowych materiałów polimerowych, zwłaszcza o charakterze układów nanostrukturalnych dla bardziej złożonych substytutów

tkankowych, takich jak tkanki mięśnia sercowego są szczególnym wyzwaniem, i temu zagadnieniu została poświęcona niniejsza rozprawa. Za szczególnie interesujące uznano polimery z grupy elastomerów termoplastycznych o charakterze multiblokowych poliestrów ze względu na szerokie możliwości projektowania takich materiałów, od twardych, wysokomodułowych aż po miękkie, niskomodułowe i elastyczne. Te ostatnie swoimi cechami naśladują właściwości taknek miękkich, a odpowiednio modyfikowane, mogą wykazywać również podatność na biodegradację i bioaktywność.

Większość prezentowanych wyników prac w niniejszej dysertacji wykonano w ramach projektów: „Nowe organiczno/nieorganiczne polimery hybrydowe: otrzymywanie i właściwości", projektu badawczego promotorskiego N N209 150636 pt. „Synteza i właściwości nanostrukturalnych materiałów dla inżynierii tkankowej" oraz projektu stypendialnego Brithish Council, British-Polish Young Scientist Programme "Nanostructured polyester/titania hybrid materials for biomedical applications" realizowanego w Imperial College London, UK.

Tab.1.1. Komercyjne dostępne produkty inżynierii tkankowej [6]

Rodzaj implantu	Firma, etap rozwoju i rodzaj produktu		
	Przedkliniczny	Badania kliniczne	Zatwierdzone
Opatrunki pozbawione komórek	3DM, Cytomatrix, RegenTec	Celltrix- mikrosfery żelatynowe Credurance®, Kuros Biosurgery	Baxter- kleje tkankowe Tissucol®, LifeCell- macierz regeneracyjna tkanek AlloDerm®
Produkty bazujące na komórkach	BioEngine- biohybrydowe systemy wspomagające regenerację wątroby, Cerco Medical- biosztuczna trzustka	Excorp- zewnętrzna biosztuczna wątroba, TiGenix- leczenie ubytków w stawach	Advanced BioHealing- substytut skóry Dermagraft®, Genzyme- autogeniczny przeszczep naskórka Epicel®
Całe tkanki i narządy	Bio Nova- biosyntetyczne protezy naczyń, Humacyte	Cytograft- naczynia krwionośne, Tengion- pęcherz moczowy	MatTek- substytuty skóry np. EpiOral®, Japan Tissue Engineering- substytut skóry LabCyte EPI-MODE

2. Część literaturowa

Tematyka niniejszej rozprawy doktorskiej dotyczy opracowania metody otrzymywania i charakterystyki nowych układów polimerowych, zawierających w swej strukturze nanocząstki lub niskocząsteczkowe kwasy, oraz możliwości potencjalnego zastosowania tych materiałów w jednej z najszybciej rozwijających się obecnie dziedzin nauki – inżynierii tkankowej. Dlatego też zaprezentowany w tym rozdziale przegląd literaturowy podzieliłam na część „materiałową", w której omówiłam obecny stan wiedzy na temat kopolimerów multiblokowych, w tym modyfikowanych nanocząstkami oraz część „aplikacyjną", dotyczącą rodzajów materiałów testowanych obecnie pod kątem zastosowań w inżynierii tkankowej i wymagań, jakim muszą one sprostać.

2.1 Kopolimery multiblokowe

Kopolimery multiblokowe zaliczane są do grupy elastomerów termoplastycznych w przypadku występowania zjawiska „sieciowania fizycznego" związanego z występowaniem dwóch wzajemnie niemieszających się (niekompatybilnych termodynamicznie) fazy składających się z segmentów sztywnych i giętkich. Tego typu układy polimerowe charakteryzują się występowaniem specyficznych międzycząsteczkowych, międzysegmentalnych oraz międzyfazowych oddziaływań, wpływających na takie właściwości jak: odporność termiczna, wytrzymałość mechaniczna czy podatność na degradację [7 – 9]. Fizyczne węzły sieci zostały zaobserwowane w następujących układach (multi)blokowych:

1) w blokowych polimerach typu poli(styren-butadien-styren), w których jeden z bloków tworzący fazę rozproszoną znajduje się w stanie szklistym, natomiast drugi – będący fazą ciągłą – w stanie amorficznym. Głównym czynnikiem klasyfikującym te materiały w grupie elastomerów termoplastycznych jest wzajemna niemieszalność bloków [10 – 12];
2) w segmentowych termoplastycznych elastomerach uretanowych, w których segmenty giętkie stanowią reszty oligoestrodioli lub oligoeterodioli, a segment sztywny poliuretan, otrzymany w reakcji diizocyjanianu z odpowiednim diolem

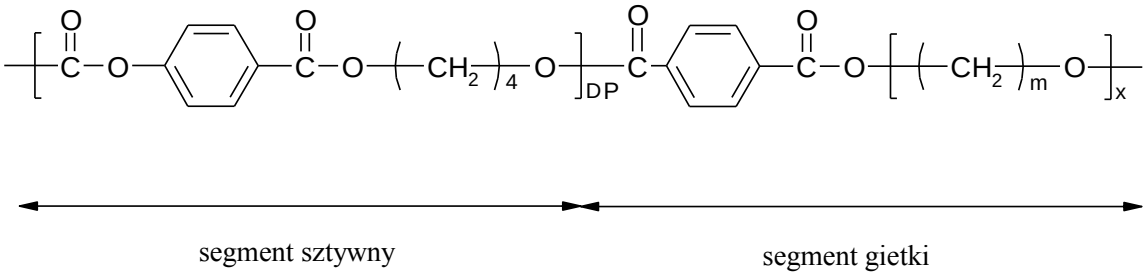
[13, 14]. Stabilizacja struktury nadcząsteczkowej w tego typu układach przypisywana jest wiązaniom wodorowym pomiędzy segmentami;

3) w multiblokowych kopolimerach poli(estrowo-eterowych) oraz poli(estrowo-estrowych), i systemach będących różnymi ich modyfikacjami. Węzły sieci stanowi rozproszona w matrycy segmentów giętkich, faza krystaliczna bloki segmentów [15– 17].

Ze względu na materiał badawczy omówiony w kolejnych rozdziałach, swoją uwagę skupiałam na szerszym omówieniu ostatniej grupy elastomerów termoplastycznych, tj. kopolimerów multiblokowych zbudowanych z termoplastycznych bloków sztywnych, takich jak poli(tereftalan butylenu) i poli(tereftalan etylenu), oraz bloków giętkich budowanych przez oligoeterodiole oraz dimeryzowane kwasy tłuszczowe.

2.1.1 Kopoli(estro-etery)

Do głównych przedstawicieli tej grupy materiałów należy produkowany od lat 60 – tych ubiegłego stulecia Hytrel® – kopolimer poli(tereftalanu butylenu) oraz oligo(1,4-oksytetrametylenu) (PTMO) oraz kopolimer PBT z poli(glikolem etylenowym) (PEG), znany pod nazwa handlową PolyActive®. Ogólny wzór budowy tych kopolimerów przedstawia rysunek 2.1.1.1.



gdzie: DP- stopień polikondensacji segmentów sztywnych, m=2 lub 4 odpowiednio dla PEG lub PTMO, x – stopień polikondensacji oligoeteru

Rys.2.1.1.1 Ogólny wzór kopoli(estro-eterów)

Polimery te otrzymuje się bądź to na drodze transestryfikacji pomiędzy tereftalanem dimetylu (DMT) a glikolem 1,4-butylenowym i PTMO/PEG, i następnie polikondensacji produktów transestryfikacji, bądź też transestryfikacji pomiędzy DMT a glikolem 1,4-butylenowym i następnie polikondensacji wytworzonych w ten sposób

oligo(tereftalanów butylenowych) z PTMO lub PEG [16 – 21]. Ze względu na niską odporność termiczną oligomerów eterowych, przy otrzymywaniu tego typu kopolimerów istnieje konieczność stosowania stabilizatorów termicznych, chroniących je przed reakcjami z wolnymi rodnikami tworzącymi się w wysokich temperaturach. W kopoli(estro-eterach) zawierających PTMO oraz PEG stosuje się głównie stabilizatory fenolowe jak i aminowe [16,22,23]. Natomiast dla PolyActive® zastosowano komercyjny produkt dostępny pod nazwą Irganox 1330, jak również α-tokoferol (witamina E), głównie ze względu na przeznaczenie tych materiałów do zastosowań biomedycznych [24,25]. W zależności od ciężaru cząsteczkowego bloku oligoeterowego w kopolimerach PBT/PEG zmieniała się separacja mikrofazowa i właściwości termiczne:

- przy stałym udziale wagowym bloków sztywnych i giętkich użycie do syntezy oligoeteru o wyższym ciężarze cząsteczkowym sprzyjało mikroseparacji fazowej,
- niezależnie od ciężaru cząsteczkowego oligoeteru, zwiększający się udział wagowy segmentu sztywnego powodował podwyższenie jego temperatury topnienia, przy jednoczesnym zmniejszeniu obszaru temperaturowego charakterystycznego dla tej przemiany,
- segmenty giętkie zachowywały zdolność do krystalizacji jedynie przy wyższych ciężarach cząsteczkowych i przy udziale wagowym powyżej 60%.

Podobne zależności pomiędzy właściwościami termicznymi a budową chemiczną zaobserwowano dla układów z PTMO, w których stanowił on segmenty giętkie [26].

Poprzez zastosowanie różnych udziałów wagowych poszczególnych segmentów, a także zmianę ciężarów cząsteczkowych oligoeterów możliwe jest otrzymanie zarówno materiałów o wysokiej wytrzymałości, twardości (przy dużym udziale estrowych segmentów sztywnych), bądź też polimerów charakteryzujących się dużym odkształceniem, jak również podatnością na degradację hydrolityczną i oksydacyjną (przewaga segmentów giętkich eterowych).

W literaturze obecne są również doniesienia dotyczące kopolimerów estrowo-eterowych, w których blok sztywny stanowią jednostki poli(tereftalanu etylenu) [27 – 29]. Otrzymywanie kopolimerów oparte było o produkty glikolizy PET, wchodzące w skład segmentów sztywnych, bądź też odbywało się na drodze transestryfiakcji pomiędzy DMT a glikolem etylenowym, a następnie polikondensacji produktów transestryfikacji z poli(glikolem etylenowym) (M_n=6000 g/mol). Kopolimery PET/PTMO zsyntezowane

były z oligomerów PET pochodzących z glikolizy oraz oligomerów PTMO zmodyfikowanych tak, aby posiadały reaktywne grupy karboksylowe. Tego typu kopolimery charakteryzowały się właściwościami termicznymi oraz termomechanicznymi zbliżonymi do komercyjnie dostępnego Hytrel'u [38]. Wyniki analizy termicznej, jak i budowy chemicznej potwierdziły założoną budowę multiblokową kopolimerów, a wykorzystanie do ich syntezy odpadowego PET wskazało jedną z możliwości recyklingu chemicznego PET.

W przypadku kopolimerów PET/PEG, zarówno wysoki ciężar cząsteczkowy oligoeteru jak i wzrastający udział segmentów estrowych prowadzą do większej mikroseparacji fazowej przejawiającej się obecnością odpowiednich przemian fazowych dla obydwu segmentów. I tak, topnienie segmentów sztywnych obserwowane było dopiero powyżej 30% wagowych w kopolimerze, poniżej tej wartości zdolność do topnienia i krystalizacji w badaniach DSC wykazywał jedynie segment eterowy [30].

2.1.2 Kopoli(estro-estry)

Do grupy kopoli(estro–estrów), określanych również jako poli(alifatyczno/ aromatyczne-estry) należą przede wszystkim kopolimery poli(tereftalanu butylenu) oraz dimeryzowanych kwasów tłuszczowych. Podobnie jak w układach estrowo-eterowych, tak i w kopoli(estro–estrach) reszty tereftalanowe stanowią segmenty sztywne, tworzące fizyczne węzły sieci rozproszone w ciągłej fazie segmentów giętkich. Również te układy charakteryzujące się właściwościami elastotermoplastycznymi mogą być przetwarzane technikami typowymi dla termoplastów, z tą różnicą iż w kopoli(estro–estrach) nie występuje problem obniżonej odporności termicznej segmentów giętkich ze względu na doskonałą odporność termoutleniającą dimerów kwasów tłuszczowych. Manuel i Gaymans otrzymali serię kopolimerów PBT z dimeryzowanymi kwasami tłuszczowymi, różniącymi się ciężarami cząsteczkowymi kwasów (C_{36}, C_{44}, C_{70}) oraz ich udziałem wagowym [31]. Z przeprowadzonych badań wynika, iż kontrola nad temperaturą zeszklenia kopolimerów odbywać się może poprzez użycie dimeru kwasu tłuszczowego o odpowiednim ciężarze cząsteczkowym – im wyższy ciężar cząsteczkowy kwasu tym niższa wartość temperatury przejścia szklistego. Związane jest to według autorów z faktem, iż amorficzne segmenty giętkie o wyższych ciężarach cząsteczkowych obniżają kompatybilność fazy miękkiej z PBT, a tym samym zwiększa się długość jednostek segmentów sztywnych i następuje

obniżenie ich zawartość w fazie ciągłej. W związku z tym można było oczekiwać, że przy jednakowym udziale wagowym segmentów giętkich i sztywnych, wraz ze zwiększającym się ciężarem cząsteczkowym tych pierwszych, wzrastać będzie również moduł zachowawczy oraz entalpia topienia, jednakże taka zależność nie została zaobserwowana.

Wpływ budowy chemicznej kopolimerów PBT/C_{36}, gdzie segmenty giętkie zawierały sekwencje dimeru kwasu linoleinowego (DLA), na wybrane właściwości takie jak: odporność termiczna, wytrzymałość mechaniczna, podatność na degradację a także ich biozgodność omówiona została w szeregu prac [8,32 – 34]. Ze względu na całkowicie amorficzną budowę dimeru kwasu tłuszczowego, przy jego wysokim udziale, temperatury zeszklenia kopolimerów znajdowały się w obszarze niskich wartości i rosły w przedziale od -55°C (T_g monomeru kwasu tłuszczowego) aż do temperatury bliskiej zeszkleniu segmentów sztywnych, tj. 51°C. W miarę zwiększania się udziałów wagowych segmentów sztywnych, a co za tym idzie lepszej zdolności do krystalizacji i separacji mikrofazowej pomiędzy składnikami kopolimeru, wzrastała liniowo wartość twardości oraz naprężenie przy zerwaniu. W istotny sposób zmniejszeniu ulegała natomiast podatność na degradację hydrolityczną, związana głównie z faktem, iż w pierwszej kolejności atakowi hydrolitycznemu ulegają obszary amorficzne. Przeprowadzone testy wytrzymałości mechanicznej na cykliczne obciążenia wykazały odporność zmęczeniową podobną do dostępnych komercyjnie kopoli(estro-eterów) i dużo wyższą od segmentowych poliuretanów oraz usieciowanych chemicznie elastomerów siloksanowych [32]. Wyniki badań mechanicznych oraz doskonała biozgodność pozwoliły zaproponować te materiały (kopolimery PBT/DLA) jako czasowe protezy tkanek miękkich, a w szczególności ścięgien zginaczy palców ręki [33].

2.1.3 Nanokompozyty o osnowie z elastomeru termoplastycznego

Doniesienia literaturowe dotyczące otrzymywania nanokompozytów o osnowie zbudowanej z elastomerów termoplastycznych są znacznie mniej liczne, niż te dotyczące kompozytów z udziałem termoplastów czy kauczuków [36]. Dotyczą one głównie elastotermoplastów uretanowych, których nanokompozyty otrzymywane były różnymi metodami, charakterystycznymi dla wszystkich rodzajów materiałów polimerowych.

Do pierwszej grupy metod należą techniki polimeryzacji *in-situ* w obecności nanonapełniacza. Nanocząstki są odpowiednio dyspergowane w jednym z monomerów

a następnie prowadzony jest proces polimeryzacji. Przykładem zastosowania tej metody mogą być prace dotyczące otrzymywania nanokompozytów w reakcji polikondensacji *in-situ* poli(tereftalanu etylenu) oraz poli(tereftalanu butylenu) [37,38]. W pracach tych otrzymano PET oraz PBT na drodze polikondensacji pomiędzy interkalowanymi warstwami montmorylonitu, uzyskując materiały o polepszonych właściwościach termicznych oraz mechanicznych. Potwierdzono również fakt, iż w przypadku nanokompozytów już niewielki udział nanonapełniacza wpływa istotnie na zmianę właściwości, a przy jego wyższym udziale wagowym efekty poprawy właściwości mechanicznych zwiększających wytrzymałość (stąd nazwa nanowzmocnienie [39]) ulegają pogorszeniu, ze względu na tworzenie się aglomeratów. Porównanie metod wytwarzania nanokompozytów *in-situ* podczas polikondensacji oraz bezpośredniego mieszania w stanie stopionym przeprowadzone zostały dla poli(tereftalanu etylenu) modyfikowanego jednościennymi nanorurkami węglowymi (SWCNT) pod kątem zmian właściwości przewodnictwa elektrycznego [40]. Lepsze właściwości przewodnictwa, przy jednoczesnym zachowaniu transparentności uzyskano dla nanokompozytów metodą mieszania w stanie stopionym.

Metody *in-situ* zastosowane do otrzymywania nanokmpozytów w osnowie elastomeru termoplastcznego składającego się ze sztywnych segmentów PBT i segmentów giętkich PTMO oraz właściwości otrzymanych nanokompozytów zostały opisane w następujących pracach [41,42]. Dla kopolimerów zawierających 45% wag. segmentów sztywnych i ich nanokompozytów zawierających 0,2 % wag. SWCNT zaobserwowano, iż już tak niewielki dodatek nanonapełniacza istotnie wpływa na właściwości mechaniczne podwyższając wartość modułu Young'a oraz naprężenie do zerwania, przy jednoczesnym obniżeniu odkształcenia o ponad połowę. Związane jest to ze specyficznym działaniem nanonapełniacza, polegającym na „unieruchomieniu" amorficznych łańcuchów PTMO, a także „zakotwiczeniu" obszarów krystalicznych PBT. Tak więc, w usztywnionym układzie nanokompozytowym przenoszenie naprężeń odbywa się w utrudniony sposób, co skutkuje pogorszeniem właściwości elastycznych.

Innym przykładem wytworzenia nanokompozytu na bazie elastomeru termoplastycznego, była modyfikacja komercyjnego produktu Hytrel® 5556, zawierającego 58 % segmentów sztywnych PBT, nano-tlenkiem krzemu (SiO_2) na drodze wytłaczania [43]. Analizując ten rodzaj modyfikacji pod kątem zmiany właściwości

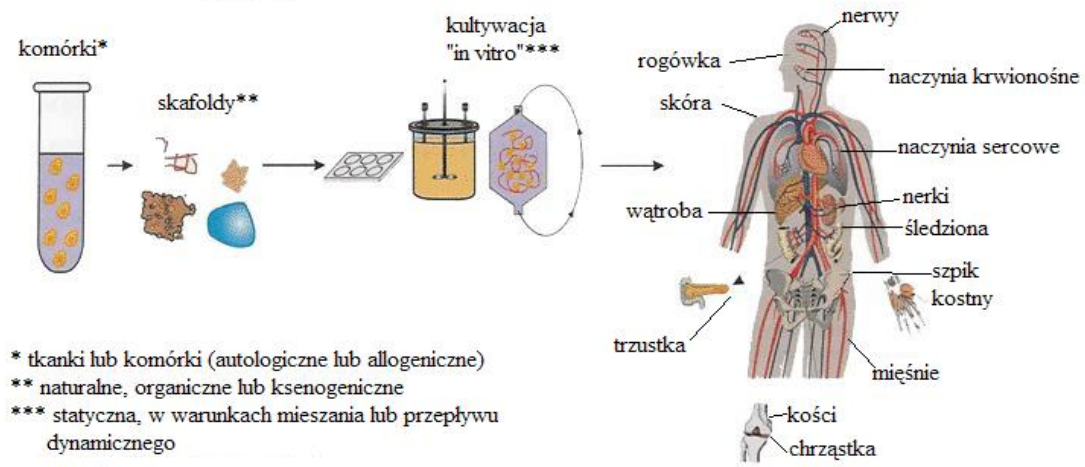
mechanicznych należy zauważyć istotne polepszenie takich właściwości jak: odkształcenie przy zerwaniu, moduł Young'a, jak również odporność na pełzanie. Autorzy wykazali również wpływ modyfikacji powierzchniowej na stabilność interfazy pomiędzy nanocząstkami a polimerem. Silniejsze oddziaływania, a co za tym idzie, nieco gorsze właściwości mechaniczne obserwowane były w przypadku zastosowania SiO_2 modyfikowanego hydrofobowym estrem dichlorosilanu.

Z przedstawionych przykładów wynika, że zachowanie elastomerów termoplastycznych, jako osnów dla nanokompozytów jest różne i zależy głównie od interakcji na granicy nanonapełniacz – polimer, a także od charakteru chemicznego segmentów wchodzących w skład kopolimeru, jak również samego nanonapełniacza.

2.2 Materiały polimerowe w inżynierii tkankowej

W ciągu zaledwie ostatnich 10 lat poczyniono ogromne postępy nad opracowaniem żywych substytutów tkanek i narządów. Część z nich, jak zaprezentowano w tabeli 1.1, jest już komercyjnie dostępna, większość jednak nadal pozostaje w fazie badań, głównie ze względu na szczególne wymagania stawiane materiałom przeznaczonym do kontaktu z żywymi tkankami.

Większość artykułów naukowych z dziedziny inżynierii tkankowej, opiera się na prostej definicji tej nauki, jako dyscypliny związanej z wytwarzaniem nowych tkanek w oparciu o postawy inżynierii materiałowej, przy jednoczesnym zrozumieniu zasad funkcjonowania żywych tkanek, w ich naturalnym środowisku [44]. Schemat „postępowania" podczas tworzenia substytutów tkanek lub organów z wykorzystaniem narzędzi inżynierii tkankowej przedstawia rysunek 2.2.1.



Rys.2.2.1 Kolejne etapy wytwarzania substytutów tkanek lub organów metodami inżynierii tkankowej (www.bionova.com.au)

Interdyscyplinarny charakter tej dziedziny nauki związany jest z:

– biomateriałami – materiałami, które opracowano tak, aby samodzielnie lub w złożonym systemie mogły oddziaływać w kontrolowany sposób z elementami żywego układu, w procesie terapeutycznym lub diagnostycznym, w medycynie ludzkiej lub weterynaryjnej [45];

– skafoldami, rusztowaniami (*ang. scaffold*s) – trójwymiarowymi strukturami, zwykle wytworzonymi z biomateriałów polimerowych, ceramicznych lub kompozytowych, służącymi jako podłoża dla hodowli komórek;

– biodegradacją – procesem degradacji, przebiegającym zwykle w środowisku wodnym przy udziale czynnika biologicznego np. enzymów.

Wszystkie te pojęcia są ze sobą powiązane w bardzo ścisły sposób, a najważniejsze to wymagania, jakie stawiane są skafoldom. Ponieważ mają one stanowić specyficzne podłoże dla żywych komórek, należy ich budowę projektować tak, aby w jak najbardziej dokładny sposób przypomniały swoją strukturą macierz zewnątrzkomórkową, występującą we wszystkich żywych komórkach. Macierz ta, w warunkach organizmu ludzkiego, utrzymuje strukturę tkanki, odpowiada za jej właściwości mechaniczne, dzięki porowatej budowie umożliwia dostarczanie składników pokarmowych do komórek, a przede wszystkim stanowi dla nich przyczep. Głównym jej budulcem są białka kolagenowe

i niekolagenowe oraz różnego rodzaju inne składniki takie, jak: hydroksyapatyt, keratyna, płyn tkankowy, kwas hialuronowy, zależnie od tkanki, w której występuje. Podłoża porowate muszą więc spełnić szereg warunków, do których zaliczyć należy [46–49]:

(1) trójwymiarową, wysokoporowatą strukturę umożliwiającą przyłączenie komórek, ich proliferację i produkcję własnej macierzy zewnątrzkomórkowej;

(2) połączoną sieć porów zapewniającą dopływ składników pokarmowych oraz odprowadzanie produktów przemiany materii;

(3) odpowiednią budowę chemiczną powierzchni umożliwiającą absorpcję białek, a następnie przyłączenie komórek, ich proliferację oraz różnicowanie;

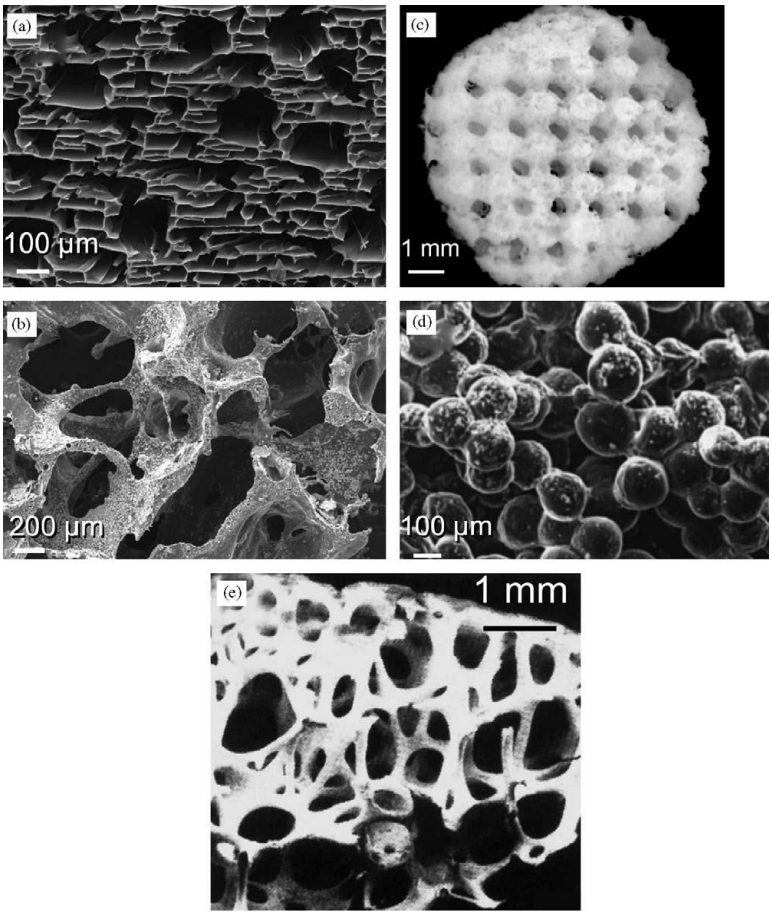
(4) biokompatybilny i najczęściej bioresorbowalny materiał o kontrolowanej szybkości degradacji;

(5) budowę wspierającą lokalną, anizotropową strukturę tkanki;

(6) odpowiednio dobrane właściwości mechaniczne umożliwiające integrację oraz współdziałanie skafoldu z naturalną tkanką;

(7) powtarzalną budowę (architekturę) dostosowaną kształtem i rozmiarem do wymogów klinicznych.

Opisane parametry idealnego skafoldu charakteryzowane są w różnych skalach i różnymi wielkościami – wytrzymałość mechaniczna, zwykle oceniana jest w skali makroskopowej, np. w teście statycznego ściskania lub rozciągania. Wielkość porów, zawierająca się w przedziale 15 –300 μm najczęściej podlega ocenie metodami takimi jak skaningowa mikroskopia elektronowa lub mikroskopia konfokalna (najczęściej dla układów skafold – komórki), natomiast właściwości powierzchniowe obecnie analizowane są coraz częściej w skali *nano*, ze względu na coraz bardziej zaawansowane metody badawcze, jak i szerszą wiedzę na temat wpływu absorpcji białek na proces proliferacji komórek. Nie mniej jednak punktem wyjścia dla procesu wytwarzania takich trójwymiarowych struktur, jest przede wszystkim dobór odpowiedniego materiału. Przykłady skafoldów dla inżynierii tkankowej kości, otrzymane przy zastosowaniu różnych technik przedstawia rysunek 2.2.2.



Rys. 2.2.2 Skafoldy otrzymane następującymi technikami: a) termicznie indukowana separacja faz, b) odlewanie połączone z wymywaniem cząstek, c) formowanie ze stopu, d) spiekanie mikrosfer; e) kość gąbczasta [50]

Przyjmując za kryterium podziału podatność na biodegradację, materiały stosowane obecnie w inżynierii tkankowej można przedstawić w postaci zestawienia tabelarycznego 2.2.1.

Tab. 2.2.1 Materiały stosowane w inżynierii tkankowej

Materiały ulegające degradacji i resorpcji	Materiały niedegradowalne
Poli(kwas mlekowy) (PLA) Poli(kwas glikolowy) (PGA) Kopolimery PLA i PGA Poli(ε–kaprolakton) (PCL) Poli(hydroksyalkaniany) Poli(etero–estry)	Poli(tlenek etylenu) Poli(tereftalan etylenu) Poli(tetrafluoro etylen) Poli(metakrylan metylu)

Główną grupą materiałów wykorzystywanych do otrzymywania skafoldów są poliestry alifatyczne, szeroko stosowane w obszarze produktów medycznych najczęściej, jako nici chirurgiczne. Do grupy tych materiałów zalicza się: poli(kwas mlekowy) (PLA), poli(kwas glikolowy) (PGA) i ich kopolimery (PGLA) oraz poli(ε-kaprolakton) (PCL), przy czym szybkość ich degradacji maleje według następującej kolejności PGA> P(D,L–LA)> P(L–LA)> PCL. Polimery te ulegają degradacji na drodze hydrolizy wiązań estrowych łańcucha głównego, a produkty ich rozkładu włączane są w cykl metaboliczny Krebsa. Szybkość degradacji zależy od wielu czynników takich jak: skład chemiczny, historia termiczna, ciężar cząsteczkowy, polidyspersyjność, czynniki środowiskowe, krystaliczność, morfologia (w tym porowatość), obecność chemicznie reaktywnych składników w masie polimeru, orientacja łańcucha polimerowego, obecność różnego rodzaju dodatków i hydrofilowość [51]. Pomimo nietoksycznego charakteru produktów degradacji PLA, PGA czy PGLA, nierzadko dochodzi do lokalnych stanów zapalnych w miejscu wszczepu, związanych z relatywnie dużą ilością kwasowych produktów degradacji, uwalnianych w trakcji degradacji polimeru [52]. Obecnie bardzo często PLA lub PGA stosowane są jako materiały referencyjne dla nowo opracowywanych materiałów w zastosowaniach dla inżynierii tkankowej.

Poly(hydroksyalkaniany) (PHA) są kolejną grupą materiałów, które degradują na drodze hydrolizy i podobnie jak w przypadku estrów alifatycznych, ich wzajemna kopolimeryzacja jest sposobem otrzymania materiałów o zróżnicowanych właściwościach i biokompatybilności [53]. Szczególnie interesujący dla inżynierii tkankowej wydaje się poli(3-hydroksymaślan) (PHB), który wykorzystany został do uzupełnienia ubytków

kostnych, gdzie po 12 miesiącach nie zaobserwowano chronicznego stanu zapalnego. Dodatkowo odbudowująca się kość pokryła 80% powierzchni implantu stając się wysoko zorganizowaną tkanką [54]. Jedną z największych przeszkód intensywnych prac nad wykorzystaniem tych biokompatybilnych polimerów jest ich ograniczona dostępność oraz czasochłonność w pozyskiwaniu odpowiedniej do procesów przetwórczych ilości polimeru z kultur bakterii. Otrzymywanie PHB na drodze otwarcia pierścienia butyrolaktonu jest natomiast procesem bardzo kosztownym ze względu na wysoką cenę monomeru. Alternatywą dla tych dwóch procesów mają być produkty inżynierii genetycznej – rośliny modyfikowane genami pochodzenia bakteryjnego, gromadzące PHB w takich partiach jak liście czy pędy [55].

Kolejną grupę materiałów testowanych pod kątem zastosowań w inżynierii tkankowej stanowią kopoli(etero–estry) zawierające fragmenty poli(glikolu etylenowego) (PEG) i poli(tereftalanu butylenu) (PBT), znane pod komercyjną nazwą PolyActive® (OctoPlus), stosowane obecnie do systemów kontrolowanego uwalniania leków [56]. Kopolimery te, ze względu na obecność wiązań estrowych ulegają degradacji hydrolitycznej, dodatkowo jednak zaobserwowano podatność na utlenianie wiązań eterowych, w obecności wolnych rodników. Szybkość degradacji zarówno na drodze hydrolizy jak i utleniania kontrolowana może być poprzez udział segmentów sztywnych i giętkich, jaki i poprzez ciężar cząsteczkowy oligomeru eterowego. Zaobserwowano, iż szybszej degradacji ulegają materiały, których segmenty sztywne zbudowane są z PEG o ciężarze cząsteczkowym 1000 g/mol, a jego udział wagowy wynosi 70%. Przy ciężarze cząsteczkowym PEG 300 g/mol i tym samym udziale wagowym segmentów, wartość granicznej liczby lepkościowej po 6 miesiącach testu degradacji pozostała na tym samym poziomie. Oprócz kontrolowanego uwalniania leków, materiały te testowane były z powodzeniem w inżynierii tkanki kostnej [57].

2.2.1 Degradacja materiałów polimerowych

Degradacja, jako nieodwracalny proces prowadzący do istotnych zmian w strukturze materiału polimerowego, zwykle definiowana jest jako proces chemiczny, któremu towarzyszą zmiany określonych właściwości np. wytrzymałościowych, fragmentacja masy próbki lub obniżenie ciężaru cząsteczkowego polimeru [58]. Ze względu na rodzaj czynnika wywołującego degradację wyróżnić można: fotodegradację, degradację

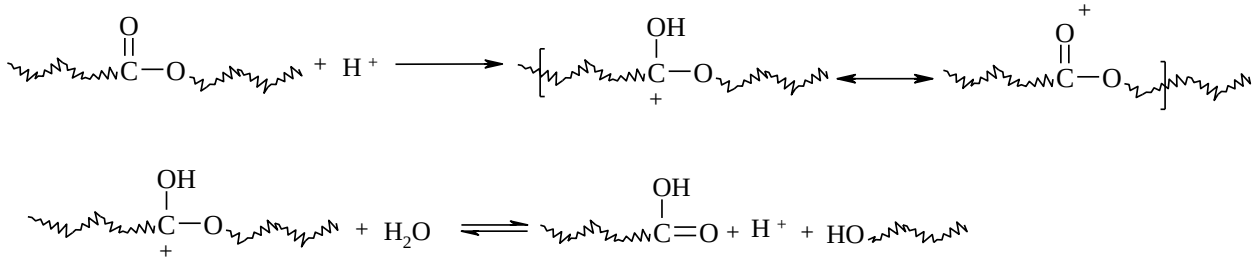
mechaniczną, chemiczną oraz degradację termiczną. W przypadku polimerów o potencjalnym zastosowaniu medycznym, trzy pierwsze typy degradacji mogą odgrywać kluczową rolę w możliwościach aplikacyjnych danego materiału. Znane są procesy fotodegradacji, zachodzące podczas sterylizacji radiacyjnej promieniowaniem γ, dla komercyjnie stosowanych biomateriałów, jak np. poliuretanowy Pellathane® P80A [59]. W przypadku degradacji mechanicznej, jej główne negatywne skutki obserwowane są wszędzie tam gdzie materiał podawany jest cyklicznym obciążeniom lub stałemu tarciu, jak ma to miejsce w przypadku panewek implantów stawu biodrowego, wykonanych z polietylenu o ultra wysokim ciężarze cząsteczkowym. W przypadku degradacji chemicznej, najczęstszym zjawiskiem jest hydroliza takich wiązań jak: estrowe, bezwodnikowe, czy orto-estrowe [60–62]. Spośród głównych czynników wpływających na szybkość hydrolizy materiału polimerowego wymienić należy:

- ciężar cząsteczkowy polimeru i polidyspersyjność;
- hydrofilowość/hydrofobowość powierzchni materiału;
- warunki prowadzenia procesu degradacji (temperatura, pH, siła jonowa);
- stopień krystaliczności lub usieciowania polimeru;
- rodzaj kształtki (porowatość, stosunek jej powierzchni do objętości).

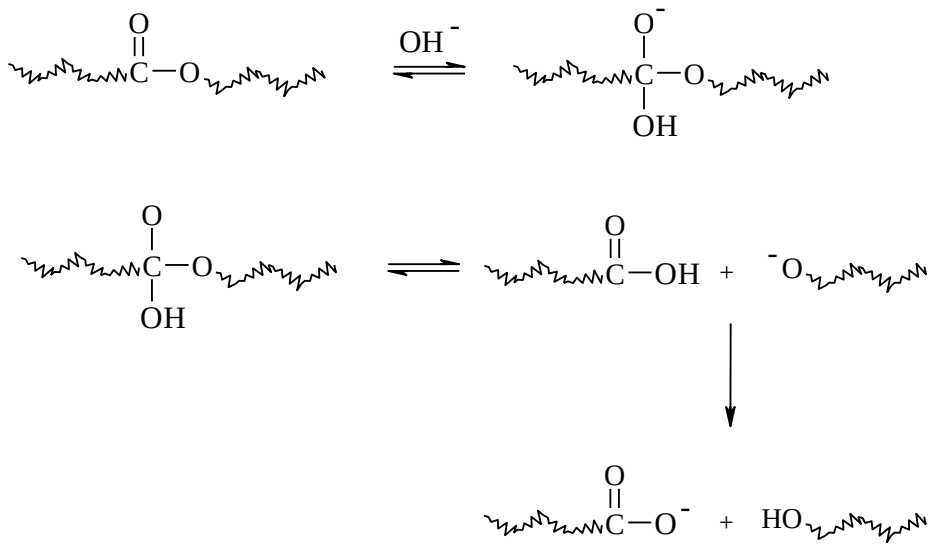
Jednak głównym kryterium podatności na degradację materiałów polimerowych m.in. poliestrów jest ich budowa chemiczna. W zależności od tego czy poliester wykazuje budowę alifatyczną, czy też aromatyczną, bądź też stanowi kopolimer blokowy, charakteryzujący się alifatyczno – aromatyczną budową, wyróżnia się materiały całkowicie degradowane lub praktycznie nieulegające degradacji. Należy wspomnieć również o szczególnym rodzaju degradacji hydrolitycznej, odbywającej się w obecności enzymów-depolimeraz, znanej powszechnie jako biodegradacja. Biodegradacji pod wpływem esteraz ulegają m.in. poli(3–hydroksyalkaniany), alifatyczne poliestry, produkowane bezpośrednio przez mikroorganizmy, bądź też na drodze polimeryzacji z otwarciem pierścienia [63,64]. Szeroko opisane w literaturze są również procesy enzymatycznego rozkładu takich poliestrów alifatycznych jak poli(kwas mlekowy), alifatycznych kopolimerów poli(estrowo–estrowych) (PBuS/PBA) czy poli(eterowo–estrowych) (PBS/PEO) [65–68]. Dużo mniej podatne na biodegradację są poliestry aromatyczne, głównie ze względu na bardzo małą ruchliwość łańcucha oraz wysoką krystaliczność, a także hydrofobową

powierzchnię, co utrudnia adsorpcję cząsteczek enzymów na powierzchni polimeru. Mechanizm degradacji takich materiałów jest różny w zależności od pH środowiska, co schematycznie przedstawione jest na rysunku 2.2.1.1.

pH ≤ 7



pH > 7



Rys. 2.2.1.1 Schemat degradacji hydrolitycznej wiązania estrowego w środowisku kwasowym lub neutralnym oraz zasadowym [69]

Jak wynika z powyższego schematu, każde rozerwanie łańcucha wymaga obecności cząsteczki wody, a towarzyszące temu procesowi powstawanie końcowych grup karboksylowych i hydroksylowych umożliwia śledzenie zmian degradacyjnych na podstawie ich analizy.

W procesie degradacji hydrolitycznej wyróżnić można dwa etapy. W pierwszym etapie dochodzi do przypadkowego rozrywania wiązań estrowych, co wpływa na obniżenie ciężaru cząsteczkowego polimeru, powoduje również zmiany w morfologii próbki i właściwości mechanicznych materiału polimerowego, nie powoduje natomiast zmiany masy wyjściowej próbki. W drugim etapie dochodzi do mierzalnej utraty masy próbki, co związane jest z dalszym obniżaniem ciężaru cząsteczkowego i przechodzeniem oligomerycznych produktów hydrolizy do wody. Dodatkowo obserwowane jest dalsze pogarszanie właściwości mechanicznych.

W przypadku poli(tereftalanu etylenu) degradacja hydrolityczna w temperaturze pokojowej zachodzi wolno, głównie ze względu na wysoką krystaliczność tego materiału i wynikające z tego trudności w dyfuzji wilgoci i tlenu. Dlatego też hydrolizę PET przeprowadza się w podwyższonej temperaturze, niekiedy powyżej jego temperatury topnienia, ze względu na szybsze zachodzenie procesów degradacji hydrolitycznej w stanie stopionym [69]. Stabilność hydrolityczna PET wykorzystywana jest głównie w przemyśle opakowaniowym, lecz również przy wytwarzaniu niedegradowalnych nici chirurgicznych i elementów protez. Jednak ze względu na ogromne ilości odpadowego PET poszukuje się metod zwiększenia jego hydrofilowości poprzez kopolimeryzację z kwasami alifatycznymi lub zastępowanie glikolu etylenowego innymi diolami [70].

2.2.2 Nanocząstki w inżynierii tkankowej

Wprowadzenie do struktury polimerów takich cząstek ceramicznych takich jak: bioaktywne szkło, fosforan wapnia (TCP), hydroksyapatyt (HAp) czy nanokrystaliczny dwutlenek tytanu (TiO_2), istotnie zwiększa bioaktywność tych układów [71–74]. Wprowadzenie tego rodzaju napełniaczy umożliwia lepszą kontrolę nad degradacją i kinetyką resorpcji matrycy polimerowej, zwiększa również biokompatybilność i integrację z tkanką kostną. Dodatkowo również zasadowe produkty resorpcji TCP lub HAp zobojętniają kwasowy odczyn powstający w wyniku resorpcji produktów ubocznych degradacji np. alifatycznych poliestrów, co pozwala uniknąć niekorzystnego dla komórek obniżenia pH [75]. Podjęte próby wytworzenia kompozytu zawierającego naturalne substancje białkowe występujące w chrząstce lub kościach, są również obiecujące. Trójwymiarowe skafoldy otrzymane metodą elektroprzędzenia z układu PCL/HAp/ żelatyna wpłynęły istotnie na proliferację osteoblastów (88%), aktywność enzymatyczną

fosfatazy alkaicznej (77%), a także proces mineralizacji (66%) w stosunku do skafoldu otrzymanego jedynie z PCL. Dodatek żelatyny wpłynął również na polepszenie właściwości mechanicznych [76].

Ditlenek tytanu jest szeroko opisanym w literaturze materiałem znanym głównie ze swoich właściwości fotokatalitycznych, wykorzystywanych w takich dziedzinach jak: techniki sterylizacyjne, materiały samoczyszczące się, oczyszczanie wody i powietrza [77]. Wiadome jest, iż właściwości fotokatalityczne wykazuje głównie jedna z form krystalicznych TiO_2 – anataz, dlatego też w badaniach porównawczych procesów fotodegradacyjnych poliuretanów modyfikowanych anatazem lub rutylem zaobserwowano wzrost procesów fotooksydacyjnych dla polimerów modyfikowanych anatazem, podczas gdy rutyl działał jako fotostabilizator dla matrycy polimerowej [78].

Ponieważ ditlenek tytanu jest już powszechnie stosowany w kontakcie z żywymi tkankami np., jako pigment w kosmetykach [79,80], pastach do zębów, a dodatkowo posiada szereg zalet z punktu widzenia materiału kontaktującego się z organizmem, stał się interesującym kandydatem do zastosowań w inżynierii tkankowej. Przeprowadzone badania odpowiedzi komórkowej na bezpośredni kontakt z TiO_2 oraz innymi nanocząstkami (SiO_2, Co, Ni, sproszkowanego PVC) wykazały, iż ditlenek tytanu w mniejszym stopniu niż Co oraz SiO_2 powodował zapalną reakcję ze strony komórek śródbłonkowych [81]. Wpływ wielkości cząstek TiO_2 na ich potencjalną toksyczność związaną z obecnością wolnych rodników został opisany w pracy [82]. Podobną cytotoksyczność nanometrycznego TiO_2 wykazały testy polegające na wstrzyknięciu odpowiedniej dawki tego nanonapełniacza w jamę brzuszną, a następnie śledzeniu jego przemieszczania się do mózgu myszy. Wykazano, że przy zwiększającej się dawce TiO_2 wzrastały uszkodzenia w mózgu wywołane stresem utleniającym, co wywoływało z kolei kaskadowe reakcje w całym organizmie [83].

Wpływ wielkości cząstek TiO_2, a co za tym idzie morfologii powierzchni na adhezję osteoblastów badano porównując zachowanie się komórek na powierzchni tlenku tytanu o uziarnieniu 32 nm oraz 2,12 μm [84]. W przypadku nanostrukturalnej powierzchni adhezja komórek była znacząco większa niż w przypadku mikrofazowego materiału.

Działanie antymikrobiologiczne TiO_2 w stosunku do bakterii z grupy *Escherichia coli* (*E. coli*), a także *Candida albicans* (*C. albicans*) badane było w układach napełniacz-

poliuretanowa matryca polimerowa [85]. Wykazano, iż już przy niewielkim udziale nanonapełniacza, wynoszącym 0,1 – 0,5 % wag. uzyskuje się niemalże 100% efekt bakteriobójczy po zaledwie 24 h inkubacji w świetle widzialnym. Podobny efekt bakteriobójczy wykazywał izotaktyczny polipropylen modyfikowany TiO_2, przy czym w przypadku tego termoplastu efektywny udział wagowy TiO_2 pod kątem działania sterylizującego, wynosił 2% wag. [86]. Tego typu nanokompozyty posiadające właściwości bakteriobójcze w obecności światła widzialnego są doskonałymi kandydatami nie tylko w zastosowaniach biomedycznych, lecz także jako opakowania do żywności czy „samodezynfekujące się" powłoki.

2.2.3 Inżynieria tkankowa mięśnia sercowego

Największym obecnie wyzwaniem dla inżynierii tkankowej jest regeneracja tkanek nieposiadających naturalnych mechanizmów odbudowy. Poza kośćmi, wątrobą i prawdopodobnie nerkami inne tkanki, a zwłaszcza chrząstka lub mięsień sercowy dorosłego człowieka, posiadają bardzo ograniczoną zdolność do samo naprawy, dlatego też opracowanie metody wspomagania ich regeneracji wydaje się szczególnie ważne.

Choroby układu krążenia, zawał serca a także choroba wieńcowa to główne przyczyny umieralności wśród mieszkańców Europy w 2002 [87]. Z pośród chorób niezakaźnych, choroby układu krążenia stanowiły ok. 72% przyczyn śmierci, w tym ponad 50% były to zawały serca. Dlatego też oprócz odpowiedniej profilaktyki zapobiegającej tym chorobom, niezwykle istotne jest opracowywanie nowoczesnych metod ich leczenia. Skupiając uwagę na uszkodzeniach, do jakich dochodzi w przypadku zawału mięśnia sercowego, wymienić należy: obumieranie komórek mięśnia sercowego w miejscu zawału, jak również znacznie częstsze patologiczne zmiany w budowie lewej komory serca, zaburzające prawidłowe funkcjonowanie tego organu. Obecnie wyróżnić można trzy główne strategie inżynierii tkankowej w leczeniu mięśnia sercowego [88, 89]:

(1) bezpośrednia transplantacja komórek w miejsce uszkodzenia;

(2) techniki mające na celu zastąpienie uszkodzonych tkanek;

(3) terapie pobudzające serce do regeneracji zniszczonych obszarów tkanek.

Pierwsza z metod polegająca na implantacji zawiesiny komórek bezpośrednio do serca, jest stosunkowo prosta ze względu na możliwość zastosowania różnego rodzaju komórek: embrionalnych hemocytoblastów, komórek rezerwuarów tkankowych (*progenitor cells*),

czy fibroblastów [90–92]. Przeprowadzone próby potwierdziły, że nowe dostarczone do miejsca ubytku komórki potrafią wbudować się w strukturę serca, jednak tylko w przypadku niezbyt dużych ubytków w tkance mięśnia sercowego, gdyż to ona stanowi podporę dla adhezji i proliferacji komórek. Obecnie trwające badania kliniczne mają na celu opracowanie najbardziej bezpiecznej i poręcznej metody dostarczania komórek do serca pacjentów [94]. Drugie podejście w największym stopniu pokrywa się z podstawową zasadą inżynierii tkankowej i polega na wytworzeniu trójwymiarowego skafoldu, służącego jako podłoże do hodowli komórek sercowych, a następnie jego wszczepieniu w miejsce ubytku. Przykładem takiego podejścia było wytworzenie trójpłatkowej zastawki z poli(hydroksyalkanianu), charakteryzującej się porami wielkości 80-180 μm, na której z powodzeniem namnażały się komórki naczyniowe [95]. Dlatego też ta metoda wydaje się najbardziej odpowiednia do wytwarzania implantów dla dużych ubytków tkankowych np. zastawki, naczynia krwionośne. W trzeciej metodzie otrzymuje się w warunkach *in vitro* zawiesinę lub warstwę odpowiednich komórek, z lub bez zorientowanego podłoża, w zależności od rodzaju użytych komórek. Tego typu formy naturalnych tkanek mogą być wykorzystane do leczenia niewielkich ubytków w obszarze mięśnia sercowego, jak również w przypadku możliwości „wyhodowania" całych części organu, mogą zastąpić testy na zwierzętach [96].

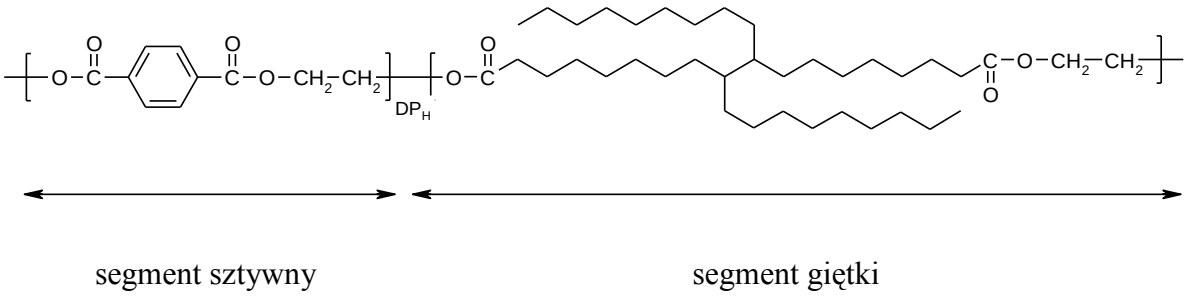
Niezwykle interesujące wydaje się również opracowanie materiału nadającego się na tzw. łatki nasercowe. Jest to koncepcja dotycząca w szczególności regeneracji lewego koniuszka serca uszkodzonego w wyniku zawału. Polega ona na wytworzeniu łatki np. w kształcie pierścienia, następnie namnożeniu na niej komórek (w warunkach *in vitro*) i w dalszej kolejności implantacji do nekrotycznego obszaru serca. Taka łatka ma za zadanie zarówno być nośnikiem dla komórek, jak również stanowić mechaniczne wsparcie dla uszkodzonych miofibryl. Przykładem takiej łatki nasercowej mogą być skafoldy otrzymane z poli(kwasu glikolowego), modyfikowane powierzchniowo poli(3-hydroksymaślanem), które posłużyły jako podłoża do hodowli miofibroblastów wyizolowanych z pępowiny noworodków [97].

Ze względu na skurczowo-rozkurczową pracę mięśnia sercowego, niezwykle ważny jest kształt łatki, sposób jej mocowania, a także sztywność. Parametry te powinny być dobrane w takiej kombinacji, aby nie zaburzać fizjologicznych skurczów serca, oraz w przypadku osadzenia na materiale pulsujących komórek włókien mięśniowych,

wzmacniać efekt ich skurczu. Kolejnym istotnym parametrem charakteryzującym materiał, o potencjalnym zastosowaniu w inżynierii tkankowej mięśnia sercowego jest czas jego degradacji. W zależności od funkcji, jaką spełnić ma materiał, czas ten może być krótszy lub dłuższy. Gdy polimer traktowany jest jedynie jako podłoże, służące dostarczeniu komórek w miejsce uszkodzenia, bez konieczności mechanicznego wspomagania mięśnia sercowego, okres degradacji materiału jest relatywnie krótki np. 3 miesiące w przypadku siateczki z poli(kwasu glikolowego) [98]. Dłuższy okres degradacji zaobserwowano dla porowatych skafoldów otrzymanych z kopolimeru węglanu trimetylenu oraz D,L–laktydu. Stanowiły one podłoże dla komórek kardiomiocytów, które pełnej degradacji/resorpcji ulegało po 10 miesiącach od momentu implantacji [99].

3. Cel pracy

Dotychczasowe ponad 20– letnie doświadczenie pracowników Instytutu Polimerów ZUT (dawnej Politechniki Szczecińskiej) w syntezie polimerów z grupy poliestrowych elastomerów termoplastycznych (TPE) [100–102] oraz potwierdzona we wcześniejszych pracach [103–107] biozgodność poliestrów kondensacyjnych, a szczególnie poli(tereftalanu etylenu) (PET) [103–105] oraz polimerów zawierających reszty kwasów tłuszczowych lub ich dimerów [106,107] pozwoliła mi zaprojektować nowe, nieopisane dotąd w literaturze materiały polimerowe o charakterze nanostrukturalnych i nanokompozytowych układów zawierających nanokrystaliczny TiO_2 w osnowie z poliestrowych kopolimerów multiblokowych. Kopolimery składały się z segmentów sztywnych budowanych przez jednostki jak w poli(tereftalanie etylenu) (PET) oraz segmentów giętkich zawierających dimeryzowany kwasu tłuszczowy – dimer kwas linoleinowego (DLA), których ogólny wzór przedstawiono na rysunku 3.1.



Rys.3.1. Wzór kopolimerów PET/DLA; DP_H – stopień polimeryzacji kondensacyjnej segmentów sztywnych

W związku z otrzymaniem nowych, nieopisanych wcześniej kopolimerów multiblokowych oraz nanokompozytów na ich podstawie, celem pracy było potwierdzenie założonej budowy chemicznej, jak również określenie właściwości fizyko-chemicznych, termicznych, mechanicznych, a także morfologii otrzymanych materiałów. Kopolimery multiblokowe PET/DLA charakteryzują się znaczną hydrofobowością, dlatego zaplanowałam oprócz zastosowania hydrofilowych nanocząstek TiO_2, wykorzystanie niskocząsteczkowych kwasów będących produktami pośrednimi lub pochodnymi kwasów występujących w cyklu Krebsa do syntez polimerów o zwiększonej hydrofilowości.

Istotnym celem pracy było również wykazanie przydatności nowych układów polimerowych do zastosowań w inżynierii tkankowej poprzez ocenę biozgodności *in vitro* w obecności określonych linii komórkowych oraz badania biozgodności *in vivo* na małych zwierzętach doświadczalnych. Zaplanowałam również badania związane z degradacją materiałów w różnych środowiskach.

Mając na uwadze planowane zastosowanie opracowanych materiałów w inżynierii tkankowej mięśnia sercowego za szczególny cel postawiono opracowanie materiałów, które stanowiłyby nie tylko rusztowanie dla komórek (ludzkich embrionalnych komórek macierzystych mięśnia sercowego), ale byłby jednocześnie „mechanicznym" wsparciem dla uszkodzonych tkanek.

4. Zakres pracy

W związku z tak określonym, jak opisano w p. 3, celem pracy, jej zakres obejmuje następujące zagadnienia:

- opracowanie sposobu wytwarzania nanostrukturalnych układów polimerowych PET/DLA zawierających (i) nanokrystaliczny ditlenk tytanu (TiO_2) (oznaczenie *nano*-PET/DLA), o stałym udziale wagowym segmentów sztywnych PET (30%) oraz giętkich DLA (70%), przy zmieniającym się udziale wagowym nanonapełniacza (0,1 – 0,6% wag. TiO_2) oraz (ii) kwasy niskocząsteczkowe,

- charakterystykę właściwości fizyko-chemicznych, termicznych i mechanicznych wytworzonych materiałów;

- ocenę podatności na degradację hydrolityczną i jej wpływ na zmiany właściwości,

- ocenę biozgodności *in vitro* oraz *in vivo* dla potencjalnych zastosowań biomedycznych.

5. Część eksperymantalna

5.1 Surowce i substancje pomocnicze stosowane do syntez

Na etapie syntezy multiblokowych elastomerów termoplastycznych oraz ich późniejszych modyfikacji stosowano następujące odczynniki i substancje:

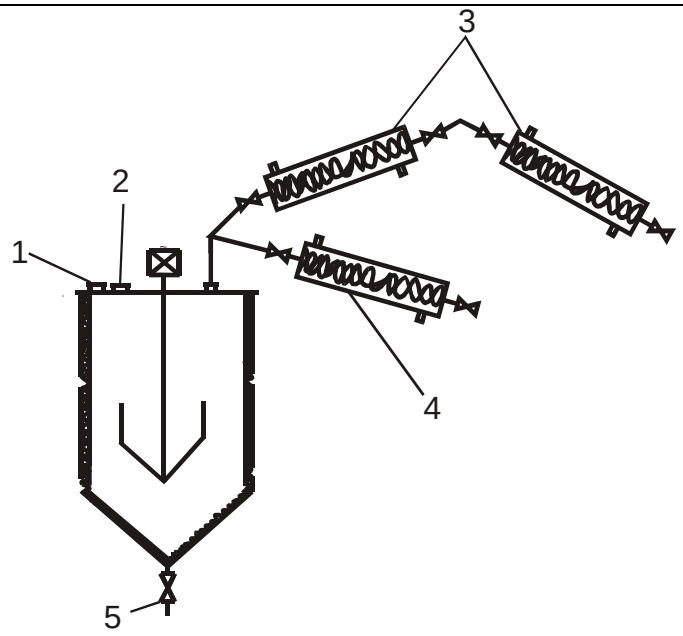
- tereftalan dimetylu (DMT) – ZCh Elana, Toruń
- glikol etylenowy (GE) – POCH, Sigma-Aldrich 99,8%
- 1,4-butanodiol (BD) – Sigma Aldrich, 98%
- dimeryzowany kwas tłuszczowy (DLA) – PRIPOL 1009 – Croda
- kwas jabłkowy – Roth, ≥99%
- kwas winowy – Sigma–Aldrich, 99%
- ditlenek tytanu (TiO_2) – AEROXIDE P25 (20 nm), Evonik Degussa
- octan cynku ($Zn(CH_3COO)_2$) –Sigma–Aldrich,
- tlenek antymonu (Sb_2O_3) – 1,3% roztwór w glikolu etylenowym– Fluka, ≥99%

Wszystkie odczynniki używane były w stanie surowym, bez wcześniejszego oczyszczania.

5.2 Synteza elastomerów termoplastycznych i nanokompozytów

Aparatura do syntez

Aparaturę do syntez stanowił reaktor wykonany ze stali nierdzewnej o pojemności 1,8 dm^3, zaopatrzony w mieszadło kotwicowe oraz dwie chłodnice, umożliwiające odprowadzanie produktów ubocznych w poszczególnych etapach syntezy. Schematyczną budowę reaktora przedstawia rysunek 5.2.1. Temperatura syntezy kontrolowana była poprzez system grzałek elektrycznych rozmieszczonych w dwóch strefach. Dla ułatwienia odbioru produktu reaktor wyposażono w dno stożkowe oraz dodatkową grzałkę umożliwiającą ogrzewanie króćca spustowego. Pod dnem reaktora umieszczona była wanna z wodą, do której wprowadzano strumień stopionego polimeru.



Rys.5.2.1 Schematyczna budowa reaktora polikondensacji: 1– króciec wsadowy, 2– króciec doprowadzający azot, 3– chłodnice odprowadzające metanol, 4– chłodnica odprowadzająca glikol, 5– króciec spustowy

Warunki syntezy

Kopolimery multiblokowe PET/DLA otrzymywane były w procesie dwuetapowej syntezy, obejmującej etap transestryfikacji oraz polikondensacji w masie stopionej, w obecności katalizatorów stosowanych jak w syntezie poli(tereftalanu etylenu). W pierwszym etapie zachodziła transestryfikacja pomiędzy tereftalanem dimetylu (DMT) a glikolem etylenowym (GE) (przy nadmiarze glikolu etylenowego 2,5), która prowadzona była przy udziale octanu cynku jako katalizatora, a jej postęp kontrolowany był poprzez obserwację ilości wydzielanego produktu ubocznego – metanolu. Temperatura procesu była stopniowo podnoszona od 100 do 210°C, przez ok. 2 h. Za koniec reakcji przyjęto moment odebrania ok. 95% ilości metanolu. W kolejnym etapie do masy reakcyjnej dodawano dimeryzowany kwas tłuszczowy (DLA) oraz katalizator polikondensacji – roztwór Sb_2O_3 w glikolu etylenowym. Temperatura polikondensacji wynosiła 265-270°C, ciśnienie 0,2–0,4 hPa, a czas wynosił 2 h. Następnie prowadzono chłodzenie polimeru do temperatury ok. 185°C również pod obniżonym ciśnieniem. Stopioną masę polimerową wytłaczano z reaktora do wanny z zimną wodą i uformowaną w ten sposób żyłkę następnie

granulowano. Otrzymano w ten sposób polimery o założonym udziale segmentów sztywnych do giętkich wynoszącym 30:70%wag, co odpowiada wyliczonemu stopniowi polimeryzacji segmentów sztywnych, DP_H=1,32.

Nanokompozyty, zawierające od 0,1 do 0,6 % wag. ditlenku tytanu otrzymane były metodą *in-situ* podczas polikondensacji przebiegającej w identycznych warunkach jak układ bez nanonapełniacza. Odpowiednia ilość nanokrystalicznego TiO_2 dyspergowana była w ciekłym monomerze – DLA, przy użyciu ultradźwięków (sonikator Hilscher). Dyspergowanie prowadzone było przy cyklu 0,7 i amplitudzie 70, w czasie 30 minut.

W przypadku otrzymywania kopolimerów zawierających poli(tereftalan butylenu)(PBT) jako składnik segmentów sztywnych, czyli układów PBT/DLA, stanowiących materiał porównawczy w wybranych testach, synteza prowadzona była przy udziale 1,4–butanodiolu (BD) z zastosowaniem katalizatora magnezowo-tytanowego, w warunkach opisanych we wcześniejszych publikacjach [8,106]. Otrzymywanie nanokompozytów PBT/DLA zawierających TiO_2 prowadzono w sposób analogiczny do opisanego powyżej, czyli tak jak dla nanokompozytu, w którym PET/DLA stanowił osnowę.

Modyfikacja układu wyjściowego małocząsteczkowymi α-hydroksykwasami – kwasem jabłkowym oraz winowym prowadzona była również na drodze polikondensacji stopowej, w takich samych warunkach jak polikondensacja układu PET/DLA, a kwasy niskocząsteczkowe dodawane były po etapie transestryfikacji razem z DLA i odpowiednim katalizatorem.

5.3 Przygotowanie próbek do badań

Pocięte polimery przetwarzano główne metodą prasowania na cienkie filmy o grubości 0,5 mm. Wszystkie polimery przed prasowaniem były suszone w temperaturze 60°C, pod ciśnieniem 0,1 hPa, przez 24 godziny. Polimery prasowano przy ciśnieniu 25 MPa w temperaturze o ok. 30°C wyższej niż ustalona na aparacie Boetius'a temperatura topnienia. Po sprasowaniu próbki chłodzono w prasie hydraulicznej do temperatury pokojowej. Z otrzymanych błon polimerowych o grubości 0,5 mm wycinano odpowiednie kształtki do następujących badań: spektroskopii w podczerwieni, różnicowej kalorymetrii skaningowej, badań wytrzymałościowych, testów degradacji hydrolitycznej oraz pomiaru kąta zwilżania.

Próbki do pomiarów kąta zwilżania metodą kropli oraz mikroskopii sił atomowych otrzymane były również metodą powlekania wirowego (*ang. spin–coating*) na aparacie Spin Coater Headway Research Inc., model PWM 32. Odpowiednia objętość roztworu polimeru (150 μl o stężeniu 10 mg/ml) bezpośrednio po umieszczeniu na szkiełku nakrywkowym (średnica 18 mm) poddawana była ruchowi wirowemu z prędkością 1200 rpm/sec. W wyniku szybkiego odparowania rozpuszczalnika – chloroformu otrzymano cienkie filmy polimerowe o grubości 60 – 160 nm.

5.4 Charakterystyka metod badawczych

Spektroskopia w podczerwieni (ATR FT-IR)

Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera, jako jedna z dwóch metod spektroskopowych stosowanych w niniejszej pracy umożliwiła wstępną ocenę budowy chemicznej otrzymanych elastomerów termoplastycznych. Analiza przeprowadzona na aparacie firmy Thermo Nicolet z przystawką Golden Gate w zakresie pomiędzy 4000 a 400cm^{-1} pozwoliła stwierdzić obecność wiązań charakterystycznych dla poliestrów aromatyczno-alifatycznych oraz w późniejszych etapach prac laboratoryjnych śledzić zmiany w budowie chemicznej polimerów, następujące w wyniku degradacji hydrolitycznej.

Spektroskopia ramanowska

Do analizy próbek w postaci filmów polimerowych o grubości 0,5 mm zastosowano konfokalną dyspersyjną mikrospektroskopię ramanowską. Analizy wykonano korzystając z konfokalnego dyspersyjnego spektrometru ramanowskiego ALMEGA XR firmy Thermo – Nicolet wyposażonego w dwa lasery umożliwiające pracę z wiązką światła laserowego o długości 532 nm i mocy do 50 mW lub z wiązką światła laserowego o długości 785 nm i mocy do 300 mW. Spektrometr ten jest wyposażony w układ siatek nisko- i wysokorozdzielczych, zapewniających zdolność rozdzielczą widmową około 2 cm^{-1} w trybie wysokiej rozdzielczości. Dodatkowo aparat wyposażony jest układ filtrów umożliwiających krokową redukcję mocy wiązki światła laserowego do 1% mocy nominalnej.

Do analiz zastosowano głównie wiązkę światła laserowego o długości 532 nm. Dla porównania niektóre analizy wykonano również z użyciem światła laserowego o długości 785 nm. Analizy wykonywano w trybie normalnej jak i wysokiej rozdzielczości widmowej.

Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H NMR)

Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (^{1}H NMR) została wykorzystana do szczegółowej oceny budowy chemicznej otrzymanych kopolimerów blokowych oraz układów modyfikowanych kwasami α-hydroksylowymi. Dzięki dużej czułości tej metody możliwe było eksperymentalne określenie udziału wagowego poszczególnych bloków oraz obliczenie rzeczywistego stopnia polikondensacji segmentów sztywnych.

Do badań na aparacie Bruker DPX 400 używano roztworów polimerów w deuterowym chloroformie, a widma otrzymano przy częstościach 400.13 MHz (^{1}H NMR).Wzorcem wewnętrznym był tetrametylosilan.

Na podstawie zredukowanych intensywności określonych pików dokonałam obliczenia stopnia polikondensacji DP, wyrażonego wzorem:

$$DP_H = \frac{I_{8,11}}{I_{2,33}} \qquad (1)$$

gdzie: $I_{8,11}$, $I_{2,33}$– intensywność zredukowana przy 8,11 oraz 2,33 ppm odczytana z widma ^{1}H NMR

Przy znajomości DP możliwe było obliczenie wagowej zawartości segmentów w kopolimerze, przy wykorzystaniu wzoru:

$$\%W_H = \frac{DP_H \cdot M_H}{DP_H \cdot M_H + M_S} \qquad (2)$$

gdzie: $\%W_H$– udział wagowy segmentów sztywnych, DP_H– stopień polikondensacji segmentów sztywnych, M_H, M_S- masy molowe kolejno segmentu sztywnego oraz giętkiego.

Graniczna liczba lepkościowa

Graniczną liczbę lepkościową (GLL) oznaczono stosując roztwory polimerów w mieszaninie fenolu i trichloroetylenu (1:1 obj.) w temperaturze 30°C. Mierzono czas przepływu czystego rozpuszczalnika oraz roztworów polimerów o stężeniu ok. 0,5

g/100cm^3 pomiędzy dwoma punktami pomiarowymi wiskozymetru Ubbelohde'a (stała kapilary: 0,01112).

Do obliczenia wartości GLL stosowano następujący wzór:

$$GLL = \frac{\sqrt{2 \times (\eta_w - \ln \eta_{wzgl})}}{c} \quad [\frac{dl}{g}] \tag{3}$$

$$\eta_{wzgl} = \frac{t_1}{t_0} \quad i \quad \eta_w = \eta_{wzgl} - 1$$

gdzie:

η_w – lepkość właściwa

η_{wzgl} – lepkość względna

c– stężenie [g/100ml]

t_0 – czas przepływu rozpuszczalnika [s]

t_1– czas przepływu roztworu polimeru [s]

Oznaczanie ciężarów cząsteczkowych metodą chromatografii żelowej (GPC)

Oznaczenia liczbowo i wagowo średnich ciężarów cząsteczkowych oraz stopnia polidyspersyjności materiałów dokonano na aparaturze złożonej z pompy Spectra Physics 8800, detektorów- refrektometru różnicowego RI (VE3580, Viscotek) i wiskozymetru (270 Dual Detector Array, Viscotek). Rozdział polimerów przeprowadzono na układzie dwóch wysokorozdzielczych kolumn styrażelowych PLgel 5 μm Mixed-C firmy Polymer Laboratories. Jako fazę ruchomą stosowano tetrahydrofuran o szybkości przepływu 1 ml/min. Oznaczenia przeprowadzono w temperaturze 35°C. Roztwory polimerów o stężeniu 0,1% były filtrowane przez filtr 0,45 μm.

Obliczenia liczbowo i wagowo średnich ciężarów cząsteczkowych dokonano w oparciu o kalibrację konwencjonalną wygenerowaną za pomocą standardów polistyrenowych o małej polidyspersyjności.

Spektroskopia mas z jonizacją przez rozpylanie w polu elektrycznym (ESI-MS)

Metoda ta wykorzystana była do określenia zarówno budowy chemicznej wyjściowego monomeru DLA, jak i analizy produktów degradacji w roztworach wodnych.

Analizę przeprowadzono w układnie wyposażonym w spektrometr masowy LCQ (Finnigan MAT) oraz w przystawkę umożliwiającą jonizację próbek metodą elektrorozpylania (ESI).

Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC)

Metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej przeprowadzono analizę właściwości termicznych otrzymanych materiałów. W trakcie badania stosowana była następująca metodyka:

1 ETAP– grzanie z prędkością 10°C/min w zakresie temperatur 30-300°C

2 ETAP– izotermiczne wygrzewanie w 300°C przez 1 minutę

3 ETAP– chłodzenie z prędkością 10°C/min w zakresie temperatur 300°C do -100°C

4 ETAP– izotermiczne chłodzenie w -100°C przez minutę

5 ETAP– grzanie z prędkością 10°C/min w zakresie temperatur -100- 300°C.

Obserwacji poddawane były procesy egzo– i endotermiczne, takie jak: krystalizacja, topnienie, oraz przejście fazowe, jakim jest przejście ze stanu szklistego do elastycznego. W związku z tym, na podstawie różnic ilości strumienia ciepła dostarczanych do wzorca oraz próbki, możliwe jest wyliczenie zmian ciepła właściwego (ΔC_p) charakterystycznego dla temperatury zeszklenia (T_g), jak również określenie entalpii krystalizacji (ΔH_c) oraz entalpii topnienia (ΔH_m).

Pomiary metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej prowadzono na aparacie TA Instruments model Q1000.

Stopień krystaliczności obliczyłam korzystając ze wzoru:

a) dla kopolimeru:

$$W_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^o} \cdot 100\% \quad [\%] \tag{4}$$

b) dla segmentu sztywnego:

$$W_{c,h} = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^o \cdot 0{,}3} \cdot 100\% \quad [\%] \tag{5}$$

gdzie:

ΔH_m– entalpia topnienia segmentów sztywnych z pomiarów DSC [J/g]

ΔH^{o}_{m}– entalpia topnienia fazy krystalicznej PET - 140 J/g [107]

0,3 – udział wagowy segmentu sztywnego.

Dynamiczna analiza termomechaniczna (DMTA)

Dynamiczne właściwości termomechaniczne, takie jak moduł zachowawczy (E'), moduł stratności (E") oraz mechaniczne tłumienie (tan δ), charakteryzują zachowanie się materiału podawanego działaniu okresowo przykładanej siły. Poznanie tych właściwości jest szczególnie ważne w momencie, gdy właściwości mechaniczne zmieniają się bądź to w funkcji temperatury, bądź częstotliwości. Dynamiczne właściwości termomechaniczne badane były od -90°C do temperatury topnienia polimeru, stosując częstotliwość 1 Hz oraz prędkość grzania 10 deg/min, na aparacie Reomatrics RSA-II.

Badania wytrzymałościowe przy statycznym rozciąganiu

Badania mechaniczne miały na celu zbadanie wpływu obecności nanonapełniaczy na właściwości mechaniczne otrzymanych nanokompozytów, w szczególności naprężenia zrywającego, wydłużenia względnego przy zerwaniu oraz modułu Young'a. Przeprowadzone zostały zgodnie z normą PN-EN ISO 527-1:1998 „Tworzywa sztuczne- oznaczanie cech wytrzymałościowych przy statycznym rozciąganiu" na maszynie wytrzymałościowej Intron 3366. Wykonałam 6 pomiarów dla każdej z próbek o grubości 0,5 – 0,7 mm i szerokości 4 mm, przy prędkości rozciągania wynoszącej 100 mm/min. Wydłużenie wyznaczone było przy użyciu bezdotykowego ekstensometru.

Interferometria światła widzialnego

Interferometria światła widzialnego, jako prosta metoda analizy optycznej powierzchni, wykorzystana była do określenia stopnia chropowatości powierzchni otrzymanych nanokompozytów. Wyznaczenia parametru *rms* (***r**oot–**m**ean–**s**quare of roughness*), czyli średniego odchylenia kwadratowego chropowatości, pozwoliło na etapie badań wstępnych określić wpływ obecności nanonapełniacza na właściwości powierzchniowe, zarówno próbek bezpośrednio po przetwórstwie jak i po teście inkubacji w symulowanym płynie fizjologicznym (SBF).

Badania przeprowadzone były na aparacie firmy Zygo – MetroPro (OMP-0347C), w Imperial College w Londynie podczas pobytu stypendialnego.

Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)

Obserwacje na skaningowym mikroskopie elektronowym (JEOL 1525) przeprowadzone były w celu obserwacji zmian na powierzchni otrzymanych materiałów, a także morfologii komórek w kontakcie z materiałami polimerowymi i nanokompozytami.

Próbki w postaci krążków o średnicy 12 mm i grubości 0.5 mm umieszczone były na specjalnych uchwytach i napylane złotem technicznym, w celu polepszenia jakości uzyskanych zdjęć, a także w celu redukcji niekorzystnych efektów związanych ze skondensowaną wiązką elektronów w komorze mikroskopu. Używano dwóch wielkości napięć przyspieszających elektrony: 10 i 20 kV. Dodatkowo przeprowadzono analizę spektrometrii rentgenowskiej z dyspersją energii (EDX) w celu identyfikacji związków wytrąconych z roztworu podczas testu w SBF.

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

W związku z obecnością nanonapełniaczy w matrycy polimerowej i niemożnością ich identyfikacji metodą SEM, konieczne było użycie techniki transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM).

Próbki do obserwacji w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (JEOL- JEM FX 2000) o grubości w zakresie 90-200 nm przygotowane były na krio-ultramikrotomie (Power Tome XL, RMC Products by Boeckeler) w -80°C i umieszczone na miedzianych siatkach. Następnie próbki zostały napylone węglem. Obserwacji dokonano przy napięciu 200 kV.

Badania SEM i TEM przeprowadziłam podczas pobytu stypendialnego w Imperial College w Londynie.

Mikroskopia sił atomowych (AFM)

Istotą działania mikroskopu sił atomowych jest pomiar siły działającej pomiędzy badaną powierzchnią a przesuwającym się po niej lub nad nią ostrzem krzemowym, umieszczonym na sprężynce. Badania prowadzone były na próbkach otrzymanych metodą

spin-coatingu, na aparacie Nanoscope IV (Veeco/Digital Instruments). Maksymalny obszar skanowania wynosił 150x150 μm.

Oznaczanie kąta zwilżania

Oznaczanie kąta zwilżania przeprowadzono dwoma metodami:

1. *Metodą kroplową* na aparacie DataPhysisc, Contact Angle System OCA, wykorzystując próbki otrzymane metodą powlekania wirowego szkiełek nakrywkowych. Badania przeprowadzone były przy użyciu ultra czystej wody, objętość kropli nanoszonej na powierzchnię warstwy polimeru wynosiła 5μl. Dla każdego polimeru kąt zwilżania badano na 3 szkiełkach, w 5 punktach.
2. *Metodą tensometryczną* na tensjometrze firmy Kruss. Badania przeprowadzone były w ultra czystej wodzie. Przed pomiarem powierzchnię wody oczyszczono rozgrzanym metalem, w celu usunięcia wszelkich drobinek pochodzących z powietrza.

Badania przeprowadzono na błonach polimerowych otrzymanych metodą prasowania- na próbkach o wymiarach około 15x20 mm, które następnie umieszczano w łapce tensometru. Procedura odbywała się automatycznie i obejmowała pomiar siły adhezji pomiędzy próbką a medium przy zanurzaniu oraz przy wynurzaniu z wody. Specjalistyczne oprogramowanie pozwoliło na obliczenie odpowiednio, zstępującego i wstępującego kąta zwilżania.

Metody degradacji hydrolitycznej i analizy

Testom degradacji hydrolitycznej poddano materiał wyjściowy PET/DLA zawierający 30% wagowych segmentów sztywnych oraz kopolimery modyfikowane ditlenkiem tytanu, celem zbadania wpływu tego nanonapełniacza na profil degradacji.

Testy krótkoterminowej degradacji hydrolitycznej (3 tygodnie) przeprowadzone były w symulowanym płynie fizjologicznym (SBF) przygotowanym wg. opisu z artykułu Kokubo [132], zawierającym następujące sole: NaCl, $NaHCO_3$, KCl, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, Na_2SO_4, $(CH_2OH)_3CNH_2$. Roztwór wymieniany był w odstępach tygodniowych, masa próbek mierzona była przed i po teście inkubacji w SBF. Po teście oceniono morfologię próbek wykorzystując technikę SEM, jednocześnie stosując metodę

EDX zbadano wpływ obecności *nano*-TiO_2 na kalcyfikację powierzchniową. Zbadano również zmiany chropowatości powierzchni stosując interferometrię światła widzialnego.

W celu określenia zmian właściwości mechanicznych oraz absorpcji i ubytku masy prowadzono testy degradacji długoterminowej w okresie 26 tygodni, a medium degradacyjnym były buforowane sole fosforowe (PBS). Próbki do badań zmian właściwości mechanicznych miały postać wiosełek o długości odcinka pomiarowego 25 mm i grubości ok. 0,5 mm, natomiast do ubytku masy i absorpcji miały postać krążków o średnicy 12 mm i grubości ok. 0,5 mm. Pomiar wagi próbek odbywał się co 3 tygodnie, również w takim okresie czasu wymieniany był roztwór degradacyjny. Materiały po okresie degradacji scharakteryzowane zostały następującymi technikami: FT-IR, ^{1}H NMR – określenie zmian w budowie chemicznej, DSC – zmiany właściwości termicznych, GPC – zmniejszenie ciężaru cząsteczkowego, określono również poziom absorpcji i ubytek masy.

Do celów analizy produktów degradacji, jako medium używano wody destylowanej, ze względu na wymagania aparaturowe metody ESI-MS (*electrospray ionization mass spectrometry*) – w roztworze należało unikać obecności jakichkolwiek jonów, mogących zaburzyć pracę detektora. Degradację prowadzono również w okresie 26 tygodni, na 3 próbkach (średnica 8 mm) z każdego polimeru. Co 3 tygodnie roztwór znad próbki zlewano a próbkę suszono do stałej masy, dodatkowo śledzono zmiany pH wyciągu wodnego.

Testy in vitro i in vivo

Zawiesina mysich fibroblastów, linia 3T3 była umieszczona na polimerowych krążkach w 24-dołkowych płytkach hodowlanych. Hodowla trwała 6 dni w medium hodowlanym Dulbeco, dodatkowo zawierającym 10% serum surowicy bydlęcej, L-glutaminę ($0{,}125 \times 10^{-3}$ ml), a także dwa antybiotyki streptomycynę i penicylinę w odpowiednich ilościach (wszystkie odczynniki Sigma–Aldrich). W inkubatorze utrzymywano stały poziom wilgotności 95%, zawartość CO_2 wynosiła 5%, a temperatura 37°C. Początkowe zagęszczenie komórek wynosiło 25 000 komórek/cm^2. W 2, 4 i 6 dniu pobierano medium hodowlane w celu określenia ilości dehydrogenazy mleczanowej (LDH), która stanowiła wskaźnik śmiertelności komórek. Następnie komórki poddawane były trypsynizacji 200 μl roztworu trypsyny. Aktywność tego enzymu hamowana była po

5-6 minutach 15% surowica zawierająca medium Dulbeco. W celu oznaczenia ilościowego proliferacji komórek użyto zestawu barwiącego AlamarBlue (Invitrogen).

Kolejny etap testów *in vitro* dotyczył badań z udziałem mysich oraz ludzkich embrionalnych komórek macierzystych, jako prekursorów do otrzymywania komórek kardiomiocytów. Testy te prowadzone były we współpracy i w laboratoriach podczas stażu w Imperial College w Londynie oraz National Heart&Lung Institute w Londynie, Wielka Brytania (w kraju tym dopuszczone są badania na ludzkich i zwierzęcych komórkach embrionalnych). Jako medium kultywacyjne dla mysich embrionalnych komórek macierzystych (*mouse-embrionic stem cells, m-ESCs*): medium Dulbeco uzupełnione 15% serum, z dodatkiem odpowiednich antybiotyków, L-glutaminą, merkaptoetanolem oraz czynniki hamujące białaczkę. Medium do hodowli ludzkich embrionalnych komórek macierzystych (*human-embrionic stem cells, h-ESCs*) zawierało dodatkowo czynniki wzrostu dla fibroblastów. W testach użyto mysich embrionalnych komórek macierzystych, linia D3 (ATCC–LGC Standards) oraz ludzkich embrionalnych komórek macierzystych, linia H7 (Geron Corp Menlo Park, CA).

Testy implantacyjne in vivo

Testy implantacyjne przeprowadzono dla kopolimeru PET/DLA oraz PET/DLA z dodatkiem 0.2% wag. TiO_2. Próbki miały postać krótkich pałeczek o długości 10-12 mm, szerokości 3-5 mm i grubości 0.6-0.8 mm i przed implantacją zostały wysterylizowane gazowym tlenkiem etylenu w aparacie 3M Steri-Vac5. Próbki polimerów wszczepiono w mięśnie szczurów rasy Wistar, o wadze 200-220g. Jako materiału referencyjnego użyto silikonu medycznej jakości (Nagosil NA 500-5). Zabieg znieczulenia przeprowadzono przy użyciu ketaminy (Narkomon) w dawce 120 mg. Obserwacje zwierząt prowadzone były przez 12 tygodni. Następnie zwierzęta uśpiono stosując pentobarbital sodu w dawce 200mg. Kolejnym etapem było przygotowanie preparatów histopatologicznych tkanek otaczających implanty. Próbki tkanek utrwalono 10% formaldehydem, odwapniono i zabarwiono hematoksyliną oraz eozyną i tak przygotowane poddano obserwacjom mikroskopowym.

6. Wyniki i dyskusja

6.1 Synteza multiblokowych elastomerów termoplastycznych

Na drodze polikondensacji w stopionej masie otrzymano kopolimery multiblokowe i nanokompozyty, których skład przedstawiono w tabeli 6.1.1.

Tab.6.1.1 Skład kopoli(estro-estrów) oraz nanokompozytów

Segment sztywny 30% wag.	Segment giętki 70 % wag.	Modyfikator	
		rodzaj	Ilość [% wag.]
PET	DLA	TiO_2	0,1 - 0,6
		Kwas jabłkowy	1; 2,5
		Kwas winowy	1; 2,5
PBT	DLA	TiO_2	0,2; 0,4

Podczas syntez nie zaobserwowano większych różnic pomiędzy procesem otrzymywania kopolimerów i ich nanokomozytów, jednakże należało dopracować szczegóły technologiczne związane z metodą wprowadzania dyspersji nanonapełnicza w monomerze DLA do masy reakcyjnej przed rozpoczęciem polikondensacji. Zaobserwowano, iż po dodaniu DLA zawierającego TiO_2 spada temperatura masy reakcyjnej (mimo wcześniejszego podgrzewania tego monomeru) i dlatego też konieczne było jej podniesienie do temperatury, w której planowane było rozpoczęcie programowania próżni. Niedogrzanie masy reakcyjnej do właściwej temperatury skutkowało „porywaniem" jej do chłodnicy, co uniemożliwiało z kolei osiągnięcie odpowiednio obniżonego ciśnienia.

Otrzymane kopolimery PET/DLA i ich nanokompozyty charakteryzowały się stosunkowo małą lepkością stopową, co powodowało trudności w odebraniu materiału w postaci żyłki, co z kolei uniemożliwiało zgranulowanie materiału na krajarce laboratoryjnej. Problemu tego nie zaobserwowano w przypadku układu, w którym blok sztywny stanowił poli(tereftalan butylenu), wykazujący szybszy proces krystalizacji, co

szerzej zostanie omówione w części dotyczącej właściwości termicznych otrzymanych nanokompozytów.

6.2 Właściwości fizyczne

Pomiary GLL zostały przeprowadzone dla wszystkich otrzymanych nanokompozytów i materiału wyjściowego. Zestawienie wartości GLL zawiera tabela 6.2.1.

Tab.6.2.1 Wartości GLL dla otrzymanych nanokompozytów

Materiał	GLL roztworu [dl/g]
PET/DLA	0,629
PET/DLA 0,1% wag. TiO_2	0,636
PET/DLA 0,2% wag. TiO_2	0,742
PET/DLA 0,4% wag. TiO_2	0,727
PET/DLA 0,6% wag. TiO_2	0,403

Jak obrazuje to powyższa tabela najwyższą wartością granicznej liczby lepkościowej charakteryzuje się nanokompozyt zawierający 0, 2% wagowych TiO_2. W przypadku najmniejszego udziału wagowego nanonapełniacza wzrost GLL nie jest istotnie znaczący. Natomiast przy najwyższym udziale wagowym, niska wartość GLL wynika z dużych problemów już na etapie syntezy tego materiału w związku z czym nie był on poddawany dalszym badaniom.

Ze względu na konieczność rozpuszczania materiałów do badań, a także procesów otrzymywania próbek do badań, konieczne było zbadanie ich rozpuszczalności w rozpuszczalnikach polarnych i niepolarnych. Wyniki tych testów przedstawia tabela 6.2.2. Jak widać niezależnie od użytego rozpuszczalnika po 48 godzinach wszystkie materiały uległy rozpuszczeniu, poprzedzonego pęcznieniem materiałów polimerowych. W ocenie wizualnej roztwory otrzymane w wyniku rozpuszczenia materiałów zawierających TiO_2, charakteryzowały się bardziej białym kolorem.

Tab.6.2.2. Oznaczenie rozpuszczalności otrzymanych polimerów

Materiał	Rozpuszczalnik czas rozpuszczania								
	chloroform			toluen			tetrahydrfuran		
	8h	24h	48h	8h	24h	48h	8h	24h	48h
PET/DLA	-	++	+++	-	++	+++	-	++	+++
PET/DLA 0,1%wag. TiO_2	-	++	+++	-	++	+++	-	++	+++
PET/DLA 0,2%wag. TiO_2	-	++	+++	-	++	+++	-	++	+++
PET/DLA 0,4%wag. TiO_2	-	++	+++	-	++	+++	-	+	+++
PET/DLA 0,6%wag. TiO_2	-	+	+++	-	+	+++	-	+	+++

(-) - bez zmian, (+) - słabe pęcznienie, (++) - pęcznienie, (+++) - rozpuszczenie całkowite

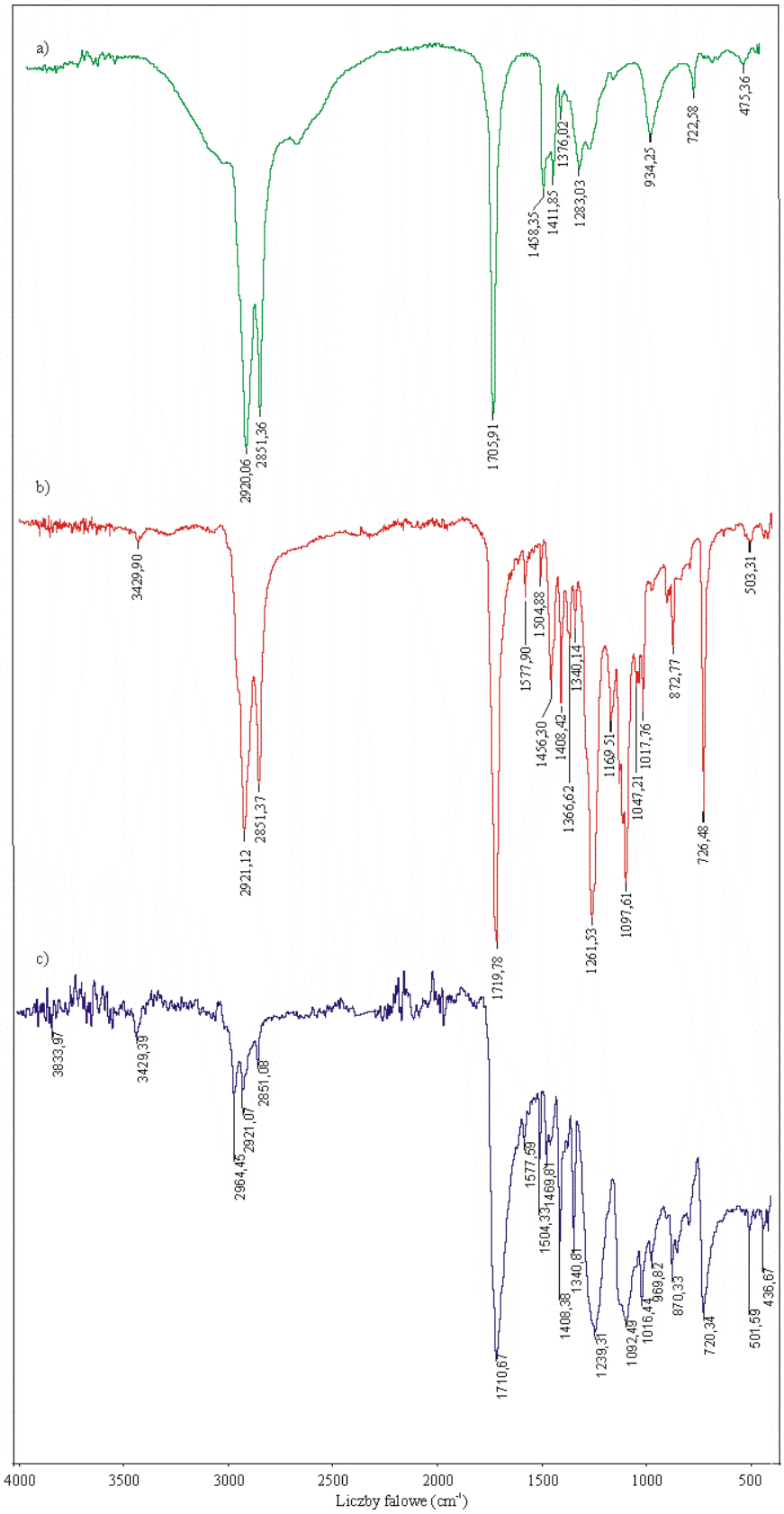
6.3. Budowa chemiczna

Analizę budowy chemicznej kopolimeru PET/DLA ocenianej metodą ATR FT-IR przeprowadzono w oparciu o analizę porównawczą widma otrzymanego dla DLA (rys. 6.3.1 a) użytego do syntez oraz widma dla PET (rys. 6.3.1.c) wytworzonego w syntezie własnej.

Porównanie widm potwierdza otrzymanie kopolimerów estrowo-estrowych (rys. 6.3.1 b), m.in. poprzez zaobserwowanie zaniku widma przy 934 cm^{-1} charakterystycznego dla DLA. Pik ten związany z drganiami deformacyjnymi poza płaszczyzną grupy OH jest nieobecny w widmie kopolimeru, co świadczy o przereagowaniu grup OH z resztami glikolu etylenowego. Dodatkowo zaobserwowano zmianę położenia intensywnego pasma drgań rozciągających C=O obecnych zarówno w niemodyfikowanym PET przy wartości 1710 cm^{-1} jak i w widmie monomeru DLA (1705 cm^{-1}). Dla kopolimeru PET/DLA znajduje się ono przy wyższej liczbie falowej, tj. przy 1719 cm^{-1}. Sprzężone jest również z drganiami rozciągającymi C(O)-O występującymi przy wartości liczby falowej 1263-1261cm^{-1}; dla monomeru DLA drgania te są przesunięte w kierunku wartości 1283 cm^{-1}, natomiast dla homopolimeru PET pasmo to nie zostało wyodrębnione, przysłonięte zostało prawdopodobnie przez dość szerokie i intensywne pasmo przy liczbie falowej 1239 cm^{-1}.

Bez zmian pozostaje natomiast podwójne pasmo obecne jedynie dla DLA i jego kopolimeru z PET (2920, 2851 cm^{-1}) charakterystyczne dla drgań rozciągających grupy CH, m.in. w ułożeniu C-CH_2-C, w przypadku PET widmo to jest potrójne.

Pasma przy długościach liczb falowych 1503, 1408, 1017 oraz 873 cm^{-1} zgodnie z doniesieniami literaturowymi są sygnałami pochodzącymi od fragmentów aromatycznych w segmentach sztywnych budowanych przez PET [108, 109]. Jednakże jak wynika z tablic [110], drgania rozciągające pierścienia aromatycznego, jakim w przypadku kopolimerów PET/DLA jest benzen, podstawiony w pozycjach 1,4 (od kwasu 1,4-benzeno-dikarboksylowego, którego dimetylowy ester użyty został do syntezy) powinien wykazywać 4 pasma położone przy następujących wartościach liczb falowych: pasmo pierwsze: 1606 ± 6 cm^{-1}, pasmo drugie: 1579 ± 6 cm^{-1}, pasmo trzecie: 1520 → 1480 cm^{-1}, oraz pasmo czwarte: 1409 ± 8 cm^{-1}. W otrzymanych widmach, zarówno dla homopolimeru PET, jak i dla kopolimeru PET/DLA zaobserwowałam występowanie wszystkich pasm wskazanych w pracy [111], jak również dodatkowe pasmo przy liczbie falowej 1577 cm^{-1} (PET) i 1578 cm^{-1} (PET/DLA), odpowiadające drugiemu pasmu drgań rozciągających pierścienia aromatycznego.



Rys 6.3.1 Widma w podczerwieni dla: a) DLA, b) PET/DLA, c) PET

Jak opisano w literaturze [111,112], widma homopolimeru PET zmieniają się w zależności od historii termicznej materiału, jak również innych zabiegów, wpływających na krystaliczność, jak np. rozciąganie. Niezależnie jednak od warunków przetwórstwa czy dodatkowego wygrzewania zaobserwowane zostały rotacyjne izomery reszt pochodzących od glikolu etylenowego – *trans i gauche* (skośna). Z literatury wynika, iż wiązania pochodzące od izomerów reszt glikolu etylenowego muszą spełniać dwa warunki: 1) tworzyć pary, przy czym jeden z pików jest bardziej intensywny od drugiego; 2) każde z wiązań musi wykazywać częstotliwość, charakterystyczną dla normalnych drgań reszt glikolu etylenowego. Drgania izomerów reszt glikolu etylenowego przedstawione są w tabeli 6.3.1, wraz z ich prawdopodobnymi odpowiednikami w kopolimerze PET/DLA.

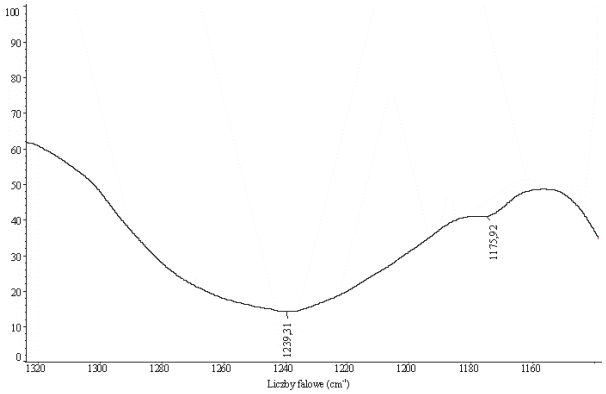
Tab. 6.3.1 Drgania izomerów reszt glikolu etylenowego

Rodzaj ugrupowania	OCH_2CH_2O w PET wg. [2]		$HOCH_2CH_2OH$	OCH_2CH_2O w PET (synteza własna)	OCH_2CH_2O w PET/DLA
CH_2 drganie deformujące	*trans* *gauche*	1456 1453	- 1458, 1408	*	1456 -
CH_2 drganie wachlarzowe	*trans* *gauche*	1337 1370	- 1368, 1306	1340 1365	1340 1367
CH_2 drganie skręcające	*trans* *gauche*	- 1172	- 1248, 1202	- 1175*	- 1168
CH_2 drganie obrotowe	*trans* *gauche*	848 895	- 881, 861	843 900	- 903
C-O drania rozciągające	*trans* *gauche*	973 1099, 1042	- 1083,1037	969 1092, *	971 1097,1047

*- położenie odpowiednich pików omówione w tekście

W przypadku drgań deformacyjnych grupy CH_2, dla PET z syntezy własnej nie zaobserwowałam piku przy 1456 cm^{-1}, widoczny jest natomiast podwójny pik, z maksimum przy 1448 oraz 1469 cm^{-1}, który po uśrednieniu daje wartość ok. 1458 cm^{-1}. Rozszczepienie tego piku może wynikać, np. z obecności niewielkich ilości

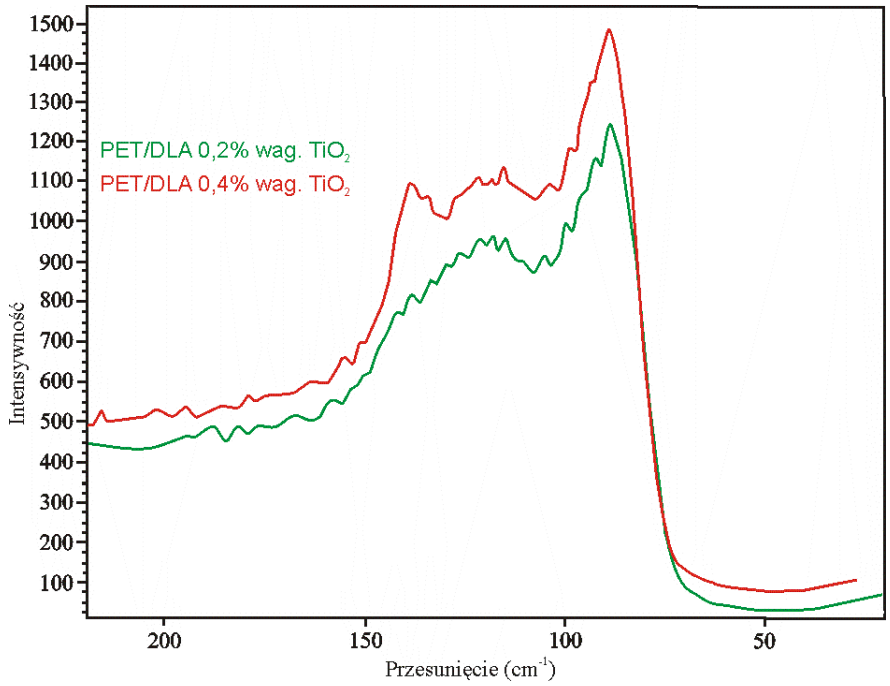
nieprzereagowanego glikolu etylenowego w polimerze. Drgania skręcające CH_2 dla PET nie występują jako oddzielny pik, natomiast przy odpowiednim powiększeniu widoczne są w paśmie przy 1239 cm^{-1}, rys. 6.3.2. Natomiast drgania rozciągające C-O nie wykazują dwóch pików, obecny jest jedynie wyraźny pik z maksimum przy 1092 cm^{-1}, prawdopodobnie powstały w wyniku nałożenia się zaobserwowanych dla kopolimeru pasm 1097 i 1047 cm^{-1}. Z powyższych obserwacji widm IR dotyczących kopolimeru multiblokowego PET/DLA, wnioskować można, iż pomiędzy produktem pośrednim – tereftalanem dihydroksyetylenowym, a dimerem kwasu linoleinowego doszło do reakcji prowadzącej do powstania kopolimeru. Efekty obserwowane dla widma PET – nakładanie się pasm – wynikać mogą ze stosunkowo dużej grubości próbki - ze względu na zastosowanie tej samej metody przetwórstwa, jaką było prasownie do postaci cienkich filmów, która to metoda nie jest dostatecznie dobrą metodą przetwórstwa termoplastów.



Rys. 6.3.2 Powiększenie piku maksimum przy 1239 cm^{-1}

Potwierdzenie obecności TiO_2 w matrycy polimerowej uzyskano stosując spektroskopię ramanowską. Rysunek 6.3.3 przedstawia widma otrzymane przy długości lasera 532 nm dla zawężonego zakresu liczb falowych. W widmach materiałów o zawartości ditlenku tytanu 0,2 oraz 0,4% wagowych zaobserwowano charakterystyczne piki przy liczbach falowych w zakresie 138-145 cm^{-1}. Ze względu na obecność napełniacza w matrycy polimerowej nie zaobserwowano wszystkich obszarów charakterystycznych dla TiO_2, które to widma zostały szczegółowo opisane dla tego tlenku jako biomateriału [113] lub w pracy dotyczącej przejść fazowych tego materiału [114]. Zaobserwowany w niniejszej pracy zakres występowania pików pochodzących od TiO_2 jest

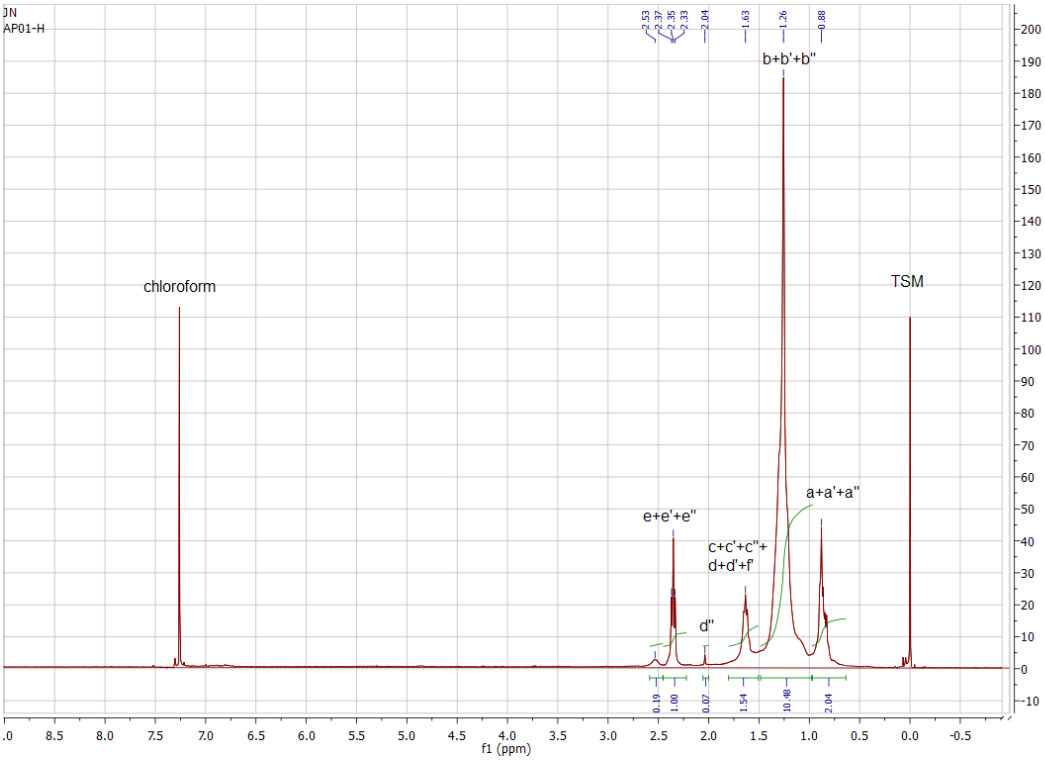
charakterystyczny dla anatazu, która to forma krystalograficzna stanowi 80% komercyjnego produktu AEROXIDE P25 użytego do syntez.



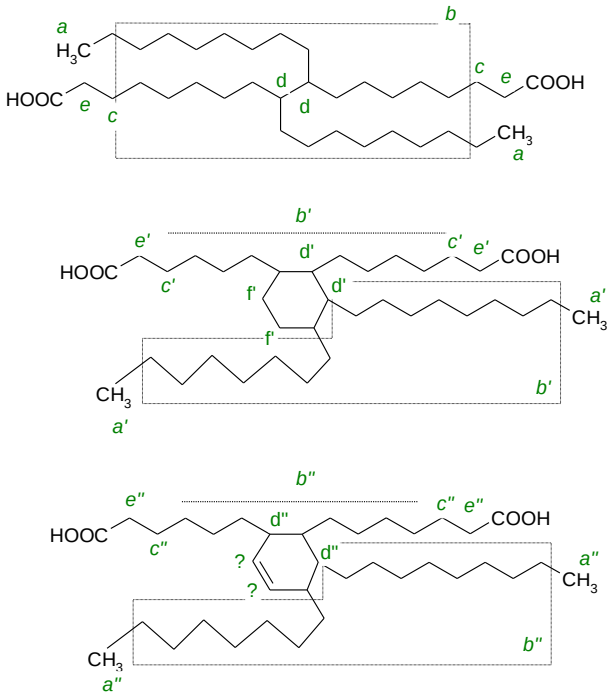
Rys. 6.3.3 Widma ramanowskie dla obszaru występowania pików pochodzących od TiO_2

Dodatkowych informacji, zarówno o budowie chemicznej monomeru DLA jak i kopolimerów PET/DLA dostarczyły badania magnetycznego rezonansu jądrowego. Rysunek 6.3.4 przedstawia widmo protonowe ^{1}H NMR dimeru kwasu linoleinowego (PRIPOL 1009) oraz odpowiadające mu struktury tego komercyjnego produktu.

a)



b)



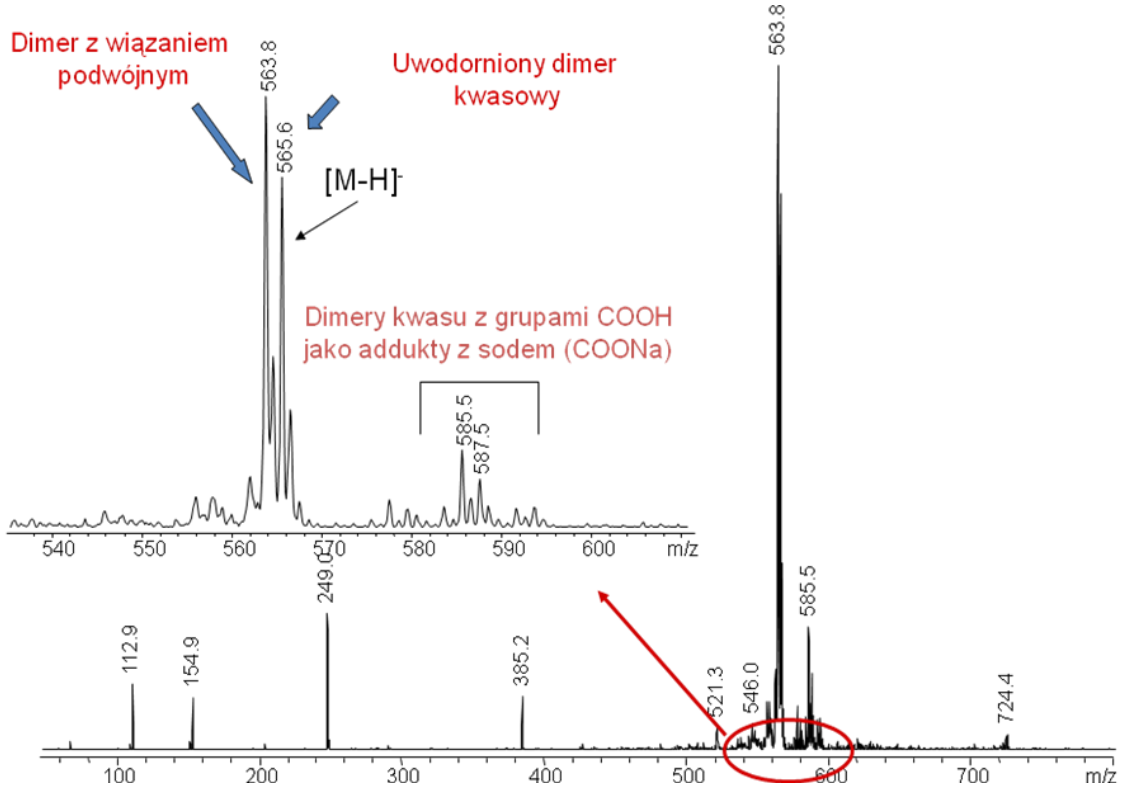
Rys. 6.3.4 Widmo ^{1}H NMR dimeru kwasu linoleinowego (PRIPOL 1009) oraz jego możliwe struktury

Założenie występowania trzech przedstawionych struktur (rys. 6.3.4) w budowie dimeru kwasu linoleinowego oparte było na informacjach producenta, a także doniesieniach literaturowych [115 – 117], które dodatkowo sugerowały przewagę struktury acyklicznej w tym komercyjnym produkcie (struktura środkowa). Rozpuszczona w deuterowanym chloroformie próbka DLA wykazała następujące przesunięcia chemiczne względem tertametylosilanu: silny sygnał przy 1,26 ppm pochodzi od długiego alifatycznego łańcucha reszty kwasu linoleinowego, a poprzedza go pik pochodzący od końcowych grup metylowych $–CH_3$ (0,88 ppm). Sygnały od protonów związanych z grupą karboksylową zinterpretowane zostały następująco: grupa metylenowa znajdująca się w pozycji α przy wiązaniu karbonylowym - tryplet 2,33, w pozycji β - 1,64 ppm. Obecność protonów od grupy końcowej –OH teoretycznie powinna dawać sygnał przy ok. 11 ppm, jednak podobnie jak sygnały od wiązania podwójnego w trzeciej strukturze nie zostały zarejestrowane. Ze względu na niejednoznaczność otrzymanych wyników monomer ten został dodatkowo scharakteryzowany dwoma rodzajami metody spektroskopii mas:

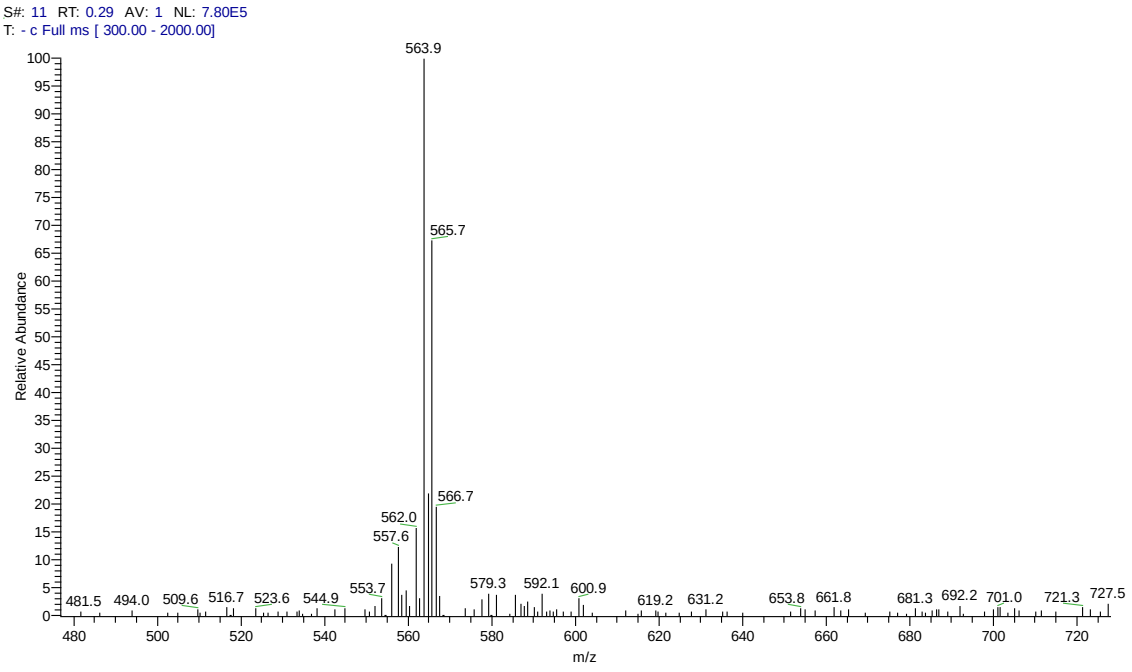
1) spektroskopią mas MALDI-TOF, – w której, jako metodę jonizacji stosuje się desorpcję jonową z udziałem matrycy oraz analizator czasu przelotu. Metoda ta generalnie umożliwia detekcję składu populacji cząsteczek o dużych masach cząsteczkowych.
2) Spektroskopią mas ESI-MS, w której metodą jonizacji jest elektrorozpylanie.

W obydwu metodach znacznie łatwiejsza była analiza przy jonach negatywnych. Obydwie zastosowane metody dały niezwykle zbliżone wyniki - wykazały obecność dwóch głównych produktów o masie cząsteczkowej 565 oraz 563 g/mol. Widma otrzymane dla PRIPOLU 1009 przy wykorzystaniu powyższych metod przedstawia rysunek 6.3.5. Jon wykazujący m/z 565.7 jest w pełni uwodornionym PRIPOLEM 1009, natomiast jon m/z 563.9 ze względu na obecność wiązania podwójnego może być pozostałością niecałkowicie uwodornionego PRIPOLU 1098. Obserwowane przy wyższych stosunkach m/z sygnały jonów pochodzą od adduktów z jonami sodu, powstałych podczas badania.

a)



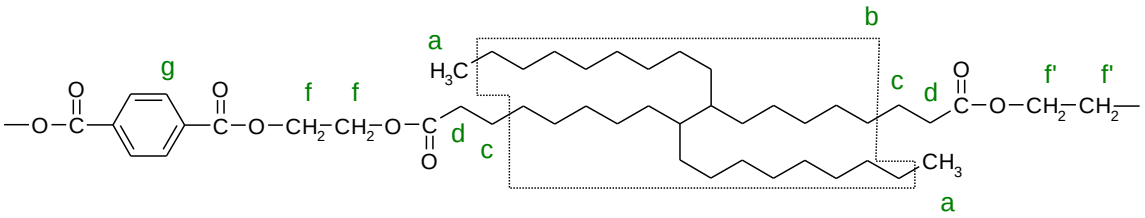
b)

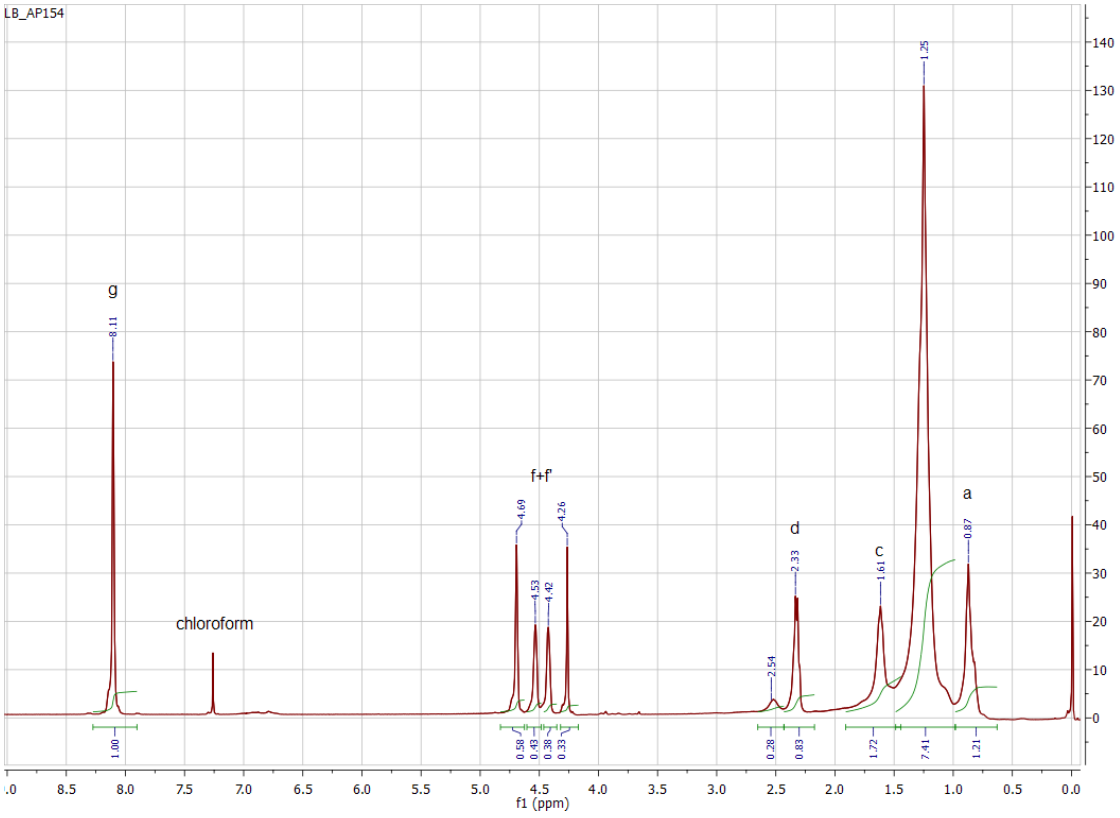


Rys. 6.3.5 Widma monomeru DLA otrzymane metodą: a) MALDI-TOF, b) ESI-MS

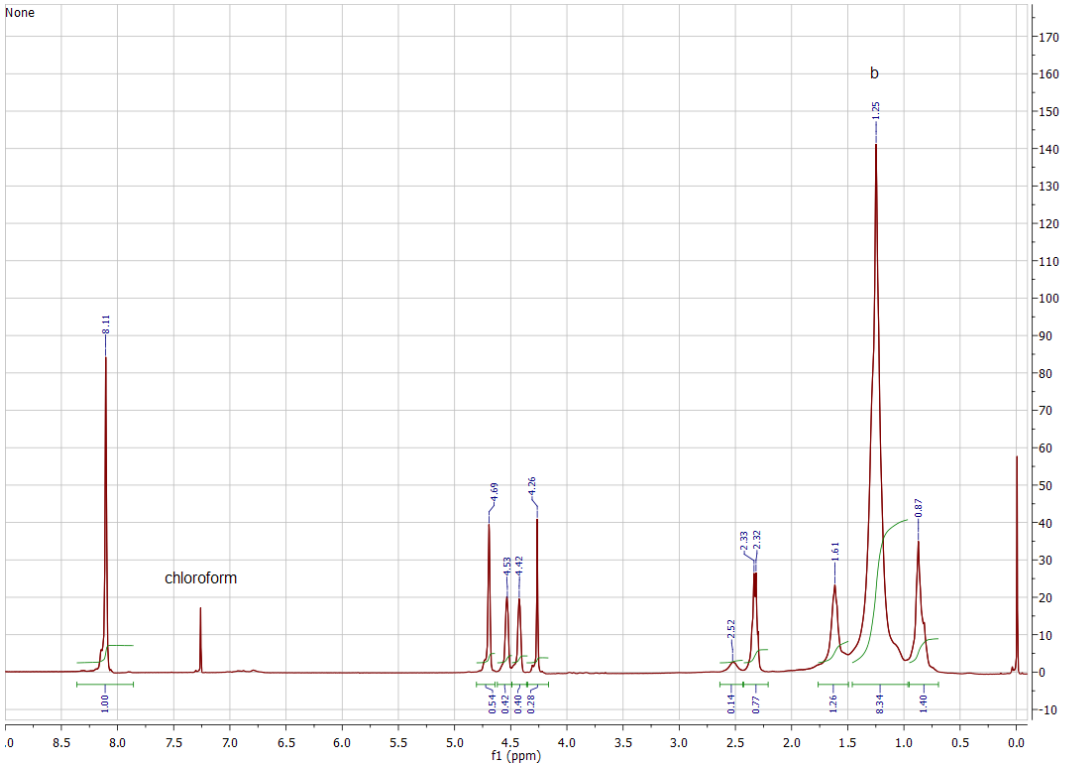
Przeprowadzona szczegółowo analiza budowy chemicznej monomerów pozwoliła na ustalenie struktury kopolimeru PET/DLA (Rys. 6.3.6 a), jak i jego nanokompozytów (Rys. 6.3.6 b,c). Analiza porównawcza widm pozwoliła stwierdzić, że nie zaobserwowano znaczących różnic w budowie chemicznej polimerów, zarówno wyjściowych jak i zawierających nanocząstki.

a)

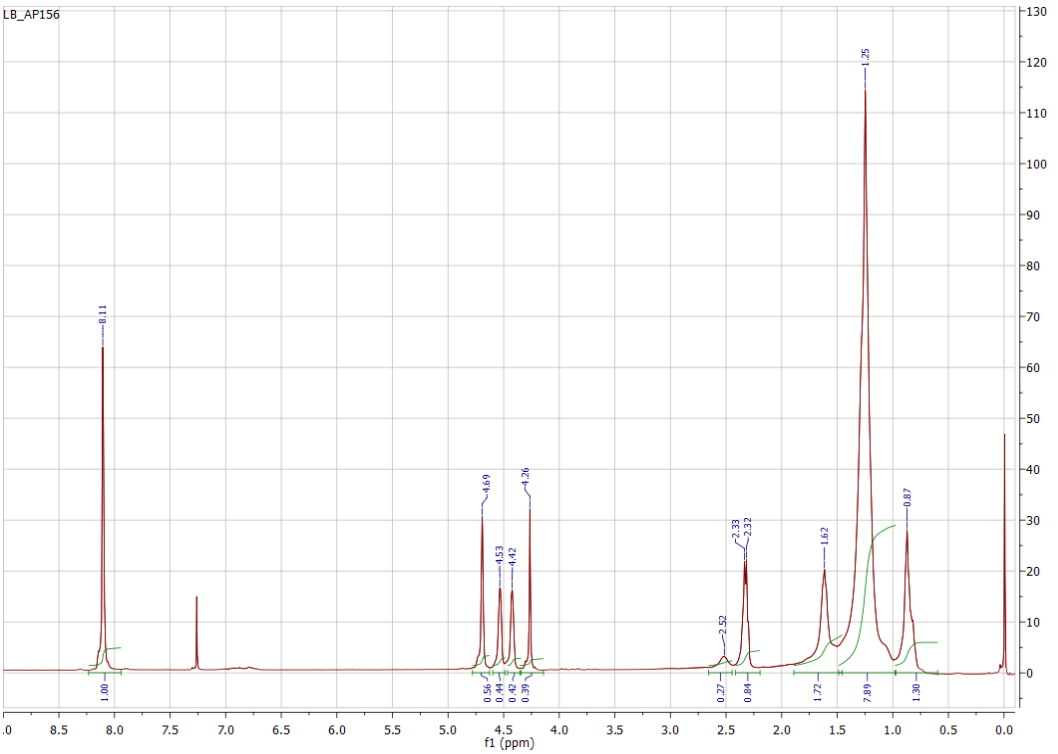




b)



c)



Rys.6.3.6. Widma ^{1}H NMR: a) PET/DLA, b) PET/DLA 0,2% wag. TiO_2, c) PET/DLA 0,4% wag. TiO_2

Oprócz pików opisanych wcześniej dla DLA, na widmach kopolimerów i kompozytów pojawiają się następujące piki: przy 8,11 ppm obserwowany jest sygnał pochodzący od czterech równoważnych protonów w pierścieniu aromatycznym reszty tereftalowej. Kolejna grupa 4 sygnałów (4,26- 4,70 ppm) pochodzi od grup metylenowych, występujących w glikolu etylenowym, związanych w kopolimerze w różny sposób.

Na podstawie wartości zredukowanych intensywności, korzystając ze wzorów (1) oraz (2) obliczyć można stopień polikondensacji segmentu sztywnego:

Zredukowaną intensywność dla protonu w pierścieniu aromatycznym oblicza się następująco: $I_{8,11}$= 1,00:4= 0,25 oraz dla protonu dimeru kwasu linoleinowego $I_{2,33}$= 0,83:4= 0,2075

$$DP = \frac{I_{8,11}}{I_{2,33}} = \frac{0{,}25}{0{,}2075} = 1{,}20 \qquad (1)$$

Znając wartość DP możliwe jest obliczenie wagowego udziału segmentów:

$$\%W_H = \frac{DP \cdot M_H}{DP \cdot M_H + M_S} \cdot 100\% = \frac{1{,}20 \cdot 192}{1{,}20 \cdot 192 + 592} \cdot 100\% = 28\% \qquad (2)$$

Wyliczenia stopnia polikondensacji na podstawie NMR oraz wagowej zawartości segmentów sztywnych przeprowadzono dla wszystkich materiałów, a zestawienie tych wartości przedstawia tabela 6.3.1.

Tab.6.3.1. Stopnie polikondensacji, wagowe udziały segmentów sztywnych wyliczone na podstawie widm ^1H NMR.

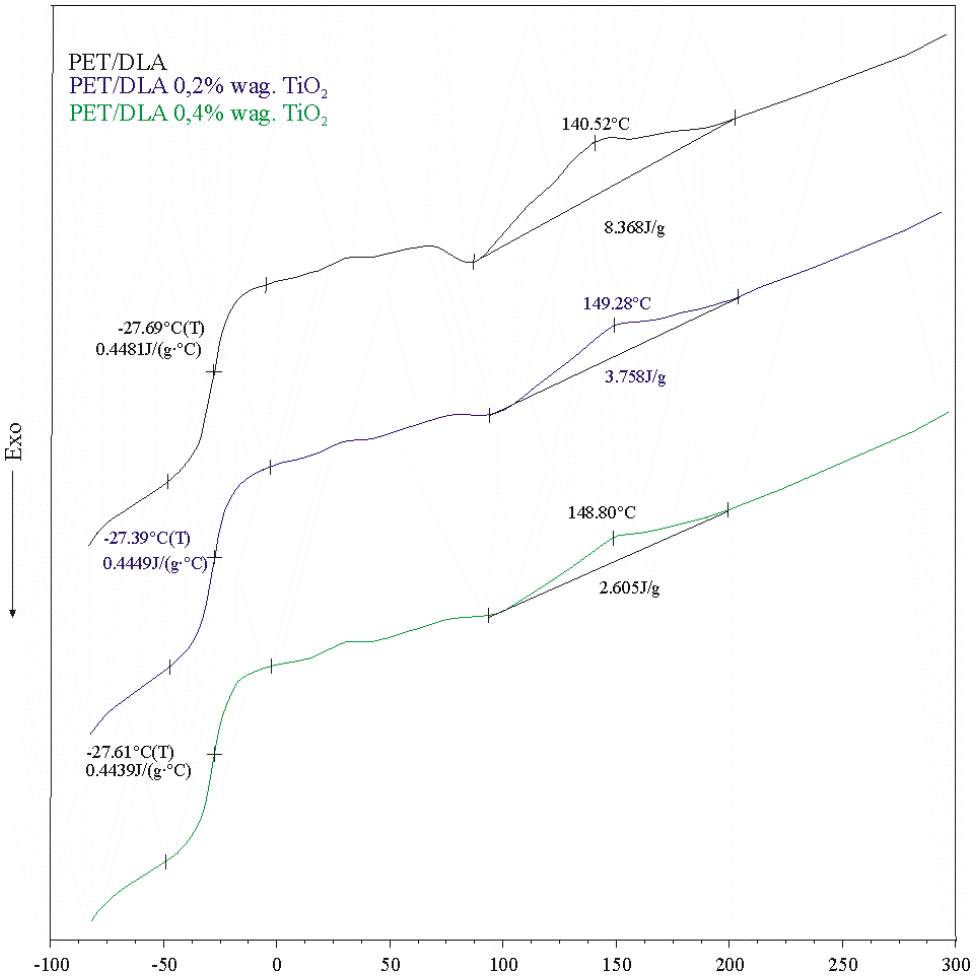
Układy polimerowe	*DP*	*$\%W_H$*	*$I_{2,33}$*
PET/DLA	1,20	28	0,83
PET/DLA 0,1% wag. TiO_2	1,11	26	0,91
PET/DLA 0,2% wag. TiO_2	1,29	29	0,77
PET/DLA 0,4% wag. TiO_2	1,19	28	0,84

Uzyskane wyniki wskazują na dobrą zgodność założonego (teoretycznego, i wynoszącego 30% wag.) z uzyskanym (wyliczonym na podstawie NMR, wynoszącym od 28 do 29% wag.) udziałem segmentów sztywnych w makrocząsteczce tylko dla nanokompozytów zawierających 0,2 oraz 0,4 % wagowych TiO_2, i te materiały zostały poddane dalszym badaniom.

6.4. Właściwości termiczne

Wpływ nanonapełniacza na właściwości termiczne, a zwłaszcza przemiany w obszarach segmentów sztywnych i giętkich zidentyfikowano metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej. Na rysunku 6.4.1 przedstawiono termogramy drugiego grzania próbek nanokompozytu zawierajacego TiO_2 w osnowie kopolimeru PET/DLA w przedziale temperatur od -100÷300°C. Charakterystycznym, występującym w obszarze niskich temperatur zjawiskiem, jest przejście szkliste typowe dla segmentów giętkich. Wartość temperatury zeszklenia, T_{g1} w układach, jakimi są kopolimery multiblokowe silnie zależy od udziałów wagowych bloków, co dla układów PET/DLA o zmiennym udziale PET do DLA w granicach od 30 do 90% wag. segmentów sztywnych zostało omówione w pracy [70].

Jak wynika z termogramów DSC (Rys. 6.4.1) dodatek nanonapełniacza nie wpływa istotnie na zmianę wartości temperatury zeszklenia segmentów giętkich, oraz związaną z tą przemianą fazową zmianę pojemności cieplnej, ΔC_p. Obserwacja ta sugeruje, iż dodatek nanonapełniacza, w odróżnieniu do tradycyjnego mikro-napełniacza, nie powoduje ograniczeń w mikroruchach łańcuchów polimerowych, co zwykle skutkuje podwyższeniem T_g w obszarze segmentów giętkich [118].

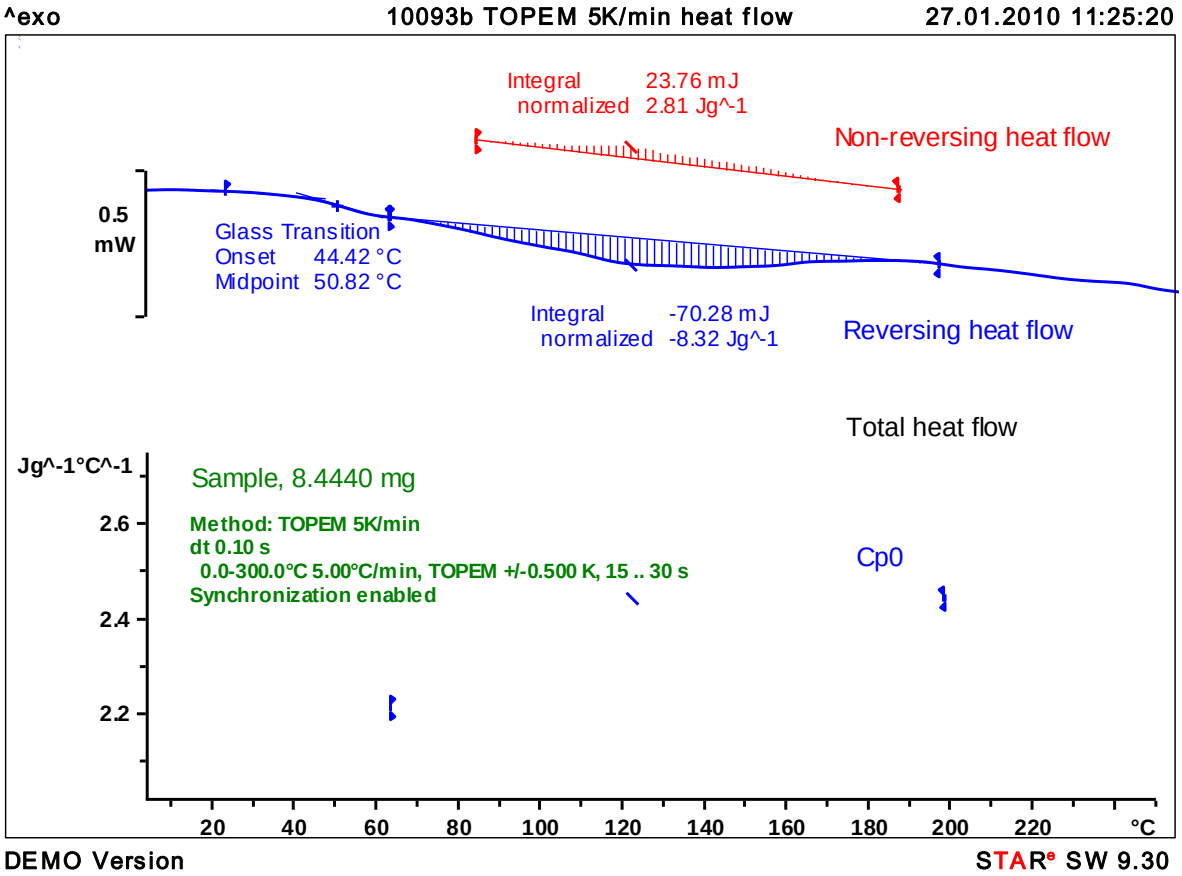


Rys. 6.4.1 Termogramy DSC polimeru PET/DLA niemodyfikowanego oraz zawierającego TiO_2.

Zaobserwowano natomiast zmiany w przedziale temperatury topnienia. Dodatek nanonapełniacza wpłynął na podwyższenie temperatury topnienia, przy jednoczesnym obniżeniu entalpii towarzyszącej temu procesowi. Powszechnie wiadomo, iż nanocząstki nukleują krystalizację [119, 120], co istotnie wpływa na proces krystalizacji oraz topnienia modyfikowanych układów. W przypadku poli(tereftalanu etylenu) działanie nukleujące zaobserwowano m.in. dla nanometrycznego $CaCO_3$ [121]. Skutkowało to zarówno podniesieniem temperatury krystalizacji, jak i wyższymi temperaturami topnienia. Istotne różnice wystąpiły w przypadku nanocząstek, które w celu zwiększenia kompatybilności z matrycą polimerową pokryte zostały kwasem stearynowym (C18) [121].

Zaobserwowane podwyższenie temperatury topnienia nanokompozytów w osnowie kopolimeru PET/DLA (Rys. 6.4.1) sugerować może również dobrą dystrybucję nanonapełniacza w matrycy polimerowej, podobnie jak w przypadku $CaCO_3$, dzięki otoczeniu cząstek TiO_2 przez hydrofobowy monomer. Podwyższenie T_{m2} przy jednoczesnym obniżeniu entalpii topnienia sugeruje, iż TiO_2 nukleuje krystalizację segmentów sztywnych w formie większych krystalitów, przy jednocześnie mniejszej ich objętości. Obserwacje te potwierdzają wartości stopnia krystaliczności obliczone na podstawie wzorów (4) oraz (5), zestawione w tabeli 6.4.1.

Ciekawy do interpretacji wydał się pik występujący przed endotermą topnienia (rys.6.3.1). Początkowo interpretowany był on jako zimna krystalizacja segmentu sztywnego, głównie ze względu na częste występowanie tego zjawiska w przypadku poli(tereftalanu etylenu) [122,123], tym bardziej iż nie zaobserwowano piku pochodzącego od krystalizacji w trakcie chłodzenia próbek podczas badania metodą DSC. Jednakże stosunkowo mały efekt cieplny jak i bliskie położenie w stosunku do procesu topnienia skłoniły do głębszej analizy tej przemiany. W tym celu przeprowadzono modulowaną analizę DSC, techniką TOPEM opracowaną przez firmę Mettler-Toledo i wprowadzoną na rynek w 2005 roku [124], wykonując badania dla materiału zawierającego 0,2% wag. TiO_2. Technika DSC-TOPEM umożliwia rozdzielenie procesów odwracalnych od nieodwracalnych, nawet przy ich nakładaniu się, a także wyznaczenie quasi-statycznej pojemności cieplnej oraz ułatwia rozróżnienie efektów zależnych od częstotliwości (np. przejście szkliste) od efektów od niej niezależnych. Rysunek 6.4.2 przedstawia wyniki otrzymane dla badanego materiału z zastosowaniem techniki TOPEM.



Rys.6.4.2 Termogram DSC-TOPEM dla polimeru PET/DLA zawierającego 0,2 % wag. TiO_2

Otrzymane krzywe przy szybkości grzania 5K/min przedstawiają kolejno: całkowity przepływ ciepła (linia czarna), oraz rozdzielenie tego przepływu na składnik odwracalny (linia górna niebieska) oraz nieodwracalny (linia czerwona). Krzywa nieodwracalnego przepływu ciepła wykazuje endotermiczny pik przy 60°C, a odpowiadający mu wzrost pojemności cieplnej, C_p, obserwowany był na krzywej odwracalnego przepływu ciepła. Efekt ten zinterpretowano jako przejście szkliste sztywnych segmentów poliestrowych oraz towarzyszącą mu entalpię relaksacji. W zakresie wysokotemperaturowym na krzywej składnika nieodwracalnego, pomiędzy 90 i 190°C zaobserwowany szeroki, słaby pik egzotermiczny, który można opisać jako proces krystalizacji segmentów sztywnych. Jak widać na krzywej odwracalnego przepływu ciepła, w odpowiadającym przedziale temperaturowym, występuje szeroki endotermiczny pik związany z odwracalnym topnieniem segmentów sztywnych. Na krzywej całkowitego

przepływu ciepła, ze względu na nakładanie się efektów, widoczny jest jedynie słaby endotermiczny pik w omawianym przedziale temperaturowym.

Tab. 6.4.1 Właściwości termiczne otrzymanych nanostrukturalnych układów polimerowych

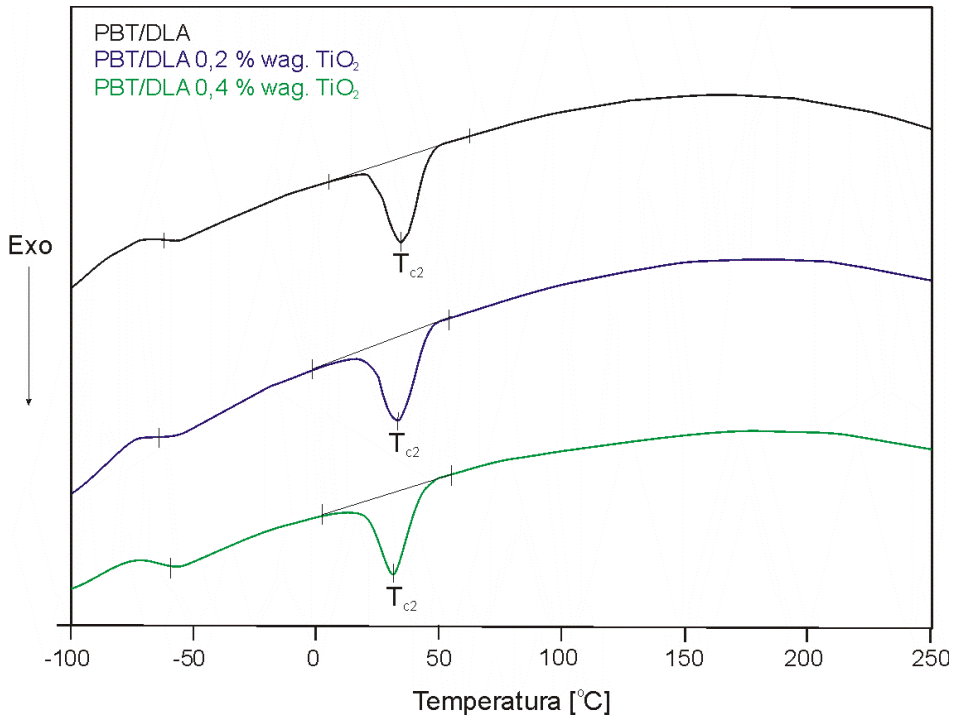
Materiał	Segmenty giętkie		Segmenty sztywne					
	T_{g1} [^oC]	ΔC_p [J/(g·^oC)]	T_{c2} [^oC]	ΔH_{c2} [J/g]	T_{m2} [^oC]	ΔH_{m2} [J/g]	$W_{c,h}$ [%]	W_c [%]
PET/DLA	-27,7	0,4481	nie zaobserwowano		140,5	8,368	19,9	5,9
PET/DLA 0.2 % wag. TiO_2	-27,4	0,4449			149,3	3,758	8,9	2,7
PET/DLA 0.4 % wag. TiO_2	-27,6	0,4439			148,8	2,605	6,2	1,8
PBT/DLA	-53,9	0,3498	35	12,8	116,5	20,7	49,3	14,4
PBT/DLA 0.2 % wag. TiO_2	-53,4	0,3690	33,2	12,7	130,4	13,0	30,9	9
PBT/DLA 0.4 % wag. TiO_2	-56,3	0,3564	31,8	12,6	125,5	16,1	38,3	11,2

T_g, T_m, T_c – odpowiednio temperatura zeszklenia, topnienia, krystalizacji, ΔH_m, ΔH_c, odpowiednio entalpia topnienia, krystalizacji, ΔCp – pojemność cieplna, $W_{c,h}$ - zawartości fazy krystalicznej w segmentach sztywnych, W_c - całkowita zawartość fazy krystalicznej w polimerze

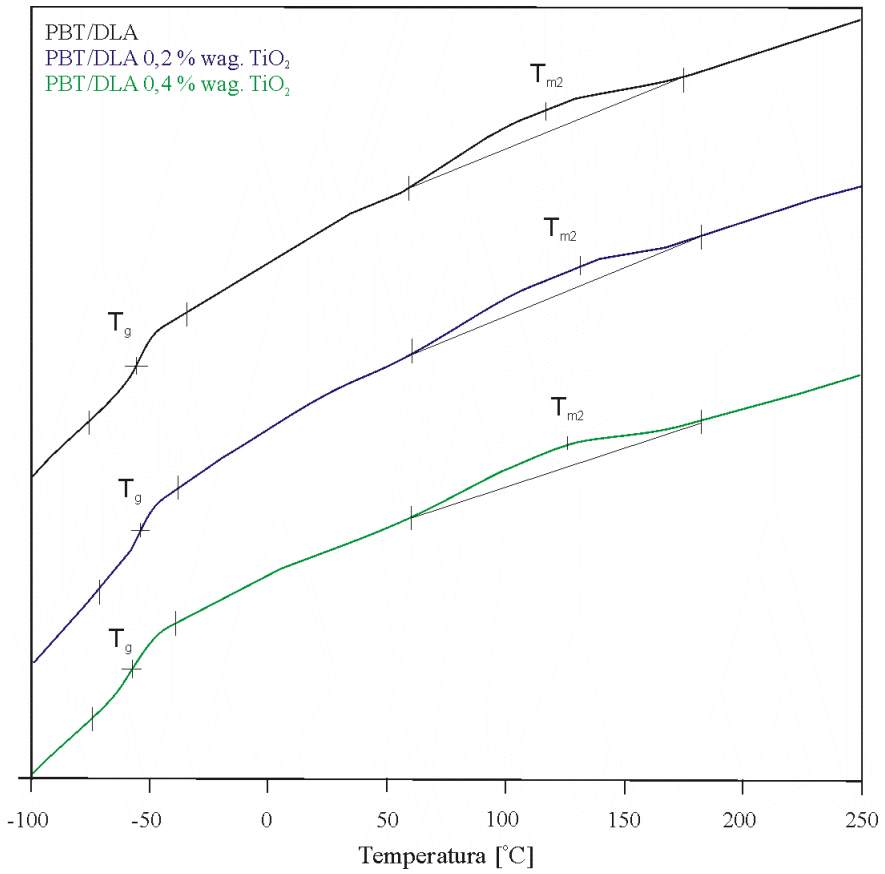
W celu zbadania wpływu osnowy polimerowej na właściwości termiczne nanokompozytów w osnowie z kopolimerów multiblokowych otrzymano również serię nanomateriałów zawierających TiO_2 w matrycy kopolimeru poli(tereftalan butylenu)/ dimer kwasu dilinoleinowego (PBT/DLA). Zestawienie temperatur przejść charakterystycznych dla tych układów przedstawiono w tabeli 6.4.1, natomiast przebiegi termogramów chłodzenia (250÷ -100°C) oraz drugiego grzania (-100 ÷250°C) obrazuje rysunek 6.4.3. Pierwszą istotną różnicą pomiędzy serią kopolimerów zawierającą w segmentach sztywnych jednostki powtarzalne poli(tereftalanu etylenu), a tą zawierającą jednostki poli(tereftalanu butylenu), jest występowanie krystalizacji podczas etapu chłodzenia w układach zawierających PBT (rys. 6.4.3 a). Związane jest to z różną szybkością krystalizacji tych dwóch polimerów termoplastycznych – powszechnie znany

jest fakt, iż szybkość krystalizacji PBT jest większa niż w przypadku PET [125]. Dlatego też dla kopolimeru PBT/DLA, jak i jego nanokompozytów zaobserwowano wyższą krystaliczność w obrębie segmentów sztywnych, jak i całego kopolimeru (odpowiednio wartości $W_{c,h}$, jak i W_c w tabeli 6.4.1). Kolejne istotne różnice zaobserwowano w przedziale niskotemperaturowym, charakterystycznym dla przejścia szklistego. W przypadku kopolimeru PBT/DLA, jak i jego nanokompozytów zaobserwowane temperatury zeszklenia znajdują się w obszarze $T_{gPRIPOL}$ charakterystycznej dla dimeru kwasu linoleinowego (-55°C) – pomiędzy -56 a -53°C. Związane jest to z innym zachowaniem się fazy amorficznej segmentów sztywnych PBT, niż ma to miejsce w przypadku kopolimerów zawierających jednostki powtarzalne PET. W przypadku układów zawierających PBT, segmenty sztywne stanowią fizyczne węzły sieci w amorficznej fazie giętkiej tworzonej jedynie przez dimer kwasu dilinoleinowego, natomiast w przypadku układów zawierających PET na fazę amorficzną składa się zarówno DLA, jak i amorficzny PET, o czym świadczą wartości T_{g1} mocno przesunięte względem $T_{gPRIPOL}$. Obecność nanoczastek, podobnie jak w układzie PET/DLA wpływa istotnie jedynie na temperaturę krystalizacji, podnosząc ją o 12 deg w stosunku do niemodyfikowanego układu PBT/DLA, przy jednoczesnym obniżeniu entalpii tego procesu.

a)



b)



Rys.6.4.3 Termogramy DSC dla niemodyfikowanego polimeru PBT/DLA oraz zawierających TiO_2

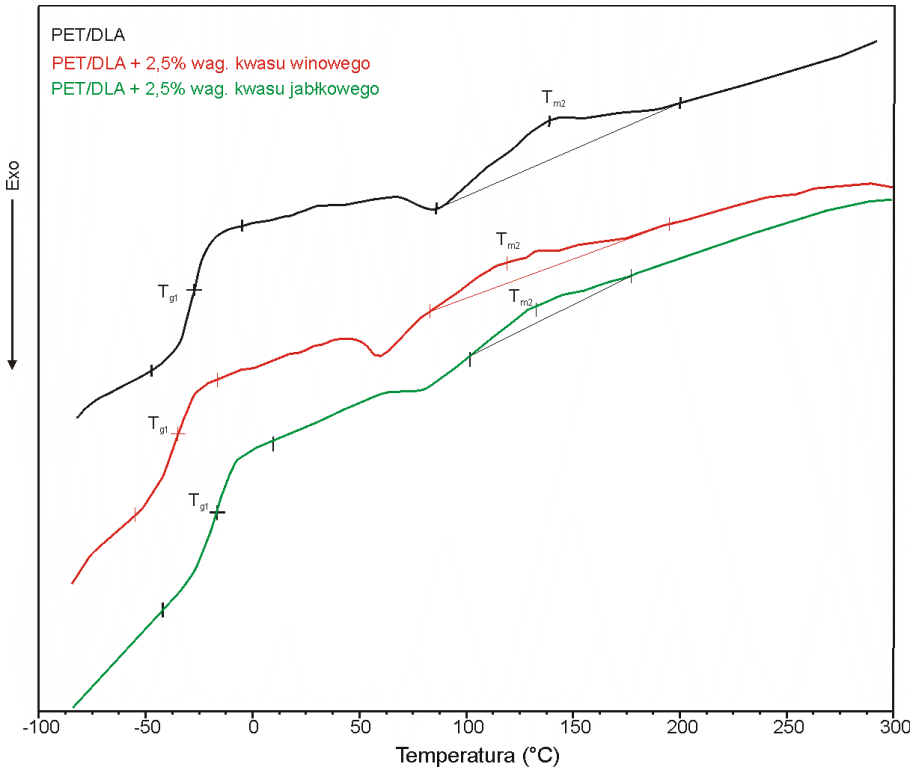
Inne zmiany właściwości termicznych zaobserwowano w przypadku układów modyfikowanych niskocząsteczkowymi hydroksykwasami. Tabela 6.4.1 przedstawia wpływ rodzaju użytego kwasu na właściwości termiczne.

Wprowadzenie na etapie polikondensacji niskocząsteczkowych kwasów – jabłkowego oraz winowego – istotnie wpłynęło na właściwości termicznego wyjściowego układu. Pomimo stosunkowo wysokich temperatur topnienia kwasów jabłkowego (143^{o}C) oraz winowego (221^{o}C), we wszystkich układach zaobserwowano obniżenie temperatury topnienia, a także entalpii towarzyszącej temu procesowi. Brak dodatkowych pików w obszarze topnienia niskocząsteczkowych kwasów świadczyć może o przyłączeniu się cząsteczek do obecnych w procesie polikondensacji oligomerów bishydroksyetylenowych lub też o zachodzeniu reakcji z monomerem alifatycznym, o czym świadczyć mogą zmiany w temperaturach zeszklenia. Przykładowe termogramy omawianych układów

przedstawia rysunek 6.3.4. Obniżenie T_{g1} wskazuje na większą ruchliwość łańcuchów polimerowych, a także prawdopodobnie powstawanie struktur rozgałęzionych, w których makrocząsteczki są ze sobą powiązane słabszymi oddziaływaniami.

Tab. 6.4.1 Wyniki badań termicznych układu PET/DLA modyfikowanego hydroksykwasami

Materiał	Segment giętki		Segment sztywny	
	T_{g1} [^oC]	ΔC_p [J/(g·^oC)]	T_{m2} [^oC]	ΔH_{m2} [J/g]
PET/DLA	-27,7	0,4481	140,5	8,368
PET/DLA 1% wag. kwasu jabłkowego	-36,8	0,4114	124,7	2,436
PET/DLA 2,5% wag. kwasu jabłkowego	-16,5	0,5699	138,8	3,595
PET/DLA 1% wag. kwasu winowego	-37,8	0,4371	112,7	5,317
PET/DLA 2,5% wag. kwasu winowego	-34,9	0,4568	113,5	5,603



Rys.6.4.3 Termogramy DSC dla wybranych układów PET/DLA modyfikowanych niskocząsteczkowymi kwasami

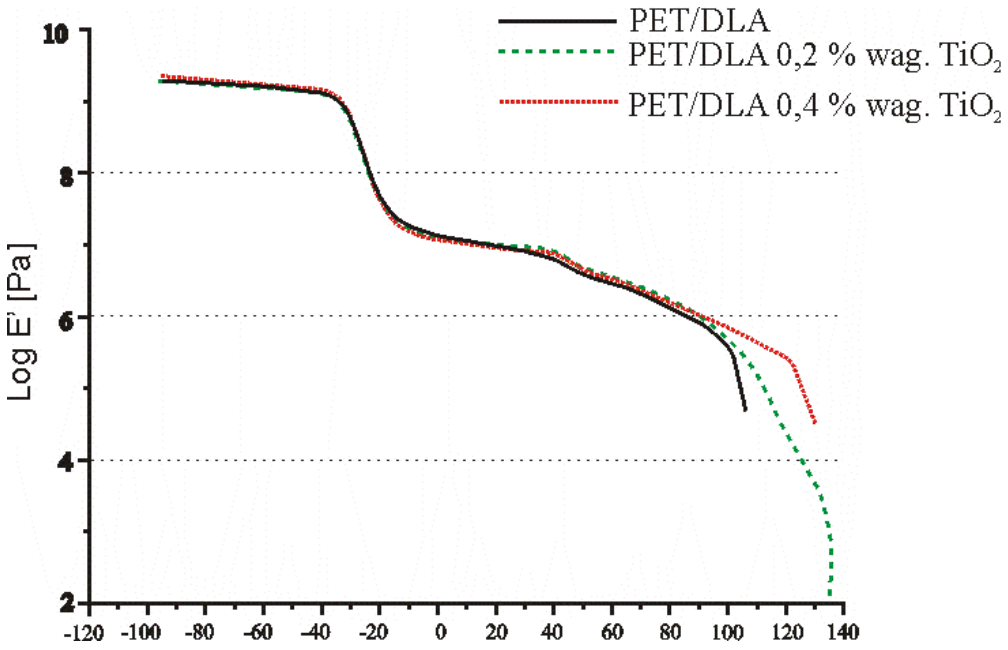
6.5 Dynamiczna analiza termomechniczna (DMTA)

W celu identyfikacji i potwierdzenia obecności przemian zaobserwowanych w badaniu różnicowej kalorymetrii skaningowej dla próbek modyfikowanych nanokrystalicznym tlenkiem tytanu, przeprowadzono badania dynamicznej analizy termomechanicznej, która dodatkowo dostarcza informacji na temat procesów relaksacyjnych zachodzących podczas przechodzenia od stanu zeszklonego to stopionego w funkcji temperatury.

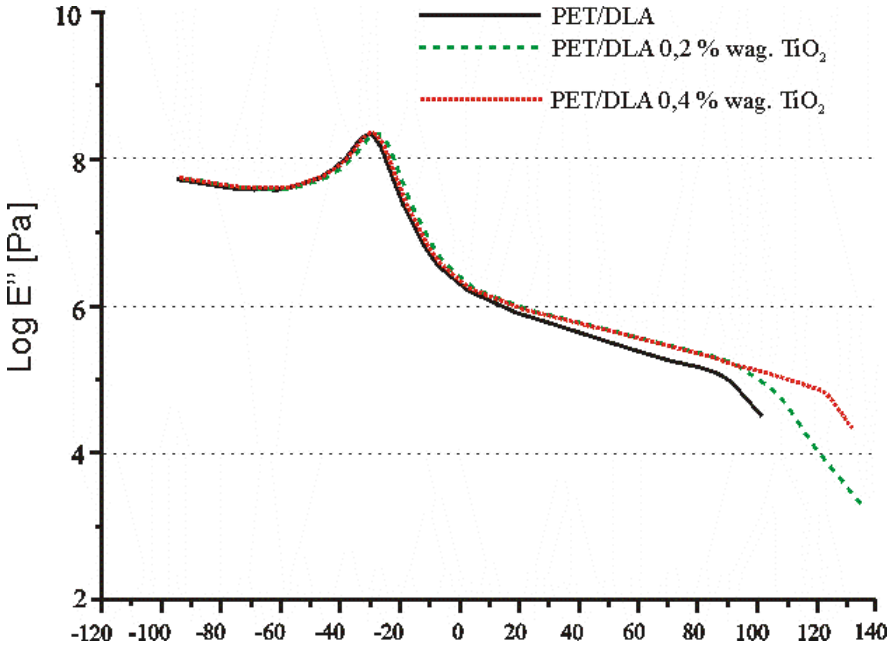
Rysunek 6.5.1 przedstawia kolejno zestawienie przebiegu zmian modułu zachowawczego, E'(a), modułu stratności, E" (b) oraz tangensa kąta stratności, tan δ (c) w funkcji temperatury. W pierwszym przedziale temperaturowym od -100 do -40°C jak również w drugim przedziale (-40÷-20°C) związanym z przejściem ze stanu szklistego w lepkosprężysty, co przejawia się obniżeniem modułu E', wszystkie polimery charakteryzują się jednakowym przebiegiem. W miarę wzrostu temperatury obserwuje się występowanie charakterystycznego plateau modułu zachowawczego, które obejmuje trzeci przedział temperaturowy od -20 do 40°C. Następnie wyróżnić można niewielki przedział

temperaturowy 40÷60°C, który związany jest z przejściem szklistym poli(tereftalanu etylenu). W kolejnym zakresie temperaturowym od 65 do 140°C zarówno dla kopolimeru oraz jego nanokompozytów obserwowany jest spadek modułu, a moment ich przegięcia określa koniec zakres temperaturowego stosowania tych materiałów (koniec *plateaux* modułu E'). Nanokompozyty zawierające TiO_2 wykazują nieco szerszy zakres modułu zachowawczego (Rys. 6.5.1 a).

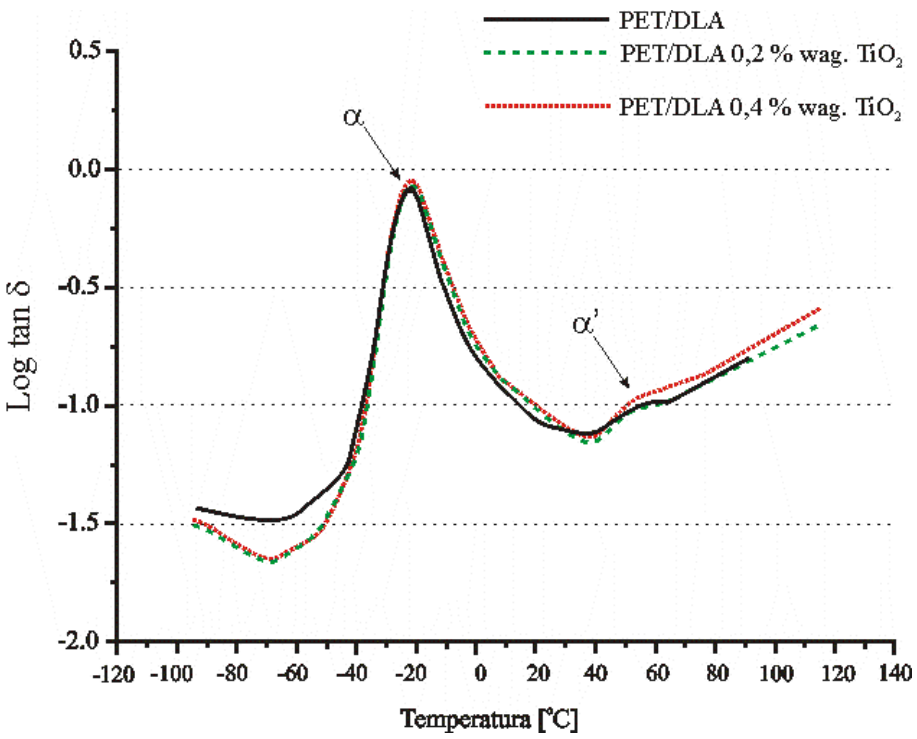
a)



b)



c)



Rys. 6.5.1 Analiza DMTA kopolimeru PET/DLA oraz nanokmpozytów

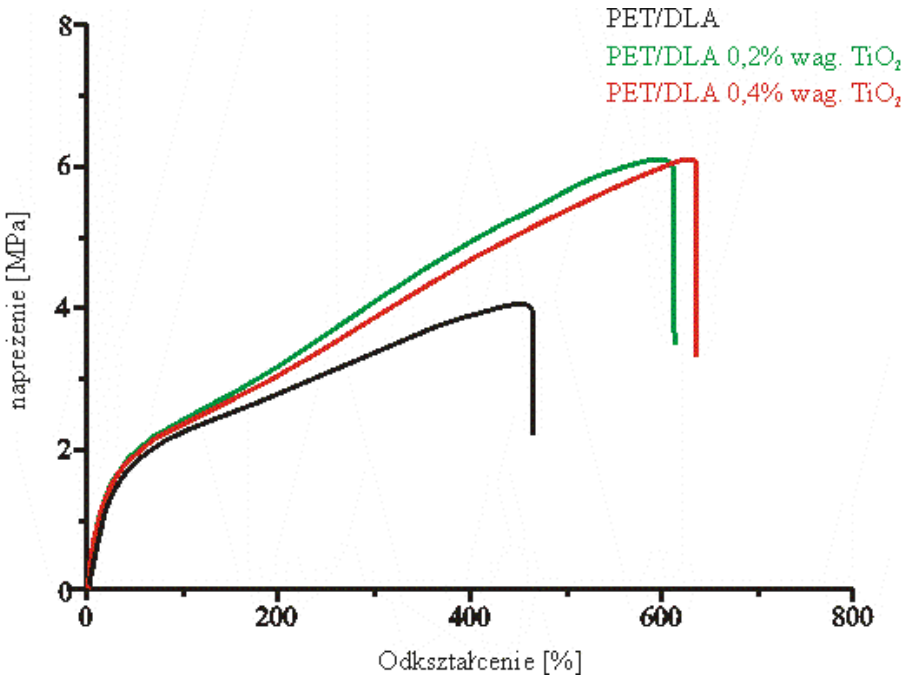
Na krzywej modułu stratności E" (rys. 6.5.1 b) oraz tangensa kąta stratności, tan δ (rys. 6.5.1 c) widoczne jest maksimum związane z temperaturą zeszklenia fazy amorficznej DLA. Dodatkowo na wykresie tan δ występuje maksimum α' odpowiadające temperaturze zeszklenia segmentu sztywnego PET. O korzystnym działaniu nanonapełniacza jako wzmocnienia matrycy polimerowej świadczą wyższe wartości modułu E' oraz E" w zakresie temperaturowym 65-140°C. Szczegółowe omówienie wpływu nanonapełniacza na właściwości mechaniczne przedstawione zostało w podrozdziale 6.6.

6.6 Wpływ udziału nanonapełniacza na właściwości mechaniczne

Przeprowadzone badania statycznego rozciągania pozwoliły ocenić wpływ nanonapełniacza na naprężenie zrywające, σ_r, naprężenie przy granicy plastyczności, σ_e a także wydłużenie względne przy zerwaniu, ε_r. W przypadku kompozytów z mikronapełniaczami wiadome jest, iż takie parametry jak np. moduł Younga są zależne od objętości napełniacza, jego kształtu i rozmieszczania, a także oddziaływań w obszarze międzyfazy polimer – napełniacz [126]. Teza ta zakłada jednocześnie, iż właściwości

mechaniczne i ich zmiany związane z wprowadzeniem napełniacza nie zależą od jego wielkości. Ze względu jednak na coraz szersze stosowanie nanonapełniaczy, wpływ wielkości cząstek stał się kluczowym aspektem w zrozumieniu efektu nanowzmocnienia.

W otrzymanym układzie PET/DLA zaobserwowano silny wpływ dodatku napełniacza na właściwości mechaniczne. Rysunek 6.6.1 przedstawia wykres naprężenie-odkształcenie dla materiału wyjściowego oraz modyfikowanego 0,2 i 0,4% wag. TiO_2.



Rys. 6.6.1 Krzywe naprężenie-wydłużenie dla układów modyfikowanych TiO_2

Jak widać na zamieszczonym powyżej rysunku, dodatek nanonapełniacza wpłynął istotnie na wydłużenie przy zerwaniu, a także naprężenie zrywające. Szczegółowe wartości tych parametrów przedstawiono w tabeli 6.6.1. Dodatkowo przedstawiono również wartości określonych parametrów, dla materiałów zawierających 0,1 oraz 0,6% wagowych nanonapełniacza, z których jasno wynika, że właściwości tych materiałów znacznie odbiegają od parametrów uzyskanych dla polimerów zawierających 0,2 i 0,4 % wag. TiO_2.

Tab.6.6.1 Wartości parametrów mechanicznych kopolimeru PET/DLA modyfikowanego TiO_2

Materiały	E_{mod} (MPa)	σ_r (MPa)	ε_r (%)	σ_r przy odkształceniu 50 % (MPa)
PET/DLA	5,6 ± 0,32	3,9 ± 0,5	354 ± 77	1,97 ± 0,04
PET/DLA 0,1% wag. TiO_2	7,8 ± 0,47	3,3 ± 0,4	427 ± 72	1,77 ± 0,05
PET/DLA 0,2% wag. TiO_2	14,24 ± 0,32	6,1 ± 0,4	611± 80	1,98 ± 0,05
PET/DLA 0,4% wag. TiO_2	14,45 ± 0,45	6,1 ± 0,3	636 ± 51	1,97 ± 0,03
PET/DLA 0,6% wag. TiO_2	9,11 ± 0,12	1,4 ± 0,3	167 ± 54	0,97± 0,02

E_{mod} – moduł Young'a, σ_r - naprężenie zrywające, σ_e - naprężenie przy granicy plastyczności, ε_r - wydłużenie względne przy zerwaniu,

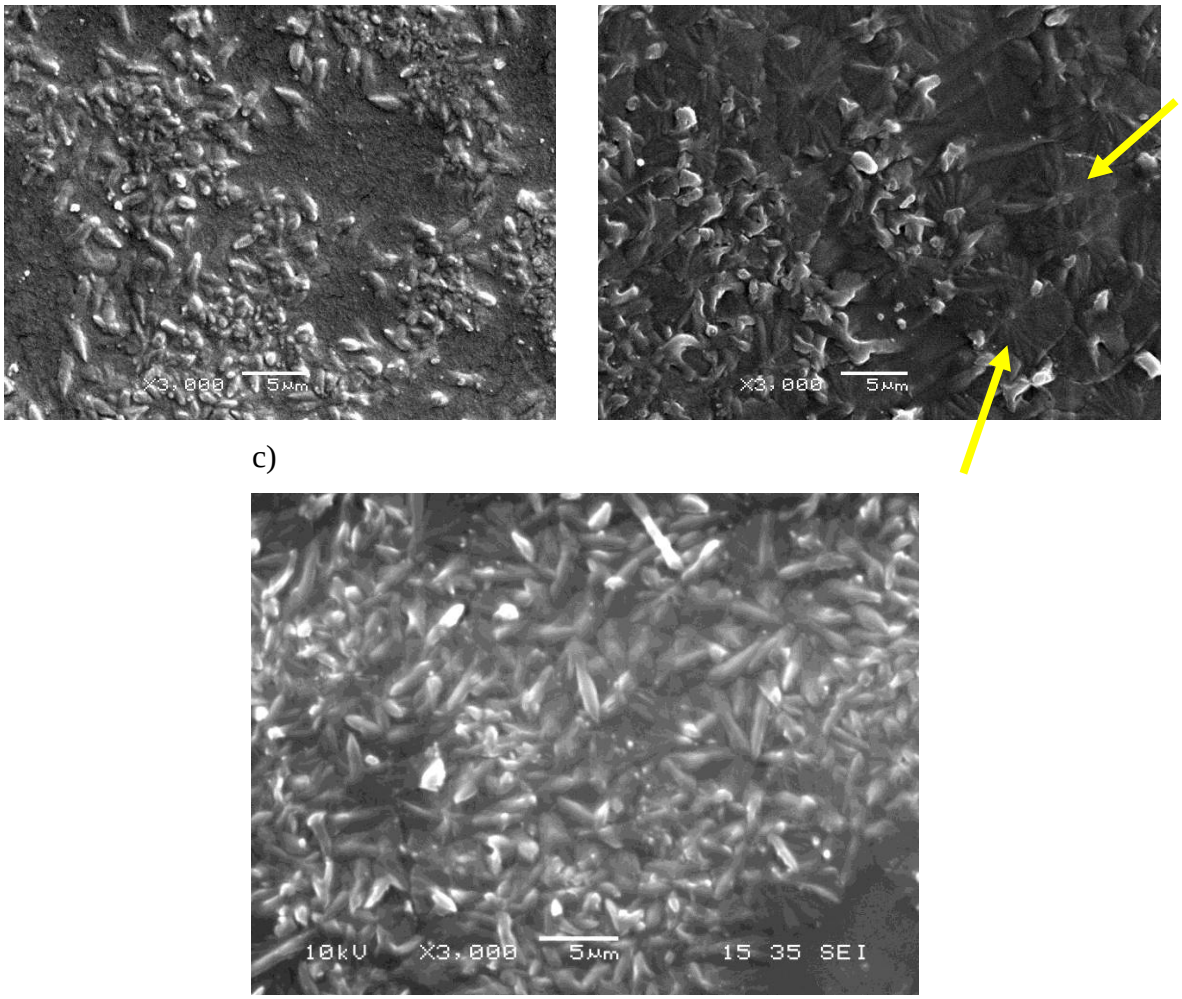
Zaobserwowany wzrost naprężenia jak i odkształcenia przy zerwaniu potwierdził występowanie zjawiska nanowzmocnienia, szczególnie przy zawartości 0,2 oraz 0,4 % wagowych TiO_2. Związane jest to uzyskiwaniem dobrej dyspersji napełniacza w matrycy polimerowej. Dla układu zawierającego maksymalną testowaną ilość TiO_2 (0,6% wag.), właściwości wytrzymałościowe uległy pogorszeniu ze względu na tworzenie się dużej ilości aglomeratów, które obserwowane były już przy zawartości 0,4% wagowych. Wynikało to głównie z faktu, iż hydrofilowy napełniacz dyspergowany był w hydrofobowym monomerze, a także ze stosunkowo dużej powierzchni właściwej nanonapełniacza (50 ± 15 m^2/g), ze względu na którą, po przekroczeniu krytycznego udziału wagowego, oddziaływania między cząstkami powodowały ich wzajemne przyciąganie się. Z kolei dla najniższego udziału wagowego napełniacza efekt wzmocnienia nie był tak silny, ze względy na wytworzenie relatywnie mniejszej międzyfazy na granicy napełniacz-polimer.

Należy jednocześnie stwierdzić, iż charakterystyka mechaniczna otrzymanych nanokompozytów odpowiada wymaganiom, jakie stawiane są materiałom mającym służyć rekonstrukcji tkanek miękkich [88]. Wartościami odpowiadają one naturalnie występującym włóknom kolagenowym, kilkakrotnie przewyższają moduł Young'a charakterystyczny dla mięśnia sercowego, co pozwala rozpatrywać je jako potencjalne materiały wspierające „mechanicznie" uszkodzone obszary serca.

6.7 Wpływ udziau nanonapełniacza na morfologię nanokompozytów polimerowych

Przeprowadzone obserwacje na skaningowym mikroskopie elektronowym, wykazały różnorodność powierzchni materiałów polimerowych po wprowadzeniu nanonapełniacza, rys. 6.7.1.

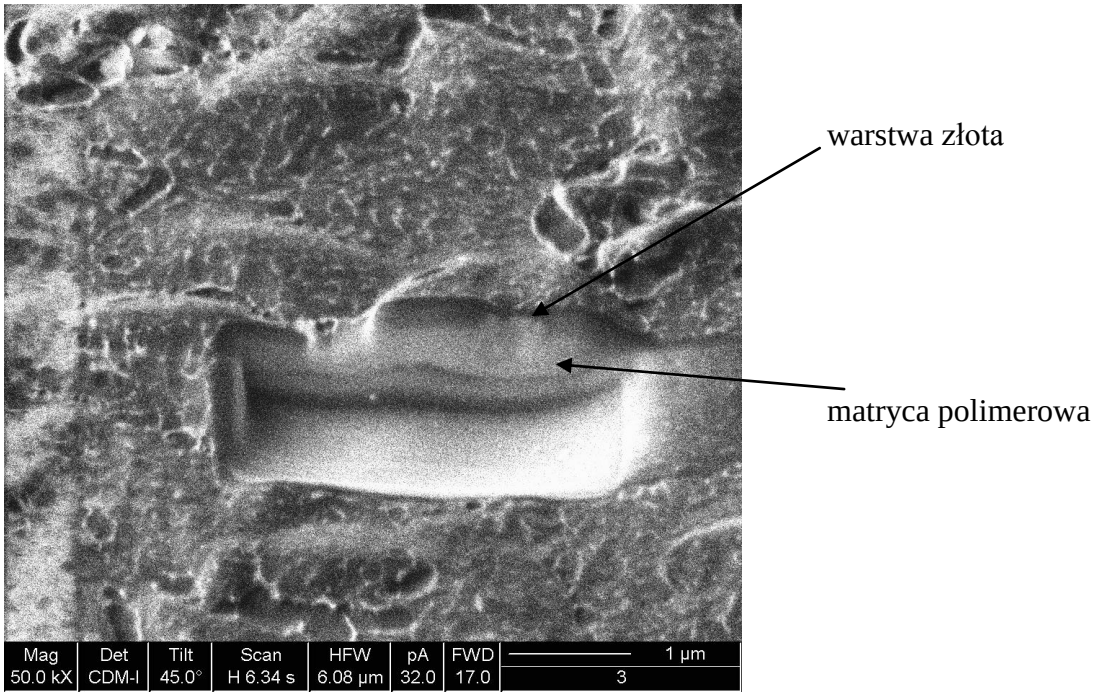
a) b)



Rys. 6.7.1 Morfologia powierzchni próbek: a) PET/DLA, b) PET/DLA 0,2 % wag. TiO_2, c) PET/DLA 0,4% wag. TiO_2, powiększenie 3000x

Dla materiałów zawierających tlenek tytanu zaobserwowano na powierzchni, oprócz specyficznych wypukłości, także struktury przypominające swą budową sferolity, będące efektem procesów krystalizacji (żółte strzałki, rys. 6.7.1 b) . W celu potwierdzenia, iż zaobserwowane na powierzchni wypukłości nie powstały np. podczas procesu napylania lub nie są efektem nagromadzenia nanonapełniacza, w próbce zawierającej 0,2 % wag

TiO_2 wykonano przekrój przy użyciu skaningowego mikroskopu jonowego (FIB – *Focused Ion Beam*). Dzięki zogniskowanej wiązce jonów o grubości ok. 6 nm otrzymano przekrój próbki zaprezentowany na rys. 6.7.2, a sprzężona z mikroskopem spektroskopia mas jonów wtórnych pozwoliła zanalizować skład poszczególnych warstw, wśród których oznaczone zostało napylone złoto oraz węgiel pochodzący z matrycy polimerowej. Nie możliwe było natomiast określenie miejsc występowania nanometrycznego tlenku tytanu.



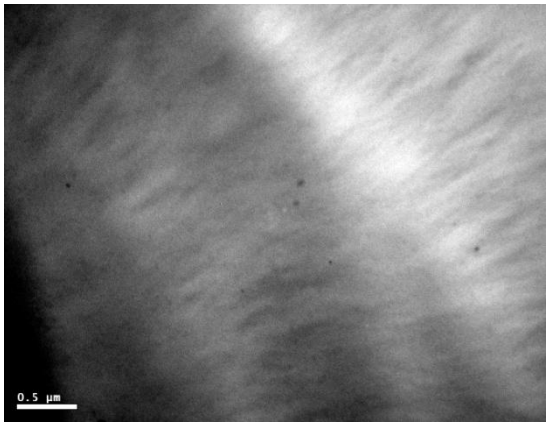
Rys.6.7.2 Przekrój przez próbkę PET/DLA 0,2 % wag. TiO_2 otrzymany dzięki zastosowaniu skaningowego mikroskopu jonowego (FIB)

Wizualizacja rozproszenia nanocząstek w matrycy polimerowej możliwa była przy zastosowaniu transmisyjnej mikroskopii elektronowej, która jest jedną z najpopularniejszych metod analizy nanomateriałów i rozproszenia nanonapełniaczy w osnowie [127]. Zaprezentowane na rysunku 6.7.3 zdjęcia pozwoliły mi ocenić wielkość cząstek znajdujących się w matrycy polimerowej oraz dzięki przystawce EDX potwierdzić obecność TiO_2.

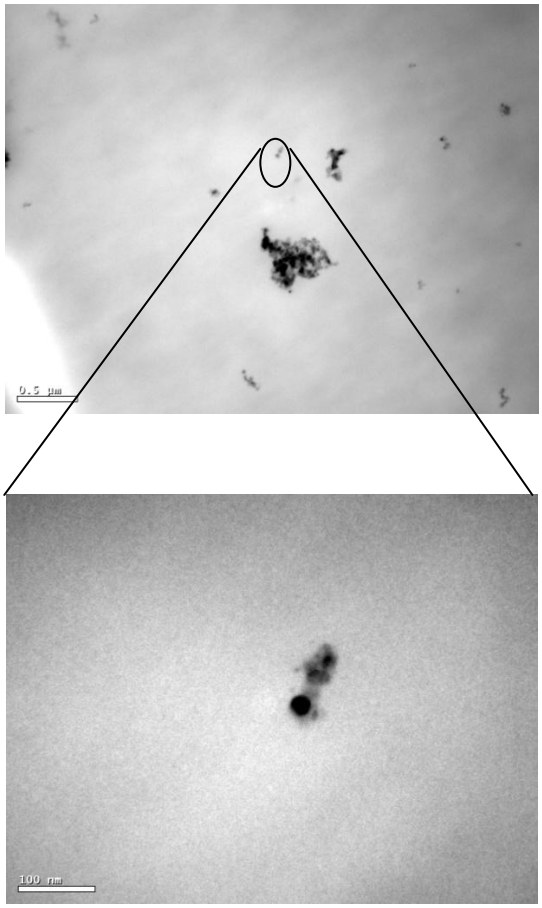
Przedstawione zdjęcia wskazują, iż w większości cząstki napełniacza występują w postaci aglomeratów, których maksymalne rozmiary sięgają ok. 0,75 μm. Ilość

aglomeratów wrasta wraz z udziałem TiO_2. Z doniesień literaturowych dotyczących tlenku tytanu, który stosowałam w swojej pracy (produkt Aeroxide P25, Evonik-Degussa) wynika, iż ten komercyjny produkt w postaci białego proszku składa się głównie z agregatów pojedynczych cząstek TiO_2, które nawet w procesie obróbki ultradźwiękami nie ulegają rozbiciu do wielkości pierwotnych cząstek (ok. 20 nm) [128, 129]. Dodatkowo zaobserwowano zjawisko reaglomeracji, przy dłuższym działaniu ultradźwięków, prawdopodobnie na skutek występującej na powierzchni cząstek TiO_2 erozji. Zjawisko to nie było tak gwałtowne w momencie, gdy do wodnego roztworu TiO_2 dodano kwasu azotowego lub wodorotlenku amonu, które ułatwiały utrzymanie potencjału zeta, ζ, na poziomie wartości sprzyjających odpychaniu się cząstek (|ζ|> 30 mV), a nie ich aglomeracji (ζ bliskie zeru).

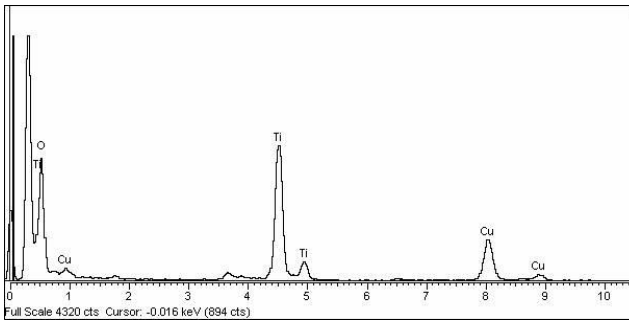
a)



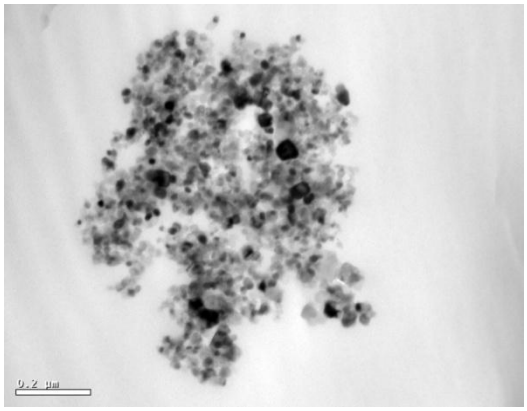
b)



c)



d)

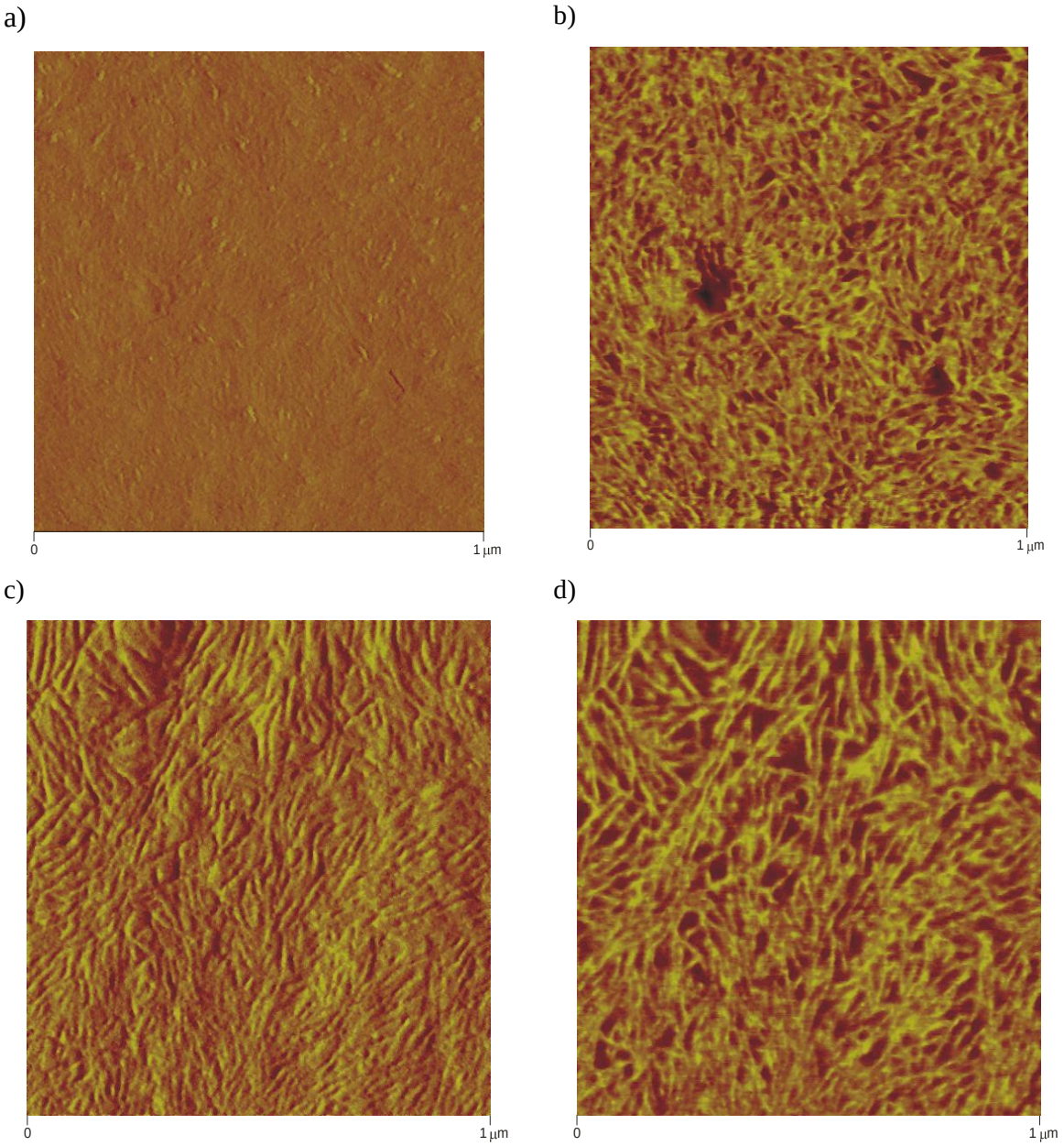


Rys.6.7.3 Obrazy TEM dla próbek: a) PET/DLA, b) PET/DLA 0,2 % wag. TiO_2, wraz z powiększeniem wybranego obszaru, c) analiza EDX potwierdzająca obecność TiO_2, d) aglomerat, przy 0,4% wag. napełniacza

W badaniach innych autorów środkiem wpływającym na zmianę właściwości elektrostatycznych wodnych zawiesin TiO_2 była sól $Na_4P_2O_7$ [130]. W swojej pracy nie stosowałam żadnego środka zmieniającego właściwości elektrostatyczne ośrodka dyspergującego, tj. DLA, dlatego też w matrycy polimerowej obecne były zarówno aglomeraty, jak i agregaty cząstek TiO_2.

Obserwacje z użyciem mikroskopu sił atomowych (AFM) przeprowadzone na materiałach otrzymanych metodą powlekania wirowego, nie wykazały obecności aglomeratów nanonapełniacza. Rysunek 6.7.4 przedstawia obrazy powierzchni próbek oraz odpowiadające im obrazy fazowe. Jak widać na zamieszczonych zdjęciach, w obydwu przypadkach widoczna jest lamelarna struktura fazowa, z segmentami sztywnymi rozproszonymi w amorficznych obszarach segmentów giętkich, przy czym dla jednakowej skali powiększenia 1 μm, w przypadku polimeru z nanonapełniaczem lamelarne struktury odpowiadające segmentom sztywnym są dłuższe. Podobna morfologia lamelarna (fibrylarna) została zaobserwowana przez Krijgsman *i in.* dla elastomerów termoplastycznych zbudowanych z bloków sztywnych T6T6T6-dimetylu (2,5 jednostki powtarzalnej Nylonu-6,T) oraz dwóch rodzajów amorficznych bloków giętkich - PTMO lub PTMO przedłużonego DMT [131]. Wynika z tego, iż lamelarna morfologia jest typowa dla kopolimerów blokowych, których krystaliczny blok jest pochodną kwasu tereftalowego. Zaznaczyć jednocześnie należy, że zarówno w moim materiale badawczym,

jak i przytoczonym ze źródła literaturowego, udział wagowy segmentu zawierającego reszty tereftalowe był niski, przy wyższym udziale należy się spodziewać struktury o większym uporządkowaniu, zbliżonej do struktury sferolitycznej.



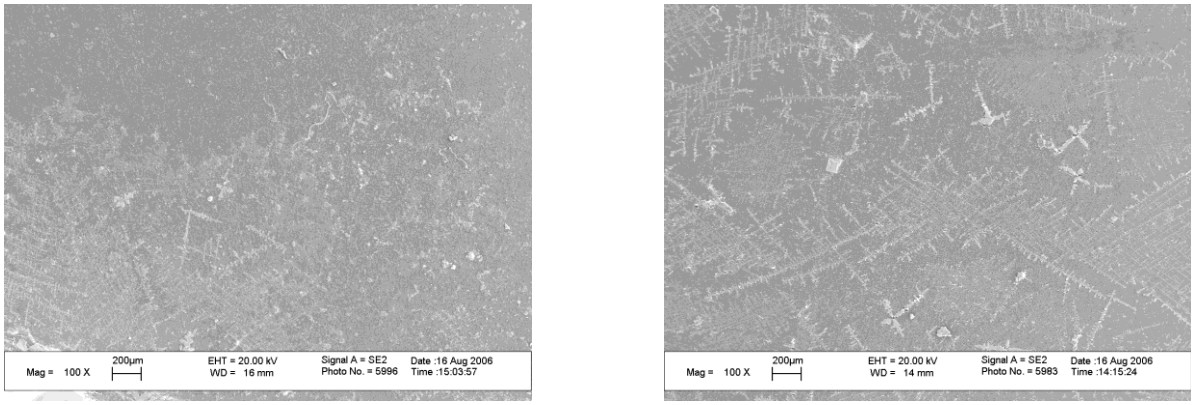
Rys.6.7.4 Obrazy AFM powierzchni próbek: a)powierzchnia PET/DLA, b) obraz fazowy PET/DLA, c) powierzchnia próbki PET/DLA 0,2 %wag. TiO_2 i odpowiadający jej obraz fazowy (d)

6.8. Degradacja hydrolityczna układów nanostrukturalnych

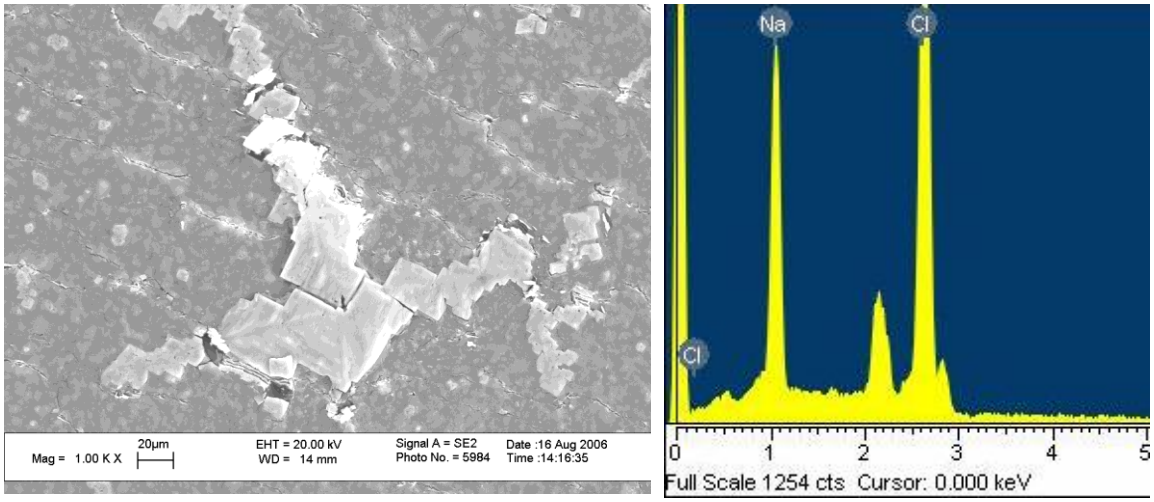
6.8.1. Degradacja krótkoterminowa

Przeprowadzenie krótkoterminowego testu w roztworze SBF miało głównie na celu sprawdzenie bioaktywności TiO_2, a tym samym zdolności do indukowania procesu wytrącania się bioaktywnej (nieorganicznej) warstwy na powierzchni materiałów polimerowych. Przeprowadzone po 21 dniach obserwacje na skaningowym mikroskopie elektronowym połączonym z spektrometrem rentgenowskim z dyspersją energii (rys. 6.8.1.1), nie wykazały obecności wśród wytrąconych na powierzchni soli związków będących pochodnymi hydroksyapatytu.

a) b)



c) d)



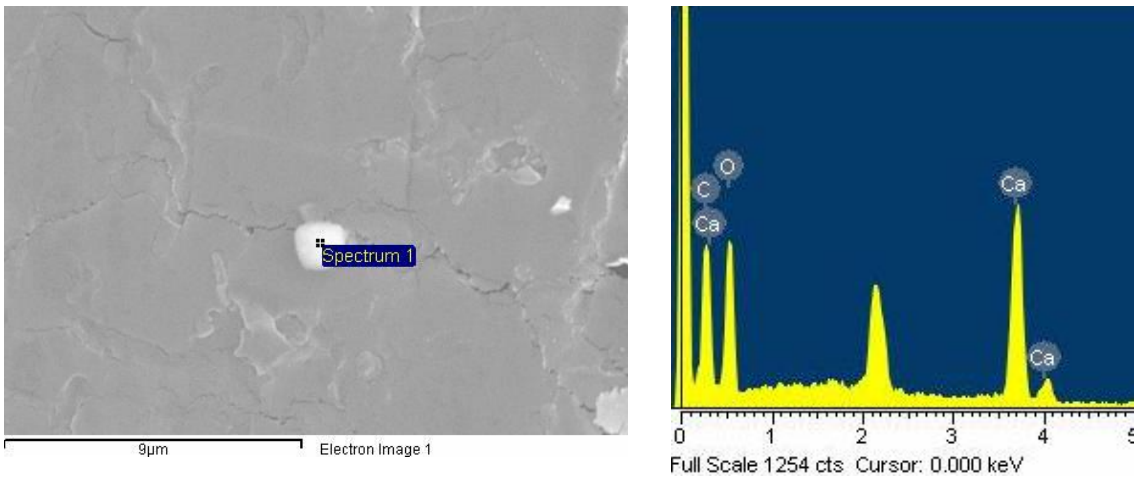
Rys. 6.8.1.1 Morfologia próbek po 21 inkubacji w SBF: a) PET/DLA, b) PET/DLA 0,4 %wag. TiO_2, c) kryształ NaCl wytrącony na powierzchni PET/DLA 0,4 %wag TiO_2 i d) analiza EDX potwierdzająca jego budowę

Obserwacje te są różne od doniesień literaturowych [133, 134], gdyż w zarówno w przypadku stosowania amorficznego poli(D,L-laktydu), jak i kopolimeru poli(D,L-laktyd-glikolid), dodatek TiO_2 indukował wytrącanie hydroksyapatytu już po 14 dniach inkubacji w SBF. Należy jednak zauważyć, że najniższy udział wagowy napełniacza wynosił 5 % wagowych, a najwyższy 20% wagowych, co ponad dziesięciokrotnie przewyższa ilość nanonapełniacza użytego w przeprowadzonych przeze mnie badaniach.

Bioaktywne działanie tlenku tytanu zostało zaobserwowane dla analogicznych układów nanokompozytowych zawierających jako segmenty sztywne poli(tereftalan butylenu) (PBT), przy tym samym ich udziale wagowym (30 % wag.). Rysunek 6.8.1.2 przedstawia morfologię tych próbek wraz z potwierdzeniem obecności soli wapnia. Z powyższych obserwacji wynika, iż bioaktywne działanie TiO_2 przy niższych zawartościach (0,2-0,4 %wag.) jest możliwe w przypadku matrycy polimerowej charakteryzującej się wyższą krystalicznością, natomiast w przypadku polimerów amorficznych lub zbudowanych z kopolimerów o większej ilości fazy amorficznej, do bioaktywnego działania TiO_2 (rozumianego jako zdolność wytrącania hydroksyapatytu z roztworu SBF) wymagana jest jego wyższa zawartość.

Opisana w pracy autorki [135] inhibicja procesu kalcyfikacji w przypadku kopolimerów PET/DLA zawierających nanometryczny tlenek tytanu pozwoliła zakwalifikować te materiały do dalszych badań, mających na celu zbadanie ich przydatności do zastosowań w inżynierii tkankowej, zwłaszcza tkanek miękkich.

a) b)



Rys. 6.8.1.2 Morfologia próbek po 21 inkubacji w SBF: a) PBT/DLA 0,2 %wag. TiO_2, b) analiza EDX potwierdzająca obecność soli wapnia

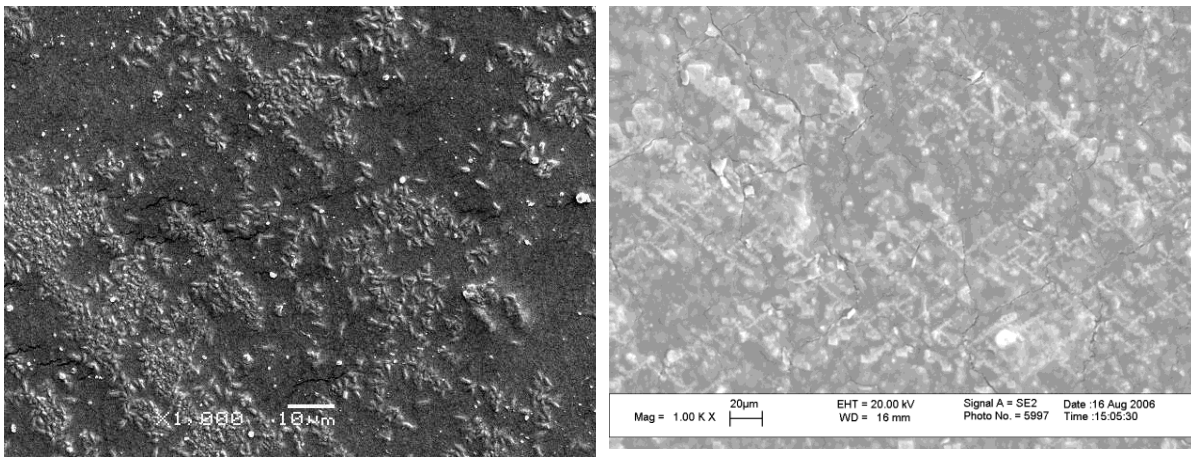
Wpływ obecności nanonapełniacza na chropowatość powierzchni, charakteryzowaną przez parametr rms (*root-meen-square*), próbek otrzymanych metodą prasowania przed i po inkubacji w roztworze SBF przedstawia tabela 6.8.1.1. Szczególną uwagę należy zwrócić na fakt, że wzrost chropowatości wyrażony parametrem *rms* dla nanokompozytu zawierającego 0,2% wag. TiO_2 w stosunku do kopolimeru PET/DLA wzrósł o ponad 100% (z 0,519 na 1,088), co – jak wynika z prac Webstera [84, 144] – może mieć duże znaczenie na procesy proliferacji komórek.

Tab. 6.8.8.1 Parametr rms dla kopolimerów oraz ich nanokompozytów przed i po inkubacji w SBF

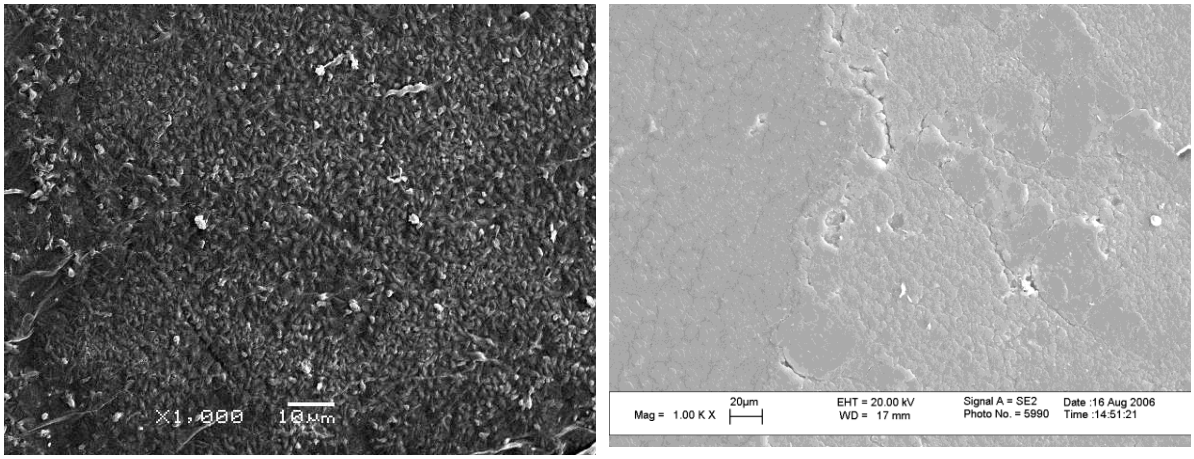
	PET/DLA	**PET/DLA 0,2 % wag TiO_2**	**PET/DLA 0,4 % wag TiO_2**	**PBT/DLA**	**PBT/DLA 0,2 % wag TiO_2**	**PBT/DLA 0,4 % wag TiO_2**
rms przed inkubacją [μm]	**0,519** ± 0,138	**1,088** ± 0,185	**0,677** ± 0,204	**0,714** ± 0,213	**1,127** ± 0,700	**0,883** ± 0,489
rms po inkubacji [μm]	**1,626** ± 0,119	**1,335** ± 0,282	**0,972** ± 0,079	**1,000** ± 0,329	**1,333** ± 0,958	**0,921** ± 0,474
Różnica w parametrze **rms**	1,107	0,247	0,295	0,287	0,206	0,038

Jak wynika z zaprezentowanej tabeli, największa różnica w szorstkości powierzchni przed i po inkubacji została zaobserwowana dla niemodyfikowanego układu PET/DLA, najmniejsza natomiast dla układu PBT/DLA zawierającego 0,4 % wag. TiO_2. Sugerować to może, iż stosunkowo „gładka" powierzchnia kopolimeru PET/DLA, sprzyjała osadzaniu się soli pochodzących z roztworu SBF i wytworzeniu zróżnicowanej pod względem chropowatości warstwy, natomiast w przypadku kopolimerów zawierających tlenek tytanu, wytrącająca się warstwa wyrównywała powierzchnię nanokompozytów, co ilustrują zdjęcia SEM próbek przed i po degradacji (rys. 6.8.1.3).

a) b)



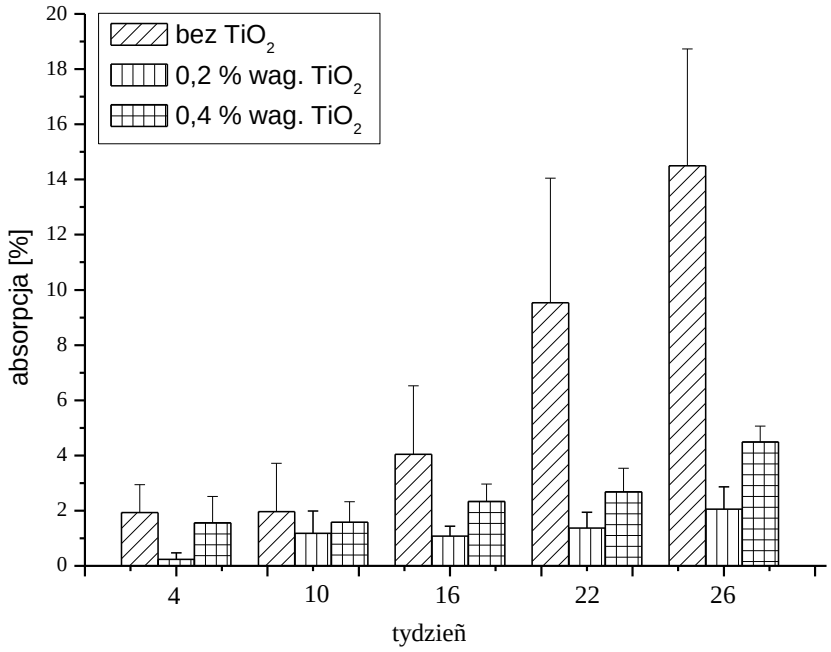
c) d)



Rys. 6.8.1.3 Morfologia próbek przed i po 21 inkubacji w SBF: a, b) PET/DLA, c, d) PET/DLA 0,2 %wag. TiO_2

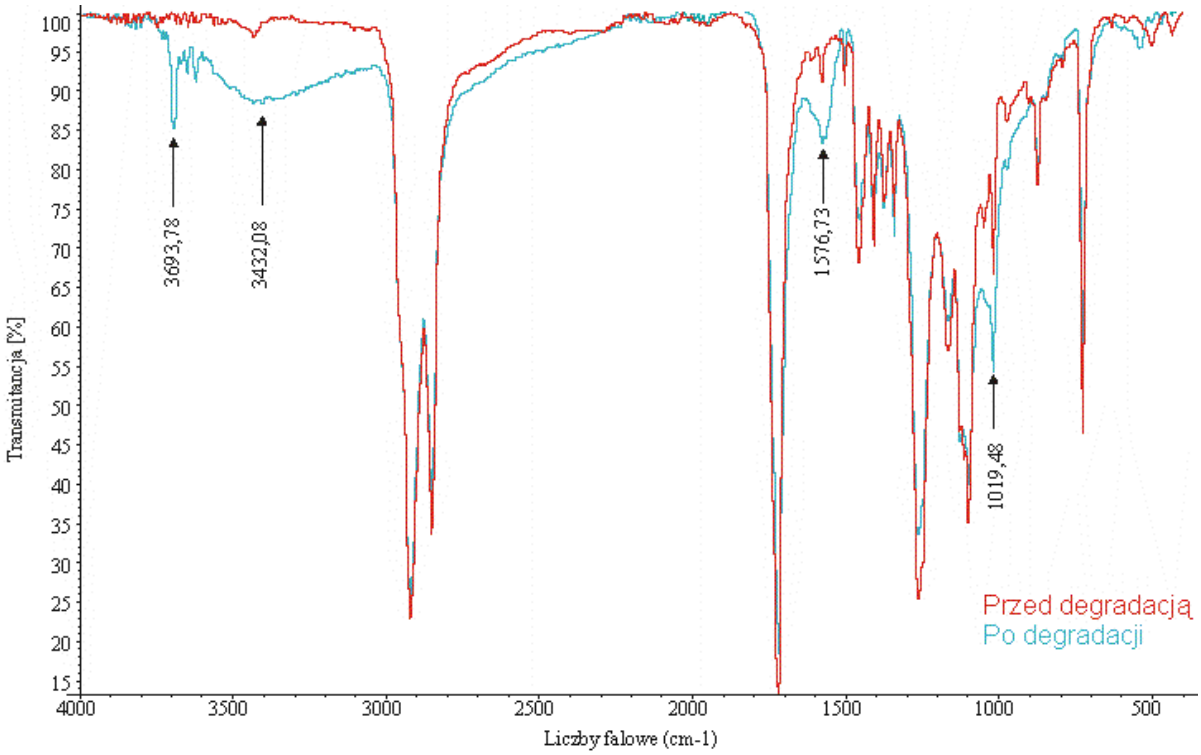
6.8.2. Degradacja długoterminowa

Przeprowadzony test degradacji długoterminowej, trwający 26 tygodni (ponad 6 miesięcy) pozwolił na poznanie mechanizmu degradacji alifatyczno-aromatycznych poliestrów oraz ich nanokompozytów zawierających TiO_2. Przedstawiony poniżej wykres (rys. 6.8.2.1) ilustruje wpływ nanonapełniacza na absorpcję roztworu degradacyjnego (w tym przypadku PBS).



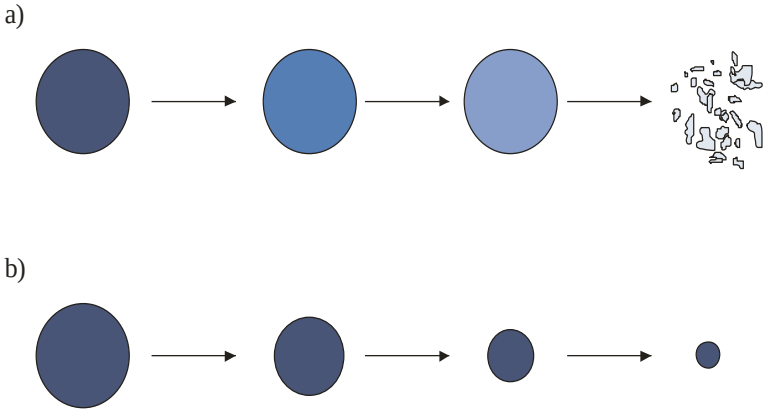
Rys. 6.8.2.1 Absorpcja roztworu degradacyjnego w kolejnych tygodniach testu

Najwyższa wartość absorpcji w przypadku materiału niezawierającego nanonapełniacza, może wynikać z faktu, iż jedynie amorficzna faza jest przepuszczalna dla wody [136], tak więc obecność napełniacza – wpływająca na budowę fazy amorficznej kopolimerów – może działać stabilizująco na tego typu, w większości amorficzne, układy polimerowe. Potwierdzenie tej hipotezy można znaleźć w badaniach budowy chemicznej kopolimeru i jego kompozytów po teście degradacji. Rysunek 6.8.2.2 przedstawia widma w podczerwieni wykonane po 26 tygodniach degradacji hydrolitycznej. Porównując widma po degradacji z tymi otrzymanymi przed degradacją, istotne zmiany w budowie zachodzą w zakresie liczb falowych 3200 – 3600 cm^{-1} – pojawia się szerokie pasmo, które przypisać należy grupom hydroksylowym, których ilość zwiększa się w łańcuchu polimerowym, zgodnie z zaprezentowanym na rysunku 2.2.1.1 schematem hydrolizy poliestrów. Inne różnice pojawiają się w przypadku pasma przy liczbie falowej 1576 cm^{-1}, któremu przypisywany jest sygnał pochodzący od wiązań C-H, obecnych w pierścieniu aromatycznym. Zwiększenie intensywności tego pasma wynika prawdopodobnie z faktu, iż degradacja przebiega głównie w obszarach amorficznych, przez co fragmenty łańcuchów sztywnych wykazują bardziej intensywne sygnały.



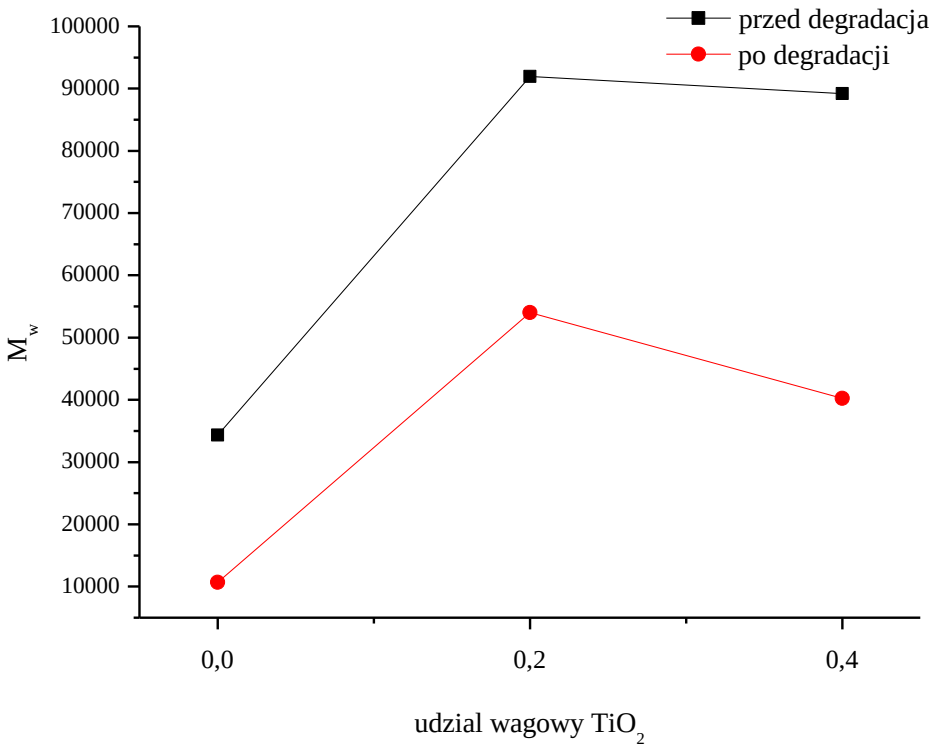
Rys. 6.8.2.2 Widmo w podczerwieni dla układu PET/DLA przed oraz po degradacji w PBS.

Biorąc pod uwagę fakt niewielkiej absorpcji roztworu degradacyjnego, jak również niewielkiego ubytku masy próbek oraz niezmienionej ich geometrii podczas procesu degradacji, wnioskować można, iż przebiega on według schematu degradacji „w masie' (rys. 6.8.2.3 a), a nie erozji powierzchniowej (b).



Rys.6.8.2.3 Schemat procesu degradacji: a) w masie; b) erozja powierzchniowa

Dodatkowo fakt ten potwierdza zaobserwowany spadek ciężarów cząsteczkowych – dla kopolimeru nie zawierającego *nano*-TiO_2 spadek ten wynosi 67% w stosunku do wartości początkowej, natomiast dla kompozytu zawierającego 0,2 % wag. TiO_2 spadek jest najmniejszy i wynosi 41%. Wykres obrazujący zmianę ciężarów cząsteczkowych przedstawia rysunek 6.8.2.4. Wysokie wartości ciężarów cząsteczkowych polimerów zawierających *nano*-TiO_2 zawiązane są z obecnością nanonapełniacza w analizowanych roztworach. Zastosowana procedura przygotowywania próbek, obejmująca etap oczyszczania roztworu polimeru przy użyciu filtra o wielkości porów 0,45 μm, nie pozwoliła na usunięcie nanocząstek z roztworu. Dlatego też zaobserwowane zmiany wagowo średnich ciężarów cząsteczkowych nanokompozytów interpretowano jakościowo, a różnice w M_w przed i po degradacji potwierdzają wcześniejsze obserwacje, iż nanonapełniacz stanowi specyficzny rodzaj „stabilizatora" dla matrycy polimerowej, obniżając zdolność materiału polimerowego do chłonięcia wody, a tym samym zmieniając jego podatność na degradację hydrolityczną.

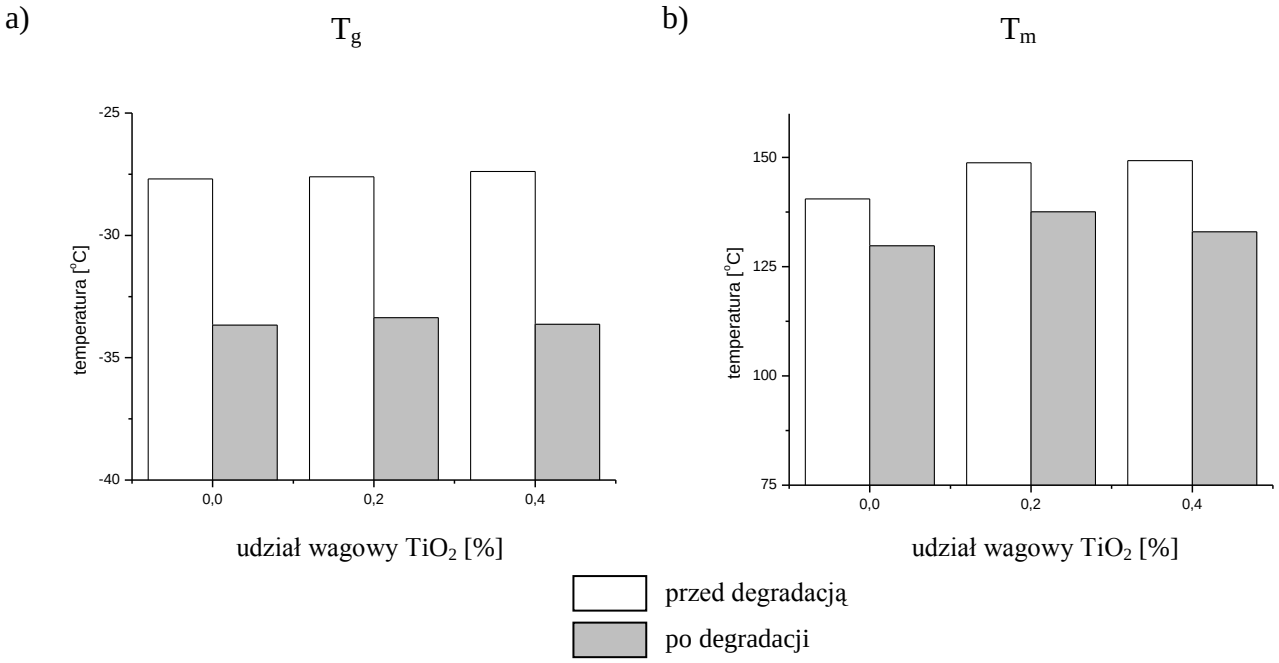


Rys.6.8.2.4 Zmiany wagowo średniego ciężaru cząsteczkowego w wyniku degradacji hydrolitycznej

Obserwacje zmian zachodzących podczas degradacji hydrolitycznej sugerujące zachodzenie degradacji w masie próbki, a nie tylko na jej powierzchni, dobrze korelują z wartościami kąta zwilżania, mierzonego metodą stawiania kropli. Dla kopolimeru PET/DLA bez napełniacza wynosi on 96°, natomiast dla kompozytów *nano*-TiO_2 ok. 92 – 93°. Obserwowana hydrofobowość związana jest głównie z naturą monomeru DLA, będącego pochodną wyższych kwasów tłuszczowych. Dlatego też podatność na hydrolizę w ten sposób modyfikowanego poli(tereftalanu etylenu) jest znacznie mniejsza niż w przypadku modyfikacji odpadowego PET lub produktów jego glikolizy poli(kwasem mlekowym) metodą roztworową [137] lub stopową [138], nawet po modyfikacji hydrofilowym napełniaczem, jakim jest prezentowany w niniejszej pracy *nano*-TiO_2.

Zmiany właściwości termicznych

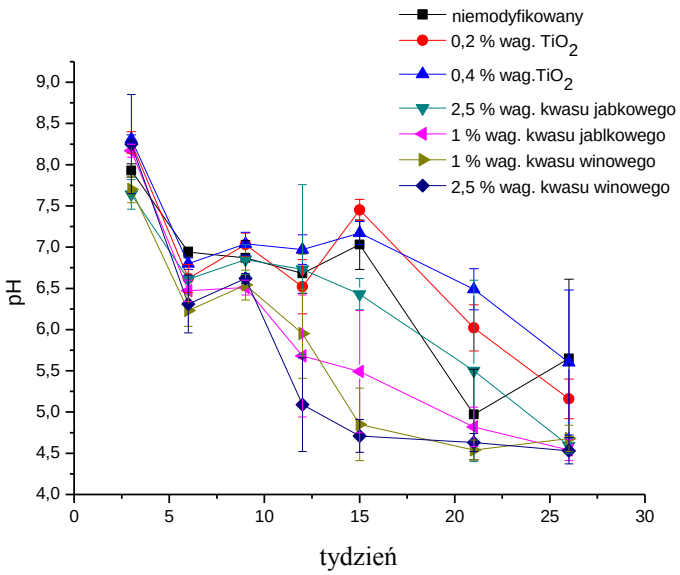
Zaobserwowane zmiany w budowie chemicznej kopolimerów modyfikowanych nanonapełniaczem przełożyły się na zmiany właściwości termicznych kompozytów. Dotyczyły one zarówno przemian termicznych charakterystycznych dla segmentów sztywnych jak i giętkich. Graficzna ilustracja tych zmian została przedstawiona na rysunku 6.8.2.5. Znaczny spadek temperatury zeszklenia związany jest przede wszystkim z wcześniej już opisanym zjawiskiem łatwiejszej penetracji roztworu degradacyjnego w obszarach amorficznych. Obniżenie T_{g1}, występujące na jednakowym poziomie zarówno dla kopolimeru PET/DLA, jak i nanokompozytów, w których stanowi osnowę, sugeruje zwiększenie zdolności łańcuchów polimerowych do mikro-ruchów. Dodatkowo przesunięcie temperatur w kierunku niższych zakresów – charakterystycznych dla monomeru DLA – świadczy, o zaburzeniach w strukturze fazy amorficznej, głównie wywołanych oddziaływaniem z obszarami amorficznymi pochodzącymi od jednostek powtarzalnych PET. Zmiany w temperaturach topnienia nie są już tak silne, i występują również w zbliżonym zakresie temperaturowym po 26 tygodniach degradacji, przy czym największy spadek temperatury zaobserwowany został dla układu zawierającego 0,4 % wag. TiO_2.



Rys.6.8.2.5 Zmiany w wyniku degradacji w obszarze a) temperatury zeszklenia, b) temperatury topnienia

Analiza produktów degradacji

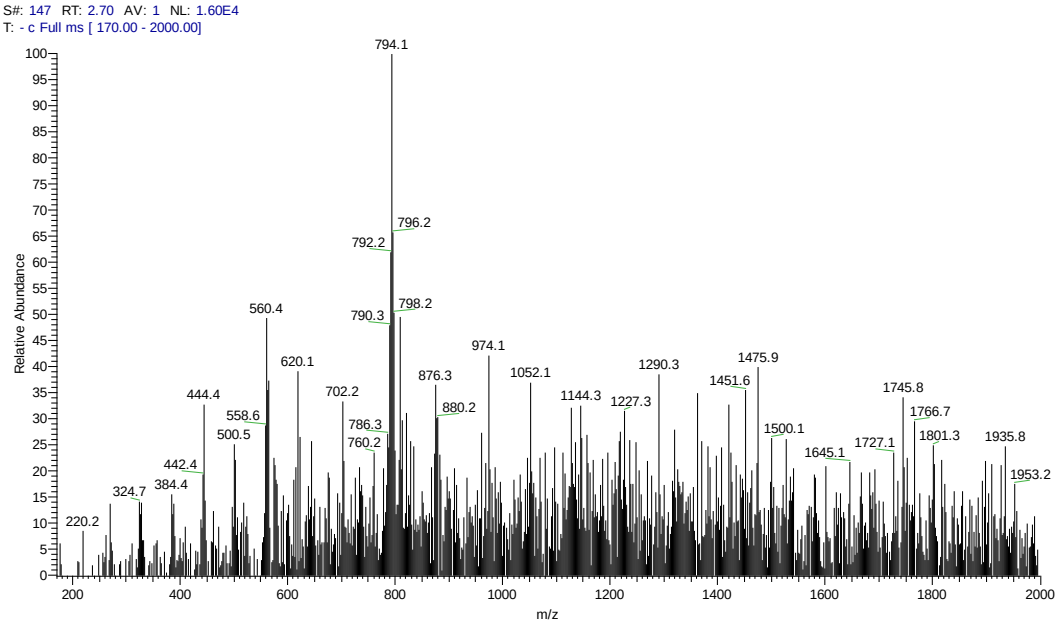
Dopełnieniem badań procesów degradacyjnych była próba identyfikacji produktów degradacji znajdujących się w roztworze, przy jednoczesnym śledzeniu zmian pH roztworu degradacyjnego, jakim była woda. Pomiary pH, których wyniki przedstawia rysunek 6.8.2.6, świadczące o zakwaszaniu środowiska degradacyjnego sugerować mogą, iż większość z produktów degradacji ma charakter kwasowy, szczególnie w przypadku polimerów modyfikowanych niskocząsteczkowymi kwasami.



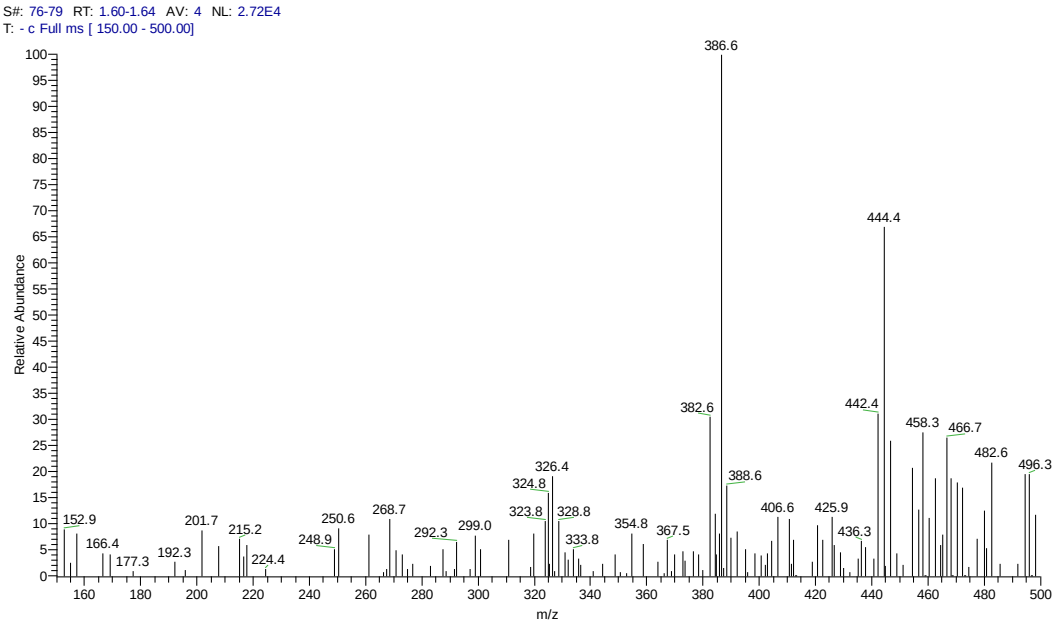
Rys.6.8.2.6 Zmiany pH roztworu degradacyjnego w zależności od modyfikatora(hydrofilowych nanocząstek lub niskocząsteczkowych kwasów karboksylowych)

Przeprowadzona wstępna analiza produktów degradacji układu niemodyfikowanego, a także zawierającego 0,2% wag. TiO_2, nie wykazała jednoznacznie obecności konkretnych produktów degradacji. Z budowy chemicznej otrzymanych układów polimerowych wynika, iż produktami degradacji powinny być pochodne dimeru kwasu linoleinowego i/ lub tereftalowego. Ponadto związki tych dwóch kwasów poszukiwane były w pierwszej kolejności ze względu na łatwość jonizacji wiązania karboksylowego. Jednakże, jak przedstawia to rys. 6.8.2.7a otrzymano widma, o nienajlepszym rozdzieleniu jonów m/z w całym analizowanym zakresie. Dodatkowe widma pozytywne w zakresie mas 100-500 nie pozwoliły jednoznacznie określić pochodnych kwasów tereftalowego – zaobserwowany został bardzo mały sygnał przy m/z 166, jednakże nie może być uznany za reprezentatywny. Nie bez znaczenia pozostaje fakt, iż w tej metodzie, identyfikacji podlegają głównie związki rozpuszczalne w wodzie, stąd też – mając na uwadze bardzo słabą rozpuszczalność poszczególnych monomerów (z wyjątkiem glikolu etylenowego) oraz ich pochodnych, detekcja związków tą metoda jest znacznie utrudniona.

a)



b)

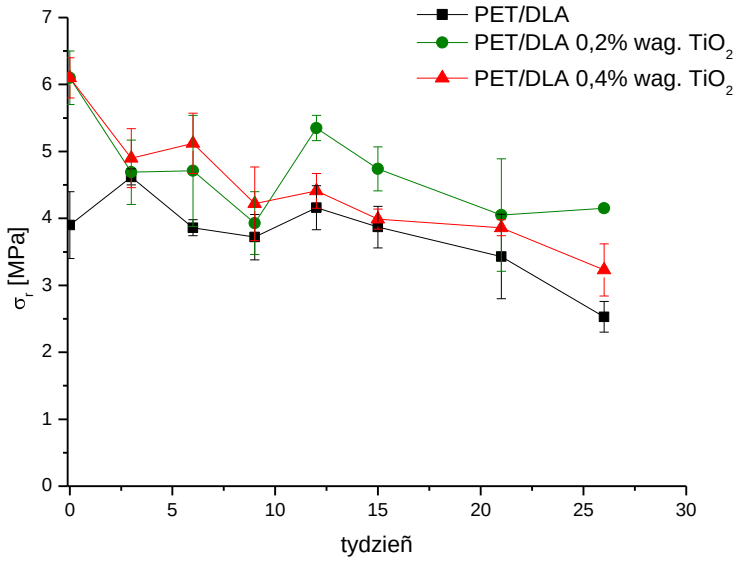


Rys. 6.8.2.7 Widma ESI-MS: a) widmo negatywne w całym analizowanym zakresie, b) widmo pozytywne w zakresie mas 100-500

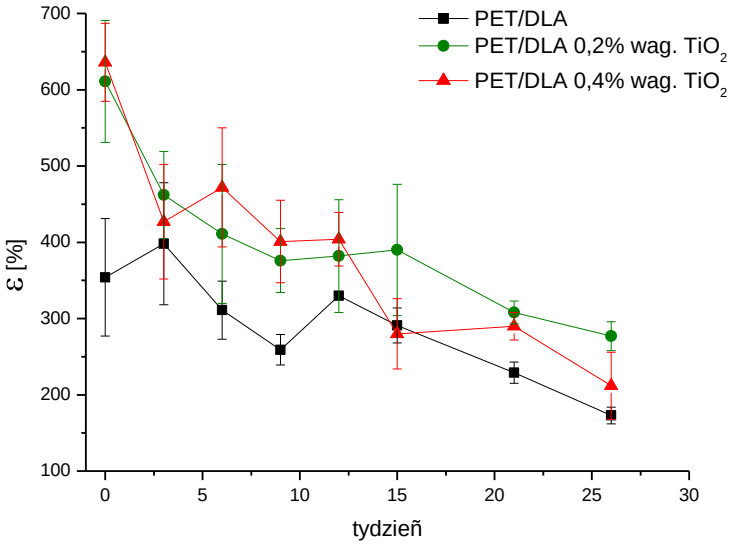
Zmiany właściwości mechanicznych

Zmiany właściwości mechanicznych obserwowane podczas degradacji hydrolitycznej, zależą głownie od składu chemicznego materiału poddanego temu procesowi. Jak już wcześniej wspomniano, dużo łatwiejszy dostęp wody – jako czynnika degradującego – występuje w obszarach amorficznych materiałów polimerowych, dlatego też odpowiedni dobór monomerów, jak i ich udziałów wagowych w przypadku kopolimerów stanowi dobre narzędzie kontroli podatności na degradacją, a tym samym zmian właściwości mechanicznych [139, 140]. Na rysunku 6.8.2.8 przedstawiono zmiany naprężenia oraz odkształcenia do zerwania, w miarę postępu degradacji hydrolitycznej. Na podstawie otrzymanych wykresów zaobserwować można, iż końcowa wartość naprężenia do zerwania (rys. 6.8.2.8 a) oraz odkształcenia do zerwania spada dla wszystkich materiałów o około 50%, przy czym najwyższą wartością ε charakteryzuje się układ zawierający 0,2 % wag. TiO_2. Wytłumaczenie tego typu zmian należy wiązać z omówionymi wcześniej zmianami temperatur, szczególnie w obszarze temperatur przejść szklistych (T_g). Obniżenie temperatury zeszklenia – jak poprzednio stwierdzono – świadczy o zwiększeniu ruchliwości makrocząsteczek, to z kolei jest wynikiem powstawania większej ilości rozgałęzionych (wolno „wiszących") łańcuchów, na skutek rozerwania wiązań estrowych w obszarach fazy amorficznej. W związku z tym, że nie zaobserwowano ubytków masy dla badanych materiałów, należy przyjąć, iż rozpad hydrolityczny jest bardzo powolny, a jeśli łańcuchy zostały rozerwane to są one „uwięzione" i unieruchomione przez nanonapełniacz.

a)



b)



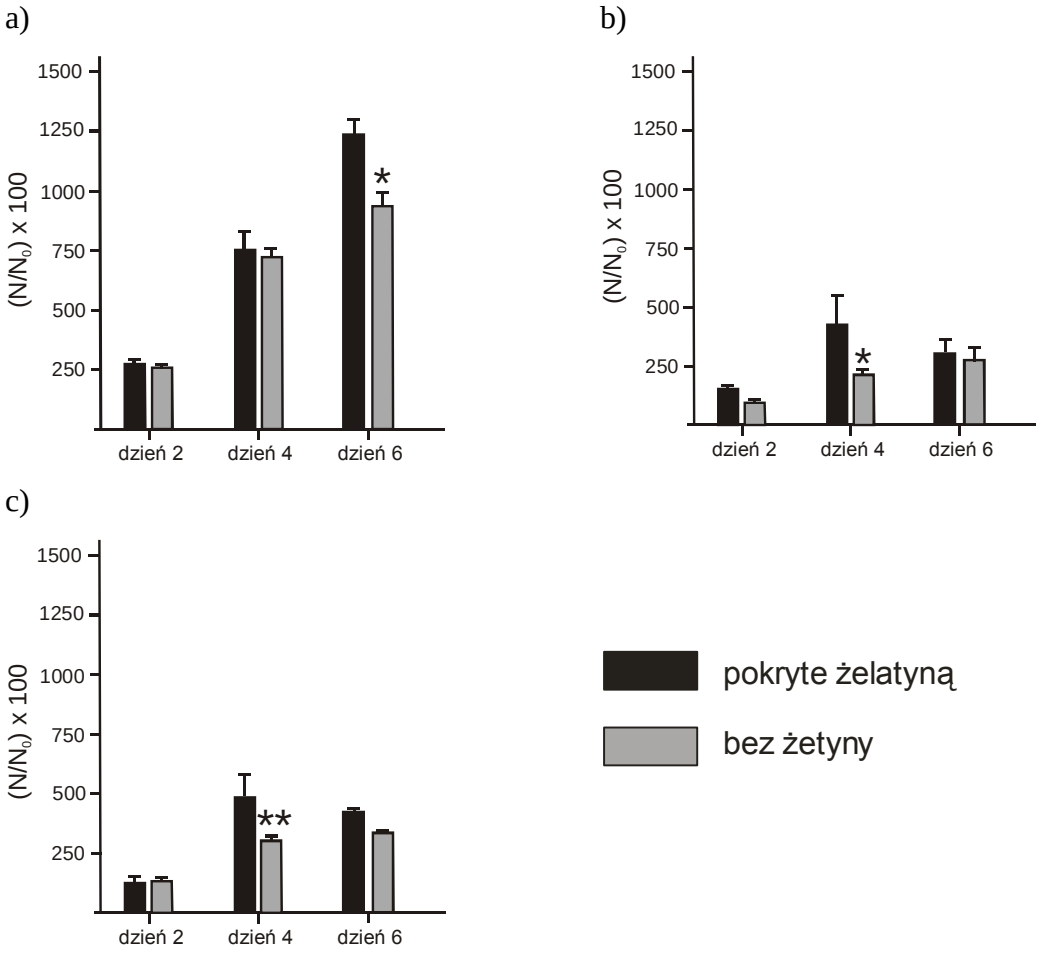
Rys. 6.8.2.8 Ocena właściwości mechanicznych materiałów poddanych długoterminowej degradacji: a) zmiany naprężenia do zerwania σ_r, b) zmiany odkształcenia przy zerwaniu, ε_r

6.9. Ocena biozgodności w testach komórkowych in vitro i in vivo

Jednym z ważniejszych celów pracy było zbadanie możliwości zastosowania nowych, nanostrukturalnych materiałów polimerowych zawierających nanokrystaliczny ditlenek tytanu do zastosowań biomedycznych, zwłaszcza w inżynierii tkanek miękkich. Dlatego też przeprowadzono kompleksową ocenę biozgodności na poziomie testów komórkowych *in vitro* oraz testów implantacyjnych (*in vivo*).

6.9.1 Testy biozgodności komórkowej in vitro

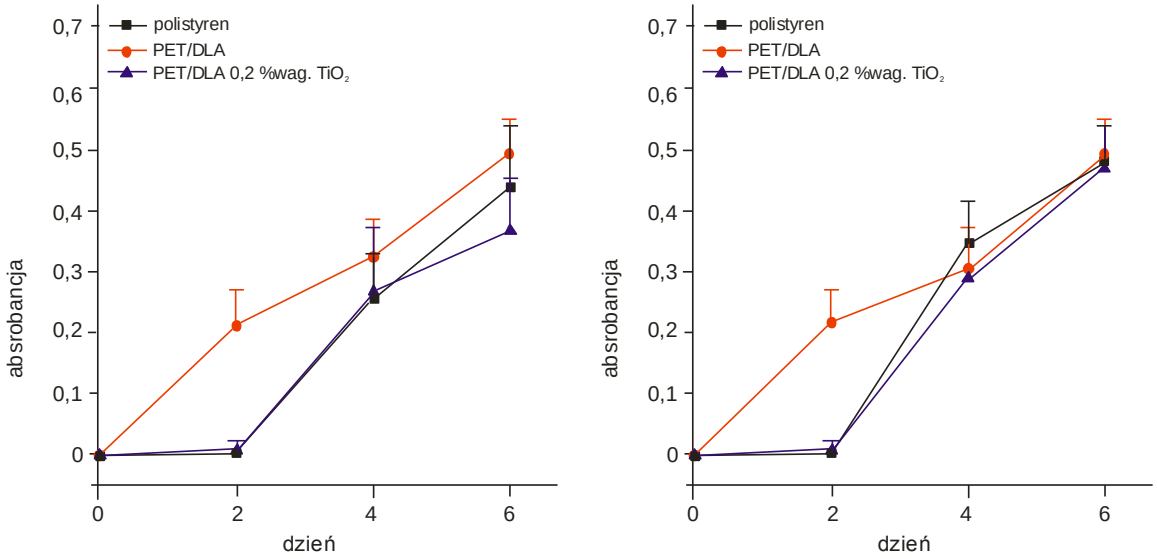
Testy przeprowadzone z udziałem mysich fibroblastów wykazały, iż zarówno kopolimer PET/DLA, jak i jego nanokompozyt zawierający 0,2 % wagowych TiO_2 sprzyjał namnażaniu mysich fibroblastów. Jak wynika z rysunku 6.9.1.1, zarówno na powierzchni kopolimeru PET/DLA, jak i nanokompozytu z osnową PET/DLA, zaobserwowano zwiększenie liczby komórek w stosunku do wartości początkowej. Jednakże należy zauważyć, iż statystycznie istotna ($p<0.05$) niższa liczba komórek została zliczona na powierzchni materiałów pokrytych żelatyną (sprzyjającą adhezji komórek), niż polistyrenu jako próby kontrolnej. Porównując proliferację komórek w obrębie badanych materiałów, nanokompozyt wykazuje lepsze właściwości jako podłoże dla wzrostu fibroblastów. Związane jest to z kilkoma czynnikami: w pierwszej kolejności ze sztywnością materiału. Obserwacje wcześniejszych badaczy wykazały, iż fibroblasty chętniej namnażają się na sztywniejszych materiałach [141, 142]. Biorąc pod uwagę wyniki badań mechanicznych przedstawione we wcześniejszym rozdziale (6.6) wprowadzenie nanokrystalicznego TiO_2 istotnie polepszyło wytrzymałość mechaniczną kopolimeru PET/DLA, a tym samym ich sztywność uległa poprawie. Podobnie wyniki mechaniczne po degradacji (rys. 6.8.2.8) wykazały większą stabilność nanokompozytów, poprzez mniejsze zmiany odkształcenia przy zerwaniu w porównaniu do kopolimeru PET/DLA.



*Rys. 6.9.1.1 Procentowy wzrost ilości komórek na powierzchni materiałów pokrytych żelatyną i bez żelatyny a) polistyren b) PET/DLA c) PET/DLA 0,2% wag. TiO_2. * $p<0.05$, ** $p<0.01$. $(N/N_0)x100$ procentowy wzrost ilości komórek: N- całkowita ilość komórek, N_0- wyjściowa liczba komórek*

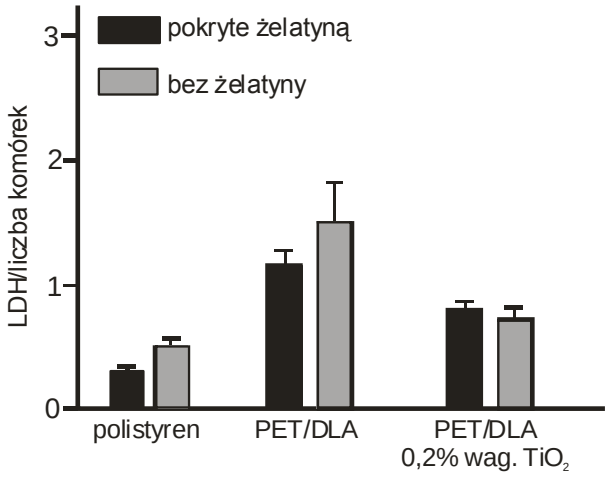
Wskaźnikiem śmiertelności komórek w przeprowadzonym eksperymencie był cytoplazmatyczny enzym – dehydrogenaza mleczanowa (LDH), która jest wydzielana do środowiska hodowli, w momencie utraty spójności błony komórkowej. Jak zaprezentowano na wykresie 6.9.1.2, uwalniana ilość LDH wzrastała przez cały okres eksperymentu. Nie zaobserwowano wpływu procesu pokrywania powierzchni żelatyną na śmiertelność komórek. Co najważniejsze, w przypadku kompozytu *nano*-TiO_2 nie wystąpił wzrost śmiertelności komórek, co świadczyć może o braku toksycznego wpływu nanocząstek znajdujących się w osnowie elastomeru termoplastycznego na przeżywalność i proliferację komórek.

a) b)



Rys. 6.9.1.2 Poziom uwalnianej LDH w kolejnych dniach eksperymentu z komórek osadzonych na: a) polimerach niepokrytych żelatyną, b) polimerach pokrytych żelatyną

W celu bardziej precyzyjnego określenia wpływu materiału na przeżywalność komórek, dokonano przeliczenia ilości uwolnionego LDH w stosunku do komórek znajdujących się na powierzchni w określonym dniu. Na podstawie tych obliczeń otrzymano wykres przedstawiony na rysunku 6.9.1.3. Pokazuje on, iż w obrębie testowanych materiałów nanokompozyt stanowi lepsze podłoże dla komórek fibroblastów, niż niemodyfikowany PET/DLA, przy czym obydwa materiały charakteryzują się wyższymi wartościami LDH w odniesieniu do polistyrenu.

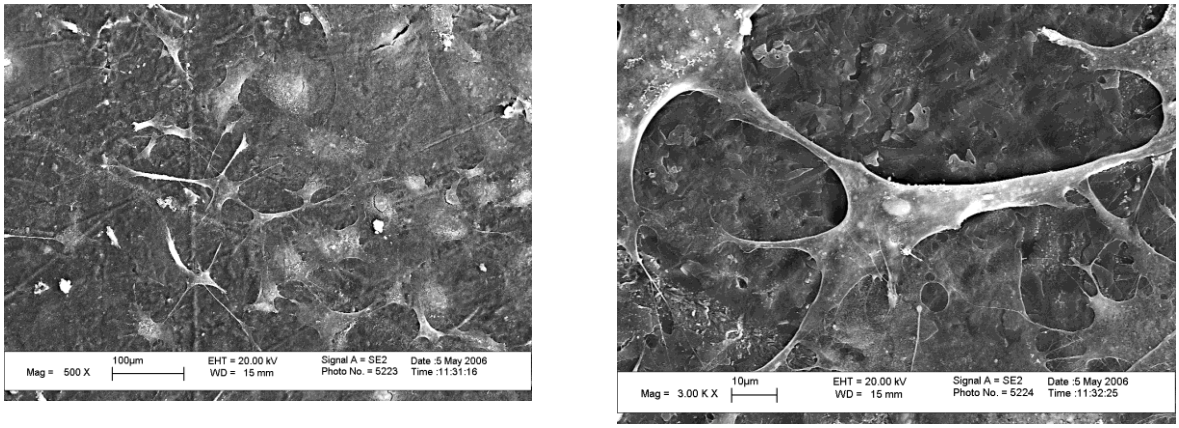


Rys. 6.9.1.3 Uwalnianie LDH przez komórki pomiędzy 4 a 6 dniem eksperymentu uwzględniające ilość komórek w dniu 4

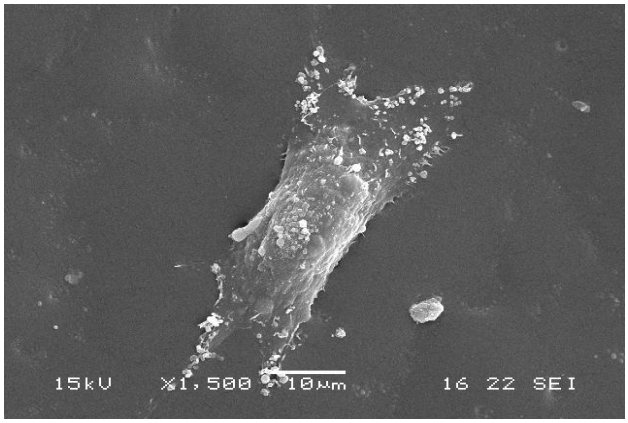
Kolejnym, istotnym czynnikiem wpływającym na adhezję i proliferację komórek jest powierzchnia biomateriału. Istotność morfologii powierzchni, a także jej nanostruktury/nanotopografii w odniesieniu do całkowitej ilości namnożonych komórek, syntezy białek, a także adhezji komórek mięśni gładkich omówiona była obszernie przez innych badaczy [143, 144].

Wpływ morfologii powierzchni na procesy adhezji, a także rozpłaszczania się komórek został doskonale zobrazowany w doświadczeniu przeprowadzonym z udziałem mysich oraz ludzkich embrionalnych komórek macierzystych. Na rysunkach 6.9.1.4-6.9.1.6 przedstawiono zdjęcia ze skaningowego mikroskopu elektronowego dla poszczególnych grup komórek.

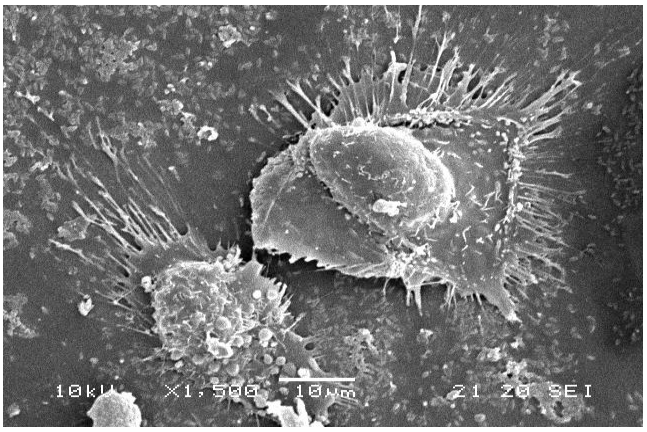
a) b)



Rys.6.9.1.4 Zdjęcia SEM mysich embrionalnych komórek macierzystych na podłożu PET/DLA pokrytym 0,1% roztworem żelatyny: a) powiększenie x 500, b) powiększenie x 3000

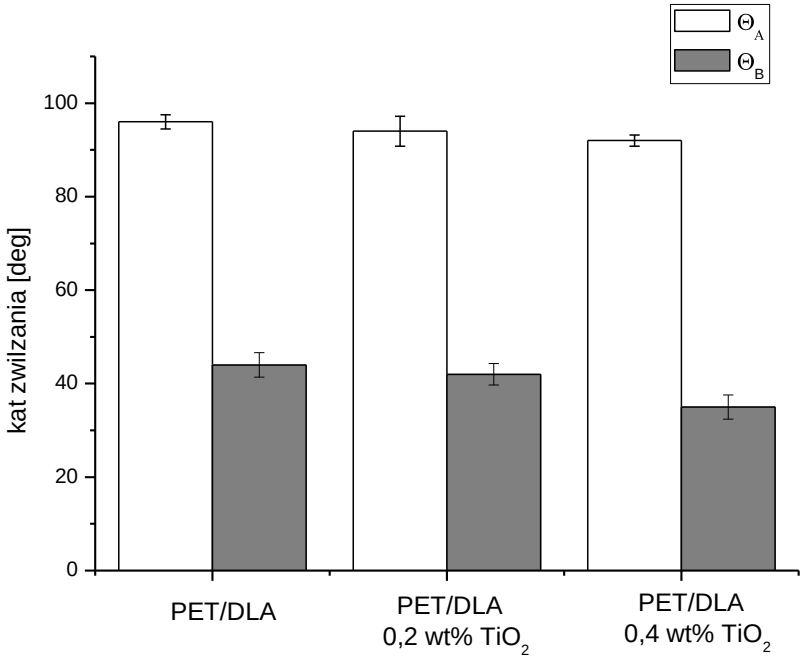


Rys.6.8.1.5 Zdjęcie SEM ludzkich embrionalnych komórek macierzystych na podłożu PET/DLA pokrytym 0,5% roztworem żelatyny



Rys. 6.9.1.6 Morfologia ludzkich embrionalnych komórek macierzystych na podłożu PET/DLA 0,2% wag. TiO_2 pokryty 0,5% roztworem żelatyny

Zarówno mysie jak i ludzkie embrionalne komórki macierzyste wykazywały adhezję i rozpłaszczały się na powierzchni testowanych materiałów, z tą uwagą iż hydrofobowy kopolimer PET/DLA wymagał wcześniej naniesienia co najmniej 0,1% roztworu żelatyny, Niemniej jednak widoczne są różnice pomiędzy materiałem nie zawierającym TiO_2, a tym modyfikowanym nanokrystalicznym tlenkiem tytanu. W drugim przypadku widoczne są lepiej wykształcone lamellipodia i filopodia, zwiększające powierzchnię kontaktu z nanokompozytem, a także pomiędzy komórkami. Jak już wcześniej wspomniano wynikać to może ze zwiększonej szorstkości powierzchni powodowanej obecnością sferolitów, a także z nieco większej hydrofilowości zaobserwowanej dla nanokompozytów. Zarówno metoda tensometryczna, jak i kroplowa potwierdziły obniżanie wartości kąta zwilżania wraz ze wzrostem zawartości hydrofilowego nanonapełniacza (rys. 6.9.1.7).



Rys. 6.9.1.7 Wartości kąta zwilżania otrzymane metoda tensometryczną: Θ_A*- kąt wstępujący,* Θ_B*- kąt zstępujący*

Innym czynnikiem powodującym zarówno większe namnożenie fibroblastów, jak i lepszą adhezję embrionalnych komórek macierzystych, jest bioaktywne działanie ditlenku tytanu, szczególnie w stosunku do komórek będących składnikami tkanki kostnej [145-147].

Otrzymane wyniki testów *in vitro* wykazały silny wpływ morfologii powierzchni na proliferację komórek, jednocześnie mniejsze uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej w przypadku materiału zawierającego *nano*-TiO_2 co świadczy o braku toksycznego działania tego materiału na komórki fibroblastów. Szczegółowe badania cytotoksyczności TiO_2 w kierunku oddziaływania na kardiomiocyty opisana została w pracy doktorskiej H. Jawad [148]. Wszystkie testy prowadzone były w wodnych roztworach TiO_2, otrzymanych w wyniku dyspergowania ultradźwiękami. Przeprowadzono analizy mające na celu określenie wielkości agregatów, szybkości sedymentacji nanocząstek w mediach do hodowli fibroblastów, ludzkich komórek embrionalnych, a także roztworu Krebsa-Henseleita (roztwór zawierający nieorganiczne sole o wysokiej sile jonowej). Wykazano, iż zwiększanie stężenia cząstek TiO_2 w roztworach do hodowli komórkowych nie powoduje statystycznie istotnego wzrostu ilości aglomeratów, prawdopodobnie przez

obecność albumin, stabilizujących siły jonowe roztworów. Dokonano również stosownych obliczeń, w których wykazano, iż w warunkach statycznej hodowli, przy wymianie medium hodowlanego, stężenie TiO_2 wynosi mniej niż 10 ppm, co biorąc pod uwagę wcześniej przedstawione wyniki dotyczące degradacji długoterminowej, pozwala stwierdzić, iż obecny w materiale TiO_2 będzie uwalniany stopniowo, a jego stężenie utrzymywać się będzie na bardzo niskim poziomie.

6.9.2 Testy biozgodności komórkowej in vivo

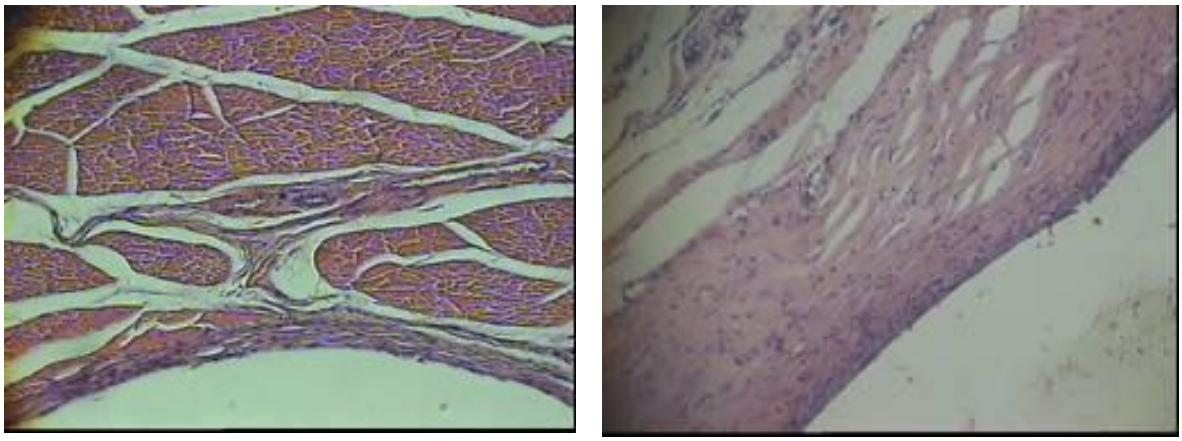
Jak opisano w pracy [149] badania *in vivo* materiałów zawierających *nano*- TiO_2 w osnowie materiału elastomerowego przeprowadzono w okresie 12 tygodni. Wszystkie zwierzęta poddane implantacji przetrwały okresu obserwacji (brak zmian w zachowaniu zwierząt, wyglądzie lub aktywności). Co ważniejsze nie zaobserwowano zmian tkanek miękkich wokół wszczepów. Rysunek 6.9.2.1 przedstawia otoczkę włóknistą powstałą od strony implantu o stosunkowo cienkich ściankach, nie zawierającą płynu. W ocenie jakościowej otoczka składała się głównie z fibroblastów, małej ilości histiocytów a także pojedynczych komórek olbrzymich, co świadczyć może o nieprzewlekłej, niespecyficznej reakcji zapalnej (podobną zmianę zaobserwowano w przypadku silikonowych implantów). Wykazywała ona grubość ok. 0,2 mm, widoczna była również jej kolagenizacja. Podobne obserwacje w zakresie grubości otoczki i jej składu opisano dla materiałów zawierających poli(tereftalan butylenu) jako segment sztywny, które to materiały testowane były pod kątem zastosowania jako tymczasowe protezy ścięgien [150]. Zmiany w budowie komórek były minimalne, bez cech wskazujących na martwicę związaną z kontaktem z materiałem polimerowym. Materiały zawierające TiO_2, jak również niemodyfikowany elastomer termoplastyczny, wykazały dobrą biozgodność, bez negatywnych skutków biologicznych. Ilościową charakterystykę składu otoczki łącznotkankowej wokół implantu przedstawiono w tabeli 6.9.2.1.

Tab.6.9.2.1 Skład otoczki łącznotkankowej wokół implantu

materiał	typ komórek					
	neutrofile	Eozynofile	makrofagi/ histiocyty	limfocyty	fibroblasty	kolagen
PET/DLA	brak	-	+	+ +	+ + +	+ + +
PET/DLA 0,2% wag. TiO_2	brak	brak	+	+ +	+ + +	+ + +

Legenda: (-)- pojedyncze komórki; (+)- niewielki udział; (+ +)- umiarkowany udział; (+ + +)- wysoki udział

a) b)

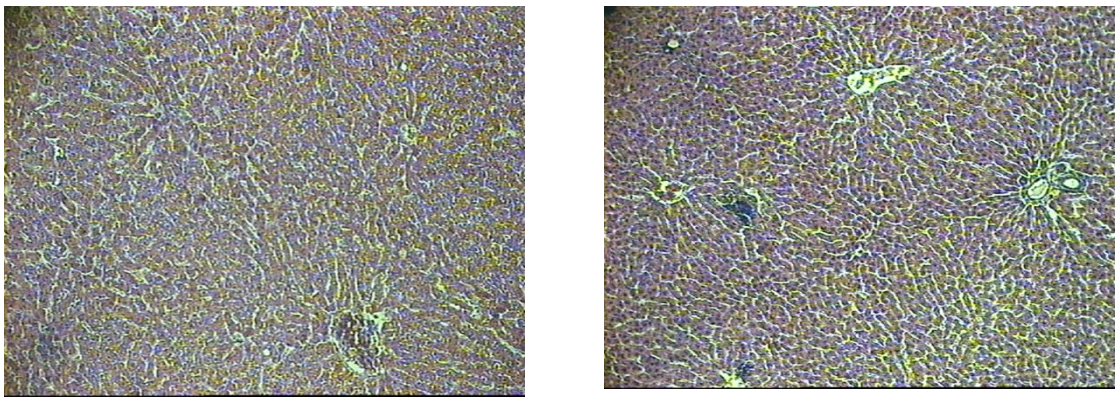


Rys.6.9.2.1 Zdjęcia pokazujące wycinki tkanki mięśniowej wokół implantu: a) PET/DLA 0,2% wag. TiO_2, b) komercyjny silikon jakości medycznej

Zbadano również wpływ nanostrukturalnych materiałów na morfologię hepatocytów w wątrobie szczura, które to badanie pozwala pośrednio ocenić toksyczność materiału polimerowego [151, 152]. U wszystkich zwierząt, zaobserwowano typową strukturę zrazikowy żył centralnych, naczyń zasilających oraz kanalików żółciowych (rys. 6.8.9.2). Występowały również nieliczne nacieki miąższu, składające się głównie z limfocytów i neutrofilów a także eozynofilów wokół żył centralnych i drobnych żył pokarmowych. Najważniejsze, że nie zaobserwowano martwicy komórek hepatocytów i zachowały one prawidłową strukturę zrazikową, tak w przypadku polimeru zawierającego TiO_2, jak i elastomeru silikonowego o medycznej jakości. (rys. 6.8.9.2 b).

Jądra komórek wątroby nie wykazały żadnych oznak nieprawidłowej budowy histologicznej. Brak oddziaływania elastomeru zawierającego TiO_2 na tkanki i strukturę wątroby sugeruje dobrą biozgodność materiału i wskazuje na duży potencjał tego materiału w zastosowaniu dla inżynierii tkanek miękkich.

a) b)



Rys.6.9.2.3 Struktura wątroby szczurów po implantacji: a) nnaokompozytu PET/DLA 0,2 % wag. TiO_2, b) komercyjnego silikonu o jakości medycznej

6.10 Możliwości zastosowania nanostrukturalnych materiałów w inżynierii tkanek miękkich

W celu sprawdzenia przydatności nowych materiałów w technikach medycznych, a zwłaszcza w inżynierii tkankowej mięśnia sercowego, przeprowadzony został w National Heart & Lung Institute w Londynie, UK, eksperyment *ex-vivo* [147] z udziałem materiałów nanostrukturalnych opracowanych w ramach niniejszej rozprawy. Biorąc pod uwagę uzyskane właściwości wytrzymałości mechanicznej (zarówno przed jak i po procesie degradacji) materiału zawierającego 0,2% wag. nanonapełniacza zaproponowano wykorzystanie tego materiału jako łatki nasercowej, która miałaby spełniać rolę nie tylko podłoża dla wzrostu i różnicowania się embrionalnych komórek macierzystych do dojrzałych kardiomiocytów, lecz również mechanicznego wzmocnienia blizny po zawale serca. Przeprowadzony eksperyment polegał na przyszyciu łatek polimerowych do wyizolowanego szczurzego serca, poddawanego perfuzji w układzie Langendorffa [147]. Ponieważ w doświadczeniu wykorzystano zdrowe narządy, badano jedynie wpływ

nanokompozytu na żywy mięsień sercowy, bez analizy jego działania terapeutycznego. Z testu tego wyciągnięto następujące wnioski: (1) materiał zawierający ditlenek tytanu nie zaburzył kurczliwej pracy serca, (2) dodatek nanonapełniczna poprawił poręczność chirurgiczną materiału - umożliwiając prawidłowe przyszycie łatki nasercowej bez jej uszkodzenia, co miało miejsce w przypadku kopolimeru PET/DLA niezawierającego TiO_2. Wyniki te mogą stanowić podstawę do stwierdzenia, że nanostrukturalny materiał polimerowy opracowany w niniejszej pracy jest niezwykle obiecujący dla inżynierii tkanek mięśnia sercowego.

7. Wnioski

Podsumowując przedstawione wyniki należy stwierdzić, że otrzymano nowe multiblokowe kopoli(estro-estry) w procesie transestryfikacji i polikondensacji w stopie. Wprowadzenie do ich struktury nanokrystalicznego ditlenku tytanu wpłynęło istotnie na większość właściwości fizyko-chemicznych, zwiększając wartość granicznej liczby lepkościowej oraz temperatury topnienia. Przeprowadzono również próby modyfikacji wyjściowego układu PET/DLA niskocząsteczkowymi hydroksydikwasami, w celu polepszenia kontroli nad procesami degradacji hydrolitycznej.

Określono strukturę chemiczną nowych układów potwierdzając założony wcześniej schemat budowy chemicznej kopolimerów multiblokowych oraz zawartość segmentów sztywnych. Badania DSC i DMTA potwierdziły strukturę fazową charakterystyczną dla elastomerów termoplastycznych. Analiza DSC pozwoliła również stwierdzić, iż obecność nanonapełniacza zaburza procesy krystalizacji segmentów sztywnych, co przejawiało się obniżeniem entalpii topnienia oraz zawartości fazy krystalicznej w kopolimerach modyfikowanych nano- TiO_2.

Testy statycznego rozciągania potwierdziły występowanie zjawiska nanowzmocnienia w wyniku dodatku 0,2 oraz 0,4 % wagowych TiO_2, zarówno przed jak i po teście długotrwałej degradacji hydrolitycznej. Tym samym potwierdziły działanie stabilizujące nanonapełniacza dla elastomerów termoplastycznych, jako osnów nanokompozytów.

Zastosowane techniki elektronowej mikroskopii skaningowej i transmisyjnej pozwoliły ocenić morfologię próbek otrzymanych metodą stopową, a także rozmieszczenie nano-TiO_2 w osnowie kopolimeru. Znaczne zwiększenie parametru chropowatości powierzchni, *rms*, dla nanokompozytów okazało się być szczególnie ważnym parametrem w testach biozgodności *in vitro*.

Przeprowadzone badania degradacji krótko- oraz długoterminowej wykazały stabilizujące działanie ditlenku tytanu w osnowie elastomeru termoplastycznego, poprzez specyficzne oddziaływanie na zmiany zachodzące w fazie amorficznej segmentów giętkich, co stwierdzono na podstawie wyników DSC. Dodatek niskocząsteczkowych hydroksykwasów, spowodował większą podatność materiałów na degradację hydrolityczną, zakwaszając tym samym środowisko (obniżając pH roztworu degradacyjnego) w sposób podobny do komercyjnie dostępnych poli(α-estrów).

Wpływ środowiska degradacji długoterminowej (PBS) na zmiany właściwości mechanicznych wskazuje na stopniową i powolną degradację, podczas której zarówno naprężenie do zerwania, jak i odkształcenia spada o ok. 50%.

Do ważniejszych wyników poznawczych pracy należy otrzymanie nowych biozgodnych materiałów polimerowych, z których zwłaszcza materiały zawierające nanometryczny ditlenek tytanu charakteryzują się doskonałą biozgodnością *in vitro* i *in vivo*. Właściwości mechaniczne, które ulegają znaczącej poprawie wytrzymałości odpowiadają, a nawet są lepsze od właściwości tkanek miękkich, w tym mięśnia sercowego, co pozwoliło na zaplanowanie oraz przeprowadzenie testów na modelu zwierzęcym, gdzie wykazano możliwość wykorzystania otrzymanych materiałów w inżynierii tkankowej mięśnia sercowego. Wprowadzenie nano-TiO_2 do osnowy z elastomeru termoplastycznego stanowiło doskonały rodzaj modyfikacji fizycznej, istotnie wpływającej nie tylko polepszoną biozgodność komórkową oraz tkankową, ale również na stabilność mechaniczną poprawiającą m.in. poręczność chirurgiczną.

8. Spis literaturowy

[1] Roach P., Eglin D., Rohde K., Perry C.C., Modern biomaterials: a review—bulk properties and implications of surface modifications, *J Mater Sci: Mater Med* 2007, vol. 18, pp.1263–1277

[2] Boyan B.D., Hummert T.W., Dean D.D., Schwartz Z., Role of materials surface in regulating bone and cartilage cells response, *Biomaterials* 1996, vol. 17, pp. 137-146

[3] Anselme K., Osteoblast adhesion on biomaterials, *Biomaterials* 2000, vol. 21, pp. 667-681

[4] Ma P.X., Biomimetic materials for tissue engineering, *Adv. Drug Delivery Rev*. 2008, vol. 60, pp. 184-198

[5] Moroni L., Elisseeff J.H., *Materials Today* 2008, vol. 11, pp.44- 51

[6] Khademhosseini A., Vacanti J.P., Langer R., *Świat Nauki* 2009, vol. 6, pp. 44-51

[7] Rosłaniec Z., Układy polimerowe o właściwościach elastotermoplastycznych, Prace Naukowe Politechniki Szczecińskiej, Szczecin 1993

[8] El Fray M., Słonecki J., Multiblock copolymers consisting of polyester and polyaliphatic block *Angew Macromol Chem*, 1996, vol. 243, pp. 103-117

[8] El Fray M. Wpływ budowy segmentów giętkich na wybrane właściwości segmentowych kopolimerów blokowych, Praca Doktorska, Politechnika Szczecińska, Szczecin 1996

[10] Cao, X., Faust, R., Polyisobutylene-based thermoplastic elastomers. 5. Poly(styrene-b-isobutylene-b-styrene) triblock copolymers by coupling of living poly(styrene-b-isobutylene) diblock copolymers, *Macromolecules*, 1999, vol. 32, pp. 5487-5494

[11] Hsiue, Ging-Ho, Chen, Der-Jang, Liew, Yeong-Kang, Stress relaxation and the domain structure of thermoplastic elastomer, *J Appl Polym Sci*, 1988, vol. 35, pp. 995-1002

[12] Fetters, L.J., Firer, E.M., Dafauti, M., Synthesis and properties of block copolymers. 4. Poly(p-tert-butylstyrene-diene-p-tert-butylstyrene) and poly (p-tert-butylstyrene-isoprene-styrene), Macromolecules, 1977, vol. 10, pp. 1200-1207

[13] Abouzahr, S., Wilkes, G.L., Ophir, Z., Structure-property behaviour of segmented polyether-MDI-butanediol based urethanes: effect of composition ratio, *Polymer*, 1982, vol. 23, pp. 1077-1086

[14] Kim, H.D., Huh, J.E.H.O., Kim, E.Y., Park, C.C., Comparison of properties of thermoplastic polyurethane elastomers with two different soft segments, J Appl Polym Sci, 1998, vol. 69, pp. 1349-1355

[15] Słonecki J. Wpływ długości łańcucha i udziału oligo(oksyetylenowych) segmentów giętkich na niektóre właściwości kopoli(estro-eterów). Cz. I Właściwości termiczne i morfologia, *Polimery*,1995, vol. 40, pp. 572–579

[16] Rosłaniec Z., Pękala S. Wojcikiewicz H. Termoplastyczne elastomery estrowo-eterowo-siliksanowe Prace Naukowe Politechniki Szczecińskiej, 1991, nr 443, pp. 17-51

[17] Lee H. S., Park H. D., Cho C. K. Domain and segment orientation behavior of PBS–PTMG segmented block copolymers, *J Appl Polym Sci*, 2000, vol. 77, pp. 699–709

[18] Cho S., Jang Y., Kim D., Lee T., Lee D., Lee Y., High Molecular Weight Thermoplastic Polyether Ester Elastomer by Reactive Extrusion, *Polym Eng Sci*, 2009, vol. 49, pp. 1456- 1460

[19] Słonecki J., Wpływ udziału masowego i ciężaru cząsteczkowego segmentów na warunki otrzymywania, budowę i właściwości termoplastycznych kopoliestroeterów (KPEE), Cz. I Synteza i fizykochemiczna charakterystyka KPEE różniących się udziałem masowym i ciężarem cząsteczkowym segmentów, *Polimery-tworzywa wielkocząsteczkowe*, 1991, vol. 6, pp. 225-229

[20] Deschamps A.A., Grijpma D.W., Feijen J., Poly(ethylene oxide)/poly(butylene terephthalate) segmentem Block copolymers: the effect of copolymer composition on physical properties and degradation behavior, *Polymer*, 2001, vol. 42, pp. 9335-9345

[21] Fakirov S., Gogeva T., Poly(ether / ester)s based on poly(butylene terephthalate) and poly(ethylene glycol). 1. Poly(ether / ester)s with various polyester-polyether ratios, Die Makromolekulare Chemie, 1990, vol. 191, pp. 603–614

[22] Ukielski R., Wojcikiewicz H., Otrzymywanie termoplastycznych elastomerów kopoli(estroeterowych), *Polimery- tworzywa wielkocząsteczkowe*, 1978, vol., pp. 48- 51

[23] DSM N.V., Bonte G., Gijsman P., Light-stable copolyether ester composition, WO/2000/024820, 04.05.2000

[24] Deschamps A., Claase M.B., Sleijster W.J., Bruijn J.D., Grijpma D.W., Feijen J. Design of segmentes poly(ether ester) materials and structures for tissue engineering of bone, J Controlled Release, 2002, vol. 78, pp. 175-186

[25] Deschamps A.A., van Apeldoorn A.A., Hayen H., Brujin J.D., Korst U., Grijpma D.W., Feijen J., In vivo and in vitro degradation of poly(ether ester) Block copolymers based on poly(ethylene glycol) and poly(botylnene terephthalate), Biomaterials, 2004, vol. 25, pp. 247-258

[26] Słonecki J., Wpływ udziału masowego i ciężaru cząsteczkowego segmentów na warunki otrzymywania, budowę i właściwości termoplastycznych kopoliestroeterów (KPEE), Cz. II Wpływ budowy na właściwości termiczne i relaksacyjne, *Polimery- tworzywa wielkocząsteczkowe*, 1991, vol. 6, pp. 422-427

[27] Saint-Loup R., Robin J.-J., Boutevin B., Synthesis of Poly(ethylene terephthalate)-block-Poly(tetramethylene oxide) Copolymer by Direct Polyesterification of Reactive Oligomers, *Macromol Chem Phys*, 2003, vol. 204, pp. 970- 982

[28] Wang M., Zhang L., Ma D., Degree of microphase separation in segmented copolymers based on poly(ethylene oxide) and poly(ethylene terephthalate), *Eur Polym J*, 1999, vol. 35, pp. 1335-1343

[29] Li W., Kong X., Zhou E., Ma D., Isothermal crystallization kinetics of poly(ethylene terephthalate)–poly(ethylene oxide) segmented copolymer with two crystallizing blocks, Polymer, 2005, vol. 46, pp. 11655–11663

[30] Fakirov S., Gogeva T., Poly(ether/ester)s based on poly(butylene terephthalate) and poly(ethylene glycol), 2. Effect of polyether segment length, Die Makromolekulare Chemie, 1990, vol 191, pp. 615- 624

[31] Manuel H.J., Gaymans R.J., Segmented block copolymers based on dimerized fatty acids and poly(butylene terephthalate), Polymers, 1993, vol. 34, pp. 636-641

[32] El Fray M., Alstädt V., Fatigue behaviour of multiblock thermoplastic elastomers. 1. Stepwise increasing load testing of poly(aliphatic/aromatic-ester) copolymers, Polymer, 2003, vol. 44, pp. 4635–4642

[33] El Fray M., Slonecki J., Prowans P., Elastomer na czasową protezę ścięgna i metoda jego otrzymywania. Patent RP 329 794 (2004)

[34] Prowans P., El Fray M., Jursa J., Study on degradation and systemic toxicity of multiblock poly(aliphatic/aromatic-ester) copolymers, Polimery, 2005, vol. 50, pp. 45-52

[35] Prowans P. El Fray M., Słonecki J., Biocompatibility studies of new multiblock poly(ester–ester)s composed of poly(butylene terephthalate) and dimerized fatty acid, *Biomaterials*, 2002, vol. 23, pp. 2973–2978

[36] Fakirov S., Handbook of Condensation Thermoplastic Elastomers, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005, pp. 473- 488

[37] Kim S.H., Park S.H., Kim S.Ch., Novel clay treatment and preparation of Poly(ethylene terephthalate)/clay nanocomposite by In-situ polymerization, *Polym Bull*, 2005, vol. 53, pp. 285–292

[38] Chang J.H., Uk An Y., Ryu S.Ch., Giannelis E.P., Synthesis of Poly(buty1ene terephthalate) Nanocomposite by In situ Interlayer Polymerization and Characterization of Its Fiber, *Polym Bull*, 2003, vol. 51, pp. 69-75

[39] Lachman N, Wagner H.D., Correlation between interfacial molecular structure and mechanics in CNT/epoxy nanocomposites, Composites: Part A, 2010, doi:10.1016/j.compositesa.2009.08.023

[40] Hernández J.J., García-Gutiérrez M.C., A. Nogales A., Rueda D.R., Kwiatkowska M., Szymczyk A., Roslaniec Z., Concheso A., Guinea I., Ezquerra T.A., Influence of preparation procedure on the conductivity and transparenty of SWCNT-polymer nanocomposites, *Comp Sci Tech*, 2009, vol. 69, pp.1867-1872

[41] Roslaniec Z., Broza G., Schulte K., *Composite Interfaces* 2003, vol.10, pp. 95-102

[42] Herna´ndez J.J., Garcı´a-Gutie´rrez M.C., Nogales A., Rueda D.D., Sanz A., Sics I., Hsiao B.S., Rosłaniec Z., Broza G., Ezquerra Z., Deformation behaviour during cold drawing of nanocomposites based on single wall carbon nanotubes and poly(ether ester) copolymers, *Polymer*, 2007, vol. 48, pp. 3286- 3293

[43] Aso O., Eguiaza´bal J.I., Naza´bal J., The influence of surface modification on the structure and properties of a nanosilica filled thermoplastic elastomer, *Comp Sci Tech*, 2007, vol. 67, pp. 2854-2863

[44] Vacanti Ch.A., History of Tissue Engineering and A Glimpse Into Its Future, *Tissue Eng*, 2006, vol. 12, pp. 1137- 1142

[45] Williams D.F., On the nature of biomaterials, Biomaterials, 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.07.027

[46] Yang S., Leong K.F., Du Z., Chua C., The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors, *Tissue Eng*, 2001, vol.7, pp.679- 689

[47] Yang S., Leong K., Du Z., Chua C., The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part II. Rapid Prototyping Techniques, Tissue Eng, 2002, vol. 8, pp.1- 11

[48] Hutmacher D.W., Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, *Biomaterials*, 2000, vol. 21, pp. 2529- 2543

[49] Woodfield T.B.F., Malda J., Wijn J., Peters F., Riesle., Blitterswijk C.A., Design of porous scaffolds for cartilage tissue engineering using a three-dimensional fiber-deposition technique, *Biomaterials*, 2004, vol. 25, 4149-4161

[50] Rezwan K., Chen Q.Z., Blakier J.J., Boccaccini A.R., Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 2006, vol. 27, pp. 3413-3431

[51] Domb A.J., Kost J., Wiseman D.M., Handbook of Biodegradable Polymers, CRC Press, 1997

[52] Fu K., Pack D.W., Klibanov A.M., Langer R., Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres, *Pharm Res*, 2000, vol. 17, pp. 100-106

[53] Sudesh, K.; Abe, H.; Doi, Y., Synthesis, structure and properties of polyhydroxy- alkanoates: biological polyesters, *Prog. Polym. Sci.*, 2000, vol. 25, pp. 1503-1555

[54] Chen G.Q., Wu Q., The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials, *Biomaterials*, 2005, vol. 26, pp. 6565- 6578

[55] Somleva M.N., Snell K. D., Beaulieu J.J., Peoples O.P., Garrison B.R., Patterson N.A., Production of polyhydroxybutyrate in switchgrass, a value-added co-product in an important lignocellulosic biomass crop**,** Plant Biotech J, 2008, vol. 6, pp. 663-678

[56] Bezemer J.M., Grijpma D.W., Dijkstra P.J., van Blitterswijk C.A., Feijen J., A controlled release system for proteins based on poly(ether ester) block-copolymer: polymer network characterization, *J Contr Real*, 1999, vol. 62, pp. 393-405

[57] Du C., Meijer G.J., van de Valk C., Haan R.E., Bezemer J.M., Hesseling S.C., Cui F.Z., de Groot K., Layrolle P., Bone Growth in biomimetic apatite coated porous Polyactive® 1000PEGT70PBT30 implants, *Biomaterials*, 2002, vol. 23, pp. 4649-4656

[58] Pandey J.K, Reddy K.R., Kumar A.P., Singh R.P., An overview on the degradability of polymer nanocomposites, *Polym Degr Stabil* 2005, vol. 88, pp. 234- 250

[59] Simmons A., Hyvarinen J., Poole_warren L., The effect of sterilisation on a poly(dimethylsiloxane)/ poly(hexamethylene oxide) mixed macrodiol-based polyurethane elastomer, *Biomaterials*, 2006, vol. 27, pp. 4484-4497

[60] Goepferich A., Mechanism of polymer degradation and erosion, *Biomaterials*, 1996, vol. 17, pp. 103-114

[61] Tokiwa Y., Calabia B.P., Biodegradability and Biodegradation of Polyesters *J Polym Environ*, 2007, vol. 15, pp. 259-267

[62] Abe H., Matsubara I., Doi Y., Physical Properties and Enzymatic Degradability of Polymer Blends of Bacterial Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] and Poly[(R,S)-3-hydroxybutyrate] Stereoisomers, *Macromolecules*, 1995, vol. 28, pp. 844- 853

[63] Mergaert J., Ruffieux K., Bourban Ch., Stroms V., Wagemans W., Wintermantel E., Swings J., *In Vitro* Biodegradation of Polyester-Based plastic Materials by Selected Bacterial Cultures, *J Polym Environ*, 2000, vol. 8, pp. 17- 27

[64] Numata K., Srivastava R.K., Finne- Winstrand A., Albertsson A.-Ch., Doi Y., Abe H., Branched Poly(lactide) Synthesized by Enzymatic Polymerization: Effects of Molecular Branches and Stereochemistry on Enzymatic Degradation and Alkaline Hydrolysis, *Biomacromolecules*, 2007, vol. 8, pp. 3115- 3125

[65] Quynh T.M., Mitomo H., Nagasawa N., Wada Y., Yoshii F., Tamada M., *Eur Polym J*, 2007, vol. 43, pp. 1779-1785

[66] Pepic D., Zagar E., Zigon M., Krzan A., Kunaver M., Djonlagic J., *Eur Polym J*, 2008, vol. 44, pp. 904-917

[67] Okajima S., Kondo R., Toshima K., Matsumura S., Lipase-Catalyzed Transformation of Poly(butylenes adipate) and Poly(butylene succinate) into Repolymerizable Cyclic Oligomers, *Biomacromolecules*, 2003, vol. 4, pp. 1514-1519

[68] Nikolic M.S., Djonlagic J., Synthesis and characterization of biodegradable poly(butylene succinate-co-butylene adipate)s, *Polym Degrad Stab*, 2001, vol. 74, pp. 263-270

[69] Paszun D., Spychaj T., Chemical Recykling of Poly(ethylene terephthalate), *Ind Eng Chem*, 1997, vol. 36, pp. 1373-1383

[70] Piegat A., El Fray M., Poly(ethylene terephthalate) modification with the monomer from renewable Resources, *Polimery*, 2007, vol. 52, pp. 885-888

[71] Hae-Won K., Knowles J.C., Hyoun- Ee K., Hydroxyapatite/poly(*e*-caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery, *Biomaterials*, 2004, vol. 25, pp. 1279- 1287

[72] Yang F., Cui W., Xiong Z., Liu L., Bei J., Wang S., Poly(l,l-lactide-*co*-glycolide)/tricalcium phosphate composite scaffold and its various changes during degradation in vitro, *Polym Degrad Stab*, 2006, 91, 3065-3073

[73] Day R.M., Maquet V., Boccaccini A.R., Jerome R., Forbes A., *In vitro* and *in vivo* analysis of macroporous biodegradable poly(D,L-lactide-*co*-glycolide) scaffolds containing bioactive glass, *J Biomed Mater Res*, 2005, vol. 75A, 778- 787

[74] Zhao L., Chang J., Zhai W., Preparation and HL-7702 cell functionality of titania/chitosan composite scaffolds, *J Mater Sci: Mater Med*, 2009, vol. 20, pp. 949- 957

[75] Agrawal C.M., Athanasiou K.A., Technique to control pH in vicinity of biodegrading PLA-PGA implants, *J Biomed Mater Res*, 1997, 38, 105- 114

[76] Venugopal J.R., Low S., Choon A.T., Kumar A.B., Ramakrishna S., Nanobioengineered Electrospun Composite Nanofibers and Osteoblasts for Bone Regeneration, *Artif Organs* 2008, vol. 32, pp. 388- 397

[77] Fujishima A., Rao T.N., Tryk D.A., Titanium dioxide photocatalysis, *J Photochem Photobiol, C* 2000, vol. 1, pp. 1-21

[78] Chen X.D., Wang Z., Liao Z.F., Mai Y.L., Zhang M.Q., Roles of anatase and rutile TiO_2 nanoparticles in photooxidation of polyurethane, *Polym Test* 2007, vol. 26, pp. 202- 208

[79] Zubek- Głowczyk J., Gabrylewicz A., Wiadomości PTK, 2001, vol. 3/4, pp. 54-59

[80] Kociołek- Balawejder E., Szymczyk M., Ditlenek tytanu jako pigment i fotokatalizator, 2007, vol. 12, pp. 1179-1188

[81] Peters K., Unger R.E., Kirkpatrick C.K., Gatti A.M., Monari E., Effects of Nano-scaled particles on endothelial cell function in vitro: Studies on viability, proliferation and inflammation, *J Mater Sci, Mater Med*, 2004, vol. 15, pp. 321- 325

[82] Donaldson K., Beswick P.H., Gilmour P.S., Free radical activity associated with the surface particles: a unifaying factor in determining biological activity?, *Toxicol Lett*, 1996, vol. 88, pp. 293- 298

[83] Ma L., Liu J., Li N., Wang J., Duan Y., Yan J., Liu H., Wang H., Hong F., Oxidative stress in the brain of mice caused by translocated nanoparticulate TiO2 delivered to the abdominal cavity, *Biomaterials*, 2010, vol. 31, pp. 99-105

[84] Webster T.J., Siegel R.W., Bizios R., Osteoblast adhesion on nanophase ceramics, *Biomaterials*, 1999, vol. 20, pp. 1221-1227

[85] Zhang X., Su H., Zhao Y., Tan T., Antimicrobial activities of hydrophilic polyurethane/titanium dioxide complex film under visible light irradiation, *J Photochem Photobiol A*, 2008, vol. 199, pp. 123-129

[86] Kubacka A. Ferrer M., Cerrada M.L., Serrano C., Sanchez-Chevez M., Fernandez-Martin F., Fernandez-Garcia M., Boosting TiO2-anatase antimicrobial activity: Polymer-oxide thin films, *Appl Catal, B*, 2009, vol. 89, pp. 441-447

[87] Beaglehole R., Irwin A., Prentice T., The World Health Report 2004 - Changing History, World Health Organization.2004, pp.120-124

[88] Chen Q.-Z., Harding S.E., Ali N.N., Lyon A.R., Boccaccini A.R., Biomaterials in cardiac tissue engineering:Ten years of research survey, *Mater Sci Eng* 2008, vol. R 59, pp. 1-37

[89] Leor J., Amsalem Y., Cohen S., Cells, scaffolds and molecules for myocardial tissue engineering, *Pharmacol& Therap*, 2005, vol. 105, pp. 151-163

[90] Klug M.G., Soonpaa M.H., Koh G.Y., Field L.J., Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts, *J Clin Invest*, 1996, vol. 98, pp. 216-224

[91] Chiu R.C., Zibaitis A., Kao R.L., Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation, *Ann Thorac Surg*, 1995, vol. 60, pp. 12-18

[92] Li R.K., Yau T.M., Weisel R.D., Mickle D.A.G., Sakai T., Choi A., Jia. Z.Q., Construction of bioengineered cardiac graft, *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2000, vol. 119, pp. 368-375

[93] Wu X., Rabkin-Aikawa E., Guleserian K.J., Perry T.E., Masuda Y., Sutherland F.W.H., Schoen F.J., Mayer J.E., Bischoff J., Tissue-engineered microvessels on three-dimensional biodegradable scaffolds using human endothelial progenitor cells, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, vol. 287, pp. H480-H 487

[94] Menasche P., Hagege A.A., Scorsin M., Pouzet B., Desnos M., Duboc D., Schwartz K., Vilquin J.-T., Marolleau J.-P., Myoblast transplantation for heart failure, *Lancet*, 2001, vol .357, pp. 279-280

[95] Sodian ., Sperling J.S., Martin D.P., Egozy A., Stock U., Mayer J.E., Vacanti J.P., Fabrication of trileaflet heart valve scaffold from a polyhydroxyalkanoate biopolyester for use in tissue engineering, *Tissue Eng*, 2000, vol. 6, pp. 183-188

[96] Akins R.E., Can Tissue Engineering Mend Broken Hearts?, *Circ Res*, 2002, vol. 90, pp. 120-122

[97] Schmidt D., Mol A., NeuenSchwander S., Breymann Ch., Gössi M., Zund G., Turina M., Hoerstrup S.P., Living patches engineered from human umbilical cord derived fibroblasts and endothelial progenitor cells, *Europ J Cardio-thor Sur*, 2005, vol. 27, pp. 795-800

[98] Ke Q., Yang Y., Rana J.S., Yu C., Morgan J.P., Yong-Fu X., Embryonic stem cells cultured in biodegradable scaffold repair infracted myocardium in mice, *Acta Physiolog Sinica*, 2005, vol. 57, pp. 673-681

[99] Pego A.P., Van Luyn M.J.A., Brouwer L.Al., Van Wachem P.B., Poot A.A., Grijpma D.W., Feijen J., In vivo bahevior of poly(1,3-trimethylene carbonate) and copolymers of 1,3-trimathylene carbonate with D,L-l lactide or epsilon-caprolactone: Degradation and tissue response, *J Biomed Res A*, 2003, vol. 67A., pp. 1044-1054

[100] Ukielski R., Wojcikiewicz H., Synteza i własności elastomerów kopoliestrowoeterowych różniących sie budową fizyczną i chemiczną, *Polimery- tworzywa wielkocząsteczkowe*, 1983, vol. , pp. 224- 226

[101] Słonecki J., Rosłaniec Z., Sposób wytwarzania termoplastycznych elastomerów kopoli(estro-eterowych) o podwyższonej sprężystości, patent RP nr 162 829, (1989), dec.o udzieleniu patentu 01.06.93

[102] Lembicz F., Slonecki J., Dynamics of soft segments phase in copoly(ether-ester)s containing segments of different molecular weights, *Polymer*, 1990, vol. 31, pp. 1464-1466

[103] Tweden K., Cameron J.D., Razzouk A., Holmberg W., Kelly S., Biocompatibility of Silver-Modified Polyester for Antimicrobial Protection of Prosthetic Valves, *J Heart Valve Dis* 1997, vol. 6, pp.553-561

[104] Lindenauer S., Weber T., Miller T., Ramsburgh S., Salles C., Kahn S., Wojtalik R. The use of velour as a vascular prosthesis, *Biomedical Engineering* 1976, vol. 11, pp. 301-306

[105] Soares B, Guidoin R, Marois Y, Martin L, King M, Laroche G, Zhang Z, Charara J, Girard J. *In vivo* characterization of a fluoropassivated gelatin-impregnated polyester mesh for hernia repair, *J Biomed Mater Res* 1996, vol. 32, 293-305

[106] Prowans P., El Fray M., Słonecki J., Biocompatibility studies of new multiblock poly(ester–ester)s composed of poly(butylene terephthalate) and dimerized fatty acid, *Biomaterials*, 2002, vol. 23, pp. 2973-2978

[107] Goepferich A., Schedl L., Langer R., The precipitation of monomers during the erosion of a class of polyanhydrides, Polymer, 1996, vol. 37, pp. 3861- 3869

[108] Liangbing L., Rui H., Ai L., Fude N., Shiming H., Chunmei W., Yuemao Z., Dong W., High pressure crystallized poly(ethylene terephthalate): high crystallinity and large extended-chain crystals, Polymer, 2000, vol. 41, pp. 6943-6947

[109] Boerio F.J., Bahl S.K., McGraw G.E., Vibration Analysis of Polyethylene Terephthalate and Its Deuterated Derivatives, *J Polym Sci: Polym Phys Edit*, 1976, vol. 14, pp. 1029- 1046

[110] Szafran M., Dega-Szafran Z., Określanie struktury związków organicznych metodami spektroskopowymi, Tablice i ćwiczenia, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1988

[111] D'Esposito L., Koenig J.L., Application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy to the Study of Semicrystalline Polymers: Poly(ethylene Terephthalate), *J Polym Sci: Polym Phys Edit*, 1976, vol. 14, pp. 1731-1741

[112] Miyake A., The Infrared Spectrum of Polyethylene Terephthalate. I. The Effect of Crystallization, *J Polym Sci*, 1959, vol. 38, pp. 479- 495

[113] Born R., Scharnweber D., Rößler S., Stölzel M., Thieme M., Wolf C., Worch H., Surface analysis of titanium based biomaterials, Fresenius J Anal Chem, 1998, vol. 361, pp. 697-700

[114] Ma W., Lu Z., Zhang M.,, Investigation of structural transformations in nanophase titanium dioxide by Raman spectroscopy, Appl. Phys. A, 1998, vol. 66, pp. 621–627

[115] Uniqema, PRIPOL Dimer fatty acids in surface coatings, broszura producenta

[116] Hiroaki I., Hirokazu K., Fuel hose, Patent US 2003/ 150503 A1

[117] Leonard E.C., Polymerization- Dimer Acids, *J Am Oil Chemists Soc*, 1979, vol. 79, pp. 782A- 785A

[118] Hablot, E., Matadi, R., Ahzi, S., Avérous, L., Renewable biocomposites of dimer fatty acid-based polyamides with cellulose fibres: thermal, physical and mechanical properties, Composites Science and Technology (2009), doi: 10.1016/j.compscitech.2009.12.001

[119] Ou Ch.F, HoM.T., Lin R.J., Synthesis and Characterization of Poly(ethylene terephthalate) Nanocomposites with Organoclay, *J Appl Polym Sci*, 2004, vol. 91, pp. 140-145

[120] Hu G., Feng X., Zhang S., Yang M., Crystallization Behavior of Poly(ethylene terephthalate)/ Multiwalled Carbon Nanotubes Composites, *J Appl Polym Sci*, 2008, vol. 108, pp. 4080-4089

[121] Di Lorenzo M.L., Errico E.R., Avella M., Thermal and morphological characterization of poly(ethylene terephthalate)/calcium carbonate nanocomposites, *J Mater Sci*, 2002, vol. 37, pp. 2351-2358

[122] Pingping Z., Dezhu M., Double cold crystallization peaks of poly(ethylene terephthalate)- 1. Samples isothermally crystallized at low temperature, *Eur Polym J*, 1997, vol. 33, pp. 1817-1818

[123] Pingping Z., Dezhu M., Study on double cold crystallization peaks of poly(ethylene terephthalate) (PET)- 2. Samples isothermally crystallized at high temperature, *Eur Polym J*, 1999, vol. 35, pp. 739-742

[124] Fraga I., Montserrat S., Hutchinson J., TOPEM, a new temperature modulated DSC technique, *J Therm Anal Calorim*, 2007, vol. 87, pp. 119-124

[125] Mark H.F., Bikales N.M., Overberger Ch.G., Menges G., Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, A Wiley- Interscience Publication, 1988

[126] Jordan J., Jacob K.J., Tannenbaum R., Sharaf M.A., Jasiuk I., Experimental trends in polymer nanocomposites- a review, *Mater Sci Eng A*, 2005, vol. 393, pp. 1-11

[127] Khare H.S., Burris D.L., A quantitative method for measuring nanocomposite dispersion, *Polymer*, 2010, vol. 51, pp. 719- 729

[128] Jiang J., Oberdörster G., Biswas P., Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies, *J Nanopart Res*, 2009, vol. 11, pp. 77-89

[129] Mandzy N., Grulke E., Truffel T., Breakage of TiO_2 agglomerates in electrostatically stabilized aqueous dispersions, *Powder Tech*, 2005, vol. 160, pp. 121-126

[130] Teleki A., Wengeler R., Wengeler L., Nirschl H., Pratsinis S.E., Distinguishing between aggregates and agglomerates of flame-made TiO_2 by high-pressure dispersion, *Powder Tech*, 2009, vol. 181, pp. 292-300

[131] Krijgsman J., Husken D., Gajmans R.J., Synthesis and properties of thermoplastic elastomers based on PTMO and tetra-amide, *Polymer*, 2003, vol. 44, pp. 7573-7588

[132] Kokubo T., Takadama H., How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?, *Biomaterials*, 2006, vol. 27, pp. 2907-2915

[133] Gerhardt L.-C., Jell G.M.R., Boccaccini A.R., Titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles filled poly(D,L lactid acid) (PDLLA) matrix composites for bone tissue engineering, *J Mater Sci: Mater Med*, 2007, vol. 18, pp. 1287-1298

[134] Torres F.G., Nazhat S.N., Sheikh Md Fadzullah S.H., Maquet V., Boccaccini A.R., Mechanical properties and bioactivity of porous PLGA/TiO_2 nanoparticle-filled composites for tissue engineering scaffolds, *Copmosites Sci Techn*, 2007, vol. 76, pp. 1139-1147

[135] Piegat A. El Fray M., Jawad H., Chen Q.Z., Boccaccini A.R., Inhibition of calcification of polymer-ceramic composites incorporating nanocrystallune TiO_2, *Adv Appl Ceram*, 2008, vol. 107, pp. 287-292

[136] Bellenger V., Ganem M., Mortigne B., Verdu J., Lifetime predicition in the hydrolytic ageing of polyesters, *Polym Degr Stabil*, 1995, vol. 49, pp. 91-95

[137] Acar I., Kasgöz A., Özgümüs S., Orbay M., Modification of Waste Poly(Ethylene Terephathalate) (PET) by using Poly(L-Lactic Acid) (PLA) and Hydrolytic Stability, *Polym-Plast Techn Engin*, 2006, vol. 45, pp. 351-359

[138] Olewnik E., Czerwiński W., Nowaczyk J., Sepulchre M.-O., Tessier M., Salhi S., Fradet A., Synthesis and structural study of copolymer of L-lactic acid and bis (2-hydroxyethyl terephtalate), *Eur Polym J*, 2007, vol. 43, pp. 1009-1019

[139] Wang W., Wang W., Chen X., Jing X., Su Z., Hydrogen Bonding and Crystallization in Biodegradable Multiblock Poly(ester urethane) Copolymer, J Polym Sci, Polym Phys, 2009, vol. 47, pp. 685- 695

[140] Ping P., Wang W., Chen X., Jing X., Poly(ε-caprolactone) Polyurethane and Its Shape-Memory Property, Biomacromolecules, 2005, vol. 6, pp. 587- 592

[141] Wong J., Balance of chemistry, topography, and mechanics at the cell- biometrial interface: Issues and challenges for assessing the role of substrate mechanics on cell response, Surface Science, 2004, vol. 570, pp. 119-133

[142] Engler A., Surface probe measurements of the elasticity of sectioned tissue, thin gels and polyelectrolyte multilayer films: Correlations between substrate stiffness and cell adhesion, Surface science, 2004, vol. 570, pp. 142- 154

[143] Savaiano J.K., Webster T.J., Altered responses of chondrocytes to nanophase PLGA/nanophase titania composites, *Biomaterials*, 2004, vol. 25, pp 1205- 1213

[144] Thapa A., Webster T.J., Haberstroh K.M., Polymers with nano-dimensional surface features enhance bladder smooth muscle cell adhesion, *J Biomed Res*, 2003, vol. 67A, pp. 1374- 1387

[145] Kay S., Thapa A., Haberstroh K.M., Webster T.J., Nanostructured Polymer/Nanophase Ceramic Composites Enhance Osteoblast and Chondrocyte Adhesion, *Tiss Eng*, 2002, vol. 8, pp. 753- 761

[146] Liu H., Slamovich E.B., Webster T.J., Surface roughness values doser to bone for titania nanoparticle/poly- lactlc-co-glycolic acid (PLGA) composites increases bone cell adhesion, 2005 MRS Spring Meeting; San Francisco Materials Research Society Symposium Proceedings Volume 873, 2005, Pages 200-205

[147] Neel E. A. Abou, Knowles J. C. Physical and biocompatibility studies of novel titanium dioxide doped phosphate-based glasses for bone tissue engineering applications, *J Mater Sci: Mater Med*, 2008, vol. 19, pp. 377-386

[148] Jawad, H.Z, Development and characterization of elastomeric block copolymeric substrates for myocardial tissue engineering using embryonic stem cell derived cardiomyocytes, Department of Materials, Imperila College London, 2009

[149] El Fray M., Piegat A., Prowans P., Influence of TiO_2 Nanoparticles Incorporated into Elastomeric Polyesters on their Biocompatibility In Vitro and In Vivo, *Adv Eng Mater*, 2009, vol. 11, B200-B203

[150] El Fray M., Nanostructured elastomeric biomaterials for soft tissue reconstruction, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2003

[151] Kucias J., Uber den fur die zellbiologie heuristichen wert des relativen Strukturinformationshehalt, der Negentropie und der negativen Entropie der Zelle, *Biol Zb*, 1984, vol.103, p. 123- 138

[152] Spausta G., Analysis of effects of selected polymers on morpho-dynamic features of rat hepatocyes, *Polim Med*, 1995, vol. 25, pp.33- 55

Abstract

A new multiblock copoly(ester-esters) and their nanocomposites containing titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles were prepared in the process of transesterification and polycondensation in the melt. Nanocrystalline titanium dioxide most significantly influenced the physico-chemical properties, increasing the limiting viscosity number and the melting temperature. Modification of the initial PET/DLA copolymer with hydroxydicaroxylic low molecular weight acids was also performed in order to improve control over the processes of hydrolytic degradation.

The ^1H NMR analysis confirmed the hard segments content and the multiblock structure, what is in good agreement with DSC and DMTA studies, and what also confirmed the phase structure characteristic for thermoplastic elastomers. DSC analysis also showed that the presence of nanofillers influence the crystallization processes of hard segments, as manifested by lowering the melting enthalpy and crystalline phase content in the copolymers modified with nano-TiO_2.

Mechanical static tests confirmed the presence of nanoreinforcement phenomenon, for nanocomposites containing 0.2 and 0.4 wt% TiO_2, both before and after the long-term hydrolytic degradation studies. Thus confirmed the stabilizing effect of nanofillers in thermoplastic elastomers matrix. Scanning and transmission electron microscopy allowed to evaluate the morphology of nanostructured materials as well as distribution of nano-TiO_2 in the copolymer matrix. A significant increase in surface roughness parameters, rms, for the nanocomposites appeared to be particularly important in the biocompatibility tests in vitro.

The short-and long-term degradation studies of stabilizing effect of titanium dioxide on thermoplastic elastomer matrix was evidenced by the DSC measurements where specific effects on changes in the amorphous phase of soft segments was observed. Addition of low molecular hydroxy acids led to higher susceptibility of materials to hydrolytic degradation, thereby acidifying the environment (lowering the pH of the solution) similar to commercially available poly (α-esters).

The most important result of the thesis is high biocompatibility of these new polymeric materials, especially materials containing titanium dioxide. They showed excellent biocompatibility in vitro and in vivo. The mechanical properties, which are significantly improved are better than the properties of soft tissues including heart muscle,

allowed for planning and carrying out the tests in animal models, which demonstrated the possibility to use the obtained materials in tissue-engineered heart muscle. The introduction of nano-TiO_2 to the matrix of the thermoplastic elastomer is a promising type of physical modification, affecting not only significantly improved cellular and tissue biocompatibility, but also improved the mechanical stability and surgical handiness of nanostructured materials.