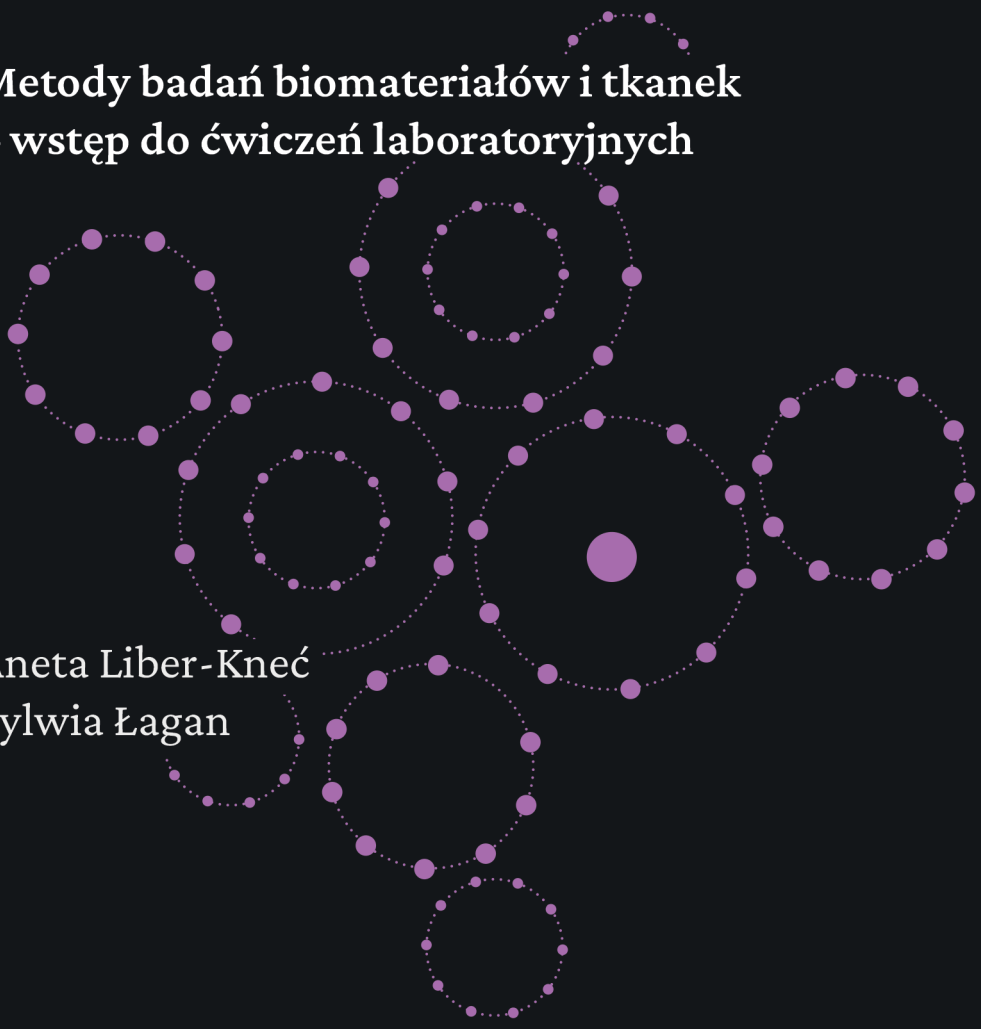
mechanika

Metody badań biomateriałów i tkanek – wstęp do ćwiczeń laboratoryjnych



Aneta Liber-Kneć
Sylwia Łagan

Kraków 2020

Cracow University of Technology

mechanika

Metody badań biomateriałów i tkanek – wstęp do ćwiczeń laboratoryjnych

Aneta Liber-Kneć
Sylwia Łagan

Kraków 2020

PRZEWODNICZĄCY KOLEGIUM REDAKCYJNEGO WYDAWNICTWA POLITECHNIKI KRAKOWSKIEJ
Tadeusz Tatara

PRZEWODNICZĄCY KOLEGIUM REDAKCYJNEGO WYDAWNICTW DYDAKTYCZNYCH
Elżbieta Węcławowicz-Bilska

REDAKTOR SERII – MECHANIKA
Witold Grzegożek

RECENZENT
Grzegorz Milewski

KOORDYNATORZY PROJEKTU
Małgorzata Kowalczyk
Otmar Vogt

REDAKTOR WYDAWNICZY
Agnieszka Filosek

KOREKTA
Dorota Sapek

SKŁAD I ŁAMANIE
Anna Pawlik

PROJEKT OKŁADKI
Karolina Szafran

Tekst został opublikowany w ramach projektu „Programowanie doskonałości – PK XXI 2.0. Program rozwoju Politechniki Krakowskiej na lata 2018-22".
Dofinansowanie z Europejskiego Funduszu Społecznego: 18,048,774.96 PLN

© Copyright by Politechnika Krakowska

https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/

Edycja online
eISBN 978-83-66531-58-1

10,5 ark. wyd.

Wydawnictwo PK, ul. Skarżyńskiego 1, 31-866 Kraków; 12 628 37 25, fax 12 628 37 60
wydawnictwo@pk.edu.pl
www.wydawnictwo.pk.edu.pl
Adres korespondencyjny: ul. Warszawska 24, 31-155 Kraków

Rzeczpospolita
Polska

Unia Europejska
Europejski Fundusz
Rozwoju Regionalnego

SPIS TREŚCI

1. Badania biozgodności biomateriałów 7
   1.1. Wprowadzenie 7
   1.2. Badania *in vitro* 8
      1.2.1. Cytotoksyczność 8
      1.2.2. Genotoksyczność 11
      1.2.3. Badanie procesów degradacji 12
   1.3. Badania *in vivo* 17
2. Tkanki miękkie – charakterystyka właściwości mechanicznych 22
   2.1. Wprowadzenie 22
   2.2. Wpływ budowy tkanek na właściwości 24
   2.3. Modele zwierzęce wykorzystywane w badaniach właściwości tkanek miękkich 31
   2.4. Badania właściwości tkanek miękkich 33
   2.5. Inne metody badań tkanek miękkich 36
3. Rusztowania komórkowe dla potrzeb inżynierii tkankowej 40
   3.1. Wprowadzenie 40
   3.2. Materiały stosowane na rusztowania komórkowe 42
      3.2.1. Materiały ceramiczne 42
      3.2.2. Materiały polimerowe 43
      3.2.3. Metale i ich stopy 47
      3.2.4. Kompozyty 48
      3.2.5. Hydrożele 49
      3.2.6. Zdecelularyzowana naturalna macierz pozakomórkowa 50
      3.2.7. Arkusze komórek z wydzieloną własną macierzą zewnątrzkomórkową 50
   3.3. Metody otrzymywania rusztowań komórkowych 50
      3.3.1. Odlewanie z roztworu polimeru z wymywaniem porogenu 51
      3.3.2. Separacja faz 53
      3.3.3. Formowanie podłoża ze stopu polimeru z wymywaniem porogenu 56
      3.3.4. Spienianie gazem 57
      3.3.5. Elektroprzędzenie 58

3.3.6. Technologie szybkiego prototypowania ... 59
4. Kompozyty polimerowe ... 66
4.1. Wprowadzenie ... 66
4.2. Materiały na wzmocnienia ... 69
4.3. Materiały na osnowę ... 71
4.4. Metody formowania kompozytów ... 72
4.5. Właściwości kompozytów ... 74
4.6. Mechanizmy uszkodzeń kompozytów ... 78
4.7. Materiały kompozytowe do zastosowań biomedycznych ... 79
5. Właściwości powierzchni tkanek i implantów ... 85
5.1. Wybrane pojęcia związane ze stanem energetycznym warstwy wierzchniej ... 85
5.2. Wybrane zagadnienia z teorii adhezji ... 87
5.3. Wybrane metody wyznaczania kąta zwilżania ... 93
5.3.1. Metoda kropli siedzącej ... 96
5.3.2. Metoda pęcherzyka powietrza ... 97
5.3.3. Metoda nachylenia płytki ... 97
5.3.4. Metoda równowagi Wilhelmy'ego ... 98
5.3.5. Metoda penetracji kapilarnej proszków i granulatów ... 98
5.4. Metody wyznaczania stanu energetycznego warstwy wierzchniej ... 98
5.4.1. Metoda Fowkesa ... 99
5.4.2. Metoda Owensa–Wendta ... 100
5.4.3. Metoda van Ossa-Gooda ... 100
5.4.4. Metoda Zismana ... 102
5.4.5. Metoda oparta na pomiarach histerezy kąta zwilżania ... 103
5.5. Podstawowe zagadnienia opisu geometrii powierzchni ... 103
5.5.1. Struktura geometryczna powierzchni ... 103
5.5.2. Pomiary chropowatości powierzchni ... 105
5.6. Wpływ warstwy wierzchniej na interakcje implant–tkanka ... 106
5.7. Znaczenie chropowatości powierzchni na przykładzie implantów tytanowych ... 111
6. Transport membranowy ... 115
6.1. Wprowadzenie ... 115
6.2. Podział membran ... 116
6.3. Podstawowe cechy charakteryzujące membrany i procesy membranowe ... 119
6.4. Podział technik membranowych ... 122
6.5. Metody otrzymywania membran ... 135
6.6. Typy modułów membranowych ... 138
6.7. Zjawiska zakłócające procesy membranowe ... 140
6.8. Wybrane zastosowania membran polimerowych w medycynie ... 143
7. Wyroby medyczne – klasyfikacja, procedury, badania ... 148

7.1. Wprowadzenie 148
7.2. Etapy wdrażania wyrobów implantacyjnyvch 149
7.3. Klasyfikacja wyrobów medycznych wg rozporządzenia UE nr 2017/745 . 150
7.4. Procedury oceny zgodności wyrobów medycznych 158
7.5. Ocena kliniczna wyrobu medycznego 162
7.6 Podsumowanie 164

1. BADANIA BIOZGODNOŚCI BIOMATERIAŁÓW

1.1. WPROWADZENIE

Nauka o biomateriałach jest interdyscyplinarną dziedziną wiedzy, która podlega ciągłemu rozwojowi, umożliwiając postęp w stosowaniu nowych rozwiązań w medycynie. Na przestrzeni lat zmieniała się funkcja biomateriału, początkowo traktowanego wyłącznie jako substytut tkanki, a obecnie również jako materiał, który miałby potencjał do uaktywnienia procesów regeneracyjnych w naprawie uszkodzonej tkanki. Według innego podziału biomateriałów wyróżnia się materiały metaliczne, polimery syntetyczne i biopolimery, materiały ceramiczne, węglowe i kompozytowe, w zastosowaniach medycznych pojawiły się również nanocząstki, nanomateriały czy kropki kwantowe. Wpłynęło to na zmianę sposobu definiowania biomateriału i sformułowania przez Williamsa w 2009 roku nowej definicji, wg której „**biomateriał** jest substancją, która została opracowana w taki sposób, aby mogła być zastosowana jako samodzielny element lub jako część złożonego systemu, w kontrolowanym oddziaływaniu ze składnikami żywych systemów, we wszelkim postępowaniu terapeutycznym lub diagnostycznym, w medycynie i weterynarii" [1].

Materiały, które są stosowane do leczenia, rekonstrukcji lub zastępowania tkanek muszą wykazywać specyficzne właściwości umożliwiające ich oddziaływanie z żywym organizmem, a nadrzędną ich cechą jest biozgodność. „**Biozgodność** jest to zdolność materiału do spełnienia zadania z akceptowalną odpowiedzią gospodarza, w określonym zastosowaniu" [2]. Podstawową normą regulującą metody badań mające na celu ocenę biologiczną wyrobów i materiałów medycznych jest norma PN-EN ISO 10993: Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Wszystkie materiały mające kontakt z organizmem żywym muszą mieć odpowiednie właściwości biologiczne, których ocena wymaga wielu badań fizykochemicznych, mechanicznych, biologicznych w warunkach *in vitro* i *in vivo*, przedklinicznych oraz klinicznych. Przy wstępnym wyborze procedur badawczych zalecanych dla wyrobów medycznych należy uwzględnić kilka aspektów, tj.:

1) charakter, stopień, czas trwania, częstotliwość i warunki narażenia organizmu żywego lub kontaktu z wyrobem medycznym podczas normalnego użytkowania zgodnego z przeznaczeniem,
2) chemiczną i fizyczną charakterystykę wyrobu medycznego,

3) aktywność toksykologiczną substancji wykorzystanych do wytworzenia wyrobu medycznego,
4) brak zastosowania niektórych badań (np. tych mających na celu ocenę skutków ogólnoustrojowych), jeżeli wykluczono obecność substancji chemicznych wymywalnych lub jeśli substancje chemiczne mają znany i dopuszczalny profil toksyczności pozwalający na bezpieczne użycie, ocenione wg PN-EN ISO 10993-17 oraz ocenę ryzyka wg ISO 14971,
5) stosunek powierzchni wyrobu medycznego i ciała pacjenta,
6) dostępność wyników badań w literaturze, czułość i swoistość testu w odniesieniu do odpowiedniego zestawu danych z oceny biologicznej,
7) ochronę ludzkiego życia, która jest celem nadrzędnym, zapewnienie ochrony zwierząt i minimalizacja badań z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych.

Ogólne zalecenia dotyczące wyboru badań w ocenie wstępnej proponowane w normie PN-EN ISO 10993-1 przedstawiono w tabeli 1.1. Jak wynika z tabeli, kryteriami, które bierze się pod uwagę w planowaniu badań biologicznych jest rodzaj kontaktu wyrobu z organizmem (wyroby inwazyjne/nieinwazyjne) oraz czas trwania kontaktu. Czas trwania kontaktu podzielono na trzy rodzaje: A – ograniczony (≤24 godziny), B – przedłużony (24 godziny do 30 dni), C – stały (powyżej 30 dni).

W kolejnych podrozdziałach zostały opisane wybrane metody oceny biologicznej wyrobów medycznych.

1.2. BADANIA *in vitro*

1.2.1. CYTOTOKSYCZNOŚĆ

Materiał toksyczny jest zdefiniowany jako materiał, który uwalnia substancję chemiczną w ilości wystarczającej do zabicia komórek albo bezpośrednio, albo pośrednio przez hamowanie głównych dróg metabolicznych. Testy cytotoksyczności to podstawowe testy stosowane w badaniach biokompatybilności *in vitro* biomateriałów dla każdego nowego materiału, w których ocenia się ich cytotoksyczne działanie na komórki biorcy. Wykorzystuje się do tego celu linie komórkowe (np. osteoblastów, chondroblastów, chondrocytów, fibroblastów i komórek nabłonkowych), które poddaje się bezpośrednio lub pośrednio działaniu badanego materiału lub substancji wyekstrahowanych z badanego materiału. Linie komórkowe są bardzo wrażliwe i ujawniają charakterystyczne oznaki toksyczności w obecności potencjalnie szkodliwych substancji wymywalnych. Aktywność cytotoksyczną można ocenić poprzez bezpośredni lub pośredni pomiar zmian zachodzących w komórce poddanej działaniu danego związku. Ocenę taką prowadzi się w odniesieniu do układu kontrolnego – hodowli komórek bez badanego związku lub ze związkiem, o którym wiadomo, że jest

Tabela 1.1

Ogólne zalecenia dotyczące wyboru badań w ocenie wstępnej wyrobu medycznego wg PN-EN ISO 10993-1 [3]

Kryterium klasyfikacji wyrobów medycznych			Działanie biologiczne									
Rodzaj kontaktu z organizmem		Czas trwania kontaktu: A, B, C	cytotoksyczność	działanie uczulające	działanie drażniące lub reaktywność śródskórna	toksyczność ogólnoustrojowa (ostra)	toksyczność subchroniczna (podostra)	genotoksyczność	implantacja	zgodność z krwią	toksyczność przewlekła	rakotwórczość
kategoria	kontakt											
Wyroby kontaktujące się z powierzchnią	skóra	A	+	+	+							
		B	+	+	+							
		C	+	+	+							
	błony śluzowe	A	+	+	+							
		B	+	+	+							
		C	+	+	+		+	+				
	przerwane lub uszkodzone powierzchnie	A	+	+	+							
		B	+	+	+							
		C	+	+	+		+	+				
Wyroby kontaktujące się zewnętrznie	system krwionośny pośredni	A	+	+	+	+				+		
		B	+	+	+	+				+		
		C	+	+		+	+			+	+	+
	tkanka miękka/kość/ zębina	A	+	+	+							
		B	+	+				+	+			
		C	+	+				+	+			+
	krew krążąca	A	+	+	+	+				+		
		B	+	+	+	+		+	+	+		
		C	+	+	+	+	+	+		+	+	+
Wyroby implantowane	tkanka miękka i kość	A	+	+	+							
		B	+	+				+	+			
		C	+	+				+	+		+	+
	krew	A	+	+	+	+			+	+		
		B	+	+	+	+		+	+	+		
		C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

cytotoksyczny w określonym zakresie stężeń. Do oceny aktywności cytotoksycznej wykorzystywany jest cały szereg testów, bazujących na:

1) ocenie żywotności i typów śmierci komórek,
2) ocenie morfologii komórek,
3) szacowaniu zdolności adhezji komórek do biomateriału,
4) badaniu zdolności komórek do proliferacji,
5) ocenie aktywności enzymatycznej komórek [4].

Norma 10993, część 5: Badania cytotoksyczności *in vitro*, zaleca trzy testy do oceny działania toksycznego wyrobów medycznych w zależności od rodzaju materiału, z którego są wykonane i ich przeznaczenia:

– kontakt bezpośredni,
– dyfuzja w agarze[1],
– test na ekstraktach [5].

Testy te pozwalają na jakościową i ilościową ocenę toksyczności wyrobu medycznego.

Procedura bezpośredniego kontaktu jest polecana dla materiałów o niskiej gęstości. W tej metodzie materiał testowy umieszcza się bezpośrednio na jednowarstwowej konfulentnej[2] hodowli. Inkubację prowadzi się w temperaturze 37°C przez minimum 24 godziny. Podczas inkubacji wymywalne substancje chemiczne z badanego materiału mogą dyfundować do pożywki hodowlanej i kontaktować się z warstwą komórkową. Reaktywność badanej próbki wskazywana jest przez śmierć lub zmiany morfologii komórek wokół materiału testowego, również przez utratę ich przyczepności do dna naczynia hodowlanego.

Test dyfuzji w agarze jest odpowiedni dla materiałów o wysokiej gęstości. W tej metodzie cienka warstwa agaru z dodatkiem składników odżywczych umieszczana jest nad hodowanymi komórkami, a badany materiał (lub wyciąg z materiału testowego wysuszony na bibule filtracyjnej) rozmieszczany jest na warstwie agaru. Hodowle poddaje się inkubacji w czasie od 24 do 72 godzin w temperaturze 37°C, w trakcie której substancje chemiczne z badanego materiału dyfundują poprzez warstwę agaru do hodowli komórkowej. Użycie specjalnego barwnika do oznaczania komórek żywych, osadzonego w agarze, umożliwia obserwację utraty zabarwienia wokół komórek martwych, co wskazuje na działanie toksyczne badanego materiału.

W teście na wyciągach wykorzystuje się ekstrakty z badanego materiału w celu określenia reaktywności biologicznej związków chemicznych wymywanych w układzie biologicznym. Warunki ekstrakcji powinny odzwierciedlać rzeczywiste warunki, w jakich wyrób będzie użytkowany. Przygotowany ekstrakt z materiału jest umieszczany w naczyniu hodowlanym z komórkami i inkubowany przez minimum 24 godziny w temperaturze 37°C. Po inkubacji komórki bada się pod mikroskopem, oceniając ich morfologię i przeżywalność.

[1] Agar to polimer w formie żelu, pochodzący z alg czerwonych.
[2] Hodowla konfluentna to hodowla, w której komórki zajmują 100% dostępnej powierzchni wzrostu.

Zgodnie z normą ISO 10993-5 w teście na wyciągach oceniane są zmiany morfologiczne komórek wywołane przez wyekstrahowane substancje z badanego materiału, w odniesieniu do 5-stopniowej skali toksyczności:

- stopień 0: wyrób nietoksyczny (pojedyncze wewnątrzplazmatyczne ziarnistości),
- stopień 1: wyrób słabo toksyczny (ok. 2% komórek zaokrąglonych i odlepiających się, pojedyncze komórki rozerwane),
- stopień 2: wyrób umiarkowanie toksyczny (ok. 50% komórek zaokrąglonych, umiarkowana liza komórek, zahamowanie proliferacji w ok. 50%),
- stopień 3: wyrób średnio toksyczny (ok. 7% komórek zaokrąglonych i odlepiających się, zaawansowana liza komórek, zahamowanie proliferacji),
- stopień 4: wyrób silnie toksyczny (praktycznie zniszczona hodowla).

Dla testów w kontakcie bezpośrednim i dyfuzji w agarze 5-stopniowa skala toksyczności oparta jest na ocenie strefy reaktywności badanego materiału na komórki:

- stopień 0: wyrób nietoksyczny (brak strefy reaktywności wokół lub pod próbką),
- stopień 1: wyrób słabo toksyczny (kilka zdeformowanych lub zdegenerowanych komórek pod próbką),
- stopień 2: wyrób umiarkowanie toksyczny (strefa reaktywności ograniczona do obszaru pod próbką),
- stopień 3: wyrób średnio toksyczny (strefa reaktywności rozszerzona do 1 cm poza próbkę),
- stopień 4: wyrób silnie toksyczny (strefa reaktywności rozszerzona powyżej 1 cm poza próbkę).

Do oceny ilościowej zmian w żywotności komórek norma PN-EN ISO 10993-5 zaleca stosowanie testu z czerwienią obojętną (NR), MTT lub jego odmiany XTT, a także testu tworzenia kolonii. Miarą aktywności cytotoksycznej badanej substancji jest określenie stężenia hamującego IC_{50} (ang. *inhibitory concentration*), dla którego wzrost i proliferacja komórek w hodowli zostają zahamowane w 50% w stosunku do wzrostu komórek kontrolnych [5].

Jeżeli testy cytotoksyczności wykażą brak szkodliwego działania biomateriału, wówczas testuje się inne właściwości.

1.2.2. GENOTOKSYCZNOŚĆ

Genotoksyczne działanie materiałów implantu i powiązanych cząstek jest powszechnie uważane za ważny aspekt długoterminowej oceny bezpieczeństwa materiałów w ludzkim ciele. Badanie genotoksyczności jest przeznaczone do wykrywania związków, które powodują uszkodzenia genetyczne bezpośrednio lub pośrednio w komórkach narażonych na działanie toksycznych substancji. Genotoksyczność jest właściwością środka chemicznego, fizycznego lub biologicznego, który wchodzi

w interakcje i powoduje wszelkie uszkodzenia samego DNA lub składników regulujących DNA, a środki te nazywane są genotoksynami. Badania genotoksyczności materiałów opierają się na ich kategoryzacji w zależności od rodzaju kontaktu z ciałem i czasu trwania kontaktu. Zgodnie z normami ISO wyroby medyczne ze stałym kontaktem poprzez powierzchnię, a także wyroby implantacyjne o przedłużonym narażeniu lub stałym kontakcie wymagają badania genotoksyczności. Działanie genotoksyczne wiąże się z powstawaniem mutacji genowych, aberracji chromosomowych lub wpływem na DNA. Są to trzy podstawowe typy wpływu genotoksycznego oceniane w badaniach. Istnieje szeroka gama metod wykrywania genotoksycznego działania środków chemicznych i materiałów. Badania te można przeprowadzać z wykorzystaniem bakterii i drożdży lub linii komórkowych ssaków *in vitro*. Nie ma jednego testu *in vitro*, który byłby w stanie wykryć wszystkie rodzaje skutków genotoksycznych, dlatego często konieczne jest przeprowadzenie zestawu dwóch lub więcej różnych testów [11]. Zgodnie z ISO 10993-3 testy *in vivo* są wymagane tylko w przypadku, gdy pozytywne wyniki testów *in vitro* wskazują na potrzebę dalszych badań [12]. Normy ISO 10993-1 i 10993-3 wymieniają testy, które mogą być wykorzystane w badaniach genotoksyczności, a szczegółowe opisy testów zawarte są w zaleceniach Organizacji Współpracy Ekonomicznej i Rozwoju (OECD). Rekomenduje się wybór jednego z poniższych testów:

- test mutacji genu chłoniaka myszy, który jest preferowany, ponieważ wykrywa najszerszy zestaw mechanizmów genotoksycznych związanych z działaniem mutagennym i rakotwórczym (OECD 490 (2015): Wytyczne dotyczące testowania chemikaliów – test mutacji genów komórek ssaków *in vitro*);
- test aberracji chromosomowej *in vitro* (CA) (OECD 473 (2014): Wytyczne dotyczące testowania chemikaliów – test aberracji chromosomowej *in vitro*);
- test mikrojądrowy *in vitro* (OECD 487 (2014): Wytyczne dotyczące testowania substancji chemicznych – test mikrojądrowy w komórkach ssaków *in vitro*).

1.2.3. BADANIE PROCESÓW DEGRADACJI

W ocenie przydatności materiałów na wyroby medyczne niezbędna jest analiza ich trwałości w kontakcie ze środowiskiem organizmu ludzkiego. Każdy materiał w warunkach środowiska biologicznego podlega zmianom, które mogą mieć wpływ na właściwości fizykochemiczne, mechaniczne, jak również biologiczne. Na skutek degradacji mogą pojawiać się produkty, których wpływ na organizm może być odmienny od wpływu samego materiału. Produkty te mogą powstawać w wyniku ruchu względnego pomiędzy elementami wyrobu medycznego lub tkanką i ich mechanicznego zużycia, procesów zmęczeniowych lub procesów uwalniania substancji wymywalnych z materiału. Zużycie mechaniczne prowadzi do uwalniania cząstek materiału, natomiast uwalnianie substancji chemicznych z materiału na skutek wymywania, rozpadu chemicznego lub korozji może prowadzić do powstawania

wolnych jonów lub produktów reakcji w postaci związków organicznych i nieorganicznych. Produkty degradacji mogą być reaktywne lub stabilne (niewchodzące w reakcje ze środowiskiem organizmu żywego). Jednak kumulacja stabilnych produktów degradacji może wpływać na otaczające tkanki. Dodatkowo produkty te mogą pozostawać w miejscu ich pojawienia się lub migrować w środowisku biologicznym na skutek różnych mechanizmów [6]. Ramowy plan identyfikacji i oznaczania ilościowego potencjalnych produktów degradacji został sformułowany w arkuszu 9 normy ISO 10993. Dodatkowo arkusz 12 podaje wytyczne odnośnie do przygotowania próbek i materiałów odniesienia do badań (ISO 10993-12), a arkusze 13, 14 i 15 zawierają wytyczne dotyczące identyfikacji i oznaczania ilościowego produktów degradacji polimerów (ISO 10993-13), ceramiki (ISO 10993-14) oraz metali i stopów (ISO 10993-15).

Podstawowe pojęcia dotyczące przygotowania i prowadzenia badań procesów degradacji, które pojawiają się w wyżej wymienionych normach, ułatwiając tym samym analizę i porównywanie wyników badań pochodzących z różnych ośrodków badawczych, to [6, 7]:

1) degradacja – rozkład materiału,
2) biodegradacja – degradacja w środowisku biologicznym (może być modelowana w testach *in vitro*),
3) ekstrakt – wyodrębniony składnik materiału, który nie jest produktem degradacji chemicznej,
4) produkt degradacji – każda cząstka lub związek chemiczny, które pochodzą z chemicznego rozkładu materiału wyjściowego,
5) środowisko badań – ulokowanie wyrobu medycznego obejmujące otaczające tkanki, płyny i biomolekuły,
6) przyspieszona degradacja – degradacja wyrobu w warunkach środowiska, które powodują skrócenie procesu, ale nie powodują zmian we właściwościach chemicznych materiału (np. podwyższona temperatura),
7) próbka reprezentatywna – wyrób medyczny, składnik materiału, ekstrakt lub jego część, który jest przedmiotem oceny,
8) kontrola pozytywna – dobrze opisany (znany) materiał o udokumentowanym pozytywnym zachowaniu się w warunkach przeprowadzonego testu,
9) kontrola negatywna – dobrze opisany (znany) materiał o udokumentowanym negatywnym zachowaniu się w warunkach przeprowadzonego testu,
10) materiał referencyjny (RM) – materiał z co najmniej jedną cechą istotną dla danego zastosowania, która jest wystarczająco powtarzalna, umożliwiając jego użycie, np. do kalibracji aparatury lub oceny procedury,
11) stabilność materiału (właściwości) – zdolność materiału do utrzymywania określonej odpowiedzi biologicznej w określonych warunkach i czasie inkubacji.

Badania degradacji powinny być przeprowadzone, jeżeli dany wyrób medyczny jest biodegradowalny lub przeznaczony do implantacji w czasie dłuższym niż 30 dni, lub istnieje uzasadnione podejrzenie uwalniania się toksycznych substancji do organizmu w czasie trwania kontaktu wyrobu medycznego z organizmem. Jeżeli przypuszczalne produkty degradacji mają te same właściwości, przewidywalną ilość i to samo tempo uwalniania lub jeżeli ich właściwości fizyczne (tj. rozmiar, kształt, rozmieszczenie) są podobne do produktów o potwierdzonym wcześniej w zastosowaniach klinicznych bezpieczeństwie, badania degradacji nie są wymagane [3].

Ocena procesów degradacji w badaniach *in vitro* przeprowadzana jest w środowisku symulującym warunki, w jakich dany wyrób medyczny będzie spełniał swoje funkcje. Jeżeli wyrób medyczny nie może być poddany badaniom w całości, należy przygotować próbkę reprezentatywną w taki sposób, aby uzyskać efekt maksymalnej ekspozycji wszystkich komponentów wyrobu, istotnych z punktu widzenia odpowiedzi biologicznej. Norma ISO 10993-9 dopuszcza również badania degradacji z wykorzystaniem ekstraktów z materiałów badanych. Proces ekstrakcji prowadzi się przy zachowaniu określonych w normie warunków, takich jak czas i temperatura (np. 37°C przez 72 godziny), stosunek masy lub powierzchni materiału do objętości środka ekstrakcyjnego (np. 1:10 lub 6 cm^2:1 ml), który zależy od grubości materiału oraz rodzaju cieczy ekstrakcyjnej. Do ekstrakcji wykorzystuje się media polarne, takie jak woda destylowana, roztwór soli fizjologicznej i medium hodowlane pozbawione surowicy oraz media niepolarne (np. oleje roślinne), a także roztwory mieszane (np. etanol/woda).

Opisane szerzej poszczególne arkusze normy ISO 10993, dedykowane ocenie procesów degradacji dla poszczególnych grup biomateriałów, wskazują jedynie zasadnicze warunki prowadzenia testów degradacji. Nie uwzględniono w nich badań degradacji wywołanych obciążeniami mechanicznymi, wysoką energią (np. temperatura, przepływ prądu) czy aktywnością biologiczną.

Identyfikacja i oznaczanie produktów rozkładu materiałów polimerowych

Ze względu na oddziaływania materiału polimerowego ze środowiskiem naturalnym wyróżnia się polimery biostabilne, które w czasie użytkowania nie ulegają procesom degradacji oraz degradowane, które rozkładają się w czasie użytkowania. Produkty degradacji materiałów polimerowych powstają głównie w wyniku rozerwania wiązań chemicznych w łańcuchu polimerowym, najczęściej w procesach hydrolitycznych, ale możliwe są również mechanizmy degradacji, takie jak oksydegradacja, fotodegradacja i degradacja enzymatyczna, która nazywana jest biodegradacją. W grupie polimerów degradowanych można wyróżnić również polimery bioresorbowalne, czyli takie, których produkty rozkładu są wchłaniane przez komórki i wchodzą w cykl przemian metabolicznych [4, 9].

Procedury oznaczania produktów rozkładu polimerów, opisane w przedmiotowej normie, dotyczą badań wyrobów medycznych z polimerów biostabilnych [8]. Bada-

nia degradacji mogą być prowadzone dwoma metodami: w czasie przyspieszonym (metoda przesiewowa) oraz w czasie rzeczywistym w symulowanym środowisku biologicznym. Degradację w czasie przyspieszonym prowadzi się w temperaturze wyższej niż 37°C, ale poniżej temperatury mięknienia czy topnienia danego polimeru. Czas badania i kontrola stopnia degradacji uzależnione są od przewidywanego czasu kontaktu danego materiału lub wyrobu z tkankami i mogą być modyfikowane. Według zaleceń normy dla wyrobów o czasie kontaktu z tkankami krótszym niż 30 dni stopień degradacji ocenia się po 2 i 7 dniach. Przy kontakcie dłuższym niż 30 dni ocenę degradacji przeprowadza się po 2 i 60 dniach. Degradację w czasie rzeczywistym prowadzi się w temperaturze 37°C, a częstotliwość kontroli stopnia degradacji, tak jak w metodzie przyspieszonej, zależy od przewidywanego czasu kontaktu materiał–tkanka. Jeżeli przewidywany czas kontaktu jest krótszy niż 30 dni, ocena stopnia degradacji przeprowadzana jest czterokrotnie (w tym w 30 dniu). Dla czasu kontaktu dłuższego niż 30 dni kontrole przeprowadza się po 1, 3, 6 i 12 miesiącach.

Rodzaj zastosowanego płynu inkubacyjnego zależy od mechanizmu degradacji (hydrolityczna/utleniająca), środowiska implantacji/pracy materiału oraz pH tego środowiska. Jeżeli przewidywany jest mechanizm degradacji hydrolitycznej, stosuje się wyciągi wodne lub buforowane (np. PBS), a dla degradacji utleniającej wyciągi przygotowuje się z nadtlenku wodoru lub odczynnika Fentona. Stosuje się minimum trzy próbki reprezentatywne oraz próbkę odniesienia (pojemnik z PP lub PTFE z wyciągiem bez materiału badanego). Ocena degradacji prowadzona jest na podstawie bilansu masy oraz pomiarze masy cząsteczkowej. Jeżeli wyniki badania degradacji przyspieszonej nie wykazują zmian w bilansie masy i masie cząsteczkowej, badania w warunkach symulowanego środowiska biologicznego nie są konieczne. Zmiana jednego z badanych parametrów wymaga przeprowadzenia badań w czasie rzeczywistym [8].

Identyfikacja i oznaczanie produktów rozkładu materiałów ceramicznych

Procedury badania degradacji materiałów ceramicznych opisane w przedmiotowej normie dotyczą materiałów ceramicznych, które ulęgają rozkładowi pod wpływem środowiska wodnego [10]. Badania degradacji mogą być realizowane według dwóch procedur: testu z wykorzystaniem roztworu ekstremalnego o niskim pH (3,0±0,2) oraz testu w warunkach symulujących środowisko naturalne (7,4±0,1). Testy te mogą być stosowane do wszystkich rodzajów materiałów ceramicznych w całej masie w postaci granul, proszków oraz pokryć ceramicznych. Przygotowanie próbek do badań polega na ich granulowaniu do określonego w normie wymiaru, a następnie przygotowaniu wyciągów ekstrakcyjnych o stosunku masy próbki do objętości roztworu 1 g/20 ml. Masa próbki zastosowanej do badań jest uzależniona od rozpuszczalności materiału. Dla granulowanych materiałów o niskiej rozpuszczalności minimalna ilość materiału to 5 g, dla granulowanych materiałów o wysokiej rozpuszczalności minimalna ilość materiału to 10 g.

Test z wykorzystaniem roztworu ekstremalnego o niskim pH polega na inkubacji próbki w zbuforowanym roztworze kwasu cytrynowego o pH 3,0±0,2 w temperaturze 37°C przez 120 godzin. W trakcie badania roztwór musi być wstrząsany z określoną częstotliwością. Po zakończeniu inkubacji medium jest filtrowane i zarówno ekstrakt, jak i próbki oraz ewentualne produkty degradacji są poddawane ocenie ilościowej i jakościowej. Właściwości określone dla materiału wyjściowego, takie jak rozwinięcie powierzchni, gęstość i mikrostruktura, są porównywane z materiałem po teście degradacji.

Test w warunkach symulujących środowisko naturalne jest przeprowadzany w roztworze o pH 7,4±0,1, np. TRIS-HCl w temperaturze 37°C przez 120 godzin. W trakcie badania roztwór musi być wstrząsany z określoną częstotliwością. Materiały ceramiczne powłokowe są badane z użyciem próbek w postaci dysków o zdefiniowanym kształcie i wymiarach, na które nanosi się powłokę metodą stosowaną przy wytwarzaniu danego wyrobu. Pozostałe materiały ceramiczne przygotowuje się poprzez ich granulowanie, tak samo jak w teście roztworu ekstremalnego. Metodyka badań jest identyczna jak w teście ekstremalnym [10].

Identyfikacja i oznaczanie produktów rozkładu metali i stopów

Środowisko organizmu żywego, które oprócz enzymów i białek, ma dużo makro- i mikroelementów w formie jonowej i stanowi środowisko wodne, w którym materiały metaliczne mogą ulegać degradacji. Arkusz 15 normy ISO 10993 zawiera wytyczne odnośnie do warunków prowadzenia testów degradacji dla wyrobów metalicznych [11]. Stosowane są kombinacje dwóch procedur badawczych, których wybór zależy od funkcji, jakie ma spełniać wyrób medyczny. Pierwsza procedura dotyczy testów potencjostatycznych i potencjodynamicznych, natomiast druga testu immersyjnego. W badaniach stosuje się elektrolit, najczęściej 0,9% roztwór NaCl, można również stosować sztuczną ślinę lub sztuczne osocze. Próbki do badań przygotowuje się w kształcie krążków lub prostokątów.

W teście potencjodynamicznym bada się zachowanie materiału pracującego jako elektroda robocza w środowisku elektrolitu w temperaturze 37°C w trakcie cyklicznie zmiennego potencjału (od 10 do 2000 mV). Pomiar gęstości prądu w zależności od potencjału pozwala na wykreślenie krzywych potencjodynamicznych i wyznaczenie dwóch istotnych punktów: E_p – potencjału przebicia i E_a – potencjału biernej granicy. Test potencjostatyczny polega na przetrzymywaniu próbki w elektrolicie i działaniu prądem o wartości wyższej o 50 mV od potencjału przebicia (E_p) przez określony czas, które powoduje rozpuszczenie produktów degradacji w elektrolicie.

Test immersyjny polega na inkubacji próbki w elektrolicie (o zmierzonym pH) w temperaturze 37°C przez 7 dni. Po tym czasie próbka jest usuwana z elektrolitu i mierzone jest jego pH z użyciem pH-metru. Próbka poddawana jest obserwacjom mikroskopowym, a elektrolit analizie ilościowej i jakościowej, np. z wykorzystaniem spektroskopii masowej.

1.3. BADANIA *in vivo*

Badania *in vitro* pozwalają na ocenę biozgodności biomateriału na poziomie komórkowym, jednak kompleksowa ocena oddziaływania biomateriału z organizmem żywym wymaga przeprowadzenia badań *in vivo*. Badania *in vivo* prowadzone z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych pozwalają na ocenę wyrobu przy oddziaływaniu różnych typów komórek, czynników hormonalnych, interakcji z macierzą zewnątrzkomórkową, komórkami krwiopochodnymi, proteinami i molekułami. Umożliwiają określenie ogólnej i miejscowej reakcji tkanek na wczep, procesu gojenia, jak i zmian w samym implancie. Dostarczają również ogólnych informacji, czy dany materiał lub implant działa zgodnie z przeznaczeniem i nie powoduje szkody.

Wstępna ocena biomateriałów *in vivo* zwykle, ale nie wyłącznie, polega na ocenie reakcji zapalnej i odpowiedzi gospodarza na wszczepiony materiał. Na etapie planowania takich badań należy uwzględnić wiele czynników związanych z: doborem zwierząt doświadczalnych (tab. 1.2), rodzajem techniki operacyjnej (w zależności od funkcji, przeznaczenia implantu, miejsca implantacji), rodzajem badań pooperacyjnych (ocena ogólnej i miejscowej reakcji organizmu na wszczep, zmiany w materiale), rodzajem badań patomorfologicznych oraz obserwacjami śródoperacyjnymi [4, 14].

Tabela 1.2

Kryteria doboru zwierząt doświadczalnych do badań [14]

Biomateriał	Zwierzę	Inne
Rozmiar Kształt Czas degradacji Produkty degradacji	Gatunek Wiek Płeć Podłoże genetyczne Stres psychologiczny Metabolizm Rodzaj defektu do leczenia Rodzaj tkanki do regeneracji	Warunki bytowe Wiedza techniczna Procedura chirurgiczna Środki znieczulające Środki przeciwbólowe i antybiotyki Ocena kliniczna Metoda eutanazji Rodzaj badań pooperacyjnych i patomorfologicznych Środki finansowe

Prowadzenie badań na zwierzętach uregulowane jest w licznych przepisach, które mają zapewnić nie tylko odpowiednie przetrzymywanie zwierząt, ale również humanitarne prowadzenie doświadczeń czy stosunkowo bezbolesne przeprowadzanie eutanazji [15]. Przy planowaniu doświadczeń z udziałem zwierząt jako podstawową stosuje się zasadę 3R, według której należy dążyć do [18]: zastępowania eksperymentów na zwierzętach metodami alternatywnymi, tzn. niewymagającymi udziału zwierząt (ang. *replacement*);

– zmniejszenie do niezbędnego minimum liczby zwierząt (ang. *reduction*), jeżeli nie można zrezygnować ze zwierząt w danym eksperymencie;

– w szerszym zakresie wprowadzać zmiany procedur eksperymentalnych na mniej bolesne (ang. *refinement*).

Wytyczne odnośnie do badania reakcji po implantacji, w tym doboru zwierząt doświadczalnych są zawarte w arkuszu 6 normy ISO 10993 [16]. Przewidziano w nim ocenę wczesnego (do 12 tygodni) i odległego (powyżej 12 tygodni) odczynu tkankowego po implantacji. W badaniach krótkookresowych wykorzystuje się zwierzęta, takie jak myszy, szczury, świnki morskie i króliki. W badaniach odległego odczynu tkankowego wykorzystuje się szczury, świnki morskie, króliki, psy, owce kozy i świnie, a badania prowadzi się przez maksymalnie 104 tygodnie.

Badania miejscowego odczynu po implantacji opierają się na badaniach histopatologicznych i mikroskopowych tkanek otaczających implant, jak również samego implantu w funkcji czasu. Na podstawie preparatów histologicznych ocenia się: stopień zwłóknienia tkanki oraz stanu zapalnego, zmiany morfologii tkanki, liczbę i dystrybucję (jako funkcję odległości od strefy kontaktu materiał/tkanka) komórek zapalnych, takich jak granulocyty, limfocyty, makrofagi, komórki plazmatyczne, obecność, zasięg i rodzaj martwicy, inne parametry tkanek, takie jak unaczynienie, naciek tłuszczowy, tworzenie ziarniniaków i kości, parametry materiału (fragmentacja i/lub obecność cząstek, forma i lokalizacja pozostałości materiału po degradacji), przerastanie tkanką implantów porowatych i biodegradowalnych [16].

Badania *in vivo* obejmują również testy toksyczności ogólnoustrojowej, których celem jest ocena wpływu substancji chemicznych uwalnianych z implantu na organy wewnętrzne i tkanki oddalone od miejsca implantacji (np. wątroba, serce, nerki) oraz wpływu na ogólny stan zdrowia. Ocena prowadzona jest na podstawie objawów klinicznych, badaniu hematologii, analizie moczu, biochemii i histopatologii. Wyróżnia się cztery kategorie toksyczności w zależności od czasu pojawienia się negatywnych objawów od momentu podania substancji badanej: ostrą <24 godziny, podostrą od 24-tej godziny do 14 dni, subchroniczną pomiędzy 14 a 28 dniem oraz chroniczną od 6 do12 miesięcy.

Dla wyrobów medycznych wymagane jest również badanie działania drażniącego i działania uczulającego na skórę. Związki chemiczne, które mogą być uwalniane z wyrobu medycznego mogą powodować podrażniania skóry, błon śluzowych i oczu oraz uczulenia skóry. Testy działania drażniącego przeprowadza się na królikach albinosach. Testom poddaje się próbki wyrobu lub ekstrakty, materiały w formie płynu i proszku. W teście podrażnienia kontakt materiału badanego ze skórą zwierzęcia (królik albinos) musi trwać minimum 4 godziny, a obserwacje prowadzi się po 1, 24, 48 i 72 godzinach. Odczyny skórne w postaci obrzęku i rumienia poddaje się ewaluacji i oblicza wskaźnik pierwotnego podrażnienia [17].

Dla wyrobów implantowanych wykonuje się testy reaktywności śródskórnej, które polegają na śródskórnym wstrzyknięciu ekstraktu substancji badanej. Materiał, który wykazał działanie drażniące na skórę, oczy lub błonę śluzową lub jeżeli pH materiału jest mniejsze od 2 lub większe od 11,5 nie jest poddawany badaniu.

Ekstrakt jest wstrzykiwany śródskórnie królikom albinosom w 5 punktach po jednej stronie, po drugiej wstrzykuje się kontrolnie rozpuszczalnik (który był wykorzystany do przygotowania ekstraktu). Obserwacje prowadzi się zaraz po wstrzyknięciu oraz po 24, 48 i 72 godzinach. W celu oceny reaktywności ocenia się obrzęk i rumień, każdy wg 4-stopniowej skali [16].

Testy działania uczulającego na skórę prowadzi się z wykorzystaniem świnek morskich i myszy. Do najczęściej stasowanych testów należą: test lokalnych węzłów chłonnych (LLNA), test maksymalizacji (GPMT) oraz test okluzyjny Buehlera. Test lokalnych węzłów limfatycznych prowadzony na myszach jest obecnie najczęściej wybieranym i zalecanym testem działania uczulającego *in vivo* [19]. W odniesieniu do dwóch pozostałych zmniejsza liczbę wykorzystywanych zwierząt w porównaniu do testów na świnkach morskich, wprowadza znaczne udoskonalenia zmniejszające ból i stres oraz nie wymaga użycia adiuwanta do wywołania reakcji nadwrażliwości skórnej.

Podstawową zasadą leżącą u podstaw testu lokalnych węzłów chłonnych (LLNA) u myszy jest to, że sensybilizatory indukują pierwotną proliferację limfocytów w usznych węzłach chłonnych drenujących miejsce podania substancji chemicznej. Proliferacja limfocytów jest proporcjonalna do dawki i potencjału uczulającego podanego alergenu. Proliferacja jest mierzona poprzez porównanie średniej proliferacji w każdej badanej grupie do średniej proliferacji w grupie kontrolnej (traktowanej tylko nośnikiem substancji badanej). Zwiększoną liczbę komórek proliferujących w drenujących węzłach chłonnych usznych mierzy się za pomocą radioaktywnego znakowania. Co najmniej cztery zwierzęta są wykorzystywane na grupę badaną, przy co najmniej trzech stężeniach badanej substancji. Dodatkowo bada się negatywną grupę kontrolną traktowaną tylko nośnikiem i grupę kontrolną dodatnią. Przez trzy dni podaje się 25 µl substancji na skórę małżowin obu uszu. W szóstym dniu podaje się 3H-metylo-tymidyny, po 5 godzinach pobiera uszne spływowe węzły limfatyczne, przygotowuje zawiesinę komórek węzłów chłonnych i mierzy włączenie 3H-metylo-tymidyny, licząc jako rozpady na minutę. Wyniki są wyrażone jako wskaźnik stymulacji (SI), który powinien być większy lub równy 3,0 [18, 20].

Wszystkie materiały mające pośredni lub bezpośredni kontakt się z krwią muszą być poddane ocenie hemokompatybilności, której wytyczne zawarto w arkuszu 4 normy ISO (wybór badań do interakcji z krwią) [21]. Badaniom poddaje się wyroby, takie jak łaty naczyniowe, zastawki serca, protezy naczyniowe, urządzenia wspomagające krążenie itp. Badany implant ma najczęściej formę pierścienia, łaty lub rury i jest wszczepiany do żyły lub tętnicy zwierzęcia (psy, świnie, króliki). Ocena hemozgodności prowadzona jest na podstawie badania zakrzepicy spowodowanej implantacją wyrobu (np. pomiar przepływu krwi, ocena stopnia niedrożności, pomiar masy skrzepu, ocena mikro- i makroskopowa po implantacji), monitoringu czynników krzepnięcia i fibrynolizy w funkcji czasu po implantacji oraz badania płytek krwi.

LITERATURA

[1] Williams D.F., *On the nature of biomaterials*, Biomaterials 2009, 30, 30, 5897––5909.
[2] Williams D.F. (ed.), *Definitions in biomaterials*, Elsevier, Amsterdam 1987.
[3] PN-EN ISO 10993-1:2009: Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 1: Ocena i badanie w procesie zarządzania ryzykiem.
[4] Błażewicz S., Marciniak J., *Biomateriały*, Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, 2016.
[5] PN-EN ISO 10993-5:2009: Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 5: Badania cytotoksyczności *in vitro*.
[6] PN-EN ISO 10993-9:2010: Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 9: Ramowy plan identyfikacji i oznaczania ilościowego potencjalnych produktów degradacji.
[7] PN-EN ISO 10993-12:2007: Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 12: Przygotowanie próbki i materiały odniesienia.
[8] PN-EN ISO 10993-13:2010: Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 13: Identyfikacja i oznaczanie ilościowe produktów degradacji wyrobów medycznych z polimerów.
[9] Ratner B.D. (ed.), *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Elsevier, 2004.
[10] PN-EN ISO 10993-14:2009: Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 14: Identyfikacja i oznaczanie ilościowe produktów degradacji ceramiki.
[11] PN-EN ISO 10993-15:2009: Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 15: Identyfikacja i oznaczanie ilościowe produktów degradacji metali i stopów.
[12] Cvetković V.J., Miladinov D.T., Stojanović S., *Biomaterials in Clinical Practice: Genotoxicity and Mutagenicity Testing of Biomaterials*, Springer, Switzerland, 2018, 501–527.
[13] PN-EN ISO 10993-3:2014: Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 3: Badania genotoksyczności, rakotwórczości i toksyczności reprodukcyjnej.
[14] Neves N.M, Reis R.L., *Biomaterials from Nature for Advanced Devices and Therapies*, John Wiley & Sons, Inc. Published, 2016, 562–579.
[15] PN-EN ISO 10993-2:2006: Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 2: Wymagania dotyczące postępowania ze zwierzętami.
[16] PN-EN ISO 10993-6:2009: Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 6: Badania miejscowej reakcji po implantacji.
[17] PN-EN ISO 10993-10:2009: Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 10: Badania działania drażniącego i działania uczulającego na skórę.

[18] *Prowadzenie badań na zwierzętach – podstawowe informacje*, https://biotechnologia.pl/biotechnologia/prowadzenie-badan-na-zwierzetach-podstawowe-informacje,12954, dostęp: luty 2020.
[19] Rozporządzenie Komisji (UE) 2017/706 z dnia 19 kwietnia 2017 r. w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH) w odniesieniu do działania uczulającego na skórę.
[20] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Test No. 429: Skin Sensitisation.
[21] PN-EN ISO 10993-4:2009: Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 4: Wybór badań do interakcji z krwią.

2. TKANKI MIĘKKIE – CHARAKTERYSTYKA WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNYCH

2.1. WPROWADZENIE

U podstaw prawidłowego poruszania się w szerokim obszarze ogólnie pojętej inżynierii medycznej znajduje się fizjologia organizmu żywego, ze szczególnym odniesieniem do człowieka, lecz z uwzględnieniem wielu procesów ze świata zwierząt i roślin. Fizjologia człowieka jako nauka o czynnościach żywego organizmu określa zbiór praw fizjologicznych, jakim podlega, w sposób hierarchiczny, cały organizm, jego elementarne układy, narządy, tkanki i wreszcie komórki.

Tkanka to zespół komórek oraz substancji międzykomórkowej (produkowanej przez komórki). W opisie komórek formujących tkankę wyróżnia się ich podobne pochodzenie, zbliżoną strukturę i funkcje. W odniesieniu do tkanek w skali makro zastosowanie ma wiele narzędzi inżynierskich. Pozwala to zarówno na realizowanie eksperymentów w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro* oraz na generowanie modeli komputerowych czy matematycznych z uwzględnieniem symulacji warunków środowiska biologicznego. Metody te, w sposób empiryczny, pozwalają na identyfikację praw zarządzających żywym organizmem. Poznanie praw określających warunki oraz mechanizmy, w jakich prawidłowo funkcjonuje organizm, narząd, tkanka czy komórka pozwala na identyfikację i diagnostykę patologii zachowania układów. Rezultaty badań ujawniają wiele cech i właściwości tkanek, które pomagają w zrozumieniu procesów chorobotwórczych czy procesów naprawczych organów. Również projektowanie sztucznych narządów oraz implantów nie jest możliwe bez poznania odpowiedzi tkanek biologicznych na różnego rodzaju obciążenia (np. termiczne, siłowe, statyczne czy dynamiczne). Dodatkowo współczesna medycyna wykorzystuje znajomość właściwości tkanek i ich odpowiedź na zmienne pole obciążeń, tak w obrazowaniu medycznym, diagnostyce, jak i chirurgii tkanek.

W odniesieniu do tkanek zwierzęcych określono cztery główne rodzaje, tj.: tkankę **nabłonkową**, tkankę **łączną**, tkankę **mięśniową** i tkankę **nerwową**. W charakterystyce tkanek należy pamiętać również o ich formach i funkcjach. Formy tkanki nabłonkowej przyjmują postać wyściółki (pokrywające zewnętrzne i wewnętrzne powierzchnie organizmu) oraz gruczołów (zespołów komórek nabłonkowych pełniących funkcje wydzielnicze). Determinuje to także jej funkcje, takie jak: funkcja

ochronna (np. naskórek), funkcja resorpcyjna (np. nabłonek jelitowy), funkcja wydzielnicza (np. gruczoły), funkcja regulacji transportu przez nabłonek (np. śródbłonek wyścielający naczynia krwionośne) lub wreszcie funkcja zmysłowa (np. kubki smakowe) [1, 2].

Ze względu na fakt, iż żywy organizm posiada strukturę materialną, aby zapewnić środowisko dla skomplikowanej chemii życia, konieczna jest interakcja pomiędzy reakcjami chemicznymi i fizycznymi, co pozwala na dostarczanie energii do utrzymania funkcji życiowych i odnawiania materiałów strukturalnych. Natomiast rozważanie właściwości biologicznych jest naturalnym oraz koniecznym uzupełnieniem właściwości fizycznych i chemicznych (tab. 2.1). Zależnie od warunków, w jakich funkcjonuje organizm, determinowanych przez czynniki fizyczne, chemiczne i biologiczne (temperaturę, wilgotność, pH, wiek, płeć itd.) stanowiące środowisko biologiczne, wartości właściwości materiałowych dla pojedynczego materiału (tkanki) mogą być różne. Przykładowo analizując właściwości tkanek, należy zwrócić uwagę na takie czynniki, jak wiek czy płeć, warunki badania, np. temperaturę czy wilgotność (otoczenia/organizmu), wartość obciążenia (fizjologiczne/patologiczne/urazowe/niszczące), rodzaj wykorzystywanych narzędzi i maszyn inżynierskich, sposób przygotowania próbki do badań, rodzaj/kształt próbki (płaska, przestrzenna, pierścieniowa), sposób obciążenia (jednokierunkowy, dwukierunkowy), kierunek i miejsce oraz lokalizację pobrania próbki, np. względem osi długiej organizmu lub tkanki, sposób i czas przechowywania tkanki po pobraniu, stopień uwodnienia itd.

Nie sposób wymienić wszystkie istotne aspekty, a zatem łatwo jest również pominąć w trakcie badań niektóre z ważnych czynników wpływających na wartości określanych parametrów. Dlatego należyte opisanie sposobu preparatyki próbek, metodyka przeprowadzanych badań oraz warunków ich realizacji jest nieodzowna w każdym projekcie dotyczącym charakterystyki materiałowej, zwłaszcza ze względu na ciągły brak standardów i norm w badaniach wytrzymałościowych biomateriałów i tkanek. W niniejszym rozdziale zostaną opisane podstawowe właściwości wybranych tkanek miękkich (skóry, naczyń krwionośnych oraz więzadeł i ścięgien) możliwe do zidentyfikowania w oparciu o przebieg statycznej próby rozciągania.

Tabela 2.1

Przykładowe właściwości materiałowe wg klas

Klasy właściwości materiałowych		
fizyczne	chemiczne	biologiczne
Mechaniczne: – wytrzymałość (np. na rozciąganie) – twardość – sprężystość/plastyczność – relaksacja – zmęczenie	Reaktywność	Adaptacja funkcjonalna
	Palność	Aktywność/Inertność
	Toksyczność	Zdolność do rozmnażania komórek
	Korozja	Odporność genetyczna

Termiczne: – przewodność cieplna – ciepło właściwe przy stałej temperaturze, przy stałej objętości, przy stałym ciśnieniu – temperatura (np. topnienia, wrzenia)	Smak	Wiek/Starzenie
		Wrażliwość na światło
		Totipotencja
Elektryczne: – oporność – przewodność elektryczna		
Magnetyczne: – przenikalność magnetyczna – impedancja – stała namagnesowania – tłumienie		
Optyczne: – kąt załamania światła – kąt odbicia światła – przenikalność optyczna – emisyjność powierzchni materiału (emisja promieniowania)		
Akustyczne		

2.2. WPŁYW BUDOWY TKANEK NA WŁAŚCIWOŚCI

Tkanki miękkie (tj. skóra, ścięgna czy naczynia krwionośnie), w ujęciu inżynierskim, definiowane są jako materiały kompozytowe wzmacniane włóknami. Z powodu wyraźnej preferencji kierunków ułożenia włókien tkanki wykazują anizotropowy oraz nieliniowy charakter odpowiedzi na obciążenie mechaniczne. Właściwości wytrzymałościowe tkanek miękkich silnie zależą od ich budowy. Zatem aby zrozumieć mechanikę tych tkanek, należy opisać ich poszczególne elementy budowy (kolagen, elastynę i włókna retikulinowe).

Włókna klejorodne, inaczej zwane **włóknami kolagenowymi**, powstają z połączenia mniejszych, gładkich i nierozgałęzionych włókien, których materiałem zespalającym jest substancja podstawowa. Włókna wykazują poprzeczne prążkowanie. Prążki ciemne, w porównaniu do prążków jasnych, zawdzięczają swoją barwę większej liczbie łańcuchów polipeptydowych. Do najważniejszych fizycznych właściwości włókien kolagenowych należą pęcznienie pod wpływem słabego roztworu kwasów oraz rozpuszczanie w silnych roztworach. Jeśli podda się włókna działaniu wysokiej temperatury, powstanie kleista masa, tzw. klej zwierzęcy, a pod wpływem pepsyny i trypsyny dochodzi do rozszczepiania włókien kolagenowych. Włókna ulegają ciągłym zmianom w wyniku działania sił pochodzenia zewnętrznego. W procesie

tworzenia się kolagenu występuje kilka faz. W pierwszej fazie kolagen wywarzany jest przez fibroblasty. Kolagen w tej fazie jest białkiem rozpuszczalnym o nazwie tropokolagen. Następnie kolagen wydzielany jest poza błonę komórkową, gdzie osiąga postać nierozpuszczalnych włókienek. Włókienka łączą się ze sobą, tworząc włókna kolagenowe stanowiące trwałą strukturę (rys. 2.1). Następnie kolagen trafia do tkanki kostnej i tkanki chrzęstnej, a w zdecydowanej większości buduje struktury skóry. Długość włókna kolagenowego jest różna, najczęściej wynosi około 1 cm, natomiast grubość waha się od 0,5 do 40 μm. Różnorodność kolagenu jest tak duża, że można wyróżnić trzy kategorie (tab. 2.2). Analiza ilościowa poszczególnych typów kolagenu wykazała, że kości zawierają praktycznie wyłącznie kolagen typu I, natomiast więzadła i ścięgna 95% kolagenu typu I i 5% kolagenu typu III [1, 2].

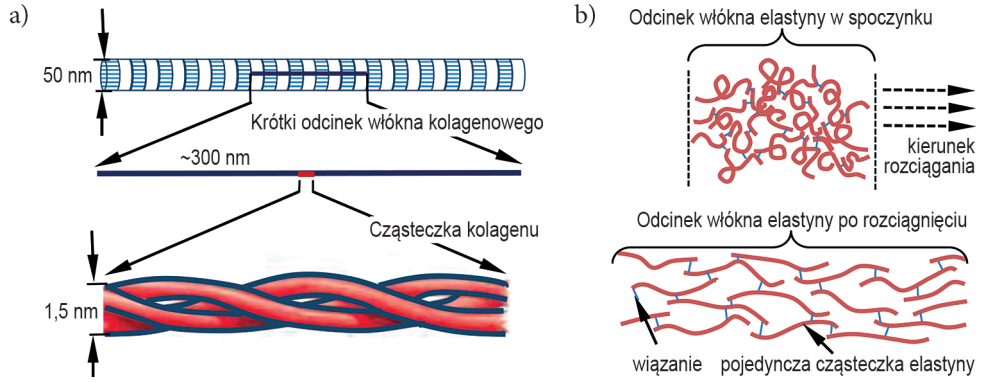
Tabela 2.2

Kategorie podziału kolagenu w organizmie [1, 2, 5]

Typ	Występowanie
Kolagen włóknisty	Typ I (najbardziej powszechny), występuje w tkance tworzącej blizny, w skórze, ścięgnach, więzadłach i tkance łącznej kości; ma skłonność do polimeryzacji do włókien (fibrylogeneza). Typ II występuje w chrząstkach stawowych. Typ III stanowi jeden z głównych składników ścian jam organów wewnętrznych, towarzyszy typowi I w mięśniach, naczyniach, płucach i skórze.
Kolagen blaszki podstawowej	Typ IV występuje w błonach podstawowych, może tworzyć warstwy, łącząc się z innymi białkami.
Kolagen błony podstawowej	Typ V znajduje się z płucach, naczyniach, wątrobie i mięśniach gładkich, ale też w niewielkich ilościach występuje w mięśniach poprzecznie prążkowanych.

Włókna sprężyste o szerokości około 0,5–0,8 μm oplatają włókna kolagenowe. Włókna sprężyste zbudowane są z białka o budowie fibrylarnej należącego do skleroprotein, zwanego **elastyną**. Elastyna składa się z aminokwasów, przede wszystkim z glicyny, natomiast zawartość proliny i hydroksyproliny jest znacznie niższa niż w cząsteczkach kolagenu. Białko to za pomocą wiązań poprzecznych organizuje się we włókna lub błony (za pomocą wiązań kowalencyjnych). W przeciwieństwie do włókien kolagenowych sieć włókien elastycznych nie wykazuje struktury hierarchicznej, lecz ma postać okrężnych włókien tworzących warstwy w formie blaszek o falistym przebiegu. Elastyna jest stabilna chemicznie, odporna na działanie podwyższonej temperatury, ulega natomiast trawieniu enzymatycznemu. Występuje w postaci bezładnych zwojów połączonych wiązaniami poprzecznymi. W stanie rozluźnienia elastyna tworzy nieregularną spiralę podatną na rozciąganie (rys. 2.1). W opisie właściwości mechanicznych elastyny wykorzystuje się model entropowej elastyczności, w którym konformacja cząsteczkowa oraz entropia zmieniają się wraz

z odkształceniem. Właściwości elastyczne są skutkiem entropicznego prostowania łańcuchów, tj. zmniejszenia entropii lub wzrostu energii wewnętrznej. Elastyczne cząsteczki tworzące trójwymiarową sieć mogą rozciągać się nawet 2,5-krotnie w stosunku do początkowej długości, nie niszcząc przy tym swojej konfiguracji. Mają mniejszą sztywność niż włókna kolagenu. Włókna elastyny po rozciągnięciu lub ściśnięciu powracają do swojej początkowej długości. Rozciągają się również szybciej niż włókna kolagenu, chroniąc je przed gwałtownym zniekształceniem. Porównanie wybranych właściwości mechanicznych włókien kolagenowych i elastyny przedstawiono w tabeli 2.3.



Rys. 2.1. Porównanie włókien: a) kolagenu, b) elastyny [1, 2]

Tabela 2.3

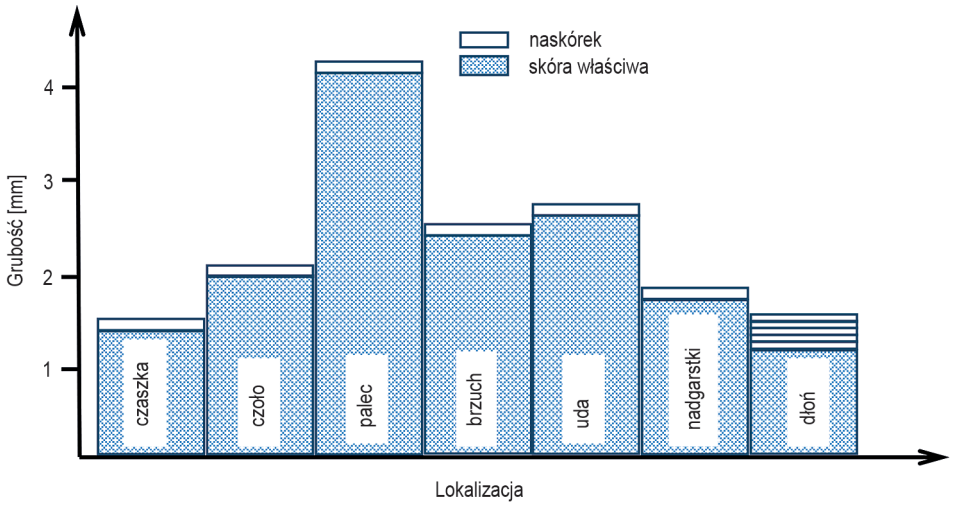
Porównanie parametrów mechanicznych kolagenu i elastyny [4]

Rodzaj włókna	Moduł Younga [MPa]	Wytrzymałość na rozciąganie [MPa]	Odkształcenie odpowiadające wytrzymałości na rozciąganie [%]
Kolagen	1000	50–100	10
Elastyna	0,6	1	100

Włókna retikulinowe (siateczkowe) są dużo mniejsze od wcześniej opisanych włókien. Syntezowane są przez fibroblasty oraz komórki osłonki naczyń (perycyty), a także retikulocyty. Grubość włókien siateczkowych wynosi 0,5–1 μm, natomiast długość ich jest zmienna. Oplatają naczynia krwionośne oraz przydatki skóry, występują też w błonie podstawnej naskórka. Pod względem budowy układają się w podobne sploty jak włókna kolagenowe. Czynnościowo natomiast mają podobne zadanie do włókien sprężystych [1, 2].

Skóra, w aspekcie materiałowym, opisywana jest jako niejednorodny materiał, który ma skomplikowaną wielowarstwową, strukturę anatomiczną. Skóra zbudowana jest z trzech podstawowych warstw: naskórka, skóry właściwej i tkanki podskórnej. Jej grubość zależy od lokalizacji na ciele (rys. 2.2). Skóra jako powłoka ciała stanowi barierę przed wnikaniem do organizmu szkodliwych czynników. Osłania także znaj-

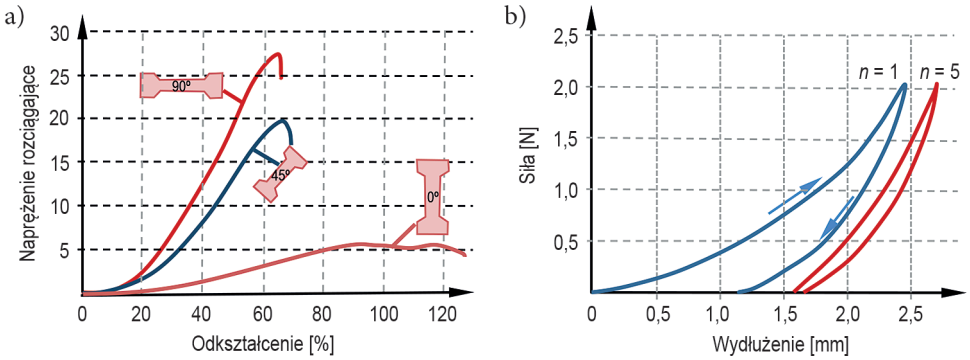
dujące się pod nią tkanki przed urazami mechanicznymi. Innymi istotnymi funkcjami tkanki skórnej są ochrona przed działaniem promieniowania ultrafioletowego, regulacja temperatury ciała poprzez wydzielanie potu oraz pełnienie roli narządu czucia dzięki specjalnym receptorom znajdującym się w skórze właściwej. W skórze następuje także synteza witaminy D.



Rys. 2.2. Porównanie grubości tkanki skórnej [12]

Skóra wykazuje właściwości anizotropowe (rys. 2.3a), jej zdolność do rozciągania się i kurczenia jest różna w zależności od kierunku obciążenia lub badania, a napięcie skóry zależy od wzajemnego położenia włókien kolagenowych, które zostały zidentyfikowane podczas obserwacji mikroskopowych ludzkiej skóry. Lepkosprężyste zachowanie tkanki skóry jest ilustrowane poprzez histerezę relacji obciążenie-odciążenie (rys. 2.3b). Histereza jest spowodowana wewnętrznym tarciem materiału. Tarcie to jest odpowiedzialne za rozpraszanie mechanicznej energii odkształcenia, np. w postaci ciepła. W warunkach panujących w żywym organizmie tkanka podlega stanowi napięcia wstępnego, które jest uzależnione od takich czynników jak wiek, lokalizacja oraz kierunek ułożenia włókien kolagenowych. Można to zaobserwować, dokonując pomiaru grubości tkanki skóry najpierw w warunkach *in vivo*, a następnie *ex vivo*. Drugi wynik będzie wskazywał, że skóra jest znacznie grubsza. Prawdopodobnie to sieć włókien elastyny odpowiada w dużym stopniu za powstawanie naprężenia wstępnego [4]. W celu usunięcia napięcia wstępnego stosuje się kondycjonowanie polegające na wykonaniu kilku cykli obciążenia-odciążenia. Charakterystyczne zmiany po zastosowaniu cyklicznego obciążania to przesunięcie w prawo krzywej siła-wydłużenie, któremu towarzyszy trwałe wydłużenie, zmniejszenie histerezy oraz spadek maksymalnego naprężenia przy danym poziomie odkształcenia (rys. 2.3b). Efekt ten jest widoczny tylko wtedy, gdy pozwoli się próbce na odpoczynek pomiędzy

cyklami, który umożliwi jej ujawnienie zachowania lepkosprężystego. Zaobserwowane zmiany maleją wraz z kolejnymi cyklami obciążania, aż ostatecznie osiągnięta zostaje powtarzalność wyników (najczęściej po 3–10 cyklach). Kondycjonowanie jest powszechnie stosowane w celu uzyskania powtarzalności wyników. Pole powierzchni znajdujące się pod wykresem powstałym podczas obciążania reprezentuje energię wprowadzoną do układu. Natomiast pole powierzchni pomiędzy charakterystyką obciążenia i odciążenia odpowiada energii wykorzystanej lub rozproszonej przez układ, czyli energii dyssypacji. Energia dostarczona do skóry jest częściowo rozpraszana przez włókna kolagenowe podczas ich porządkowania zgodnie z kierunkiem działającej siły. Ilość straconej przez układ energii jest miarą lepkości materiału [6]. Szeroka pętla histerezy świadczy o wysokiej lepkości badanej struktury. Na podstawie wyznaczonych wartości energii można obliczyć współczynnik pochłaniania energii, który jest stosunkiem energii dyssypacji do energii dostarczonej do układu. Współczynnik ten stanowi miarę zdolności absorpcji energii mechanicznej przez tkankę skórną.

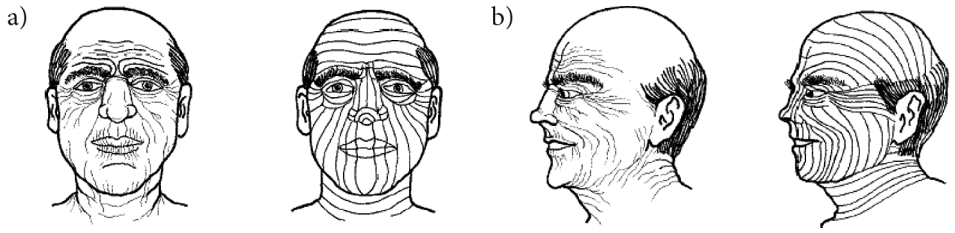


Rys. 2.3. Właściwości mechaniczne skóry: a) wpływ kierunku pobrania próbki tkanki skóry (z pleców) względem osi kręgosłupa, b) histereza obciążenia-odciążenia

Ujawniono, że topografia skóry charakteryzuje się liniami formującymi sieć, których układ strukturalny i orientacja wpływają na podstawowe właściwości mechaniczne skóry. Organizacja sieci odzwierciedla wielokierunkowe napięcia związane z budową skóry. Linie główne, występujące w warstwie powierzchniowej skóry właściwej, odpowiadają rozkładowi sił napięcia w skórze i są widoczne nawet po oddzieleniu naskórka od skóry właściwej. Zależą one od rozkładu napięć we włóknach kolagenowych i włóknach elastyny, a także od macierzy zewnątrzkomórkowej. Linie pomocnicze są pochodzenia naskórkowego. Warstwa siatkowa skóry właściwej zawiera elastynę ułożoną w grube, poziome włókna. Warstwa brodawkowata skóry właściwej, która jest cieńsza, zawiera włókna elastyny ułożone prostopadle do powierzchni skóry. Sieć elastyny zapewnia skórze elastyczność, podczas gdy kolagen jest białkiem odpowiedzialnym za wytrzymałość skóry. Skóra w warunkach *in vivo*

poddawana jest naprężeniu wstępnemu, które jest nierówno rozłożone na jej powierzchni.

Obszary o obniżonym napięciu są odwzorowane liniami Langera, które potwierdzają jej anizotropową naturę. Ich kierunek jest prostopadły do długiej osi mięśni leżących pod skórą. Linie te, nazwane na cześć ich odkrywcy Karla Langera, zostały oznaczone w 1861 roku. W wyniku przekłuwania skóry okrągłym narzędziem, Langer zauważył, że rany przybierają kształt eliptyczny i dlatego łącząc główne osie, można narysować kontury linii. Przykład linii Langera zaprezentowano na rys. 2.4. Występują one na całym ciele, lecz najłatwiej zaobserwować je można na twarzy człowieka, gdyż pokrywają się ze zmarszczkami mimicznymi. W zależności od ułożenia włókien elastyny i kolagenu w stosunku do linii Langera, stopień sztywności i rozciągliwości skóry jest różny. Skóra jest bardziej rozciągliwa, gdy włókna te ułożone są równolegle do linii napięcia skóry niż w kierunku prostopadłym do nich [9, 10].



Rys. 2.4. Linie Langera w obrębie twarzy: a) widok z przodu, b) widok z boku [17]

W celu zlokalizowania linii Langera, metodą bezinwazyjną należy wykonać ruchy zginania i prostowania stawów lub uchwycić fałd skóry między palcem wskazujący oraz kciukiem (chwyt szczypcowy). Zmarszczenie skóry wskazuje na równoległy przebieg osi długiej wytworzonego fałdu względem linii Langera, natomiast powierzchnia gładka oznacza ułożenie prostopadłe [9]. Poznanie układu linii Langera ma szczególne znaczenie przy wykonywaniu cięć operacyjnych. Cięcie prowadzone wzdłuż linii powoduje nieznaczne rozwarcie brzegów rany, a w konsekwencji pozwala uzyskać estetyczny wygląd blizny, umożliwia również ukrycie blizny w naturalnie występujących fałdach skóry. Cięcie prostopadłe do linii Langera powoduje szerokie rozwarcie brzegów rany i większe prawdopodobieństwo wystąpienia przykurczów blizny [17].

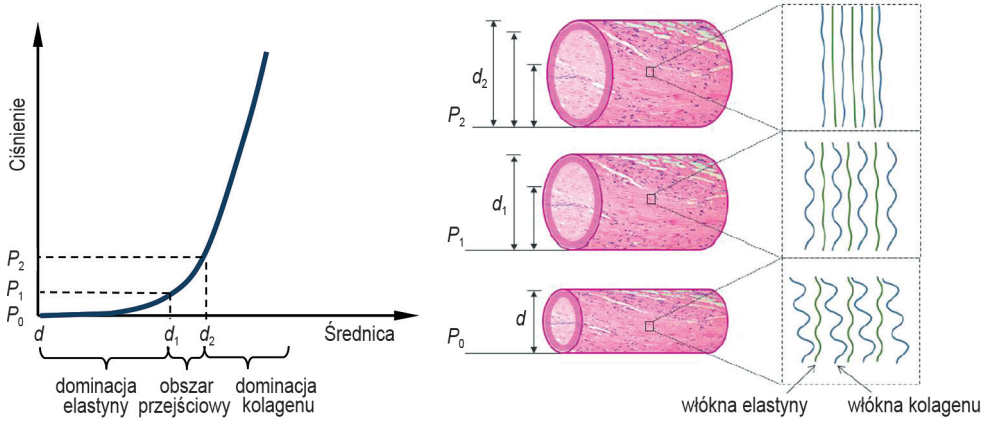
Naczynia krwionośne to kolejny narząd, którego właściwości mechaniczne zależą od układu sieci włókien kolagenu i elastyny (rys. 2.5). Obieg krwi w organizmie człowieka umożliwiają trzy rodzaje naczyń krwionośnych: tętnice, żyły oraz naczynia włosowate. Pełnią one różne funkcje, co przekłada się na różnice w ich budowie. Tętnice, których zadaniem jest wyprowadzanie krwi z serca pod wysokim ciśnieniem (90–70 mmHg; 8–12 MPa) mają grubszą ścianę niż żyły, które kierują krew o niższym ciśnieniu (15–20 mmHg; 2–2,7 MPa) z powrotem do serca. Naczynia włosowate dzięki cienkim ścianom umożliwiają wymianę substancji pomiędzy komórkami ciała

a krwią. Ze względu na wielkość tętnice można podzielić na: duże (ok. 24–39 mm), do których zaliczana jest aorta, średnie (do 35 mm) oraz małe (tętniczki). Ich średnica wynosi od 1,1 do 2 mm. W odniesieniu do budowy wyróżniamy tętnice typu:

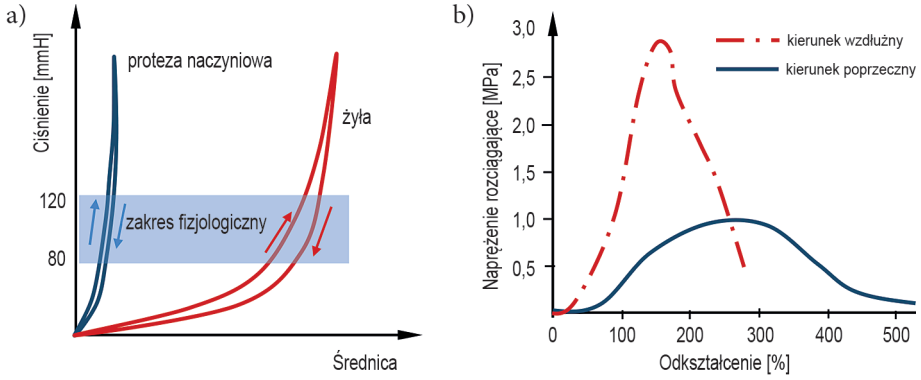
- sprężystego (duże), w ich budowie główną rolę odgrywają włókna i błony sprężyste,
- mięśniowego (średnie i małe), w ich ścianach występuje więcej tkanki mięśniowej gładkiej.

Przejście pomiędzy kolejnymi rodzajami występuje stopniowo wraz ze zmniejszającą się średnicą naczyń, jak również ze zmieniającą się liczbą włókien sprężystych [2, 5, 16].

Tkanka naczyń, poddana obciążeniu, również przejawia zależności nieliniowe i właściwości anizotropowe (rys. 2.6). Przykładowo ściana naczynia w obrębie aorty brzusznej posiada grubość 0,7 mm, a jej błona środkowa może zawierać w przybliżeniu około 30 blaszek sprężystych. Elastyna odpowiada za sprężystość naczynia, jej



Rys. 2.5. Rola elastyny i kolagenu w naczyniach krwionośnych [16]



Rys. 2.6. Charakterystyki mechaniczne naczyń krwionośnych: a) cykliczne odciążanie-odciążanie, b) rozciąganie [16]

włókno ma zdolność do nawet 2-krotnego zwiększenia długości, a następnie powrotu do stanu wyjściowego. W fizjologicznych warunkach siły, które oddziałują na ścianę tętnicy, są przede wszystkim równoważone przez elastynę (przez kolagen tylko w ok. 1%) [5, 16].

Ścięgna i więzadła stanowią kolejną grupę tkanek, w której sposób ułożenia włókien kolagenowych determinuje wytrzymałość na rozciąganie. W ścięgnach włókna ułożone są równolegle, pozwala to na zwiększenie odporności na rozciąganie. W więzadłach włókna kolagenowe ułożone są w większości równolegle, jednak część włókien znajduje się w pozycji pochylonej, dzięki temu więzadła mają zdolność przenoszenia sił przyłożonych w różnych kierunkach. Kształt ścięgien jest bardzo różny (walcowaty, spłaszczony, postać szerokiej, płaskiej błony – rozcięgna). Długość ścięgna zależy od długości kurczliwej mięśnia oraz od zakresu ruchu w danym stawie. Ścięgno łączy brzusiec mięśnia z kością oraz przenosi siłę niezbędną do wygenerowania czynnego ruchu w stawie [14, 15]. W tabeli 2.4 porównano procentowy udziału kolagenu i elastyny w wybranych tkankach miękkich oraz ich wytrzymałości na rozciąganie.

Tabela 2.4

Własności mechaniczne wybranych tkanek miękkich [5]

Materiał	Wytrzymałość na rozciąganie [MPa]	Odkształcenie [%]	Kolagen (% udział w masie suchej)	Elastyna (% udział w masie suchej)
Ścięgno	50–100	10–15	75–85	<3
Więzadło	50–100	10–15	70–80	10–15
Aorta	0,3–0,8	50–100	25–35	0–50
Skóra	1–20	20–70	60–80	5–10
Chrząstka	9–40	60–120	40–70	–

2.3. MODELE ZWIERZĘCE WYKORZYSTYWANE W BADANIACH WŁAŚCIWOŚCI TKANEK MIĘKKICH

Poznanie właściwości mechanicznych tkanek miękkich jest istotne w medycynie, szczególnie w chirurgii, ale również w inżynierii medycznej dla celów projektowania narzędzi chirurgicznych oraz implantów i protez tkanek. Przystępując do realizacji testów tkanek miękkich, należy podjąć decyzję o warunkach realizacji testu. Wyniki badań realizowane w warunkach *in vivo* oraz *in vitro* mogą różnić się znacząco. Testy *in vitro* są realizowane w ściśle określonych warunkach, dzięki czemu uzyskane wyniki są bardziej dokładne niż wyniki uzyskane podczas testów *in vivo*. W badaniach *in vitro* ludzkie tkanki wykorzystuje się rzadko ze względu na jej niewielką dostępność oraz konieczność uzyskania zgody komisji etycznej. Modele zwierzęce mogą

pomóc w zrozumieniu fizjologii i biomechaniki mechanizmów urazów, jak i odbudowy tkanek miękkich.

Obecnie w badaniach stosuje się kilka gatunków zwierząt w zależności od rodzaju tkanki i wielkości symulowanego uszkodzenia. W celu określenia najlepszego modelu zwierzęcego przeprowadza się liczne badania, w których porównaniu podlegają m.in. budowa i właściwości mechaniczne tkanek oraz inne właściwości, np. adhezja w obecności materiału implantu, starzenie czy transport leków oraz przenikalność substancji. Najczęściej wykorzystywanymi tkankami w badaniach zastępczych są testy na tkankach skóry, naczyń krwionośnych oraz więzadłach/ścięgnach. Realizuje się również badania tkanek narządu wzroku czy zastawek serca z udziałem tkanek zwierzęcych. Skóra zwierzęca jest badana pod kątem zastosowania jej jako substytutu ludzkiej w badaniach związanych z adsorpcją leków i przepuszczalnością, starzeniem skóry oraz wpływem promieni UV na skórę, jak również w analizie procesów gojenia ran. Poniżej przytoczono kilka przykładów modeli zwierzęcych i ich podobieństwa do tkanek ludzkich [5, 8, 11–13].

- **Małpy** to gatunek najbardziej zbliżony filogenetycznie do człowieka, chociaż ze względu na ich duży koszt oraz ograniczoną dostępność rzadko są wykorzystywane w badaniach.
- **Psy** posiadają ścięgna zginaczy, które są strukturalnie podobne do ścięgien człowieka, jednak zaprzestano używania psów w związku z ich rolą jako towarzyszy człowieka.
- **Kury** wykorzystywane są jako model w badaniach ścięgna zginającego oraz osłonki ścięgien. Mają wystarczająco duże ścięgna do symulowania ran szarpanych. Ścięgna kury (Leghorna) wykorzystywano do rekonstrukcji osłonki ścięgna materiałem PGA.
- **Myszy**, **szczury** są często wykorzystywane do badań biomechanicznych ze względu na ich dużą dostępność, niski koszt i niewielkie rozmiary. Tkanki, np. skóry i ścięgien, są stosowane jako model ludzkich zarówno w badaniach mechanicznych, jak i w badaniach klinicznych. Szczury to zwierzęta chrakteryzujące się luźną skórą, co jest spowodowane jej elastycznością oraz redundancją (zdolność tworzeniem fałdów luźnej skóry). Ponadto skóra szczurów nie jest silnie połączona z warstwami leżącymi pod spodem, przez co wyniki otrzymane dla badania procesu gojenia ran mogą być trudne do odniesienia do skóry ludzkiej. Rozmiary ścięgien/więzadeł myszy i szczurów oraz ciągły proces remodelingu w układzie mięśniowo-kostnym tych zwierząt, trwający przez całe ich życie, sprawia że kwestionuje się ich interpretację w badaniach dotyczących biomechaniki. Gatunki te są często wykorzystywane w badaniach genetycznych. Służą do wyjaśnienia podstawowych procesów biologicznych, relacji genowych oraz fenotypów chorobowych.
- **Króliki** wykorzystywane są w badaniach przedklinicznych implantów, a skórę z ucha zwierzęcia wykorzystano z dobrym skutkiem jako model skóry ludz-

kiej podczas badań nad jontoforetycznym transportem leków. Ze względu na permanentną postawę spoczynkową brzuszną ścięgna/więzadła królików są dużo mocniejsze w stawie kolanowym, ponadto staw ten znajduje się w ciągłym zgięciu, co powoduje trudności w symulacji ścięgna ludzkiego.

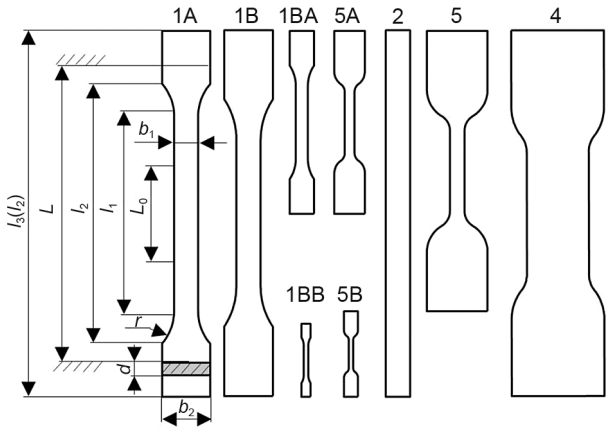
- **Kozy**, **owce** służą do modelowania przeszczepów i rekonstrukcji więzadeł krzyżowych ze względu na analogię do ludzkiego stawu kolanowego, pomimo różnic w wartościach i kierunkach działania sił.
- **Świnia**, tak jak w przypadku kóz i owiec, ma liczne podobieństwa do stawu kolanowego. Pomimo różnic w wartościach i kierunkach sił w tylnej części ACL, wykorzystano model świni podczas badań przy użyciu rusztowań jedwabnych, uzyskując struktury podobne do tych w ACL, zarówno w strukturze, jak i własnościach mechanicznych. Skóra świńska cieszy się szczególnym zainteresowaniem jako substytut skóry ludzkiej, głównie w badaniach wytrzymałościowych oraz w badaniach związanych z analizą przepuszczalności skóry względem różnych substancji. Za pomocą skóry świni można również badać mechanizm gojenia się ran oraz analizować zmiany zachodzące w powłoce wspólnej podczas oparzeń. Inne tkanki świńskie wykorzystywane jako substytut ludzkich to zastawki serca i naczynia krwionośne.
- **Bydło** również znajduje zastosowanie w badaniach modelowych tkanek skóry oraz zastawek serca.

2.4. BADANIA WŁAŚCIWOŚCI TKANEK MIĘKKICH

Testy tkanek miękkich można podzielić na **statyczne** i **dynamiczne**. W statycznych testach stosuje się pojedynczy bodziec zewnętrzny i mierzy odpowiedź tkanki na jego działanie. W testach dynamicznych bodziec oddziałuje na tkankę w sposób cykliczny, a analizie poddaje się początkowe dostosowanie się tkanki do warunków obciążenia oraz jej końcowe reakcje w stanie ustalonym. Dynamiczne metody testowe dostarczają potencjalnie więcej informacji niż testy statyczne, jednak nieograniczona kombinacja parametrów bodźca powoduje trudności w porównaniu oraz interpretacji wyników [4].

W inżynierii materiałowej wiodącą próbą realizowaną w celu identyfikacji właściwości wytrzymałościowych materiału jest jednoosiowa statyczna próba rozciągania. Przebieg zarejestrowanej podczas testu krzywej zależności przyrostu siły (ΔF [N]) od przyrostu wydłużenia (Δl [mm]) pozwala określić fizyczną odpowiedź materiału na zadawane obciążenia zewnętrzne. Przystępując do realizacji jednoosiowego rozciągania tkanek miękkich, należy dokonać wyboru rodzaju kształtu próbki do badań oraz przygotować kształtki. Zadanie to utrudnia fakt, iż preparaty tkanek miękkich pozyskiwane są *post morten* (tkanki naczyń krwionośnych, tkanki skóry) i pozbawione zostają napięcia wstępnego, a ich podatność na odkształcenie utrudnia pro-

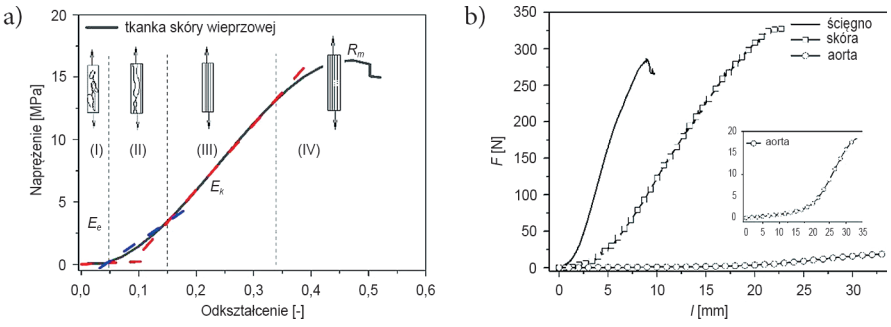
ces przygotowania kształtki (wycinanie). Dlatego często wykorzystuje się stemple do ich wykrawania lub formy do wycinania. Kształtki tkanek miękkich przyjmują postać wiosełka lub beleczki (rys. 2.7), natomiast wymiary determinowane są przez rozmiar wyjściowy (anatomiczny) tkanek oraz typ wykorzystanej w badaniach maszyny wytrzymałościowej. Metody *in vitro* polegają na badaniu próbek, które są testowane tak, jak każdy inny materiał.



Rys. 2.7. Przykłady typów próbek wykorzystywanych w testach rozciągania materiałów [18]

Opis charakterystyki przebiegu krzywej rozciągania dla tkanek miękkich opisywany jest w literaturze przedmiotu [4] jako *J*-kształtny lub *S*-kształtny, nieliniowy, czasami *bi*-liniowy, z wyraźnym podziałem na obszary charakterystyczne.

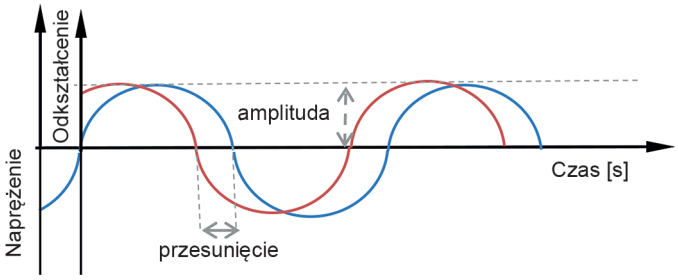
Na rysunku 2.8 przedstawiono przykładowe krzywe wybranych tkanek (jako materiał reprezentatywny wybrano tkanki wieprzowe, ze względu na ich biologiczne i fizyczne podobieństwo do tkanek ludzkich). Analizując rysunek 2.8a), zwraca uwagę *bi*-liniowość charakterystyki, liniowość obszaru (I) przypisuje się odpowiedzi włókien elastyny na jednoosiowe rozciąganie próbek, natomiast obszaru (III) włókien



Rys. 2.8. Charakterystyka rozciągania: a) skóry wieprzowej z podziałem na zakresy, b) przykładowych tkanek miękkich

kolagenowych zawartych w tkance skórnej (na wykresie przerywana linia czerwona). Zakres (II) jest przejściową strefą pomiędzy pracą jaką wykonywały włókna elastyny a pełnym przejęciem odpowiedzialności za odpowiedź na obciążenia rozciągające przez włókna kolagenu (pofalowane włókna ulegają wyprostowaniu aż do wyczerpania ich liniowej charakterystyki). Ostatnia część wykresu (IV) prezentuje stopniową utratę liniowości przez tkankę do osiągnięcia maksimum, a następnie rozrywanie włókien powoduje lokalny spadek siły przenoszonej przez tkankę aż do jej zniszczenia.

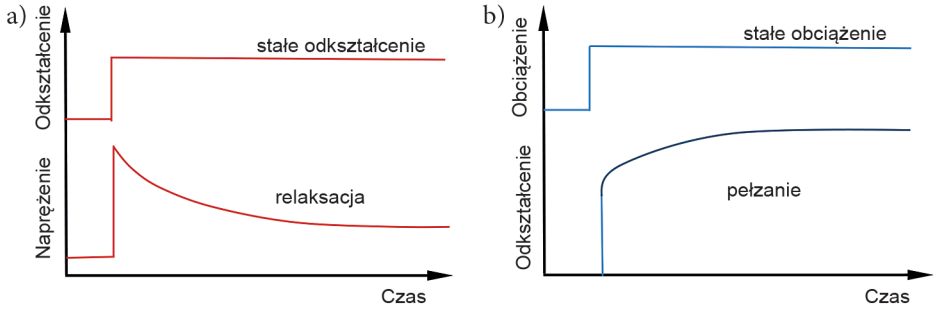
Dynamiczna analiza DMA (ang. *Dynamic Mechanical Analysis*) jest metodą dającą więcej informacji o badanym materiale niż analiza statyczna. Umożliwia pomiar właściwości mechanicznych materiałów w tym także tkanek. Na próbkę materiału oddziałuje oscylacyjna siła powodująca sinusoidalne naprężenie oraz odkształcenie, które są przesunięte w czasie (rys. 2.9). Charakter deformacji próbki materiału zależy od schematu obciążenia (np.: ściskanie, ścinanie, zginanie i rozciąganie). DMA umożliwia pomiar następujących parametrów: moduł zespolony (E^*), moduł magazynowania energii (E'), moduł strat/rozproszenia energii (E'') oraz pomiaru tłumienia. Co więcej dostarcza informacji na temat odpowiedzi badanego materiału na różne temperatury i częstotliwości [3, 4, 6].



Rys. 2.9. Zasada działania dynamicznej analizy mechanicznej [3, 4]

Tkanki miękkie podlegają zjawiskom reologicznym: relaksacji naprężeń oraz pełzaniu materiału. Dlatego właściwości ich zależą m.in. od zakresu działającego na nią naprężenia, a także od długości czasu, przez który to naprężenie występuje. Zjawisko relaksacji polega na redukcji naprężeń wraz z upływem czasu, pomimo występującego stałego odkształcenia (rys. 2.10a). Natomiast pełzanie objawia się tym, że po przyłożeniu określonego obciążenia tkanka nadal będzie się odkształcać wraz z upływem czasu, nawet jeśli wartość obciążenia nie będzie wzrastać (rys. 2.10b). Własności reologiczne tkanek mogą być związane z lepkim oporem włókien kolagenu i elastyny pojawiającym się podczas przemieszczania się tych struktur wewnątrz międzykomórkowej substancji podstawnej [3, 4, 6].

Gdy tkanka jest rozciągana, natychmiast zaczyna dostosowywać strukturę wewnętrznej siatki kolagenu, aby zminimalizować obciążenie. Zatem obciążenie ko-



Rys. 2.10. Charakterystyki reologiczne materiału: a) relaksacja naprężenia, b) pełzanie

nieczne do utrzymania danego wydłużenia stopniowo maleje aż do wartości minimalnej – jest to relaksacja. I odwrotnie, dla danego obciążenia próbka będzie się stopniowo wydłużać w czasie obciążania, co określamy jako pełzanie. Wydłużenie obecne po każdym cyklu odciążenia (napięcie resztkowe) wskazuje na plastyczność skóry i nie zależy ona od wieku. W badaniach, w których skóra jest rozciągana z bardzo dużą szybkością zjawisko relaksacji powoduje spadek wartości naprężenia. Ta utrata napięcia, wyrażona jako procent maksymalnego napięcia początkowego, wskazuje na plastyczność skóry. Parametr ten wykazuje znaczny spadek wraz z wiekiem.

2.5. INNE METODY BADAŃ TKANEK MIĘKKICH

Inne metody badawcze wykorzystywane w ocenie właściwości tkanek miękkich zostaną krótko scharakteryzowane poniżej na przykładzie tkanki skóry jako najczęściej wykorzystywanej tkance w badaniach. **Ekstensometria jednoosiowa to statyczna metoda wykorzystująca** ekstensometry przymocowane do tkanki (np. skóry) klejem cyjanoakrylowym i rozłożone tak, by uzyskać wstępne wydłużenie (zazwyczaj 30% wydłużenia). Rejestrowana jest siła wymagana do rozciągnięcia skóry i utrzymania nowej separacji mierników. Separacja powoduje początkową siłę szczytową, która natychmiast spada z powodu adaptacji siatki kolagenowej skóry właściwej (relaksacja). Szybkość redukcji siły można wyprowadzić z krzywej siła–czas, modelując ją jako prostą funkcję logarytmiczną lub wykładniczą. Metodę tę stosowano do badania zmian spowodowanych starzeniem, radioterapią czy promieniowaniem UVA, aplikacją steroidów, operacją plastyczną oraz chorobami, np. twardziną układową [3, 4, 6, 7].

Balistometryczne systemy testowe rejestrują i analizują wzór odbicia małego młotka uderzającego w skórę. Zarejestrowane reakcje zawierają jednak dane z nieokreślonej objętości skóry, a także podstawowych struktur tłuszczu, mięśni lub kości, lecz takie dane mogą być użyteczne [3, 4, 6, 7].

Systemy propagacji fal sprężystych skupiają się głównie na pomiarach prędkości fali ścinania i szybkości, z jaką są one rozpraszane podczas ich przejścia przez skórę. Zastosowanie bodźca mechanicznego wytwarzającego te fale odbywa się za pośrednictwem wibracyjnego rysika lub elementu piezoelektrycznego. Metoda ta reprezentuje metodę jednoosiowego testu dynamicznego, przy czym oś definiowana jest przez linię między nadajnikiem a detektorem fal ścinania. Najbardziej wrażliwe do oceny są składniki skóry, które są związane z lepkimi właściwościami skóry [3, 4, 6, 7].

Pomiar impedancji mechanicznej mierzy opór, jaki skóra wykazuje podczas wymuszonego ruchu. Zmienia się on w zależności od częstotliwości przykładanej siły, stanu naprężeń tkanek, właściwości mechanicznych tkanek i mechanicznego sprzężenia aplikatora ze skórą. Elektrodynamometr mierzy siłę i przemieszczenie wibrującej głowicy przymocowanej do skóry. Układ ten również skutkuje pomiarem nieokreślonej objętości skóry, ale regionalne różnice we właściwościach mechanicznych skóry są łatwe do interpretacji [3, 4, 6, 7].

Badania nagniatania są akceptowane i często stosowane jako pomiary *in vivo* biomechanicznych właściwości skóry. W badaniach tych stosuje się wgłębnik, który wchodzi w bezpośredni kontakt z tkanką poprzez obciążenie go siłą działającą prostopadle do ograniczonego obszaru skóry. W celu oszacowania elastyczności skóry proponuje się analizy numeryczno-eksperymentalne przy założeniach, że skóra jest liniową i elastyczną monowarstwą. Wartości modułu Younga w kierunku prostopadłym bez naprężania wstępnego skóry uzyskiwane ta metodą wahają się od 4,5–8 kPa. Powstają różne modyfikacje metody, np. z wykorzystaniem układu ultrasonograficznego wgłębnika w celu uzyskania odpowiedzi miękkich tkanek głębokich kończyny dolnej. Proponuje się także urządzenie do nieinwazyjnych testów dynamicznego nagniatania z wykorzystaniem małych odkształceń amplitudowych (1–10 μm) i głębokości penetracji wgłębnika (100–500 μm) (stosując piezoelektryczny stopień translacji do przemieszczania wgłębnika w urządzeniu Tonoderm, wywierany jest nacisk na skórę za pomocą sprężarki powietrza, a głębokość wgłębienia zostaje zmierzona za pomocą wiązki laserowej przechodzącej przez laserowy czujnik przemieszczenia). Test nagniatania wykorzystuje się również w warunkach *in vitro* w eksperymentach na chrząstce stawowej rzepki zwierzęcej (bydlęcej) do oznaczenia modułu Younga (1,33–2,21 MPa) oraz współczynnika Poissona (0,45–0,47) [3, 4, 6, 7].

Testy ssania zostały opracowane w oparciu o procesy używane w testach membranowych lub materiałów gumopodobnych, w których zaciśnięta w uchwytach membrana jest napompowana do uzyskania postaci kopuły. Testy te stały się powszechnymi procedurami testowania mechanicznego skóry. W celu zbadania anizotropii skóry (*in vivo*) ciśnienie ssania jest kontrolowane przez regulator ciśnienia zasysania w odniesieniu do wywołanej deformacji (wypukłości) warstwy rogowej skóry. Zasadniczo wykorzystuje pomiar podniesienia skóry w okrągłej czaszy, spowodowany warun-

kami próżni (<500 mBar) przy użyciu systemów optycznych, takich jak Dermaflex i Cutometer [3, 4, 6, 7].

Testy skręcania pozwalają na ocenę reakcji skóry na działanie sił ścinających poprzez zastosowanie bodźca skrętnego. Typowym urządzeniem skręcającym jest dysk centralny wewnątrz cienkiego pierścienia. Obydwa elementy zostają przyklejone do skóry, a wewnętrzny dysk jest skręcany o kilka stopni (max. 10°), podczas gdy monitorowany jest moment obrotowy wymagany do osiągnięcia i utrzymania tego obrotu. Zjawiska pełzania i relaksacji skóry są tutaj takie same, jak przy użyciu tensometru jednoosiowego. Różnica między tymi metodami polega na tym, że urządzenie skrętne skręca skórę pod małym kątem we wszystkich kierunkach, eliminując w ten sposób różnice wynikające z kierunku badania (zmniejszenie efektu anizotropowego). Po przyłożeniu momentu obrotowego następuje natychmiastowe odkształcenie sprężyste, a w dalszej kolejności odkształcenie lepkosprężyste (płynięcie materiału). Uwolnienie momentu obrotowego prowadzi do natychmiastowej regeneracji, po której następuje proces relaksacji. Metoda skręcania została wykorzystana do określenia niektórych podstawowych właściwości sprężystych i lepkosprężystych skóry oraz w badaniach przewlekłej ekspozycji na słońce i różnic rasowych we właściwościach skóry [3, 4, 6, 7].

LITERATURA

[1] Alberts B., Bray D., Hopkin K., et al., *Essential Cell Biology*, Garland Science 2010.

[2] Bochenek A., Reicher M., *Anatomia człowieka*, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 2019.

[3] Edwards C., Marks R., *Evaluation of biomechanical properties of human skin*, Clinics in Dermatology, 13, 1995, 375–380.

[4] Hendriks F.M., *Mechanical Behaviour of Human Skin in Vivo. A Literature Review*, Koninklijke Philips Electronics N.V., 2001.

[5] Holzapfel G.A., *Biomechanics of soft tissue*, Biomech Preprint Series, 7, 2000.

[6] Joodaki H., Panze M.B, *Skin mechanical properties and modeling: A review*, Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers Part H Journal of Engineering in Medicine 232, 2018, 1–21.

[7] Kalra A., Lowe A., Al-Jumaily A.M., *Mechanical Behaviour of Skin: A Review*, Journal of Material Science & Engineering, 5:4, 2016, 1–7.

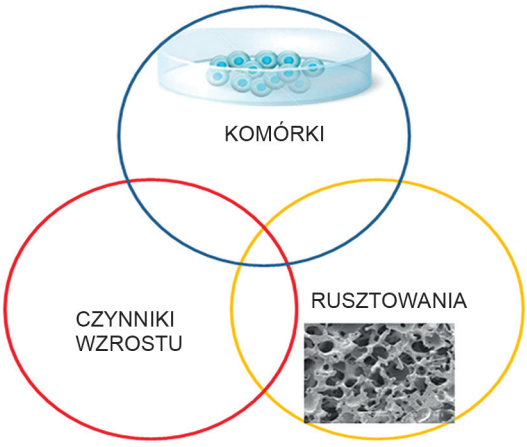
[8] Karimi A., Rahmati S.M., Navidbakhsh M., *Mechanical characterization of the rat and mice skin tissues using histostructural and uniaxial data*, Bioenginnered, 63, 2015, 153–160.

[9] Kwak M., Son D., Kim J., Han K., *Static Langer's line and wound contraction rates according to anatomical regions in a porcine model*, Wound Repair and Regeneration, 22, 2014, 678–682.
[10] Langer K., *On the anatomy and physiology of the skin*, British Journal of Plastic Surgery, 31, 1978, 3–8.
[11] Manan N.F., Mahmud J., Ismail M.H., *Quantifying the biomechanical properties of bovine skin under uniaxial tension*, Journal of Medical and Bioengineering 2(1), 2013.
[12] Maurel W., Wu Y., Magnenat Thalmann N., Thalmann D., *Biomechanical Models for Soft Tissue Simulation*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1998.
[13] Netzlaff F., Schaefer U.F., Lehr C.M., Meiers P., Stahl J., Kietzmann M., Niedorf F., *Comparison of bovine udder skin with human and porcine skin in percutaneous permeation experiments,* Alternatives to laboratory animals, 34, 2006, 499–513.
[14] Nordin M., Lorenz T., Campello M., *Basic Biomechanics of the Musculoskeletal System*, London: Lippincott Williams and Wilkins, 2001.
[15] Rodrigues M.T., Reis R.L., Gomes, M.E., *Engineering tendon and ligament tissues: present developments towards successful clinical products*, Journal of Tissue Engineering And Regenerative Medicine, 7, 2013, 673–686.
[16] Singh C., Cynthia S. Wong C.S., Wang X., *Medical textiles as vascular implants and their success to mimic natural arteries*, Journal of Functional Biomaterials 6, 2015, 500–525.
[17] Trybus M., *Podstawy chirurgii plastycznej*, Medycyna Praktyczna Chirurga, 2005.
[18] ISO 527-1:2019(en) Plastics — Determination of tensile properties — Part 1: General principles.

3. RUSZTOWANIA KOMÓRKOWE DLA POTRZEB INŻYNIERII TKANKOWEJ

3.1. WPROWADZENIE

Inżynieria tkankowa (ang. *tissue engineering*, TE) to interdyscyplinarna dziedzina wiedzy łącząca w sobie podstawy inżynierii, nauk przyrodniczych (biologia, biochemia, chemia) i medycyny, której celem jest zastąpienie, przywrócenie, udoskonalenie lub podtrzymanie funkcji tkanek i narządów uszkodzonych w wyniku urazu, choroby przewlekłej lub schorzeń wrodzonych. Inżynieria tkankowa jest dyscypliną naukową stwarzającą nowe, alternatywne rozwiązania zmieniające sposób podejścia do leczenia za pomocą implantów zawierających komórki własne pacjenta, osadzone na specjalnych trójwymiarowych podłożach (3D) (rusztowaniach – ang. *scaffolds*). Inżynieria tkankowa zapewnia możliwości poprawy lub zastąpienia funkcji biologicznych poprzez zastosowanie kombinacji komórek, rusztowań i odpowiednich czynników biomechanicznych. Te trzy kluczowe elementy tworzą tzw. triadę inżynierii tkankowej (rys. 3.1). **Rusztowanie komórkowe (skafold)** stanowi miejsce przyczepu komórek, które zapewnia im określone warunki przestrzenne, niezbędne do prawidłowego wzrostu. Komórki po zaszczepieniu na rusztowaniu namnażają się,



Rys. 3.1. Triada inżynierii tkankowej

a następnie integrują się z komórkami uszkodzonej tkanki. Czynniki wzrostu, tj. witaminy, aminokwasy, cukry czy hormony są substancjami odżywczymi, które umożliwiają komórkom prawidłowe funkcjonowanie i wzrost [1, 13].

Rusztowania komórkowe służą jako tymczasowa macierz pozakomórkowa (ang. *extra cellular matrix*, ECM), która zapewnia wsparcie dla wzrostu komórek i regeneracji tkanek. Rusztowania naśladujące charakterystykę naturalnej ECM odgrywają ważną rolę w regulacji funkcji komórkowych, dlatego muszą spełniać szereg wymagań, które przedstawiono w tab. 3.1.

Tabela 3.1

Zestawienie wymaganych cech dla rusztowań komórkowych [1, 13, 21]

Właściwości rusztowań	
biokompatybilność	• nietoksyczne produkty degradacji • brak składników wywołujących reakcję immunologiczną
biodegradowalność	• kontrolowana degradacja rusztowań, która umożliwia wrastanie tkanek przy zachowaniu wystarczającego wsparcia mechanicznego dla uszkodzonej tkanki • degradacja w wyniku procesów enzymatycznych lub biologicznych zachodzących w organizmie • pozwala na wytworzenie własnej macierzy pozakomórkowej przez komórki gospodarza
bioaktywność	• materiały rusztowań, które mogą wchodzić w interakcje z tkanką gospodarza i wiązać się z nią • właściwości osteokonduktywne i osteoinduktywne dla rusztowań tkanek kostnych • możliwość włączenia do rusztowania sygnałów biologicznych i czynników wzrostu w celu stymulowania wzrostu i różnicowania komórek
architektura rusztowania	• połączone pory umożliwiające dyfuzję i migrację komórek • mikroporowatość zapewniająca duże pole powierzchni dla interakcji między rusztowaniem a komórką • makroporowatość umożliwiająca migrację komórek i tworzenie układu naczyniowego • wielkość porów dostosowana do docelowych tkanek i komórek • wystarczająca porowatość dla ułatwienia wrastania komórek bez osłabiania właściwości mechanicznych • wbudowane kanały naczyniowe w celu wzmocnienia angiogenezy *in vivo*
właściwości mechaniczne	• wytrzymałość na ściskanie, sprężystość i zmęczenie porównywalne z tkanką gospodarza, umożliwiające mechanoregulację komórek i zachowanie integralności strukturalnej *in vivo* • materiał rusztowania, którym można łatwo manipulować w środowisku klinicznym w celu leczenia indywidualnych wad tkanek i narządów pacjenta

3.2. MATERIAŁY STOSOWANE NA RUSZTOWANIA KOMÓRKOWE

W projektowaniu i wytwarzaniu rusztowań komórkowych wykorzystuje się cztery podstawowe podejścia:

- porowate rusztowania wytwarzane z biomateriałów,
- zdecelularyzowana naturalna macierz pozakomórkowa,
- arkusze komórek z wydzieloną własną macierzą zewnątrzkomórkową,
- enkapsulacja komórek w hydrożelu.

Osadzanie komórek na gotowych rusztowaniach wykonanych z porowatych, degradowalnych biomateriałów stało się najczęściej stosowanym i ugruntowanym podejściem do rusztowań tkankowych. Jednym z kluczowych zagadnień w trakcie projektowania nowoczesnego rusztowania tkankowego jest dobór odpowiedniego biomateriału, na którym będzie się rozwijać nowa tkanka. Spośród licznej grupy biomateriałów stosowanych do wytwarzania trójwymiarowych rusztowań na szczególną uwagę zasługują bioaktywna ceramika – trójfosforan wapnia (TCP) i hydroksyapatyt (HAp) oraz biodegradowalne polimery, takie jak polilaktyd (PLA), poliglikolid (PGA), kopolimer polilaktyd-glikolid (PLGA), polihydroksyalkaniany (PHA), polikaprolakton (PCL), chityna oraz kolagen [13].

3.2.1. MATERIAŁY CERAMICZNE

Materiały ceramiczne wykorzystywane są w inżynierii tkankowej na podłoża do regeneracji tkanki kostnej zarówno twardej, jak i miękkiej [16]. Charakteryzują się one wysoką biozgodnością oraz dają możliwość kontroli porowatości. Ceramika wykazuje duże podobieństwo strukturalne oraz chemiczne do fazy mineralnej kości, co jest korzystne dla różnicowania i proliferacji osteoblastów. Dzięki temu podłoża hydroksyapatytowe oraz na bazie fosforanu wapnia są z powodzeniem wykorzystywane w regeneracji kości [4, 16]. Skafoldy na bazie materiałów ceramicznych charakteryzują się zazwyczaj wysoką sztywnością i bardzo niską elastycznością. Ich zastosowanie kliniczne w inżynierii tkankowej jest ograniczone ze względu na kruchość i trudność uzyskania kształtu wymaganego do implantacji. Nowa kość uformowana w sieci HAp nie jest w stanie wytrzymać obciążenia mechanicznego niezbędnego do przebudowy kości [4, 16].

Hydroksyapatyt (HAp) charakteryzuje się osteokonduktywnością, co sprzyja adhezji, wzrostowi oraz różnicowaniu się osteoblastów. Jest także osteoinduktywny, a więc pobudza tworzenie się tkanki kostnej. HAp degraduje powoli, a szybkość jego degradacji jest trudna do kontrolowania. Ceramika hydroksyapatytowa jest stosowana do małych wypełnień ubytków kości po resekcji guza lub po utracie tkanki z powodu złamań kości [20].

Trójfosforan wapnia (TCP) należy do grupy bioresorbowalej ceramiki i posiada dwie formy krystaliczne: α-TCP oraz β-TCP. Fosforany wapnia wykazują dosko-

nałą biokompatybilność z tkanką kostną dzięki swojemu podobieństwu chemicznemu i krystalicznemu do minerału kości. Posiadają własności osteokonduktywne i mogą wiązać się z kością w pewnych warunkach. Wspierają adhezję, różnicowanie i proliferację osteoblastów oraz komórek mezenchymalnych. TCP w warunkach *in vivo* degraduje szybciej niż hydroksyapatyt. Jednak stosunkowo powolna degradacja oraz niska wytrzymałość mechaniczna trójfosforanu wapnia ograniczają jego zastosowanie w inżynierii tkanki kostnej. Degradacja *in vivo* krystalicznych fosforanów wapnia trwa od kilku miesięcy do kilku lat. Właściwości mechaniczne TCP różnią się znacznie w zależności od krystaliczności, wielkości ziaren oraz porowatości materiału. Właściwości te maleją wraz ze wzrostem fazy amorficznej, mikroporowatości oraz wielkości ziarna. Wysoka krystaliczność, mała porowatość i mała wielkość ziaren zwiększają sztywność oraz wytrzymałość na ściskanie i rozciąganie, a także odporność na pękanie materiału [18].

3.2.2. MATERIAŁY POLIMEROWE

Materiały polimerowe są najczęściej wykorzystywanym materiałem do produkcji rusztowań na potrzeby inżynierii tkankowej. Znajdują one zastosowanie m.in. w regeneracji kości i chrząstki [3]. Do produkcji skafoldów wykorzystywane są zarówno polimery naturalne (biopolimery), jak i syntetyczne, głównie te ulegające biodegradacji w kontakcie ze środowiskiem wewnętrznym organizmu żywego. Spośród polimerów syntetycznych najczęściej aplikowane w inżynierii tkankowej są materiały z grupy liniowych poliestrów alifatycznych, które degradują poprzez hydrolizę wiązań estrowych. Polimery nieulegające biodegradacji mogą być wykorzystywane do regeneracji tkanek wymagających znacznej stabilności mechanicznej, takich jak więzadła czy mięśnie, jednak ich długotrwałe przebywanie w organizmie ingeruje w proces odtworzenia i przebudowy tkanki. Dlatego też aktualnie większość badań skierowanych jest w kierunku materiałów biodegradowalnych [18, 20, 23]. Najczęściej stosowane syntetyczne i naturalne polimery wykorzystywane do wytwarzania rusztowań tkankowych przedstawiono w tab. 3.2.

Tabela 3.2

Polimery stosowane do wytwarzania rusztowań tkankowych [1, 13]

NATURALNE	SYNTETYCZNE
źródło zwierzęce kolagen, jedwab, elastyna, keratyna, chityna	**surowiec chemiczny** poliglikolid (PGA), polikaprolakton (PCL), glikol polietylenowy (PEG)
źródło roślinne alginian, skrobia, celuloza, soja	**surowiec roślinny** polilaktyd (PLA)
źródło mikroorganizmy PHA, celuloza	

Biopolimery, najczęściej stosowane w inżynierii tkankowej, można podzielić na dwie główne grupy: białka i polisacharydy. Wykorzystywanymi proteinami są: kolagen, żelatyna, elastyna, fibryna, fibrynogen oraz jedwab [3, 6, 18]. Do poilisacharydów zaliczamy chitynę, chitozan, glikozoaminoglikany (głównie kwas hialuronowy), skrobię, agarozę i celulozę. Do produkcji skafoldów stosowane są również proteoglikany oraz alginiany [3, 10, 18]. Polimery naturalne są aktywne biologicznie i wspomagają adhezję oraz proliferację komórek [16]. Charakteryzują się naturalną strukturą, a także obecnością czynników wzrostu oraz białek macierzy zewnątrzkomórkowej, które ułatwiają przyleganie komórek [3]. Poza tym są biodegradowalne i umożliwiają komórkom macierzystym wytworzenie, po pewnym czasie, własnej macierzy zewnątrzkomórkowej i zastąpienie zdegradowanego rusztowania [16]. Naturalne polimery, oprócz pobudzania komórek do wzrostu na różnych etapach rozwoju, mogą jednocześnie stymulować reakcję odpornościową, co budzi obawy dotyczące obecności antygenów. W przypadku ich zastosowania pojawia się również problem przenoszenia chorób [3]. Wadami biopolimerów są trudności w wytwarzaniu rusztowań o jednorodnej i powtarzalnej strukturze oraz słabe właściwości mechaniczne. Polimery naturalne degradują enzymatycznie, dlatego stopień ich degradacji może się różnić w zależności od pacjenta. Rusztowania z naturalnych polimerów stosowane są do regeneracji uszkodzonych nerwów, skóry, chrząstki oraz kości [3, 16].

Kolagen jest białkiem strukturalnym, charakteryzującym się wysoką stabilnością oraz dużą wytrzymałością na rozciąganie. Jest bioresorbowalnym, nierozpuszczalnym w wodzie polimerem, który pod wpływem podwyższonej temperatury ulega denaturacji. Istnieją pewne obawy dotyczące stosowania kolagenu w inżynierii tkankowej związane z potencjalnym ryzykiem przenoszenia czynników chorobotwórczych, możliwą reakcją immunologiczną organizmu oraz stosunkowo słabą kontrolą procesu biodegradacji [3]. Kolagen wykorzystywany jest m.in. do produkcji skafoldów przeznaczonych do regeneracji kości (dzięki właściwościom osteokonduktywnym), a także chrząstki, nerwów oraz naczyń krwionośnych [10, 14, 20]. Kolagen sprzyja adhezji chondrocytów, ale przed wysianiem komórek powinien zostać oczyszczony [3]. Kolagen może być kształtowany w różne formy: rurki, warstwy, matryce, pianki, proszki, a także substancje lepkie, które mogą być wstrzykiwane do organizmu [20].

Jedwab to białko włókniste produkowane przez jedwabniki. Charakteryzuje się bardzo dobrymi właściwościami mechanicznymi, m.in. wysoką wytrzymałością na rozciąganie [10]. Chociaż jedwab zaliczany jest do materiałów niedegradowalnych, to może on ulegać bardzo powolnej degradacji enzymatycznej w warunkach *in vivo*. Z materiałem tym związane są obawy dotyczące jego cytotoksyczności. Stosowanie jedwabiu może powodować niepożądane formowanie się ziarnin oraz wystąpienie reakcji alergicznej. Pomimo to, materiał ten sprzyja adhezji i wzrostowi fibroblastów oraz osteoblastów [11].

Chitozan jest biodegradowalnym polisacharydem, który można pozyskać w procesie deacetylacji chityny, będącej składnikiem budulcowym skorupiaków morskich [3, 10]. Deacetylacja chityny prowadzi do powstania merów aminiglukozowych. W temperaturze ciała człowieka chitozan tworzy żele i posiada zdolność do dostarczania i współdziałania z czynnikami wzrostu i białkami adhezyjnymi. Degradacja chitozanu jest kontrolowana przez resztkową zawartość acetylu i może zachodzić szybko zgodnie z deacetylacją tego polimeru [3]. Szybkość degradacji chitozanu zależy także od stopnia jego krystaliczności [20]. Chitozan wykorzystywany jest do wytwarzania podłoży dla tkanki chrzęstnej i kostnej oraz do regeneracji wątroby. Dzięki kontroli nad porowatością chitozanowych skafoldów można wpływać na wytrzymałość i elastyczność implantu. Chitozan może być formowany w celu utworzenia rusztowań o porowatej mikrostrukturze, która sprzyja osteokondukcji [3, 20].

Alginiany to sole kwasu alginowego występujące w wodorostach morskich. Pozyskiwane są z glonów, w których stanowią jeden ze składników ściany komórkowej. Wykorzystywane są na porowate podłoża dla inżynierii tkankowej, m.in. do regeneracji tkanki chrzęstnej oraz hepatocytów. Charakteryzują się stosunkowo powolną degradacją, co może powodować problemy, gdy regenerująca tkanka zaczyna się odbudowywać. Rusztowania na bazie alginianów wykazują także słabą integralność właściwości mechanicznych i nie powinny być stosowane na implanty długoterminowe, ponieważ tracą funkcjonalność w ciągu jednego roku [3].

W grupie **polimerów syntetycznych** na największą uwagę zasługują materiały bioresorbowalne, takie jak polilaktyd (PLA), poliglikolid (PGA) oraz ich kopolimer (PLGA), a także polikaprolakton [3, 18, 20]. Stosowane są również m.in. polihydroksyalkaniany (PHA), poliuretany (PU) i glikol polietylenowy (PEG). Materiały te pozwalają na wytwarzanie rusztowań o określonej architekturze oraz kontrolowanych właściwościach fizycznych, takich jak czas degradacji czy podatność na rozciąganie. Niewątpliwą ich zaletą, w stosunku do materiałów naturalnych, jest stały skład polimerów syntetycznych [18]. Jednak posiadają one także wady, takie jak słaba bioaktywność, która może być powodem odrzucenia rusztowania przez organizm [16]. Dodatkowo PLA oraz PGA degradują hydrolitycznie w wyniku czego powstaje dwutlenek węgla, który obniża wartość lokalnego pH. Może to doprowadzić to zbytniego zakwaszenia tkanek, co skutkuje nekrozą komórek [3].

Poli(kwas mlekowy) (PLA) zaliczany jest do grupy liniowych poliestrów alifatycznych. Polilaktyd posiada trzy różne stereoizomery: PLLA, PDLA, PDLLA, które różnią się ułożeniem przestrzennym grupy metylowej w monomerze kwasu mlekowego. Każdy z tych stereoizomerów wykazuje odmienne właściwości. Mieszanina poli-D,L-laktydu (PDLLA) charakteryzuje się wysoką stabilnością mechaniczną oraz właściwościami osteoindukcyjnymi oraz osteokonduktywnymi [18]. PLLA, ze względu na wyższą strukturę krystaliczną, charakteryzuje się wyższą temperaturą topnienia (170–180°C) niż PDLLA i wykorzystywany jest do produkcji skafoldów stosowanych do regeneracji tkanki chrzęstnej, nerwów, zastawek serca oraz mięśnia

sercowego [10, 18]. PDLLA w warunkach *in vivo* degraduje enzymatycznie i hydrolitycznie, jednak PDLLA degraduje szybciej niż PLLA, który jest odporny na hydrolizę [18, 20]. Czas degradacji PLLA jest szacowany na okres od roku do ponad 2 lat, podczas gdy PDLLA degraduje całkowicie w czasie 12-16 miesięcy. Skafoldy z PLLA mogą być wytwarzane różnymi metodami, m.in. metodą formowania ze stopu z wymywaniem porogenu, poprzez separację faz oraz spienianie gazem [20].

Kolejnym poliestrem alifatycznym jest **poli(kwas glikolowy) (PGA)**, który stosowany jest jako materiał na podłoża dla inżynierii tkankowej ze względu na bardziej hydrofilowy charakter (w porównaniu z PLA) oraz korzystny czas resorpcji tego materiału. Ze względu na wysoki stopień krystaliczności PGA nie jest rozpuszczalny w większości rozpuszczalników organicznych. W porównaniu z PLA, PGA charakteryzuje się stosunkowo wysoką wytrzymałością na rozciąganie oraz wysokim modułem sprężystości. Rusztowania komórkowe wykonane z poliglikolidu charakteryzują się utratą wytrzymałości o 50% po około 2–4 tygodniach od implantacji, ale całkowitej resorpcji ulegają po 4–12 miesiącach. W przypadku rusztowań o wysokiej porowatości, właściwości mechaniczne PGA oraz PLA są względnie słabe, co ogranicza ich użycie do regeneracji tkanek twardych. Jednak PGA może być stosowany w inżynierii tkanki chrzęstnej, zastawek serca, tkanki mięśniowej oraz hepatocytów [3, 18, 20].

Kopolimer kwasu glikolowego i polimlekowego (PLGA) uzyskuje się poprzez odpowiednie dopasowanie stężeń monomerów LA i GA. Dzięki takiemu połączeniu uzyskiwany jest produkt o właściwościach pośrednich w stosunku do jego poszczególnych składników [4, 10]. Kopolimer PLGA charakteryzuje się pośrednim stopniem degradacji w porównaniu do czystych PLA i PGA. Posiada strukturę amorficzną, ponieważ cząsteczki PGA i PLA nie są w stanie się ściślej upakować. Podczas wytwarzania podłoży z PLGA możliwe jest regulowanie wielkości porów oraz porowatości struktury. Kopolimer ten stosowany jest m.in. na rusztowania dla tkanki chrzęstnej i mięśniowej. Ze względu na hydrofobowy charakter powierzchni PLGA, który nie wspomaga adhezji komórek i wzrostu kości, zastosowanie tego kopolimeru w ortopedii jest ograniczone [3, 18, 20].

Poli(ε-kaprolakton) (PCL) jest poliestrem alifatycznym o semikrystalicznej strukturze i wolniejszej degradacji w porównaniu z PLA, PGA czy PLGA, co sprawia, że materiał ten jest mniej użyteczny dla aplikacji w inżynierii tkankowej [9, 10]. Czas degradacji polikaprolaktonu może wynosić nawet ponad 24 miesiące [3, 18]. PCL można łatwo formować w różne kształty, ponieważ jest bardzo dobrze rozpuszczalny w rozpuszczalnikach organicznych. Charakteryzuje się niską wytrzymałością na rozciąganie (23 MPa), ale równocześnie bardzo dużym odkształceniem (>700%). Wykorzystywany jest na rusztowania z włókniny do regeneracji kości, tkanek serca, naczyń krwionośnych, skóry oraz chrząstki [14, 20].

Polihydroksyalkaniany (PHA) to grupa poliestrów alifatycznych, do której zaliczane są poli(3-hydroksymaślan) – PHB, kopolimer 3-hydroksymaślanu i 3-hydrok-

sywalerianianu – PHBV, poli(4-hydroksymaślan) – P4HB, kopolimer 3-hydroksymaślanu i 3-hydroksyheksanianu – PHBHHx oraz poli(3-hydroksyoctan) – PHO. PHA z reguły ulegają degradacji w wyniku hydrolizy [9, 16]. Poli(3-hydroksymaślan) jest wytwarzany głównie przez drobnoustroje w procesie fermentacji. PHB jest materiałem kruchym. Z powodu hydrofobowego charakteru PHB oraz jego kopolimery degradują bardzo wolno. Skutkuje to ograniczonym zastosowaniem poli(3-hydroksymaślanu) do produkcji rusztowań [11]. Wykazano, że przy implantacji trwającej do 12 miesięcy PHB pozwala na uzyskanie korzystnej odpowiedzi tkanki kostnej, nie wykazując przy tym niepożądanej chronicznej odpowiedzi zapalnej [18]. Biodegradowalny kopolimer 3-hydroksymaślanu i 3-hydroksywalerianianu (PHBV) wykazuje lepsze właściwości mechaniczne i degradacyjne w porównaniu z czystym PHB. Jest także mniej kruchy od homopolimeru. Zarówno PHB, jak i PHBV są rozpuszczalne w wielu rozpuszczalnikach i dzięki temu mogą być formowane w różne kształty: filmy, warstwy, sfery czy włókna [14]. Wadą niektórych polihydroksyalkanianów jest ich ograniczona dostępność oraz czasochłonna procedura ekstrakcji z hodowli bakteryjnych. Polihydroksyalkaniany stosowane są do produkcji podłoży, m.in. do odbudowy zastawki serca [18].

3.2.3. METALE I ICH STOPY

Rusztowania z materiałów metalicznych są wykorzystywane w ortopedii, stomatologii oraz otolaryngologii jako nośniki do hodowli komórek kostnych, zwłaszcza w zastosowaniach wymagających przenoszenia dużych obciążeń. W porównaniu do rusztowań wykonanych z ceramiki lub polimerów cechuje je wysoka wytrzymałość mechaniczna i odporność na zmęczenie. Powszechnie używane biomateriały metaliczne obejmują tytan i jego stopy, stale nierdzewne, stopy na bazie kobaltu i chromu oraz magnez [15].

Ogólnie, porowaty tytan i stopy tytanu wykazują dobrą zgodność biologiczną. Bioaktywne siatki tytanowe są z powodzeniem stosowane w chirurgii zespalania kręgosłupa od kilkudziesięciu lat [24]. Siatki tytanowe i trójwymiarowe rusztowania tytanowe są stosowane również w miejscach ubytków kostnych w rekonstrukcji żuchwy, szczęki i twarzoczaszki. Potencjalna osteointegracja tytanu może być ulepszona przez wprowadzenie do rusztowania określonych czynników wzrostu. W zastosowaniach, w których istnieją ubytki kości, takie jak rekonstrukcja twarzoczaszki, augmentacja kości czy ubytki okołowszczepowe, regenerację kości zwiększa się poprzez dostarczanie czynników wzrostu, tj. TGF-β i BMP-2 przez tytanowe rusztowanie [7].

Spośród rusztowań metalicznych należy wspomnieć o porowatych rusztowaniach z magnezu, które są obiecującymi biomateriałami dla rusztowań kości o dobrych właściwościach mechanicznych, zdolności do całkowitej biodegradacji i niewywołujące odpowiedzi zapalnej ani ogólnoustrojowej. Ponadto uwolnione jony Mg i pro-

dukty biodegradacji w miejscach śródkostnych wykazały zdolność do indukowania nowych kości i neowaskularyzacji. Istnieją jednak obawy dotyczące stosowania czystego Mg, ponieważ szybkość jego rozpuszczania w warunkach fizjologicznych jest duża, co może prowadzić do hipermagnezji, chociaż zaproponowano szereg potencjalnych dróg kontrolowania szybkości degradacji. Dane dotyczące długoterminowego zachowania porowatych rusztowań z Mg lub stopów Mg są ograniczone, jednak materiał ten wydaje się obiecujący w niektórych zastosowaniach związanych z wrastaniem kości, takich jak regeneracja kości beleczkowej [22].

3.2.4. KOMPOZYTY

Zastosowanie opisanych wyżej materiałów jest często ograniczone ze względu na problemy z dopasowaniem właściwości rusztowania do właściwości tkanki, którą ma ono wspomagać w procesie regeneracji. Jednym ze sposobów uzyskania produktu o optymalnych cechach jest wytwarzanie kompozytów. Pozwala to na otrzymanie materiału o niestandardowych właściwościach, takich jak wysoka wytrzymałość mechaniczna przy równoczesnym utrzymaniu niskiego modułu Younga i zachowaniu wysokiej biozgodności. W przypadku podłoży dla inżynierii tkankowej wykorzystywane są kompozyty polimerów naturalnych z biodegradowalnymi polimerami syntetycznymi. Najczęściej stosowanym składnikiem naturalnym jest kolagen, który łączony jest z poliglikolidem, polikaprolaktonem lub poliglaktyną. Wytwarza się także kompozyty, których obydwa składniki są pochodzenia naturalnego lub syntetycznego. Przykładowo połączenie kolagenu z elastyną nadaje kompozytowi dużą wytrzymałość na rozciąganie oraz elastyczność, co jest wskazane w przypadku skafoldów do odbudowy naczyń krwionośnych. Z kolei połączenie hydrofobowego, biodegradowalnego PLA z hydrofilowym i stabilnym PEG skutkuje uzyskaniem materiału, który jest bardziej hydrofilowy od PLA i mniej stabilny niż PEG [10]. Współistnienie hydrofilowości i podatności na biodegradację można kontrolować poprzez odpowiedni dobór proporcji łączonych polimerów.

Podjęto również próby wytwarzania kompozytów z udziałem ceramiki w celu wyeliminowania wad tych materiałów [3, 11, 18]. Przykładowo wysoce porowate podłoża dla inżynierii tkanki kostnej produkowane są z kompozytów ceramika–polimer. Zastosowany w kompozycie materiał polimerowy może być zarówno naturalny, jak i syntetyczny. Podłoża te charakteryzują się dobrymi właściwościami mechanicznymi oraz wspomagają przestrzenną odbudowę tkanki kostnej [11, 18]. W hodowli tkanek kostnych można także wykorzystać kompozyty z resorbowalnych poliuretanów na bazie poli(ε-kaprolaktonu) wzmocnionych fazą ceramiczną, którą mogą być np. węglany wapnia charakteryzujące się wysoką biozgodnością oraz właściwościami osteoindukcyjnymi.

Kość ludzka jest mineralno-organicznym kompozytem złożonym z hydroksyapatytu oraz kolagenu. W związku z tym kompozyty na bazie tych składników są uwa-

żane za najbardziej biomimetyczny układ do regeneracji kości. Mieszanka cząstek HAp z kolagenem jest łatwym do formowania biomateriałem. Dodatkowo powłoki kolagenowe na podłożach z fosforanu wapnia ułatwiają i poprawiają adhezję oraz proliferację komórek. Powoduje to wzrost osteokonduktywności, osteointegracji oraz zdolności do formowania kości na rusztowaniach z tych materiałów po wszczepieniu *in vivo* [20].

3.2.5. HYDROŻELE

Hydrożele to usieciowane hydrofilowe polimery, które zawierają wodę w postaci fazy rozproszonej. Substancja żelująca może być zarówno pochodzenia syntetycznego, jak i naturalnego. Hydrożele mogą być wprowadzone do organizmu podczas małoinwazyjnego zabiegu chirurgicznego jako wstrzykiwane skafoldy, które idealnie wypełniają defekty o nieregularnych kształtach. W inżynierii tkanki chrzęstnej hydrożele są wykorzystywane do enkapsulacji komórek i czynników wzrostu w sieci polimerowej, która unieruchamia komórki i umożliwia bardziej efektywne różnicowanie się chondrocytów przez zmuszanie ich do zachowania okrągłego kształtu [3].

Większość naturalnych polimerów można formować w hydrożele, w tym kolagen, chitozan, alginiany, agarozę czy fibrynę. Wśród syntetycznych hydrożeli wykorzystuje się glikol polietylenowy (PEG). Wadami tego materiału są możliwa toksyczność środka sieciującego oraz brak zdolności do degradacji. Aby umożliwić hydrożelowi PEG proces rozkładu, łączy się go z PLA, PGA lub poli(fumaranem propylenu) (PPF), tworząc kopolimer. Innym sposobem na degradację tego hydrożelu jest wprowadzenie wiązań enzymatycznie rozkładalnych do szkieletu PEG [3, 11].

Następnym syntetycznym hydrożelem wykorzystywanym do produkcji rusztowań komórkowych jest sieć polimerowa składająca się z poli(N-izopropyloakrylamidu) oraz liniowych łańcuchów poli(kwasu akrylowego). Podłoża z tego materiału wykazują korzystne właściwości mechaniczne oraz stabilność termiczną. Jednak w przypadku wytwarzania wystarczająco sztywnego syntetycznego rusztowania problemem jest fakt, iż prawie wszystkie środki sieciujące są cytotoksyczne [3, 11].

Hydrożel kolagenowy jest wykorzystywany do regeneracji tkanki chrzęstnej, naczyń krwionośnych, skóry, ścięgien oraz więzadeł. Kolagen jest również stosowany razem z innymi naturalnymi polimerami, np. chitozanem, do produkcji podłoży z kompozytowych hydrożeli [11].

Fibrina jest kolejnym białkiem włóknistym, które tworzy żel i została przebadana pod kątem zastosowania w inżynierii tkankowej. Żele fibrynowe są zwykle wytwarzane przez połączenie roztworów fibrynogenu i trombiny. Mają one obiecujące właściwości, ale ich degradacja zachodzi gwałtownie, co stanowi poważny problem aplikacyjny [11].

3.2.6. ZDECELULARYZOWANA NATURALNA MACIERZ POZAKOMÓRKOWA

Poza materiałami naturalnymi i syntetycznymi jako rusztowania komórkowe wykorzystywana jest przetworzona (pozbawiona komórek) macierz zewnątrzkomórkowa pochodząca z ludzkich lub zwierzęcych narządów i tkanek. Matryca pozakomórkowa (ECM), która pozostaje po decelularyzacji, odgrywa kluczową rolę jako wsparcie strukturalne dla tkanki, a także jako źródło sygnałów biochemicznych i biofizycznych dla komórek w niej przebywających [1, 13]. Przykładem może być bezkomórkowa matryca z tkanki podśluzówki jelita cienkiego (SIS – ang. *small intestinal submucosa*), która zawiera kolagen typu I, glikozaminoglikany oraz czynniki wzrostu [11]. Początkowo matryce SIS wykorzystywano w inżynierii naczyń krwionośnych, ale trwają również badania nad wykorzystaniem tego materiału do rekonstrukcji pęcherza moczowego. Innymi stosowanymi tkankami po decelularyzacji są podśluzówka pęcherza moczowego, świńskie zastawki serca, a także matryce przygotowane z żołądka, osierdzia oraz tkanki skórnej. W przypadku stosowania tych materiałów istnieje ryzyko przenoszenia patogenów oraz reakcji immunologicznej. Jednak ze względu na swoją budowę matryce te charakteryzują się niewielką immunogennością, którą można zminimalizować poprzez stosowanie odpowiednich metod sterylizacji i konserwacji [11].

3.2.7. ARKUSZE KOMÓREK Z WYDZIELONĄ WŁASNĄ MACIERZĄ ZEWNĄTRZKOMÓRKOWĄ

Arkusze komórkowe z wydzieloną własną macierzą zewnątrzkomórkową uzyskiwane są w wyniku osadzenia komórek na płaskim podłożu i wydzielenia przez nie własnej ECM poprzez konfluencję (pokrycie 100% dostępnej powierzchni hodowlanej). Komórki te hodowane są bez użycia metod enzymatycznych. Osiąga się to przez hodowanie komórek na termicznie reaktywnym polimerze, takim jak poli(N-izopropyloakryloamid) w naczyniu hodowlanym, aż do osiągnięcia konfluencji. Konfluentny arkusz komórek jest odrywany przez termiczną regulację hydrofobowości powłoki polimerowej bez obróbki enzymatycznej. Aby utworzyć grubsze rusztowanie, warstwy poszczególnych arkuszy komórkowych są laminowane. Takie podejście zastosowano do hodowli rogówki w przypadkach klinicznych i mięśnia sercowego w badaniach przedklinicznych [1].

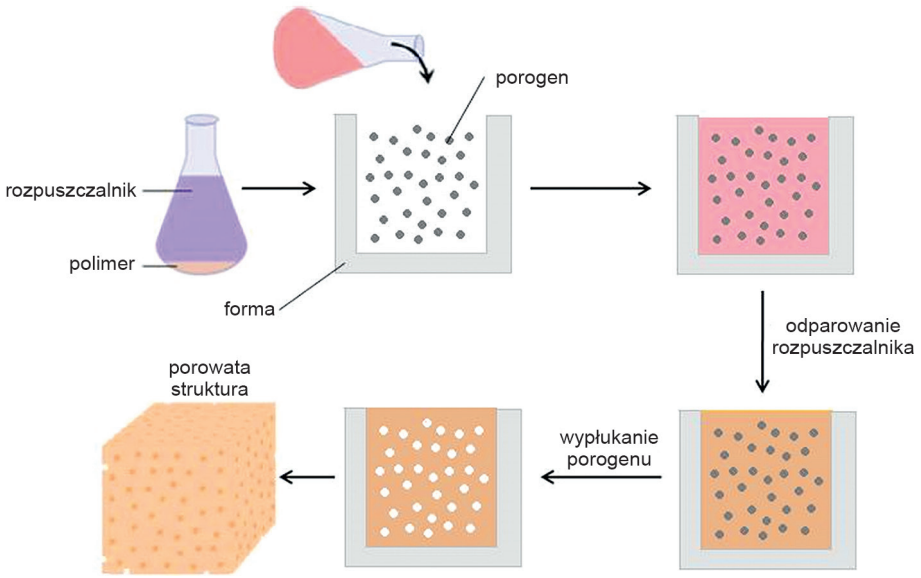
3.3. METODY OTRZYMYWANIA RUSZTOWAŃ KOMÓRKOWYCH

Metody umożliwiające wytwarzanie biodegradowalnych porowatych rusztowań można sklasyfikować jako oparte na rozpuszczalnikach (np. elektrospining, odlewanie z roztworu polimeru z wymywaniem porogenu) lub na bazie stopu (np. wytła-

czanie lub wtryskiwanie z cząstkami porotwórczymi, metody szybkiego prototypowania). Metody oparte na rozpuszczalnikach wymagają bardzo dokładnego procesu doboru rozpuszczalnika oraz dokładnego jego usuwania ze względu na możliwe działanie toksyczne na komórki. Metody przetwarzania na bazie stopu wymagają zastosowania umiarkowanych temperatur zapewniających brak degradacji termicznej podczas przetwarzania biomateriałów. W dalszej części rozdziału scharakteryzowano wybrane metody wywarzania rusztowań komórkowych.

3.3.1. ODLEWANIE Z ROZTWORU POLIMERU Z WYMYWANIEM POROGENU

Odlewanie z roztworu z wymywaniem porogenu (ang. *solvent casting particulate leaching*, SCPL) jest jedną z najczęściej stosowanych metod wytwarzania porowatych przestrzennych rusztowań. Otrzymywanie podłoża tą metodą składa się z kilku etapów. W pierwszym etapie porogen, np. chlorek sodu lub sacharoza, zostaje zmielony na ziarna o odpowiedniej wielkości. Następnie polimer rozpuszcza się w rozpuszczalniku organicznym. Do tak powstałego roztworu polimeru dodaje się porogen, którego cząstki dyspergują w uzyskanym roztworze. Otrzymana mieszanina odlewana jest do form o wcześniej zaprojektowanym kształcie. Aby utrwalić kształt rusztowania, doprowadza się do odparowania rozpuszczalnika. Następnie w celu uzyskania porowatej struktury kryształki porogenu są wymywane z polimerowej matrycy przy użyciu wody [11, 13]. Schemat procesu odlewania z roztworu polimeru z wypłukiwaniem porogenu pokazano na rys. 3.2.



Rys. 3.2. Schemat otrzymywania porowatego rusztowania metodą odlewania z roztworu z wymywaniem porogenu

Porogen dobiera się do danego polimeru tak, aby był nierozpuszczalny w stosowanym organicznym rozpuszczalniku. Do powszechnie stosowanych porogenów należą: sacharoza, chlorek sodu, glukoza, winian sodu, cytrynian sodu oraz sfery żelatynowe. Stosowane są również kulki parafinowe, ale wtedy proces wymywania porogenu musi być przeprowadzony w podwyższonej temperaturze [11, 13].

Zaletami tej metody są łatwość wykonania, a także możliwość kontrolowania wymiarów i geometrii porów poprzez odpowiedni dobór wielkości i kształtu cząstek porogenu oraz kontrolowanie porowatości przez ustalenie wymaganego stosunku części wagowych porogenu i polimeru. Metoda ta pozwala na uzyskanie porowatości w zakresie 30–93%, przy czym wielkość uzyskanych porów może wynosić od 50 μm do 1 mm [19]. Kontrolowanie właściwości mechanicznych oraz czasu degradacji podłoża odbywa się poprzez dobór części wagowych porogenu oraz stężenia polimeru. Zastosowanie większej ilości porogenu powoduje osłabienie właściwości mechanicznych. Natomiast wraz ze wzrostem stężenia polimeru wzrasta wytrzymałość rusztowania. Przy użyciu małej ilości porogenu, a więc przy małej porowatości (poniżej 65%), problematyczne staje się utworzenie sieci połączonych porów. Także obecność otwartych porów jest wtedy ograniczona. Ponadto niski udział objętościowy porogenu może mieć wpływ na niecałkowite usunięcie jego cząstek podczas wymywania z polimerowego podłoża [5]. Zjawisko to staje się wadą metody odlewania z roztworu z wymywaniem porogenu.

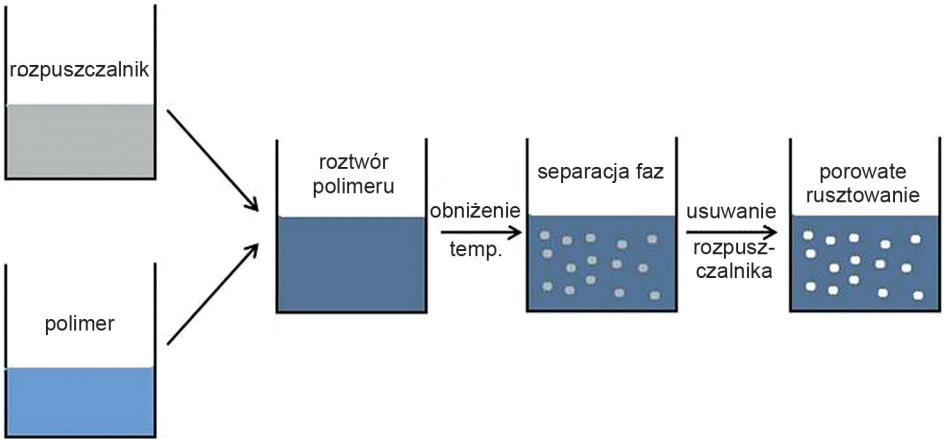
Wraz ze wzrostem objętości rusztowania wzrasta ryzyko, że porogen nie zostanie całkowicie wypłukany. Powoduje to ograniczenie wielkości wytwarzanego podłoża. Bezpieczna grubość, gwarantująca całkowite wypłukanie porogenu to 3 do 4 mm. Aby zwiększyć grubość rusztowania wykonanego tą metodą, podjęto próby laminowania cienkich warstw. Jednak rozwiązanie to ma też swoje minusy. Powstające w ten sposób podłoże ma tylko fragmentarycznie połączoną sieć porów. Poza tym rusztowania uzyskane przez laminację wykazują niskie właściwości mechaniczne [5, 6]. Kolejnym problemem związanym ze stosowaniem tej metody jest stosowanie organicznych rozpuszczalników, które mogą zostać niecałkowicie usunięte ze struktury podłoża. Wpływa to na osłabienie proliferacji oraz adhezji hodowanych komórek. Dodatkowo po implantacji efektem ubocznym może być także niekorzystny wpływ pozostałości rozpuszczalnika na otaczające tkanki. Techniką pozwalająca na wyeliminowanie tego zagrożenia jest metoda prasowania na gorąco lub wtryskiwania z wymywaniem porogenu (ang. *hot-pressing* lub *melt-molding porogen leaching*), w której nie ma potrzeby stosowania rozpuszczalnika [5, 6]. Inną modyfikacją metody SCPL jest stosowanie cząstek porogenu, które podczas wymywania wytwarzają produkty gazowe (ang. *gas foaming porogen leaching*). Przykładem takiego porogenu jest wodorowęglan sodu, który w połączeniu z wodą wydziela dwutlenek węgla. Stosowany jest również wodorowęglan amonu, który w kontakcie z wodą produkuje, oprócz dwutlenku węgla, także gazowy amoniak [5].

3.3.2. SEPARACJA FAZ

Metoda separacji faz dotyczy wieloskładnikowych systemów, które w pewnych warunkach stają się termodynamicznie niestabilne i mają skłonności do rozdzielania się na poszczególne fazy w celu obniżenia energii swobodnej układu. Rozdzielenie faz można przykładowo uzyskać poprzez obniżenie temperatury w celu wykrystalizowania rozpuszczalnika z roztworu polimeru. Roztwór rozdziela się na fazę bogatą w polimer oraz ubogą w polimer. Po usunięciu rozpuszczalnika faza bogata w polimer krzepnie, a w przestrzeni, którą zajmował początkowo rozpuszczalnik tworzą się pory. Metoda separacji faz jest stosowana nie tylko do wytwarzania rusztowań, ale także do produkcji porowatych membran. Pory otrzymane tą techniką zazwyczaj mają średnice rzędu od kilku do kilkudziesięciu mikrometrów i często są rozmieszczone nierównomiernie, co jest niepożądane w inżynierii tkankowej. Zmieniając warunki, w których zachodzi separacja faz, można otrzymać różne struktury porów. Metoda separacji faz może być stosowana do otrzymywania rusztowań z różnych materiałów polimerowych oraz kompozytów polimerowych [5, 11, 13].

Separację faz roztworu polimeru można otrzymać w dwojaki sposób: poprzez termiczne indukowanie (ang. *thermal induced phase separation*, TIPS) oraz przez inwersje faz dzięki zastosowaniu nierozpuszczalnika (ang. *liquid induced phase separation*, LIPS). Stosowane są dwie metody termicznie indukowanej separacji faz, które różnią się między sobą temperaturą przeprowadzenia procesu. Pierwszą z nich jest termicznie indukowana separacja faz w układzie ciało stałe–ciecz, która zachodzi, gdy osiągnięta zostaje temperatura krystalizacji rozpuszczalnika. Drugą metodą jest termicznie indukowana separacja faz w układzie ciecz–ciecz zachodząca, gdy temperatura procesu przekroczy punkt zamarzania roztworu lub temperaturę krystalizacji rozpuszczalnika [5, 13].

W pierwszym etapie **termicznie indukowanej separacji faz w układzie ciało stałe–ciecz** (liofilizacja) polimer jest rozpuszczany w odpowiednim rozpuszczalniku organicznym. Przykładowymi rozpuszczalnikami są fenol, naftalen oraz dioksan. Otrzymany roztwór odlewany jest do form. Następnie doprowadza się do krystalizacji rozpuszczalnika z roztworu polimeru poprzez bardzo szybkie obniżenie temperatury prowadzące do zamrożenia roztworu. W czasie gdy rozpuszczalnik ulega krystalizacji, cząsteczki polimeru są wypierane z roztworu, następnie agregują się i przemieszczają z frontem krystalizacji rozpuszczalnika. Na granicach kryształów powstaje faza bogata w polimer, która tworzy szkielet podłoża. Następnie poprzez liofilizację usuwane są kryształki rozpuszczalnika i powstają pory, których wymiary oraz geometria zależą od wielkości i kształtów kryształków rozpuszczalnika [13, 21]. Schemat termicznie indukowanej separacji faz przedstawiono na rys. 3.3. Stosując separację faz w układzie ciało stałe–ciecz, można uzyskać rusztowania komórkowe o porowatości w zakresie 30–97%. Z kolei rozmiary otrzymywanych porów waha-



Rys. 3.3. Schemat otrzymywania porowatego rusztowania metodą termicznie indukowanej separacji faz

ją się w przedziale 10–350 μm. Dodatkowo pory te połączone są siecią oraz występuje porowatość otwarta.

Zaletą termicznie indukowanej separacji faz w układzie ciało stałe–ciecz jest możliwość kontrolowania rozmiarów porów oraz ich rozmieszczenia w podłożu poprzez zmianę masy cząsteczkowej i stężenia polimeru, rodzaju oraz stężenia rozpuszczalnika, czasu mrożenia, szybkości obniżania temperatury, a także gradientu temperatury. Duże stężenie polimeru wpływa na zwiększenie grubości ścianek porów, co skutkuje zmniejszeniem ich średnicy. Zmniejszenie rozmiarów porów może być uzyskane także poprzez skrócenie czasu zamrażania. Z kolei duży gradient temperatury sprzyja powstawaniu zorientowanej struktury porów.

Wadą tej metody jest to, że jeśli szybkość obniżania temperatury jest zbyt mała, to może dojść do separacji faz w układzie ciecz–ciecz zanim zostanie osiągnięty punkt zamarzania rozpuszczalnika. W takim przypadku średnica uzyskanych porów wynosi ok. 10 μm, a porowatość ma charakter izotropowy.

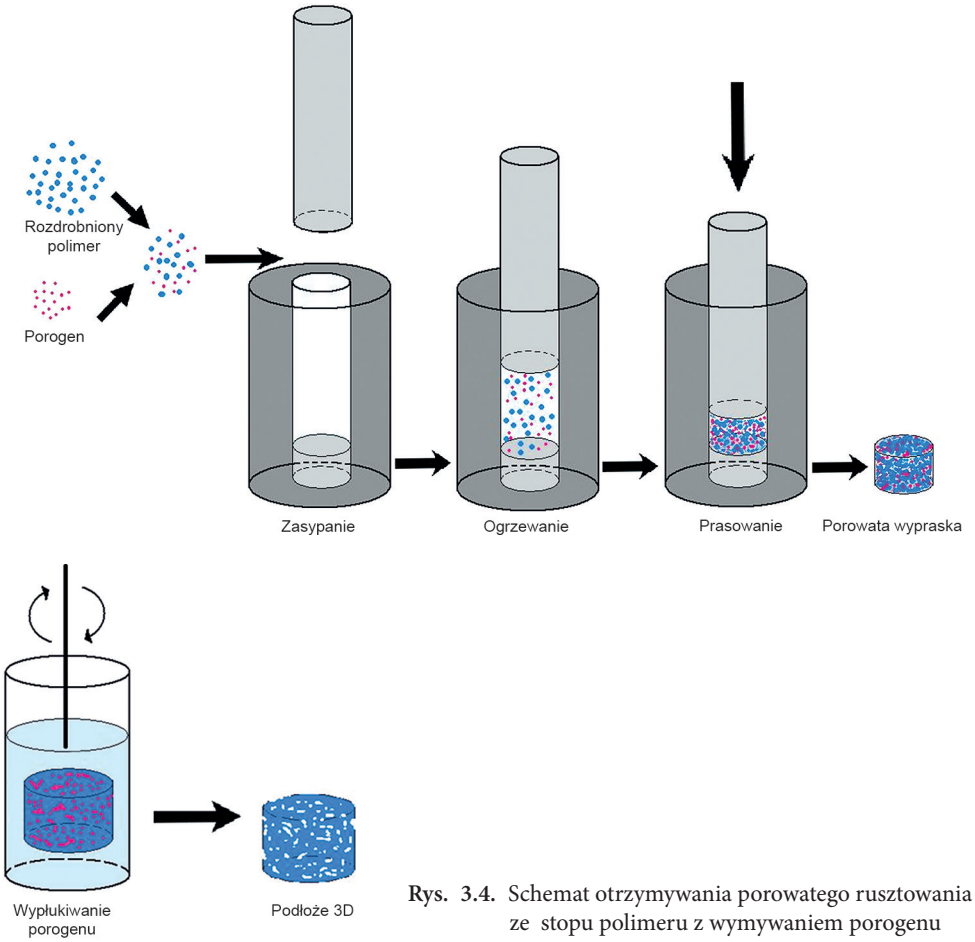
Termicznie indukowana separacja faz w układzie ciecz–ciecz polega na separacji dwóch wzajemnie niemieszających się faz homogenicznego układu roztworu polimeru. Układ ten składa się z polimeru i rozpuszczalnika, więc jest jednofazowy, dwuskładnikowy. Obniżenie temperatury wywołuje utratę stabilności termodynamicznej układu, który dążąc do zmniejszenia energii swobodnej, ulega separacji na poszczególne fazy. Skutkiem jest wytworzenie dwóch stabilnych termodynamicznie, niemieszających się wzajemnie faz. Jedna z nich zawiera wysokie, a druga niskie stężenie polimeru. Kolejnym krokiem jest usunięcie fazy ubogiej w polimer poprzez mrożenie i liofilizację, czego wynikiem jest powstanie porów w strukturze podłoża. Rozmiar porów oraz stopień ich połączenia można kontrolować w pewnym zakresie takimi parametrami, jak szybkość chłodzenia, lepkość rozpuszczalnika oraz stężenie polimeru. Duża lepkość rozpuszczalnika oraz duża szybkość chłodzenia powo-

dują zmniejszenie wielkości porów. Natomiast spadek stężenia polimeru skutkuje zwiększeniem stopnia połączenia porów. Wadą tej metody jest utrudniona kontrola wielkości porów, porowatości oraz połączenia porów. Można tego dokonać poprzez niewielkie zmiany stężenia oraz masy cząsteczkowej polimeru, rodzaju zastosowanego rozpuszczalnika oraz parametrów schładzania, takich jak czas chłodzenia, minimalna uzyskana temperatura czy szybkość obniżania temperatury. Jednak z powodu wysokiej czułości tej metody na ww. parametry występują trudności w uzyskaniu powtarzalności rozmiarów oraz dystrybucji porów. Tak samo jak w przypadku wymywania porogenu, metoda ta wykorzystuje rozpuszczalnik, a więc wadą jest ryzyko, iż nie zostanie on w pełni usunięty z rusztowania. Wykorzystując termicznie indukowaną separację faz w układzie ciecz–ciecz połączoną z liofilizacją, można otrzymać podłoża o porowatości do 96% i porach o rozmiarze 10–300 μm, a uzyskane pory posiadają zazwyczaj anizotropową morfologię. Przykładowo w inżynierii tkankowej stosuje się w tej metodzie mieszaninę dioksanu i wody do rozdzielenia faz ciecz–ciecz przy wytwarzaniu rusztowań z PLA oraz PLGA [5, 11, 13, 21].

Przy zastosowaniu metody **inwersji faz w układzie rozpuszczalnik–nierozpuszczalnik** proces wytwarzania porowatego rusztowania rozpoczyna się od rozpuszczenia polimeru w organicznym rozpuszczalniku oraz odlewaniu tak uzyskanego roztworu do form. W metodzie LIPS inwersję faz wywołuje się dzięki wprowadzeniu trzeciego składnika (nierozpuszczalnika) do układu polimer–rozpuszczalnik poprzez zanurzenie wcześniej uzyskanego roztworu w kąpieli strącającej. Rozpuszczalnik dyfunduje z materiału, a nierozpuszczalnik dyfunduje do roztworu polimeru, który będzie tworzył strukturę rusztowania. Układ, dążąc do zmniejszenia energii swobodnej, ulega separacji na poszczególne fazy, co pozwala na uzyskanie nowego stanu równowagi termodynamicznej. W wyniku tego procesu powstają dwie fazy: jedna o wysokim, a druga o niskim, stężeniu polimeru. Rozpuszczalnik oraz nierozpuszczalnik usuwane są w wyniku suszenia pod obniżonym ciśnieniem. Można też przeprowadzić w tym celu liofilizację. Jednym z istotniejszych parametrów wpływających na mikrostrukturę otrzymanego podłoża jest szybkość dyfuzji, zarówno rozpuszczalnika, jak i nierozpuszczalnika, z i do roztworu polimeru. Separacja faz w układzie ciecz–ciecz zachodzi w sytuacji, gdy szybkość dyfuzji nierozpuszczalnika do roztworu polimeru jest większa niż szybkość dyfuzji rozpuszczalnika z roztworu polimeru oraz gdy stężenie polimeru jest niskie. W odwrotnej sytuacji, czyli gdy stężenie polimeru jest wysokie lub gdy nierozpuszczalnik dyfunduje do roztworu polimeru wolniej niż rozpuszczalnik z roztworu, dochodzi do żelowania. W takim przypadku wytworzona struktura jest lita i pozbawiona porów, co jest niekorzystne. Metodę LIPS stosuje się do wytwarzania zarówno polimerowych, jak i kompozytowych podłoży dla inżynierii tkankowej, w których rozmiary porów wynoszą 10–50 μm, a porowatość mieści się w zakresie 61–98% [5, 11, 13, 21].

3.3.3. FORMOWANIE PODŁOŻA ZE STOPU POLIMERU Z WYMYWANIEM POROGENU

Metoda ta polega na zmieszaniu drobnego granulatu polimeru, z którego ma być wykonane rusztowanie z porogenem. Następnie uzyskana mieszanka jest zasypywana do metalowej formy i ogrzewana powyżej temperatury płynięcia polimeru. Materiał przechodzi wówczas w stan plastyczny, który pozwala na wtopienie się cząstek porogenu w tworzywo. Najczęściej wykorzystywanymi porogenami są chlorek sodu oraz sacharoza. W przypadku tego drugiego środka podczas ogrzewania należy uważać, aby nie przekroczyć temperatury karmelizacji sacharozy, co w pewnym stopniu ogranicza jego zastosowanie. W kolejnym etapie stop polimeru zostaje sprasowany poprzez przyłożenie odpowiedniego ciśnienia, następnie formę ochładza się i wypycha uzyskaną wypraskę. Aby otrzymać porowatą strukturę podłoża, należy wymyć porogen z polimeru przy użyciu gorącej wody. Na rys. 3.4 przedstawiono schemat metody.

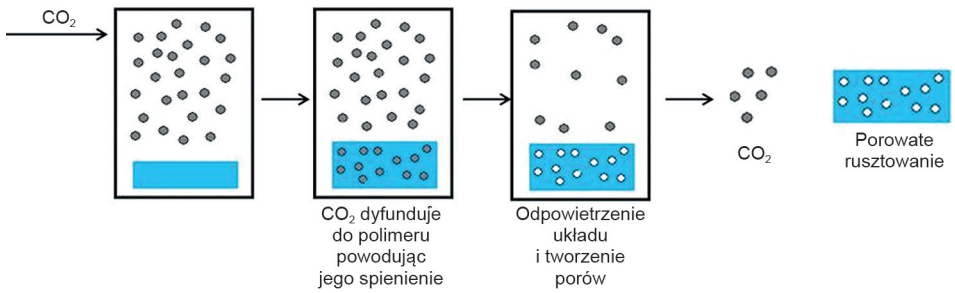


Rys. 3.4. Schemat otrzymywania porowatego rusztowania ze stopu polimeru z wymywaniem porogenu

Wykorzystując metodę formowania ze stopu, można kontrolować wielkość porów poprzez dobór porogenu o odpowiedniej średnicy. Z kolei porowatością można sterować, dostosowując udział wagowy porogenu do stosowanego granulatu polimeru. Za pomocą tej metody można otrzymać rusztowania o różnych kształtach. Wymaga to jednak stosowania różnorakich form o odmiennej geometrii. Zaletą formowania rusztowań komórkowych ze stopu polimeru jest brak konieczności stosowania rozpuszczalnika. Natomiast wadą jest brak kontroli nad przestrzennym rozłożeniem porów w materiale. Ograniczone są również rozmiary wykonywanych rusztowań ze względu na potrzebę wypłukania porogenu. Materiałami najczęściej stosowanymi w tej metodzie są PLA, PGA oraz PLGA [13].

3.3.4. SPIENIANIE GAZEM

Spienianie gazem opiera się na procesie spieniania termoplastów w celu uzyskania porowatego materiału. Istnieje kilka wariantów tej metody, które różnią się głównie zastosowanym środkiem porotwórczym. Najczęściej do spieniania wykorzystywany jest dwutlenek węgla. Proces ten polega na sprężaniu polimeru dwutlenkiem węgla w zbiorniku wysokociśnieniowym. Rozpuszczanie dwutlenku węgla w polimerze prowadzi do obniżenia temperatury zeszklenia polimeru, a po odpowietrzeniu – obniżenie ciśnienia w układzie prowadzi do niestabilności termodynamicznej, która powoduje nadmierne nasycenie dwutlenkiem węgla rozpuszczonym w polimerze i zarodkowanie porów [13]. Schematycznie proces spieniania gazem przedstawiono na rys. 3.5.



Rys. 3.5. Schemat otrzymywania rusztowania metodą spieniania gazem

Spienianie polimeru można także prowadzić w trakcie formowania wtryskowego oraz wytwarzania przy zastosowaniu komory wysokiego ciśnienia w autoklawie. Środki porotwórcze mogą być wprowadzane w wyniku reakcji chemicznej lub przez termiczny rozkład specjalnie dodanych substancji, np. azodikarbonamidu. Proces spieniania można także zainicjować poprzez zmianę temperatury i ciśnienia.

Powszechną metodą wytwarzania skafoldów jest wystawianie polimeru na działanie wysokociśnieniowego dwutlenku węgla. Zaletami stosowania CO_2 jest jego łatwa

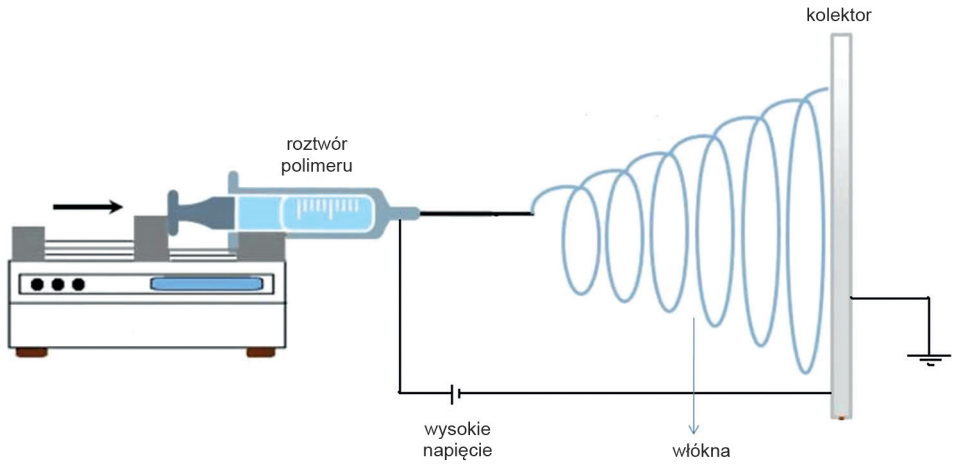
dostępność, niska cena oraz możliwość uzyskania struktury o mniejszej gęstości niż w przypadku użycia np. azotu. Poza tym stosowanie dwutlenku węgla nie wymaga jego usuwania z rusztowania przed wysianiem komórek, co jest niekiedy konieczne przy stosowaniu innych środków porotwórczych.

Wadą spieniania gazem jest tworzenie rusztowań o małej liczbie połączonych porów oraz trudność uzyskania porowatości otwartej. Natomiast zaletą jest możliwość wprowadzenia do materiału substancji bioaktywnych oraz farmaceutyków. Poza tym metoda ta nie wymaga stosowania organicznego rozpuszczalnika [13, 21].

3.3.5. ELEKTROPRZĘDZENIE

Elektroprzędzenie (ang. *electrospinning*) jest procesem pozwalającym na wytwarzanie włókien ze stopionych polimerów oraz ich roztworów, wykorzystując w tym celu wysokie napięcie. Włókna otrzymane tą metodą posiadają średnice w zakresie od kilku nanometrów (nanowłókna) do kilku milimetrów. Elektroprzędzenie umożliwia wytwarzanie podłoży o strukturze imitującej budowę ECM.

W metodzie tej roztwór polimerowy jest przeciskany przez metalową kapilarę formującą kroplę roztworu polimeru na jej końcówce. Między końcówkę kapilary a uziemiony kolektor metaliczny przykładane jest wysokie napięcie. W wyniku tego powstaje wysokonapięciowe pole elektrostatyczne (10–20 kV). Gdy siła pola elektrycznego przewyższa napięcie powierzchniowe kropli, powstaje strumień roztworu polimeru, który przyspiesza w kierunku kolektora. Podczas przechodzenia strumienia przez powietrze rozpuszczalnik paruje i na kolektorze formowana jest włóknina polimerowa (rys. 3.6) [13, 21].



Rys. 3.6. Schemat otrzymywania rusztowania metodą elektrospiningu

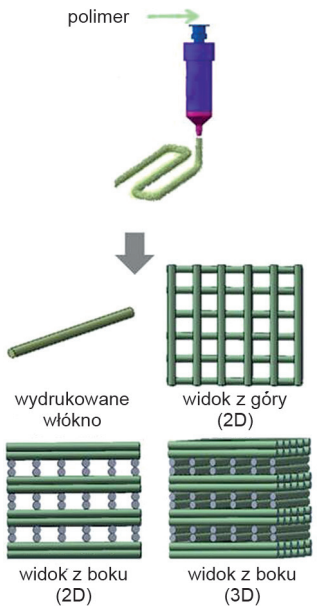
3.3.6. TECHNOLOGIE SZYBKIEGO PROTOTYPOWANIA

Wadą większości wyżej wymienionych metod jest brak możliwości precyzyjnej kontroli nad przestrzenną porowatą strukturą rusztowania. Dlatego zaczęto korzystać ze wspomagania komputerowego w projektowaniu rusztowań komórkowych. Techniki szybkiego prototypowania polegają na wytwarzaniu rusztowania o określonym kształcie poprzez selektywne dodawanie materiału, warstwa po warstwie, za pomocą odpowiedniego programu komputerowego [6, 13, 21].

Zaletą technologii szybkiego prototypowania jest wysoka powtarzalność procesu wytwarzania. Umożliwia to lepszą niż w przypadku konwencjonalnych metod kontrolę porowatości, wielkości porów oraz tworzenia siatki połączonych porów. Poza tym w metodach tych nie ma konieczności stosowania rozpuszczalników, które mogą mieć działanie toksyczne. Techniki te mają jednak także wady, takie jak ograniczony wybór stosowanych materiałów oraz niewystarczającą rozdzielczość wynikającą z dokładności stosowanych narzędzi. Spośród metod szybkiego prototypowania wykorzystuje się kilka technik, wybrane z nich zostaną scharakteryzowane poniżej.

Drukowanie przestrzenne (3D printing)

Projekt rusztowania wykonuje się z zastosowaniem oprogramowania CAD (ang. *computer aided design*). Następnie strukturę podłoża otrzymuje się poprzez drukowanie kolejnych warstw polimeru. Materiałem podstawowym w metodzie druku 3D jest proszek, którego warstwa początkowo jest rozłożona na platformie.



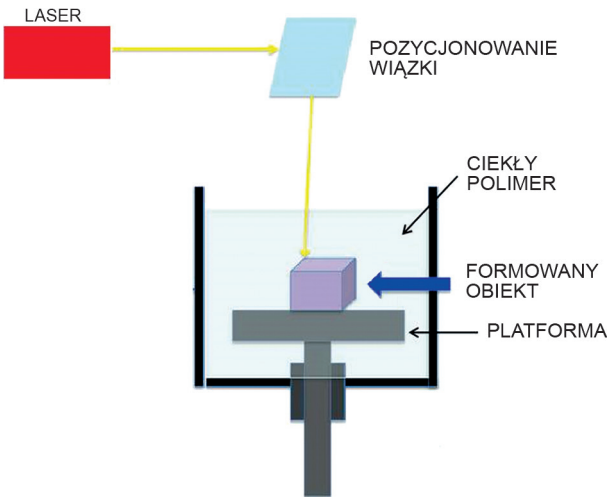
Rys. 3.7. Schemat otrzymywania rusztowania metodą druku 3D

Następnie za pomocą głowicy drukarki osadza się na proszku roztwór stanowiący spoiwo. W wyniku tego pojedyncze cząstki proszku zostają połączone, tworząc dwuwymiarowy profil warstwy. Kolejnym krokiem jest położenie nowej warstwy proszku. Proces powtarza się cyklicznie. Po wyschnięciu spoiwa niepołączone cząstki proszku są usuwane za pomocą strumienia powietrza i powstaje rusztowanie. Na rys. 3.7 przedstawiono schemat drukowania przestrzennego rusztowania komórkowego.

Metoda ta jest jednak ograniczona przez wielkość cząsteczek proszku oraz kropli spoiwa do kilkuset mikrometrów. Na obniżenie precyzji wykonania rusztowania wpływa także rozmiar dyszy drukarki oraz dokładność jej pozycjonowania, które są ograniczone. Zdarza się także, że proszek z materiału, który może być zastosowany do produkcji skafoldów, nie jest dostępny w odpowiednim rozmiarze cząstek (zazwyczaj 80–250 μm). Stwarza to potrzebę obróbki wstępnej materiału. Konieczne jest także dopasowanie odpowiedniego spoiwa do poszczególnych materiałów bazowych. Najczęściej jako środek wiążący stosuje się wodę lub naturalne polimery, takie jak żelatyna, kolagen czy polimery na bazie skrobi [13].

Stereolitografia

Stereolitografia (SLA) wykorzystuje promieniowanie elektromagnetyczne do zainicjowania reakcji chemicznej (fotopolimeryzacji lub sieciowania) w specjalnych ciekłych polimerach. Wiązka lasera UV jest kierowana na wybrane obszary warstwy ciekłego polimeru, powodując punktowe krzepnięcie materiału. Następnie utworzona warstwa jest zanurzana głębiej w kąpieli ciekłego polimeru, co powoduje, że kolejna warstwa materiału jest poddawana ekspozycji na wiązkę lasera. Proces ten powtarza się aż do uzyskania podłoża o wymaganym kształcie. Schemat procesu stereolitografii pokazano na rys. 3.8.



Rys. 3.8. Schemat otrzymywania rusztowania metodą SLA

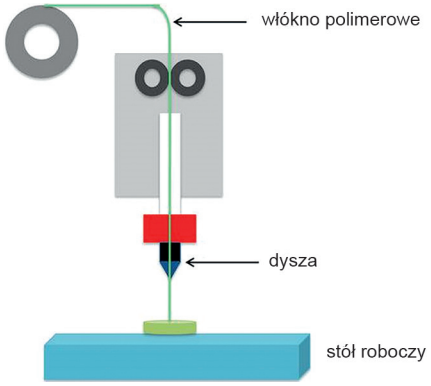
Ograniczeniem stereolitografii są wymagania stawiane materiałom, które mogą być wykorzystane w tej metodzie. Przede wszystkim materiał musi posiadać zdolność do reagowania na działanie światła, które aktywuje reakcje chemiczne. Ze wszystkich metod szybkiego prototypowania stereolitografia jest najdokładniejszą i najbardziej precyzyjną metodą. Podłoża wytwarzane za pomocą tej techniki posiadają zazwyczaj pory o rozmiarze ok. 250 μm, ale niektóre systemy mają możliwość produkowania skafoldów o porach o wielkości 70 μm, dzięki skupieniu światła lasera do bardzo małej plamki [13].

Selektywne spiekanie laserowe

Kolejną metodą z grupy technik szybkiego prototypowania jest selektywne spiekanie laserowe (ang. *selective laser sintering*, SLS). Technika ta wykorzystuje wiązkę lasera do spiekania cienkich warstw proszku. Najczęściej w tym celu stosuje się promieniowanie laserowe z zakresu podczerwieni, którego źródłem może być np. laser CO_2. Spiekanymi materiałami mogą być woski, polimery syntetyczne (poliamid, poliwęglan, polikaprolakton) lub mieszaniny polimerów, np. alkoholu poliwinylowego z hydroksyapatytem. Wiązka lasera selektywnie spieka powierzchnię proszku poprzez podniesienie jego temperatury nieznacznie ponad temperaturę zeszklenia, ale poniżej temperatury topnienia zastosowanego materiału. Cząstki proszku stykające się ze sobą są odkształcane i łączone ze sobą. Kolejnym krokiem jest obniżenie stołu roboczego o zadaną wysokość, która stanowi grubość jednej warstwy. Nowe warstwy proszku rozprowadzone są za pomocą wałka na wcześniej spieczonej warstwie. Laser znowu skanuje powierzchnie, powodując spiekanie kolejnej warstwy i łączenie jej z poprzednią. Opisana procedura jest powtarzana aż do uzyskania zadanego kształtu. Cały proces jest kontrolowany przez specjalistyczne oprogramowanie, które umożliwia sterowaniem różnymi parametrami, np. wartością ciśnienia panującego w komorze roboczej [12, 13].Ograniczeniami techniki SLS są średnica wiązki lasera (ok. 400 μm) oraz rozmiar cząstek stosowanego proszku, które determinują wymiary wytwarzanego rusztowania. Materiał stosowany w tej metodzie musi także spełniać określone wymagania, takie jak odpowiednia topliwość. W związku z rozkładem gaussowskim energii lasera zazwyczaj trudno wytworzyć kształty o ostrych narożnikach czy wyraźnych granicach. Kolejnym problemem jest usuwanie niezwiązanego materiału z podłoża. Nakłada to pewne ograniczenie w konstrukcji rusztowania w postaci najmniejszej wielkości porów, przez które można usunąć nadmiar proszku. Zaletą metody SLS jest możliwość wykorzystania materiału, którego nie trzeba doprowadzać do stanu ciekłego. Selektywne spiekanie laserowe jest techniką preferowaną przy wytwarzaniu złożonych porowatych rusztowań z materiałów ceramicznych, które są odpowiednie do implantacji w miejscu ubytku kości [6, 13].

Osadzanie stopionego materiału

W procesie osadzania stopionego materiału (ang. *fused deposition modeling*, FDM) rusztowania powstają poprzez nakładanie kolejnych warstw półpłynnego materiału, który jest wytłaczany (ekstrudowany) z podgrzewanej dyszy. Materiał ma formę filamentu o stałej średnicy (1,75 mm lub 2,85 mm) nawiniętego na szpulę. Głowica drukująca porusza się nad stołem roboczym według zdefiniowanej w pliku STL ścieżki i nakłada na powierzchnię stołu roboczego półpłynny materiał polimerowy, rysując za jego pomocą kształt (rys. 3.9). Kiedy pierwsza warstwa materiału jest utworzona, stój jest obniżany o grubość jednej warstwy i procedura wytłaczania polimeru jest powtarzana, poszczególne warstwy są nakładane jedna na drugą, budując strukturę 3D rusztowania o dokładnie określonej porowatości. Do tworzenia rusztowań metodą FDM można wykorzystać obrazy uzyskane za pomocą tomografii komputerowej, rezonansu magnetycznego lub dane modeli wygenerowanych komputerowo [13].



Rys. 3.9. Schemat otrzymywania rusztowania metodą FDM

Modyfikacją FDM jest metoda PED (ang. *precision extruding deposition*). Pozwala ona na ominięcie etapu wytwarzania włókien do głowicy wytłaczarki. Zamiast tego polimer może być użyty w postaci granulek. Metodą tą wytwarza się przykładowo rusztowania z polikaprolaktonu (PCL) z porami o rozmiarze 200–250 μm. Ograniczeniem metody FDM są wymagania stawiane stosowanym materiałom. Polimer musi wykazywać odpowiednie właściwości termoplastyczne, dlatego najczęściej wykorzystywane są w niej polimery, takie jak PCL, ABS lub PP. Czasem stosowane są biodegradowalne PLGA oraz PLA [13].

Wadą skafoldów wykonanych metodą osadzania stopionego materiału jest utrudnienie biodegradacji poprzez dużą grubość ścianek porów, która wynika z grubości wykorzystanych włókien. Poza tym otrzymywane rusztowania mają najczęściej postać prostopadłościanu [13].

Tabela 3.3

Wady i zalety metod formowania rusztowań komórkowych [1, 13, 21]

Metody	Zalety	Wady
Odlewanie z roztworu/ wymywanie porogenu	• Stosunkowo prosta technika pozwalająca na tworzenie rusztowań o regularnej porowatości, kontrolowanym składzie i wielkości porów	• Konieczność całkowitego usunięcia rozpuszczalników organicznych, które mogą mieć działanie toksyczne na komórki • Trudność z kontrolowaniem kształtu porów i ich wzajemnego połączenia • Ograniczona grubość rusztowania i właściwości mechaniczne
Spienianie gazem	• Eliminuje użycie rozpuszczalników chemicznych	• Wysokie ciśnienie uniemożliwia włączenie komórek i cząsteczek bioaktywnych bezpośrednio w rusztowanie • Materiały niestabilne temperaturowo mogą być denaturowane podczas prasowania tłokowego • Trudno jest kontrolować rozmiary porów i zapewnić ich wzajemne połączenia
Separacja faz	• Eliminuje etap wypłukiwania porogenu • Może być w łatwy sposób łączona z innymi technikami	• Mały rozmiar porów • Stosowanie rozpuszczalników organicznych ogranicza stosowanie bioaktywnych cząsteczek lub komórek podczas formowania rusztowania
Elektrospining	• Rusztowanie o dużej powierzchni do osadzania komórek • Prosta i niedroga technika	• Mogą być wymagane rozpuszczalniki organiczne, które mogą być szkodliwe dla komórek • Ograniczone właściwości mechaniczne • Trudno wprowadzić precyzyjną mikroarchitekturę w rusztowaniu
Technologie szybkiego prototypowania • Druk 3D • FDM • SLA • SLS	• Złożone kształty 3D o wysokiej rozdzielczości, kontrolowanym rozmiarze porów i morfologii oraz kontrolowanej strukturze • Poprawiona zdolność do wprowadzania struktur naczyniowych w rusztowania • W zależności od zastosowanej techniki komórki mogą być zawarte w wysokim stężeniu bezpośrednio w materiale rusztowania	• Niektóre techniki są ograniczone ze względu na dostępne do druku materiały • Koszty konfiguracji mogą być wysokie

Opisane wybrane metody wykorzystywane w inżynierii tkankowej mają zarówno zalety, jak i ograniczenia. Obserwuje się nieustanny rozwój tego obszaru inżynierii tkankowej, który dąży do poprawy kontroli parametrów wykonywanych podłoży. Dla prawidłowego rozwoju hodowanych komórek istotne są wielkość oraz kształt uzyskanych porów, tworzenie sieci połączonych porów, a także właściwości mechaniczne podłoża oraz czas jego biodegradacji. W tab. 3.3 porównano wady i zalety wybranych metod stosowanych do wytwarzania rusztowań komórkowych.

Badania w dziedzinie inżynierii tkankowej prowadzone przez ostatnie trzy dekady przyniosły wiele rozwiązań, jednak wciąż pozostaje wiele trudności, np.:

- prawidłowy wzrost komórek (często pochodzących z komórek macierzystych) z właściwym fenotypem i ich organizacja w odpowiednich rusztowaniach;
- dostarczanie, podawanie i utrzymywanie odpowiedniego poziomu tlenu i składników odżywczych dla komórek w rusztowaniach;
- określenie optymalnych środowisk inżynierskich, takich jak bioreaktory, pożywki hodowlane, stymulacje fizyczne, dla konkretnych rusztowań tkankowych; funkcjonalna integracja tkanki hodowanej na rusztowaniach z tkanką gospodarza.

LITERATURA

[1] Akter F., *Tissue engineering made easy*, Academic Press, London 2016.

[2] Agmon G., Christman K.L., *Controlling stem cell behavior with decellularized extracellular matrix scaffolds*, Current Opinion in Solid State and Materials Science 2016, 20(4):193-201.

[3] Cheung H., Lau K., Lu T., Hui D., *A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffolds development*, Composites: Part B: Engineering 2007, 38:291-300.

[4] Dutta R. C., Dey M., Dutta AK., Basu B., *Competent processing techniques for scaffolds in tissue engineering*, Biotechnology Advances 2017, 35(2):240-250.

[5] Dziadek M., Cholewa-Kowalska K., *Wybrane metody otrzymywania porowatych rusztowań w inżynierii tkankowej*, Acta Bio-Optica et Informatica Medica. Inżynieria Biomedyczna 2014, 20(4):193-203.

[6] Hutmacher D.W., *Scaffolds design and fabrication technologies for engineering tissues – state of art and future perspectives*, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 2001, 12(1):107-124.

[7] Jansen J.A., Vehof J.W., Ruhe P.Q., Kroze-Deutman H., Kuboki Y., Takita H., Hedberg, E.L., Mikos, A.G., *Growth factors-loaded scaffolds for bone engineering*, J. Control Release 2005, 101, 127-136.

[8] Kramschuster A., Turng L., *Fabrication of Tissue Engineering Scaffolds*, Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics, Plastics Design Library 2012, 427-442.
[9] Langer R., Vacanti J.P., *Tissue engineering*, Science 1993, 14, 260(5110):920-6.
[10] Li W., Shanti R.M., Rocky S.T., *Electrospinning technology for nanofibrous scaffolds in tissue engineering*, Nanotechnologies for the Life Sciences 2006, 9:135-187.
[11] Ma P. X., *Scaffolds for tissue fabrication*, Materials Today 2004, 7(5):30-40.
[12] Mierzejewska Ż.A., *SLS Technology – characteristics and application of selective laser sintering in biomedical engineering*, Journal of Technology and Exploitation in Mechanical Engineering 2015, 1(1-2):178-190.
[13] Migliaresi C., Motta A., *Scaffolds for tissue engineering. Biological design, materials, fabrication*, Pan Stanford Publishing, USA, 2014.
[14] Nair L.S., Laurencin C.T., *Biodegradable polymers as biomaterials*, Progress in Polymer Science 2007, 32:762-798.
[15] Nikolova M.P., Chavali M.S., *Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review*, Bioactive materials 2019, 4, 271-292.
[16] O'Brien F.J., *Bio materials and scaffolds for tissue engineering*, Materials Today 2011, 14(3):88-95, https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
[17] Pande V., Kharde A., Bhawar P., Abhale V., *Scaffolds: Porous Scaffold for Modulated Drug Delivery*, Austin Therapeutics 2016, 3(1):1027.
[18] Rezwan K., Chen Q.Z., Blaker J.J., Boccaccini A.R., *Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering*, Biomaterials 2006, 27(18):3413-1431.
[19] Salgado A., Coutinho O., Reis R., *Bone tissue engineering: state of the art and future trends*, Macromolecular Bioscience 2004, 4(8):743-65.
[20] Sheikh Z., Najeeb S., Khurshid Z., Verma V., Rashid H., Glogauer M., *Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering Applications*, Materials 2015, 8(9):5744-5794.
[21] Turnbull G.S., Clarke J.V., Picard F., Riches P., Jia J., Han F., Li B., Shu W., *3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering*, Bioactive Materials 2018, 3(3):278-314.
[22] Witte F., Ulrich H. ,Rudert M., Willbold E., *Biodegradable magnesium scaffolds: Part 1: appropriate inflammatory response*, J. Biomed. Mater. Res. 2007, A81, 748–756, https://doi.org/10.1002/jbm.a.31170.
[23] Yingfei X., Sant V., Phillippi J., Sant S., *Biodegradable and biomimetic elastomeric scaffolds for tissue-engineered heart valves*, Acta Biomaterialia 2017, 48:2-19.
[24] Zdeblick T.A., Phillips F.M., *Interbody cage devices*, Spine J. 2003, 28, S2-S7.

4. KOMPOZYTY POLIMEROWE

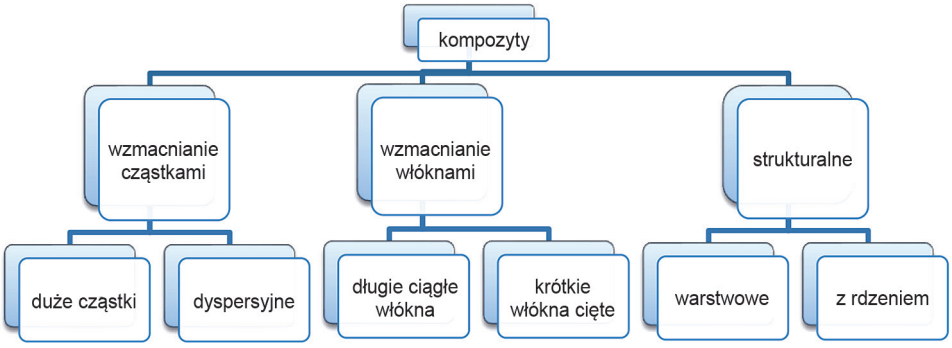
4.1. WPROWADZENIE

„**Kompozyt** jest to materiał utworzony z co najmniej dwóch faz o różnych właściwościach w taki sposób, że ma właściwości lepsze i (lub) właściwości nowe (dodatkowe) w stosunku do komponentów użytych osobno lub wynikających z prostego sumowania tych właściwości – kompozyt jest materiałem zewnętrznie monolitycznym, jednakże z widocznymi granicami między komponentami" [3].

Kompozyty są wykorzystywane ze względu na możliwość projektowania ich właściwości oraz struktury dopasowanych do funkcji, które dany wyrób ma spełniać. Kompozyty mogą być tak zaprojektowane, aby ich sztywność, wytrzymałość lub odporność na kruche pękanie były lepsze w porównaniu ze składnikami użytymi do ich wytworzenia. Właściwości te zależą od rodzaju i zawartości włókna lub cząstki, ich postaci oraz adhezji do matrycy polimerowej. Do właściwości, które mogą być poprawione poprzez wytworzenie materiału kompozytowego należą: wytrzymałość, sztywność, odporność korozyjna, odporność na zużycie, wytrzymałość zmęczeniowa, waga, przewodnictwo termiczne lub elektryczne. Materiały kompozytowe znajdują zastosowanie w wielu gałęziach medycyny ze względu na możliwość ich projektowania pod kątem spełniana zarówno funkcji biomechanicznych, jak i biologicznych. Wiele żywych tkanek ma strukturę przypominającą kompozyty włókniste (ścięgna, więzadła) lub włóknisto-cząsteczkowe (kość), co daje możliwość stosowania kompozytów do wspomagania lub zastępowania funkcji tkanek w procesach ich leczenia.

Kompozyt składa się z osnowy (matrycy) i umieszczonego w niej drugiego składnika (zbrojenia), równomiernie rozproszonego i zwykle o znacznie lepszych właściwościach mechanicznych. Osnowa, nazywana również fazą ciągłą, scala napełniacz, umożliwia nadanie wyrobom odpowiedniego kształtu oraz determinuje większość fizycznych oraz chemicznych właściwości materiału. Zadaniem fazy rozproszonej (zbrojenia) jest dodatkowe poprawienie wybranych właściwości materiału. Materiały kompozytowe podzielić można w zależności od rodzaju osnowy, rodzaju zbrojenia, sposobu wytwarzania, przeznaczenia, właściwości technologicznych itd. W zależności od kryterium rodzaju napełniacza wyróżnia się kompozyty zbrojone cząstkami, włóknami oraz strukturalne (rys. 4.1). Podział w zależności od pochodzenia

wyróżnia kompozyty naturalne oraz kompozyty wytwarzane i zaprojektowane przez człowieka (sztuczne). Ze względu na materiał osnowy wyróżnia się kilka rodzajów kompozytów: (1) kompozyty z osnową ceramiczną CMC (ang. *ceramic-matrix composites*), np. Al_2O_3, SiO_2, SiC, TiO_2; (2) kompozyty z osnową organiczną polimerową lub węglową OMC (ang. *organic-mtrix composites*); (3) kompozyty z osnową metalową MMC (ang. *metal-matrix composites*), np. Ti, Ni, Fe, Al, Cu lub ich stopy. Kompozyty na osnowie polimerowej dominują nad pozostałymi pod względem zastosowania w technice. Osnowę w polimerowych materiałach kompozytowych mogą stanowić duroplasty lub termoplasty. Duroplasty stosowane jako osnowa kompozytów polimerowych to m.in. żywice epoksydowe, poliestry lub silikony. Typowe termoplasty stosowane jako osnowy polimerowe to poliamid, poliacetal, polietylen, polipropylen, poli(chlorek winylu), polistyren czy też poliwęglan [6, 9, 10].



Rys. 4.1. Klasyfikacja kompozytów wg rodzaju wzmocnienia

Poza wymienionymi wyżej rodzajami kompozytów polimerowych, w inżynierii medycznej znajdują również zastosowanie nanokompozyty oraz kompozyty gradientowe.

W **kompozytach umacnianych dyspersyjnie** o wytrzymałości kompozytu decyduje osnowa, a mechanizm wzmocnienia polega na ograniczeniu przez cząstki ruchów dyslokacji. Wynikająca z obciążenia przemieszczająca się dyslokacja, napotykając na cząstki zbrojenia, może zawijać się wokół nich i po całkowitym przejściu pozostawić pętlę dyslokacyjną wokół tej cząstki. Dalszy ruch dyslokacji wymaga przyłożenia wyższego naprężenia. Obserwuje się wówczas podwyższenie granicy plastyczności kompozytu. Dodatkowym efektem wprowadzenia do osnowy cząstek dyspersyjnych jest także obniżenie skłonności materiału do pełzania oraz podwyższenie odporności materiału na pełzanie w szerokim zakresie temperatur. Za cząstki dyspersyjne uważa się cząstki, których średni wymiar wynosi od 0,01 do 0,1 μm. Udział objętościowy cząstek dyspersyjnych w kompozycie nie może przekraczać 15%. Efektywność umocnienia cząstkami dyspersyjnymi zależy od wielkości, kształtu, udziału objętościowego oraz od wzajemnego oddziaływania dyslokacji z wydzieleniami. Najefektywniejsze umocnienie uzyskuje się, stosując cząstki o wielkości do 0,01 μm.

W **kompozytach umacnianych dużymi cząstkami** obciążenia przenoszone są przez osnowę i cząstki. Umocnienie cząstkami kompozytów wynika z oddziaływania sprężystego cząstek z osnową, ograniczenia ruchu dyslokacji i utworzenia ciągłego szkieletu cząstek fazy umacniającej. Cząstki umacniające mają wielkość powyżej 1 μm, a ich udział objętościowy może dochodzić do 90%.

Kompozyty umacniane włóknami dominują obecnie na rynku materiałów kompozytowych. Włókna stosowane do ich produkcji mogą być ciągłe lub nieciągłe, czyli krótkie. Jako zbrojenie można stosować także wyroby powstające z pojedynczych włókien, tj. rowing, maty, tkaniny i preimpregnaty. Udział objętościowy włókien w kompozytach może dochodzić do 90%. W kompozytach włóknistych wykorzystuje się włókna szklane, grafitowe, węglowe lub organiczne o różnym stopniu uporządkowania struktury oraz różnych parametrach. W kompozytach tego typu obciążenia przenoszone są przez włókna. Ze względu na podobieństwo budowy i właściwości kompozytów włóknistych do niektórych tkanek oraz dobre właściwości mechaniczne, materiały te mogą pracować jako implanty zdolne do zespalania, wypełniania lub zastępowania tkanek. Ta grupa kompozytów zostanie szerzej opisana w rozdz. 4.5.

Kompozyty strukturalne można podzielić na dwie grupy: laminaty, czyli połączone ze sobą warstwy dwuwymiarowych kompozytów oraz kompozyty warstwowe (przekładkowe, kanapkowe (ang. *sandwich*)). Laminat to układ połączonych ze sobą warstw kompozytowych (najczęściej o różnych parametrach) odpowiednio zorientowanych względem kierunku głównego obciążenia tak, aby wykorzystać jak najlepsze ułożenia pojedynczych warstw. Konstrukcje warstwowe są zbudowane z co najmniej dwóch różnych składników połączonych na poziomie makroskopowym. Wzorem dla wielowarstwowych materiałów kompozytowych są konstrukcje spotykane w naturze (pnie drzew, plaster miodu, łodygi zbóż itp.).

Nanokompozyty są to materiały kompozytowe, w których co najmniej jeden składnik ma wymiar w skali nanometrycznej. Nanonapełniacze można sklasyfikować ze względu na charakter chemiczny, rodzaj struktury fizycznej, jednak najczęściej są one klasyfikowane pod względem kształtu cząstek. Wyróżniamy nanonapełniacze 1D – liniowe (np. nanorurki węglowe), 2D – płytkowe (np. montmorylonit) bądź 3D – proszkowe (np. cząstki srebra). Dobry efekt umocnienia uzyskiwany dla nankompozytów wynika z tego, iż osnowa polimerowa oraz nanonapełniacz oddziaływają ze sobą już na poziomie cząsteczkowym. Dzięki temu nanonapełniacz, o wymiarach poniżej 100 nm, dodany w niewielkiej ilości do osnowy (zwykle kilka procent) może znacznie zmienić wybrane właściwości materiału kompozytowego.

Kompozyty gradientowe to materiały, w których – wzdłuż co najmniej jednego określonego kierunku – uzyskano w sposób celowy ciągłą zmianę właściwości użytkowych i/lub konstrukcyjnych w wybranym procesie technologicznym. W przypadku kompozytów stosowanych w medycynie największe znaczenie odgrywają kom-

pozyty z gradientem modułu Younga, porowatości oraz resorpcji, które pozwalają na projektowanie np. implantów ortopedycznych na wzór tkanki kostnej.

Kompozyty wzmacniane cząstkami są materiałami izotropowymi, natomiast kompozyty włókniste (włókna długie) anizotropowymi, dla których właściwości w różnych kierunkach mogą być zaprojektowane tak, aby spełnić określone wymagania. Większość tkanek, np. kości, ścięgna i naczynia krwionośne, to kompozyty o hierarchicznej budowie. Szerokie możliwości projektowania kompozytów dają możliwość uzyskania materiału dopasowanego do właściwości tkanek, które ma zastępować lub wspomagać w procesie leczenia.

4.2. MATERIAŁY NA WZMOCNIENIA

Faza zbrojenia odpowiada w kompozycie za jest poprawienie wybranych właściwości materiału osnowy. Wśród podstawowych funkcji zbrojenia wymienia się poprawę właściwości wytrzymałościowych, zwiększenie odporność na ścieranie, zmniejszenie rozszerzalności cieplnej, zwiększenie odporność na gradient temperatury oraz hamowanie rozprzestrzeniania się pęknięć.

W kompozytach wykorzystywanych w inżynierii medycznej najczęściej stosowane są systemy wzmacniające, takie jak: włókna węglowe, włókna polimerowe oraz cząstki ceramiczne. Włókna to najefektywniejszy rodzaj zbrojenia. Włókna wytwarzane są często jako ciągłe włókna, a właściwości kompozytu są określane przez orientację i udział objętościowy włókien danego rodzaju względem osnowy. W porównaniu z kompozytami z włóknami ciągłymi kompozyty z krótkimi włóknami są mniej efektywne w osiągnięciu pożądanej orientacji, ale posiadają większy potencjał przetwórczy.

Włókna węglowe otrzymywane są w wyniku pirolizy organicznych włókien prekursorowych, np. poliakrylonitrylu (PAN) w środowisku obojętnym. Zawartość węgla w tych włóknach wynosi od 93 do 95%. Włókna węglowe mają niską gęstość (od 1,7 do 2,1 g/cm^3 – w zależności od prekursora) i bardzo dobre właściwości mechaniczne (moduł sprężystości do 900 GPa i wytrzymałość do 4,5 GPa – w zależności od prekursora i procesu wytwarzania). Ich główną wadą jest niska wytrzymałość na ścinanie. Włókna węglowe służą do wytwarzania lekkich kompozytów o wysokiej wytrzymałości znajdujących zastosowanie również w inżynierii medycznej, m.in. w elementach konstrukcyjnych protez. Należy wziąć pod uwagę, że biozgodność włókna węglowego zależy od temperatury stosowanej do obróbki cieplnej w jego produkcji.

Włókna polimerowe charakteryzują się znacznie mniejszą wytrzymałością i sztywnością w porównaniu z włóknami węglowymi, dlatego wykorzystywane są w mniejszym zakresie. Wyjątek stanowią jedynie włókna aramidowe lub polietylenowe o ultrawysokiej masie cząsteczkowej, o właściwościach porównywalnych do

niektórych tkanek miękkich. W zależności od materiału włókna polimerowe cechują się również zdolnością do biodegradacji, co stanowi o ich przydatności w niektórych zastosowaniach. Poniżej scharakteryzowano najważniejsze włókna polimerowe wykorzystywane w inżynierii medycznej.

Włókna aramidowe (poliamidy aromatyczne, poli(para-aramidy)) są otrzymywane metodą przędzenia z roztworu poli(p-fenylenotereftalamidu) (Kevlar, DuPont) i kwasu siarkowego oraz koagulacje w kąpieli wodnej. Włókna aramidowe są lekkie (1,44 g/cm^3), sztywne (moduł sprężystości może osiągać wartość 190 GPa) i wytrzymałe (wytrzymałość na rozciąganie ok. 3,6 GPa). Mają również dużą odporność na ścieranie i wytrzymałość zmęczeniową. Ich wadą jest zdolność do pochłaniania wody oraz niska wytrzymałość na ściskanie.

Włókna polietylenowe o dużej wytrzymałości są wytwarzane z polietylenu o ultrawysokiej masie cząsteczkowej (UHMWPE). Włókna wytłacza się ze stopu przez filiery pod wysokim ciśnieniem, a następnie poddaje rozciągowi w celu uzyskania jednoosiowej orientacji fibryli i wysokiego stopnia krystaliczności (96%). Włókna polietylenowe charakteryzuje wysoka wytrzymałość na rozciąganie i wysoki moduł sprężystości przy niskiej gęstości (0,97 g/cm^3) oraz duża zdolność do dyssypacji energii. Niska zwilżalność włókien UHMWPE powoduje złe wiązanie włókien z matrycą polimerową.

Polilaktyd (PGA) i poliglikolid (PLA) oraz ich kopolimery są najczęściej wykorzystywanymi polimerami do produkcji **włókien biodegradowalnych**. Polimery te wykorzystywane są do produkcji wchłanialnych nici chirurgicznych. Znalazły również zastosowanie w wytwarzaniu rusztowań komórkowych na potrzeby inżynierii tkankowej oraz jako włókna lub tkaniny na zbrojenia w kompozytach polimerowych.

Cząstki ceramiczne dodawane są do osnowy polimerowej w celu poprawy takich właściwości, jak wytrzymałość i twardość. Do materiałów ceramicznych, które znajdują zastosowanie jako cząstki do wzmacniania kompozytów, zalicza się fosforany wapnia, fosforany glinu i cynku, szkło i ceramikę szklaną. Spośród fosforanów wapnia, hydroksyapatyt $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (HAp) oraz trójfosforan wapnia $Ca_3(PO_4)_2$ (TCP) są najczęściej wykorzystywanymi materiałami ceramicznymi do formowania kompozytów na potrzeby stomatologii oraz ortopedii. Oprócz poprawy właściwości mechanicznych osnowy polimerowej, cząstki ceramiczne wpływają również na zwiększenie zdolności integracji implantów z tkanka kostną.

Najczęściej stosowanymi **nanonapełniaczami** są nanorurki węglowe (CNT), grafen, metale (nanosrebro), tlenki metali, ceramika, nanoglinka (np. montmorylonit, hektoryt i saponit). Nanokompozyty polimerowe znajdują wiele interesujących zastosowań w obszarze inżynierii medycznej, takich jak inżynieria tkankowa, obrazowanie biomedyczne, implanty chirurgiczne czy systemy dostarczania leków.

4.3. MATERIAŁY NA OSNOWĘ

Osnowa w kompozycie jest ciągłą fazą objętościową, która obejmuje również fazę wzmocnienia w sposób całkowity lub częściowy. Pełni ona kilka ważnych funkcji, tj. utrzymuje włókna lub cząstki na miejscu (utrzymuje układ w zwartej i określonej formie), a w kompozytach zorientowanych utrzymuje preferowany kierunek włókien. Osnowa przenosi obciążenie zewnętrzne na zbrojenie i redystrybuuje naprężenie. W przypadku kruchych włókien matryca pomaga zwiększyć odporność na pękanie, ponieważ zazwyczaj jest to materiał o mniejszej sztywności i może tolerować większe siły wydłużenia i ścinania niż wzmocnienie. Matryca określa również odporność na obciążenia chemiczne, higroskopijne i termiczne oraz chroni zbrojenie przed uszkodzeniami wywołanymi tymi obciążeniami. Matryca, która może być termoplastem lub duroplastem ma również duży wpływ na przetwarzanie kompozytu. Należy również wymienić negatywne czynniki związane z osnową, które wpływają na osłabiające właściwości kompozytu, tj.: porowatość, wtrącenia obce, zanieczyszczenia na granicy włókno–osnowa oraz ewentualna reakcja osnowy z włóknami.

W większości kompozytów biomedycznych stosuje się osnowy polimerowe, głównie termoplastyczne, które w środowisku organizmu mogą być biostabilne lub biodegradowalne. Zestawienie materiałów polimerowych wykorzystywanych w kompozytach dla medycyny pokazano w tab. 4.1. Najczęściej stosowanymi polimerami biostabilnymi są: polisulfon (PSU), polieteroketon (PEEK), polietylen o ultrawysokiej masie cząsteczkowej (UHMWPE), poli(metakrylan metylu) (PMMA), politetrafluoroetylen (PTFE) i hydrożele. Te osnowy można wzmocnić włóknami węglowymi, polimerowymi i cząstkami ceramicznymi. Zastosowania takich kompozytów w inżynierii medycznej obejmują endoprotezy stawu biodrowego, płytki i śruby do osteosyntezy, sztuczne korzenie zębów i cementy kostne [6].

Jednymi z najważniejszych biodegradowalnych polimerów stosowanych jako osnowy kompozytów są alifatyczne poliestry. Istnieje wiele alifatycznych biodegradowalnych poliestrów, które cechuje doskonała biodegradowalność i biokompatybilność. Jednak tylko niewielka ich liczba jest dostępna na rynku. Poliestry, które zyskały komercyjne zastosowanie lub które są obecnie badane to kwas polimlekowy (PLA), kwas poliglikolowy (PGA), poli-ε-kaprolakton (PCL) i polihydroksymaślan (PHB). Alifatyczne poliestry znalazły wiele zastosowań w medycynie i technologii farmaceutycznej, np. w systemach dostarczania leków, zamykaniu ran, szwach chirurgicznych, implantach i inżynierii tkankowej.

Również polimery bioresorbowalne pochodzenia naturalnego, np. kolagen bydlęcy, są wykorzystywane jako osnowy kompozytów. Resorbowalne polimery naturalne są wypełniane cząstkami ceramicznymi, np. HAp, TCP lub biodegradowalnymi włóknami polimerowymi. Zastosowanie takich kompozytów obejmuje płytki do mocowania złamań i wypełnienia kości w procesach regeneracji kości.

Tabela 4.1

Materiały wykorzystywane w kompozytach stosowanych w medycynie [6]

OSNOWA	WŁÓKNA	CZĄSTKI
Duroplasty	**Polimery**	
Żywica epoksydowa	Aramid	Bioszkło
Poliestry	UHMWPE	Fosforany wapnia (HAp, TCP)
	PTFE	Fosforany glinu
	Poliestry	Fosforany cynku
Termoplasty	**Polimery resorbowalne**	Srebro
Poliolefiny (PE, PP)	Polilaktyd	Tlenki metali
UHMWPE	Poliglikolid	
Poliwęglan	Kolagen	
Polisulfon	Jedwab	
Poli(etero keton)		
Poliestry		
Polimery resorbowalne	**Nieorganiczne**	
Polilaktyd	Szklane	
Poliglikolid	Węglowe	
Polihydroksymaślan		
Polidioksanon		
Alginian		
Chitozan		
Kolagen		

4.4. METODY FORMOWANIA KOMPOZYTÓW

Metoda wytwarzania kompozytów zależy od rodzaju wypełniacza (cząstka, krótkie lub długie włókna) oraz materiału osnowy (termoplastyczna lub termoutwardzalna) (tab. 4.2). Na wybór odpowiedniej technologii wytwarzania kompozytów biomedycznych ma również wpływ użycie rozpuszczalników, których pozostałości mogą wpływać na biokompatybilność materiału i względnie mała wielkości produkcji w porównaniu z innymi zastosowaniami. Niektóre kompozyty biomedyczne są wytwarzane *in situ*, np. cement kostny lub kompozyty z nanowypełniaczami.

Najprostsze metody formowania elementów kompozytowych to **laminowanie ręczne** i **natryskowe**, są to równocześnie metody najstarsze z obecnie używanych. Polegają na układaniu zbrojenia w formie i przesycaniu go żywicą z dodatkiem utwardzacza za pomocą wałków, pędzli itp. Po przesyceniu i odpowietrzeniu zbroje-

nia żywica żeluje, a następnie utwardza się. Ponieważ żywica podawana jest do formy w stanie płynnym w tym samym czasie, co zbrojenie, metoda ta nazywana jest metodą laminowania „na mokro". W metodzie ręcznej włókna w postaci mat i tkanin lub kombinacji obu tych materiałów są układane w formie w postaci pasów zbrojenia. W metodzie natryskowej włókna ciągłe są cięte w specjalnej krajarce znajdującej się nad pistoletem natryskowym i w kolejnym kroku są podawane na strumień żywicy aplikowanej z pistoletu. Tak wykonany mokry laminat wymaga jeszcze odpowietrzenia i wałkowania za pomocą ręcznych narzędzi (wałków twardych, wałków miękkich, pędzli) [7].

Tabela 4.2

Metody formowania materiałów kompozytowych

METODY WYTWARZANIA			
Osnowa: duroplasty		**Osnowa: termoplasty**	
Włókna krótkie	Włókna ciągłe	Włókna krótkie	Włókna ciągłe
wtryskiwanie prasowanie formowanie natryskowe	laminowanie ręczne nawijanie RTM pultruzja	wtryskiwanie prasowanie	laminowanie ręczne termoformowanie prasowanie

Przy produkcji dużych serii wyrobów oraz wszędzie tam, gdzie ważny jest wygląd obu stron wyrobu, bardzo często stosowaną metodą produkcji wyrobów z kompozytów polimerowych jest metoda zwana **RTM** (ang. *Resin Transfer Molding*). W metodzie tej kompozycję żywicy wtłacza się pod ciśnieniem do szczelnej formy, w której wcześniej umieszczono włókniste wzmocnienie. Oprócz ciśnienia, pod którym przetłaczana jest żywica stosuje się także próżnię wspomagającą zamykanie formy i zapewniającą optymalne przesycenie wzmocnienia. W metodzie RTM ciśnienia stosowane do formowania wyrobów są znacznie wyższe niż przy stosowaniu jedynie próżni, a dwustronne formy muszą być sztywne i precyzyjne. Wpływa to pozytywnie na jakość i powtarzalność wyrobów [7].

Inną możliwością wytwarzania kompozytów polimerowych jest **wykorzystanie prepregów** (czyli wcześniej sprefabrykowanych warstw włókna węglowego, które na etapie produkcji surowca zostały przesycone żywicą). Przy formowaniu z użyciem prepregów forma jest podobna do tej używanej w laminowaniu ręcznym (poza szerszymi kołnierzami pozwalającymi na przyklejenie i uszczelnienie worka próżniowego). Zamiast zbrojenia w postaci suchych włókien (mat lub tkanin) w formie układa się preimpregnowane, ściśle określone co do zawartości włókna i jego kierunku oraz grubości, wykroje zbrojenia wycięte z rolek bazowych. Po dokładnym ułożeniu zbrojenia w formie całość jest przykrywana workiem próżniowym i formowana próżniowo, a następnie wkładana do pieca, w którym żywica jest utwardzana. Żywica w prepregu jest wcześniej skatalizowana (z dodatkiem utwardzacza) i z do-

datkiem wszystkich wymaganych komponentów. Dzięki temu że żywica jest aktywowana w podwyższonej temperaturze (powyżej 70°C), w temperaturze pokojowej nie rozpoczyna sieciowania. W zależności od rodzaju prepregu i użytej żywicy, czas i temperatura magazynowania prepregu jest różna. Przykładowo dla standardowego preimpregnatu składowanego w temperaturze –18°C czas magazynowania bez utraty właściwości waha się pomiędzy 6–12 miesięcy. W porównaniu z laminowaniem „mokrym" praca z prepregami wiąże się z mniejszą emisją lotnych związków organicznych [7].

Metoda przeciągania (pultruzji) oraz **metoda nawijania** (*filament winding*) pozwalają na uzyskanie wyrobów o wysokiej zawartości uporządkowanego włókna wzmacniającego (rzędu 70%, a w niektórych specjalnych wyrobach nawet 90%). Są to wyroby o bardzo wysokiej wytrzymałości o charakterze ortotropowym. Metodą pultruzji produkowane są pręty i profile. Przeciągane przez wannę z żywicą włókno przechodzi następnie przez ustniki formujące i odciskające nadmiar żywicy oraz strefy grzejne formy, gdzie następuje utwardzenie. Metoda nawijania polega na ciągłym nawijaniu włókien na obracający się rdzeń o kształcie bryły obrotowej (walec, stożek itd.), tak aby uzyskać pożądany ich układ geometryczny. W zależności od kierunku obrotu rdzenia i sposobu przesuwu, tzw. sanek z bębnem z nawiniętym włóknem, można przeprowadzać nawijanie obwodowe, śrubowe i planetarne. Taśmy rovingu (czyli zespołu złączonych preparacją, lecz nieskręconych pasm ciągłych włókien) używanego w metodzie nawijania mogą być wstępnie nasycone żywicą. Przed nawinięciem na rdzeń muszą one być ogrzane, tak aby żywica przeszła w stan płynny. Również rdzeń musi być ogrzewany podczas nawijania w celu zapewnienia dokładnego powiązania ze sobą kolejnych nawijanych warstw. Taka metoda uzyskiwania kompozytu nosi nazwę nawijania z nasyceniem włókien na sucho [7].

4.5. WŁAŚCIWOŚCI KOMPOZYTÓW

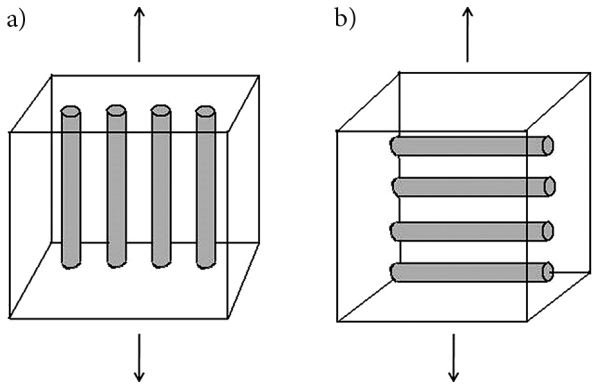
Właściwości mechaniczne kompozytów polimerowych zależą od kilku czynników, tj.:

- właściwości poszczególnych faz (osnowy i zbrojenia),
- względnej zawartości poszczególnych faz,
- geometrii fazy rozproszonej (wzmacniającej):
  - kształtu cząsteczek/włókien,
  - rozmiarów cząsteczek/włókien,
  - rozkładu cząsteczek/włókien,
  - uporządkowania (orientacji) cząsteczek/włókien.

Materiał osnowy, włókien oraz adhezja pomiędzy nimi wpływa również na właściwości biologiczne, biokompatybilność oraz biofunkcyjność kompozytów. Poprzez odpowiedni dobór składników, architektury przestrzennej ułożenia włókien

oraz udziału objętościowego składników można zaprojektować kompozyt o właściwościach dostosowanych do funkcji, jakie ma spełniać implant [9].

Rozpatrując orientację fazy wzmacniającej w kompozycie, właściwości kompozytów mogą być izotropowe (kompozyty z przypadkowym rozmieszczeniem fazy wzmacniającej, tj. włókna krótkie i cząstki) oraz anizotropowe (kompozyty z włóknami długimi ukierunkowanymi, laminaty). Kompozyty wzmacniane włóknami charakteryzują się właściwościami niehomogenicznymi, anizotropowym, a ich właściwości są zależne od właściwości poszczególnych faz wchodzących w skład kompozytu, ich zawartości, ułożenia oraz adhezji pomiędzy składnikami. W celu oszacowania właściwości kompozytów wzmacnianych włóknami, tj. moduł Younga i wytrzymałość, wykorzystuje się uproszczone założenia dotyczące rozkładu naprężeń i odkształceń w reprezentatywnym elemencie objętościowym kompozytu. Umożliwia to zastosowanie klasycznych metod uśredniania: reguły Voigta i reguły Reussa, które znane są również pod nazwą reguł mieszania. Według tych zasad właściwości są proporcjonalne do frakcji objętościowej i właściwości poszczególnych składników kompozytu. Zasada mieszania jest przydatna w oszacowaniu górnych i dolnych granic właściwości mechanicznych zorientowanego kompozytu włóknistego z włóknami w jednym kierunku (rys. 4.2). Przy założeniu doskonałej spójności na granicy włókno–osnowa, można rozpatrywać teoretycznie wyidealizowane przypadki kompozytów. Moduł Younga kompozytu z włóknami ciągłymi, obciążonego równolegle do



Rys. 4.2. Sposób obciążenia kompozytu: a) równolegle do kierunku ułożenia włókien (reguła Voighta), b) prostopadle do kierunku ułożenia włókien (reguła Reussa)

osi włókna, jest średnią ważoną modułów osnowy i włókna. Dla oszacowania górnej granicy stosuje się regułę Voighta (rys. 4.2a, równanie (4.1)), dla której zakłada się takie samo odkształcenie włókna i osnowy. Dla oszacowania dolnej granicy stosuje się regułę Reussa (rys. 4.2b, równanie (4.2)), gdzie zakłada się, że naprężenie jest takie samo we włóknie i osnowie. Pozwala to na otrzymanie równania dla obliczenia maksymalnej i minimalnej wartości modułu Younga możliwych do uzyskania dla danego kompozytu [2, 9]:

$$E_1 = E_w V_w + E_o V_o, \tag{4.1}$$

$$E_2 = \frac{E_w E_o}{V_o E_w + V_w E_o}, \tag{4.2}$$

$$V_o = 1 - V_w, \tag{4.3}$$

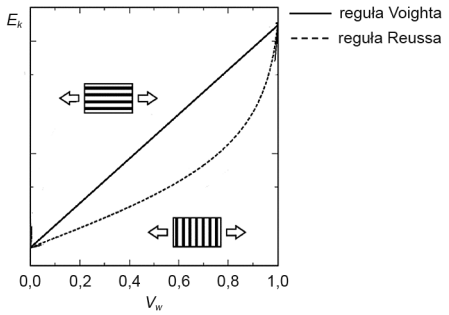
gdzie:

E_1, E_2 – moduły Younga dla kierunku obciążenia równoległego i prostopadłego,

E_f, E_m – moduły Younga odpowiednio dla włókna i osnowy,

V_f, V_m – udziały objętościowe włókien i osnowy w kompozycie.

Na rysunku 4.3 pokazano ilustrację graficzną zależności modułu sprężystości od udziału objętościowego włókien oraz ich orientacji względem kierunku działającego obciążenia. Linia prosta wyznacza górną granicę modułu (obciążenie równoległe do osi włókien), linia krzywa – dolną granicę (obciążenie prostopadłe do osi włókien). Efekt wzmocnienia obserwuje się, gdy zwiększa się zawartość włókien w osnowie polimeru, ale w przypadku kompozytów z włóknami krótkimi muszą być spełnione dodatkowe warunki, tj. długość krytyczna włókien. Nawet stosując włókna krótkie, można uzyskać wytrzymałość kompozytu porównywalną z wytrzymałością kompozytu z włóknami ciągłymi, pod warunkiem że ich długość jest dostatecznie duża. Długość krytyczna włókna (l_{kryt}) jest to najmniejsza długość (przy określonej średnicy), dla której rozkład naprężeń powoduje pęknięcie włókna w czasie rozciągania wcześniej niż mogłoby nastąpić ścięcie na granicy włókno–osnowa. Sposoby obliczania krytycznej długości włókien zależą od cech deformacyjnych osnowy, w zależności, czy jest to osnowa plastyczna, czy sprężysta [2]. Długość krytyczną można określić, posługując się modelem pokazanym na rys. 4.4.



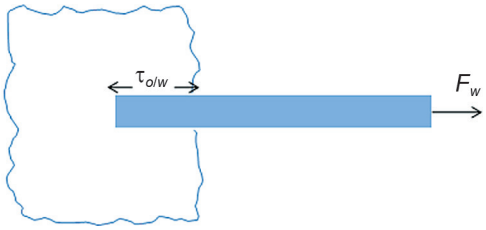
Rys. 4.3. Zależność modułu sprężystości (E) od udziału objętościowego (V_f) włókna w zależności od kierunku ułożenia włókien względem siły obciążającej [6]

Na pojedyncze włókno o określonej średnicy (D) w osnowie działają siły normalne oraz siła styczna przekazywana do włókna przez osnowę poprzez powierzchnię styku obu składników. Z warunku równowagi sił otrzymuje się wyrażenie:

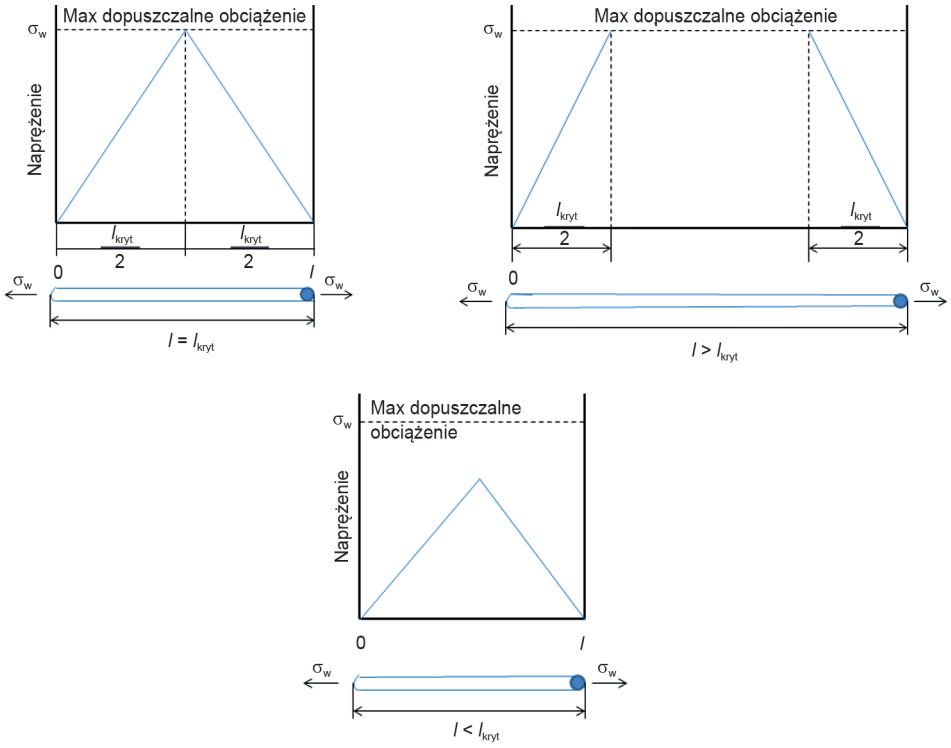
$$\sigma_w \cdot A_w = \tau_{o/w} \cdot S_{o/w} \tag{4.4}$$

gdzie:

- σ_w – wytrzymałość włókna na rozciąganie,
- A_w – pole powierzchni przekroju poprzecznego włókna,
- $\tau_{o/w}$ – naprężenie styczne między osnową i włóknem,
- $S_{o/w}$ – powierzchnia na granicy włókno–osnowa.



Rys. 4.4. Model przenoszenia obciążenia przez włókno [2]



Rys. 4.5. Rozkład naprężeń dla trzech długości włókna w odniesieniu do długości krytycznej [2]

Równanie (4.4) możemy zapisać jako:

$$\sigma_w \cdot \frac{\pi D^2}{4} = \tau_{o/w} \cdot \pi D \frac{l_{\text{kryt}}}{2}. \tag{4.5}$$

Z wyrażenia (4.5) otrzymujemy wzór na długość krytyczną włókna (l_{kryt}):

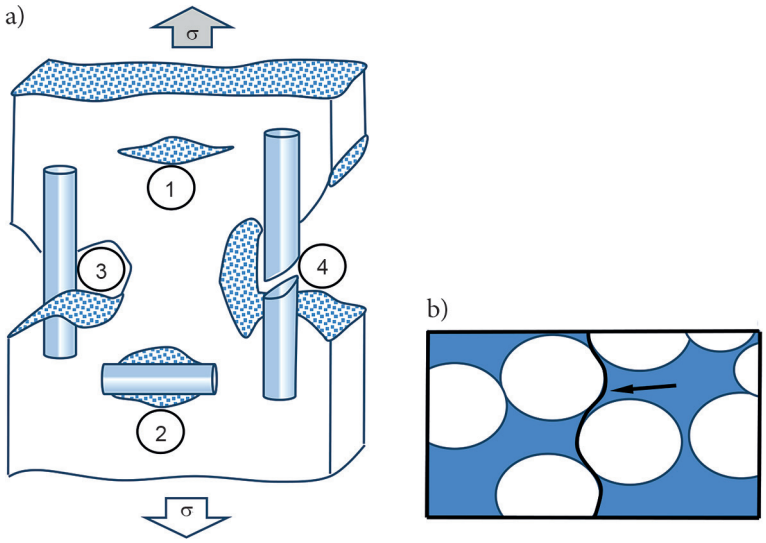
$$l_{\text{kryt}} = \frac{\sigma_w \cdot D}{2\tau_{o/w}} \tag{4.6}$$

Na rys. 4.5 przedstawiono rozkłady naprężeń dla trzech różnych długości włókna w odniesieniu do długości krytycznej dla kompozytu włóknistego poddanego naprężeniu rozciągającemu równemu naprężeniu we włóknie (σ_w). Dla długości włókna równej jego długości krytycznej, maksymalne obciążenie jest przenoszone przez włókno w środkowym punkcie jego długości ($l_{\text{kryt}}/2$ od końca włókna). Jeżeli długość włókna jest większa od jego długości krytycznej, maksymalne obciążenie jest przenoszone na znacznej długości włókna. Przy długości mniejszej od długości krytycznej, maksymalne obciążenie nie jest nigdy osiągane we włóknie [2].

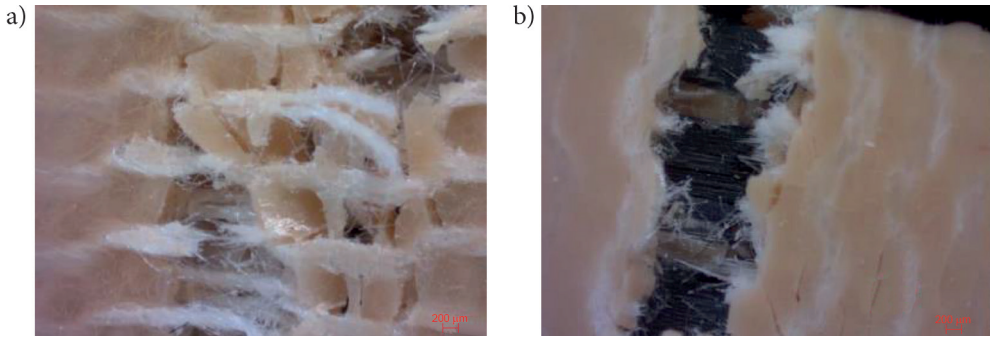
4.6. MECHANIZMY USZKODZEŃ KOMPOZYTÓW

W schematach zniszczeń laminatów włóknistych wyróżnia się cztery formy uszkodzeń: pękanie zbrojenia, pękanie osnowy, delaminacja i wyciągnięcie zbrojenia z osnowy (ang. *pull-out*) (rys. 4.6a). Poprzeczne pękanie włókien zachodzi w materiałach kompozytowych zbrojonych włóknem długim podczas rozciągania zgodnie z kierunkiem ułożenia umocnienia. Do zjawiska tego dochodzi wówczas, gdy wzdłużne odkształcenie niszczące osnowy jest większe od odkształcenia włókien. Pęknięcie włókien nie zawsze wiąże się ze zniszczeniem rozciąganej próbki, pomimo zniszczenia włókien matryca może przenosić obciążenie. Pęknięcie granicznej warstwy materiału zachodzi w pierwszych stadiach degradacji kompozytu. Warstwa graniczna kompozytu wywiera istotny wpływ na właściwości wytrzymałościowe całej struktury. Jej pęknięcie początkowo może nie oddziaływać na makroskopowe struktury wyrobu, jednak wywołuje późniejsze zmiany, prowadząc do zniszczenia kompozytu. Poprzeczne pęknięcia warstw laminatów są wynikiem pęknięć warstwy granicznej i mikropęknięć matrycy. Mikropęknięcia osnowy wraz z debodingiem (rys. 4.6b) powodują pęknięcia przebiegające przez całą grubość warstw [2, 5]. Kolejny schemat zniszczenia kompozytu związany jest z rozwarstwieniem warstw, tzw. delaminacja. Zjawisko to prowadzi do zmniejszenia wytrzymałości oraz sztywności laminatu. Samo rozwarstwienie nie powoduje utraty nośności struktury, jednak w połączeniu z innymi uszkodzeniami może przyczynić się do zniszczenia konstrukcji [2, 5]. W strukturach kompozytowych wytrzymałość na ściskanie zwykle jest mniejsza niż wytrzymałość na rozciąganie. Obciążenia ściskające wywołują pojawie-

nie się w strukturze deformacji o orientacji poprzecznej w stosunku do orientacji ściskania [2, 5]. Przykład zniszczenia kompozytu GF/CF/żywica w zależności od kierunku obciążenia względem ułożenia włókien przedstawiono na rys. 4.7.



Rys. 4.6. Przykłady uszkodzenia laminatów; a) pękanie osnowy (1), utrata połączenia włókno–osnowa (2), wyciągnięte zbrojenie z osnowy (3), pękanie włókien (4) [17], b) debonding [2]



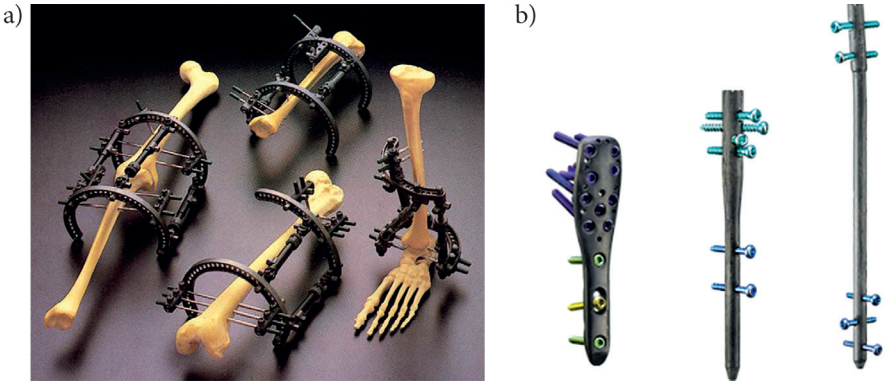
Rys. 4.7. Przykłady zniszczenia kompozytów stosowanych na leje ortopedyczne: a) zbrojenie poprzeczne, b) zbrojenie wzdłużne względem kierunku rozciągania

4.7. MATERIAŁY KOMPOZYTOWE DO ZASTOSOWAŃ BIOMEDYCZNYCH

W zastosowaniach biomedycznych materiały kompozytowe wykorzystywane są zarówno w ich postaciach naturalnych, jak i syntetycznych. Zainteresowanie inżynierii medycznej kompozytami wynika również z możliwości celowego projektowania

właściwości wyrobu wykonanego z dobranych składników kompozytów, zarówno z komponentów stabilnych, jak i biodegradujących w kontakcie ze środowiskiem biologicznym. Wśród dziedzin medycznych kompozyty najczęściej stosuje się w ortopedii, np. na leje protez kończyn czy w implantach służących do osteointegracji, tj. gwoździe śródszpikowe lub płytki i wkrętny kostne [1, 8]. Również w rekonstrukcjach ubytków tkanki kostnej. W stomatologii kompozyty znalazły zastosowanie w obszarze protetyki stomatologicznej na mosty i protezy oraz w stomatologii zachowawczej na ubytki tkanek twardych zębów. Ponadto w ramach inżynierii tkankowej realizuje się wiele projektów, w których przedmiotem badań są kompozyty, szczególnie te dedykowane na rusztowania tkankowe wykorzystywane do rekonstrukcji i regeneracji tkanek, tj. sztuczna skóra.

Tradycyjne metody stabilizacji złamań kości to przykład wykorzystania kompozytu w ortopedii w postaci odlewów gipsowych czy szyn, z wykorzystaniem tkanin bawełnianych lub tkanin z włókna szklanego i włókien poliestrowych zapewniających niezbędne wzmocnienie gipsowej matrycy. W stabilizacji zewnętrznej złamań stosuje się systemy mocowania w postaci lekkich konstrukcji z włókna węglowego (rys. 4.8a). Konstrukcje niemetaliczne wykorzystane w systemach mocowania pozwalają na bardziej efektywne wykorzystanie obrazowania medycznego, w odróżnieniu od stalowych i aluminiowych, które powodują artefakty w radiogramach. Dzięki niskiej gęstości polimerowej osnowy wzmocnionej włóknem węglowym uzyskuje się poprawę jakości i prędkości chodu. Główna wada wszystkich systemów zewnętrznych polega na ich trudności płynnego dostosowania sztywności analogicznej do mięśni [11].

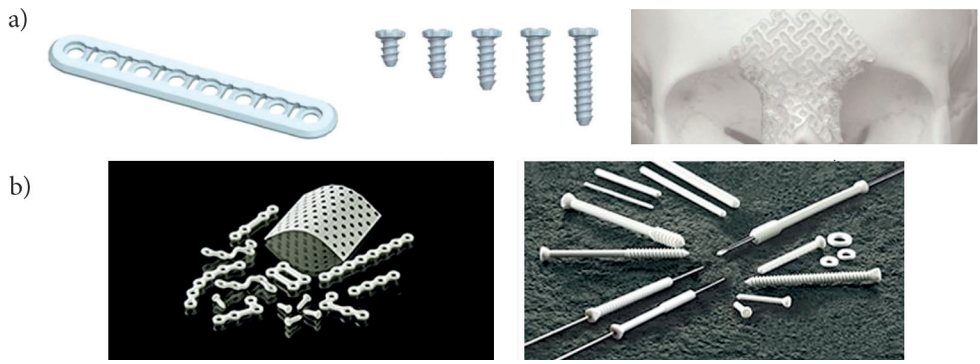


Rys. 4.8. Przykłady stabilizatorów kompozytów węglowych: a) zewnętrznych, b) wewnętrznych [11,12]

Duży potencjał zastosowań jako materiał na implanty ortopedyczne lub dentystyczne w naprawach kości, regeneracji i inżynierii tkankowej wzmocniony włóknem węglowym wykazuje PEEK. Implantom wykonanym z PEEK przypisuje się dobrą biokompatybilność oraz minimalną odpowiedź komórkową podczas badań *in vitro*

i *in vivo*. Kompozyt PEEK-CFR zawiera losowo ułożone krótkie włókna węglowe, w większości krótsze niż 0,4 mm, co nadaje mu izotropowo jednorodny charakter. Długie włókna węglowe w kompozycie PEEK-CFR, zasadniczo ułożone na całej szerokości i długości implantu, implikują jego anizotropowy charakter. Wzmocnione włóknami węglowymi implanty z PEEK mogą być zaprojektowane tak, aby miały różny stopień wytrzymałości i sztywności w zależności od orientacji i liczby warstw włókna węglowego. Może to pozwolić na wyprodukowanie implantu, który jest bardziej zgodny z właściwościami tkanki kostnej niż implant metalowy. Wytrzymałość na rozciąganie kompozytu PEEK z długimi włóknami węglowymi wynosi ok. 2000 MPa, a z krótkimi włóknami ok. 170 MPa. Moduł sprężystości CFR-PEEK wynosi 3,5 GPa w porównaniu z 230 GPa dla stali nierdzewnej czy 210 GPa dla stopu CrCo oraz 155 GPa dla stopu tytanu. Stanowi zatem lepszą zgodność z właściwościami kości korowej, której moduł Younga szacuje się na poziomie od 12 do 20 GPa oraz kości gąbczastej, której moduł sprężystości wynosi ok. 1 GPa. Dodatkowo wytrzymałość zmęczeniowa sprawia, że CFR-PEEK jest idealnym materiałem na implanty płytek i gwoździ kostnych (rys. 4.8b). Brak artefaktów zarówno w tomografii komputerowej, jak i MRI predysponuje CFR-PEEK również na zastosowania implantów do kręgosłupa [4].

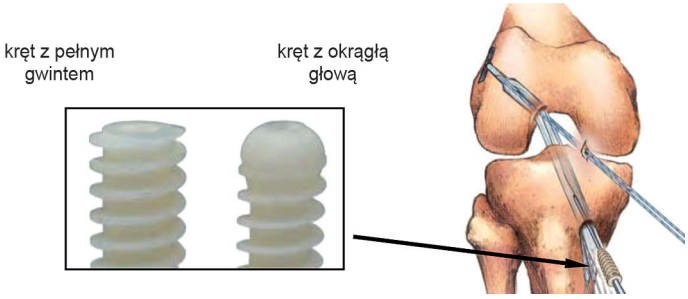
Wchłaniane płytki kostne z kompozytu polihydroksymaślan/hydroksyapatyt (PHB/HA) stają się szczególnie interesujące, ponieważ umożliwiają stopniowe obciążanie kości w miarę jej gojenia. W pełni resorbowalne implanty kompozytowe zapewniają dużą przewagę nad konwencjonalnymi płytkami metalowymi, ponieważ nie trzeba ich usuwać podczas drugiego zabiegu chirurgicznego. Kompozyt PHB/HA stanowi alternatywę dla produkcji resorbowalnych implantów ortopedycznych, wykazuje właściwości fizykochemiczne, chemiczne i strukturalne podobne do struktury i składu chemicznego kości. Ponadto jest biodegradowalny i umożliwia resorpcję polimeru w czasie, a zatem umożliwia gojenie się złamań. Przykładami komercyjnych rozwiązań kompozytów biodegradowalnych wykorzystywanych w chirurgii szczękowej są m.in. RapidSorb® (DePuy Synthes CMF, West Chester, PA, USA) zawierają-



Rys. 4.9. Przykłady systemów do osteointegracji: a) RapidSorb®, b) OsteotransMX® [14, 15]

ca 85% PLLA i 15% PGA (rys. 4.9a); system SuperFIXORB-MX® (OsteotransMX®, TEIJIN Medical Corp., Osaka, Japan), w którym płytka składa się z 60%wag. PLLA i 40%wag u-HA natomiast wkręt z 70%wag. PLLA i 30%wag.u-HA (rys. 4.9b).

Zastosowanie kompozytów w całkowitych protezach stawów okazało się niezwykle trudne. Próby polepszenia odporności na zużycie panewki stawu wykonanej z polietylenu o ultra wysokiej masie cząsteczkowej (UHMWPE) za pomocą wzmacniających włókien węglowych zakończyły się niepowodzeniem z powodu słabego wiązania dwóch składników. Podobnie inne wysiłki, takie jak wzmocnienie polietylenu włóknami UHMWPE nie doprowadziły do zwiększenia odporności na zużycie; uzyskano jednak lepszą sztywność, wytrzymałość i odporność na pełzanie [9]. W alloplastyce stawów istotną rolę pełnią techniki stabilizacji trzpieni protezy skoncentrowane głównie na cementowaniu i zroście kostnym [11]. W stabilizacji stawów kompozyty znajdują również zastosowanie w fiksacji, np. systemu więzadłowego kolana ACL (rys. 4.10), np. kompozyt 40% PLDLA i 60% β-TCP [13].



Rys. 4.10. System stabilizacji więzadła ACL wykorzystujący wkręt kostny PLDLA/TCP [13]

W protetyce ortopedycznej kompozyty żywicy epoksydowej i włókien węglowych wykorzystywane są do formowania leja ortopedycznego, ale w protezach stopy (rys. 4.11). Wykorzystuje się także tworzywa polipropylenowe i włókna szklane (GF/PP) czy też polietylen o dużej gęstości (GF/HDPE).

Rys. 4.11. Przykład wykorzystania kompozytów z włóknem węglowym w protetyce ortopedycznej: a) stopa protezowa, b) lej ortopedyczny [16]

Zastosowanie kompozytów wzmocnionych włóknami do tkanek miękkich okazało się trudne. Wiele rodzajów tkanek miękkich, w tym skóra, nerwy, ścięgna, więzadła i naczynia krwionośne, pod wpływem obciążenia fizjologicznego wykazuje nieliniową *J*-kształtną charakterystykę. Materiały kompozytowe zastępujące tkankę miękką są zasadniczo oparte na naturalnie występujących polimerach, takich jak białka polisacharydowe. Ponadto właściwości wewnętrzne, tj. masa cząsteczkowa i ładunek komponentów pełnią ważną funkcję przy opracowywaniu substytutów tkanek miękkich. Na przykład w przeszczepach naczyniowych istotną rolę odgrywa optymalizacja porowatości. Nadmierna porowatość może prowadzić do wycieku krwi, ale jednocześnie wymagany jest pewien próg, aby pobudzić wzrost tkanki i akceptację przez tkankę gospodarza [11].

Strukturę naturalnej macierzy pozakomórkowej (ECM) można naśladować, wytwarzając włókna o podobnym zakresie wielkości. Komórki zaszczepione na włóknistych rusztowaniach mają tendencję do przywierania do nanowłókien, których hodowla moduluje morfologię komórek i organizację cytoszkieletu. Pomimo licznych technik produkcji, w tym samoorganizacji, rozdziału faz, rozdmuchiwania ze stopu i syntezy matryc, elektroprzędzenie stało się wiodącą techniką wytwarzania rusztowań z nanowłókien, ponieważ jest opłacalne i zapewnia przyjazne dla użytkownika podejście umożliwiające wszechstronność. Pozwala ponadto na udoskonalenie rusztowania poprzez wyrównanie włókien w celu stworzenia strukturalnej anizotropii z siecią formującą [11].

LITERATURA

[1] Błażewicz S., Marciniak J., *Biomateriały*, Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, 2016.

[2] Boczkowska A., Kapuściński J., Lindemann Z., Witemberg-Perzyk D., Wojciechowski S., *Kompozyty*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2003.

[3] Bonecki H. i in., *Encyklopedia Powszechna PWN*, tom 5, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1988, s. 187.

[4] Hak D.J., Mauffrey C., Seligson D., Lindeque B., *Use of Carbon-Fiber-Reinforced Composite Implants in Orthopedic Surgery Use of Carbon-Fiber-Reinforced Composite Implants in Orthopedic Surgery*, ORTHOPEDICS,37 (2014), 825−830.

[5] Hyla I., Śledziona J., *Kompozyty element mechaniki i projektowania*, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2004.

[6] Kutz M., *Standard Handbook of Biomedical Engineering&Design*, Chapter 12. Biomedical composites, McGraw-Hill: New York, 2003.

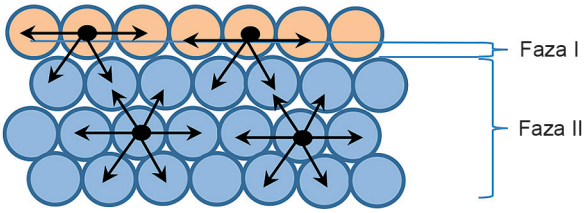
[7] Rajak D.K., Pagar D.D., Menezes P.L., Linul E., *Fiber-Reinforced Polymer Composites: Manufacturing, Properties, and Applications*, Polymers 2019, 11, 1667.
[8] Ramakrishna S., Mayer J., Wintermantel E., Leong K.W., *Biomedical applications of polymer-composite materials: a review*, Composites Science and Technology 2001, 61,9, 1189-1224.
[9] Ratner B.D., Hoffman A.S., Schoen F.J., Lemons J.E., *Biomaterials Science. An introduction to materials in medicine*, Elsivier 2004, USA.
[10] Shaw A., Sriramula S., Gosling P.D., Chryssanthopoulo M.K., *A critical reliability evaluation of fibre reinforced composite materials based on probabilistic micro and macro-mechanical analysis*, Composites Part B 2010, 41, 446–453.
[11] Scholz M.S., Blanchfield J.P., Bloom L.D., Coburn B.H., Elkington M, Fuller J.D., Gilbert M.E., Muflahi S.A., Pernice M.F., Rae S.I., Trevarthen J.A., White S.C., Weaver P.M., Bond I.P., *The use of composite materials in modern orthopaedic medicine and prosthetic devices: A review*, Composites Science and Technology 71 (2011), 1791–1803.
[12] DePuy Companies. <http://www.depuy.com/> [cited 02.08.11].
[13] https://www.zimmerbiomet.com/
[14] https://www.jnjmedicaldevices.com/
[15] https://teijin-medical.co.jp/
[16] https://www.ottobockus.com/

5. WŁAŚCIWOŚCI POWIERZCHNI TKANEK I IMPLANTÓW

Podstawowe cechy biomateriałów i implantów są opisane nie tylko poprzez parametry wytrzymałościowe i biologiczne materiałów, z których są wykonane, ale także są określone przez właściwości warstwy wierzchniej materiału. Warstwa wierzchnia, która charakteryzuje się inną strukturą w porównaniu do rdzenia materiału, spełnia różne funkcje i podlega różnym czynnikom w zależności od przeznaczenia implantu. Najważniejsze parametry materiału implantu, które mogą korelować z bioreaktywnością, to: hydrofilowość/hydrofobowość, obecność grup funkcyjnych, szorstkość. Według Ratnera [12] **bioreaktywność** to zdolność materiału do wzbudzania określonej odpowiedzi tkanki/komórki. Podstawowe reakcje na wszczepiony materiał obejmują: adsorpcję białka, adhezję bakteryjną, fagocytozę, hemolizę, aktywację płytek krwi, adhezję płytek krwi i biodegradację. W niniejszym rozdziale skupiono uwagę na wybranych właściwościach powierzchni związanych z oceną stanu energetycznego i parametrami struktury geometrycznej powierzchni jako istotnych dla interakcji układu tkanka–implant, w zależności od obszaru medycznych zastosowań. W celu zrozumienia tych zjawisk ważne jest przypomnienie podstawowych terminów fizykochemicznych.

5.1. WYBRANE POJĘCIA ZWIĄZANE ZE STANEM ENERGETYCZNYM WARSTWY WIERZCHNIEJ

Każde ciało zbudowane jest z atomów. Atomy, łącząc się wzajemnie, wyodrębniają swoiste części układu fizycznego oddzielone od innych powierzchniami międzyfazowymi, zwanymi granicami faz. Fazy różnią się właściwościami fizykochemicznymi. Najpowszechniejszym przykładem pozwalającym zrozumieć zagadnienie odrębnych faz jest jednorodne ciało będące w różnych stanach skupienia (np. woda i lód, woda i para wodna). Wyróżnione typy układów fazowych to: ciecz–gaz, ciało stałe–ciecz oraz ciało stałe–gaz. Atomy formujące zewnętrzną warstwę każdej z faz znajdują się w obszarze międzyfazowym w związku z tym podlegają działaniu innych sił niż atomy położone głębiej [19]. Oddziaływania międzycząsteczkowe na granicy faz oraz w głębi materiału zaprezentowano na rys. 5.1.



Rys. 5.1. Oddziaływania międzycząsteczkowe wewnątrz materiału i na granicy faz

Warstwa wierzchnia to zewnętrzna warstwa materiału obejmująca jego powierzchnię oraz pewną grubość pod powierzchnią. Warstwa ta prezentuje odmienne właściwości fizyczne, a niekiedy chemiczne, od rdzenia materiału. Różnice te wynikają z odmiennego stanu energetycznego. W opisie i ocenie warstwy wierzchniej oraz stanu równowagi atomów ją tworzących stosuje się różne funkcje termodynamiczne, wśród nich: swobodną energię powierzchniową, napięcie powierzchniowe oraz swobodną entalpię powierzchniową [19].

Swobodna energia powierzchniowa (SEP) definiowana jest jako praca, którą należy wykonać, aby podczas odwracalnego izotermicznego procesu dokonać rozdziału dwóch powierzchni będących w równowadze faz, tak aby podczas procesu rozdziału powstała nowa jednostka powierzchni. Wartość swobodnej energii powierzchniowej wyraża się w [mJ/m^2] [19].

Napięcie powierzchniowe to kolejna, równie ważna funkcja termodynamiczna wykorzystywana do opisu stanu warstwy wierzchniej. Parametr ten identyfikuje wartość siły działającej na jednostkę długości, przy czym siła ta działa w kierunku prostej stycznej do rozpatrywanej powierzchni. Wartość napięcia powierzchniowego wyraża się w [mN/m] [19].

Pomiędzy napięciem powierzchniowym a swobodną energią powierzchniową istnieje zależność:

$$\sigma = \gamma + \frac{\partial \gamma}{\partial S}, \tag{5.1}$$

gdzie:

σ – napięcie powierzchniowe,
γ – swobodna energia powierzchniowa,
S – jednostka powierzchni.

W pewnych specyficznych warunkach wartość napięcia powierzchniowego może być równa wartości swobodnej energii powierzchniowej, jednak ze względu na jednostki pojęcia te nie są tożsame, gdyż jednostka SEP to skalar, a napięcie powierzchniowe dla ciał stałych to wielkość wektorowa.

Proces formowania nowej powierzchni wyróżnia dwa etapy. W trakcie pierwszego etapu atomy zajmują dotychczasowe położenie (stan ten występuje bezpośrednio po powstaniu nowej powierzchni). Podczas drugiego etapu atomy w sposób sa-

morzutny zmieniają swoje lokalizacje w celu osiągnięcia stanu równowagi trwałej. Oba etapy zachodzą równocześnie w cieczy, co umożliwia wyprowadzenie zależności [19]:

$$\frac{\partial \gamma}{\partial S} = 0, \text{ przy założeniu } S \neq 0 \tag{5.2}$$

W opisywanym przypadku wartość napięcia powierzchniowego jest równa wartości swobodnej energii powierzchniowej, w ujęciu fizycznym może to być spełnione wtedy, gdy potencjał chemiczny albo adsorpcja na granicy faz każdego składnika wynosi zero. W przypadku ciała stałego zależność między napięciem powierzchniowym a swobodną energią powierzchniową określa **teoria Gibbsa**, według której wartości te są sobie równe, kiedy adsorpcja na ciele stałym wynosi zero [19].

Entalpia swobodna (energia swobodna Gibbsa) jest to potencjał termodynamiczny zdefiniowany jako:

$$G = U + pV - TS, \tag{5.3}$$

gdzie:

- G – entalpia swobodna Gibbsa,
- U – energia wewnętrzna układu,
- p – ciśnienie układu,
- V – objętość układu,
- T – temperatura bezwzględna,
- S – entropia [19].

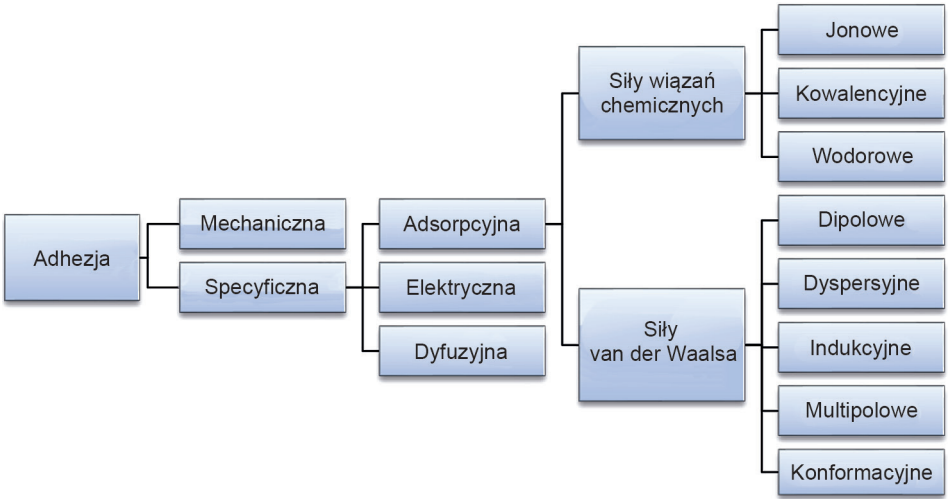
5.2. WYBRANE ZAGADNIENIA Z TEORII ADHEZJI

Znajomość zagadnień związanych z adhezją jest istotna w przypadku oceny zjawisk występujących na granicy faz biomateriał–tkanka organizmu żywego. Szczególną uwagę należy zwrócić na aspekt uzyskania optymalnej adhezji podczas procedur implantacji czy wgajania implantu już na etapie jego projektowania, np. zapewnić odpowiednią zwilżalność poprzez wprowadzenie stosownej modyfikacji warstwy wierzchniej.

Adhezja to zjawisko, podczas którego dochodzi do związania ze sobą warstwy wierzchniej dwóch ciał poprzez siły powodujące wzajemne przyciąganie się cząsteczek tworzących warstwę wierzchnią. Miarą adhezji jest praca przypadająca na jednostkę powierzchni, którą należy wykonać, aby rozłączyć połączone ciała. [19].

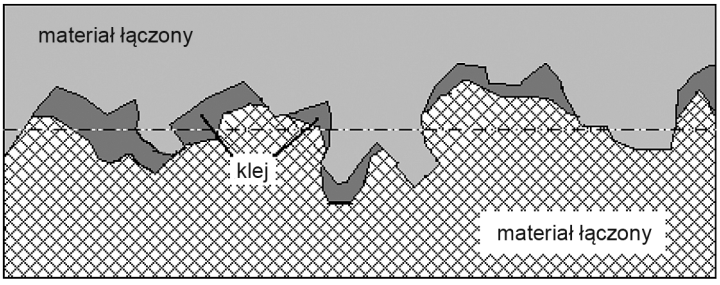
Kohezja to zjawisko, podczas którego dochodzi do rozdzielenia ciała na części. Kohezja ciał fizycznych zależy od wielu różnych czynników, np.: stanu skupienia, oddziaływań międzycząsteczkowych czy – w przypadku ciał stałych – mikrostruktury.

Opracowano kilka teorii opisujących mechanizmy adhezji. Do najważniejszych z nich zalicza się teorie: **mechaniczną** oraz **specyficzną**. Na rys. 5.2 przedstawiono schemat podziału teorii adhezji oraz sił wiązań adhezyjnych.



Rys. 5.2. Schemat podziału teorii adhezji [5, 6]

Mechaniczna teoria adhezji bazuje na typowo fizycznych właściwościach przylegających do siebie powierzchni materiałów, często z wykorzystaniem spoiwa. Proces tworzenia ciągłego kontaktu pomiędzy klejem a podłożem określa się mianem **zwilżania**. Adhezja mechaniczna jest związana z porowatością i topografią materiału. Na rys. 5.3 przedstawiono schemat mechanicznej teorii adhezji.



Rys. 5.3. Schemat mechanicznej teorii adhezji [19]

Podczas łączenia dwóch materiałów za pomocą trzeciego materiału (spoiwa-kleju), klej wypełnia nierówności oraz pory pomiędzy łączonymi powierzchniami i umożliwia trwałe połączenie tych materiałów. Zgodnie z mechaniczną teorią adhezji, aby połączenie było odpowiednio wytrzymałe, klej po wniknięciu w nierówności musi zająć miejsce znajdującego się tam powietrza [5, 6]. Na wielkość adhezji

ma wpływ wiele czynników i parametrów, tj.: ciśnienie, lepkość kleju, czas wnikania, temperatura, wielkość nierówności powierzchni łączonych. Ponieważ chropowatość powierzchni kontaktu ma wpływ na wielkość adhezji, a tym samym na wytrzymałość połączenia, dlatego ważnym elementem dla uzyskania dobrego połączenia adhezyjnego jest właściwe rozwinięcie powierzchni kontaktu materiałów. Mechaniczna teoria adhezji przyjmuje, że złącza utworzone przez klej z materiałem chropowatym nie ulegają rozerwaniu na granicy faz pod wpływem obciążeń zewnętrznych. Dekohezja następuje wewnątrz najsłabszego materiału złącza, ponieważ na granicy faz uniemożliwia ją zestalony klej [6].

Adhezja specyficzna obejmuje dużo szersze zagadnienia fizykochemiczne, tj. adhezję: **adsorpcyjną**, **elektrostatyczną**, **dyfuzyjną**, **fizykochemiczną** oraz **słabej warstwy granicznej.** Wyraźne oddzielenie od siebie poszczególnych typów adhezji jest trudne ze względu na specyfikę zjawiska. Nie można mówić o adhezji czysto mechanicznej, ponieważ towarzyszą jej również oddziaływania chemiczne. Natomiast adsorpcja chemiczna wykazuje lepsze rezultaty po wcześniejszym zastosowaniu obróbki mechanicznej powierzchni. **Adhezja adsorpcyjna** wynika z oddziaływania na poziomie molekularnym między dwoma materiałami pozostającymi w kontakcie oraz z obecności sił powierzchniowych. Cząsteczki kleju są adsorbowane na powierzchni w wyniku działania sił przyciągania (sił van der Waalsa). Aby powstały te siły, powierzchnie nie mogą być oddalone od siebie o więcej niż 0,5 nm. Dlatego klej musi stanowić ścisły, molekularny kontakt z powierzchnią podłoża. Należy również pamiętać o możliwości utworzenia typowych wiązań kowalencyjnych pomiędzy cząsteczkami kleju i podłoża [6, 19].

Elektrostatyczna teoria adhezji opisuje zjawiska przepływu strumienia elektronów podczas wzajemnego kontaktu dwóch ciał. Parametry związane z przepływem elektronów (tj. natężenie i czas) zależą od różnicy pracy wyjścia, jak również od odległości między tymi materiałami. Materiał elektroujemny będzie umożliwiał wytworzenie się na jego powierzchni nadmiarowego ładunku ujemnego, natomiast materiał mniej elektroujemny będzie generował na jego powierzchni nadmiarowy ładunek dodatni. W rezultacie powstaje podwójna warstwa elektryczna. Elektrostatyczna teoria adhezji jest rozpatrywana jako teoria opisująca adhezję komórek [6, 11, 19].

Dyfuzyjna teoria adhezji opiera się na założeniu, że adhezja zachodzi w wyniku wzajemnej dyfuzji cząsteczek spoiwa i materiału klejonego, po doprowadzeniu do kontaktu tych dwóch materiałów. Dyfuzja jest możliwa dzięki różnicy potencjałów termodynamicznych, ponieważ układ dąży do uzyskania stanu równowagi termodynamicznej, co następuje poprzez zmianę położenia cząsteczek i atomów znajdujących się w obszarze międzyfazowym. Szybkość i natężenie procesu dyfuzji zależy od ilorazu składowej energetycznej i entropijnej potencjału termodynamicznego. Energia kohezji oraz związana z nią rozpuszczalność to jedne z ważniejszych pojęć związanych z tą teorią adhezji. Jest to energia, dzięki której 1 mol materiału ulegnie rozdzieleniu na pojedyncze atomy albo cząsteczki, oddalone od siebie na taką

odległości, przy której nie zaobserwuje się oddziaływań między nimi. Warunkiem powstania złącza adhezyjnego w rozumieniu dyfuzyjnej teorii adhezji jest podobna rozpuszczalność materiałów łączonych. W celu uzyskania złącza o dużej wytrzymałości realizuje się częściowe rozpuszczenie warstwy wierzchniej łączonych materiałów, co zapewnia cząsteczkom większą swobodę i polepsza proces dyfuzji. Wraz z odparowaniem rozpuszczalnika swobodne ruchy cząsteczek zanikają i wytrzymałość połączenia wzrasta [6, 11, 19].

Teoria słabej warstwy granicznej (teoria pękania złącz adhezyjnych) przyjmuje, że siłę kohezji należy rozważyć jako główny czynnik służący do oceny poziomu adhezji. Według tej teorii rozdzielenie materiału będzie powstawało w obrębie tzw. słabej warstwy granicznej. Warstwa ta tworzy się przez zanieczyszczenia powierzchni materiału, głównie polimeru. W jej formowaniu biorą udział substancje, które zostały wchłonięte lub wprowadzone do materiału oraz oligomery, które są połączone słabymi wiązaniami z rdzeniem materiału (najszybciej ulegają rozerwaniu, co powoduje dekohezję połączenia adhezyjnego). Teorii tej nie można stosować do analizy wszystkich materiałów ze względu na liczne ograniczenia, brak opisu mechanizmu procesu adhezji oraz skupienie się na opisie procesu pękania złącz adhezyjnych [11, 19].

Fizykochemiczna teoria adhezji nazywana jest również teorią oddziaływań cząsteczkowych i koncentruje się na zagadnieniach związanych z różnymi siłami międzycząsteczkowymi (momentów generowanych przez te siły oraz stanu energetycznego składników układu [19]). Do sił międzycząsteczkowych zalicza się siły van der Waalsa, wiązania wodorowe oraz wiązania jonowe, kowalencyjne i koordynacyjne [1, 11].

Siły van der Waalsa to oddziaływania międzycząsteczkowe, występujące we wszystkich atomach i cząsteczkach (zalicza się do nich kilka rodzajów sił: dyspersyjne, orientacyjne, indukcyjne, multipolowe oraz konformacyjne):

- Siły dyspersyjne (siły Londona) są uniwersalne, nie zależą od temperatury oraz występują niezależnie od tego, czy obecne są cząsteczki charakteryzujące się trwałym momentem dipolowym. Siły Londona to siły przyciągania, jednak aby wystąpiły, należy zbliżyć atomy albo cząsteczki na odpowiednią odległość. Oddziaływania dyspersyjne są silniejsze w przypadku tych atomów lub cząsteczek, których elektrony wykazują słabsze związanie z jądrem [1].
- Siły orientacyjne, nazywane również siłami Keesoma albo siłami dipolowymi, występują pomiędzy dipolami trwałymi, które utworzone są przez atomy o różnych wartościach elektroujemności. W przypadku atomów o większej wartości elektroujemności prawdopodobieństwo występowania w bliskiej odległości elektronów jest większe niż w przypadku atomów o niższej elektroujemności. W efekcie ujemny ładunek występujący w cząsteczce ulega przesunięciu w kierunku atomu charakteryzującego się wyższą wartością elektroujemności. Energia związania z oddziaływaniami dipolowymi zależy

od temperatury, ponieważ z powodu ruchów cieplnych cząstek dochodzi do zaburzenia orientacji poszczególnych dipoli [1].

- Siły indukcyjne (siły Debye'a) występują między dipolami trwałymi a dipolami charakteryzującymi się nietrwałym momentem dipolowym. Oddziaływania indukcyjne powstają podczas polaryzacji w wyniku tworzenia się dipola indukowanego w skutek przesunięcia ładunku elektrycznego. Jest to efekt zbliżania elektronów z dipola nietrwałego do dipola trwałego. Następnie dochodzi do oddziaływania elektronów z dipola nietrwałego z każdym biegunem dipola trwałego [1].
- Siły konformacyjne powstają poprzez zmianę położenia wiązań międzycząsteczkowych, co jest spowodowane rotacją atomów albo ich grup dookoła wiązań. W rezultacie dochodzi do zmiany położenia cząsteczki w polu elektrostatycznym, co wpływa na zmianę oddziaływania pomiędzy fragmentami cząsteczki [1].
- Siły multipolowe są związane z oddziaływaniami kwadrupoli oraz multipoli wyższego rzędu. Składowe dipoli ulegają wewnętrznej kompensacji. Pole powstające w wyniku dowolnego skończonego rozkładu ładunków można wyrazić jako superpozycję pól pojawiających się w wyniku superpozycji multipoli. Wpływ sił multipolowych oraz konformacyjnych na zjawisko adhezji jest niewielki [1].

Wiązania kowalencyjne (wiązanie atomowe) są wytwarzane pomiędzy atomami charakteryzującymi się taką samą lub zbliżoną zdolnością do przyjmowania i oddawania elektronów. Atomy dążą do uzyskania konfiguracji odpowiadającej konfiguracji gazów szlachetnych. Orbitale, które są obsadzone pojedynczymi elektronami o przeciwnej orientacji spinów nakładają się na siebie i w efekcie powstaje tzw. wspólna para elektronowa [1]. Wiązania kowalencyjne mają niewielki wpływ na tworzenie połączeń adhezyjnych.

Wiązania jonowe powstają, gdy atomy pochodzące od dwóch pierwiastków łączą się w celu uzyskania konfiguracji elektronowej gazu szlachetnego. Wówczas dochodzi do przekazania elektronów walencyjnych, co jest spowodowane znaczną różnicą elektroujemności obu atomów. Atom pierwiastka elektrododatniego przekazuje swoje elektrony walencyjne atomowi pierwiastka elektroujemnego. W efekcie powstają jony: dodatni zwany kationem oraz ujemny zwany anionem. Dzięki znacznym siłom elektrostatycznym dochodzi do wzajemnego przyciągania się powstałych jonów [1]. Wiązania jonowe mają niewielki wpływ na tworzenie połączeń adhezyjnych.

Wiązania wodorowe, zwane mostkiem wodorowym, oznaczane są umownie jako: X–H–Y. Wiązanie między pierwiastkami X i Y oraz H (wodorem) musi być silnie spolaryzowane. Aby doszło do wytworzenia wiązania wodorowego, pierwiastek Y musi posiadać wolną parę elektronową, a pierwiastki X i Y muszą być silnie elektroujemne [1].

Wiązania donorowo-akceptorowe (kwasowo-zasadowe). Akceptorem wolnej pary elektronowej mogą być kwasy, u których zewnętrzna powłoka orbitali nie jest całkowicie obsadzona elektronami. Natomiast zasada dysponuje wolną parą elektronów. W efekcie dochodzi do wytworzenia wiązania między kwasem a zasadą Lewisa [1].

W tabeli 5.1 przedstawiono podział opisanych sił van der Waalsa, natomiast w tabeli 5.2. omówiono podział wiązań chemicznych.

Tabela 5.1

Podział sił van der Waalsa [1]

Typ siły	Źródło siły	Energia wiązania [kJ/mol]
Dyspersyjne	oddziaływanie fluktuujących dipoli	<10
Orientacyjne	oddziaływania między dipolami trwałymi	<10
Indukcyjne	oddziaływania między dipolami nietrwałymi a dipolami trwałymi	<2
Konformacyjne	zmiana położenia wiązania wskutek rotacji atomów albo grup atomów dookoła wiązań	0,6
Multipolowe	wewnętrzna kompensacja atomów składowych dipoli atomów albo grup atomów	–

Tabela 5.2

Podział wiązań chemicznych [1]

Typ wiązania	Mechanizm powstawania wiązania	Energia wiązania [kJ/mol]
Kowalencyjne	utworzenie wspólnej pary elektronowej między atomami o tej samej lub zbliżonej zdolności do przyjmowania i oddawania elektronów	400–600
Jonowe	łączenie atomów o dużej różnicy elektroujemności	200–400
Wodorowe	wiązania utworzone między atomem elektroujemnym a atomem wodoru połączonym mocno spolaryzowanym wiązaniem z innym atomem	15–50
Kwasowo-zasadowe	kwas Lewisa jest akceptorem wolnej pary elektronowej pochodzącej od zasady Lewisa	–

Istotą wytworzenia trwałych połączeń adhezyjnych jest połączenie ze sobą powierzchni w sposób pozostawiający jak najmniej wolnych przestrzeni. Idealna odległość pomiędzy materiałami powinna znajdować się w przedziale 1–2 Å (lub mniej). Ponieważ przyleganie do siebie materiałów w tak niewielkiej odległości jest trudne do osiągnięcia, dlatego stosuje się modyfikacje powierzchni z wykorzystaniem obróbki mechanicznej oraz zwilżania materiału. Ma to na celu rozwinięcie powierzchni

kontaktu poprzez np. szorstkowanie, które wpływa bezpośrednio na wielkość energii powierzchniowej oraz osiągnięcie całkowitego zwilżania powstałej powierzchni materiału.

5.3. WYBRANE METODY WYZNACZANIA KĄTA ZWILŻANIA

Wyznaczenie swobodnej energii powierzchniowej w sposób bezpośredni nie jest możliwe, dlatego wielkość tę dla ciał stałych oznacza się metodami pośrednimi. Do pośrednich metod wyznaczania swobodnej energii powierzchniowej zalicza się:

- metodę ekstrapolacji wyników pomiarów SEP polimerów, które występują w stanie ciekłym do temperatury 20°C;
- metodę opartą na obliczeniach SEP za pomocą wzorów doświadczalnych, w których wykorzystuje się zależność SEP od różnych właściwości polimeru, np. od gęstości;
- metodę bazującą na obliczeniu SEP na podstawie wartości oznaczonego kąta zwilżania.

Ostatnia z metod jest najbardziej popularna, ponieważ umożliwia otrzymanie wyników bezpośrednio w odniesieniu do warstwy wierzchniej [19]. Zwilżalność powierzchni determinuje pojęcia **hydrofobowości** oraz **hydrofilowości**. Charakter powierzchni jest ściśle powiązany z kątem zwilżania. Im powierzchnia jest bardziej hydrofobowa, tym kąt zwilżania jest większy [19].

Podstawy teoretyczne do wyznaczania SEP z wykorzystaniem kąta zwilżania sformułowane zostały w 1805 roku przez Tomasza Younga. **Równanie Younga** [19] wykorzystuje warunek równowagi sił występujących na styku trzech faz, tj. cieczy, pary oraz ciała stałego:

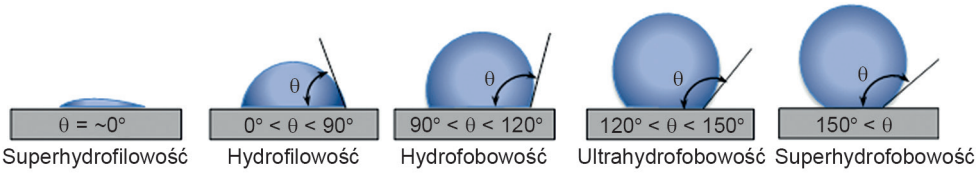
$$\sigma_{SV} = \sigma_{SL} + \sigma_{LV} \cos\theta_i, \tag{5.4}$$

gdzie:

- σ_{SV} – napięcie powierzchniowe materiału (*solid* – ciało stałe) będącego w równowadze z parą nasyconą (*vapour*) cieczy,
- σ_{SL} – napięcie powierzchniowe międzyfazowe ciała stałego oraz cieczy (*liquid*),
- σ_{LV} – napięcie powierzchniowe cieczy, która znajduje się w stanie równowagi ze swoją parą nasyconą,
- θ_i – kąt Younga, kąt zwilżania cieczą pomiarową *i*.

Kąt Younga, określany również jako **równowagowy kąt zwilżania**, jest utworzony przez linię styczną do powierzchni kropli cieczy pomiarowej, która została osadzona na powierzchni ciała stałego i znajduje się w punkcie będącym na styku trzech faz. Na rys. 5.4 w sposób schematyczny przedstawiono interpretację graficzną kąta Younga oraz zależność między kątem zwilżania a charakterem powierzchni. Istnieją

również inne charakterystyki zwilżania, gdy θ = ~180° przyjmuje się brak zwilżania, dla θ = 90° określa się zwilżalność niezadowalającą oraz θ = 30° zwilżalność zadowalającą i θ = ~0° zwilżalność bardzo dobrą.



Rys. 5.4. Schematyczna zależność między kątem zwilżania a charakterem powierzchni [5]

Korzystając z teorii Gibbsa, możliwe jest wyprowadzenie równania Younga z bilansu energetycznego przeprowadzonego dla punktu, w którym trzy fazy są w równowadze. Równanie Younga w tym przypadku wyraża się wzorem:

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos\theta_i, \tag{5.5}$$

gdzie:

- γ_{SV} – SEP materiału (w stanie stałym) będącego w stanie równowagi z parą nasyconą cieczy,
- γ_{SL} – SEP ciała stałego oraz cieczy,
- γ_{LV} – SEP cieczy, która znajduje się w stanie równowagi ze swoją parą nasyconą,
- θ_i – kąt Younga, kąt zwilżania cieczą pomiarową *i*.

Ponieważ w równaniu (5.5) występują dwie niewiadome, w celu wyznaczenia swobodnej energii powierzchniowej stosuje się uproszczenia polegające na pominięciu wpływu adsorpcji na granicy faz. Otrzymuje się wówczas równanie w postaci:

$$\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_L \cos\theta_i, \tag{5.6}$$

gdzie:

- γ_S – SEP materiału (w stanie stałym) w próżni,
- γ_{SL} – SEP ciała stałego oraz cieczy,
- γ_L – SEP cieczy pomiarowej,
- θ_i – kąt Younga, kąt zwilżania cieczą pomiarową *i*.

Równanie Younga opisuje stan idealnego układu. W celu zastosowania tego równania należy spełnić szereg warunków związanych zarówno z odpowiednim przygotowaniem powierzchni, jak i realizacją pomiarów. Są to przede wszystkim zapewnienie właściwej sztywności badanego materiału, chropowatości, jednorodności pod względem chemicznym oraz fizycznym, jak również czystości warstwy wierzchniej. Kropla cieczy pomiarowej osadzona na powierzchni niespełniającej wymienionych warunków może przechodzić w stan metastabilny, co powoduje generowanie histerezy kąta zwilżania [19]. W stanie metastabilnym utworzony kąt zwilżania ma wartość różną od kąta równowagowego. Podczas zwiększania objętości kropli cieczy pomia-

rowej wartość kąta zwilżania wzrasta do jego granicznej wartości zwanej **kątem napływu** (*advancing contact angle* θ_a). Po przekroczeniu kąta napływu następuje gwałtowne i wyraźne spłaszczenie kropli cieczy pomiarowej, co skutkuje zmniejszeniem wysokości kropli oraz zwiększeniem powierzchni styku, a to powoduje zmniejszenie wartości kąta zwilżania. W przypadku zmniejszania objętości kropli cieczy pomiarowej wartość kąta zwilżania zbliża się do granicznej wartości zwanej **kątem cofania** (*receding contact angle* θ_r). Schemat powstawania kąta napływu i kąta cofania zaprezentowano na rys. 5.5. Po przekroczeniu kąta cofania następuje nagły wzrost wysokości kropli cieczy pomiarowej oraz zmniejszenie się powierzchni kontaktu kropli z podłożem, co generuje zwiększenie wartości kąta zwilżania. Różnica między kątem napływu a kątem cofania określana jest mianem **histerezy kąta zwilżania (H)**:

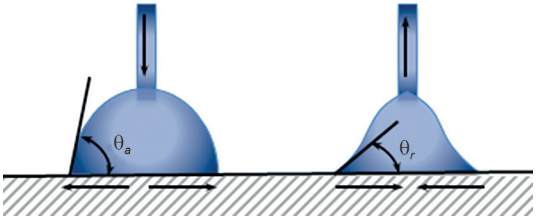
$$H = \theta_a - \theta_r, \tag{5.7}$$

gdzie:

θ_a – kąt napływu,

θ_r – kąt cofania.

Rozróżnia się dwie składowe histerezy kąta zwilżania: termodynamiczną oraz dynamiczną. Histereza termodynamiczna związana jest głównie ze zbyt wysoką chropowatością badanej powierzchni oraz heterogenicznością warstwy wierzchniej badanego materiału. Histereza dynamiczna związana jest z czasem kontaktu kropli cieczy pomiarowej z badaną powierzchnią, podczas którego dochodzi do reakcji chemicznych pomiędzy cieczą pomiarową a badanym materiałem [19].

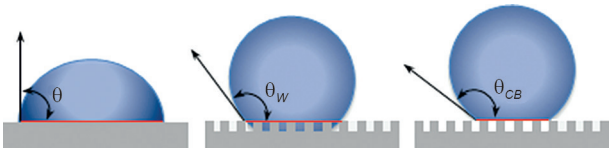


Rys. 5.5. Schemat powstawania kąta napływu i kąta cofania [19]

Histereza kąta zwilżania wynika z chropowatości powierzchni i/lub niejednorodności i ma znaczenie w szacowaniu właściwości powierzchni. W przypadku powierzchni, które nie są jednorodne istnieją strefy stanowiące bariery dla przemieszczania się obszaru kontaktu. W przypadkach, w których chropowatość powierzchni odgrywa rolę w formowaniu histerezy rzeczywiste mikroskopowe zmiany nachylenia na powierzchni tworzą przeszkody, które zatrzymują ruch obszaru kontaktu kropli z powierzchnią materiału i zmieniają makroskopowe kąty zwilżania. Ponieważ równanie Younga nie uwzględnia topografii powierzchni, interpretacja danych kąta zwilżania w odniesieniu do równania Younga może być myląca. Ze względu na złożoność zjawisk towarzyszących zwilżaniu obserwowany eksperymentalnie kąt zwil-

żania może, ale nie musi być równy kątowi zwilżania Younga θ. Na idealnie płaskich powierzchniach stałych nie występuje histereza kąta zwilżania, ale na gładkich, lecz niejednorodnych chemicznie powierzchniach stałych obserwowany eksperymentalnie kąt zwilżania może nie być równy θ.

Termodynamiczne kąty kontaktowe równowagi na szorstkich i niejednorodnych powierzchniach nazywane są odpowiednio kątami Wenzela (θ_W) i Cassie-Baxtera (θ_{CB}) (rys. 5.6) [16]. Nie są równoważne kątowi zwilżania Younga. Zaleca się, aby powierzchnia stała była przygotowana tak gładko, jak to możliwe i była możliwie jak najbardziej obojętna dla cieczy pomiarowych, aby chropowatość powierzchni nie miała wyraźnego wpływu na kąt zwilżania.



Rys. 5.6. Porównanie zwilżania powierzchni z modelem Wenzela i Cassie-Baxtera [16]

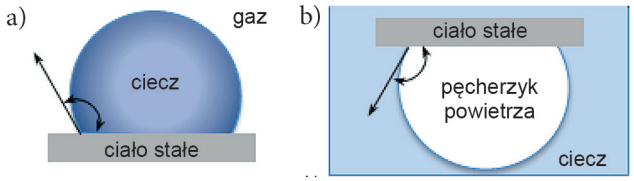
5.3.1. METODA KROPLI SIEDZĄCEJ

Najpopularniejszą techniką pomiaru kąta zwilżania jest bezpośredni pomiar kąta zwilżania w układzie równowagi trzech faz metodą kropli siedzącej. Jest to bezpośrednia metoda optyczna, z wykorzystaniem rejestracji obrazu kropli za pomocą goniometru teleskopowego, która wymaga niewielkich ilości cieczy i małej powierzchni ciał stałych. Z drugiej strony możliwy jest wpływ zanieczyszczeń ze względu na mały rozmiar cieczy i podłoża. Pomiary wymagają konsekwencji operatora w definiowaniu linii stycznej do zarysu kształtu kropli, co wpływa na dokładność i odtwarzalność oraz niespójność między wieloma użytkownikami. Kroplę na płaskiej powierzchni materiału osadza się za pomocą manualnej mikropipety lub strzykawki [18]. Dodatkowo istnieją problemy związane z odparowaniem cieczy i dehydratacją powierzchni ciała stałego. Mała kropla cieczy, w odniesieniu do swojej objętości, posiada dużą powierzchnię kontaktu, a jej parowanie powoduje cofnięcie się kropli na powierzchni materiału, co wpływa na wartości mierzonego kąta zwilżania. Dehydratacja powierzchni stałej może doprowadzić do zmiany wartości kąta zwilżania (szczególnie materiały polimerowe mogą zmieniać właściwości powierzchni względem otaczającego ich środowiska). Jeśli polimer umieszczony jest w suchym otoczeniu (np. w powietrzu), hydrofobowe grupy w polimerze będą orientować się na powierzchni materiału, zmniejszając zwilżalność materiału. Oba te problemy rozwiązuje się poprzez umieszczenie próbki materiału i cieczy w zamkniętej komorze paroszczelnej z przeziernymi oknami tak, aby obraz cieczy i badanej powierzchni mógł być nadal przechwytywany przez kamery goniometru. Współcześnie aparaty do wyznaczania kąta zwilżania rejestrują kształt kropli przy użyciu kamery cyfrowej, przekazując obraz

do komputera. Następnie za pomocą oprogramowania obraz ten jest analizowany, stosując jedną z wybranych metod, np. dopasowanie Laplace'a lub dopasowanie kuliste, metodę pomiaru szerokości i wysokości czy też metodę stycznych [19].

5.3.2. METODA PĘCHERZYKA POWIETRZA

Inną metodą, obok metody kropli siedzącej, jest wykorzystanie pęcherzyka powietrza. Pod próbką materiału zanurzoną w cieczy może powstać pęcherzyk powietrza uwięziony w cieczy testowej. Kąt zwilżania utworzony przez pęcherzyk powietrza w cieczy można również zmierzyć bezpośrednio z wykorzystaniem goniometru. Niewielka ilość powietrza jest wstrzykiwana do cieczy testowej, aby utworzyć pęcherzyk powietrza pod powierzchnią materiału (rys. 5.7b) [18].



Rys. 5.7. Porównanie metod szacowania kąta zwilżania przez: a) kroplę siedzącą, b) pęcherzyk powietrza

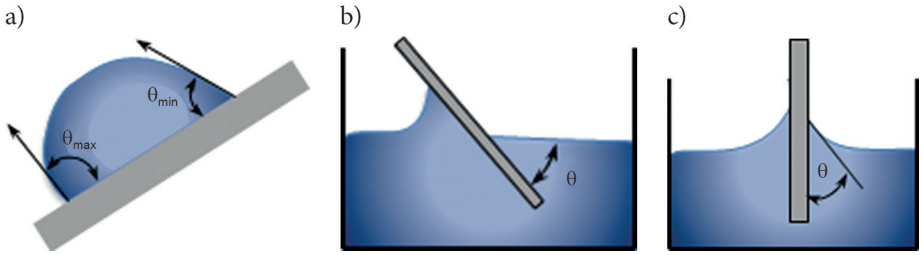
Metoda pęcherzyka ma te zalety, że powierzchnia materiału styka się z nasyconą parą, minimalizuje także wpływ zanieczyszczenia, łatwiejsze jest również monitorowanie temperatury cieczy. Metoda ta wymaga jednak znacznie więcej płynu niż metoda kropli siedzącej i może być problematyczna, gdy ciało stałe pęcznieje po zanurzeniu w cieczy lub warstwa wierzchnia ciała stałego rozpuszcza się w cieczy.

5.3.3. METODA NACHYLENIA PŁYTKI

W metodzie nachylenia płytki stosuje się zagadnienie przesunięcia i cofania kąta zwilżania (rys. 5.8a). Płytka ciała stałego z jednym końcem zamontowanym nad cieczą obraca się w kierunku powierzchni cieczy aż drugi koniec płytki zostanie zanurzony w cieczy, tworząc menisk po obu stronach płytki (rys. 5.8b). Następnie płytkę przechyla się powoli, aż menisk stanie się poziomy po jednej stronie płytki. Kąt między płytką a poziomem jest definiowany jako kąt zwilżania. Technika ta wykazuje wysoką dokładność i możliwość automatycznego określania zależności dynamicznych kątów zwilżania [18].

5.3.4. METODA RÓWNOWAGI WILHELMY'EGO

Metoda równowagi Wilhelmy'ego jest techniką, którą pośrednio mierzy się kąt zwilżania próbki ciała stałego. Cienka, gładka, pionowa płyta jest utrzymywana w kontakcie z cieczą, zmiana jej masy jest wykrywana przez wagę (rys. 5.8c) jako kombinacja wyporu, siły ciężkości oraz siły oddziaływań między fazami. Mierząc wartość siły rejestrowanej przez układ, można wyznaczyć cosinus kąta zwilżania [19].



Rys. 5.8. Schematy metody płyty z zastosowaną płytą: a) metoda płyty przechylnej, b) metoda wagi Wilhelmy'ego

5.3.5. METODA PENETRACJI KAPILARNEJ PROSZKÓW I GRANULATÓW

Zjawiska zwilżania i pomiaru kąta zwilżania są również ważne w zachowaniu proszków i granulek, jednak skomplikowane ze względu na porowatą architekturę układu. Bezpośredni pomiar kątów zwilżania pojedynczego proszku lub granulki jest prawie niemożliwy za pomocą konwencjonalnych metod. W metodach pośrednich proszki lub granulki są prasowane w formę krążka, następnie na jego płaską powierzchnię nakładane są krople cieczy i mierzone są kąty zwilżania. Należy wspomnieć, że ze względu na porowatą architekturę sprasowanych form proszkowych penetracja cieczy może wystąpić, jeśli rzeczywisty kąt zwilżania cieczy i ciała stałego będzie mniejszy niż 90°. Rzeczywisty wskaźnik penetracji może się różnić w zależności od faktycznej zwilżalności i porowatej struktury oraz tempa penetracji.

5.4. METODY WYZNACZANIA STANU ENERGETYCZNEGO WARSTWY WIERZCHNIEJ

W celu określenia stanu energetycznego warstwy wierzchniej wykorzystuje się swobodną energię powierzchniową. Parametr ten powiązany jest z pracą adhezji, którą opisuje równanie Dupre [19]:

$$W_A = \gamma_S + \gamma_L - \gamma_{SL}, \tag{5.8}$$

gdzie:

W_A – praca niezbędna do wytworzenia nowej jednostki powierzchni poprzez rozdzielenie cieczy pomiarowej oraz badanego tworzywa,
γ_S – SEP tworzywa (w stanie stałym) w próżni,
γ_{SL} – SEP ciała stałego oraz cieczy,
γ_L – SEP cieczy pomiarowej.

Dotychczas opisano kilka metod obliczania swobodnej energii powierzchniowej materiałów w stanie stałym, m.in. wśród najważniejszych wymienia się metody: Fowkesa, Owensa–Wendta, Naumanna, van Ossa-Gooda, Zismana oraz metody oparte na histerezie kąta zwilżania.

5.4.1. METODA FOWKESA

Metoda Fowkesa oparta jest na dwóch założeniach, z których wynika, że swobodną energię powierzchniową można podzielić na kilka indywidualnych składowych pochodzących od sił międzycząsteczkowych oraz że cząsteczki przyciągają się wzajemnie tylko wtedy, gdy działają na nie siły tego samego rodzaju. Uniwersalnymi siłami międzycząsteczkowymi są siły dyspersyjne, tzw. siły Londona (siły te są obecne we wszystkich pierwiastkach) [19].

Na granicy faz między cieczą pomiarową oraz badaną powierzchnią siły międzycząsteczkowe pochodzą w większości od cząsteczek i atomów z pierwszej warstwy cieczy pomiarowej oraz z pierwszej warstwy badanego materiału. Biorąc pod uwagę powyższe, Fowkes sformułował równanie:

$$\gamma_{SL} = \gamma_L + \gamma_S - 2\sqrt{\gamma_S^d \gamma_L^d}, \tag{5.9}$$

gdzie:

γ_{SL} – SEP ciała stałego oraz cieczy,
γ_S – SEP tworzywa (w stanie stałym),
γ_L – SEP cieczy pomiarowej,
γ_S^d – składowa dyspersyjna SEP ciała stałego,
γ_L^d – składowa dyspersyjna SEP cieczy pomiarowej [19].

Po podstawieniu równania (5.6) do (5.9) otrzymuje się równanie o postaci:

$$\gamma_S^d = \frac{(1+\cos\theta)^2 \gamma_L^2}{4\gamma_L^d}, \tag{5.10}$$

gdzie:

γ_{SL} – SEP ciała stałego oraz cieczy,
γ_S – SEP tworzywa (w stanie stałym),
γ_L – SEP cieczy pomiarowej,
γ_S^d – składowa dyspersyjna SEP ciała stałego,

γ_L^d – składowa dyspersyjna SEP cieczy pomiarowej,
θ – kąt zwilżania [19].

Zaproponowana przez Fowkesa metoda pozwala wyznaczyć wyłącznie składową dyspersyjną swobodnej energii powierzchniowej materiału, dlatego wykorzystuje się ją jedynie w przypadku obliczania SEP materiałów całkowicie niepolarnych [19].

5.4.2. METODA OWENSA–WENDTA

Jest to metoda wyznaczania swobodnej energii powierzchniowej opierająca się na modelu zawierającym składową polarną i składową dyspersyjną SEP [19]. W przypadku ciała stałego SEP określa się równaniem:

$$\gamma_S = \gamma_S^d + \gamma_S^p, \tag{5.11}$$

gdzie:
γ_S – SEP materiału (w stanie stałym),
γ_S^d – składowa dyspersyjna SEP ciała stałego,
γ_S^p – składowa polarna SEP ciała stałego.

W metodzie Owensa–Wendta ważny jest odpowiedni dobór cieczy pomiarowych. Jedna ciecz powinna charakteryzować się niską wartością składowej polarnej i wysoką wartością składowej dyspersyjnej, natomiast druga ciecz pomiarowa powinna charakteryzować się wysoką wartością składowej polarnej i niską wartością składowej dyspersyjnej (np. woda) [19]. Następnie należy dokonać pomiaru kąta zwilżania, co umożliwi rozwiązanie układu dwóch równań z dwiema niewiadomymi, wykorzystując równanie:

$$\frac{1}{2}(1+\cos\theta_i)\gamma_{Li} = \sqrt{(\gamma_S^d\gamma_{Li}^d)} + \sqrt{(\gamma_S^p\gamma_{Li}^p)}, \tag{5.12}$$

gdzie:
γ_L – SEP cieczy,
γ_L^d – składowa dyspersyjna SEP cieczy,
γ_L^p – składowa polarna SEP cieczy,
θ_i – kat zwilżania wybranymi cieczami, indeks *i* przyjmuje wartości 1, 2, oznacza kolejną ciecz pomiarową.

5.4.3. METODA VAN OSSA-GOODA

Metoda ta oparta jest na metodzie Fowkesa oraz na teorii kwasów i zasad Lewisa [19]. W metodzie założono, że swobodną energię powierzchniową (ciała stałego i cieczy pomiarowej) stanowią dwie składowe, co można przedstawić za pomocą równania:

$$\gamma_i = \gamma_i^{AB} + \gamma_i^{LW}, \tag{5.13}$$

gdzie:

γ_i – swobodna energia powierzchniowa,
γ_i^{AB} – składowa związana z siłami van der Waalsa (siły dużego zasięgu),
γ_i^{LW} – składowa oddziaływań kwasowo-zasadowych swobodnej energii powierzchniowej,
i – kolejna ciecz pomiarowa lub ciało stałe.

Do zdefiniowania składowej γ_i^{AB} wykorzystuje się teorię kwasów i zasad Lewisa. Podczas reakcji między kwasem Lewisa a zasadą Lewisa powstaje wiązanie koordynacyjne. Według definicji Lewisa kwas to atom, cząsteczka lub jon, który przyjmuje parę elektronową (jest jej akceptorem), natomiast zasada to atom, cząsteczka lub jon, który dostarcza pary elektronowej (jest jej donorem). Na podstawie teorii kwasów i zasad Lewisa związki chemiczne można podzielić na bipolarne (mają cechy kwasów i zasad Lewisa), monopolarne (są albo kwasami albo zasadami Lewisa) oraz apolarne (nie mają cech kwasów, ani zasad Lewisa) [1]. Przykładem związku apolarnego jest α-bromotaflaten lub dijodometan, przykładem związku monopolarnego jest chloroform (kwas Lewisa) oraz eter (zasada Lewisa), natomiast przykładem związku bipolarnego jest woda.

Przytoczony podział, jak również wykorzystanie dodatkowych oznaczeń składowej kwasowej swobodnej energii powierzchniowej symbolem γ_i^+, a składowej zasadowej swobodnej energii powierzchniowej symbolem γ_i^-, umożliwia stosowanie następujących zależności:

$$\gamma_i^{AB} = 2\sqrt{\gamma_i^+ \gamma_i^-}, \tag{5.14}$$

$$\gamma_i^{AB} = 0, \tag{5.15}$$

gdzie:

γ_i^{AB} – składowa oddziaływań kwasowo-zasadowych swobodnej energii powierzchniowej,
γ_i^+ – składowa γ_i^{AB} odpowiadająca za kwas według teorii Lewisa,
γ_i^- – składowa γ_i^{AB} odpowiadająca za zasadę według teorii Lewisa.

Zależność 5.14 ma zastosowanie do substancji bipolarnych, natomiast zależność 5.15 do substancji apolarnych i monopolarnych [19].

W celu obliczenia swobodnej energii powierzchniowej zgodnie z metodą van Ossa-Gooda, zgodnie z równaniami (5.13), (5.14) oraz (5.15) wykorzystuje się następującą formułę:

$$\frac{1}{2}(1+\cos\theta_i)\gamma_{Li} = \sqrt{(\gamma_S^{LW}\gamma_{Li}^{LW})} + \sqrt{(\gamma_S^+\gamma_{Li}^-)} + \sqrt{(\gamma_S^-\gamma_{Li}^+)}, \tag{5.16}$$

gdzie:

γ_S^+ – składowa γ_i^{AB} badanego ciała odpowiadająca za kwas według teorii Lewisa,

γ_S^- – składowa γ_i^{AB} badanego ciała odpowiadająca za zasadę według teorii Lewisa,
γ_{Li}^+ – składowa γ_i^{AB} cieczy pomiarowej odpowiadająca za kwas według teorii Lewisa,
γ_{Li}^- – składowa γ_i^{AB} cieczy pomiarowej odpowiadająca za zasadę według teorii Lewisa,
γ_S^{LW} – składowa SEP badanego ciała związana z siłami van der Waalsa (siły dużego zasięgu),
γ_{Li}^{LW} – składowa SEP cieczy pomiarowej związana z siłami van der Waalsa (siły dużego zasięgu),
γ_{Li} – SEP cieczy pomiarowej, indeks przyjmuje wartości 1, 2, oznacza kolejną ciecz pomiarową lub ciało stałe.

Model van Ossa-Gooda wymaga przeprowadzenia pomiarów kąta zwilżania trzema cieczami (dwie z nich muszą być bipolarne, a jedna apolarna) o znanych wielkościach γ_{Li}^{LW}, γ_{Li}^-, γ_{Li}^+. Model van Ossa-Gooda jest rezultatem badań oddziaływań pomiędzy proteinami a powierzchniami hydrofobowymi oraz próbami wyjaśnienia zjawiska *hydrophobic bond*.

5.4.4. METODA ZISMANA

Metoda Zismana jest wykorzystywana do wyznaczenia wartości krytycznej swobodnej energii powierzchniowej. W celu obliczenia tej wartości należy przeprowadzić badania kąta zwilżania ciała stałego przy wykorzystaniu kilku cieczy pomiarowych o różnych wartościach swobodnej energii powierzchniowej. Następnie należy wygenerować graficzną zależność wartości SEP cieczy pomiarowych od wartości cosinusów kątów zwilżania cieczy pomiarowych. Po przeprowadzeniu aproksymacji liniowej otrzymanych punktów należy odszukać wartość rzędnej na poziomie współrzędnej odcięcia wartości cosinusa kąta zwilżania wynoszącej 1. Punkt wspólny stanowi wartość krytycznej swobodnej energii powierzchniowej badanego materiału [19], co można sformułować jako:

$$\gamma_C = \gamma_{Li} - \frac{1-\cos\theta_i}{b}, \tag{5.17}$$

gdzie:
γ_C – krytyczna wartość swobodnej energii powierzchniowej,
γ_{Li} – swobodna energia powierzchniowa cieczy pomiarowej,
θ_i – kąt zwilżania,
b – tangens kąta nachylenia prostej, która stanowi aproksymację otrzymanych wyników pomiarów.

Należy również wspomnieć o dwóch kryteriach adhezji międzyfazowej. Z pierwszego kryterium wynika, że dobra zwilżalność badanego ciała zostanie uzyskana

wówczas, gdy zajdzie zależność $\gamma_L < \gamma_C$. Drugie kryterium determinuje zależność optymalnych warunków zwilżania oraz adhezji międzyfazowej. Z kryterium tego wynika, że parametry te będą najlepsze, gdy praca adhezji będzie maksymalna. Metoda Zismana umożliwia uzyskanie bardziej wiarygodnych wyników na powierzchniach niepolarnych niż na polarnych [19].

5.4.5. METODA OPARTA NA POMIARACH HISTEREZY KĄTA ZWILŻANIA

Jest to najnowsza z metod wyznaczania swobodnej energii powierzchniowej ciała stałego. Oparta jest na pomiarach wartości dwóch kątów związanych z histerezą kąta Younga: kąta napływu oraz kąta cofania. Wartość swobodnej energii powierzchniowej określa się według równania:

$$\gamma_S = \frac{\gamma_L(\cos\theta_r + \cos\theta_a)(1+\cos\theta_a)^2}{(1+\cos\theta_r)^2 - (1+\cos\theta_a)^2}, \tag{5.18}$$

gdzie:

- γ_S – swobodna energia powierzchniowa badanego materiału,
- γ_L – swobodna energia powierzchniowa cieczy pomiarowej,
- θ_r – kąt cofania,
- θ_a – kąt napływu.

5.5. PODSTAWOWE ZAGADNIENIA OPISU GEOMETRII POWIERZCHNI

5.5.1. STRUKTURA GEOMETRYCZNA POWIERZCHNI

Struktura geometryczna powierzchni to kolejny ważny czynnik decydujących o jakości danej powierzchni implantu [7]. Definiowana jest jako zbiór wszystkich nakładających się na siebie nierówności powstałych w wyniku procesów obróbki oraz zużycia materiału. Nierówności te mają różne formy, kształty, wymiary oraz lokalizacje. Jakość powierzchni materiału dedykowanego na implant czy protezę w znaczący sposób wpływa na własności użytkowe elementu, które determinowane są przez warunki tarcia na powierzchniach kontaktu, naprężenia stykowe, wytrzymałość zmęczeniową, odporność na korozję, szczelność połączeń, powierzchniowe promieniowanie cieplne czy też własności optyczne. Zapewnienie wysokiej jakości powierzchni implantu ogranicza powstawanie niebezpiecznych dla zdrowia zdarzeń podczas długotrwałego kontaktu materiału z agresywnym i zmiennym środowiskiem żywego organizmu. Niestety obserwowane są uszkodzenia mechaniczne elementów implantów, takie jak pęknięcia zmęczeniowe, pęknięcia wywołane naprężeniem korozyjnym, zużyciem ścierno-korozyjnym, nadmiernym ściernym zużyciem, korozją czy też erozją.

W celu znormalizowania cech tekstury powierzchni i określenia ich użytkowych wartości zdefiniowano jej podstawowe składowe [21], tj.:

- **odchyłki (błędy) kształtu** – maksymalna dopuszczalna różnica pomiędzy rzeczywistym kształtem a jego idealnym, prawidłowym odpowiednikiem;
- **falistość powierzchni** – nierówności o charakterze przypadkowym lub zbliżonym do postaci okresowej, których odstępy (s) znacznie przewyższają odstępy chropowatości powierzchni (falistość powierzchni w inżynierii części maszyn jest uznawana jako błąd wykonawczy, powstający najczęściej w wyniku wibracji maszyn produkcyjnych podczas obróbki elementu);
- **chropowatość powierzchni** – zbiór nierówności powstających w wyniku obróbki charakteryzujących się małym odstępem (s) między wierzchołkami o wysokości (R).

Miarą chropowatości powierzchni są jej parametry. Parametry chropowatości odnoszą się do konkretnych cech profilu. Pełna charakterystyka powierzchni wymaga podania zbioru parametrów opisujących wysokość nierówności, ich kształt oraz odstępy między nimi. Można wyróżnić ponad trzydzieści parametrów, natomiast w codziennej praktyce stosowanych jest zaledwie kilka. Wśród podstawowych parametrów należy wymienić:

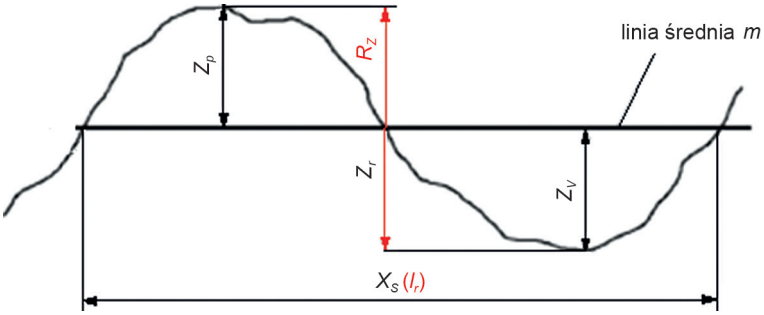
- **średnią arytmetyczną rzędnych profilu chropowatości** (R_a) jako średnią arytmetyczną bezwzględnych wartości rzędnych ($Z(x)$) wewnątrz odcinka elementarnego (l_r) (rys. 5.9);

$$R_a = \frac{1}{l_r}\int_0^{l_r} \left| Z(x) \right| dx \tag{5.19}$$

Rys. 5.9. Zasada wyznaczania parametru [21]

- **największą wysokość profilu chropowatości** (R_Z) jako sumę wysokości najwyższego wzniesienia profilu (Z_p) i głębokości najniższego wgłębienia profilu chropowatości (Z_V) wewnątrz odcinka elementarnego (l_r) (rys. 5.10);

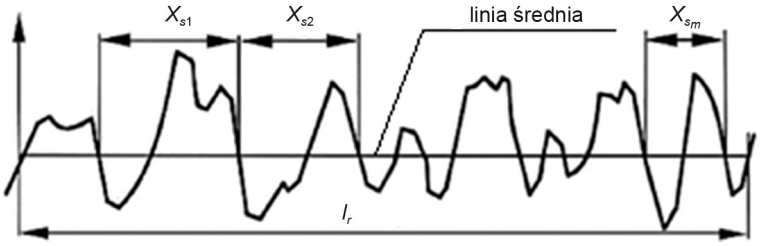
$$R_Z = \sum_0^{l_r} (Z_p + Z_V) \tag{5.20}$$



Rys. 5.10. Zasada wyznaczania parametru R_z [21]

- **średnią szerokość rowków elementów profilu chropowatości** (RS_m) będącą średnią wartością szerokości elementów profilu (X_s) wewnątrz odcinka elementarnego (l_r) (rys. 5.11);

$$RS_m = \frac{1}{m}\sum_{i=1}^{m} X_{S_i} \tag{5.21}$$



Rys. 5.11. Zasada wyznaczania parametru RS_m [21]

5.5.2. POMIARY CHROPOWATOŚCI POWIERZCHNI

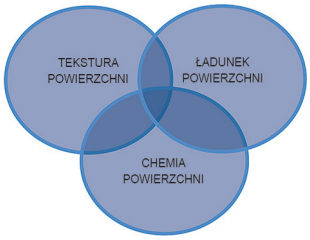
Wśród metod pomiaru chropowatości powierzchni rozróżnia się metody liniowe i powierzchniowe. Metody liniowe polegające na badaniu profili powierzchni można podzielić na optyczne i mechaniczne (stykowe). Do metod powierzchniowych optycznych należy m.in. mikroskopia interferencyjna.

Zasada pomiaru stykowego struktury geometrycznej powierzchni polega na rejestrowaniu położenia głowicy pomiarowej z ostrzem odwzorowującym, pozostającym w kontakcie z badaną powierzchnią, przesuwanej ze stała prędkością wzdłuż kierunku mierzonego profilu. Ciągły kontakt ostrza z mierzoną powierzchnią badanego przedmiotu możliwy jest dzięki naciskowi pomiarowemu. Pionowe przemieszczenie ostrza przetwarzane jest na sygnał elektryczny, który po wzmocnieniu poddawany jest filtracji. Przy pomiarze chropowatości odfiltrowuje się falistość i błędy kształtu. Uzyskany sygnał pomiarowy można zarejestrować w postaci **profilografu**

oraz przetransformować w celu uzyskania wartości liczbowych parametrów chropowatości. Aparaty wykorzystywane w badaniach stykowych struktury geometrycznej powierzchni to **profilografometry**.

5.6. WPŁYW WARSTWY WIERZCHNIEJ NA INTERAKCJE IMPLANT–TKANKA

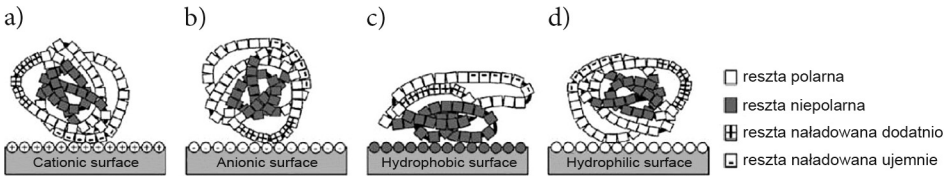
Warstwa wierzchnia implantu jako pierwsza ma kontakt z tkankami gospodarza. Ze względu na to właściwości warstwy wierzchniej biomateriału z jakiego wytworzony został implant będą determinowały charakter interakcji pomiędzy biomateriałem a tkanką. Główne **typy interakcji** to **adsorpcja białek**, **adhezja komórek** oraz **proliferacja komórek** [4]. Natomiast wśród **kluczowych właściwości warstwy wierzchniej** można wyróżnić trzy grupy: **teksturę powierzchni**, **ładunek powierzchni** oraz **chemię powierzchni**. Podział ten przedstawiono na rys. 5.12. Odpowiednia korelacja właściwości zaliczanych do tych trzech grup stanowi o optymalizacji właściwości biomateriałów przeznaczonych na implanty.



Rys. 5.12. Trzy główne grupy istotnych właściwości warstwy wierzchniej wg [2]

Charakter interakcji biomateriału z tkanką, związany z każdą z kluczowych wymienionych wyżej właściwości warstwy wierzchniej, determinowany jest także przez **zwilżalność**. Warunkuje ona adsorpcję białek, koagulację krwi oraz odpowiedź biologiczną [5]. Adsorpcja białek to pierwszy proces, który zachodzi podczas kontaktu biomateriału z krwią i jest przypisywana nierozpoznanemu dotąd zjawisku, które prawdopodobnie powstaje w wyniku interakcji pomiędzy białkiem a rozpuszczalnikiem (w celu zapewnienia energii, która umożliwiłaby dostarczenie białka z roztworu) lub interakcji pomiędzy powierzchnią a rozpuszczalnikiem (jest to związane z adhezją wody do powierzchni adsorbujących) albo jako rezultat oddziaływań międzycząsteczkowych (np. sił van der Waalsa, wiązań wodorowych) między białkiem a powierzchnią [17]. Większość powszechni stosowanych biomateriałów jest hydrofobowa i ma duże powinowactwo do wielu białek. Bezpośrednio po implantacji biomateriał pokrywa się warstwą białek. Są to głównie albuminy, fibrynogen, fibronektyny, immunoglobuliny oraz czynniki von Willebranda. Poprzez interakcje

hydrofobowe białka te ze względu na różną konformację i obecność domen hydrofobowych adherują do hydrofobowych powierzchni. Zmiany konformacji zaabsorbowanych białek wywołują odpowiedź tkanek w postaci stanu zapalnego w obszarze biomateriału, koagulacji czy też reakcji na ciało obce. Zwilżalność powierzchni ma również wpływ na stopień różnicowania się drugorzędowej struktury białka. Pomimo braku jednolitego poglądu, uważa się, że bardziej pożądany jest hydrofobowy charakter materiału, gdyż sprzyja on adsorpcji białek ze względu na wcześniej wspomniane interakcje hydrofobowe. Hydrofilowa powierzchnia charakteryzuje się niską swobodną energią powierzchniową, co odpowiada niskiej adhezji białek i biokompatybilności. Zaobserwowano, że białka nie mają tendencji do łączenia się z powierzchniami hydrofilowymi (wprowadzenie hydrofilowego monomeru do organizmu spowodowało zmniejszenie adsorpcji fibrynogenu, zwiększenie adsorpcji albuminy, jak również stopniowe zmniejszenie adhezji płytkowej) [3, 4, 14, 17]. Na rys. 5.13. przedstawiono mechanizm adhezji białek na różnych powierzchniach.



Rys. 5.13. Mechanizm adhezji białek na różnych powierzchniach: a) powierzchnia o ładunku dodatnim, b) powierzchnia o lądunku ujemnym, c) powierzchnia hydrofobowa, d) powierzchnia hydrofilowa [3]

Obserwuje się zwiększenie adhezji płytkowej przy powierzchniach niejonowych i neutralnych powłokach. Uważa się również, że hydrofilowe powierzchnie wpływają stymulująco na adhezję leukocytów i połączenie makrofagów, natomiast mogą zmniejszać wydzielanie cytokin i osłabiać reakcje zapalne. Na uwagę zasługuje również fakt, że powierzchnia hydrofobowa osłabia rozprzestrzenianie się komórek [4, 14].

Wzajemna relacja determinowana jest również poprzez wpływ poszczególnych grup funkcyjnych badanego materiału na organizm. Materiały, które nie sprzyjają adhezji białek na powierzchni implantu charakteryzują się hydrofilową warstwą wierzchnią, obecnością akceptorów wiązania wodorowego, brakiem donorów wiązania wodorowego oraz neutralnym ładunkiem. Identyfikacja grup funkcyjnych odpowiedzialnych za odporność na działanie białek umożliwia kontrolę adhezji oraz interakcji między białkami, co wpływa na optymalizację biokompatybilności implantu. Grupy funkcyjne mogą wpływać na wzrost komórek na powierzchni implantu poprzez zmianę funkcjonalności powierzchni biomateriału. Warstwa wierzchnia posiadająca w swoim składzie **grupę karboksylową** stanowi powierzchnię naładowaną **ładunkiem ujemnym**. Przykładowo fibronektyna oraz albumina są łatwiej usuwane z takich powierzchni. Materiały z grupą karboksylową wpływają stymulu-

jąco na wzrost komórek, jednak materiały te mogą hamować różnicowanie się osteoblastów i proces mineralizacji. **Grupa hydroksylowa** nadaje warstwie wierzchniej **neutralny ładunek** i hydrofilowe właściwości. Dzięki obecności grup hydroksylowych następuje wzrost komórek ze względu na zwiększenie tlenu oraz wzrost siły adhezji, wysoki poziom różnicowania się komórek oraz zwiększenie mineralizacji. Zwiększenie ilości tlenu ułatwia tworzenie się wiązań wodorowych, co ułatwia kropli wody rozprzestrzenianie się po powierzchni. **Dodatni ładunek** warstwie wierzchniej dostarcza grupa aminowa. Dzięki jej obecności dochodzi do zwiększenia wzrostu komórek śródbłonka oraz do polepszenia różnicowania i mineralizacji komórek osteoblastów. Dodatkowo na powierzchni warstwy wierzchniej zawierającej grupy aminowe obserwuje się adhezję, wzrost i tworzenie matrycy fibroblastów. Jednym z głównych składników powszechnie stosowanych polimerów jest **grupa metylowa**, która odpowiada za hydrofobowy charakter, ponieważ hydrofobowa powierzchnia sprzyja adhezji białek, obecność grupy metylowej zwiększa wiązanie fibrynogenu, akumulację płytek krwi i kompatybilność materiału do krwi. Z badań wynika, że białka takie jak fibrynogen, albuminy oraz immunoglobuliny najlepiej adherują do powierzchni zawierających w swojej warstwie wierzchniej grupę metylową [14].

Kolejnym ważnym parametrem opisującym warstwę wierzchnią i mającym wpływ na interakcje pomiędzy biomateriałem a tkanką jest **krytyczne napięcie powierzchniowe**. Wartość ta jest ustalana indywidualnie dla każdego materiału. W tab. 5.3. przedstawiono wartości krytycznego napięcia powierzchniowego dla wybranych polimerów. Polimery charakteryzują się szerokim zakresem wartości krytycznego napięcia powierzchniowego od 18 do 87 N/m.

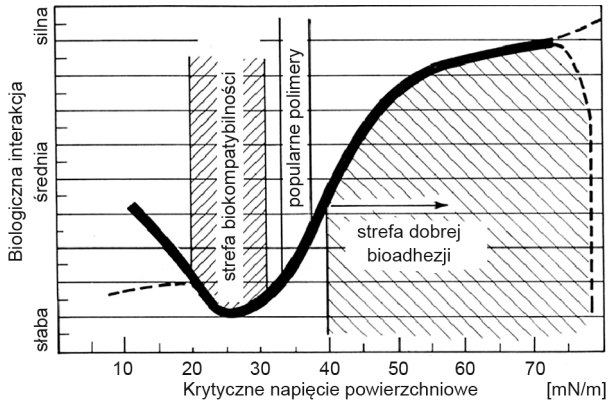
Tabela 5.3

Krytyczne napięcie powierzchniowe wybranych polimerów [2]

Polimer	γ_C [N/m]w 20°C	Polimer	γ_C [N/m]w 20°C
Politrifluoroetylen PTFE	18–22	Chlorek poliwinylu	39
Fluorek poliwinylidenu PVDF	25–28	Chlorek poliwinylidenu	40
Polietylen PE	31	Politereftalan etylenu PET	43
Polichlorotrifluoroetylen	31	Poliamid 6	46
Polistyren PS	33	Alkohol poliwinylowy	87

W 1960 roku Robert Baier [2] poddał analizie role energii warstwy wierzchniej biomateriałów w trombogenezie i na podstawie wyników opracował wykres korelacji stopni biologicznej interakcji w zależności od wartości krytycznej energii powierzchniowej. Wykazano, że materiały, które charakteryzują się wysokimi wartościami krytycznego napięcia powierzchniowego wykazują dobrą adhezję tkanek. Dla materiałów charakteryzujących się niskimi wartościami krytycznego napięcia powierzchniowego potwierdzono słabą adhezję tkanek. Krytyczne napięcie po-

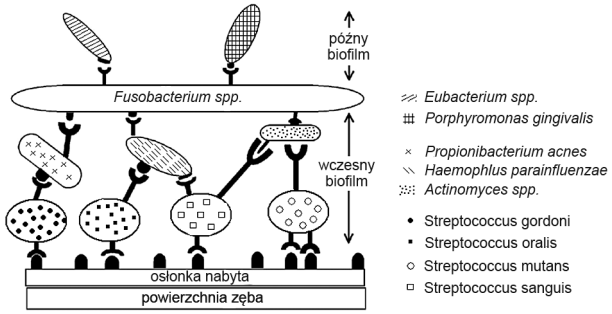
wierzchniowe wpływa również na czas krzepnięcia krwi otaczającej biomateriał. Wraz ze wzrostem wartości napięcia powierzchniowego czas krzepnięcia ulega skróceniu. Przy wykorzystaniu pomiarów kąta zwilżania w celu obliczenia krytycznego napięcia powierzchniowego stwierdzono, że powierzchnie, które uniemożliwiały krzepnięcie krwi zostały wcześniej zanieczyszczone hydrofobową powłoką [2]. Opierając się na badaniach eksperymentalnych, zgodnie z hipotezą R. Baiera [2], wydzielono zakresy wartości krytycznego napięcia powierzchniowego, w których obserwuje się minimalny poziom przyczepiania się i rozprzestrzenienia się komórek, co stanowi hipotetyczny przedział biokompatybilności, który wynosi 20–30 N/m (rys. 5.14). Obszar pomiędzy 20 a 30 N/m to hipotetyczny rejon biokompatybilności, natomiast materiały charakteryzujące się krytycznym napięciem powierzchniowym powyżej 40 N/m wykazują dużą zdolność do bioadhezji. Są to materiały przeznaczone na implanty ortopedyczne. Wysoka wartość krytycznego napięcia powierzchniowego zapewnia pożądane interakcje biomateriału z tkankami, które polegają na dobrym rozprzestrzenianiu się komórek oraz ich przyłączeniu do biomateriału (np. wgajanie trzpienia implantu stawu biodrowego). Na rys. 5.14. zaznaczono także wąski przedział, który obejmuje wartości krytycznej energii powierzchniowej najbardziej popularnych polimerów. Przedział ten zawiera się pomiędzy hipotetycznym przedziałem biokompatybilności oraz dobrym przedziałem bioadhezji. Oznacza to, że, opierając się wyłącznie na kryterium relacji między krytycznym napięciem powierzchniowym a poziomem bioadhezji, materiały polimerowe nie stanowią najlepszych biomateriałów [2].



Rys. 5.14. Relacja między krytycznym napięciem powierzchniowym materiału a reakcjami biologicznymi wg [2]

Jednym z obszarów medycyny, w którym szerokie zastosowanie mają badania wpływu zwilżania powierzchni oraz jej stanów energetycznych na wielkość adhezji jest stomatologia i protetyka stomatologiczna. Badanie niosą ze sobą informacje na temat warunków formowania się płytki nazębnej. Płytka nazębna związana jest

z obecnością bakterii w jamie ustnej. Proces formowania się płytki nazębnej rozpoczyna się od wytworzenia osłonki nabytej, która pozwala na adhezję flory bakteryjnej. Wczesny biofilm jest przyłączony do powierzchni zęba poprzez receptory (adhezyny). Powstają kolonie, które koagregują z innymi bakteriami i formują biofilm późny. Proces ten określa się mianem biochemicznego czynnika adhezji bakterii i został przedstawiony w sposób schematyczny na rys. 5.15 [8, 10]. Po uformowaniu płytki nazębnej w miarę upływu czasu następuje proces mineralizacji i biofilm przekształcony zostaje w twardą matrycę, którą można usunąć jedynie z wykorzystaniem metod mechanicznych, np. ścierania. Powstawanie nadmiernej ilości płytki nazębnej ma negatywne skutki i może być przyczyną próchnicy, powstawania stanów zapalnych oraz chorób przyzębia.



Rys. 5.15. Schemat powstawania płytki nazębnej (*Streptococcus* odpowiedzialne za próchnicę; *Porphyromonas gingivalis* oraz *Fusobacterium* wywołujące zapalenie przyzębia) [10]

Dodatkowo można wyróżnić inne teorie tworzenia się płytki nazębnej, które mają charakter fizykochemiczny. **Teoria DLVO** (**D**erjaguin i **L**andau oraz **V**ervey i **O**verbeek) jest to teoria, w której zakłada się stabilność koloidów liofobowych, co pozwala obliczyć zmianę energii podczas zbliżania się cząstek do siebie. Teoria DLVO wykorzystywana jest do tłumaczenia zjawiska formowania płytki nazębnej z uwzględnieniem oddziaływania van der Waalsa oraz sił elektrostatycznych. Natomiast **teoria termodynamiczna** oparta jest na pojęciu swobodnej energii powierzchniowej, która występuje pomiędzy dwoma ośrodkami [8]. Problem płytki nazębnej dotyczy nie tylko szkliwa zębowego, ale także materiałów protetycznych znajdujących się w jamie ustnej. Ilość powstającej płytki nazębnej jest związana ze swobodną energią powierzchniową, a dokładniej – im wyższa jest swobodna energia powierzchniowa, tym łatwiej bakterie adherują do tych powierzchni. Skład pytki bakteryjnej oraz szybkość jej przyrastania zależy od rodzaju materiału protetycznego. Szorstka powierzchnia implantu, korony protetycznej czy protezy jest czynnikiem predysponującym do powstawania płytki nazębnej. Na szorstkiej powierzchni dochodzi do tworzenia się płytki bardziej dojrzałej, z większą ilością pałeczek i krętek w porównaniu z gładką powierzchnią szkliwa. Konsekwencją tych procesów jest zapalenie przyzębia i podwyższony wskaźnik krwawienia oraz zwiększona produk-

cja płynu dziąsłowego. Badania pozwoliły również na określenie wartości progowej wskaźnika szorstkości powierzchni R_a, który wynosi 0,2 μm. Obniżenie tej wartości nie wpływa na zredukowanie adhezji bakteryjnej. Materiały ceramiczne wykazują najmniejsze powinowactwo do tworzenia płytki nazębnej ze wszystkich wykorzystywanych współcześnie materiałów protetycznych [8, 10].

5.7. ZNACZENIE CHROPOWATOŚCI POWIERZCHNI NA PRZYKŁADZIE IMPLANTÓW TYTANOWYCH

Dla implantów tytanowych (ortopedycznych i stomatologicznych) celowe jest uzyskanie trwałego połączenia pomiędzy tkanką a materiałem, dlatego dąży się do uzyskania powierzchni o pewnej chropowatości, natomiast w przypadku narzędzi chirurgicznych i implantów przeznaczonych m.in. do kontaktu z krwią wytwarza się powierzchnie o jak najmniejszej chropowatości [7, 9, 13]. Chropowatość powierzchni implantu wpływa na adhezję osteoblastów, powodując zwiększenie aktywności enzymatycznej oraz decyduje o ilości, jak i rodzaju syntezowanych przez nie białek. Zwiększony potencjał biomechanicznego kontaktu na granicy implant–kość wpływa na szybkość adsorpcji białek. Mikroskopowe cechy powierzchni implantu mają wpływ na rodzaj komórek obecnych na powierzchni wgajającego się implantu [7, 15]. W tab. 5.4 przedstawiono wpływ modyfikacji powierzchni tytanowych implantów na chropowatość powierzchni i kąt zwilżania.

Tabela 5.4

Wpływ typów modyfikacji powierzchni na chropowatość i kąt zwilżania powierzchni [9]

Modyfikacja	Chropowatość powierzchni Ra [μm]	Kąt zwilżania [°]
Ti czysty	0,22±0,01 (a)	55,5±4,1
Ti-6Al-4V czysty	0,23±0,01 (a)	56,3±2,7
Natryskiwanie plazmowe	7,01±2,09	–
Piaskowanie (SLA)	1,15±0,05	138,3±4,2
Modyfikowane SLA	1,16±0,04	0
Ti z naniesiona warstwa HA	1,06±0,21	57,4±3,2
Warstwy biomimetyczne CaP	1,83±0,64	13,4±0,17

(a) po obróbce mechanicznej i polerowaniu

Fibroblasty mają tendencję do kolonizowania powierzchni o niższej chropowatości, natomiast obecność osteoblastów potwierdzana jest na powierzchniach chropowatych. Chropowatość powierzchni *in vitro* wpływa na osteoblasty, determinując ich proliferację i różnicowanie. Kultury komórkowe prowadzone w hodowlach na powierzchniach o wyższej chropowatości wykazują zwiększoną produkcję macie-

rzy pozakomórkowej. Osteoblasty wykazują odmienne zróżnicowanie na powierzchniach charakteryzujących się różną chropowatością, jak również na powierzchniach o podobnej chropowatości, ale o odmiennej topografii. Dobrze tolerowana przez komórki jest powierzchnia o współczynniku chropowatości Ra na poziomie 4 μm. Większość implantów charakteryzuje się powierzchnią o średniej chropowatości Ra w zakresie 1–2 μm. Zbyt duży stopień chropowatości wszczepu niekorzystnie wpływa na oddziaływanie pomiędzy tytanem a kością przez zwiększone uwalnianie jonów, utrudnia adsorpcję komórek i powoduje zwiększenie naprężeń.

Uzyskanie trwałego połączenia implant–tkanka kostna, które przy dłuższym okresie użytkowania nie prowadziłoby do obluzowania wszczepionego implantu, wymaga opracowania powierzchni o odpowiedniej topografii i bioaktywności umożliwiającej szybki i stabilny przerost implantu tkanką. Możliwe jest to poprzez modyfikacje powierzchni wszczepów, które zapewniłyby szybką osteointegrację, umożliwiając tym samym natychmiastowe obciążenie czynnościowe wszczepu [7].

Metody modyfikacji powierzchni implantów metalicznych można podzielić na dwie grupy (tab. 5.5) – fizykochemiczne i biochemiczne. W grupie modyfikacji fizykochemicznych zakłada się uzyskanie zamierzonej zmiany składu chemicznego istniejącej powierzchni, mikrostruktury, topografii powierzchni, odporności korozyjnej i odporności na zużycie przez tarcie. Biochemiczne modyfikowanie powierzchni polega na wytworzeniu i przyłączeniu związków organicznych, które ułatwiają wiązanie białek do powierzchni (opracowano implanty pokryte substancjami aktywnymi biologicznie, wpływającymi na adhezję komórek) [7].

Tabela 5.5

Wybrane fizykochemiczne i biochemiczne metody modyfikacji powierzchni implantów [7]

Rodzaje obróbki powierzchniowej (modyfikacje fizykochemiczne)	Aktywne biologiczne pokrycia warstwy implantów (modyfikacje biochemiczne)
pasywacja	sekwencje peptydowe
polerowanie elektrolityczne	warstwa kopolimeru modyfikowana peptydem
powłoki nanoszone metodami CVD oraz PVD	czynniki wzrostu fibroblastów (fibronektyna)
implantacja jonów	polisacharydy (chitozan)
powłoki bioceramiczne (elektroforeza, zol-żel)	hydrofobiany nadające właściwości hydrofilne
powłoki węglowe typu DLC oraz NCD	wzbogaconej fluorkami
piaskowanie	–

Szczególnie interesujące wydaje się być połączenie modyfikacji fizykochemicznej z biochemiczną, która pozwoli na otrzymanie powierzchni implantu o przeciętnej chropowatości i o takich wartościach napięcia powierzchniowego, mikrotopografii ładunku jonowego, energii powierzchniowej i strukturze krystalograficznej oraz bioaktywizującym składzie chemicznym, które powodowałyby stymulację tkanki kostnej do wzrostu [3, 7, 13, 15].

Wprowadzane modyfikacje powierzchni implantów skutkują poprawą warunków osteointegracji oraz umożliwiają natychmiastowe lub wczesne obciążanie implantów, przywracając mobilność pacjentowi. W ocenie osteointegracji wykorzystuje się badania *in vitro*, które stanowią hodowle komórkowe, pomiar adsorpcji białek czy tworzenia kryształów HA. Natomiast w badaniach *in vivo* w ocenie jakości osteointegracji zastosowanie mają modele zwierzęce, pomiar momentu obrotowego przy próbie wykręcania implantu, badania częstotliwości rezonansu drgań oraz badania histologiczne kontaktu kość–implant (tzw. *Bone Implant Contact* (BIC)) [7].

LITERATURA

[1] Atkins P., *Chemia fizyczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2001.

[2] Baier R.E., *The role of surface energy in thrombogensis*, Bull N Y Acad Med, 48, 1972.

[3] Goddard J.M., Hotchkiss J.H., *Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds*, Progress in Polymer Science, 32, 3007.

[4] Kim M.S., Khang G., Le H.B., *Gradient polymer surfaces for biomedical applications,* Progress in Polymer Science, 33, 2008.

[5] Krawczuk A., Domińczuk J., *Analiza możliwości wykorzystania krzywych zwilżania do optymalizacji procesów adhezyjnych*, Technologia i Automatyzacja Montażu 4, 2015, 45-49.

[6] Krawczyk-Kłys I., Jaruga I., *Właściwości adhezyjne powierzchni*, Technologia i Jakość Wyrobów 59, 2014, 28-35.

[7] Łukaszewska M., Gajdus P., Hędzelek W., Zagalak R., *Rozwój powierzchni wszczepów tytanowych*, Przegląd Piśmiennictwa, Implantoprotetyka X, 3 (36), 2009.

[8] Merta U., Wiśniewska G., *Adhezja bakterii do materiałów dentystycznych – przegląd piśmiennictwa*, Dental Forum, 1, XXXXI, 2013, 65-67.

[9] Ossowska A., Sobieszczyk S., Supernak M., Zielinski A., *Morphology and properties of nanotubular oxide layer on the Ti-13Nb-13Zr alloy*, Surfaces and Coatings Technology 258, 2014, 1239-1248.

[10] Pasich E., *Mechanizm i czynniki ryzyka powstawania biofilmu bakteryjnego jamy ustnej*, Postepy Hig Med Dosw 67: 2013, 736-741.

[11] Petrie E.M., *Handbook of adhesives and sealants*, McGraw Hill Professional, Michigan 2000.

[12] Ratner B.D. et al., *An Introduction to Materials in Medicine*, Biomaterials Science: Elsevier, 2004.

[13] Świeczko-Żurek B., Zieliński A., Ossowska A., Sobieszczyk S., *Biomateriały*, Wyd. Politechniki Gdańskiej, Gdańsk 2014.

[14] Thevenot P., Hu W., Tang L., *Surface chemistry influences implant biocompability*, Current Topics in Medicinal Chemistry, 8, 2008.
[15] Wierzchoń T., Czarnowska E., Krupa D., *Inżynieria powierzchni w wytwarzaniu biomateriałów tytanowych*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2000.
[16] Xiao K., Yanping Zhao Y., Ouyang G., Li X., *Modeling the Effects of Nanopatterned Surfaces on Wetting States of Droplets Nanoscale*, Research Letters 12, 309, 2017.
[17] Xu L.C., Siedlecki C., *Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomedical surfaces*, Biomaterials, 28, 2008.
[18] Yuan Y., Lee T. R., *Contact Angle and Wetting Properties,* Springer Series in Surface Sciences 51, G. Bracco, B. Holst (eds.), Surface Science Techniques, 2013.
[19] Żenkiewicz M., *Adhezja i modyfikowanie warstwy wierzchniej tworzyw wielkocząsteczkowych*, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2000.
[20] PN-EN ISO 4287:1999/A1:2012 – Specyfika geometryczna wyrobów. Struktura geometryczna powierzchni: metoda profilowa. Terminy, definicje i parametry struktury geometrycznej powierzchni.

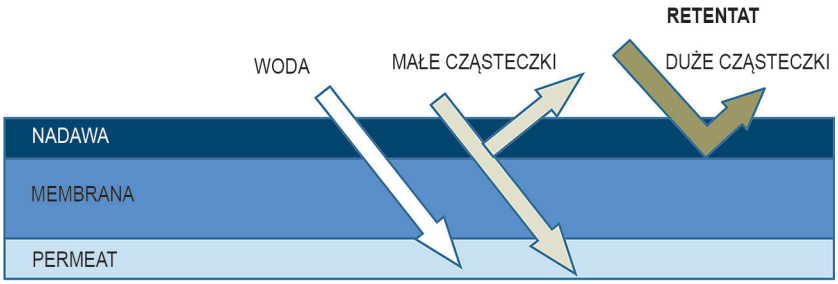
6. TRANSPORT MEMBRANOWY

6.1. WPROWADZENIE

Według nomenklatury zalecanej przez Europejskie Towarzystwo Membranowe (*European Society of Membrane Science and Technology,* ESMST) **membrana** definiowana jest jako półprzepuszczalna faza (stała lub ciekła) rozdzielająca dwie inne fazy, najczęściej ciekłe lub gazowe, działająca jako pasywna lub aktywna bariera dla transportu masy między tymi fazami, umożliwiająca przenikanie niektórych składników jednej fazy do drugiej. Membrany określa się często jako błony, folie, przepony, przegrody, separatory i filtry [12].

Membrana półprzepuszczalna umożliwia selektywne przenikanie wybranych rodzajów cząsteczek, dopuszczając transport lub migrację wybranego składnika, blokując albo zatrzymując inne w różnym stopniu. Membranę półprzepuszczalną można określić jako selektywną barierę, jednak taka definicja nie jest wystarczająca do rozważania procesów transportu w membranie, ponieważ nie zawiera informacji o strukturze i roli membrany.

W trakcie rozdziału składników na membranie strumień roztworu zasilającego (mieszanina lub zawiesina), tzw. **nadawa** (surówka), ulega rozdziałowi (separacji lub oczyszczaniu) na **strumień filtratu (permeat),** który przeniknął przez membranę i **strumień koncentratu (retentat)**, czyli pozostałość nadawy po odseparowaniu składnika, która nie przeszła przez membranę do permeatu (rys. 6.1) [8–10, 12]. **Permeacja** jest zatem procesem przenikania gazów i cieczy przez membranę. Produktem procesu membranowego może być zarówno permeat, jak i retentat. Skład

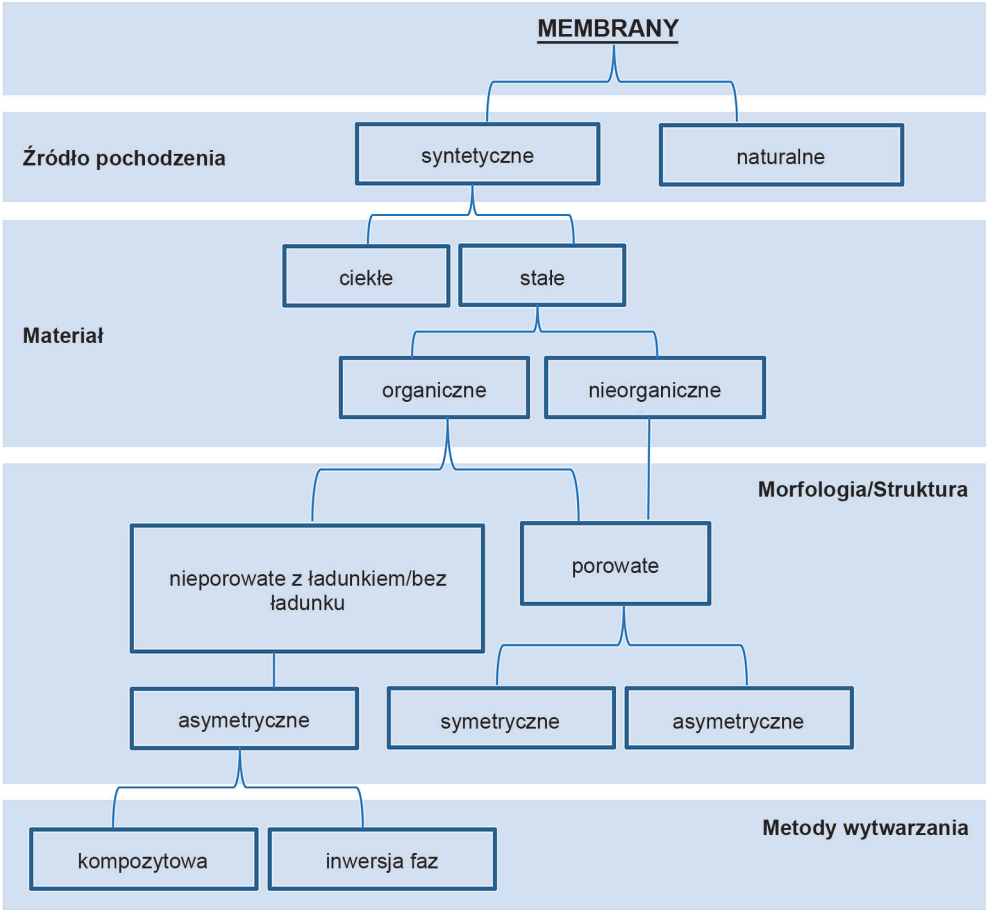


Rys. 6.1. Schemat mechanizmu rozdziału nadawa–permeat–retentat przez membranę

strumieni permeatu i retentatu silnie zależy od właściwości zastosowanej membrany. Właściwy wybór membrany uwarunkowany jest z reguły procesem, w którym ma być ona wykorzystana. Składniki rozdzielane podczas procesu nie ulegają przemianom termicznym, chemicznym ani biologicznym [8, 9, 12].

6.2. PODZIAŁ MEMBRAN

Istnieje wiele kryteriów podziałów i klasyfikacji membran obejmujących **pochodzenie, morfologię**, **strukturę**, **metodę wytwarzania** oraz **materiał**, z którego są wykonane (rys. 6.2), jak również wiele mechanizmów i rodzajów siły napędowej wywołującej transport substancji przez membranę [8, 9, 12].



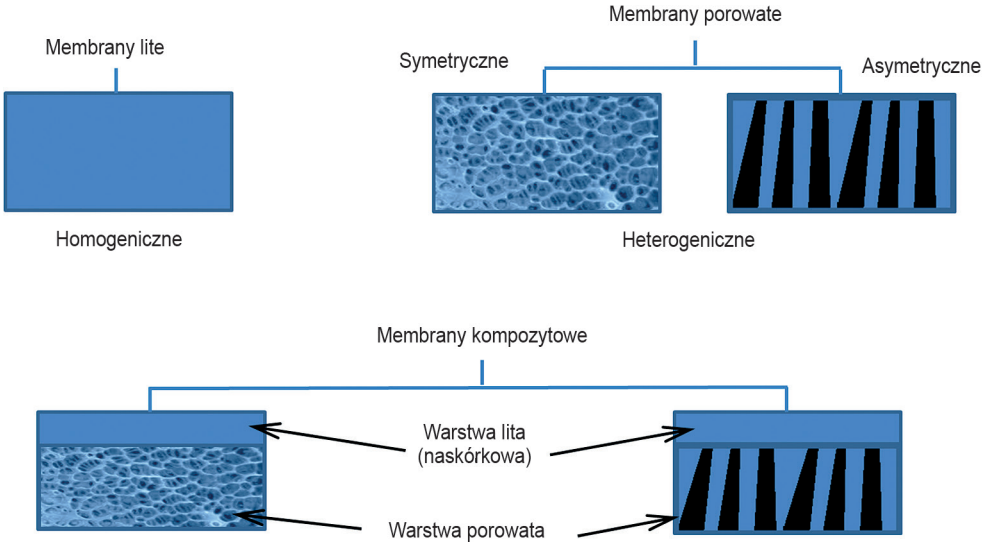
Rys. 6.2. Kryteria podziałów membran

Ze względu na źródło pochodzenia membrany można podzielić na dwie grupy **biologiczne** i **syntetyczne** [2, 8, 9, 12]. Membrany biologiczne różnią się od membran syntetycznych pod względem struktury, roli jaką pełnią oraz mechanizmów transportu cząsteczek/jonów. Przykładem naturalnej **biologicznej membrany** półprzepuszczalnej jest błona komórkowa. Błony komórkowe stanowią złożony ustrój membran odpowiedzialny za równowagę pomiędzy wnętrzem komórki a zewnętrznym obszarem ją otaczającym. Błony komórkowe realizują wymianę produktów przemiany materii, jak i składników odżywczych, pełnią również funkcję ochronną komórki. **Membrany syntetyczne** są wytwarzane zarówno z materiałów organicznych, jak i nieorganicznych. Do **membran organicznych** należą membrany polimerowe wytwarzane z takich materiałów, jak: octan celulozy, polietylen, polipropylen, poli(tetrafluoroetylen), polisulfon, poli(fluorek winylidenu), poliamid oraz związki poliwęglanu. Charakterystyka właściwości membran organicznych podkreśla ich podstawowe wady, jakimi są ograniczona chemiczna stabilność w układach agresywnych, do których należą roztwory wodne o niskim lub wysokim pH oraz roztwory zawierające rozpuszczalniki organiczne oraz małą odporność termiczną i krótki okres trwałości związany z procesami starzenia polimerów. Jednak różnorodność struktury, łatwość i niska cena wytwarzania powodują, że membrany te znajdują zastosowanie w wielu dziedzinach przemysłu, w tym również w medycynie. Alternatywą dla membran polimerowych są **membrany z materiałów nieorganicznych**. Membrany nieorganiczne wykonywane są z nieorganicznych materiałów spiekowych, tj. tlenki glinu, tlenki cyrkonu, szkło, aluminium, stal szlachetna, włókna węglowe. Nie posiadają one wad membran organicznych, jednak odznaczają się łamliwością, co wymaga zastosowanie specjalnych konstrukcji wspierających i podwyższa koszty ich wytwarzania. Do membran nieorganicznych zalicza się również membrany otrzymywane na porowatych nośnikach na zasadzie formowania *in situ* w wyniku filtracji roztworów zawierających substancje membranotwórcze, zarówno pochodzenia organicznego, jak i nieorganicznego. Membrany formowane w miejscu (ang. *formed-in-place membranes*), oprócz wyższego od membran polimerowych wskaźnika odporności chemicznej, charakteryzują się prostym sposobem otrzymywania oraz możliwością wielokrotnej regeneracji [11].

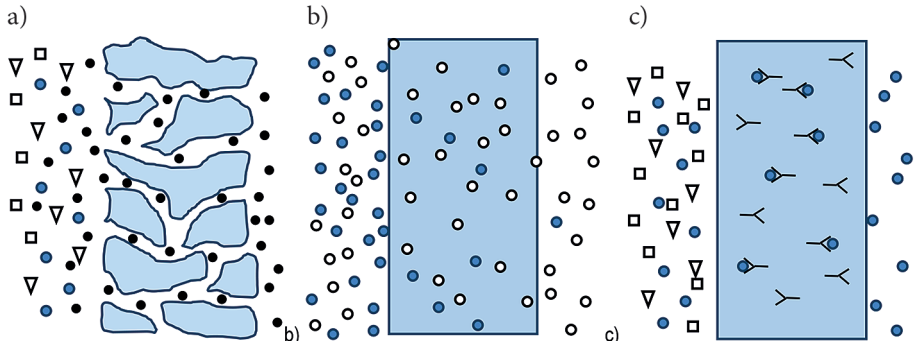
Kolejny podział membran uwzględniający ich **morfologię** wyróżnia **nieporowate-homogeniczne membrany** (m. elektrycznie obojętne i m. jonowymienne) oraz **membrany porowate**. Membrany homogeniczne charakteryzuje równomierne rozłożenie grup jonowymiennych w matrycy polimerowej, podobnie jak wysoka stabilność mechaniczna, niska oporność elektryczna i stopień pęcznienia uzależniony od usieciowania polimeru. Membrany o strukturze heterogenicznej charakteryzują wyraźne makroskopowe skupiska polimerów jonowymiennych rozmieszczone w obojętnej matrycy polimerowej z polietylenu, polichlorku winylu czy polikondensatów fenolowych. Właściwości permeacyjne membran nieporowatych-homogenicznych wynikają z obecności porów o wielkości molekularnej, których liczba i położe-

nie ulegają ciągłym zmianom w wyniku ruchów cieplnych. Są to zwykle membrany nieorganiczne ceramiczne, szklane lub organiczne z octanu celulozy, kauczuku silikonowego lub polietylenu. Do tego typu należą również membrany ciekłe [8, 9, 12].

Inny podział opiera się na **strukturze membran**, wyróżniając **membrany symetryczne o strukturze jednorodnej** oraz **membrany asymetryczne o strukturze uwarstwionej** (rys. 6.3). Ta charakterystyka membran związana jest ściśle z metodami ich wytwarzania. Wśród nich wyróżniamy: membrany uzyskiwane metodą inwersji faz wykonane z jednej substancji oraz kompozytowe wykonane z dwóch różnych substancji otrzymywane przez nakładanie warstw. Do membran niesymetrycznych zalicza się również membrany dynamiczne złożone z nośnej przegrody i naniesionej na nią substancji zwanej pomocą filtracyjną dodawanej do nadawy (podrozdział pt. *Metody otrzymywania membran*). Niezależnie od powyższych klasyfikacji można wyodrębnić trzy zasadnicze typy membran: **porowate**, **zwarte** i **ciekłe** (rys. 6.4). Do grupy membran porowatych należą przeznaczone do mikro-, ultra- i nanofiltracji membrany działające w oparciu o efekt sitowy (zjawisko przesiewania). O efektywności separacji membran porowatych decydują rozmiary składników rozdzielanych oraz porów. Grupa membran zwartych/litych (oraz mikroporowatych) nie zawiera porów w znaczeniu makroskopowym. Rozdzielana substancja najpierw ulega rozpuszczeniu w membranie, a następnie – z wykorzystaniem odpowiedniej siły napędowej – dyfunduje przez nią. Membrany zwarte wykorzystywane są w procesach perwaporacji, separacji par i gazów oraz związków małocząsteczkowych, gdzie o rozdziale składników decydują różnice w rozpuszczalności lub szybkość dyfuzji poszczególnych składników nadawy. W grupie membran ciekłych filtr tworzy warstwa cieczy, w której znajduje się tzw. nośnik (odpowiedni związek chemiczny),



Rys. 6.3. Struktury membran stałych



Rys. 6.4. Schemat działania membran: a) porowatej, b) zwartej, c) ciekłej

tworząc kompleks z jednym ze składników. Powstały kompleks dyfunduje do przeciwległej powierzchni membrany, gdzie składnik jest uwalniany do medium odbierającego. Przykładem tego typu membran są żele polimerowe z chemicznie wbudowanymi grupami funkcyjnymi, zdolnymi do oddziaływania z wybranym składnikiem i transportowania go w procesach wymiany i dyfuzji do przeciwległej powierzchni membrany [2, 8, 9, 12].

6.3. PODSTAWOWE CECHY CHARAKTERYZUJĄCE MEMBRANY I PROCESY MEMBRANOWE

Grubość membrany, a właściwie grubość warstwy funkcjonalnej związana jest z warunkami środowiska, w jakich membrana pracuje. Najczęściej grubość ta wynosi od 75 do 350 μm. W nanofiltracji wykorzystuje się membrany o grubości od 10 do 30 μm, natomiast membrany izolujące, ceramiczne mogą mieć grubość rzędu 400–500 μm. Najcieńszymi membranami są błony komórkowe. Grubość membrany lipidowej (dwuwarstwowej) zawiera się w przedziale 4–13 μm.

Porowatość, jako forma struktury membrany zależy od realizowanego w membranie mechanizmu przepuszczania oraz od rodzaju materiału membranotwórczego. Porowatość wpływa na wydajność procesu (określana wagowo lub mikroskopowo). Membrany polimerowe mogą mieć strukturę włóknistą zbudowaną ze splotu wielu włókienek formujących sieć kanalików, przez które przenika para wodna. Inną strukturą membrany może być układ jednofazowy wykorzystywany w membranach kapilarnych służący jako wypełnienie modułów do dializy (patrz rozdział pt. *Typy modułów membranowych*). **Wielkość porów** jest parametrem determinującym teoretyczne możliwości separacyjne membrany (określana jest za pomocą metody *buble-point* lub mikroskopowo). **Rozkład wielkości porów** to cecha wpływająca na zdolności separacyjne membrany (określany jest przy zastosowaniu substancji wzorcujących).

Graniczna masa molowa (GMM) jest poziomem masy molowej/cząsteczkowej związków/substancji zatrzymywanych przez membranę w 90% (rozdzielczość graniczna). **Współczynnik retencji** (*R*) opisujący skuteczność separacji definiuje się jako:

$$R = \frac{C_{iN} - C_{iP}}{C_{iN}} \cdot 100\% = \left(1 - \frac{C_P}{C_N} \right) \cdot 100\%, \tag{6.1}$$

gdzie:

C_{iN} – stężenie składnika (*i*) w nadawie,
C_{iP} – stężenie składnika (*i*) w permeacie.

Przepływ objętościowy roztworu (szybkość filtracji):

$$J_V = \frac{1}{A_M} \frac{dV_P}{dt}, \tag{6.2}$$

gdzie:

V_P – objętość permeatu,
A_M – powierzchnia robocza membrany.

Strumień permeatu charakteryzuje wydajność membrany poprzez objętość, masę lub liczbę moli substancji, która przechodzi przez jednostkową powierzchnię membrany w jednostce czasu.

Przepuszczalność (współczynnik przepuszczalności hydraulicznej) opisywany jest jako odwrotność oporu stawianego przez membranę i przedstawiony za pomocą następującego wzoru:

$$L_p = J_V / \Delta p, \tag{6.3}$$

gdzie:

J_V – strumień permeatu (przepływ objętościowy przypadający na jednostkę powierzchni membrany),
Δp – różnica ciśnień hydrostatycznych.

Analiza współczynnika przepuszczalności hydraulicznej pozwala na szybką ocenę działania membrany syntetycznej.

Trwałość (skuteczność/efektywność) filtracji jest kolejną cechą charakteryzującą membranę i proces membranowy. W trakcie realizacji procesu membranowego obserwuje się spadek wielkości strumienia permeatu, a poziom tego spadku zależy od realizowanej techniki membranowej. Za spadek skuteczności odpowiada złożony, wieloczynnikowy proces związany z polaryzacją stężeniową, adsorpcją na powierzchni membrany, formowaniem się powierzchniowej warstwy żelowej, blokowaniem porów i ich deformacją (patrz rozdział pt. *Zjawiska zakłócające procesy membranowe*).

Selektywność separacji (S_{AB}) jest to stosunek przepuszczalności składników przez membranę:

$$S_{AB} = \frac{C_{iP} / C_{jP}}{C_{iN} / C_{jN}}, \tag{6.4}$$

gdzie:

C_{iN} – stężenie składnika (*i*) w nadawie,
C_{iP} – stężenie składnika (*i*) w permeacie,
C_{jN} – stężenie składnika (*j*) w nadawie,
C_{jP} – stężenie składnika (*j*) w permeacie.

Stopień konwersji (odzysku) *Y*:

$$Y = \frac{Q_N}{Q_P} \cdot 100, \tag{6.5}$$

gdzie:

Q_N – objętościowe natężenie przepływu nadawy,
Q_P – objętościowe natężenie przepływu permeatu.

Hydrofilowość/hydrofobowość określa stopień powinowactwa do wody, wpływa na przepuszczalność membran (określana przez pomiar kąta zwilżania powierzchni membrany). Analizując wpływ nadawy na skuteczność procesów separacji, należy zwrócić uwagę na oddziaływanie substancji występujących w roztworze strumienia zasilającego na powierzchnię membrany poprzez polarność cząstek substancji nadawy, powierzchniowy ładunek elektryczny membran, siłę jonową roztworów i stężenie jonów wodorowych. Szczególnie podatne na absorpcję na powierzchniach membrany wykonanych zwłaszcza z hydrofobowych polimerów, tj. PE, PP i PTFE, są białka. Membrany hydrofilowe (estry celulozy, poliamidy alifatyczne) są mniej podatne na adsorpcję, stąd częściej stosuje się je na membrany w technikach ultra- i mikrofiltracji lub wprowadza się metody modyfikacji właściwości powierzchniowych membran (patrz rozdział pt. *Zjawiska zakłócające procesy membranowe*).

Odporność na ciśnienie jest cechą, która opisuje podatność membrany na deformacje porów podczas procesu membranowego. **Ciśnienie przezbłonowe** definiuje się jako średnią arytmetyczną przyłożonego ciśnienia od nadawy i od strony koncentratu membrany pomniejszoną o ciśnienie permeatu:

$$p = \frac{p_N - p_k}{2} - p_p, \tag{6.6}$$

gdzie:

p_N – ciśnienie nadawy,
p_k – ciśnienie retentatu,
p_p – ciśnienie permeatu.

Odporność na działanie czynników chemicznych lub **termicznych** również wpływa na żywotność membran i gwarantuje prawidłowość przebiegu procesów membranowych.

6.4. PODZIAŁ TECHNIK MEMBRANOWYCH

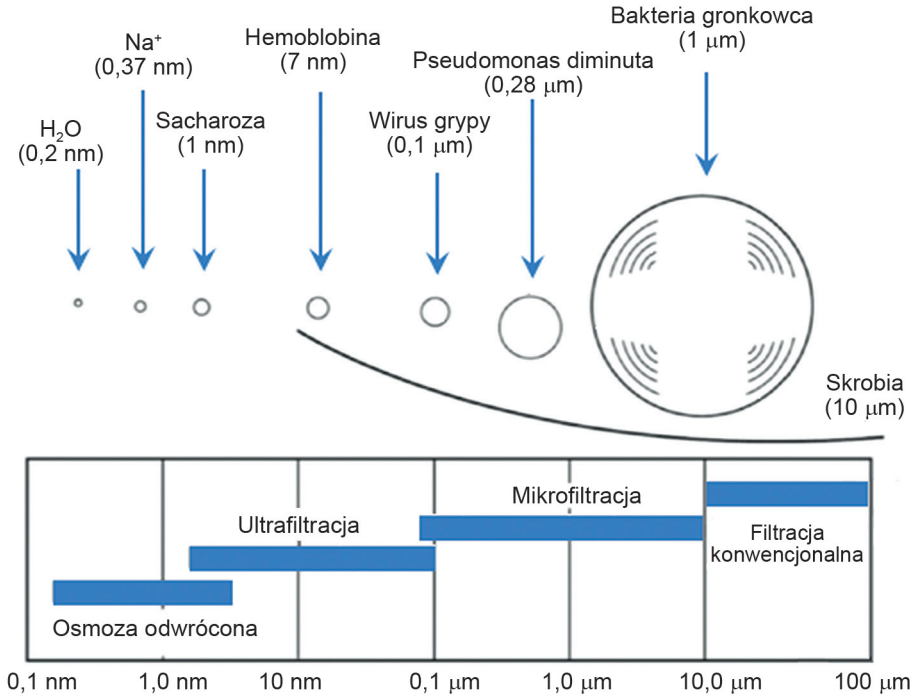
Mnogość wytwarzanych membran umożliwia realizowanie rożnych technik membranowych i zadań separacyjnych. Do najważniejszych zadań membrany zalicza się: **zatężanie** definiowane jako proces usuwania rozpuszczalnika (np. wody); **oczyszczanie**, czyli usuwanie zanieczyszczeń oraz **frakcjonowanie** opisywane jako przebieg rozdzielania substancji w mieszaninie lub roztworze na dwa lub więcej składników. Różnorodność typów membran oraz ich zadań wpływa na konieczność zdeterminowania klasyfikacji technik membranowych opartej na strukturze membran i na rodzaju tzw. **siły napędowej** koniecznej do realizacji rozdzielenia mieszaniny. Wyróżnia się kilka rodzajów sił napędowych stanowiących o aktywacji procesu membranowego. Na przebieg procesów membranowych zasadniczy wpływ mają dwie właściwości membrany: **selektywność** określająca zdolność rozdzielczą składników oraz **strumień permeatu** wyrażający wydajność osiąganą przy danych warunkach procesowych. Transport transbłonowy może się odbyć w oparciu o zasadę **różnicy ciśnień**, **różnicy stężeń** (aktywności), **różnicy temperatury** lub **różnicy potencjału** występującą po obu stronach membrany (tab. 6.1–6.6).

Procesy membranowe, których siłą napędową jest różnica ciśnień po obu stronach membrany stosuje się przede wszystkim do zatężania i/lub oczyszczania rozcieńczonych roztworów wodnych. Mechanizm separacji oparty jest na stosunku wielkości cząsteczki rozpuszczonej lub koloidalnej zawiesiny, obecnej w roztworze, do wielkości porów membrany, tzw. **dystrybucja wielkości porów** (rys. 6.5). Do procesów tych zalicza się mikrofiltrację, ultrafiltrację, odwróconą osmozę (hiperfiltrację), nanofiltrację.

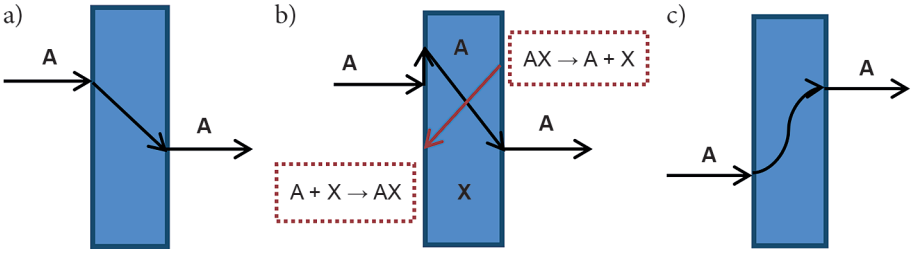
Wśród mechanizmów przenoszenia w membranach wyróżnia się:

- efekt sitowy – małe cząstki przechodzą przez membranę, a duże zostają zatrzymane;
- różnicę rozpuszczalności substancji i różnicę dyfuzji w membranie;
- różnicę szybkości migracji składników jonowych w membranach jonowymiennych;
- odwracalną reakcję substancji wchodzącej w skład nadawy ze składnikiem membrany, tzw. mechanizm reakcyjno-dyfuzyjny.

Na rysunku 6.6 przedstawiono typy transportu masy w membranie z oznaczeniem kierunku transportu względem wartości potencjału elektrochemicznego. **Transport bierny** charakteryzuje przenoszenie w kierunku malejącej wartości potencjału elektrochemicznego. **Transport bierny z nośnikiem** realizowany jest w kierunku malejących wartości potencjału elektrochemicznego. Podczas przenikania składnik A łączy się z nośnikiem X w membranie. Powstały związek AX jest szybko transportowany do drugiej powierzchni membrany, gdzie następuje uwolnienie A i X. Następnie nośnik X dyfunduje do przeciwnej powierzchni membrany. **Transport aktywny** od-



Rys. 6.5. Zakres filtracji ciśnieniowych procesów membranowych [13]



Rys. 6.6. Transport masy w membranie: a) przenoszenie bierne, b) transport bierny z nośnikiem, c) transport aktywny

bywa się w kierunku rosnących wartości potencjału elektrochemicznego, wstępuje w komórkach żywych.

Pomimo iż w tabeli 6.3 wyraźnie zaznaczono przedziały wartości wielkości cząstek, dla których dedykowane są techniki membranowe, to granice między poszczególnymi technikami są płynne.

Tabela 6.1

Klasyfikacja procesów membranowych uwzględniająca rodzaj siły napędowej wywołującej transport substancji przez membranę [8]

Różnica ciśnień (Δp)	Różnica stężeń (aktywności)	Różnica temperatury (ΔT)	Różnica potencjału elektrycznego ΔE
Mikrofiltracja Ultrafiltracja Nanofiltracja Odwrócona osmoza Piezodializa	Perwaporacja Separacja gazów Dializa Membrany ciekłe Membrany katalityczne	Termoosmoza Destylacja membranowa	Elektrodializa Membrany bipolarne Elektroosmoza

Tabela 6.2

Ciśnieniowe techniki separacji inicjowane ciśnieniem transmembranowym [8]

	Mikrofiltracja MF	Ultrafiltracja UF	Nanofiltracja NF	Odwrócona osmoza RO
Separacja	cząstek (np. bakterii)	substancji wielkocząsteczkowych i koloidalnych (np. białek)	jonów > II wartościowych oraz związków organicznych M > 300	substancji małocząsteczkowych
Ciśnienie osmotyczne (MPa)	pomijalne	pomijalne	istotne	wysokie 0,5–2,5
Ciśnienie trans-membranowe (MPa)	<0,2	0,1–1,0	0,5–2,0	wysokie 1,0–6,0
Struktura membran	symetryczna	asymetryczna	asymetryczna	asymetryczna
Rozmiar porów	0,1–10 μm	5–100 nm	~10Å	nanometrowe
Grubość membrany (μm)	10–150	0,1–1,0	0,1–1,0	0,1–1,0
Mechanizm separacji	sitowy	sitowy	rozpuszczanie i dyfuzja, wykluczanie Donnana	rozpuszczanie i dyfuzja; sorpcyjno-kapilarny przepływ rozpuszczalnika (wody)

Tabela 6.3

Przykłady substancji separowanych podczas technik membranowych [8]

Techniki	Skala rozmiaru cząstek		Przykład	Rozmiar cząstek	
mikrofiltracja	10		Pyły węglowe	1–100 um	
			Dym papierosowy	0,01–1 um	
			Aerozole	0,005–5 um	
			Pigmenty malarskie	0,01–6 um	
			Drożdże i grzyby	1–10 um	
			Czerwone krwinki	7,5 um	
			Bakterie (wymiar podłużny)		
			Lactobacillus delbrueckii	2–9 um	
			Escherichia coli	1–3 um	
	0,1 um		*Salmonella enteritidis*	2–3 um	
	nm	M		Wielkość	M
ultrafiltracja	100	1 000 000	Koloidy	4–4000	
			Proteiny	20–90	20 000–90 000
			Wirusy	4–60	40 000–50 000
			Endotoksyny (pyrogeny)	2–80	20 000–80 000
nanofiltracja	1	10 000	Albuminy	~7	60 000
	Å	M			
dyfuzje reakcyjne, prądowe i termiczne	10	1000	Sacharoza	8–20	342
			Laktoza		342
			Glukoza		180
			Mocznik		60
			H_2O	2,7	18
			CH_4	4,4	16
			O_2	3,46	32
			N_2	3,64	28
			He	2,6	4
	~2	2	H_2	2,34	2
			Na^+	1,96	
			K^+	2,66	
			Mg^{2+}	1,56	
			Ca^{2+}	2,12	

Tabela 6.4

Prądowe techniki rozdziału [8]

Techniki/siły napędowe	Nazwa i symbol	Rodzaj membrany	Mechanizm/podstawa działania
Siła napędowa ΔE, stałe pole elektryczne	Elektroliza ED	Żelowa, jonowa	Migracja jonów
	Elektroliza membranowa ME	Żelowa, jonowa	Migracja jonów
	Rozszczepienie soli BPED	Żelowa, bipolarna	Migracja jonów, katalizowana dysocjacja wody
	Elektrodializa z periodycznie odwracalną polaryzacją EDR	Żelowa, jonowa	Migracja jonów

Tabela 6.5

Dyfuzyjne techniki rozdziału [8]

Techniki/siły napędowe	Nazwa i symbol	Rodzaj membrany	Mechanizm/podstawa działania
Siła napędowa: Δc, dla gazów i par Δp	Separacja gazów GS	Asymetryczna z nieporowatym naskórkiem	Sorpcyjno-dyfyzyjny
	Perwaporacja PV	Asymetryczna nieporowata	Sorpcyjno-dyfyzyjny
	Przenikanie par VP	Asymetryczna nieporowata	Sorpcyjno-dyfyzyjny
	Dializa dyfuzyjna Dd	Żelowa, jonowa	Sorpcyjno-dyfyzyjny
	Hemodializa D	Polimer sztywny, silnie hydratowany	Transport kapilarny
	Dializa Donnana DD	Żelowa, jonowa	Interfuzja--transmembranowa wymiana jonów
	Destylacja osmotyczna OD	Solwatowa	Sorpcyjno-dyfyzyjny
	Regulowane uwalnianie CR	Nieporowata	Sorpcyjno-dyfyzyjny
	Membrany ciekłe I rodzaju LM	Ciekła	Rozpuszczanie i dyfuzja

Tabela 6.6

Reakcyjno-dyfuzyjne i termiczne techniki rozdziału [8]

Techniki/siły napędowe	Nazwa i symbol	Rodzaj membrany	Mechanizm/podstawa działania
Siła napędowa: powinowadztwo i gradient stężeń	Membrany ciekłe II-go rodzaju (z przenośnikiem) LM	Ciekła	Transport ułatwiony (FT) lub przeciwtransport
	BLM	Ciekła grubowarstwowa	Transport ułatwiony (FT) lub przeciwtransport
	ELM	Ciekła emulsyjna	Transport ułatwiony (FT) lub przeciwtransport
	SLM	Ciekła immobilizowana (w porach membrany porowatej)	Transport ułatwiony (FT) lub przeciwtransport
	Elektrody membranowe ME	Ciekła lub żelowa	Powinowadztwo reakcyjne
	Sensory membranowe MS		Powinowadztwo reakcyjne
Siła napędowa: ΔT (różnica prężności par Δp)	Destylacje membranowe MD	Porowata liofobowa; dla roztworów wodnych – hydrofobowa	Transport konwekcyjny, gdy pory są odpowiedtrzone; tr. dyfuyjny, gdy pory są wypełnione powietrzem

Mikrofiltracja (MF) jest to proces filtracji zawiesin przy użyciu membran porowatych, w którym cząstki o średnicach z zakresu 10–100 μm są oddzielane od rozpuszczalnika i małocząsteczkowych składników roztworu. Mechanizm rozdziału bazuje na mechanizmie sitowym i zachodzi wyłącznie względem średnic cząsteczek. W procesie mikrofiltracji stosuje się mikroporowate syntetyczne membrany z polimerów organicznych (octan celulozy, polisulfon, fluorek poliwinylidenu, polieterosulfon i poliamid), stosowane ze względu na ich elastyczność i właściwości chemiczne oraz membrany z materiałów nieorganicznych (ceramika, spiek metali, porowaty tlenku glinu, szkło) o średnicy porów rzędu 0,05–10 μm. Pod względem struktury membrany do mikrofiltracji składają się z dwóch warstw: cienkiej półprzepuszczalnej warstwy aktywnej (od 10 do 100 μm) i grubszej, relatywnie porowatej warstwy nośnej (od 100 do 200 μm). Warstwy aktywna i nośna mogą być wykonane z tych samych lub różnych materiałów. W zależności od średnicy porów stosowanej membrany cząsteczki większe od porów membrany są przez nią zatrzymywane i pozo-

stają w retentacie, natomiast cząsteczki, których średnica jest mniejsza od średnicy porów membrany przenikają przez pory membrany, tworząc permeat. Pozwala to na selektywny rozdział cząstek w fazie koloidalnej o masie cząsteczkowej >200 kDa. Proces mikrofiltracji wymuszany jest różnicą ciśnień hydrostatycznych po obu stronach membrany o wartości ok. 0,01–0,5 MPa (umożliwiający przepływ w zakresie od kilku do kilkunastu $m^3/(m^2 \cdot h)$). Za pomocą tej metody separacji usuwa się z roztworu zawiesiny, mikroorganizmy (takie jak bakterie czy niektóre wirusy) oraz cząstki tłuszczu. Rozmiary porów membrany pozwalają na przepuszczenie substancji rozpuszczonych, tj. jony i niejonowe związki chemiczne (np. niektórych witamin i rozpuszczalnych białek). Mikrofiltrację stosuje się w przemyśle oraz w laboratorium do usuwania, zatężania i oczyszczania cząsteczek (cząstek) o średnicy większej niż 0,1 μm. Mikrofiltracja może być przeprowadzona na dwa sposoby: w układzie jednokierunkowego przepływu nadawy (usuwanie zmętnień-klarowanie, sterylizacja roztworów) lub w układzie krzyżowego przepływu nadawy (zatężanie zawiesiny poprzez oddzielenie nadmiaru środka dyspersyjnego). W przepływie krzyżowym permeat przepływa przez membranę w kierunku prostopadłym do nadawy. Nadawa, która płynie wzdłuż membrany odbierana jest z modułu jako retentat [2, 8, 9, 12].

Ultrafiltracja (UF) jest procesem niskociśnieniowym wykorzystującym porowate membrany do separacji lub zatężania związków o średnicy od 1 do 100 nm lub związków o masie molowej od 10 do 100 kDa, umożliwiającymi przepływ przez membranę takim składnikom, jak cukry, sole, woda, oddzielając białka i większe cząstki. Ultrafiltrację stosuje się do usuwania, zatężania, oczyszczania substancji wielkocząsteczkowych i koloidalnych. W procesie ultrafiltracji nie występuje przeciwciśnienie osmotyczne, a separacja oparta jest, podobnie jak w mikrofiltracji, na fizycznym odsiewaniu cząstek substancji rozpuszczonych lub koloidalnych przez membranę o odpowiedniej porowatości. Procesy dyfuzyjne odgrywają niewielką rolę w mechanizmie rozdziału. Stosowane w ultrafiltracji ciśnienia są większe niż w procesie mikrofiltracji, różnica ciśnień hydrostatycznych wynosi ok. 0,2–1,0 MPa. W odróżnieniu od mikrofiltracji w procesie ultrafiltracji stosuje się membrany asymetryczne. Membrany ultrafiltracyjne stanowią też podstawę, tzw. suport, na który naniesione są membrany kompozytowe stosowane w innych technikach membranowych, takich jak odwrócona osmoza, perwaporacja i separacja gazów. Do ultrafiltracji wykorzystuje się membrany symetryczne lub asymetryczne wytworzone metodą inwersji fazowej, złożone z makroporowatej warstwy nośnej, a także mikroporowatej aktywnej warstwy rozdzielczej. Przykładem procesu ultrafiltracji stosowanego w medycynie jest hemodializa. Ponieważ ultrafiltracja zajmuje się rozdzieleniem cząstek o dużej masie molowej, tj. proteiny polisacharydy lub polimery syntetyczne, które tworzą roztwory koloidalne lub roztwory rzeczywiste, dlatego jej przeprowadzenie jest trudne. Związki te formują żele przy powierzchni membrany, blokując pory i zmniejszając jej efektywność [2, 8, 9, 12].

Nanofiltracja (NF) jest procesem wymagającym stosowania membran pozwalających na przepływ niektórych jonów, szczególnie jednowartościowych, np. sodu czy potasu. Ciśnienia stosowane przy nanofiltracji wahają się w granicach od 1 do 3 MPa. Nanofiltrację stosuje się zazwyczaj, gdy należy usunąć z roztworu np. białka, cukry i inne duże cząstki oraz sole dwu- i więcej wartościowe, pozostawiając w filtracie sole jednowartościowe (o masie cząsteczkowej >200–300 g/mol). Stosowane w nanofiltracji membrany mogą być asymetryczne, jonowe lub mikroporowate. Separują one cząstki o wielkości 1–5 nm, a więc takie związki małocząsteczkowe jak aminokwasy, proste cukry, enzymy oraz niektóre jony. Membrany nanofiltracyjne mają różne stopnie selektywności, z reguły jednak jony dwu- i wielowartościowe są przez nie zatrzymywane, swobodnie natomiast przechodzą jony jednowartościowe. Stosuje się ją do odsalania, oczyszczania i zmiękczania wody pitnej lub zatrzymywania trudno rozkładających się składników ścieków przed oczyszczalnią biologiczną. W nanofiltracji składniki separowane są w procesie, który jest połączeniem przepływu kapilarnego z mechanizmem rozpuszczająco-dyfuzyjnym [2, 8, 9, 12].

Odwrócona osmoza (*reverse osmosis* – RO) to proces wykorzystywany do rozdzielania związków małocząsteczkowych (tj.: sole nieorganiczne, małocząsteczkowe związki organiczne) od rozpuszczalnika. Odwrócona osmoza wymaga stosowania wyższych ciśnień transmembranowych niż w procesach ultra- i mikrofiltracji, ponieważ związki małocząsteczkowe cechują się wyższymi ciśnieniami osmotycznymi. Ciśnienia te silniej zależą od stężenia niż w przypadku roztworów związków wielkocząsteczkowych. U podstaw procesu odwróconej osmozy leży zjawisko osmozy naturalnej. W układzie, w którym membrana rozdziela roztwór od rozpuszczalnika lub dwa roztwory o różnym stężeniu, następuje samorzutne przenikanie rozpuszczalnika przez membranę w kierunku roztworu o większym stężeniu. Ciśnienie zewnętrzne równoważące przepływ osmotyczny zwane jest ciśnieniem osmotycznym i jest charakterystyczne dla danego roztworu. Jeżeli po stronie roztworu wytworzy się ciśnienie hydrostatyczne przewyższające ciśnienie osmotyczne, rozpuszczalnik będzie przenikał z roztworu bardziej stężonego do rozcieńczonego, a więc w kierunku odwrotnym niż w procesie osmozy naturalnej. Dla tego procesu zaproponowano nazwę odwrócona osmoza. Równolegle stosowana jest czasem nazwa **hiperfiltracja**. Odwrócona osmoza pozwala oddzielić rozpuszczalnik (wodę) od substancji rozpuszczonych nawet o stosunkowo niskiej masie cząsteczkowej, np. sole i cukry. Mechanizm rozdziału ma charakter dyfuzyjny. Ciśnienia robocze stosowane w procesie odwróconej osmozy ze względu na wysoką wartość ciśnień osmotycznych rozdzielanych roztworów są wysokie i wynoszą od 1 do 10 MPa [9, 12].

Proces odwróconej osmozy przebiega przy użyciu membran asymetrycznych, mikroporowatych oraz zwartych [2, 8, 9]. Zazwyczaj są one wykonane z octanu lub innych estrów celulozy oraz poliamidów. Wielkość porów sięga maksymalnie 1 nm, przez co przenika przez nie wyłącznie rozpuszczalnik. Przy tak małej wielkości porów oraz uwzględnieniu przepływu rozpuszczalnika przeciwnie do ciśnienia osmotycz-

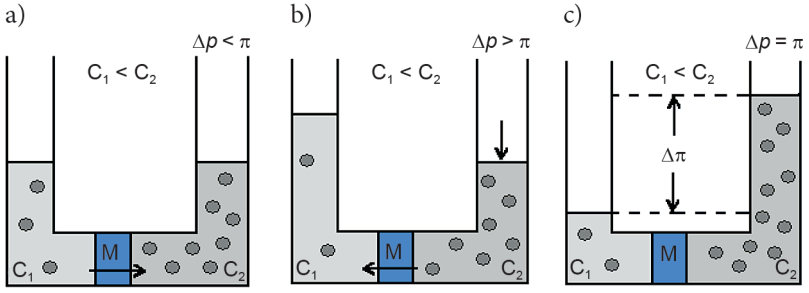
nego, konieczne jest wytworzenie dużej różnicy wartości ciśnień hydrostatycznych – ok. 1–10 MPa. W mechanizmie selektywnego działania membrany do odwróconej osmozy znaczenie ma powinowactwo membrany i składników roztworu, a także szybkość ich transportu w membranie. Składniki, które charakteryzują się większym powinowactwem do membrany rozpuszczają się w niej o wiele łatwiej od składników z mniejszym powinowactwem. Następnie proces transportu składników zachodzi na zasadzie dyfuzji molekularnej, zatem selektywność membran do osmozy odwróconej jest połączeniem procesów rozpuszczalności i dyfuzyjności składników roztworu. Osmoza odwrócona umożliwia rozdział składników o małej masie cząsteczkowej (M < 300), natomiast średnice rozdzielanych cząstek i cząsteczek mogą wynosić od kilku do kilkunastu Å. Cząstki i cząsteczki zatrzymywane na membranie powodują wzrost stężenia po stronie nadawy oraz ciśnienia osmotycznego, a to niweluje siłę procesu. Przepływ permeatu (filtratu) jest możliwy, gdy ciśnienie zewnętrzne (Δp) przewyższy ciśnienie osmotyczne (π).

$$\pi = C \cdot R \cdot T, \tag{6.7}$$

gdzie:

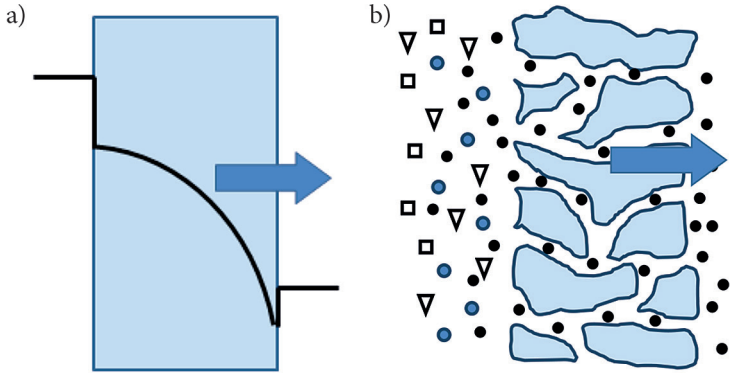
- π – ciśnienie osmotyczne [Pa],
- R – stała gazowa [Pa·dm^3/mol·K],
- T – temperatura absolutna [K],
- C – stężenie substancji rozpuszczonej w roztworze [mol/dm^3].

Stosując odwróconą osmozę, można rozdzielać składniki roztworów do poziomu molekularnego, dlatego osmoza odwrócona jest konkurencyjna względem innych technik separacji. Dodatkowo możliwe jest łączenie jednostek membranowych z tradycyjnymi procesami inżynierii chemicznej, jak wymianą jonową, destylacją czy krystalizacją. Proces osmozy odwróconej znalazł szerokie zastosowanie w odsalaniu wody morskiej, oczyszczaniu ścieków zwłaszcza z fabryk tekstylnych, zatężaniu ścieków zawierających rozpuszczalniki czy w odzyskiwaniu kwasu fosforowego.



Rys. 6.7. Schematy i zasady mechanizmów: a) osmozy naturalnej, b) osmozy odwróconej, c) stan równowagi (C_1 – stężenie nadawy, C_2 – stężenie permeatu, Δp – ciśnienie transmembranowe, $\Delta\pi$ – ciśnienie osmotyczne)

Permeacja jako proces rozróżnia w opisie modelowym metody przenikania cieczy i gazów przez przegrody porowate o różnych stopniach porowatości. W odniesieniu do **permeacji (separacja) gazów** opis zjawiska podkreśla ciśnieniowy charakter techniki membranowej (siłą napędową jest ciśnienie cząstkowe), w której podstawą rozdziału jest wielkość cząsteczki i rozpuszczalność gazu w membranie. Mechanizm permeacji gazów jest ściśle związany z rodzajem stosowanej membrany (rys. 6.8).



Rys. 6.8. Idealne modele membrany: a) membrana rozpuszczalnościowo-dyfuzyjna (osmoza odwrócona, perwaporacja, permeacja gazów), b) membrana porowata (ultrafiltracja, mikrofiltracja, dializa)

Realizacja permeacji przez membrany homogeniczne (nieporowate) uwarunkowana jest szybkością przenikania gazów, a szybkość przenikania zdeterminowana jest przez rozpuszczalność i dyfuzyjność gazu w materiale membrany. Natomiast szybkości przenikania gazu podczas permeacji gazu przez membrany mikroporowate (efuzja molekularna/dyfuzja gazowa) związana jest z przepływem molekularnym (dyfuzja Knudsena). W permeacji gazów w membranach nieporowatych można wyróżnić kilka etapów procesu:

- adsorpcja gazu na powierzchni membrany,
- rozpuszczanie gazu w materiale membrany,
- dyfuzja molekularna gazu przez membranę,
- uwolnienie się gazu na drugiej powierzchni membrany,
- desorpcja gazu z drugiej powierzchni membrany.

Dodatkowo postać gazu podczas przenikania przez membranę może występować pod postaciami:

- cząsteczkowej – przez membrany pochodzenia organicznego,
- atomowej – przez membrany metalowe.

Perwaporacja to technika rozdziału, w której zachodzi przemiana fazowa pierwszego rodzaju połączona z transportem masy przez nieporowatą membranę. Transport masy przez membranę nie jest wywołany zwiększonym ciśnieniem po stronie nadawy, lecz zmniejszoną aktywnością składników po stronie permeatu w postaci

pary. Mechanizm separacji opiera się na zjawiskach rozpuszczania i dyfuzji, w zależności od składnika, który ma zostać usunięty podczas perwaporacji. Jest to proces alternatywny do odwróconej osmozy. W perwaporacji wykorzystuje się membrany o charakterze zarówno hydrofilowym, jak i hydrofobowym o porowatości podobnej do tych stosowanych w procesie osmozy odwróconej (membran litych polimerowych nieporowatych lub membran ceramicznych o średnicy porów poniżej 5 nm) oraz kompozytowej membrany z warstwą aktywną z polimeru elastycznego lub szklistego o grubości warstwy aktywnej od 0,1 do kilku μm. Transport substancji przez membranę odbywa się trójstopniowo. W przypadku membran polimerowych separacja wynika z różnic rozpuszczalności w membranie (selektywna sorpcja – pierwszy etap) oraz różnic w szybkości dyfuzji poszczególnych składników poprzez membranę (drugi etap). Natomiast w trzecim etapie następuje desorpcja substancji w postaci pary po stronie permeatu. Perwaporacja nie wymaga obniżania ciśnienia po stronie permeatu, jednak w celu usprawnienia procesu separacji można sterować ciśnieniem. W porównaniu z osmozą odwróconą siły napędowe uzyskiwane w perwaporacji są zdecydowanie większe. W procesie perwaporacji zachodzi zmiana stanu skupienia rozdzielanego składnika (permeat przechodzi ze stanu ciekłego w gazowy), dlatego należy zwrócić uwagę zarówno na transport masy, jak i transport ciepła w membranie. Ponieważ wraz ze spadkiem temperatury w procesie perwaporacji wyraźnie maleje strumień, dlatego w modułach do separacji metodą perwaporacji stosuje się podgrzewanie. Perwaporację stosuje się w przemyśle do odwadniania rozpuszczalników oraz ich mieszanin, odzyskiwania aromatów w przemyśle spożywczym, obróbce ścieków zawierających związki organiczne, oddzieleniu metanolu od węglowodorów oraz rozdzielaniu izomerów [2, 8, 9, 12].

Dializa to proces permeacyjnego rozdzielania substancji rozpuszczonych w rozpuszczalnikach ciekłych przebiegający pod wpływem różnicy stężeń tych substancji w roztworach oddzielonych membraną (rys. 6.9). Proces separacji napędzany różnicą stężeń, wykorzystujący różnicę szybkości dyfuzji rozdzielanych składników mieszaniny w membranie, nosi nazwę **dializy dyfuzyjnej**. Jest to proces powolny w porównaniu z ciśnieniowymi procesami membranowymi stosowany do substancji wrażliwych na ciśnienie, np. rozdzielania cząstek koloidalnych od małocząsteczkowych. Proces dializy może być realizowany w sposób okresowy lub ciągły/przepływowy. Za pomocą dializy rozdziela się elektrolity oraz wydziela substancje niejonowe z roztworów elektrolitów. W układzie elektrolit–membrana proces trwa do uzyskania równowagi jonowej – równowagi Donnana. **Dializa Donnana** jest techniką membranową, w której za pomocą membran (elektrycznie obojętnych lub jonowymiennych) zachodzi separacja elektrolitów (siłą napędową techniki jest różnica potencjałów chemicznych roztworów rozdzielonych membraną).

W procesie dyfuzji należy wyróżnić **gęstość strumienia molowego** (N_A) składnika A, który można opisać równaniem:

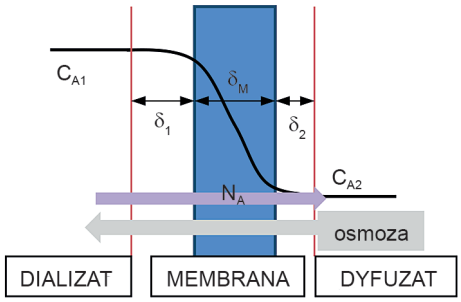
$$N_A = K_A (C_{A1} - C_{A2}), \tag{6.8}$$

Natomiast **współczynnik dialityczny** (K_A) jest parametrem związanym ze **współczynnikiem dyfuzji** (D_A) danego składnika (A) w cieczy oraz drogą strumienia (przy założeniu, że współczynniki dyfuzji molekularnej są stałe w roztworach i membranie):

$$\frac{1}{K_A} = \frac{\delta_1}{D_{A1}} + \frac{\delta_M}{D_{AM}} + \frac{\delta_2}{D_{A2}}, \tag{6.9}$$

Szacunkową wartość sumarycznego **współczynnika wnikania masy** k_C (opisującego wnikanie w obu fazach ciekłych w układzie) można wyznaczyć ze wzoru:

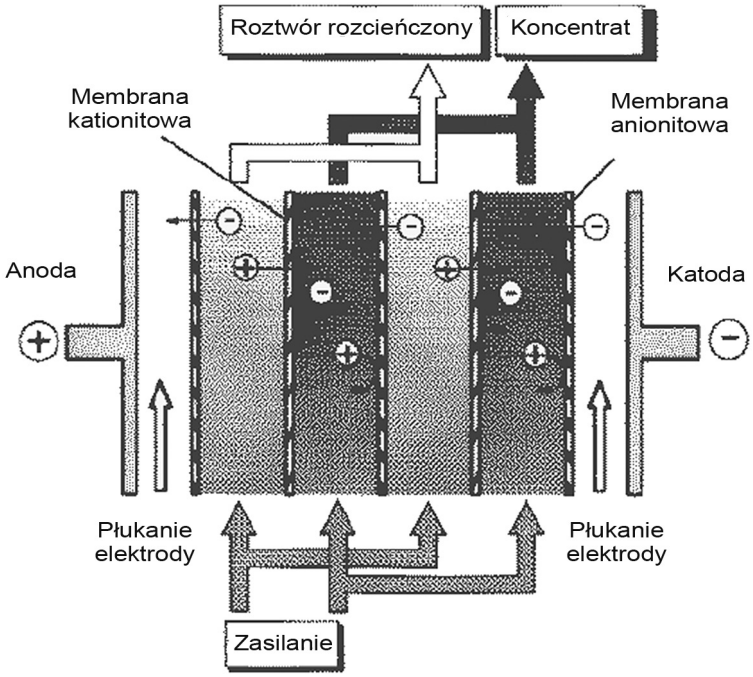
$$k_C = 10^3 D_A, \tag{6.10}$$



Rys. 6.9. Schemat dializy

Proces wnikania masy to przenoszenie substancji z głębi fazy płynnej do powierzchni międzyfazowej (lub odwrotnie), natomiast przenoszenie substancji pomiędzy dwiema fazami przez powierzchnię rozdziału nazywamy procesem przenikania masy.

Elektrodializa jako proces membranowy umożliwia zatężenie lub rozcieńczenie wodnych roztworów naładowanych elektrycznie. Składniki jonowe roztworu ciekłego pod wpływem różnicy potencjałów zewnętrznego pola elektrycznego przenikają przez membranę (rys. 6.10). Elektrodializa wykorzystuje membrany jonoselektywne, które posiadać mogą ładunek zarówno ujemny (przepuszczalne dla kationów – tzw. kationity), jak i dodatni (przepuszczalne dla aninów – tzw. anionity). Jony dodatnie wędrują w stronę ujemnie naładowanej katody, a jony ujemne w stronę dodatnio naładowanej anody. Przenoszenie elektrolitu zachodzi w kierunku od roztworu rozcieńczonego do stężonego. Jeżeli liczby przenoszenia jonów w roztworze oraz w materiale membrany są różne, wówczas prąd elektryczny płynący w kierunku prostopadłym do powierzchni membrany powoduje różnicowanie składów roztworów po obu stronach membrany.



Rys. 6.10. Transport jonów w obrębie membrany jonowymiennej w czasie elektrodializy [9]

Podczas elektrolizy realizowanej przy sile napędowej o natężeniu prądu I ładunek Q, jaki przepływa przez roztwór w czasie t, jest sumą ładunków Q_i, przeniesionych przez wszystkie jony obecne w roztworze, co można zapisać wzorem:

$$Q = \Sigma Q_i = It, \tag{6.11}$$

Ładunek Q_i, jaki jest przenoszony przez jony i-tego rodzaju między elektrodami o powierzchni A, jest proporcjonalny do liczby jonów w jednostce objętości (stężenia C_i, przy założeniu całkowitej dysocjacji elektrolitu), do ładunku jonu z_i oraz ruchliwości u_i. Stosunek ładunku elektrycznego Q_i przeniesionego przez dany rodzaj jonów do sumarycznego ładunku Q, jaki przepłynął przez roztwór, nosi nazwę liczby przenoszenia jonu (t_i):

$$t_i = \frac{Q_i}{Q} = \frac{C_i |z_i| u_i}{\Sigma_i C_i |z_i| u_i} \tag{6.12}$$

Membrany stosowane do elektrodializy powinny wykazywać dużą selektywność w stosunku do jednego rodzaju jonów, małą oporność elektryczną, dużą odporność mechaniczną oraz chemiczną. Metoda elektrodializy stosowana jest głównie w przemyśle chemicznym i petrochemicznym do odsalania średnich stężeń soli oraz w przemyśle spożywczym przy odsalaniu serwatki pozbawionej protein czy odkwaszaniu soków owocowych.

Reasumując, **skuteczność/jakość separowania** z wykorzystaniem technik membranowych uzależniona jest od rozmiaru cząsteczek (od 10 μm do Å), stanu skupienia (zawiesiny, emulsje, koloidy, roztwory rzeczywiste, mieszaniny gazów), ładunku związku (obojętne, amfoteryczne, jonowe). Duże cząstki oddzielane są technikami filtracji membranowej. Zakres rozmiaru cząstek obejmuje cząstki przenikające przez tradycyjne filtry z tkanin i włóknin oraz bibuły filtracyjne. Poniżej $d < 10$ μm mieszczą się cząstki pyłów, dymów, emulsji olejowych, jak również grzyby bakterie i drożdże. Ponieważ cząstki koloidalne mają rozmiary mniejsze, dlatego w ich przypadku uzasadnione jest podawanie wartości masy molowej, (wymiarowo jest to przedział d_p od 2 do 100 nm i masy molowej poniżej $<1{\cdot}10^{-6}$, co zbliża je do zakresu mikroskopii elektronowej), a stosowane dla nich techniki rozdziału noszą nazwę ultrafiltracji. Natomiast membrany o średnicach $d_p < 2$ nm przeznaczone są do procesów nanofiltracji. Wszystkie wymienione techniki membranowe (mikro-, ultra- i nanofiltracji) opierają się na zasadzie efektu sitowego, w którym cząstki o średnicy większej od średnicy porów są zatrzymywane na membranie. Cząstki mniejsze, których średnica mierzona jest w Å (1 Å= $1{\cdot}10^{-10}$ m) o masie molowej poniżej 1 000 Da wpisują się w zakres roztworów rzeczywistych (ciekłych i gazowych) o rozdrobnieniu materii na poziomie molekularnym. Podstawą rozdziału w odniesieniu do związków gazowych są różnice w ich rozpuszczalności, szybkości dyfuzji, ładunku elektrycznego lub zdolności reagowania.

6.5. METODY OTRZYMYWANIA MEMBRAN

Membrany polimerowe wytwarza się zarówno z polimerów hydrofobowych, jak i hydrofilowych. Membrany ceramiczne produkuje się głównie z tlenku glinu oraz dwutlenku cyrkonu. Do wytwarzania membran nieorganicznych stosuje się szkło, metale (pallad, wolfram) oraz materiały spiekane z węglem.

Na przestrzeni lat opracowano wiele metod formowania membran, dzięki którym można zaprojektować membrany wymagane dla danego procesu membranowego. Wśród nich można wymienić metody:

- spiekania,
- rozciągu,
- radiacyjne,
- inwersji faz.

Metoda spiekania polega na ogrzaniu materiału powyżej temperatury topnienia, a następnie gwałtownym chłodzeniu. Uzyskane w ten sposób membrany charakteryzują się dużym rozrzutem wielkości porów o średnicy porów $d > 1$ μm. **Metoda rozciągu** stosowana w wytwarzaniu membran polimerowych polega na mechanicznym naprężeniu materiału polimerowego w dwóch prostopadłych do siebie kierunkach, co pozwala uzyskać pory o rozmiarach od 0,2 do 20 μm. **Metoda radiacyjna**

bazuje na napromieniowywaniu skoligowanym promieniowaniem materiału polimerowego. Pozwala uzyskać pory z zakresu od 0,01 do 12 μm. **Metoda inwersji faz**, obecnie najczęściej stosowana, polega na rozpuszczeniu polimeru w rozpuszczalniku, a następnie powolnym odparowaniu tego rozpuszczalnika w ilości pozwalającej utworzyć odwróconą fazę – w polimerze rozpuszczony jest rozpuszczalnik. Stosuje się również metodę, w której żeluje się układ polimer rozpuszczony w rozpuszczalniku przez dodatek nierozpuszczalnika (różne rozmiary porów w zakresie od 0,02 do 20 μm) [10, 11]. Materiałami stosowanymi w tej metodzie są m.in. octan celulozy, poliamidy i polisulfony. Mechanizm wytwarzania membran metodą inwersji faz wykorzystuje lukę mieszalności w układzie trójskładnikowym: polimer–rozpuszczalnik–środek strącający. Pierwszy etap preparatyki obejmuje przygotowanie homogenicznego roztworu polimeru o określonej lepkości. Następnie metodą odlewania (poprzez wylewanie na cienkie płyty szklane lub stalowe) otrzymuje się cienki film. Po odparowaniu części rozpuszczalnika następuje zatężenie powierzchni polimerowego filmu i generowanie warstwy aktywnej. Ostatnim z etapów jest wytrącanie membrany, w tzw. kąpieli strącającej (koagulującej). Istotnymi parametrami wpływającymi na strukturę otrzymanej membrany są skład roztworu polimeru i kinetyka strącania, tzn. szybkość z jaką odparowywany jest rozpuszczalnik. Wraz ze wzrostem zawartości polimeru wzrasta gęstość struktury otrzymanego produktu, natomiast wraz z wydłużaniem czasu odparowywania rozpuszczalnika zwiększa się stopień porowatości membrany. Dlatego w procesie wytwarzania membran istotny jest właściwy dobór zarówno polimeru i jego stężenia, jak i rozpuszczalnika. W wyniku inwersji faz otrzymuje się także asymetryczne membrany, których warstwa nośna i warstwa mikroporowata składają się z co najmniej dwóch różnych materiałów. Tego typu membrany nazywane są **membranami kompozytowymi**. Nanoszenie warstwy aktywnej może przebiegać poprzez zanurzenie warstwy nośnej w roztworze innego polimeru lub przez natryskiwanie roztworu na nośnik i następujące po tym suszenie albo przez polimeryzację na powierzchni granicznej ewentualnie w przebiegu polimeryzacji plazmowej [8, 10]. Odmianę membran kompozytowych stanowią membrany dynamiczne. Powstają one poprzez przepuszczanie przez porowate rury nośne roztworu zawierającego składniki membranotwórcze (tzw. warstwę aktywną).

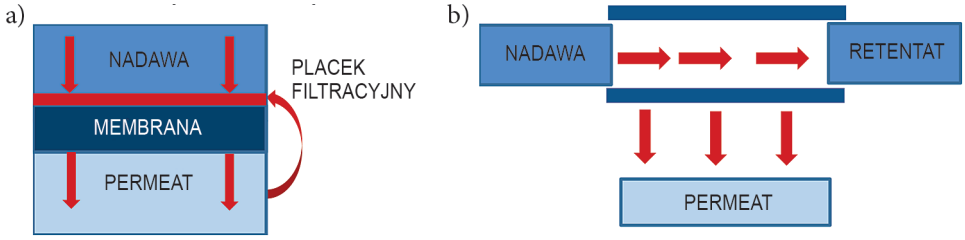
Dodatkowo można wyróżnić otrzymywanie membran **metodą adsorpcji składników aktywnych** na powierzchni porowatej rury (nośnika). W ten sposób otrzymuje się membrany dynamiczne nieorganiczne, tj. węglowe, szklane oraz ceramiczne. Na składniki do utworzenia warstwy aktywnej stosuje się polielektrolity organiczne lub uwodnione tlenki metali w formie koloidalnej [10]. Inną metodą wytwarzania membran jest metoda **elektroprzędzenia**, która jest procesem otrzymywania nanowłókien ze stopionych polimerów albo ich roztworów za pomocą pola elektrycznego. Dzięki temu procesowi możliwe jest otrzymywanie nanowłókien o różnej morfologii – porowatych, płaskich, wstążkowych lub też rozgałęzionych i wydrążonych. Tak przygotowane nanowłókna wykorzystywane są w tworzeniu membran mających

zastosowanie w systemach uwalniania leków czy inżynierii tkankowej. Wykorzystuje się również metody hybrydowe. Otrzymywanie membran nieorganicznych odbywa się w wyniku **prasowania izostatycznego**, **wytłaczania** lub **odlewania masy**, a następnie **spiekania proszków** o zaprojektowanym uziarnieniu. Uzyskane membrany nieorganiczne mają strukturę asymetryczną wielowarstwową. Warstwa nośna może mieć grubość kilku milimetrów, warstwa pośrednia charakteryzuje się mikroporowatością na poziomie 50–100 μm, a warstwa właściwa (rozdzielcza), zawierająca nanopory, posiada grubość do 1 μm. Po wysuszaniu warstwę poddaje się wypalaniu w celu osiągnięcia warstwy utlenionej. Prowadzenie dalszej obróbki cieplnej wpływa na kształt i strukturę membrany nieorganicznej. Membrany nieorganiczne cechuje odporność na wysoką temperaturę, odporność chemiczna, trwałość długoterminowa, kontrolowany rozmiar średnicy porów i poziom porowatości. Membrany węglowe otrzymywane są dwiema metodami. Jedna z metod bazuje na formowaniu membran rurowych z past grafitowych, pokrywanych w kolejnym etapie drobnymi cząstkami, poprzez szlamowanie grafitu SiC, ZrO_2. Drugą metodą jest osadzanie drobnych cząstek węgla na tkaninowych kształtkach węglowych. Membrany szklane wytwarzane są w procesie termicznego rozdziału na dwie fazy homogenicznego stopu szkła złożonego z SiO_2, B_2O_3 i Na_2O. Jedna z faz, nierozpuszczalna w kwasach organicznych, składa się głównie SiO_2, natomiast faza druga może zostać usunięta z heterogenicznej struktury poprzez działanie na nią kwasami nieorganicznymi. Strukturę membran szklanych można modyfikować poprzez zmianę składu stopu, czas wypalania oraz temperaturę wytopu. Najpopularniejszą formą membran szklanych są szklane rurki stosowane w modułach rurowych lub kapilarnych.

Otrzymywanie membran jonoselektywnych możliwe jest na drodze **syntezy**, w wyniku której najczęściej otrzymuje się membranę dwuskładnikową. Jeden składnik, zazwyczaj polimer organiczny, tj. polichlorek winylu lub alkohol poliwinylowy, odpowiada za stabilność właściwości mechanicznych membrany. Zadaniem drugiego składnika jest transport jonów. Membrany homogeniczne wytwarza się na drodze polimeryzacji lub polikondensacji funkcjonalnych monomerów (np. polimeryzacji diwinylobenzenu lub styrenu) i ich sulfonowania dla uzyskania membran kationowymiennych lub aminowania w celu otrzymania membran anionowymiennych. Membrany heterogeniczne wytwarza się przez rozpuszczenie i wprasowanie suchej żywicy razem z granulatem polimeru lub przez dyspersję żywicy jonowymiennej w roztworze polimeru [9].

6.6. TYPY MODUŁÓW MEMBRANOWYCH

Procesy rozdzielania membranowego są prowadzone w tzw. modułach membranowych zapewniających przepływ separowanej mieszaniny w kierunku prostopadłym lub równoległym do powierzchni membrany (rys. 6.11). Moduł membranowy jest najmniejszym powtarzalnym integralnym elementem instalacji membranowej.



Rys. 6.11. Tryby pracy układów membranowych: a) *dead-end* (jednokierunkowy) tryb pracy, b) *cross-flow* (krzyżowy)

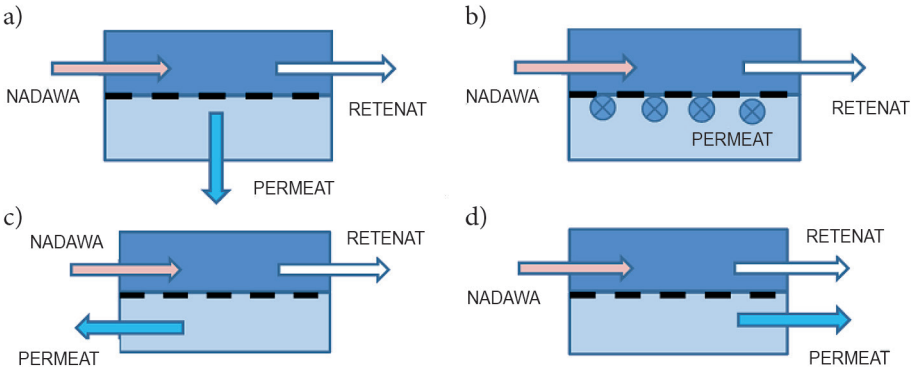
Oprócz wymagań stawianych samym membranom odnośnie do przepuszczalności i selektywności względem składnika, moduł membranowy powinien charakteryzować się następującymi cechami:

- zapewnić prawidłowe warunki hydrodynamiczne, aby w sposób ciągły usuwać składniki zatrzymywane na membranie, uzyskując w ten sposób kontrolę nad procesem oraz wysoką jego wydajność,
- zapewnić szczelność pomiędzy rozdzielanymi strumieniami permeatu i koncentratu,
- posiadać duży stosunek powierzchni membran do objętości modułu,
- zapewnić krótki czas przebywania roztworu,
- posiadać łatwość mycia i sterylizacji,
- niskimi kosztami eksploatacji,
- dużą odpornością membran na działanie czynników chemicznych, fizycznych i biologicznych,
- niskimi kosztami własnymi.

Konfiguracje modułów membranowych opierają się na dwóch podstawowych formach membrany: płaskiej i rurowej. Istnieje wiele rozwiązań modułów membranowych, np. płytowe, płytowo-ramowe, spiralne, rurowe czy kapilarne. **Moduły płytowe** charakteryzuje rozdzielenie sąsiednich membran arkuszami z materiału porowatego pełniącego funkcję ochronną dla membrany, umożliwiając przepływ permeatu. Moduły płytowe charakteryzują się prostą konstrukcją, małą gęstością upakowania oraz stratami ciśnienia przy zawracaniu przepływu. **Moduły spiralne** cechuje rozdzielenie materiałem porowatym membran nawiniętych współosiowo na rurkę o niedużej średnicy. Moduły spiralne, podobnie jak płytowe, mają prostą konstrukcję, lecz dużą gęstość upakowania oraz cechują je trudności z czyszczeniem. **Moduły**

rurowe mają postać membrany nawiniętej na rurkę o małej średnicy. **Moduły kapilarne** to połączenie ze sobą wiele mikrorurek wykonanych z membrany. Charakteryzują się dużą wytrzymałością mechaniczną, stosowane są głównie w dializie.

We wszystkich przedstawionych typach modułów można zastosować jeden z czterech podstawowych wariantów prowadzenia strumieni (rys. 6.12). Porównanie wybranych parametrów modułów rurowych zaprezentowano w tab. 6.7. Zestawienie wad oraz zalet modułów membranowych przedstawiono w tab. 6.8.



Rys. 6.12. Sposoby prowadzenia strumieni w modułach membranowych: a) odpływ swobodny, b) prąd krzyżowy, c) przeciwprąd, d) współprąd

Tabela 6.7

Wybrane parametry modułów opartych na konfiguracji rurowej

Konfiguracja	Średnica [mm]	Gęstość upakowania [m^2/m^3]
Rurowa	>10,0	360[1]
Kapilarna	0,5–10,0	3600[2]
Włókna kanalikowe	<0,5	36000[3]

[1] przy średnicy rury 5 mm,
[2] przy średnicy rury 0,5 mm,
[3] przy średnicy rury 0,05 mm.

Tabela 6.8

Wady i zatety modułów membranowych

Typ modułu	Powierzchnia właściwa [m^2/m^3]	Zalety	Wady	Zastosowanie
Płytowy	400–600	– małe zatrzymanie płynu na jednostkę powierzchni membrany; – łatwa wymiana membrany uszkodzonej	– cena; – trudności z czyszczeniem	– ultrafiltracja; – osmoza odwrócona; – perwaporacja

Rurowy	<300	– łatwa wymiana; – łatwe oczyszczanie	– duże zatrzymanie; – koszty	– ultrafiltracja z dużą zawartością cząstek stałych
Spiralny	800-1000	– małe zatrzymanie	– trudne czyszczenie	– ultrafiltracja; – perwaporacja; – permeacja gazów
Kapilarny	600–1200 >10 000	– duża zwartość budowy; – małe zatrzymanie; – niskie koszty	– trudne oczyszczanie	– osmoza odwrócona; – ultrafiltracja; – dializa; – permeacja gazów

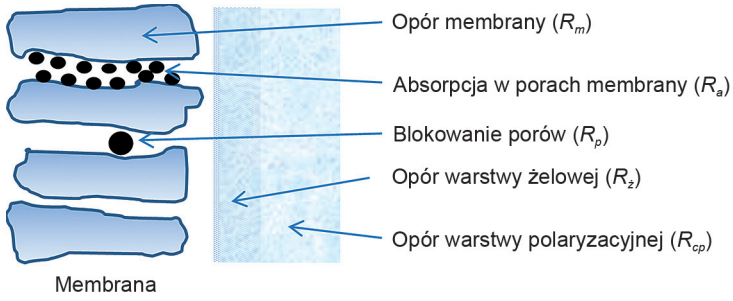
6.7. ZJAWISKA ZAKŁÓCAJĄCE PROCESY MEMBRANOWE

Rozważając układ modelowy technik separacji, analizuje się opory membran. Membrany charakteryzują się różną szybkością transportu poszczególnych składników roztworu, a w pewnych przypadkach nawet całkowicie je zatrzymują. Zatrzymanie składników roztworu przez membranę odbywa się w procesie zatężania, w efekcie którego w pobliżu powierzchni membrany formuje się warstwa substancji rozpuszczonej o wyższym stężeniu, zwana **warstwą polaryzacyjną**.

Zwiększenie oporów membrany (rys. 6.13) wpływa na spadek strumienia permeatu w czasie (zmniejszony zostaje efekt rozdzielenia), poziom tego spadku jest różny dla różnych procesów membranowych. Jako przyczyny tego zjawiska wymienia się:

- **polaryzację stężeniową**, która powoduje formowanie się w bezpośrednim sąsiedztwie membrany warstewki przyściennej (warstwy granicznej) roztworu o stężeniu przewyższającym średnie stężenie roztworu poddawanego filtracji. Roztwór zasilający jest zubożony w dominujący składnik przenikający przez membranę i wzbogacony w zatrzymywany składnik. Wywołuje to niekorzystne obniżenie szybkości procesu oraz zmianę własności separacyjnych membrany;
- **adsorpcję substancji** na powierzchni membrany wywołaną przez powinowactwo materiału membrany i substancji występujących w roztworze;
- **formowanie warstwy** żelowej na powierzchni membrany; gdy rozpuszczalność składników roztworu filtrowanego w warstwie polaryzacyjnej jest przekroczona, warstwa żelowa występuje pomiędzy membraną a roztworem, generując wtórną membranę wywołującą opór wobec transportowanych składników, stężenie warstwy żelowej ma wartość stałą, niezależną od stężenia roztworu, warunków prowadzenia procesu i rodzaju membrany;
- **zatykanie porów** membrany stałymi mikrozanieczyszczeniami wywołane przez odkładanie się substancji (cząstki zawieszone, koloidy, rozpuszczalne

związki wielkocząsteczkowe, sole) na powierzchni membrany i/lub w porach, ograniczające jej przepuszczalność;
- **deformację porów** pod wpływem ciśnienia.



Rys. 6.13. Schemat składowych oporu wpływających na transport masy przez membranę

Spadku efektu rozdzielenia nie da się całkowicie wyeliminować, można natomiast wprowadzić kilka zabiegów pomocniczych, takich jak wzbudzenie przepływu turbulentnego nadawy (poprzez intensywne mieszanie roztworu) lub wprowadzenie strumieni o małych gęstościach rozpuszczalnika. Bezpośrednio z polaryzacją stężeniową związane jest kolejne zjawisko tworzenia warstwy żelowej na powierzchni membrany prowadzące do powstawanie tzw. placka, szczególnie w przypadkach mikrofiltracji i ultrafiltracji, gdzie ważny problem stanowią zanieczyszczenia mikrobiologiczne w postaci bakterii, wirusów czy grzybów. Zanieczyszczenia tego typu są źródłem zakażeń i chorób. Dodatkowo formowanie się pokrywających membranę warstw, tzw. *fouling*, przez zawieszone, koloidalne rozpuszczone lub rozrastające się biologicznie substancje prowadzi do zwiększenia oporów membrany [8, 11, 12]. Do zjawisk składowych foulingu zalicza się:
- formowanie żelu – najbardziej podatne na tworzenie warstwy żelowej są substancje humusowe, fenole, pestycydy, makrocząsteczki (np. białka, węglowodany, serwatka, oleje) oraz substancje powierzchniowo czynne;
- strącanie (scaling) – do najczęściej spotykanych w formie strąceniowej należą związki Ca^{2+}, Mg^{2+}, CO_3^{2-}, SO_4^{2-}, krzemionka oraz sole Fe^{3+};
- zatykanie – powodowane jest przez drobno zdyspergowane lub zawieszone cząstki stałe oraz koloidy organiczne i nieorganiczne;
- biofouling – wywoływany przez bakterie, wirusy oraz fragmenty ścian komórkowych; powstająca błona powoduje zaślepienie porów membrany;
- degradacja membrany – wywołana na skutek działania mikroorganizmów (membrany celulozowe) lub czynników chemicznych (np. chloru, chlorowcopochodnych, fenolu), które niszczą strukturę membrany.

Powstawanie biofilmu na powierzchni membrany, tzw. *biofouling*, znacząco wpływa na zmniejszenie efektywności separacji membranowej. Zjawiska te są niebez-

pieczne zarówno w przemyśle spożywczym, jak i farmaceutycznym oraz w medycynie. Biofouling prowadzi do zaburzenia w ciśnieniowych procesach membranowych stosowanych do oczyszczania cieczy. Większość polimerów wykorzystywana do wytwarzania membran porowatych ma charakter hydrofobowy, co determinuje ich podatność na sorpcję zanieczyszczeń organicznych [8, 12].

Zanieczyszczania membran podczas separacji białek wynikają z adsorpcji protein na powierzchni i ścianach porów membrany, co wywołuje wzrost oporu przepływu hydraulicznego, zmniejszenie strumienia filtracji i spadek efektywności, a to podnosi koszty procesów odzyskiwania białek. Zmniejszenie warstwy depozytu na membranie poprzez sfunkcjonalizowanie jej powierzchni i nadanie jej właściwości bakteriobójczych lub bakteriostatycznych może zmniejszyc zjawisko biofoulingu. W celu zmniejszenia biofoulingu stosuje również tzw. filtrację krzyżową, czyli stałe lub okresowe zmywanie warstwy żelowej [12]. **Modyfikacja membran w celu nadania jej właściwości antyfoulingowych** polega na zmianie właściwości powierzchniowych, tak aby zapobiegać zjawiskom adsorpcji i adhezji niepożądanych substancji na powierzchni membrany. Najczęściej stosowane są dwa alternatywne podejścia obróbki chemicznej materiałów, z których produkowane są membrany. Metoda tzw. **zaszczepiania do** polega na przyłączeniu polimerów do warstwy podstawowej. Natomiast metoda **zaszczepienie z** to zainicjowana polimeryzacja monomerów przebiegająca bezpośrednio na powierzchni membrany. Metody te pozwalają na wytwarzanie powierzchni bakteriobójczych lub bakteriostatycznych, nie dopuszczając do osadzania się na powierzchni membrany bakterii. W celu nadania tych cech warstwie wierzchniej materiał powinien wykazywać minimalną adhezję żywych drobnoustrojów z otoczenia do powierzchni membrany. Zrealizować to można poprzez odpychanie lub zabijanie komórek bakteryjnych.

Odpychanie może być realizowane w przebiegu kilku mechanizmów:

- **odpychania sferycznego** w wyniku reakcji chemicznej lub tylko oddziaływań odpychających (gdy atomy zbliżają się do siebie na odległość mniejszą od promieni sfer elektrolitów),
- **odpychania elektrostatycznego**, czyli oddziaływania ciał posiadających jednakowy ładunek elektryczny (drobnoustroje wraz z powierzchnią membrany posiadają ładunek jednoimienny wskutek czego następuje ich wzajemne odpychanie),
- **niskiej energii powierzchniowej**, która zmniejsza siłę adhezji (zjawisko to związane jest wzrostem hydrofobowości powierzchni, co utrudnia drobnoustrojom przyczepianie się do powierzchni zmodyfikowanego materiału).

Zabijanie/unieszkodliwianie komórek bakteryjnych może być to spowodowane przez:

- **uwalnianie** środków bakteriobójczych z powierzchni membrany, np. przez formowanie na powierzchni membrany reaktywnych form tlenu (ROS –

reactive oxygen species) za pomocą fotokatalitycznego ditlenku tytanu, tlenku cynku;
- **biocydy**, które są aktywowane podczas kontaktu z bakterią (powłoki na bazie polimerów uwalniających biocydy często zmieniają ich właściwości powierzchniowe po wyzwoleniu środka bakteriobójczego, np. nanocząstki srebra).

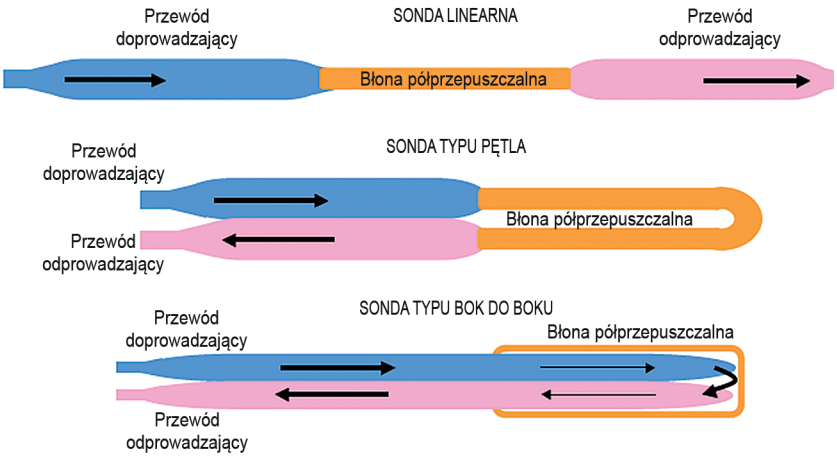
Jeśli polimery są rozpuszczalne w wodzie lub hydrofilowe, to powierzchnia może odpychać martwe komórki drobnoustrojów i powodować odświeżanie biofilmu. Przykładem może być hydrożel używany do pokrywania implantów składający się głównie z poli(alkoholu winylowego), kopolimeru PEG lub poli(kwasu akrylowego). Umieszczanie w hydrożelu antybiotyków lub biocydów sprawiają, że pokrycie jest jeszcze efektywniejsze.

6.8. WYBRANE ZASTOSOWANIA MEMBRAN POLIMEROWYCH W MEDYCYNIE

Do najpopularniejszych i zarazem najszerzej opisywanych zastosowań membran oraz technik membranowych w medycynie zaliczyć można obszar związany z implantologią sztucznych narządów, tj. sztuczna nerka czy sztuczne naczynia krwionośne. W niniejszym rozdziale przybliżone zostaną zagadnienia mające szerokie zastosowanie w różnych dziedzinach medycyny.

Mikrodializa, czyli technika pozwalająca na kontrolowanie stężenia substancji w tkance żywej, jest jedną z technik membranowych rozwijaną na potrzeby zastosowań medycznych [5]. Konwencjonalne badanie homeostazy organizmu, jak i jej zaburzeń, opiera się głównie na pomiarach stężeń substancji (substratów i metabolitów) oraz zmian ich wartości zachodzących w różnych stanach klinicznych i pod wpływem innych związków chemicznych w oparciu o analizę próbki krwi. Mikrodializa daje możliwość wykorzystania pozostałych płynów ustrojowych/pozakomórkowych do oceny stężenia substancji chemicznych bezpośrednio w tkankach. Podstawowym elementem wykorzystywanym w mikrodializie jest sonda mikrodializacyjna z membraną pełniącą funkcję błony półprzepuszczalnej. Sondy mikrodializacyjne dedykowane są do różnych tkanek i narządów, np. mięśni szkieletowych, podskórnej tkanki tłuszczowej, tkanek (płaty skórne) i narządów przeszczepianych, ścięgien, skóry, gruczołu sutkowego, serca, płuc, jamy otrzewnowej i jelit oraz żyły udowej. Zasadniczą częścią sondy jest błona półprzepuszczalna. Z sondą połączone są dwa kanały: doprowadzający (przewodzący perfuzat) i odprowadzający (którym przepływa dializat). Wyróżnia się następujące typy sond (rys. 6.14):
- z różnymi miejscami wejścia i wyjścia z tkanki; linearne i typu *shunt*,

- z jednym miejscem wejścia i wyjścia – wchodzące do tkanki i wychodzące z niej w jednym punkcie; typu pętla – *loop*, bok do boku – *side by side*, koncentryczne – *concentric*;



Rys. 6.14. Typy sond stosowanych w mikrodializie wraz z konfiguracją błon półprzepuszczalnych [5]

Skład płynu perfuzyjnego do mikrodializy zbliżony jest stężeniem do podstawowych elektrolitów płynu pozakomórkowego tkanki, do której wprowadza się sondę (mózg, mięśnie, tkanka podskórna, wątroba itp.). Przykładowo płyn stosowany w neurochirurgii ma skład zbliżony do płynu mózgowo-rdzeniowego. **Substancje monitorowane poprzez mikrodializę** oznaczane w warunkach klinicznych w płynie pozakomórkowym to glukoza, markery niedokrwienia i metabolizmu beztlenowego (mleczany, pirogroniany oraz obliczany stosunek mleczanów do pirogronianów) oraz glicerol jako wskaźnik uszkodzenia błony komórkowej komórek nerwowych i aktywności układu współczulnego. Pozostałe możliwe do oznaczenia substancje to aminokwasy o potencjalnym działaniu neurotoksycznym (glutaminian, aspartanian) czy też endogenny produkt metabolizmu (mocznik). Możliwości jakie daje mikrodializa powodują, że wykorzystuje się ją:

- w neurochirurgii do monitorowania zmian w metabolizmie neuronów,
- w monitorowaniu konsekwencji biochemicznych niedokrwienia i niedotlenienia tkanek,
- w badaniach nad przemianami energetycznymi w tkankach poddawanych skrajnemu wysiłkowi.

Kolejnym obszarem wykorzystywania procesów membranowych w medycynie jest zaopatrzenie ran i blizn [4, 6]. Współczesne **materiały opatrunkowe**, poza ich podstawową rolą jaką jest ochrona rany przed środowiskiem zewnętrznym, wspierają również proces zdrowienia i regeneracji uszkodzonej tkanki. Materiały wykorzystywane do tego celu są wytwarzane metodą elektroprzędzenia, która umożliwia spełnie-

nie takich wymagań opatrunku, jak duża przepuszczalność dla gazów, bariera przed patogenami oraz przed dehydratacją uszkodzonej tkanki. Powinny zatem cechować się dużą porowatością przy jednoczesnym zachowaniu dobrej bariery dla różnych drobnoustrojów. Dzięki kontroli odparowywania wody oraz możliwości doprowadzania cieczy i bardzo dobrej przepuszczalności powietrza, takie membrany stanowią dobry fundament dla regenerujących się tkanek skórnych [6]. Membrany stosowane w regeneracji skóry powinny stanowić także dobrą podstawę dla fibroblastów. W celu uzyskania takiej właściwości stosuje się kompozyty polikaprolaktonu z dodatkiem kolagenu. Również membrany chitozanowe otrzymywane metodą inwersji faz lub w reakcji z fosforanami (trifosforanem sodu) mogą być potencjalnymi materiałami opatrunkowymi. Membrany te charakteryzują się stosunkowo dużą wytrzymałością mechaniczną (od 0,2 do 2 N/mm^2). Zawierają w swojej strukturze wodę o różnym charakterze; wodę swobodną wypełniającą pory oraz wodę częściowo lub całkowicie związaną z polimerem. Są nietoksyczne. Wykazują własności bakteriostatyczne. Membrany chitozanowe stanowić mogą również materiał do separacji białek osocza. Granica odcięcia dla membran płaskich oznaczona na podstawie separacji dekstanu wynosi około 30 kDa [7]. Hydrożelowe membrany mogą również stanowić nośnik do kontrolowanego uwalniania środków farmakologicznych, a nanowłókna, z których tworzy się taką membranę, powstają w procesie elektroprzędzenia z mieszaniny roztworu polimeru z lekiem. O sposobie uwalniania leku przez membranę decyduje odpowiednie dozowanie ilości leku, odpowiednia dystrybucja cząsteczek leku w ich objętości, a także rodzaj materiału włókien i ich wymiary [1, 3, 6].

Zjawiska membranowe są ważne w interdyscyplinarnym obszarze z pogranicza farmakologii i implantologii w **systemach transportowania**, **uwalniania** i **dozowania leków**. W procesach dostarczania leków mianem systemu terapeutycznego określa się urządzenie lub postać leku dozującą lub uwalniającą substancję leczniczą z zaprojektowaną, kontrolowaną szybkością. Szybkość dozowania lub uwalniania leku w systemach terapeutycznych jest niezależna od stężenia substancji leczniczej pozostającej w systemie. Podstawowe elementy systemu terapeutycznego to zbiornik substancji leczniczej, element kontrolujący uwalnianie i źródło siły uwalniającej lek. Rozróżnia się kilka systemów terapeutycznych, tj. przezskórne/transdermalne oraz doustne. **Transdermalne systemy** terapeutyczne mają budowę kilkuwarstwowych plastrów zawierających jedną lub kilka substancji leczniczych. Umieszczane są na skórze w postaci samoprzylepnego plastra, z którego substancja lecznicza migruje do krążenia ogólnego. W celu zwiększenia przenikania przez skórę wprowadza się promotory wchłaniania, które odwracalnie zmieniają strukturę warstwy rogowej naskórka. Wyróżnia się systemy membranowe (zbiornikowe), matrycowe oraz mikrozbiornikowe. **System membranowy** pomiędzy zewnętrzną i wewnętrzną warstwą membrany posiada zbiornik wypełniony roztworem lub zawiesiną substancji leczniczej. Sama membrana wykonana jest z polimeru (np. kopolimery octanu winylu i etylenu lub metakrylany), a jej zadaniem jest regulowanie szybkości uwalniania

substancji leczniczej. Szybkość uwalniania leku jest regulowana przepuszczalnością membrany oraz składem fazy rozpraszającej w zbiorniku. **Systemy matrycowe** nie posiadają membrany, a lek jest homogennie rozproszony w stałej matrycy, którą stanowią hydro- lub lipofilowe polimery, np. silikony czy poliakrylany. **Systemy mikrozbiornikowe** stanowią formę pośrednią między systemami membranowymi i matrycowymi, w których matrycę stanowi lipofilowy polimer, z rozproszoną w postaci mikrozbiorników fazą hydrofilową połączoną z substancją leczniczą. W tego typu rozwiązanych szybkość uwalniania zależy od współczynnika podziału mikrozbiornik/matryca oraz od szybkości dyfuzji z matrycy [14].

LITERATURA

[1] Bialik K., Pielichowski K., *Polimerowe opatrunki hydrożelowe dla zastosowań biomedycznych*, Czasopismo Techniczne, z. 10/2011.

[2] Bodzek M., Bohdziewicz J., Konieczny K., *Techniki membranowe w ochronie środowiska*, Wyd. Politechniki Śląskiej, Gliwice 1997.

[3] Gosk J., *Materiały zastępcze skóry – teraźniejszość i przyszłość*, Polim. Med. 2012, 42, 2, 109–114.

[4] Karpiński R., Górniak B., Maksymiuk J., *Biomedyczne zastosowania polimerów – materiały opatrunkowe*, [w:] *Nowoczesne trendy w medycynie*, pod red. M. Olszówka, K. Maciąg, Lublin 2015.

[5] Maruniak-Chudek I., Świetliński J., *Mikrodializa – zastosowanie metody w badaniach eksperymentalnych i klinicznych zaburzeń metabolizmu tkanek*, Postepy Hig Med Dosw. (online, data dostępu 04.05.2020), 2007; 61: 384–402.

[6] Michniowski A., Szyszkowska A., Galas D., *Aplikacje materiałów polimerowych w medycynie*, [w:] *Nowoczesne trendy w medycynie*, pod red. M. Olszówka, K. Maciąg, Lublin 2015.

[7] Modrzejewska Z., *Formy chitozanowe do zastosowań w inżynierii biomedyczne*, Inż. Ap. Chem. 2011, 50, 5, 74–75.

[8] Narębska A. (red.), *Membrany i membranowe techniki rozdziału*, Tempus Projekt JEN-04720PL, UMK, Toruń 1997.

[9] Rautenbach R., *Procesy membranowe*, WNT, 1996.

[10] Selecki A. Gawroński R., *Podstawy projektowania wybranych procesów rozdzielania mieszanin*, WNT, 1998.

[11] Szaniawska D., Kuca M., *Fouling membran ceramicznych w procesie ultrafiltracji roztworów białka i chlorku sodu*, Inż. Ap. Chem. 2010, 49, 3, 109–110.

[12] Wódzki R., *Membrany teoria i praktyka*, Fundacja Rozwoju Wydziału Chemii, UMK, Toruń 2003.

[13] www.wigo.pl/artyluly/ciśnieniowe-procesy-membranowr-mikrofiltracja-uf-nano-od-os
[14] https://biotechnologia.pl/technologie/systemy-terapeutyczne-w-technologii-postaci-leku-cz-1,18619

7. WYROBY MEDYCZNE – KLASYFIKACJA, PROCEDURY, BADANIA

7.1. WPROWADZENIE

Procedury wprowadzania do obrotu, udostępniania na rynku lub wprowadzania do używania w Unii Europejskiej wyrobów medycznych regulowane są w dyrektywach Unii Europejskiej. Dyrektywy zawierają wytyczne określające warunki wprowadzania wyrobów o wymaganej jakości na rynek, procedury oceny zgodności i nadawania znaku CE, regulacje prawne dotyczące badań klinicznych z użyciem wyrobów medycznych i wymagania zasadnicze dotyczące wyrobów. Obowiązek oceny, czy dany wyrób podlega jednej z dyrektyw ciąży na wytwórcy.

Przed wprowadzeniem wyrobu na rynek państw członkowskich UE wytwórca musi określić jego klasę wg obowiązującej klasyfikacji i poddać go procedurze oceny zgodności ustalonej w stosownej dyrektywie lub dyrektywach. Oznakowanie wyrobu znakiem CE oznacza, że wyrób został poddany stosownej ocenie zgodności z dyrektywami i jest zgodny z ich wymaganiami. Najważniejsze regulacje prawne dotyczące wyrobów medycznych na terytorium państw członkowskich to:

- MDD (ang. *Medical Device Directive*) – 93/42/EEC – dyrektywa dotycząca wyrobów medycznych różnego przeznaczenia;
- AIMD (ang. *Active Implantable Medical Device*) – 90/385/EEC – dyrektywa dla aktywnych implantowanych wyrobów medycznych;
- IVDD (ang. *In vitro Diagnostic Device Directive*) – 98/79/EC – dyrektywa dla wyrobów medycznych do diagnostyki *in vitro*.

5 kwietnia 2017 r. Parlament Europejski i Rada uchwaliły dwa nowe rozporządzenia w sprawie wyrobów medycznych i wyrobów medycznych do diagnostyki *in vitro* uchylające dyrektyw Rady 90/385/ECC i 93/42/ECC. Okres przejściowy dla nowego rozporządzenia o wyrobach medycznych wynosi trzy lata (26 maja 2020 r.) i pięć lat dla wyrobów medycznych do diagnostyki *in vitro* (26 maja 2022 r.), dodatkowo od tych terminów prawodawca przewidział szereg wyjątków. Zmiany te są konieczne do wprowadzenia również w przepisach obowiązujących na terytorium RP, dlatego trwają prace nad projektem nowej Ustawy o wyrobach medycznych, która ma służyć stosowaniu unijnych Rozporządzeń 2017/745 i 2017/746 dotyczących wyrobów

medycznych. Z tego względu zagadnienia związane z wyrobami medycznymi zostaną opisane wg nowych rozporządzeń Parlamentu Europejskiego.

Do obrotu i używania mogą być wprowadzone wyroby medyczne spełniające następujące wymagania:

- wymagania zasadnicze w zakresie projektowania, wytwarzania, opakowania, oznakowania tych wyrobów, a także informacji dostarczonej przez wytwórcę,
- posiadają deklarację zgodności, czyli oświadczenie wytwórcy lub jego autoryzowanego przedstawiciela stwierdzające, że wyrób jest zgodny z wymaganiami zasadniczymi,
- są oznakowane znakiem CE [1].

7.2. ETAPY WDRAŻANIA WYROBÓW IMPLANTACYJNYCH

Proces wdrażania wyrobów medycznych jest złożony i zachodzi w wielu etapach, od pomysłu wynikającego z zapotrzebowania do rejestracji produktu i wprowadzenia do obrotu rynkowego (rys. 7.1). Pierwszym etapem jest faza projektowa, w której zakres wchodzą: identyfikacja potrzeb, tj. postać funkcjonalna wyrobu, kryteria jakości i zakres jego zastosowania, następnie projekt wyrobu i dobór odpowiedniego biomateriału. W fazie projektowania wykonana musi być również analiza biomechaniczna, która pozwala na optymalizację wymiarów i kształtu implantu, jak również właściwości mechanicznych biomateriału. Kolejnym etapem są badania materiałów w warunkach *in vitro* dotyczące właściwości fizykochemicznych i struktury, jak również badania cytotoksyczności *in vitro*. W kolejnej fazie wytworzony wyrób (producent z wdrożonym systemem Dobrej Praktyki Produkcyjnej (GMP – *Good Manufacturing Practice*)), dla którego dobrano odpowiednią metodę sterylizacji, oceniany jest pod względem cech geometrycznych i użytkowych. Faza oceny zgodności wyrobu obejmuje badania właściwości mechanicznych, fizykochemicznych i użytkowych (laboratorium z systemem Dobrej Praktyki Laboratoryjnej (GLP – *Good Laboratory Practice*)) oraz badania *in vivo* z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych. Po uzyskaniu pozytywnych rezultatów wyrób medyczny poddawany jest badaniom klinicznym w klinice z systemem Dobrej Praktyki Klinicznej (GCP – *Good Clinical Practice*) po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej. Ostatnia fazą jest faza rejestracji i wprowadzenia wyrobu do obrotu, która musi być poprzedzona identyfikacją wyrobu wg określonej klasy wyrobu, deklaracją zgodności i certyfikatem oceny typu. Rejestracja wyrobu jest dokonywana w Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, który nadzoruje rynek wyrobów medycznych.

Rys. 7.1. Etapy wdrażania implantacyjnych wyrobów medycznych

7.3. KLASYFIKACJA WYROBÓW MEDYCZNYCH WG ROZPORZĄDZENIA UE NR 2017/745

Wyroby medyczne to bardzo szerokie spektrum produktów obarczonych ryzykiem różnego stopnia. Na rynku obecne są wyroby medyczne proste, których użytkowanie wiąże się z najniższym ryzykiem dla pacjenta, np. ortezy ortopedyczne, przez produkty o podwyższonym ryzyku (np. ze względu na rodzaj styczności z organizmem (cewniki)), po inwazyjne, pozostające w organizmie człowieka przez długi czas (niejednokrotnie do końca życia) i niosące bardzo duże ryzyko dla pacjenta, jak implanty czy zastawki serca. Są wśród nich produkty stosowane w różnych dziedzinach, tj. diagnostyka, chirurgia, stomatologia, ale i środki zbliżone w swej funkcji do produktów leczniczych, lecz kwalifikowane jako wyroby medyczne. Dlatego dyrektywy zawierają definicje i klasyfikację wyrobów medycznych w konkretnej klasie ryzyka, która determinuje dalszą procedurę związaną z jego wprowadzeniem na rynek.

Wyrób medyczny oznacza narzędzie, aparat, urządzenie, oprogramowanie, implant, odczynnik, materiał lub inny artykuł przewidziany przez producenta do stosowania – pojedynczo lub łącznie – u ludzi do co najmniej jednego z następujących szczególnych zastosowań medycznych:

- diagnozowanie, profilaktyka, monitorowanie, przewidywanie, prognozowanie, leczenie lub łagodzenie choroby,
- diagnozowanie, monitorowanie, leczenie, łagodzenie lub kompensowanie urazu bądź niepełnosprawności,
- badanie, zastępowanie lub modyfikowanie budowy anatomicznej albo procesu bądź stanu fizjologicznego lub chorobowego,
- dostarczanie informacji poprzez badanie *in vitro* próbek pobranych z organizmu ludzkiego, w tym pobranych od dawców narządów, krwi i tkanek,

i który nie osiąga swojego zasadniczego przewidzianego działania środkami farmakologicznymi, immunologicznymi lub metabolicznymi w ludzkim ciele lub na nim, ale którego działanie może być wspomagane takimi środkami.

Następujące produkty są również uznawane za wyroby medyczne:

- wyroby do celów kontroli poczęć lub wspomagania poczęcia,
- produkty specjalnie przeznaczone do czyszczenia, dezynfekcji lub sterylizacji wyrobów.

Wyróżnia się:

- wyrób medyczny,
- aktywny wyrób medyczny,
- wyrób medyczny do implantacji,
- wyrób medyczny inwazyjny,
- wyrób medyczny wykonany na zamówienie.

Aktywny wyrób medyczny oznacza wyrób, którego funkcjonowanie zależy od źródła energii innego niż energia generowana przez ciało ludzkie do tego celu lub przez siłę grawitacji i który działa poprzez zmianę gęstości lub przetwarzanie tej energii. Za wyroby aktywne nie uznaje się wyrobów przeznaczonych do przenoszenia między wyrobem aktywnym a pacjentem – bez istotnych zmian – energii, substancji lub innych elementów. Oprogramowanie również uznaje się za wyrób aktywny.

Wyrób medyczny do implantacji oznacza wyrób, włącznie z wyrobami częściowo lub całkowicie wchłoniętymi, który jest przeznaczony do:

- całkowitego wprowadzenia do ludzkiego ciała, lub
- zastąpienia powierzchni nabłonka lub powierzchni oka w wyniku zabiegu chirurgicznego i który po zabiegu ma pozostać na miejscu.

Za wyrób do implantacji uznaje się również wyrób przeznaczony do częściowego wprowadzenia do ludzkiego ciała w drodze zabiegu chirurgicznego, i który po zabiegu ma pozostać na miejscu przez co najmniej 30 dni.

Wyrób medyczny inwazyjny oznacza wyrób, który w całości lub w części wnika do wnętrza ciała przez jeden z jego otworów lub przez powierzchnię ciała.

Wyrób wykonany na zamówienie oznacza wyrób wykonany specjalnie zgodnie ze zleceniem medycznym, wystawionym przez osobę upoważnioną na podstawie prawa krajowego ze względu na jej kwalifikacje zawodowe, które określa – na odpo-

wiedzialność tej osoby – szczególne właściwości konstrukcyjne, oraz przeznaczony do wyłącznego stosowania przez konkretnego pacjenta wyłącznie w celu leczenia jego schorzeń lub zaspokojenia jego indywidualnych potrzeb.

Uszeregowanie wyrobów w klasach dokonane zostało ze względu na stopień ryzyka, jakie niesie ze sobą ich stosowanie. Dlatego też każdej z klas zostały przypisane szczegółowo określone wymagania, jakie musi spełnić nowy wyrób medyczny, aby zgodnie z prawem mógł zostać wprowadzony do użytku i obrotu.

Kryteriami na jakich opiera się klasyfikacja wyrobów medycznych są:

- stopień inwazyjności,
- czas i rodzaj styczności z pacjentem,
- sposób zasilania,
- obecność składników potencjalnie niebezpiecznych dla pacjenta (np. produktów leczniczych, produktów krwiopochodnych, tkanek zwierzęcych).

Zgodnie z obowiązującymi przepisami istnieją następujące klasy wyrobów medycznych:

- klasa I: – wyroby medyczne bez funkcji pomiarowych i niesterylne,
  – wyroby medyczne sterylne,
  – wyroby medyczne z funkcją pomiarową,
- klasa IIa (np. opatrunki hydrożelowe, cewniki jednorazowe, klisze rentgenowskie),
- klasa IIb (np. pojemniki na krew, prezerwatywy, respiratory),
- klasa III (np. implanty piersi, zastawki serca, protezy naczyniowe).

Szczegółowe zasady klasyfikacji zamieszczone są w Rozporządzeniu Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2017/745 w sprawie sposobu klasyfikowania wyrobów medycznych. Dokument ten określa reguły, jakimi należy posługiwać się, chcąc prawidłowo sklasyfikować nowy wyrób. Jednym z kryteriów, którym podlegają wyroby jest czas, w jakim dochodzi do bezpośredniej styczności produktu z pacjentem, według którego wyróżniamy:

- wyroby do chwilowego użytku – ciągłe używanie przez czas krótszy niż 60 minut,
- wyroby do krótkotrwałego użytku – ciągłe używanie przez czas od 60 minut do 30 dni,
- wyroby do długotrwałego użytku – ciągłe używanie przez czas dłuższy niż 30 dni.

W usystematyzowaniu zawiłości klasyfikacji pomagają 22 reguły określone w rozporządzeniu dotyczącym klasyfikacji wyrobów medycznych (tab. 7.1).

Reguła 1: wszystkie wyroby nieinwazyjne należą do klasy I, chyba że podlegają jednej z poniższych reguł.

Reguła 2: wszystkie wyroby nieinwazyjne przeznaczone do przesyłania lub przechowywania krwi, płynów ustrojowych, komórek lub tkanek, płynów lub gazów do

celów ewentualnych infuzji, podawania lub wprowadzania do organizmu należą do klasy IIa:

- jeżeli mogą zostać połączone z aktywnym wyrobem klasy IIa, klasy IIb lub klasy III, lub
- jeżeli są przeznaczone do przesyłania lub przechowywania krwi i innych płynów ustrojowych lub do przechowywania organów, części organów lub komórek i tkanek ciała, z wyjątkiem worków na krew; worki na krew należą do klasy IIb.

We wszystkich pozostałych przypadkach wyroby takie należą do klasy I.

Tabela 7.1

Reguły klasyfikacji wyrobów medycznych wg [4]

Stopień inwazyjności	Klasy ryzyka			
	Klasa I	Klasa IIa	Kalsa IIb	Klasa III
Nieinwazyjne	1, 2, 4	2–4	3, 4	–
Inwazyjne	5, 6	5–8	5–8	6–8
Aktywne	10, 11, 13	9, 10, 11, 12	9, 10, 11, 12	9, 11
Inne	–	16, 17, 19–21	15, 16, 19–21	14, 15, 18, 19, 21, 22

Reguła 3: wszystkie wyroby nieinwazyjne przeznaczone do zmiany biologicznego lub chemicznego składu ludzkich tkanek lub komórek, krwi, innych płynów ustrojowych lub innych płynów przeznaczonych do podawania do organizmu lub do implantacji w organizmie należą do klasy IIb, chyba że ich stosowanie polega na filtracji, wirowaniu bądź wymianie gazu lub ciepła, w których to przypadkach należą one do klasy IIa.

Wszystkie wyroby nieinwazyjne składające się z substancji lub mieszaniny substancji przeznaczonych do stosowania *in vitro* w bezpośrednim kontakcie z ludzkimi komórkami, tkankami lub narządami pobranymi z ciała ludzkiego lub do stosowania *in vitro* z embrionami ludzkimi przed ich implantacją lub podaniem do ciała należą do klasy III.

Reguła 4: wszystkie wyroby nieinwazyjne, które wchodzą w kontakt z uszkodzoną skórą lub błoną śluzową należą do:

- klasy I, jeżeli są przeznaczone do stosowania jako bariera mechaniczna, do ucisku lub do wchłaniania wysięków,
- klasy IIb, jeżeli są przeznaczone do stosowania głównie przy uszkodzeniach skóry z naruszeniem skóry właściwej lub błony śluzowej, które mogą się goić wyłącznie przez ziarninowanie,
- klasy IIa, jeżeli są przeznaczone głównie do zapewnienia właściwego mikrośrodowiska uszkodzonej skóry lub błony śluzowej, oraz
- klasy IIa – we wszystkich pozostałych przypadkach.

Reguła ta ma zastosowanie również do wyrobów inwazyjnych, które wchodzą w kontakt z uszkodzoną błoną śluzową.

Reguła 5: wszystkie wyroby inwazyjne stosowane przez otwory ciała – inne niż chirurgiczne wyroby inwazyjne – które nie są przeznaczone do połączenia z aktywnym wyrobem lub wyroby przeznaczone do połączenia z aktywnym wyrobem klasy I, należą do:

- klasy I, jeżeli są przeznaczone do chwilowego użytku,
- klasy IIa, jeżeli są przeznaczone do krótkotrwałego użytku, z wyjątkiem przypadków, gdy są używane w jamie ustnej aż do gardła, w kanale ucha aż do błony bębenkowej lub w jamie nosowej, w których to przypadkach należą do klasy I, oraz
- klasy IIb, jeżeli są przeznaczone do długotrwałego użytku, z wyjątkiem przypadków gdy są używane w jamie ustnej aż do gardła, w kanale ucha aż do błony bębenkowej lub w jamie nosowej, i nie podlegają wchłonięciu przez błonę śluzową, w których to przypadkach należą do klasy IIa.

Wszystkie wyroby inwazyjne stosowane przez otwory ciała – inne niż chirurgiczne wyroby inwazyjne – które są przeznaczone do połączenia z aktywnym wyrobem klasy IIa, klasy IIb lub klasy III, należą do klasy IIa.

Reguła 6: wszystkie chirurgiczne wyroby inwazyjne przeznaczone do chwilowego użytku należą do klasy IIa, chyba że:

- są przeznaczone specjalnie do kontrolowania, diagnozowania, monitorowania lub korygowania wad serca lub centralnego układu krążenia poprzez bezpośredni kontakt z tymi częściami organizmu, w których to przypadkach należą do klasy III,
- są narzędziami chirurgicznymi wielokrotnego użytku, w którym to przypadku należą do klasy I,
- są przeznaczone specjalnie do stosowania w bezpośrednim kontakcie z sercem lub centralnym układem krążenia lub ośrodkowym układem nerwowym, w których to przypadkach należą do klasy III,
- są przeznaczone do dostarczania energii w postaci promieniowania jonizującego, w którym to przypadku należą do klasy IIb,
- wywołują efekt biologiczny lub są wchłaniane w całości lub w większej części, w których to przypadkach należą do klasy IIb, lub
- są przeznaczone do podawania produktów leczniczych za pomocą układu podającego, jeżeli to podawanie produktów leczniczych odbywa się w sposób potencjalnie niebezpieczny przy uwzględnieniu sposobu stosowania, w którym to przypadku należą do klasy IIb.

Reguła 7: wszystkie chirurgiczne wyroby inwazyjne przeznaczone do krótkotrwałego użytku należą do klasy IIa, chyba że:

- są przeznaczone specjalnie do kontrolowania, diagnozowania, monitorowania lub korygowania wad serca lub centralnego układu krążenia poprzez bez-

pośredni kontakt z tymi częściami organizmu, w których to przypadkach należą do klasy III,
- są przeznaczone specjalnie do stosowania w bezpośrednim kontakcie z sercem lub centralnym układem krążenia, lub ośrodkowym układem nerwowym, w których to przypadkach należą do klasy III,
- są przeznaczone do dostarczania energii w postaci promieniowania jonizującego, w którym to przypadku należą do klasy IIb,
- wywołują efekt biologiczny lub są wchłaniane w całości, lub w większej części, w których to przypadkach należą do klasy III,
- są przeznaczone do poddania przemianom chemicznym w organizmie, w którym to przypadku należą do klasy IIb, z wyjątkiem przypadków, gdy wyroby są umieszczane w zębach, lub
- służą do podawania leków, w którym to przypadku należą do klasy IIb.

Reguła 8: wszystkie wyroby do implantacji i chirurgiczne wyroby inwazyjne do długotrwałego użytku należą do klasy IIb, chyba że:
- są przeznaczone do umieszczania w zębach, w którym to przypadku należą do klasy IIa,
- są przeznaczone do użytku w bezpośrednim kontakcie z sercem, centralnym układem krążenia lub ośrodkowym układem nerwowym, w których to przypadkach należą do klasy III,
- wywołują efekt biologiczny lub są wchłaniane w całości, lub w większej części, w których to przypadkach należą do klasy III,
- są przeznaczone do poddania przemianom chemicznym w organizmie, w którym to przypadku należą do klasy III, z wyjątkiem przypadków, gdy wyroby są umieszczane w zębach, lub
- służą do podawania produktów leczniczych, w którym to przypadku należą do klasy III,
- są aktywnymi wyrobami do implantacji lub ich wyposażeniem, w których to przypadkach należą do klasy III,
- są implantami piersi lub siatkami chirurgicznymi, w których to przypadkach należą do klasy III,
- są całkowitymi lub częściowymi protezami stawów, w którym to przypadku należą do klasy III, z wyjątkiem komponentów pomocniczych, takich jak śruby, kliny, płytki i narzędzia, lub
- są protezami dysków międzykręgowych lub wyrobami do implantacji, które pozostają w kontakcie z kręgosłupem, w którym to przypadku należą do klasy III, z wyjątkiem komponentów, takich jak śruby, kliny, płytki i narzędzia.

Reguła 9: wszystkie aktywne wyroby terapeutyczne przeznaczone do podawania lub wymiany energii należą do klasy IIa, chyba że ich właściwości są takie, że mogą podawać energię do ciała ludzkiego lub wymieniać energię z ciałem ludzkim w spo-

sób potencjalnie niebezpieczny, biorąc pod uwagę charakter, gęstość i miejsce stosowania energii, w którym to przypadku należą do klasy IIb.

Wszystkie wyroby aktywne przeznaczone do sterowania lub monitorowania działania aktywnych wyrobów terapeutycznych klasy IIb lub bezpośrednio przeznaczone do wpływania na działanie takich wyrobów należą do klasy IIb.

Wszystkie wyroby aktywne przeznaczone do emitowania promieniowania jonizującego do celów terapeutycznych, w tym wyroby, które sterują lub monitorują ich działanie lub bezpośrednio na to działanie wpływają należą do klasy IIb.

Wszystkie wyroby aktywne przeznaczone do sterowania lub monitorowania ich działania lub bezpośrednio na to działanie wpływające należą do klasy III.

Reguła 10: wyroby aktywne przeznaczone do diagnostyki i monitorowania należą do klasy IIa:

- jeżeli są przeznaczone do dostarczania energii, która będzie pochłonięta przez ciało ludzkie, z wyjątkiem wyrobów przeznaczonych do oświetlania ciała pacjenta w zakresie widma widzialnego, w którym to przypadku należą do klasy I,
- jeżeli są przeznaczone do obrazowania *in vivo* rozmieszczenia produktów radiofarmaceutycznych, lub
- jeżeli są przeznaczone do umożliwiania bezpośredniego diagnozowania lub monitorowania życiowych procesów fizjologicznych, chyba że są przeznaczone specjalnie do monitorowania życiowych parametrów fizjologicznych, a charakter zmian tych parametrów może powodować bezpośrednie zagrożenie dla pacjenta, na przykład zmiany czynności serca, oddychania, aktywności ośrodkowego układu nerwowego, lub jeżeli są przeznaczone do diagnozowania w sytuacjach klinicznych, w których pacjent jest w stanie bezpośredniego zagrożenia – w takich przypadkach należą do klasy IIb.

Wyroby aktywne przeznaczone do emitowania promieniowania jonizującego oraz przeznaczone do celów radiologii diagnostycznej lub terapeutycznej, w tym wyroby przeznaczone do celów radiologii interwencyjnej oraz wyroby, które sterują lub monitorują działanie tych wyrobów lub bezpośrednio na to działanie wpływają, należą do klasy IIb.

Reguła 11: oprogramowanie, które ma dostarczać informacje wykorzystywane przy podejmowaniu decyzji do celów diagnostycznych lub terapeutycznych, należy do klasy IIa, z wyjątkiem przypadków, gdy skutki takich decyzji mogą spowodować:

- zgon danej osoby albo nieodwracalne pogorszenie stanu jej zdrowia, w którym to przypadku oprogramowanie należy do klasy III, lub
- poważne pogorszenie stanu zdrowia danej osoby lub konieczność interwencji chirurgicznej, w którym to przypadku oprogramowanie należy do klasy IIb.

Oprogramowanie przeznaczone do monitorowania procesów fizjologicznych należy do klasy IIa, z wyjątkiem przypadków, gdy jest przeznaczone do monitorowania życiowych parametrów fizjologicznych, w przypadku gdy zmiana tych parametrów

może powodować bezpośrednie zagrożenie dla pacjenta, wówczas oprogramowanie należy do klasy IIb.

Pozostałe oprogramowanie należy do klasy I.

Reguła 12: wszystkie wyroby aktywne przeznaczone do podawania do organizmu lub usuwania z niego produktów leczniczych, płynów ustrojowych lub innych substancji należą do klasy IIa, o ile to podawanie lub usuwanie nie odbywa się w sposób potencjalnie niebezpieczny, biorąc pod uwagę rodzaj substancji, daną część ciała oraz sposób stosowania, w którym to przypadku należą do klasy IIb.

Reguła 13: wszystkie inne wyroby aktywne należą do klasy I.

Reguła 14: wszystkie wyroby zawierające jako swoją integralną część substancję, która w przypadku użycia osobno może być uważana za produkt leczniczy w rozumieniu art. 1 pkt 2 Dyrektywy 2001/83/WE, w tym produkt leczniczy na bazie ludzkiej krwi lub ludzkiego osocza w rozumieniu art. 1 pkt 10 tej Dyrektywy, i której działanie ma charakter pomocniczy w stosunku do działania tych wyrobów, należą do klasy III.

Reguła 15: wszystkie wyroby używane do celów antykoncepcji lub do zapobiegania przekazywaniu chorób przenoszonych drogą płciową należą do klasy IIb, chyba że są wyrobami do implantacji lub wyrobami inwazyjnymi do długotrwałego użytku, w których to przypadkach należą do klasy III.

Reguła 16: wszystkie wyroby przeznaczone specjalnie do dezynfekcji, czyszczenia, płukania lub – w stosownych przypadkach – nawilżania soczewek kontaktowych należą do klasy IIb.

Wszystkie wyroby przeznaczone specjalnie do dezynfekcji lub sterylizacji wyrobów medycznych należą do klasy IIa, chyba że są to roztwory dezynfekujące lub myjnie-dezynfektory przeznaczone specjalnie do dezynfekcji wyrobów inwazyjnych jako punkt końcowy procesu, w którym to przypadku należą do klasy IIb.

Niniejsza reguła nie ma zastosowania do wyrobów przeznaczonych do czyszczenia wyrobów innych niż soczewki kontaktowe wyłącznie przez działanie fizyczne.

Reguła 17: wyroby przeznaczone specjalnie do rejestracji obrazów diagnostycznych uzyskiwanych za pomocą promieniowania rentgenowskiego należą do klasy IIa.

Reguła 18: wszystkie wyroby wyprodukowane z wykorzystaniem tkanek lub komórek pochodzenia ludzkiego, lub zwierzęcego, lub ich pochodnych, które są niezdolne do życia lub zostały pozbawione zdolności do życia, należą do klasy III, chyba że takie wyroby zostały wyprodukowane z wykorzystaniem tkanek lub komórek pochodzenia zwierzęcego lub ich pochodnych, niezdolnych do życia lub pozbawionych zdolności do życia, i są wyrobami przeznaczonymi wyłącznie do kontaktu z nieuszkodzoną skórą.

Reguła 19: wszystkie wyroby zawierające nanomateriał lub składające się z niego należą do:

– klasy III – jeżeli stwarzają duże lub średnie ryzyko narażenia wewnętrznego,

– klasy IIb – jeżeli stwarzają małe ryzyko narażenia wewnętrznego, oraz
– klasy IIa – jeżeli stwarzają znikome ryzyko narażenia wewnętrznego.

Reguła 20: wszystkie wyroby inwazyjne stosowane przez otwory ciała – inne niż chirurgiczne wyroby inwazyjne – które są przeznaczone do podawania produktów leczniczych w drodze inhalacji, należą do klasy IIa, chyba że sposób ich działania ma podstawowe znaczenie dla skuteczności i bezpieczeństwa podawanego produktu leczniczego lub są one przeznaczone do leczenia w stanach zagrażających życiu, w którym to przypadku należą do klasy IIb.

Reguła 21: wyroby składające się z substancji lub mieszanin substancji, które są przeznaczone do wprowadzenia do organizmu ludzkiego przez jeden z otworów ciała lub do podania na skórę i które są wchłaniane przez organizm ludzki lub miejscowo rozpraszane w organizmie ludzkim, należą do:

– klasy III – jeżeli one same lub produkty ich metabolizmu są systematycznie wchłaniane przez organizm ludzki, aby osiągnąć przewidziane zastosowanie,
– klasy III – jeżeli osiągają one swoje przewidziane zastosowanie w żołądku lub dolnej części przewodu pokarmowego i one same lub produkty ich metabolizmu są systematycznie wchłaniane przez organizm ludzki,
– klasy IIa – jeżeli są podawane na skórę lub jeżeli są stosowane w jamie nosowej lub jamie ustnej aż do gardła i w tych jamach osiągają swoje przewidziane zastosowanie, oraz
– klasy IIb – we wszystkich pozostałych przypadkach.

Reguła 22: aktywne wyroby terapeutyczne ze zintegrowaną lub wbudowaną funkcją diagnostyczną, która w istotnym stopniu wpływa na postępowanie z pacjentem za pośrednictwem wyrobu, takie jak systemy o obiegu zamkniętym lub automatyczne defibrylatory zewnętrzne, należą do klasy III.

7.4. PROCEDURY OCENY ZGODNOŚCI WYROBÓW MEDYCZNYCH

Podmiot wprowadzający wyrób do obrotu, używania lub przekazujący wyrób do badań klinicznych albo oceny działania musi przeprowadzić procedurę oceny zgodności, w zależności od klasyfikacji wyrobu, w oparciu o wymagania zasadnicze przedstawione w stosownych do danego wyrobu, Rozporządzeniach Ministra Zdrowia. Wytwórca lub jego upoważniony przedstawiciel przed umieszczeniem na wyrobie oznakowania CE musi przeprowadzić właściwą dla danego wyrobu procedurę oceny zgodności, która w pełni zaświadcza, że wyrób spełnia wszystkie wymagania odnoszących się do niego przepisów prawnych. Jeżeli ocena zgodności została przeprowadzana wraz z udziałem Jednostki Notyfikowanej, obok znaku CE zostaje umieszczony 4-cyfrowy numer identyfikacyjny jednostki, która brała udział w ocenie zgodności. Dla wyrobów medycznych I klasy ryzyka, niesterylnych i bez funkcji pomiarowej, wytwórca samodzielnie przeprowadza ocenę zgodności, wy-

stawia deklarację zgodności i oznakowuje swój wyrób znakiem CE. Natomiast dla wyrobów o wyższych klasach ryzyka, innych niż wyroby wykonane na zamówienie, wyroby do badań klinicznych, wyroby do oceny działania i wyroby wykonane przez użytkownika niezbędne jest uczestnictwo w procedurze oceny zgodności jednostki notyfikowanej (JN).

Wytwórca ma kilka możliwości wyboru procedur oceny zgodności [4, 6, 7].

Dla wyrobów klasy I ocenę zgodności przeprowadza się z zastosowaniem procedury dotyczącej deklaracji zgodności WE[1] (rys. 7.2).

Dla wyrobów klasy IIa można stosować procedury dotyczące: (1) deklaracji zgodności WE, deklaracji zgodności WE bazującej na (2) systemie zapewnienie jakości produkcji, (3) wyrobu lub (4) pełnym systemie zapewnienia jakości (rys. 7.3).

Dla wyrobów lub wyposażenia wyrobów medycznych sklasyfikowanych do klasy IIb przeprowadza ocenę zgodności z zastosowaniem procedury dotyczącej: (1) deklaracji zgodności WE (pełny system zapewnienia jakości), (2) badania typu WE[2] oraz weryfikacji WE[3], (3) badania typu WE oraz deklaracji zgodności WE (zapewnienie jakości produkcji), (4) badania typu WE oraz deklaracji zgodności WE (zapewnienie jakości wyrobu) (rys. 7.4).

Dla wyrobów lub wyposażenia wyrobów medycznych sklasyfikowanych do klasy III przeprowadza ocenę zgodności z zastosowaniem procedury dotyczącej: (1) deklaracji zgodności WE (pełny system zapewnienia jakości), (2) badania typu WE oraz weryfikacji WE, (3) badania typu WE oraz deklaracji zgodności WE (zapewnienie jakości produkcji) (rys. 7.5).

Znak CE umieszczony na wyrobie jest potwierdzeniem, że wyrób spełnia odnoszące się do niego normy jakości, bezpieczeństwa oraz wymagania zasadnicze w zakresie cech wyrobu, projektowania oraz wytwarzania określone w stosownych dla danego wyrobu dyrektywach.

Oznakowanie CE można umieścić na wyrobie tylko i wyłącznie po sporządzeniu deklaracji zgodności WE, która zawiera:

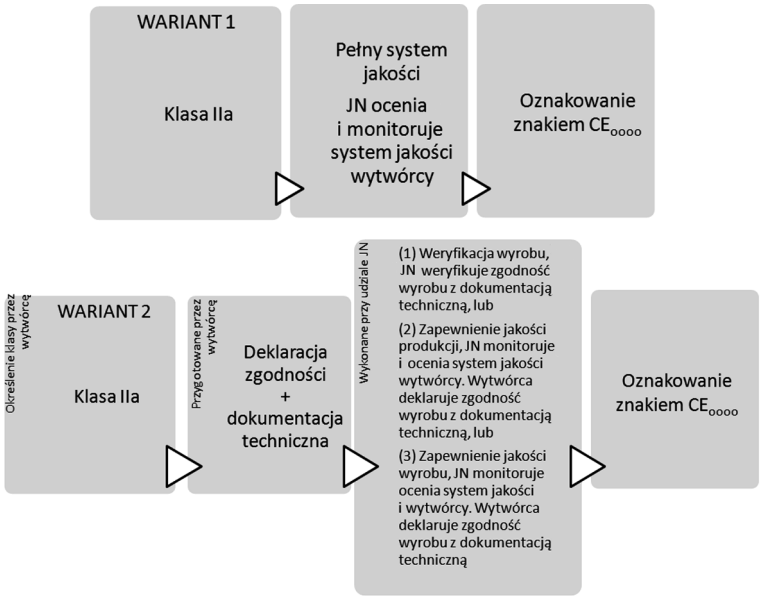
- nazwę i adres wytwórcy,
- nazwę i adres autoryzowanego przedstawiciela, jeśli dotyczy,
- dane identyfikujące wyrób,
- oświadczenie o zgodności wyrobu z wymaganiami przepisów rozporządzenia,
- wskazanie zastosowanych norm zharmonizowanych lub specyfikacji technicznych,

[1] Deklaracja zgodności WE jest pisemnym oświadczeniem i jednorazowym zgłoszeniem sporządzonym przez producenta w celu udowodnienia spełnienia wymogów UE dotyczących produktu.

[2] Badanie typu WE jest procedurą, według której jednostka notyfikowana bada i następnie zaświadcza, że zgłoszony do badania wyrób spełnia wymagania bezpieczeństwa.

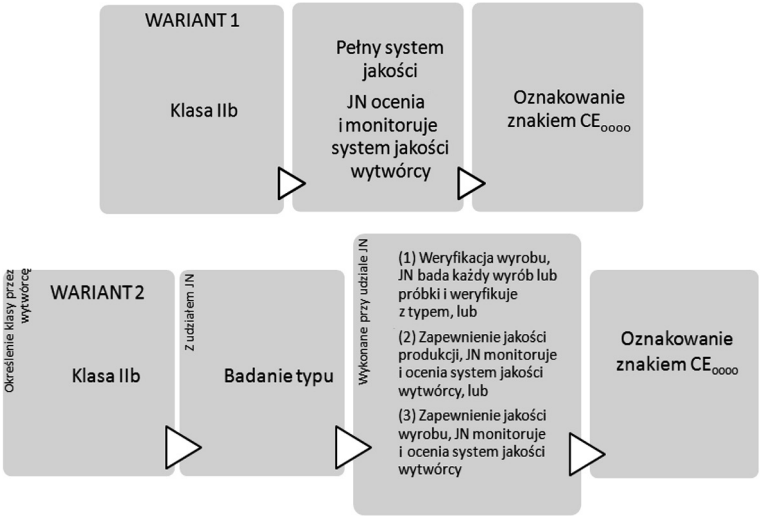
[3] Weryfikacja WE jest procedurą, w której wytwórca lub jego autoryzowany przedstawiciel zapewnia i oświadcza, że wyrób, który był przedmiotem postępowania, jest zgodny z typem określonym w certyfikacie badania typu WE i spełnia odnoszące się do tego wyrobu wymagania.

Rys. 7.2. Procedura oceny zgodności wyrobów medycznych klasy I

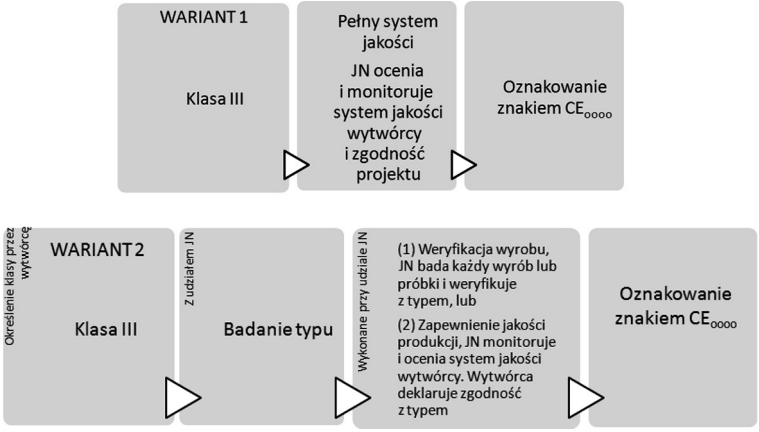


Rys. 7.3. Procedura oceny zgodności wyrobów medycznych klasy IIa

– zastosowaną procedurę oceny zgodności,
– numer identyfikacyjny jednostki notyfikowanej, jeśli brała udział w ocenie zgodności,
– imię, nazwisko, stanowisko i podpis osoby upoważnionej przez wytwórcę do wystawienia deklaracji zgodności WE,
– miejsce i datę wydania.



Rys. 7.4. Procedura oceny zgodności wyrobów medycznych klasy IIb



Rys. 7.5. Procedura oceny zgodności wyrobów medycznych klasy III

7.5. OCENA KLINICZNA WYROBU MEDYCZNEGO

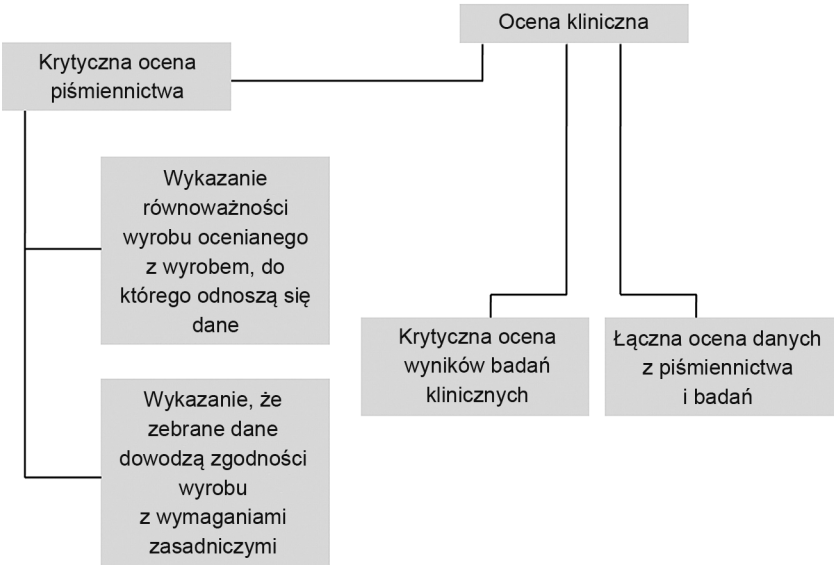
Ocena kliniczna wyrobu medycznego jest procesem ciągłym, wykonywanym po raz pierwszy w ramach procedury oceny zgodności przed wprowadzeniem ocenianego wyrobu do obrotu, a następnie powtarzanym, gdy podczas używania tego wyrobu uzyska się nowe informacje dotyczące bezpieczeństwa lub skuteczności działania. Wytwórca lub autoryzowany przedstawiciel dokonują oceny klinicznej wyrobu medycznego lub aktywnego wyrobu medycznego do implantacji w celu potwierdzenia zgodności z wymaganiami zasadniczymi dotyczącymi właściwości i działania ocenianego wyrobu oraz w celu oceny działań niepożądanych i akceptowalności stosunku korzyści klinicznych do ryzyka w normalnych warunkach używania ocenianego wyrobu, chyba że wykazanie zgodności z wymaganiami zasadniczymi bez wykonania oceny klinicznej, na podstawie oceny działania, testów efektywności i oceny przedklinicznej jest należycie uzasadnione w dokumentacji oceny zgodności. W dokumentacji oceny zgodności należy podać uzasadnienie każdego takiego wyłączenia oparte na wynikach zarządzania ryzykiem, z uwzględnieniem specyficznych interakcji wyrobu z organizmem ludzkim, przewidywanej skuteczności działania oraz stosownych deklaracji wytwórcy dotyczących wyrobu.

Ocena kliniczna uwzględnia wszelkie normy zharmonizowane dotyczące wyrobu medycznego i jest prowadzona według określonej i metodologicznie wiarygodnej procedury opartej na:

1) krytycznej ocenie aktualnie dostępnego piśmiennictwa naukowego dotyczącego bezpieczeństwa, działania, właściwości projektu i przewidzianego zastosowania wyrobu, jeżeli:
   a) wykazano równoważność ocenianego wyrobu z wyrobem medycznym lub aktywnym wyrobem medycznym do implantacji, do którego odnoszą się dane, i
   b) dane dowodzą zgodności z wymaganiami zasadniczymi odnoszącymi się do danego wyrobu;
2) krytycznej ocenie wyników wszystkich badań klinicznych;
3) krytycznej łącznej ocenie danych, o których mowa w pkt. 1 i 2.

Schematycznie procedurę oceny klinicznej pokazano na rys. 7.6.

Ocena kliniczna aktywnego wyrobu medycznego, wyrobu medycznego do implantacji oraz wyrobu medycznego klasy III jest wykonywana na podstawie danych klinicznych pochodzących z badania klinicznego, chyba że wykonanie tej oceny na podstawie już istniejących danych klinicznych jest należycie uzasadnione. Jeżeli brak jest wystarczających danych klinicznych potwierdzających bezpieczeństwo i skuteczność działania wyrobu, poszerza się zakres poszukiwań dostępnych danych i powtarza ocenę kliniczną, a jeżeli nie przyniesie to rezultatów, wykonuje się badanie kliniczne wyrobu.



Rys. 7.6. Proces oceny klinicznej

Ocena kliniczna składa się z kilku etapów, tj.:

- identyfikacja wymagań zasadniczych, których spełnienie wymaga dowodów na podstawie danych klinicznych;
- przegląd dostępnych danych klinicznych dotyczących ocenianego wyrobu i jego zastosowania;
- cena, czy poszczególne dane kliniczne są wystarczające do wykazania bezpieczeństwa i skuteczności działania ocenianego wyrobu;
- ocena przydatności danych klinicznych do potwierdzenia wyników oceny zgodności;
- ocena podobieństwa wyrobu, którego dotyczą dane kliniczne z ocenianym wyrobem, jeżeli ocena kliniczna jest sporządzana na podstawie wyrobu podobnego lub równoważnego z ocenianym wyrobem;
- stworzenie nowych danych klinicznych dotyczących kwestii, których nie można rozstrzygnąć na podstawie dostępnych danych klinicznych, poprzez przeprowadzenie badania klinicznego;
- zestawienie wszystkich danych klinicznych i ich porównanie oraz sformułowanie wyników na temat bezpieczeństwa i skuteczności działania ocenianego wyrobu.

Badaniem klinicznym jest każde badanie prowadzone z udziałem ludzi w celu odkrycia lub potwierdzenia klinicznych, farmakologicznych, w tym farmakodynamicznych skutków działania jednego lub wielu badanych produktów leczniczych, lub w celu zidentyfikowania działań niepożądanych jednego lub większej liczby badanych produktów leczniczych, lub śledzenia wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu

i wydalania jednego lub większej liczby badanych produktów leczniczych, mając na względzie ich bezpieczeństwo i skuteczność [8]. Badanie kliniczne wyrobu medycznego można rozpocząć po uzyskaniu pozytywnej opinii Komisji Bioetycznej i pozwolenia Prezesa Urzędu Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych na prowadzenie badania klinicznego. Po uzyskaniu opinii Komisji Bioetycznej sponsor przedkłada Prezesowi Urzędu wniosek o wydanie pozwolenia na prowadzenie badania klinicznego. Opinia Komisji Bioetycznej jest integralną częścią dokumentacji składanej wraz z wnioskiem Prezesowi Urzędu. Każde badanie kliniczne zostaje zarejestrowane w Centralnej Ewidencji Badań Klinicznych (CEBEK).

Wyniki z oceny klinicznej dokumentuje się w sprawozdaniu z oceny klinicznej. Sprawozdanie z oceny klinicznej i dane kliniczne, na podstawie których zostało ono sporządzone, są częścią dokumentacji oceny zgodności wyrobu i dowodem, że w warunkach klinicznych wyrób spełnia wymagania zasadnicze oraz może być wprowadzony do obrotu. W sprawozdaniu z oceny klinicznej zamieszcza się opis zakresu i kontekstu oceny, wejściowych danych klinicznych, etapów oceny i analizy danych klinicznych oraz wnioski dotyczące bezpieczeństwa i skuteczności działania wyrobu ocenianego.

7.6. PODSUMOWANIE

Podsumowując wszystkie działania, jakie muszą być podjęte, aby wyrób medyczny mógł być wprowadzony na rynek, można wyróżnić kilka etapów:

1) projekt wyrobu odpowiadający zasadom bezpieczeństwa i aktualnemu stanowi wiedzy;
2) spełnienie definicji wyrobu medycznego;
3) klasyfikacja wyrobu na podstawie reguł klasyfikacji;
4) identyfikacja wymagań zasadniczych i norm zharmonizowanych, wybór optymalnej ścieżki oceny zgodności;
5) opracowanie systemu zarządzania jakością uwzględniającego wymagania aktów prawnych;
6) wdrożenie wymagań norm, przebadanie wyrobu we własnym zakresie i w akredytowanych laboratoriach;
7) przeprowadzenie analizy ryzyka i dokonanie korekt;
8) przeprowadzenie oceny klinicznej i dokonanie korekt;
9) sporządzenie dokumentacji technicznej, deklaracji zgodności;
10) wybór jednostki notyfikowanej i złożenie wniosku do jednostki;
11) wprowadzenie korekt wymaganych przez jednostkę notyfikowaną;
12) oznakowanie znakiem CE (z numerem jednostki notyfikowanej).

Po wykonaniu oceny zgodności wytwórca wyrobu medycznego na 14 dni przed wprowadzeniem wyrobu medycznego do obrotu ma obowiązek dokonania zgłoszenia do Prezesa Urzędu. Zgłoszenie i powiadomienie nie stanowią decyzji administracyjnej. Uzyskanie wpisu do bazy prowadzonej przez Prezesa Urzędu nie jest potwierdzeniem skuteczności i bezpieczeństwa używania danego wyrobu medycznego. Obowiązek spoczywający na wytwórcach wyrobów medycznych oraz innych podmiotach obwarowany jest przepisami karnymi. Informacje pochodzące ze zgłoszeń i powiadomień służą Prezesowi Urzędu do skutecznego sprawowania nadzoru nad wyrobami medycznymi, m.in. w przypadku wystąpienia incydentów medycznych.

LITERATURA

[1] Dyrektywa Rady 90/385/EEC z dnia 20 czerwca 1990 r. w sprawie zbliżenia ustawodawstwa państw członkowskich odnoszących się do wyrobów medycznych aktywnego osadzania (Dz.U. L 189 z 20.7.1990, s. 17).
[2] Dyrektywa Rady 93/42/EEC z dnia 14 czerwca 1993 r. dotycząca wyrobów medycznych (Dz.U. L 169 z 12.07.1993).
[3] Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 98/79/CE z dnia 27 października 1998 r. w sprawie wyrobów medycznych używanych do diagnozy *in vitro* (Dz.Urz.UE.L.1998.331.1, z późn. zm.).
[4] Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2017/745 z dnia 5 kwietnia 2017 r. w sprawie wyrobów medycznych, zmiany dyrektywy 2001/83/CE, rozporządzenia (CE) nr 178/2002 i rozporządzenia (CE) nr 1223/2009 oraz uchylenia dyrektyw Rady 90/385/ECC i 93/42/ECC.
[5] Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2017/746 z dnia 5 kwietnia 2017 r. w sprawie wyrobów medycznych do diagnostyki *in vitro* oraz uchylenia dyrektywy 98/79/WE i decyzji Komisji 2010/227/UE.
[6] Ustawa z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych, Dz.U. 2010, nr 107, poz. 679.
[7] Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 17 lutego 2016 r. w sprawie wymagań zasadniczych oraz procedur oceny zgodności wyrobów medycznych, Dz.U. 2016, poz. 211.
[8] Ustawa Prawo farmaceutyczne z dnia 6 września 2001 r., Dz.U. 2001, Nr 126, poz. 1381.

eISBN 978-83-66531-58-1

Cracow University
of Technology