

ANETA LIBER-KNEĆ^{A-F}, SYLWIA ŁAGAN^{A-F}

Zastosowanie pomiarów kąta zwilżania i swobodnej energii powierzchniowej do charakterystyki powierzchni polimerów wykorzystywanych w medycynie

The Use of Contact Angle and the Surface Free Energy as the Surface Characteristics of the Polymers Used in Medicine

Zakład Mechaniki Doświadczalnej i Biomechaniki, Instytut Mechaniki Stosowanej, Wydział Mechaniczny, Politechnika Krakowska, Kraków, Polska

A – koncepcja i projekt badania; B – gromadzenie i/lub zestawianie danych; C – analiza i interpretacja danych; D – napisanie artykułu; E – krytyczne zrecenzowanie artykułu; F – zatwierdzenie ostatecznej wersji artykułu; G – inne

Streszczenie

Wprowadzenie. W procesie oddziaływania implant–organizm żywy istotną rolę pełni warstwa wierzchnia materiału. Wiele badań z dziedziny inżynierii biomateriałów dotyczy chemii powierzchni.

Cel pracy. Ocena zmiany właściwości warstwy wierzchniej polimerów na skutek procesu degradacji hydrolitycznej na podstawie pomiarów kąta zwilżania i kalkulacji swobodnej energii powierzchniowej.

Materiał i metody. Badania zwilżalności przeprowadzono dla dwóch typów polimerów: polilaktydu (PLA) i polihydroksyalanianu (PHA) poddanych procesowi degradacji hydrolitycznej przez 27 miesięcy. Na podstawie oznaczonych kątów zwilżania obliczono wartości swobodnej energii powierzchniowej metodą Owensa-Wendta oraz określono krytyczne napięcie powierzchniowe.

Wyniki. Powierzchnia obu badanych polimerów ma charakter hydrofilowy. Degradacja hydrolityczna wpływa na zwiększenie wartości swobodnej energii powierzchniowej oraz krytycznego napięcia powierzchniowego.

Wnioski. Zastosowana metodyka może stanowić łatwo dostępną metodę wstępnej oceny materiału z punktu widzenia zdolności do adhezji komórek oraz postępu procesu degradacji (**Polim. Med.** 2014, 44, 1, 29–37).

Słowa kluczowe: kąt zwilżania, swobodna energia powierzchniowa, biomateriały, polimery biodegradowalne.

Abstract

Background. In the interaction process between implant and a living organism an important role is covered by the material layer. Many studies in the field of chemical engineering concern biomaterials surface.

Objectives. Changes estimation of properties of polymers surface layer due to hydrolytic degradation on the base on measurements of contact angles and calculation of the surface free energy.

Material and Methods. Contact angle measurements were made for the two polymers: polylactide (PLA) and polyhydroxyalkanoate (PHA) undergoing the hydrolytic degradation process over a period of 27 months. Based on the measured values of contact angles, surface free energy by the Owens-Wendt method and the critical surface tension were calculated.

Results. The surface for both tested polymers is hydrophilic. Hydrolytic degradation influences the growth of the surface free energy and the critical surface tension.

Conclusions. Methodology can be a easily available for the initial assessment of the material from the point of view of the ability to cell adhesion and the progress of the degradation process (**Polim. Med.** 2014, 44, 1, 29–37).

Key words: contact angle, surface free energy, biomaterials, biodegradable polymers.

O podstawowych cechach wielu wyrobów z materiałów polimerowych, a szczególnie implantów, rozstrzygają właściwości warstwy wierzchniej materiału, z którego są one wykonane. Warstwa wierzchnia, która charakteryzuje się odmienną strukturą od rdzenia materiału, spełnia różne funkcje i jest poddawana działaniu różnych czynników w zależności od przeznaczenia wyrobu [1]. Organizm żywy reaguje na biomateriał poprzez jego warstwę powierzchniową. Ocenia się, że oddziaływanie między warstwą wierzchnią biomateriału a organizmem żywym dotyczą nie więcej niż 5 Å poniżej warstwy powierzchniowej materiału. Dlatego wiele badań z dziedziny inżynierii biomateriałów dotyczy chemii powierzchni [2]. Do najważniejszych parametrów materiału implantacyjnego, które mogą korelować z bioreaktywnością należą takie wskaźniki, jak: hydrofilowość/hydrofobowość, obecność grup funkcyjnych, chropowatość [3]. Bioreaktywność według Ratnera jest to zdolność materiału do wzbudzenia określonej odpowiedzi tkanki/komórki. Wśród podstawowych reakcji na zaimplantowany materiał wymienia się: adsorpcję białek, adhezję bakterii, fagocytozę, hemolizę, aktywację płytek, adhezję płytek, biodegradację.

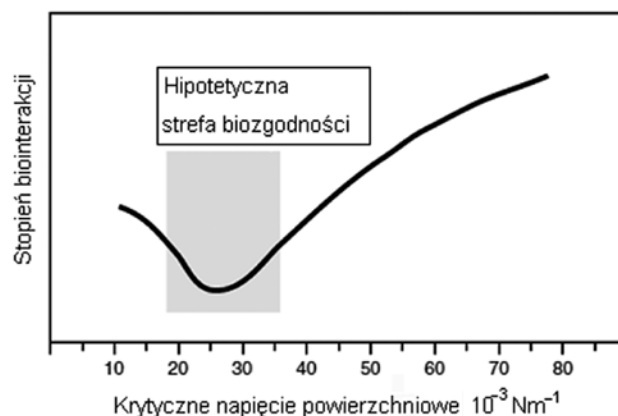
Oddziaływanie między powierzchnią materiału implantacyjnego a środowiskiem biologicznym *in vitro* lub *in vivo* są związane z właściwościami warstwy wierzchniej materiału, spośród których najistotniejsze są te dotyczące topografii, zwilżalności, składu chemicznego i energii powierzchniowej. Dla biomateriałów swobodna energia powierzchniowa SEP (ang. *SFE Surface Free Energy*) może służyć do oceny stopnia oddziaływania między materiałem a organizmem żywym. W przypadku powierzchni, które charakteryzują się dużą wartością energii powierzchniowej adsorpcja białek i będąca jej następstwem adhezja komórek jest dobra. Odwrotne zjawisko występuje dla materiałów z małą wartością energii powierzchniowej. Dla powierzchni z dużą energią powierzchniową na granicy komórka–ciało stałe (tканка–implant) w porównaniu z sumą energii powierzchniowych między fazami komórka–ciecz oraz ciało stałe występuje mniejsze prawdopodobieństwo adhezji do powierzchni ciała stałego. Należy jednak podkreślić, że silnie hydrofilowe powierzchnie (bardzo duża SEP), jak np. hydrożele czy metakrylany, nie sprzyjają adhezji [4, 5]. Adhezja komórek do powierzchni biomateriału jest ważna w przypadku implantów ortopedycznych lub stomatologicznych, gdyż wpływa na proces integracji implantu z tkanką. Z kolei w niektórych klinicznych zastosowaniach, np. zastawki serca, urządzenia służące do dializy mała adsorpcja białek, która ogranicza proces krzepnięcia krwi jest pożądana. Mała wartość energii powierzchniowej jest również korzystna w przypadku materiałów wykorzystywanych do wytwarzania soczewek wewnątrzgałkowych i kontaktowych. Proces adhezji komórek jest skomplikowany i determinowany przez wiele czynników, nie tylko wspomnianą energię powierzchniową, może jednak ona stanowić dość pro-

sty wskaźnik dający nam wstępne informacje na temat adhezji komórek, może również być miarą chemicznej i biologicznej odporności powierzchni materiału na biodegradację [6, 7].

Pod koniec lat 60. XX wieku Robert Baier [8] badał rolę energii powierzchniowej biomateriałów w trombogenezie. Wynikiem prowadzonych badań i studiów literaturowych była korelacja stopnia biologicznych interakcji z wartością krytycznej swobodnej energii powierzchniowej (ryc. 1). Według zaproponowanej hipotezy powierzchnia materiału z tzw. krytyczną energią powierzchniową na poziomie 20–30 [10^{-3} N/m] charakteryzuje się atrombogennością i została określona przez Baiera jako hipotetyczna strefa biokompatybilności, rozumianej jako strefa minimalnej adhezji komórek. Z kolei materiały charakteryzujące się krytyczną energią powierzchniową powyżej 40 [10^{-3} N/m] sprzyjają adhezji komórek. Stanowią więc dobre materiały szczególnie dla ortopedii, gdzie adhezja komórek do powierzchni implantu oraz przerastanie implantu tkankami stanowią kluczową rolę w procesie jego wganiania [8].

Należy jednak pamiętać, iż w badaniach laboratoryjnych *in vitro* symuluje się warunki środowiska naturalnego, zatem są one obarczone pewnym błędem. Kosztowność oraz względy etyczne badań klinicznych *in vivo*, szczególnie na wczesnym etapie, kierują jednak uwagę badaczy ku badaniom laboratoryjnym.

Związana z energią powierzchniową zwilżalność powierzchni materiału jest również przydatnym parametrem służącym do oceny biologicznych oddziaływań między materiałem a organizmem żywym. W przypadku projektowania właściwości materiałów na implanty oddziaływania te dotyczą przede wszystkim zjawisk, takich jak adsorpcja białek, której następstwem są adhezja i namnażanie komórek. Prace badawcze [4, 5, 7] prowadzone w celu oceny wpływu zwilżalności powierzchni i powiązanej z nią hydrofobowością lub hydrofilowością na oddziaływanie biomateriał–środowisko biologiczne



Ryc. 1. Zależność między biokompatybilnością i krytycznym napięciem powierzchniowym ciała stałego [3, 8]

Fig. 1. Correlation of biological interactions and relative surface energy of solid [3, 8]

pokazały między innymi, że liczba zaadsorbowanych białek zwiększa się, kiedy powierzchnia materiału staje się bardziej hydrofobowa, z kolei zmiany konformacyjne zaadsorbowanych białek zachodzą, gdy powierzchnia staje się bardziej hydrofilowa. Powierzchnie biomateriałów w roztworach wodnych oddziałują z molekułami wody. W przypadku powierzchni polarnych najsilniejsze oddziaływania są związane z interakcją między wodą a kwasem Lewisa będącym akceptorem elektronów lub zasadową grupą funkcyjną będącą donorem elektronów. Drugim oddziaływaniem między hydrofilową powierzchnią a wodą są oddziaływania międzycząsteczkowe (jonowe, van der Waalsa). W przypadku powierzchni hydrofobowych ich oddziaływania z cząstkami rozpuszczalnika występują głównie dzięki wiązaniami van der Waalsa, nie ma oddziaływań donor–elektron i akceptor–elektron [4, 9].

Polimery z grupy poliestrów alifatycznych, np. polilaktyd, polihydroksyalkaniany ze względu na biodegradowalność oraz immunologiczną obojętność znajdują zastosowanie w medycynie. Polihydroksyalkaniany (PHA) są wytwarzane przez wiele mikroorganizmów i gromadzone w postaci granulek w cytoplazmie ich komórek jako materiał zapasowy. PHA wykazują małą cytotoksyczność, ponieważ ich monomery występują w organizmie ludzkim jako produkty metabolizmu. PHA mają właściwości zbliżone do konwencjonalnych materiałów polimerowych. Są powszechnie stosowane jako biomateriały do produkcji nici chirurgicznych oraz opatrunków [10–12]. Polilaktyd (PLA) jest jednym z niewielu polimerów pochodzenia naturalnego, który znajduje praktyczne zastosowanie w produkcji nici chirurgicznych i implantów. Jego właściwości mechaniczne wystarczają do przenoszenia obciążeń mechanicznych występujących w organizmie ludzkim. Polimer ten ulega jednak łatwo procesowi degradacji hydrolytycznej zarówno w warunkach enzymatycznych, jak i nieenzymatycznych. Duża podatność PLA na hydrolizę jest niekorzystna w przypadku stałego kontaktu ze środowiskiem biologicznym w przypadku długotrwałego wspomagania leczonych tkanek [11, 13].

Proces degradacji hydrolytycznej poliestrów alifatycznych był przedmiotem wielu badań [14–16]. Wykazano, iż proces degradacji większości wyrobów z polilaktydu jest szybszy wewnątrz materiału niż na jego powierzchni, co jest wynikiem efektu autokatalitycznego. Dla poliestrów alifatycznych szybkość hydrolizy zależy od temperatury, struktury molekularnej, gęstości grup estrowych, rodzaju mediów oraz obciążeń mechanicznych [17, 18]. Przebieg procesu degradacji polimerów pod wpływem inkubacji w różnych płynach (np. w wodzie destylowanej, SBF, płynie Ringera) w temperaturze 37°C najczęściej ocenia się na podstawie zmian masy cząsteczkowej [17–19] oraz masy badanych próbek [17], zmian parametrów wytrzymałościowych, zmian pH i przewodnictwa płynów inkubacyjnych w funkcji czasu inkubacji materiałów, obserwacji mi-

kroskopowych (SEM) zmian zachodzących na powierzchni inkubowanych materiałów [17, 19, 20, 21].

Celem badań niniejszej pracy było oznaczenie swobodnej energii powierzchniowej oraz krytycznego napięcia powierzchniowego dla dwóch polimerów wykorzystywanych w implantologii ulegających procesom biodegradacji: polilaktydu (PLA) oraz polihydroksyalkanianu (PHA) na podstawie pomiarów kąta zwilżania. Dodatkowo oceniono zmiany SEP dla badanych polimerów, które były inkubowane w wodzie destylowanej przez 27 miesięcy w celu oceny wpływu degradacji na zmianę charakteru powierzchni badanych polimerów. Zastosowana metoda określania i obliczania swobodnej energii powierzchniowej materiałów polimerowych na podstawie pomiarów kąta zwilżania ma istotne znaczenie ze względu na łatwość przeprowadzania pomiarów i dużą dokładność uzyskiwanych wyników, jest również jedną z podstawowych metod wykorzystanych do charakterystyki powierzchni polimerów biomedycznych [1, 22–26]. Niewiele jest jednak doniesień na temat pomiarów zmian kąta zwilżania i swobodnej energii powierzchniowej polimerów poddanych długotrwałemu procesowi degradacji.

Materiał i metody

W laboratorium Zakładu Mechaniki Doświadczalnej i Biomechaniki Politechniki Krakowskiej przeprowadzono analizę kątów zwilżania i swobodnej energii powierzchniowej (SEP) dla dwóch dostępnych komercyjnie polimerów biodegradowalnych z grupy poliestrów alifatycznych produkcji francuskiej firmy Natureplast: polilaktydu (PLA) i polihydroksyalkanianu (PHA). Próbkę do badań wykonano metodą wtrysku z użyciem wtryskarki Krauss-Maffei typu KM 40-125 w temperaturze wtrysku zgodnej z zaleceniami producenta polimerów.

Polimery inkubowano w wodzie destylowanej w temperaturze 37°C przez 27 miesięcy, dokonując pomiarów kąta zwilżania po 3, 9 i 27 miesiącach. Pomiar kąta zwilżania kroplą cieczy naniesionej na nieruchome podłoże (warstwę wierzchnią materiałów) został wykonany na stanowisku badawczym złożonym z aparatu czechskiej firmy Advex Instruments zintegrowanego z kamerą do wykonywania zdjęć kropli cieczy naniesionej na powierzchnię próbek i programu See System do analizy zarejestrowanego obrazu kropli. Ciecze pomiarowe o objętości 0,4 μ l były наносzone na powierzchnię badanych próbek za pomocą mikropipety. Pomiary kąta zwilżania wykonano z użyciem trzech cieczy: wody destylowanej (θ_w) (prod. Poch S.A.), diiodometanu (θ_d) (prod. Merck sp.z o.o.) oraz gliceryny bezwodnej (θ_g) (prod. Chempur).

Ciecze pomiarowe dobrano w taki sposób, aby jedna z nich charakteryzowała się możliwie dużą wartością składowej polarnej (woda), a druga była cieczą dysper-

syjną (dijodometan). Taki dobór cieczy pozwala minimalizować wpływ błędów występujących podczas określania wartości składowych SEP polarnej i dyspersyjnej cieczy pomiarowych na obliczoną SEP materiału [6, 22]. W celu wyznaczenia wartości krytycznej energii powierzchniowej metodą Zismana wykorzystano dodatkowo glicerynę bezwodną do pomiaru kąta zwilżania przed 27-miesięczną inkubacją i po niej. Przyjęte do obliczeń wartości swobodnych energii powierzchniowych (SEP) oraz ich składowe: polarną i dyspersyjną dla metody Owensa-Wendta podano w tabeli 1. Pomiar wszystkimi cieczami był wykonywany co najmniej 10 razy dla wszystkich badanych próbek.

Oznaczone wartości kąta zwilżania oraz swobodnej energii powierzchniowej zostały pokazane jako wartości średnie z odchyleniem standardowym ($X \pm SD$).

Tabela 1. Wartości SEP i poszczególnych ich składowych dla cieczy pomiarowych stosowanych w metodzie Owensa-Wendta [1]

Table 1. Values of free surface energy and its components for measurement liquids used in Owens-Wendt method [1]

Ciecz pomiarowa	γ_L [mJ/m ²]	γ_L^d [mJ/m ²]	γ_L^p [mJ/m ²]
Woda destylowana	72,8	21,8	51,0
Dijodometan	50,8	50,8	0
Gliceryna	64,0	34,0	30,0

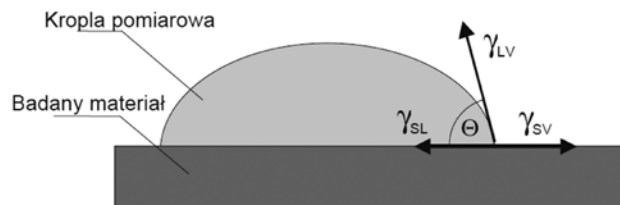
Metody określania wartości swobodnej energii powierzchniowej [1, 22]

Miarą ilościową zwilżalności zarówno dla ciał stałych, jak i cieczy jest kąt zwilżania θ . Jest to kąt utworzony przez powierzchnię ciała stałego i płaszczyznę styczną do powierzchni cieczy w punkcie styku z ciałem stałym lub do powierzchni dwóch stykających się cieczy (ryc. 2).

Zmierzona wartość kąta zwilżania oraz równanie Younga (1) stanowią podstawę obliczeń wartości swobodnej energii powierzchniowej. Równanie to zostało wyprowadzone z warunku równowagi sił reprezentujących odpowiednie napięcia powierzchniowe w punkcie styku trzech faz: ciała stałego, cieczy i pary:

$$\sigma_{SV} = \sigma_{SL} + \sigma_{LV} \cos \theta, \quad (1)$$

gdzie: σ_{SV} – napięcie powierzchniowe ciała stałego (biomateriału) w równowadze z parą nasyconą cieczy, σ_{SL} – napięcie powierzchniowe ciała stałego i cieczy, σ_{LV} – napięcie powierzchniowe cieczy w równowadze z parą nasyconą tej cieczy, θ – kąt, jaki tworzy styczna do powierzchni kropli pomiarowej osadzonej na powierzchni ciała stałego w punkcie styku trzech faz (równowagowy kąt zwilżania).



Ryc. 2. Kropla cieczy pozostająca w równowadze z płaską powierzchnią ciała stałego, γ_{SL} – swobodna energia powierzchniowa na granicy ciało stałe–ciecz, γ_{SV} – swobodna energia powierzchniowa na granicy ciało stałe–para nasycona cieczą, γ_{LV} – swobodna energia powierzchniowa na granicy ciecz–para nasycona cieczą [1]

Fig. 2. Liquid droplet remaining in equilibrium state with flat solid surface: γ_{SL} – free surface energy between solid–liquid, γ_{SV} – free surface energy between solid–vapor, γ_{LV} – free surface energy between liquid–vapor [1]

Do wyznaczania swobodnej energii powierzchniowej tworzyw wykorzystuje się równanie Younga w formie przekształconej (2):

$$\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_L \cos \theta, \quad (2)$$

gdzie: γ_S – swobodna energia powierzchniowa ciała stałego, γ_{SL} – swobodna energia powierzchniowa ciała stałego w kontakcie z cieczą, γ_L – swobodna energia powierzchniowa cieczy pomiarowej.

Występujące w równaniu (2) wartości γ_L oraz θ można wyznaczyć na podstawie pomiarów, jednakże wyznaczenie pozostałych dwóch wielkości: γ_S i γ_{SL} wymaga przyjęcia dodatkowych założeń o związkach zachodzących między poszczególnymi wielkościami γ_L , γ_S i γ_{SL} . Badania naukowe prowadzone w tej dziedzinie doprowadziły do określenia różnych metod określania wartości swobodnej energii powierzchniowej materiałów. Podstawowe znaczenie dla obliczeń swobodnej energii powierzchniowej materiałów polimerowych ma metoda Owensa-Wendta.

Metody obliczeń SEP materiałów polimerowych oparte na metodzie Owensa-Wendta [1, 22]

Zastosowany w analizach model Owensa-Wendta wymaga stosowania dwóch cieczy (jednej polarnej oraz drugiej dyspersyjnej). Stosując ten model, otrzymuje się przybliżenie, uznając średnią geometryczną γ_S^p (powierzchni) i γ_L^p (cieczy) składowych polarnych. W modelu Owensa-Wendta wykorzystuje się następujące wzory analityczne (3) i (4):

$$\gamma_S = \gamma_S^d + \gamma_S^p, \quad (3)$$

γ_S^d – składowa dyspersyjna (Lifshitz-Van der Waals {LW})

γ_S^p – składowa polarna (Lewis kwas–zasada {AB}):

$$\gamma_L (1 + \cos \theta) = 2\sqrt{\gamma_S^d \cdot \gamma_L^d} + 2\sqrt{\gamma_S^p \cdot \gamma_L^p}. \quad (4)$$

W równaniu (4) są obecne dwie niewiadome γ_s^d oraz γ_s^p , zatem nie wystarcza ono do wyznaczenia wartości swobodnej energii powierzchniowej. W związku z tym w pomiarach kąta zwilżalności wykorzystuje się dwie ciecze, co prowadzi do uzyskania układu równań liniowych ze współczynnikami o stałych wartościach (5):

$$\begin{cases} x + ay = b(1 + \cos \theta_1) \\ x + cy = d(1 + \cos \theta_2) \end{cases} \quad (5)$$

W powyższym równaniu (5) a , b , c , d są to współczynniki związane z cieczami pomiarowymi, θ_1 , θ_2 – są wartościami kątów zwilżania oznaczonymi z użyciem dwóch cieczy pomiarowych, a niewiadome x i y : $x = \sqrt{\gamma_s^d}$, $y = \sqrt{\gamma_s^p}$. Do pomiarów kątów zwilżania wybiera się dwie ciecze o różnych charakterach, co pozwala na ograniczenie wpływu błędów w określaniu wartości składowych γ_L^d , γ_L^p , najczęściej stosuje się diiodometan i wodę [1, 22].

Wśród innych metod określania SEP dla materiałów polimerowych wyróżnia się metoda Zismana, służąca do wyznaczania tzw. krytycznej swobodnej energii powierzchniowej γ_C . W pomiarach wykorzystuje się kilka cieczy z danego szeregu homologicznego, a na podstawie wyników doświadczalnych generuje się wykres w układzie współrzędnych, w którym oś odciętych stanowi wartość γ_L wykorzystanych cieczy, na osi rzędnych natomiast definiuje się cosinus kątów zwilżania θ . Wartości $(\cos \theta)$ wykorzystanych w badaniach cieczy z szeregu n-alkanów formują w przybliżeniu linię prostą, a ekstrapolacja wykresu do punktu $\cos \theta = 1$ pozwala wyznaczyć γ_C równej wartości odciętej w tym punkcie [1, 22]. W ten sposób można wyznaczyć równanie prostej (6) w zdefiniowanym układzie współrzędnych, w którym b jest współczynnikiem kierunkowym prostej:

$$\cos \theta = 1 + b(\gamma_C + \gamma_L) \quad (6).$$

Wykorzystując równania (2) i (6) dla badanego materiału, można opisać zależność między swobodną

energiją powierzchniową (γ_s) a krytyczną swobodną energiją powierzchniową (γ_C):

$$\gamma_s = \frac{(b\gamma_C + 1)^2}{4b} \quad (7).$$

Wyniki i omówienie

Przykładowe zdjęcie kropli diiodometanu oraz wody destylowanej naniesionej na powierzchnię polilaktydu pokazano na rycinie 3. Wyniki pomiarów kąta zwilżania dla próbek polimerów przed inkubacją w wodzie destylowanej i po niej porównano w tabeli 2. Zarówno polilaktyd, jak i polihydroksyalkanian mają hydrofilowy charakter powierzchni. Inkubacja polimerów w wodzie destylowanej spowodowała zmniejszenie wartości kąta zwilżania po 27 miesiącach o 7,6% dla PLA i 14% dla PHA, charakter powierzchni pozostał jednak hydrofilowy. W przypadku PLA po 6 i 9 miesiącach inkubacji zaobserwowano zwiększenie wartości kąta zwilżania, a następnie jej zmniejszenie, co wymaga dalszych badań w celu wyjaśnienia tych zmian.

Tabela 2. Wyniki pomiarów kąta zwilżania dla polilaktydu i polihydroksyalkanianu przed inkubacją w wodzie destylowanej i po niej dla dwóch cieczy pomiarowych

Table 2. The results of contact angle measurements for polylactide and polyhydroxyalkanoate before and after incubation in distilled water for two measurement liquids

	Kąt zwilżania [°]			
	PLA		PHA	
Czas inkubacji (miesiące)	woda destylowana	dijodometan	woda destylowana	dijodometan
0	69,2 ± 1,3	35,8 ± 1,5	75,7 ± 1,1	28,9 ± 1,9
6	73,1 ± 1,9	35,6 ± 1,1	75,3 ± 1,7	31,2 ± 1,4
9	79,4 ± 1,5	45,9 ± 1,3	66,8 ± 1,3	31,2 ± 1,8
27	63,9 ± 1,9	31,2 ± 1,2	65,1 ± 1,2	25,5 ± 1,9



Ryc. 3. Zdjęcie kropli diiodometanu (po lewej) i wody destylowanej naniesionych na powierzchnię polilaktydu

Fig. 3. The photo of the diiodomethane (left) and distilled water drop deposited on the polylactide surface

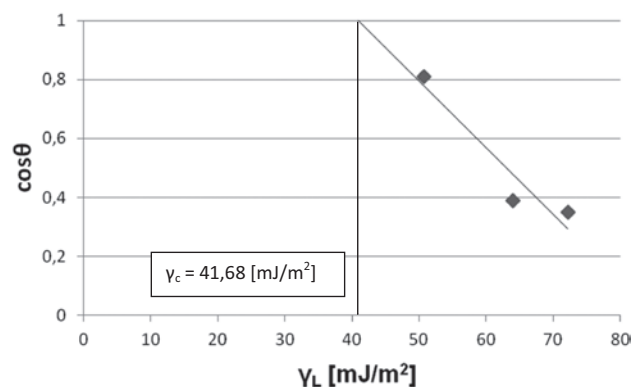
Wartość kąta zwilżania oznaczona dla PLA przed inkubacją z użyciem wody destylowanej jest mniejsza od wartości oznaczonej przez Pinto et al. [23], ale jest zbliżona do wartości kąta zwilżania oznaczonej przez Corrello et al. [27] z wykorzystaniem glicerolu, który tak jak woda jest cieczą polarną. Wartość oznaczonego kąta zwilżania dla PLA z użyciem diiodometanu jest zbliżona do uzyskanej przez Wan et al. [26] (37°), ale różni się od wartości kąta oznaczonej z zastosowaniem wody destylowanej (78°). Oznaczona przez Kang et al. [24] wartość kąta zwilżania dla PHA nieinkubowanego wyniosła $75 \pm 2^\circ$ i jest jednakowa z oznaczoną wartością. Nie ma doniesień o zmianie kąta zwilżania na skutek długotrwałego procesu inkubacji PLA i PHA. Pamuła et al. [28] badała zmiany wartości kąta zwilżania dla kopolimeru laktydu z glikolidem inkubowanego w PBS o temp. 37°C przez 7 tygodni. Oznaczona wartość kąta zwilżania nieznacznie spadła z $77,2^\circ$ na $76,1^\circ$.

W tabeli 3 zestawiono wartości obliczonej na podstawie pomiarów kątów zwilżania swobodnej energii powierzchniowej wg modelu Owens-Wendta. Udział składowej dyspersyjnej w sumarycznej wartości swobodnej energii powierzchniowej jest większy dla obu badanych polimerów. Dla badanych polimerów wartość swobodnej energii powierzchniowej nieznacznie wzrosła po 27 miesiącach inkubacji próbek w stosunku do próbek nieinkubowanych, zwiększenie wartości zaobserwowano dla PHA. Oznaczona wartość swobodnej energii powierzchniowej dla PLA nieinkubowanego ma wyższą wartość niż prezentowana w pracy [26], gdzie wartość swobodnej energii powierzchniowej $\gamma_s = 43,2 \text{ mJ/m}^2$, a składowe: polarna $\gamma_s^p = 10,7 \text{ mJ/m}^2$ i dyspersyjna $\gamma_s^d = 32,5 \text{ mJ/m}^2$. Zheng et al. [25] oznaczali SEP dla polihydroksymaśla-

Tabela 3. Swobodna energia powierzchniowa obliczona na podstawie pomiarów kąta zwilżania dla polilaktydu i polihydroksyalkanianu przed inkubacją w wodzie destylowanej i po inkubacji

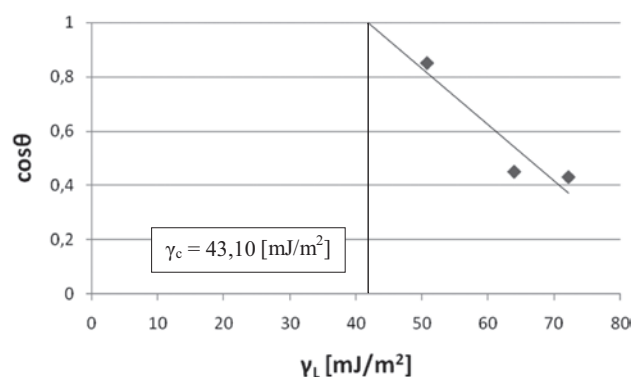
Table 3. The free surface energy calculated from contact angles for polylactide and polyhydroxyalkonate before and after incubation in distilled water

Ciecz pomiarowa	γ_s [mJ/m ²]	γ_s^p [mJ/m ²]	γ_s^d [mJ/m ²]
Czas inkubacji (miesiące)	PLA		
0	$48,85 \pm 1,55$	$7,23 \pm 0,55$	$41,62 \pm 1,00$
6	$47,27 \pm 1,63$	$5,55 \pm 0,90$	$41,72 \pm 0,73$
9	$40,84 \pm 1,54$	$4,34 \pm 0,55$	$36,50 \pm 0,99$
27	$52,81 \pm 1,79$	$9,12 \pm 1,07$	$43,69 \pm 0,72$
PHA			
0	$48,57 \pm 1,24$	$3,95 \pm 0,24$	$44,62 \pm 1,00$
6	$47,97 \pm 2,08$	$4,28 \pm 0,59$	$43,69 \pm 1,49$
9	$51,44 \pm 1,53$	$7,75 \pm 0,53$	$43,69 \pm 1,00$
27	$53,85 \pm 1,57$	$7,90 \pm 0,54$	$45,95 \pm 1,03$



Ryc. 4. Wykres Zismana dla PLA przed inkubacją

Fig. 4. Zisman plot for PLA before incubation



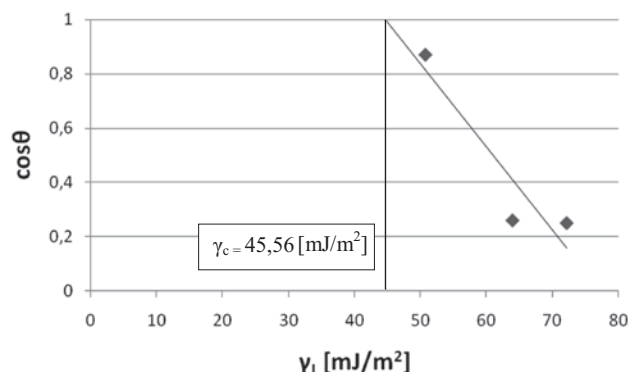
Ryc. 5. Wykres Zismana dla PLA po inkubacji

Fig. 5. Zisman plot for PLA after 27 months of incubation

nu (PHB) z rodziny polihydroksyalkanianów, uzyskując wartość $\gamma_s = 45 \text{ mJ/m}^2$, nieznacznie mniejszą niż oznaczona w badaniach własnych dla PHA.

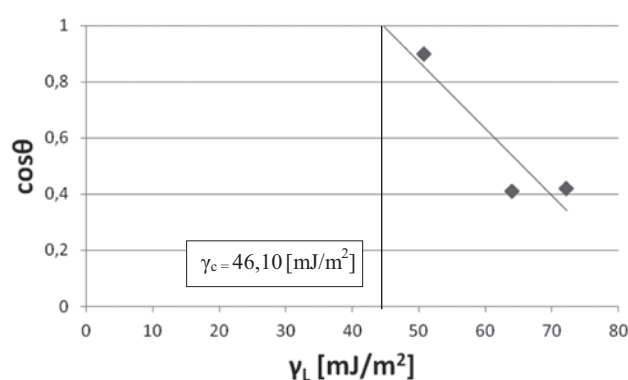
Wartość kąta zwilżania powierzchni badanych polimerów określona z użyciem gliceryny bezwodnej zmieniła się z wartości $67,2 \pm 0,9^\circ$ przed inkubacją na wartość $63,3 \pm 1,1^\circ$ po 27 miesiącach inkubacji dla PLA, a dla PHA z $74,7 \pm 3,3^\circ$ na $65,8 \pm 3,7^\circ$. Oznaczone wartości kąta zwilżania posłużyły do wyznaczenia trzeciego punktu wykresu Zismana. Wyznaczona metodą Zismana wartość krytycznej swobodnej energii powierzchniowej zarówno dla PLA (ryc. 4), jak i dla PHA (ryc. 6) przekracza wartość 40 mJ/m^2 , co stanowi zakres dobrej bioadhezji [3, 8, 29]. Dla próbek inkubowanych w wodzie destylowanej w trakcie procesu biodegradacji nastąpiło nieznaczne zwiększenie wartości krytycznej swobodnej energii powierzchniowej (ryc. 5 i 7). Rezultatem wzrostu wartości krytycznej swobodnej energii powierzchniowej jest zwiększenie adhezji komórek i proliferacja komórek, takich jak fibroblasty, komórki mięśni gładkich oraz komórki nabłonkowe [29].

Analiza charakteru warstwy wierzchniej pod względem zwilżalności (hydrofobowości lub hydrofilowości) pozwala na ocenę, między innymi, zachowania komórek organizmu w obecności warstwy wierzchniej materiału.



Ryc. 6. Wykres Zismana dla PHA przed inkubacją

Fig. 6. Zisman plot for PHA before incubation



Ryc. 7. Wykres Zismana dla PHA po 27 miesiącach inkubacji

Fig. 7. Zisman plot for PLA after 27 months of incubation

Oba badane polimery charakteryzują się hydrofilowością, co sprzyja adhezji komórek [30]. Należy jednak pamiętać, iż płyny ustrojowe składają się z wody, różnych białek i komórek, dlatego mogą pojawić się synergiczne oddziaływania, zatem trudno jest przewidzieć dokładny mechanizm oddziaływania powierzchni hydrofilowych i hydrofobowych ze środowiskiem biologicznym. Analiza dostępnego piśmiennictwa [31–35] oraz przeprowadzone badania pozwalają na sformułowanie wniosku o przydatności pomiarów kąta zwilżania i SEP jako parametrów służących do oceny stopnia zmian biodegradacji w przypadku odpowiedzi tkankowej.

Poznanie czasu bezpiecznego użytkowania lub czasu degradacji biologicznej w warunkach laboratoryjnych, które odbiegają od tych panujących w środowisku naturalnym pozwala jedynie na przybliżoną ocenę. Dodatkowo przebieg procesu zależy od wielu czynników, tj.: od obecności tlenu, zmian pH, temperatury, wilgotności oraz obecności mikroorganizmów [6].

Szeroko prowadzone współcześnie badania cytotoxyczności polimerów biodegradujących zarówno

in vivo, jak i *in vitro* wskazują na różny poziom biodegradacji w odniesieniu do różnych tkanek, dlatego też w ocenie długofalowej istotne są metody oceny stopnia biodegradacji materiałów w różnych środowiskach. Niestety z uwagi na złożony charakter reakcji między organizmem gospodarza a implantem oraz specyficzne wymagania, jakie stawia się biomateriałom w aspekcie biodegradacji, biofunkcjonalności oraz bioreaktywności prezentowane wyniki analiz obejmują jedynie wybrane elementy szczegółowych badań uzależnione od zainteresowań zespołów badawczych. Na podstawie przeglądu dostępnej literatury można jednak wyznaczyć kierunek kompleksowych badań i analiz dających odpowiedź na temat wpływu materiałów biodegradujących (PLA, PHA) zarówno w przypadku zastosowań w farmacji w systemach sterowanego uwalniania leków, jak i w odniesieniu do kinetyki zmian i umiejscowienia implantów biodegradujących [37–39]. Dzięki analizom możliwości hodowli wybranych linii komórkowych w kontakcie z materiałami biodegradowalnymi [39, 40] ocenia się ich biodegradację oraz ewentualną możliwość wykorzystania na rusztowania w inżynierii tkankowej [41].

Prowadząc badania oznaczania stopnia degradacji oraz kinetyki zmian pod wpływem czynników zewnętrznych, należy jednak pamiętać o tym, że symulując środowisko biologiczne, otrzymuje się przybliżone wyniki, a weryfikacja błędu jest możliwa jedynie poprzez prowadzenie niezależnych badań przez różne ośrodki. Ograniczone doniesienia literaturowe z zakresu wyznaczania zmian kątów zwilżania, zmian swobodnej energii powierzchniowej czy wyznaczania wartości krytycznej swobodnej energii powierzchniowej dla polimerów w trakcie procesu biodegradacji pozostawiają otwarty temat interpretacji wyników.

Obiecujące trendy rozwoju materiałów opracowywanych *de novo*, modyfikacji powierzchni implantów oraz wprowadzenia materiałów gradientowych lub biodegradujących poszerzają obszar ich zastosowań medycznych. Pozwala to na projektowanie materiałów pod względem zarówno wytrzymałości na zmienne obciążenia zewnętrzne i wewnętrzne, jak i optymalizacji strukturalnej.

Zmiany kąta zwilżania oraz SEP mogą służyć do oceny wpływu środowiska wodnego na zmiany właściwości warstwy wierzchniej materiału oraz postępu procesu degradacji. Wymaga to jednak korelacji zmian kąta zwilżania i SEP ze zmianami innych parametrów, tj. np. zmiany właściwości mechanicznych lub pH i przewodności wyciągów wodnych z polimerów. Ocena kinetyki procesu degradacji badanych polimerów na podstawie zmian różnych wskaźników będzie przedmiotem innego opracowania.

Piśmiennictwo

- [1] **Żenkiewicz M.**: Adhezja i modyfikowanie warstwy wierzchniej tworzyw wielkocząsteczkowych. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2000.
- [2] **Park J.B., Bronzino J.D.**: Biomaterials: Principles and applications, CRC Press, Nowy Jork, USA 2003.
- [3] **Ratner B.D. et al.**: Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. Elsevier, New York, USA 2004.
- [4] **Goddard, J.M., Hotchkiss, J.H.**: Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress Polym. Sci.* 2007, 32, 698–725.
- [5] **Xu, L.C.**: Effect of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials* 2007, 28, 3273–3283.
- [6] **Kaczmarek H., Bajer K.**: Metody badania biodegradacji materiałów polimerowych. *Polimery* 2006, 51, (10), 716–721.
- [7] **Kim M.S., Khang G., Lee H.B.**: Gradient polymer surfaces for biomedical applications. *Progress Polym. Sci.* 2008, 33, 1, 138–164.
- [8] **Baier R.E.**: The role of surface energy in thrombogenesis. *Bull. N.Y. Acad. Med.* 1972, 48, 2, 257–272.
- [9] **Van Oss C.J.**: Hydrophobicity and hydrophilicity of biosurfaces. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 1997, 2, 503–512.
- [10] **Hazer B., Hazer D.B., Kilicay E.**: Poly(3-hydroxyalkanoates)s: Diversification and biomedical applications. A state of art review. *Materials Science and Engineering C* 2012, 32, 637–647.
- [11] **Ishii D., Hui Ying T., Yamaoka T., Iwata T.**: Characterization and biocompatibility of biopolyester nanofibers. *Materials* 2009, 2, 1520–1546.
- [12] **Keshavarz T., Roy I.**: Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Curr. Opin. Microbiol.* 2010, 13, 321–326.
- [13] **Lyu S., Untereker D.**: Degradability of Polymers for Implantable Biomedical Devices. *Int. J. Mol. Sci.* 2009, 10, 4033–4065.
- [14] **Li S., Girard A., Garreau H., Vert M.**: Enzymatic degradation of polylactide stereocopolymers with predominant d-lactyl contents. *Polym. Degrad. Stab.* 2000, 71 (1), 61–67.
- [15] **Tsuji H.**: Autocatalytic hydrolysis of amorphous-made polylactides: effects of l-lactide content, tacticity, and enantiomeric polymer blending. *Polymer* 2002, 43, 1789–1796.
- [16] **Nowak B., Pająk J.**: Biodegradacja polilaktydu (PLA). *Archiwum Gospodarki Odpadami i Ochrony Środowiska* 2010, 12 (2), 1–10.
- [17] **Vieira A.C., Vieira J.C., Ferra J.M., Magalhaes F.D., Guedes R.M., Marques A.T.**: Mechanical study of PLA–PCL fibers during *in vitro* degradation. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2011, 4 (3), 451–460.
- [18] **Saha S.K., Tsuji H.**: Enhanced Crystallization of Poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) in the Presence of Water. *J. Appl. Polym. Sci.* 2009, 112, 715–720.
- [19] **Farrar D.F., Gilson R.K.**: Hydrolytic degradation of polyglyconate B: the relationship between degradation time, strength and molecular weight. *Biomaterials* 2002, 23, 3905–3912.
- [20] **Szaraniec B., Ziabka M., Morawska-Chochół A., Chłopek J., Zdebiak P., Piątek M., El Fray M.**: Badania degradacji hydrolytycznej *in vitro* włókien resorbowalnych przeznaczonych na implanty medyczne. *Inżynieria Biomateriałów/Engineering of Biomaterials* 2007, 69–72, 114–117.
- [21] **Ziabka M., Szaraniec B., Chłopek J.**: Resorbowalne kompozyty polimerowe dla chirurgii kostnej. *Przegl. Lek.* 2007, 64, 216–219.
- [22] **Żenkiewicz M.**: Analiza głównych metod badania swobodnej energii powierzchniowej materiałów polimerowych. *Polimery* 2007, 52, 10, 760–767.
- [23] **Pinto A.M., Moreira S., Goncalves I.C., Gama F.M., Mendes A.M., Magalhaes F.D.**: Biocompatibility of poly(lactic acid) with incorporated graphene-based materials. *Coll. Surf. B: Biointerfaces* 2013, 104, 229–238.
- [24] **Kang I.K., Choi S.H., Shin D.S., Yoon S.C.**: Surface modification of polyhydroxyalkanoate films and their interaction with human fibroblasts. *Int. J. Biol. Macromol.* 2001, 28, 205–212.
- [25] **Zheng Z., Bei F.F., Tian H.L., Chen G.Q.**: Effects of crystallization of polyhydroxyalkanoate blend on surface physicochemical properties and interactions with rabbit articular cartilage chondrocytes. *Biomaterials* 2005, 26, 3537–3548.
- [26] **Wan Y., Yang J., Yang J., Bei J., Wang S.**: Cell adhesion on gaseous plasma modified poly-(l-lactide) surface under shear stress field. *Biomaterials* 2003, 24, 3757–3764.
- [27] **Correlo V.M., Pinho E.D., Pashkuleva I., Bhattacharya M., Neves N.M., Reis R.L.**: Water absorption and degradation characteristics of chitosan-based polyesters and hydroxyapatite composites. *Macromol. Biosci.* 2007, 7, 354–363.
- [28] **Pamuła E., Dryzek E., Dobrzyński P.**: Hydrolytic degradation of poly(L-lactide-co-glycolide) studied by positron annihilation lifetime spectroscopy and other techniques. *ACTA Physica Polonica A* 2006, 110(5), 631–640.
- [29] **Busscher H.J., Weerkamp A.H., Van Der Mei H.C., Van Steenberghe D., Quirynen M., Pratt I.H., Marechal M., Rouxhet P.G.**: Physico-chemical properties of oral streptococcal cell surfaces and their relation with adhesion to solid substrata *in vitro* and *in vivo*. *Coll. Surf.* 1989, 42, 345–353.
- [30] **Ryan J.A.**: Evolution of Cell Culture Surfaces. *BioFiles* 2008, 3.8, 21.
- [31] **Xu L.C., Siedlecki C.A.**: Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials* 2007, 28, 3273–3283.
- [32] **Combe E.C., Owen B.A., Hodges J.S.**: A protocol for determining the surface free energy of dental materials. *Dent. Mater.* 2004, 20, 262–268.
- [33] **Harnett E.M., Alderman J., Wood T.**: The surface energy of various biomaterials coated with adhesion molecules used in cell culture. *Coll. Surf. B: Biointerfaces* 2007, 55, 90–97.

- [34] Fuse Y., Hirata I., Kurihara H., Okazaki M.: Cell Adhesion and Proliferation Patterns on Mixed Self-assembled Monolayers Carrying Various Ratios of Hydroxyl and Methyl Groups. *Dent. Mater. J.* 2007, 26(6), 814–819.
- [35] Namen F., Galan J., Oliveira J., Cabreira R.: Surface Properties of Dental Polymers: Measurements of Contact Angles, Roughness and Fluoride Release. *Mater. Res.* 2008, 11, 3, 239–243.
- [36] Chen G.Q., Wu Q.: The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* 2005, 26, 6565–6578.
- [37] Zhao K., Deng Y., Chen G.Q.: Effects of surface morphology on the biocompatibility of polyhydroxyalkonates. *Biochem. Engineer. J.* 2003, 16, 115–123.
- [38] Sendil D., Gursel I., Wise D.L., Hasirci V.: Antibiotic release from biodegradable PHBV microparticles. *J. Control. Release* 1999, 59, 207–217.
- [39] Wang Y.W., Yang F., Wu Q., Cheng Y.C., Yu P., Chen J., Chen G.Q.: Effect of composition of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) on growth of fibroblast and osteoblast. *Biomaterials* 2005, 26, 755–761.
- [40] Deng Y., Zhao K., Zhang X.F., Hu P., Chen G.Q.: Study on the threedimensional proliferation of rabbit articular cartilage-derived chondrocytes on polyhydroxyalkanoate scaffolds. *Biomaterials* 2002, 23, 4049–4056.
- [41] Wang Y.C., Lin M.C., Wang D.M., Hsieh H.J.: Fabrication of a novel porous PGA-chitosan hybrid matrix for tissue engineering. *Biomaterials* 2003, 24, 1047–1057.

Adres do korespondencji:

Aneta Liber-Kneć
Zakład Mechaniki Doświadczalnej i Biomechaniki
Instytut Mechaniki Stosowanej
Politechnika Krakowska
Al. Jana Pawła II 37
31-864 Kraków
Polska
tel.: 12 628 33 45
e-mail: aliber@pk.edu.pl

Konflikt interesów: nie występuje.

Praca wpłynęła do Redakcji: 8.11.2013 r.

Po recenzji: 4.03.2014 r.

Zaakceptowano do druku: 12.03.2014 r.

Received: 8.11.2013

Revised: 4.03.2014

Accepted: 12.03.2014