



AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

DZIEDZINA NAUKI INŻYNIERYJNO-TECHNICZNE

DYSCYPLINA INŻYNIERIA MATERIAŁOWA

ROZPRAWA DOKTORSKA

*Biodegradowalne, wielofunkcyjne materiały
kompozytowe dla inżynierii tkankowej*

Autor: Kamila Chęcińska

Promotor rozprawy: dr hab. inż. Katarzyna Cholewa-Kowalska, prof. AGH

Promotor pomocniczy: dr hab. inż. Michał Dziadek

Praca wykonana: Akademia Górniczo-Hutnicza im. S. Staszica w Krakowie,
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki

Kraków, 2025



AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

FIELD OF SCIENCE ENGINEERING AND TECHNICAL SCIENCES

SCIENTIFIC DISCIPLINE MATERIALS ENGINEERING

DOCTORAL DISSERTATION

*Biodegradable, multifunctional composite materials
for tissue engineering*

Author: Kamila Chęcińska

First supervisor: dr hab. inż. Katarzyna Cholewa-Kowalska, prof. AGH

Auxiliary supervisor: dr hab. inż. Michał Dziadek

Completed at: AGH University of Science and Technology,
Faculty of Materials Science and Ceramics

Kraków, 2025

Chciałabym serdecznie podziękować Pani dr hab. inż. Katarzynie Cholewie-Kowalskiej prof. AGH za Jej nieocenione wsparcie, cenne uwagi i cierpliwość, które pozwoliły mi pokonać wszelkie trudności podczas pracy nad tą rozprawą. Moje szczególne podziękowania kieruję również do Pana dr hab. inż. Michała Dziadka za merytoryczne wskazówki oraz pomoc w krytycznych momentach tego procesu.

Dziękuję mojej Rodzinie za bezgraniczną cierpliwość, zrozumienie i niezachwiane wsparcie.

SPIS TREŚCI

Wstęp.....	9
1. Regeneracja tkanki kostnej.....	11
1.1. Strategie regeneracji tkanki kostnej i ich ograniczenia.....	12
1.1.1. Przeszczepy.....	13
1.1.2. Materiały alloplastyczne dla inżynierii tkankowej.....	16
1.1.3. Współczesne wyzwania stawiane materiałom alloplastycznym.....	25
1.1.4. Wzbogacanie materiałów alloplastycznych substancjami aktywnymi.....	25
1.1.5. Związki polifenolowe jako naturalne substancje aktywne biologicznie.....	27
1.1.6. Koncepcja wykorzystania związków polifenolowych jako substancji aktywnych w biomateriałach do regeneracji tkanki kostnej.....	32
2. Cele i hipotezy pracy.....	35
3. Materiały i metody.....	37
3.1. Przygotowanie ekstraktów roślinnych.....	37
3.2. Zastosowane polimery.....	39
3.3. Wytworzenie bioaktywnych szkieł.....	39
3.4. Modyfikacja wielościennych nanorurek węglowych.....	42
3.5. Otrzymywanie materiałów kompozytowych.....	42
3.6. Metody analizy materiałów.....	44
3.6.1. Mikrostruktura.....	44
3.6.2. Topografia, zwilżalność oraz energia powierzchniowa.....	44
3.6.3. Właściwości mechaniczne.....	44
3.6.4. Analiza termiczna.....	45
3.6.5. Analiza masy cząsteczkowej.....	46
3.6.6. Spektroskopia Ramana.....	47
3.6.7. Właściwości bioaktywne.....	47
3.6.8. Właściwości antyoksydacyjne.....	48
3.6.9. Właściwości cytotoksyczne.....	49
4. Wyniki i dyskusja.....	51
4.1. Kompozyty o osnowie poli(ϵ -kapolakton) oraz kopolimeru glikolidu i laktydu modyfikowane cząstkami bioaktywnego szkła.....	51
4.2. Kompozyty modyfikowane bioaktywnymi szklami o zróżnicowanym składzie chemicznym i właściwościach teksturalnych.....	88

4.3. Kompozyty modyfikowane nanorurkami węglowymi	112
5. Badania długoterminowej degradacji hydrolitycznej	126
5.1. Warunki prowadzenia eksperymentów	127
5.2. Wyniki badań i wnioski	128
5.3. Właściwości biologiczne	146
6. Podsumowanie i wnioski.....	163
7. Bibliografia	167

WSTĘP

Rozwój biomateriałów przeznaczonych do regeneracji tkanki kostnej jest jednym z kluczowych obszarów współczesnej inżynierii biomedycznej, zyskującym na znaczeniu w odpowiedzi na rosnące wyzwania zdrowotne, wynikające z dynamicznie zmieniających się warunków demograficznych i cywilizacyjnych [1]. Wydłużenie średniej długości życia prowadzi do rozwoju niektórych chorób cywilizacyjnych, mających bezpośredni wpływ na jakość tkanki kostnej. Wśród nich znajdują się: osteoporoza, zwyrodnienia kości czy nowotwory. Dodatkowo, postęp cywilizacyjny, zmiana trybu życia oraz wzrastająca liczba wypadków komunikacyjnych przyczyniają się do zwiększenia liczby urazów, prowadzących do rozległych ubytków tkanki kostnej, które wymagają zaawansowanych metod leczenia.

W kontekście tych zmian kluczowym zadaniem staje się projektowanie wielofunkcyjnych biomateriałów, które będą spełniać złożone wymagania regeneracji tkanki kostnej. Niniejsza praca w pierwszym rozdziale przedstawia analizę wyzwań, aktualnych trendów oraz potencjalnych kierunków rozwoju w odniesieniu do biomateriałów przeznaczonych do regeneracji tkanki kostnej. Kolejne rozdziały prezentują rezultaty badań własnych, dotyczących projektowania i wytwarzania wielofunkcyjnych, bioresorbowalnych materiałów kompozytowych, wzbogaconych związkami polifenolowymi wraz z oceną możliwości kontrolowania właściwości materiałowych i biologicznych.

1. REGENERACJA TKANKI KOSTNEJ

Tkanka kostna jest dynamiczną i wysoce zorganizowaną strukturą, odgrywającą kluczową rolę w homeostazie organizmu, dzięki zdolności do przebudowy, gojenia i regeneracji. Właściwości te są fundamentalne dla utrzymania integralności strukturalnej i funkcjonalności układu kostnego człowieka przez całe życie.

Tkanka kostna jest zaliczana do tkanki łącznej, w której w wyniku mineralizacji substancji międzykomórkowej powstaje kompozyt nieorganiczno-organiczny. Głównym składnikiem nieorganicznym tego kompozytu jest hydroksyapatyt, odpowiadający za twardość oraz wytrzymałość mechaniczną kości. Składnik organiczny stanowi przede wszystkim kolagen typu I, który nadaje kości elastyczność i odporność na rozciąganie.

Struktura kości dzieli się na dwie zasadnicze warstwy: zbitą (korową) i beleczkowatą (gąbczastą). Kość zbita, stanowiąca około 80% masy całej kości, charakteryzuje się dużą gęstością i wysoką wytrzymałością mechaniczną. Ta zewnętrzna warstwa pełni funkcję ochronną oraz zapewnia szkieletowi stabilność strukturalną. Wewnętrzna warstwa, czyli kość beleczkowata, jest znacznie bardziej porowata i mniej gęsta, co umożliwia jej absorpcję wstrząsów oraz redystrybucję sił mechanicznych działających na kość. Struktura beleczkowa, skonstruowana z wielu beleczek kostnych, tworzy złożoną sieć przestrzenną, dzięki której kości osiągają optymalne właściwości mechaniczne przy zmniejszonej masie.

W tkance kostnej obecne są różnorodne typy komórek, które pełnią zróżnicowane, lecz wzajemnie komplementarne funkcje w jej przebudowie. Osteoblasty odpowiadają za syntezę macierzy kostnej oraz jej mineralizację. Osteoklasty z kolei są odpowiedzialne za procesy resorpcji kości, co jest niezbędne dla jej ciągłej przebudowy oraz regulacji poziomu wapnia we krwi. Osteocyty, będące dojrzałymi formami osteoblastów, pełnią rolę mechanosensorów i są kluczowe dla utrzymania homeostazy mineralnej tkanki kostnej. Ponadto, w kości obecne są osteogenne komórki prekursorowe, które stanowią źródło nowych osteoblastów i odgrywają istotną rolę w procesach regeneracyjnych [2].

W przypadku uszkodzenia tkanki kostnej uruchamiany jest złożony proces gojenia, który przebiega w kilku etapach: faza zapalna, formowanie kostniny oraz jej stopniowe przekształcanie w dojrzałą tkankę kostną. Kluczowym elementem tego procesu jest odpowiednia stabilizacja miejsca złamania, co zapewnia optymalne warunki do regeneracji. Mimo że kości mają znaczną zdolność do samoregeneracji, w niektórych przypadkach uszkodzenia przekraczają tzw. krytyczny rozmiar defektu, co uniemożliwia samoczynne

zagojenie się tkanki. Może to wynikać z niedostatecznego unaczynienia, co ogranicza efektywny transport składników odżywczych i komórek naprawczych do miejsca urazu, hamując tym samym proces naprawy. Dodatkowo, niestabilność miejsca urazu, poddawanie go nadmiernym siłom mechanicznym oraz czynniki wtórne, takie jak infekcje, mogą znacząco utrudniać prawidłowe gojenie [3]. Szczególnie trudne do leczenia są duże segmentowe ubytki kostne, które ze względu na swój rozmiar, rolę nośną w szkielecie oraz często skomplikowany kształt, stanowią poważne wyzwanie terapeutyczne. W takich sytuacjach konieczne staje się zastosowanie zaawansowanych metod terapeutycznych, które wspierają regenerację tkanki, w tym nowoczesnych technik chirurgicznych, innowacyjnych biomateriałów oraz terapii biologicznych. W dalszej części omówione zostaną aktualnie stosowane strategie regeneracji tkanki kostnej, w tym również podejście oparte na inżynierii tkankowej, które otwiera nowe perspektywy dla rozwoju efektywnych metod leczenia.

1.1. STRATEGIE REGENERACJI TKANKI KOSTNEJ I ICH OGRANICZENIA

W poprzednim rozdziale omówiono trudności związane z regeneracją tkanki kostnej, które wynikają między innymi z niewystarczającej stabilności odłamów kostnych po urazach. Aby zapewnić odpowiednią stabilizację, powszechnie stosuje się różnorodne biomateriały w postaci śrub, płytek, drutów oraz innych implantów, które służą do łączenia i stabilizowania odłamów kostnych. Tego typu elementy są zazwyczaj wykonane z materiałów metalicznych, takich jak stopy tytanu czy stal nierdzewna, ze względu na ich właściwości mechaniczne. Niemniej, implanty metalowe często muszą być usuwane po zakończeniu leczenia z uwagi na ryzyko wywołania niepożądanych reakcji organizmu, takich jak stany zapalne czy reakcje alergiczne [4]. Szczegółowa analiza tego problemu wykracza jednak poza ramy niniejszej pracy.

W niniejszej pracy główny nacisk położono na rozwój biomateriałów przeznaczonych do leczenia ubytków tkanki kostnej, którym towarzyszą w szczególności choroby nowotworowe, infekcje bakteryjne, przewlekłe stany zapalne. W dalszej części pracy zostaną omówione obecnie stosowane standardy postępowania w leczeniu rozległych ubytków tkanki kostnej (zarówno reparacji jak i regeneracji), ze szczególnym uwzględnieniem ich wad oraz wyzwań, które stawiają przed nauką i medycyną. Przedstawiona analiza pozwoli na lepsze zrozumienie ograniczeń współczesnych metod oraz wskaże kierunki, w jakich rozwija się inżynieria biomateriałów w celu przezwyciężenia tych trudności.

1.1.1. PRZESZCZEPY

Przeszczepy kości są powszechnie uznawane za złoty standard w leczeniu rozległych ubytków tkanki kostnej, zwłaszcza w przypadkach wymagających kompleksowej rekonstrukcji. Metody te są szeroko stosowane w ortopedii rekonstrukcyjnej ze względu na ich zdolność do wspierania naturalnych procesów regeneracyjnych kości.

PRZESZCZEPY KSENOGENNE

Przeszczepy ksenogenne, czyli przeszczepy pochodzenia zwierzęcego, są ważną gałęzią medycyny regeneracyjnej. Ze względu na ich biozgodność oraz właściwości osteokonduktywne i osteogenne, materiały te są często stosowane w rekonstrukcji ubytków kostnych. Kostne substytuty pochodzenia zwierzęcego są poddawane procesom, takim jak obróbka termiczna, radiacyjna czy chemiczna, aby zredukować obecność organicznych komponentów, które mogą wywołać niepożądane reakcje w organizmie biorcy. Jednakże, mimo wielu zalet, przeszczepy ksenogenne mogą wiązać się z ryzykiem przenoszenia chorób zwierzęcych na ludzi oraz obecnością resztek antygenów, co może prowadzić do odpowiedzi immunologicznej i stanowić wyzwanie dla długoterminowej integracji z tkankami biorcy [5].

AUTOPRZESZCZEPY

Autoprzeszczepy, czyli przeszczepy tkanki kostnej pobranej od samego pacjenta, są uważane za najbardziej efektywną metodę rekonstrukcji ubytków kostnych. Wynika to z faktu, że przeszczepiona tkanka stymuluje naturalny proces regeneracji kości, wspierając osteogenezę i osteokondukcję, przy jednoczesnym braku ryzyka reakcji immunologicznych. Mimo licznych zalet, autoprzeszczepy mają swoje wady. Pobranie tkanki kostnej, najczęściej z talerza biodrowego, jest zabiegiem inwazyjnym, który wiąże się z dodatkowym obciążeniem dla pacjenta. Procedura ta może prowadzić do powikłań, takich jak ból, infekcje, krwiaki oraz złamania w miejscu pobrania. Operacja jest skomplikowana, wymaga precyzyjnego wykonania, co zwiększa koszty leczenia i wydłuża czas rekonwalescencji pacjenta [6]. Ponadto, ilość dostępnej tkanki do przeszczepu jest ograniczona, co może stanowić problem w przypadku dużych ubytków kostnych.

KOŚĆ LUDZKA ALLOGENNA

Przeszczepy allogenne, czyli przeszczepy pochodzące z banku tkanek i komórek, są cenione w terapii rekonstrukcji ubytków kostnych ze względu na zdolność wiernego odwzorowania struktury i funkcji zastępowanych tkanek. Jednak ich zastosowanie wiąże się z istotnymi wyzwaniami klinicznymi i etycznymi. Aby zminimalizować ryzyko odrzutu przeszczepu, niezbędne jest precyzyjne dopasowanie tkankowe oraz długotrwała terapia immunosupresyjna, która znacząco obciąża organizm pacjenta i zwiększa

prawdopodobieństwo powikłań. Poza tym procedurze towarzyszy ryzyko przeniesienia patogenów i chorób z dawcy na biorcę, co może prowadzić do poważnych komplikacji zdrowotnych. Niemniej ważne pozostają również kwestie etyczne związane z pozyskiwaniem materiału biologicznego, co dodatkowo komplikuje stosowanie przeszczepów allogennyh [6].

Do istotnych wad wszystkich typów przeszczepów należy także brak możliwości modyfikowania ich właściwości, takich jak na przykład nadanie im działania antybakteryjnego czy przeciwzapalnego. Pomimo wysokiej skuteczności przeszczepów w odbudowie tkanki kostnej, wszystkie wyżej wymienione ograniczenia skłaniają do poszukiwania alternatywnych rozwiązań, w tym biomateriałów, które mogą pełnić funkcję rusztowania dla regenerujących się tkanek. Regeneracja ta umożliwia odtworzenie tkanek o identycznej strukturze i funkcji, co minimalizuje ryzyko powikłań i nieprawidłowości. **W ostatnich latach, w odpowiedzi na te wyzwania, intensywnie rozwija się inżynieria tkankowa (ang. *tissue engineering*), której celem jest tworzenie optymalnych warunków dla procesów regeneracyjnych. Kluczowym elementem tej dziedziny są biomateriały, które pełnią funkcję tymczasowego rusztowania, wspierając migrację komórek, ich proliferację oraz syntezę macierzy zewnątrzkomórkowej.**

Biomateriał to materiał pochodzenia naturalnego lub syntetycznego, przeznaczony do interakcji z układem biologicznym w celu pełnienia określonej funkcji terapeutycznej, diagnostycznej lub regeneracyjnej. Ponieważ ma on kontakt z organizmem żywym, musi spełniać szereg wymagań, które potwierdzą jego skuteczność i bezpieczeństwo kliniczne. Definicja ta i warunki, jakie spełniać muszą biomateriały, ewoluowały na przestrzeni ostatnich dekad- od materiałów zastępujących tkanki, po zaawansowane struktury aktywnie wspierające procesy regeneracyjne.

Biomateriały pierwszej generacji charakteryzowały się pięcioma głównymi cechami: **nietoksycznością, niekancerogennością, nietrombogennością, niemutagennością i brakiem właściwości alergizujących**, co łącznie określano mianem **biozgodności**. Ich głównym zadaniem było zastępowanie uszkodzonych tkanek lub narządów przy zachowaniu **bioinertności**, czyli obojętności wobec organizmu, tak aby nie wywoływały niekorzystnych reakcji ani nie wchodziły w interakcje z otaczającą tkanką. Ich integracja z organizmem ograniczała się do pasywnego wbudowania w tkankę, bez aktywnego udziału w procesach biologicznych. Z czasem jednak zauważono, że obecność biomateriału prowadzi do zmian w budowie i właściwościach otaczających tkanek oraz indukuje reakcje obronne organizmu. W ich wyniku wokół implantu tworzy się otoczka włóknista, której zadaniem jest izolacja biomateriału od tkanki gospodarza. **Obserwacje te doprowadziły do redefinicji pojęcia**

biozgodności, obejmując nim nie tylko brak negatywnych reakcji, ale także zdolność do aktywnego oddziaływania z tkankami w celu wywołania korzystnych efektów.

W odpowiedzi na to podejście opracowano biomateriały drugiej generacji, których zadaniem jest wspieranie funkcji tkanek gospodarza poprzez aktywność sprzyjającą uzyskaniu efektu terapeutycznego. Do tej grupy zaliczają się **materiały bioaktywne**, takie jak bioaktywne szkła i hydroksyapatyt, które – dzięki zdolności do tworzenia wiązań chemicznych z tkanką kostną – integrują się z nią bez wytwarzania otoczki włóknistej. Kolejną kategorię biomateriałów drugiej generacji stanowią polimery resorbowalne, które stopniowo ulegają degradacji w organizmie. Powstające w tym procesie produkty degradacji zostają włączone w naturalne szlaki metaboliczne i ostatecznie wydalone, co zmniejsza ryzyko długoterminowych powikłań.

Wprowadzenie biomateriałów trzeciej generacji stanowi kolejny krok w kierunku zaawansowanych strategii regeneracyjnych inżynierii tkankowej, w której biomateriały nie tylko wspierają odbudowę tkanek, ale także aktywnie modulują procesy biologiczne na poziomie komórkowym i molekularnym. Te zaawansowane materiały są zdolne do interakcji z białkami i komórkami w sposób precyzyjny, sterując procesami regeneracji w sposób analogiczny do naturalnych mechanizmów komunikacji komórkowej w tkankach. Przestrzenna struktura oraz odpowiednia porowatość tych materiałów odgrywają także kluczową rolę, zapewniając wsparcie mechaniczne dla nowo powstającej tkanki. Zatem nadrzędnym celem biomateriałów trzeciej generacji jest nie tylko zastąpienie brakującej tkanki na początkowym etapie, ale przede wszystkim aktywne stymulowanie procesów regeneracyjnych, prowadzących do odtworzenia tkanek o pełnej funkcjonalności, zbliżonej do tkanki pierwotnej [7].

W klasycznym podejściu inżynierii tkankowej, komórki są umieszczane na biodegradowalnym rusztowaniu (ang. *scaffold*), które pełni rolę tymczasowej podpory. Komórki te są następnie hodowane *in vitro* w bioreaktorze, gdzie przez kilka tygodni dochodzi do ich proliferacji, aktywacji oraz produkcji składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Po zakończeniu tego etapu, powstała struktura, łącząca biomateriał z nową tkanką, jest wszczepiana w odpowiednie miejsce w organizmie. Rusztowanie ulega stopniowej degradacji w trakcie integracji z otaczającymi tkankami, umożliwiając pełną regenerację tkanki w miejscu implantacji. Proces ten prowadzi do odtworzenia struktury i funkcji tkanki, które są zbliżone do pierwotnej tkanki.

Alternatywne podejście w inżynierii tkankowej zakłada, że biomateriały mogą nie tylko wspierać proces regeneracji, ale także aktywnie stymulować i ukierunkowywać wzrost nowej tkanki. W metodzie *in vivo* biomateriał jest implantowany bezpośrednio w organizmie

pacjenta, w którym tworzy środowisko sprzyjające migracji, osiedlaniu się i różnicowaniu komórek endogennych, czyli tych naturalnie występujących w organizmie. Dzięki temu nie ma potrzeby wcześniejszej hodowli komórek w warunkach laboratoryjnych. Kluczową rolą biomateriału jest pełnienie funkcji tymczasowej macierzy zewnątrzkomórkowej, która wspiera proces regeneracji, poprzez dostarczanie odpowiedniej struktury i sygnałów biologicznych. Wraz z postępem odbudowy tkanki, biomateriał ulega degradacji lub się przebudowuje, pozostawiając przestrzeń dla nowo powstałej, autologicznej tkanki kostnej [8].

W obydwu podejściach biomateriał odgrywa kluczową rolę jako tymczasowa struktura wspierająca procesy regeneracyjne, jednak jego degradacyjność jest cechą fundamentalną dla skuteczności terapii. Degradacja biomateriału to proces jego stopniowego rozpadu pod wpływem czynników biologicznych, chemicznych lub fizycznych, prowadzący do utraty integralności strukturalnej. Kluczowym aspektem w inżynierii tkankowej jest kontrolowana degradacja, która zapewnia, że biomateriał stopniowo zanika w tempie dostosowanym do odbudowy tkanki, zapobiegając zarówno przedwczesnej utracie stabilności mechanicznej, jak i nadmiernemu zaleganiu w organizmie.

Szczególną formą degradacji jest bioresorpcja, czyli proces, w którym produkty rozpadu biomateriału nie tylko ulegają wchłonięciu przez organizm, ale również zostają aktywnie włączone w jego cykl metaboliczny. Jest to cecha kluczowa dla biomateriałów stosowanych w inżynierii tkankowej, ponieważ pozwala na ich całkowite zastąpienie przez nowo powstającą, autologiczną tkankę. Należy zaznaczyć, że materiały biodegradowalne charakteryzuje zmienność struktury i właściwości w zależności od upływu czasu, co powoduje, że układ biomateriał/tkanka jest dynamiczny.

1.1.2. MATERIAŁY ALLOPLASTYCZNE DLA INŻYNIERII TKANKOWEJ

W ramach kontynuacji przeglądu aktualnych strategii w regeneracji tkanki kostnej, szczególną uwagę należy poświęcić biomateriałom alloplastycznym, które odgrywają kluczową rolę w inżynierii tkankowej. W kolejnych podrozdziałach niniejszej rozprawy zostaną omówione oraz szczegółowo scharakteryzowane biodegradowalne materiały alloplastyczne, stosowane w inżynierii tkankowej, co pozwoli na dogłębne zrozumienie ich właściwości, obecnego stanu wiedzy oraz kierunków rozwoju w obszarze inżynierii tkankowej.

1.1.2.1 MATERIAŁY POLIMEROWE

Biodegradowalne biomateriały z grupy polimerów stosowane w regeneracji tkanki kostnej można sklasyfikować na dwie główne kategorie: polimery pochodzenia naturalnego oraz syntetycznego.

Wśród polimerów naturalnych, szczególne znaczenie mają białka- m.in. takie jak żelatyna i kolagen, a także polisacharydy takie jak m.in. celuloza, chitozan, kwas hialuronowy czy proteoglikany, które są nieodłącznym składnikiem macierzy międzykomórkowej organizmów żywych. Polimery pochodzenia naturalnego wykazują istotną aktywność biologiczną, która sprzyja adhezji, proliferacji oraz migracji komórek, co jest kluczowe dla efektywnej regeneracji tkanki. Niemniej ich zastosowanie ograniczają istotne czynniki, takie jak potencjalne ryzyko wywołania odpowiedzi immunologicznej z powodu obcego pochodzenia materiału oraz niejednorodności strukturalnej, które mogą prowadzić do braku powtarzalności w wynikach klinicznych. Z tego powodu optymalizacja właściwości tych biomateriałów oraz rozwój nowych, bardziej przewidywalnych rozwiązań, stanowią istotne wyzwania współczesnej inżynierii biomateriałów [9], [10].

Z uwagi na liczne trudności związane z zastosowaniem biodegradowalnych polimerów naturalnych w inżynierii tkankowej, coraz częściej preferuje się wykorzystanie bioresorbowalnych polimerów syntetycznych. Poliestry alifatyczne zyskały szczególną popularność jako materiał inżynieryjny w tej dziedzinie. W porównaniu z polimerami pochodzenia naturalnego, syntetyczne poliestry alifatyczne oferują szereg istotnych korzyści. Przede wszystkim, można je otrzymywać z monomerów o bardzo wysokim stopniu czystości, co zapewnia wysoką jakość końcowego materiału. Dodatkowo, ich właściwości fizykochemiczne można precyzyjnie kontrolować, co umożliwia ich dostosowanie do specyficznych wymagań aplikacyjnych. Należy zwrócić uwagę, że poliestry alifatyczne podlegają procesowi degradacji, w wyniku którego rozkładają się na związki, takie jak kwas mlekowy i kwas glikolowy, które naturalnie występują w organizmie i są metabolizowane w cyklu Krebsa, oraz kwas kapronowy, który może zostać dalej przekształcony i wydalony. Warto jednak zaznaczyć, że czas trwania degradacji tych polimerów może się różnić w zależności od konkretnego materiału [11].

Poliestry alifatyczne stanowią zróżnicowaną grupę materiałów, które ze względu na swoją budowę chemiczną dzielą się na homopolimery i kopolimery. Różnice w ich strukturze mają istotne znaczenie dla właściwości fizykochemicznych, a tym samym dla ich zastosowań w inżynierii tkankowej. Do najczęściej stosowanych homopoliestrów należą poliglikolid (PGA), polilaktyd (PLA), poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) oraz polidioksanon (PDO), które składają się z jednego rodzaju monomeru. Aby uzyskać materiały o bardziej precyzyjnie

dostosowanych właściwościach, szczególnie pod względem cech mechanicznych oraz degradacyjnych, stosuje się kopolimery, takie jak kopolimer glikolidu i laktydu (PLGA) czy poli(ϵ -kaprolakton-co-laktyd). Kopolimery umożliwiają modyfikację właściwości materiału, co pozwala na odpowiednie dopasowanie do specyficznych zastosowań. Dzięki możliwości kontrolowania składu kopolimerów można modyfikować ich właściwości mechaniczne oraz szybkość biodegradacji, aby zapewnić im większą wszechstronność.

W ramach niniejszej pracy zdecydowano się na wybór materiałów o zróżnicowanych właściwościach, aby móc dokonać kompleksowej wielopłaszczyznowej oceny funkcjonalności projektowanych i wytwarzanych biomateriałów. Zastosowano homopolimer poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) oraz kopolimer kopolimer glikolidu i laktydu (PLGA), które różnią się przede wszystkim stopniem krystaliczności i czasem degradacji.

POLI(ϵ -KAPROLAKTON) (PCL)

Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL), ze względu na swoje biokompatybilne oraz biodegradowalne właściwości, jest powszechnie stosowanym alifatycznym polimerem w dziedzinie inżynierii tkankowej. Jego znaczenie jako materiału jest szczegółowo omawiane i wykorzystywane w niniejszej pracy. Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) powstaje w wyniku polimeryzacji z otwarciem pierścienia ϵ -kaprolaktonu. Uzyskany materiał ma półkrystaliczną strukturę i charakteryzuje się temperaturą topnienia na poziomie 59-64°C. PCL posiada moduł elastyczności w granicach 300-400 MPa, co czyni go stosunkowo elastycznym tworzywem, doskonałym do budowy rusztowań wspomagających wzrost komórek oraz regenerację tkanek [12].

Czas degradacji PCL w warunkach *in vivo* wynosi zwykle od 2 do 4 lat – zależnie od masy cząsteczkowej, kształtu, porowatości materiału i środowiska, w którym się znajduje. Wydłużony czas degradacji sprawia, że PCL jest szczególnie przydatny w aplikacjach wymagających długoterminowego podparcia, takich jak regeneracja tkanek kostnych. PCL cechuje się dobrą rozpuszczalnością w rozpuszczalnikach organicznych, takich jak chloroform, dichlorometan oraz aceton. Ta właściwość umożliwia efektywne przetwarzanie PCL w różnych metodach, w tym elektroprzędzeniu oraz technologii druku 3D. Ze względu na swoje cechy, PCL jest powszechnie wykorzystywany w produkcji trójwymiarowych rusztowań, które imitują macierz zewnątrzkomórkową, wspierając wzrost i organizację komórek w procesie regeneracji tkanek [13], [14].

KOPOLIMER GLIKOLIDU I LAKTYDU (PLGA)

Drugim materiałem użytym w badaniach był kopolimer PLGA, składający się z 85% kwasu mlekowego i 15% kwasu glikolowego. PLGA (kopolimer glikolidu i laktydu) jest powszechnie stosowany w inżynierii tkankowej ze względu na swoje właściwości mechaniczne,

biodegradowalność oraz możliwość dostosowywania tempa degradacji do wymagań konkretnych zastosowań.

Kopolimer PLGA charakteryzuje się wysoką wytrzymałością mechaniczną, z modułem elastyczności w zakresie 1-2 GPa oraz wytrzymałością na rozciąganie od 50 do 100 MPa. PLGA wykazuje umiarkowane tempo degradacji, co jest szczególnie ważne w kontekście długoterminowych aplikacji biomedycznych. Degradacja kopolimeru trwa od 6 do 12 miesięcy, a całkowity rozkład w organizmie zajmuje 12 do 24 miesięcy. Tempo to jest uzależnione od stosunku kwasu mlekowego do glikolowego – wyższa zawartość kwasu mlekowego powoduje wolniejsze tempo degradacji [15].

Polimery biodegradowalne z grupy poliestrów alifatycznych, pomimo licznych korzystnych właściwości, nie posiadają na swojej powierzchni ligandów, które mogłyby wiązać się z receptorami komórkowymi [8]. W związku z tym konieczne jest wprowadzenie modyfikacji powierzchniowych lub opracowanie kompozytów na bazie polimerów, wzbogaconych o bioaktywne napełniacze, które mogą wspomagać interakcje z komórkami. Takie kompozyty będą miały zwiększoną zdolność do integracji z tkanką oraz efektywniejszego wspierania procesów regeneracyjnych.

Modyfikacja powierzchni biopolimerów alifatycznych stanowi istotny obszar badań w kontekście poprawy ich właściwości bioaktywnych, zwłaszcza w zastosowaniach medycznych, takich jak inżynieria tkankowa i materiały implantacyjne. W literaturze dostępnych jest wiele przykładów zastosowania różnorodnych metod funkcjonalizacji, takich jak chemiczne, fizyczne i biologiczne modyfikacje, które mają na celu zwiększenie adhezji komórek, wspomaganie procesów regeneracyjnych oraz kontrolowanie odpowiedzi immunologicznej organizmu gospodarza [16]. Do najczęściej stosowanych metod należą immobilizacja czynników wzrostu, nanostrukturyzacja powierzchni, czy pokrywanie biopolimerów warstwami aktywnymi, takimi jak hydrożele, które zawierają bioaktywne cząsteczki.

Jednak, mimo licznych sukcesów w obszarze modyfikacji powierzchniowej, działanie takich materiałów ma ograniczoną skuteczność w długoterminowej perspektywie. Główne trudności wynikają z faktu, że biopolimery alifatyczne, takie jak poli(ϵ -kaprolakton) czy polilaktyd, ulegają degradacji w organizmie. Degradacja ta prowadzi do stopniowego zmniejszania grubości oraz zanikaniu warstw funkcjonalnych, które zostały wcześniej nałożone na powierzchnię materiału. W miarę rozkładu polimeru, aktywna warstwa wspomagająca regenerację tkanek staje się coraz cieńsza, a jej skuteczność w promowaniu naprawy tkankowej maleje.

Co więcej, dodatkowym ograniczeniem jest nietrwałość takich modyfikacji w obliczu mechanicznych i chemicznych obciążeń, którym materiał jest poddawany w trakcie zabiegu implantacyjnego oraz w początkowej fazie po jego wprowadzeniu do organizmu. Podczas implantacji materiały te mogą ulegać uszkodzeniom na skutek tarcia, naprężeń lub kontaktu z instrumentami chirurgicznymi, co znacząco obniża efektywność warstwy bioaktywnej. W związku z tym istnieje potrzeba opracowania nowych strategii, które pozwolą na bardziej trwałe i efektywne modyfikacje biopolimerów, odporne na procesy mechaniczne oraz degradacyjne. To umożliwi przedłużenie ich bioaktywności i skuteczniejsze wspomaganie procesów regeneracyjnych na różnych etapach interakcji z tkankami.

1.1.2.2 MATERIAŁY CERAMICZNE

Bioceramika odgrywa kluczową rolę w nowoczesnej inżynierii biomateriałów, oferując szeroki zakres zastosowań w regeneracji oraz odbudowie tkanek. W zależności od mechanizmu działania, materiały ceramiczne mogą być klasyfikowane jako: inertne (np. tlenek cyrkonu), bioaktywne (np. szkła bioaktywne, hydroksyapatyt) oraz bioresorbowalne (np. trójfosforan wapnia, szkła fosforanowe).

HYDROKSYAPATYT (HAP)

Hydroksyapatyt (HAp) jest fosforanem wapnia o wzorze chemicznym $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, będącym głównym mineralnym składnikiem tkanek twardych. Jego stosunek molowy wapnia do fosforu wynosi 1,67, co zapewnia mu stabilność termodynamiczną w warunkach fizjologicznych. Pod względem właściwości mechanicznych hydroksyapatyt wykazuje wysoką twardość, lecz jego kruchość i niska odporność na pękanie ograniczają zastosowania w strukturach poddawanych intensywnym obciążeniom. Pomimo tego HAp odznacza się wysoką **osteokondukcyjnością**, co oznacza, że stanowi rusztowanie sprzyjające migracji osteoblastów i tworzeniu nowej tkanki kostnej. Mechanizm jego interakcji z organizmem obejmuje adsorpcję białek macierzy zewnątrzkomórkowej, wiązanie czynników wzrostu oraz inicjację odpowiedzi osteogennych, poprzez aktywację szlaków sygnałowych zależnych od integryn. Ponadto, HAp posiada wysokie powinowactwo do jonów wapniowych i fosforanowych, co umożliwia kontrolowaną nukleację i wzrost biomimetycznej fazy krystalicznej na jego powierzchni, sprzyjając biointegracji z tkanką kostną [17] [18].

FOSFORAN TRÓJWAPNIOWY (TCP)

Trójwapniowy fosforan wapnia (TCP) należy do grupy bioresorbowalnych fosforanów wapnia o stosunku molowym Ca:P poniżej 1,5. Występuje w dwóch głównych odmianach

polimorficznych: α -TCP, cechującym się wysoką rozpuszczalnością i krótkim czasem resorpcji, oraz β -TCP, który degradowuje się wolniej, zapewniając dłuższe wsparcie dla regenerującej się tkanki kostnej. Zdolność TCP do osteokondukcji wynika z jego chemicznego i strukturalnego podobieństwa do mineralnych składników kości, co umożliwia integrację z tkanką i stopniową wymianę na nowo tworzoną kość. Na szybkość resorpcji TCP wpływają liczne czynniki, w tym między innymi stopień krystaliczności, porowatość oraz obecność defektów strukturalnych. W celu optymalizacji właściwości degradacyjnych często stosuje się ceramikę dwufazową (BCP), łączącą β -TCP z hydroksyapatytem (HAp). To pozwala na precyzyjne dostosowanie tempa resorpcji do specyficznych zastosowań klinicznych. Pomimo korzystnych właściwości biologicznych, ograniczenia w zastosowaniu TCP wynikają z jego niskiej wytrzymałości mechanicznej oraz wysokiej kruchości. Wymaga to modyfikacji składu lub łączenia z innymi materiałami w celu poprawy parametrów mechanicznych.

SZKŁA BIOAKTYWNE

Wśród szkieł bioaktywnych wyróżnia się szkła krzemianowe, boranowe i fosforanowe, przy czym szkła krzemianowe stanowią najliczniejszą i najlepiej poznaną grupę. Ich skład opiera się na odpowiednich proporcjach tlenków SiO_2 , CaO , Na_2O i P_2O_5 , co decyduje o ich bioaktywności. Najbardziej znanym przedstawicielem tej klasy jest Bioglass® 45S5, opracowany przez Hencha w latach 70. XX wieku. Wspomniana bioaktywność szkieł polega na ich zdolności do inicjowania specyficznych reakcji chemicznych i biologicznych w kontakcie z płynami ustrojowymi, co prowadzi do integracji z otaczającymi tkankami. Kluczowym mechanizmem tego procesu jest tworzenie bioaktywnej warstwy fosforanowo-wapniowej, która jest analogiczna do mineralnej fazy kości i umożliwia trwałe wiązanie materiału z tkanką kostną. Dzięki tym właściwościom szkła bioaktywne nie tylko pełnią funkcję rusztowania dla nowej tkanki, ale także aktywnie stymulują procesy regeneracyjne wykazując zdolność do osteoindukcji. **Osteoindukcyjność** wyraża się zdolnością inicjacji zarówno wewnątrz-, jak i zewnątrzkomórkowej reakcji organizmu. Powierzchnia szkieł bioaktywnych sprzyja zasiedlaniu przez komórki macierzyste tkanki kostnej, pobudzając ich namnażanie i różnicowanie, co sprzyja odbudowie i integracji z tkanką kostną [19].

Oprócz amorficznych bioszkieł, rozwijane są również materiały szklano-krystaliczne, które powstają w wyniku kontrolowanej krystalizacji bioaktywnych szkieł. Obecność fazy krystalicznej sprzyja wzrostowi wytrzymałości mechanicznej materiału, przy jednoczesnym zachowaniu właściwości bioaktywnych. Niemniej jednak, nawet po krystalizacji, materiały te zachowują charakterystyczną dla ceramiki kruchość, co ogranicza ich zastosowanie [20], [21], [22].

Współczesne badania nad bioszkłami koncentrują się na dwóch kluczowych kierunkach. Pierwszym jest optymalizacja porowatości, która wpływa na bioaktywność i proces regeneracji tkanki kostnej. Szczególną uwagę zwraca się na bioszko mezoporowate, którego uporządkowana struktura porów o rozmiarach od 2 do 50 nm umożliwia transport jonów i cząsteczek odpowiedzialnych za osteogenezę. Szko mezoporowate otrzymywane są metodą zol-żel, która została wykorzystana w niniejszej pracy. Materiał nie jest toksyczny, nie powoduje także stanów zapalnych, a jego duża powierzchnia właściwa umożliwia kontakt z tkanką na większym obszarze, co wspomaga proces regeneracji i tworzenie nowych struktur kostnych [23]. Bioszko mezoporowate odgrywa również istotną rolę w kontrolowanym dostarczaniu czynników wzrostu oraz leków, dzięki czemu wielorakie zastosowanie w terapii medycznej [24]. Zagadnienie wprowadzania substancji aktywnych oraz możliwości ich immobilizacji w biomateriałach zostanie omówione w kolejnych rozdziałach.

Drugim istotnym trendem w dziedzinie szkieł bioaktywnych jest modyfikacja ich składu chemicznego, co umożliwi dostosowanie właściwości tych materiałów do konkretnych zastosowań medycznych. Metoda ta polega na wzbogacaniu materiału jonami terapeutycznymi, takimi jak jony cynku (Zn), strontu (Sr), srebra (Ag), selenu (Se), holmu (Ho) oraz terbu (Tb). Jony te są wprowadzane do szkieł, aby promować ich właściwości osteogenne, angiogenne, przeciwzapalne i przeciwbakteryjne. Niektóre z tych jonów, na przykład selen i terb, nadają materiałom dodatkowe właściwości, takie jak fluorescencja, luminescencja oraz ochrona przed promieniowaniem, co rozszerza możliwości zastosowań tych materiałów [25]. W niniejszej pracy szczególną uwagę poświęcono jonom magnezu i miedzi, które odgrywają kluczową rolę w procesach biologicznych w tkance kostnej. Jony magnezu sprzyjają proliferacji osteoblastów i mineralizacji macierzy kostnej, natomiast jony miedzi wykazują właściwości przeciwbakteryjne i stymulują angiogenezę. Tego typu modyfikacje składu szkieł bioaktywnych są przedmiotem intensywnych badań, mających na celu poprawę ich efektywności w regeneracji tkanki kostnej oraz w terapiach wspomagających leczenie infekcji i stanów zapalnych [26], [27].

1.1.2.3 BIOZGODNE MATERIAŁY WĘGLOWE

Innym podejściem w inżynierii biomateriałów jest wykorzystanie nanotechnologii, a w szczególności nanomateriałów, takich jak nanorurki węglowe, których zastosowanie może otwierać nowe kierunki w regeneracji tkanek kostnych. Nanorurki węglowe (CNT, ang. *carbon nanotubes*) są allotropową formą węgla, odkrytą przez Sumio Iijima w 1991 roku. Istnieją dwa główne typy nanorurek węglowych: jednościenne (SWCNT, ang. *single-walled carbon nanotubes*) i wielościenne (MWCNT, ang. *multi-walled carbon nanotubes*). SWCNT

mają średnicę od 1 do 2 nm, podczas gdy średnica MWCNT może osiągać nawet 100 nm, co wpływa na ich właściwości mechaniczne i chemiczne [28].

Nanorurki węglowe, ze względu na swoje właściwości, budzą zainteresowanie jako materiały o potencjalnym zastosowaniu w medycynie, m.in. jako nośniki leków, biosensory i składniki rusztowań dla inżynierii tkankowej. [29]. Literatura wskazuje, że nanorurki węglowe dzięki możliwości funkcjonalizacji mogą być używane do dostarczania leków lub genów, co pozwala na skuteczniejszą terapię chorób nowotworowych i genetycznych. Nanorurki mogą również pełnić funkcję biosensorów w nowoczesnych systemach diagnostycznych [28], [29].

Literatura dostarcza licznych przykładów kompozytów wykorzystywanych w inżynierii tkankowej, w których nanorurki węglowe pełnią funkcję fazy modyfikującej. Wśród najczęściej opisywanych materiałów znajdują się kompozyty na bazie hydroksyapatytu, chitozanu czy poli(ϵ -kaprolaktonu). Dodatek nanorurek węglowych przyczynia się do zwiększenia wytrzymałości mechanicznej, poprawy biokompatybilności oraz usprawnienia procesów osteokondukcji i osteoindukcji, co wspomaga regenerację tkanki kostnej [30]. Inne badania *in vitro* wykazały, że jednościenne nanorurki węglowe stymulują różnicowanie i proliferację osteoblastów, wpływając pozytywnie na mechanizmy sygnałowe w komórkach, takie jak szlaki MAPK i NF- κ B. Mechanizmy te odgrywają kluczową rolę w procesach regeneracyjnych, wskazując na znaczący potencjał nanorurek węglowych w odbudowie tkanki kostnej. Dodatkowo, nanorurki węglowe wykazują właściwości antyoksydacyjne, redukując wolne rodniki oraz indukując ekspresję enzymów antyoksydacyjnych w komórkach, wspomagając proces regeneracji [31]. Badania *in vivo* również potwierdzają efektywność nanorurek węglowych w regeneracji tkanki kostnej. Stosowanie nanorurek w miejscach uszkodzeń tkanki kostnej zwiększa mineralizację i wzmacnia strukturę tkanki kostnej u zwierząt laboratoryjnych. Nanorurki stymulują aktywność osteoblastów oraz indukują wydzielanie czynników wzrostowych, co przyspiesza proces regeneracji [31].

1.1.2.4 MATERIAŁY KOMPOZYTOWE

Materiały kompozytowe odgrywają kluczową rolę w rozwoju nowoczesnych biomateriałów stosowanych w inżynierii tkankowej, stanowiąc odpowiedź na ograniczenia poszczególnych grup materiałów, takich jak materiały polimerowe, materiały ceramiczne czy materiały węglowe. Każda z nich wykazuje określone właściwości korzystne dla inżynierii tkankowej, jednak ich samodzielne zastosowanie wiąże się z pewnymi ograniczeniami, które wpływają na efektywność procesów regeneracyjnych. W związku z tym, celem projektowania biomateriałów kompozytowych jest optymalizacja właściwości mechanicznych, biozgodności i bioaktywności poprzez łączenie właściwości poszczególnych faz. W kontekście regeneracji tkanki kostnej szczególną uwagę zwracają kompozyty polimerowo-

ceramiczne oraz polimerowo-węglowe, które łączą biodegradowalność i biogodność osnowy polimerowej z bioaktywnością fazy ceramicznej lub unikalnymi właściwościami nanorurek węglowych.

Polimery, takie jak poli(ϵ -kaprolakton) i kopolimer glikolidu i laktydu, pełnią kluczową rolę jako osnowa kompozytów analizowanych w niniejszej pracy, zapewniając formowalność, elastyczność oraz kontrolowaną degradację. Choć same nie wykazują osteokonduktywności, stanowią doskonałą bazę dla bioaktywnych modyfikatorów, modulując właściwości mechaniczne i biologiczne kompozytów oraz umożliwiając kontrolowane uwalnianie bioaktywnych dodatków.

KOMPOZYTY POLIMEROWO-CERAMICZNE

Szkło bioaktywne, jako faza modyfikująca kompozytów polimerowo-ceramicznych, odgrywa istotną rolę w stymulacji regeneracji tkanki kostnej. Jego unikalna zdolność do tworzenia warstwy apatytowej w środowisku biologicznym sprzyja adhezji i proliferacji osteoblastów, co znacząco poprawia integrację materiału z otaczającą tkanką. Dodatkowo, modyfikacja składu chemicznego bioszklą poprzez wprowadzenie jonów terapeutycznych, takich jak magnez czy miedź, umożliwia dalsze dostosowanie jego właściwości biologicznych, w tym modulowanie procesów angiogenezy oraz działanie przeciwbakteryjne. Włączenie bioaktywnego szkła do polimerowej osnowy znacząco zwiększa bioaktywność i poprawia właściwości mechaniczne kompozytu, jednocześnie umożliwiając precyzyjną kontrolę tempa degradacji, co pozwala na dostosowanie funkcjonalności do specyficznych zastosowań klinicznych.

KOMPOZYTY POLIMEROWO-WĘGLOWE

Nanorurki węglowe, jako faza modyfikująca kompozytów polimerowo-węglowych, odgrywają kluczową rolę w poprawie właściwości mechanicznych i funkcjonalnych materiału. Ich unikalna struktura pozwala na efektywne wzmocnienie osnowy polimerowej, zwiększając jej wytrzymałość na ściskanie i rozciąganie oraz redukując podatność na pękanie. Ponadto, nanorurki węglowe wykazują zdolność do przewodzenia ładunków elektrycznych, co może wspierać procesy osteogenezy poprzez modulację sygnałów bioelektrycznych związanych z regeneracją tkanki kostnej. Ich powierzchnia może być dodatkowo funkcjonalizowana w celu poprawy interakcji z komórkami oraz kontroli nad ich biokompatybilnością. Włączenie nanorurek węglowych do osnowy polimerowej wzmocnia kompozyt i może modyfikować jego właściwości biologiczne, co sugeruje jego potencjalną przydatność w inżynierii tkankowej.

1.1.3. WSPÓŁCZESNE WYZWANIA STAWIANE MATERIAŁOM ALLOPLASTYCZNYM

Współczesne wyzwania stawiane materiałom alloplastycznym koncentrują się na pogłębionym zrozumieniu reakcji biologicznych organizmu na wprowadzenie ciała obcego oraz na optymalizacji tych reakcji w kontekście implantacji. W badaniach nad biomateriałami nacisk kładzie się na analizę zjawisk zachodzących na granicy faz implant–tkanka, takich jak adsorpcja białek, procesy zapalne oraz mechanizmy gojenia ran. W rezultacie definicja biomateriałów została rozszerzona – współczesne projektowanie tych materiałów skupia się na ich aktywności biologicznej na poziomie molekularnym, z uwzględnieniem reakcji z białkami i komórkami w taki sposób, aby wspierały procesy regeneracyjne analogiczne do naturalnych mechanizmów organizmu [8], [31].

Badania nad procesem gojenia wskazują na kluczowe wyzwania, którym muszą sprostać biomateriały, aby skutecznie wspierać biologiczną odpowiedź organizmu, przyspieszając i usprawniając proces regeneracji. **Do najczęstszych powikłań związanych z procesem regeneracji tkanki kostnej należą zakażenia okołowszczepowe oraz nadmierna reakcja zapalna, wynikająca z intensywnej odpowiedzi immunologicznej na ciało obce, jakim jest wprowadzony biomateriał. W związku z tym nowoczesne biomateriały powinny charakteryzować się nie tylko wysoką biozgodnością, zgodnie z definicją przytoczoną w poprzednich rozdziałach, lecz także jej rozszerzoną koncepcją, obejmującą właściwości antybakteryjne, przeciwzapalne i przeciwnowotworowe, co umożliwi skuteczniejsze i bezpieczniejsze procesy regeneracyjne [32], [33].** Poszukiwania materiałów spełniających te kryteria stanowią jedno z kluczowych wyzwań w dziedzinie inżynierii biomateriałów, gdyż muszą one jednocześnie integrować różne funkcje biologiczne w sposób harmonijny i przewidywalny, minimalizując ryzyko powikłań. **Potencjalnym rozwiązaniem tych problemów może być zastosowanie dodatkowych substancji aktywnych, które wspierają procesy regeneracyjne, modulują odpowiedź immunologiczną oraz nadają biomateriałom właściwości antybakteryjne i przeciwnowotworowe, co dodatkowo zwiększa ich efektywność w zastosowaniach medycznych.**

1.1.4. WZBOGACANIE MATERIAŁÓW ALLOPLASTYCZNYCH SUBSTANCJAMI AKTYWNYMI

Obecnie prowadzone są intensywne badania nad różnymi klasami substancji aktywnych, w tym peptydami, czynnikami wzrostu, przeciwutleniaczami oraz innymi biomolekułami, które mogą znacząco wpływać na poprawę biokompatybilności oraz przyspieszenie procesów regeneracyjnych [34], [35], [36]. Nowoczesne możliwości inżynierii materiałowej umożliwiają umieszczanie w strukturze materiałów do regeneracji tkanki kostnej

wspomnianych substancji wykazujących aktywność biologiczną. W związku z tym, materiały alloplastyczne poza swoją podstawową funkcją mogą pełnić rolę nośników składników bioaktywnych. Możliwa staje się modulacja funkcji otaczającej tkanki kostnej zgodnie z zamierzeniem terapeutycznym. Aby poprawić zakres, szybkość i jakość regeneracji tkanki kostnej, wskazane jest stosowanie substancji stymulujących osteogenezę. Ingerencja w ten proces możliwa jest dzięki promowaniu syntezy białek o ukierunkowanej aktywności, w tym osteokalcyny, osteopontyny i grupy białek morfogenetycznych kości. Stosowanymi dodatkami stymulującymi osteogenezę są czynniki wzrostu, cytokiny i peptydy, takie jak BMP, TGF β , FGF, VEGF [37].

Stan zapalny jest kluczowy w regeneracji tkanki kostnej i występuje w formach ostrej oraz chronicznej. Ostro stan zapalny wspomaga gojenie, aktywując układ odpornościowy do uwalniania cytokin prozapalnych (IL-1, IL-6, TNF- α) i reaktywnych form tlenu (ROS), które eliminują patogeny i uszkodzone komórki. W kolejnej fazie makrofagi przechodzą w fenotyp przeciwwzapalny (M2), wygaszając reakcję zapalną i wspierając odbudowę tkanki poprzez stymulację osteoblastów i angiogenezę. Chroniczny stan zapalny natomiast pojawia się, gdy reakcja zapalna nie zostaje wygaszona i utrzymuje się przez dłuższy czas. Z czasem prowadzi to do zahamowania procesu regeneracji tkanki kostnej. Chroniczny stan zapalny pojawia się, gdy reakcja zapalna nie zostaje wygaszona i utrzymuje się dłużej, hamując regenerację tkanki kostnej. Długotrwała obecność prozapalnych cytokin, takich jak IL-6 i TNF- α , może prowadzić do rozkładu macierzy kostnej i zaburzyć równowagę między resorpcją a tworzeniem kości. Aby temu zapobiec, biomateriały są wzbogacane substancjami modulującymi reakcję zapalną, w tym środkami przeciwwzapalnymi, takimi jak deksametazon i ibuprofen, które regulują nadmierną odpowiedź immunologiczną oraz wspierają prawidłowy przebieg procesu regeneracyjnego.

Kolejnym istotnym zagrożeniem dla skutecznej regeneracji tkanki kostnej są bakteryjne zakażenia okołowszczepowe, które mogą prowadzić do powikłań zapalnych, degradacji biomateriału oraz zahamowania osteogenezy. Aby zmniejszyć ryzyko takich zakażeń, biomateriały są projektowane z uwzględnieniem właściwości antybakteryjnych. Na przykład ich powierzchnie mogą być pokrywane cienkimi warstwami materiałów antybakteryjnych, takich jak srebro czy miedź, które wykazują naturalne właściwości przeciwdrobnoustrojowe, co pozwala na redukcję adhezji bakterii. Inną metodą jest kontrolowane uwalnianie substancji przeciwdrobnoustrojowych bezpośrednio z biomateriału. Dzięki temu można uzyskać wysokie stężenie terapeutyczne antybiotyku dokładnie tam, gdzie jest potrzebne, minimalizując jednocześnie ogólnoustrojowe efekty uboczne. Do podawanych w ten sposób antybiotyków należą doksorubicyna, gatifloksacyna, gentamycyna, tetracyklina,

wankomycyna [38], [39], [40]. Niestety, obecne badania wykazują alarmujące poziomy antybiotykooporności, co stanowi istotne zagrożenie zarówno dla skuteczności terapii, jak i zdrowia publicznego. W kontekście materiałów do regeneracji tkanki kostnej, oporność bakterii na stosowane antybiotyki oznacza, że standardowe leczenie zakażeń staje się coraz mniej efektywne. Powoduje to konieczność stosowania coraz wyższych dawek lub bardziej toksycznych leków, co może prowadzić do poważniejszych skutków ubocznych u pacjentów. Dodatkowo, bakterie odporne na antybiotyki są trudniejsze do wyeliminowania, co zwiększa ryzyko przewlekłych infekcji wokół implantów i materiałów stosowanych w leczeniu złamań czy defektów kości. To z kolei może skutkować koniecznością przeprowadzenia dodatkowych operacji, usunięcia implantów oraz wydłużenia czasu rekonwalescencji. W najgorszym przypadku oporność ta może prowadzić do rozwoju infekcji, które są niemal niemożliwe do wyleczenia za pomocą dostępnych metod, co podkreśla potrzebę rozwoju nowych, alternatywnych terapii antybakteryjnych [41].

W przypadkach onkologicznych, ubytki kostne powstałe po resekcjach nowotworowych stanowią znaczące wyzwanie kliniczne, wymagające skutecznych metod rekonstrukcji przy jednoczesnym zapobieganiu wznowy miejscowej. Wzbogacanie materiałów do regeneracji tkanki kostnej cytotatykami, takimi jak cisplatyna czy metotreksat, jest jedną z możliwych strategii. Jednakże, lokalna toksyczność wysokich dawek tych środków dla komórek i tkanek ludzkich stanowi poważny problem. Ponadto, brak kontroli nad dawkowaniem zwiększa ryzyko rozwoju lekooporności [42], [43].

Z powyższych powodów kluczowe jest poszukiwanie alternatywnych substancji, które skutecznie hamują rozwój i rozmnażanie się bakterii oraz wykazują działanie przeciwzapalne i przeciwnowotworowe. Wymagania te spełniają naturalne fitozwiązki, takie jak polifenole, które stanowią potencjalnie korzystny dodatek do materiałów przeznaczonych do regeneracji tkanki kostnej.

1.1.5. ZWIĄZKI POLIFENOLOWE JAKO NATURALNE SUBSTANCJE AKTYWNE BIOLOGICZNIE

Naturalne fitozwiązki, a zwłaszcza polifenole, charakteryzują się rozległym zakresem aktywności biologicznej, w tym właściwościami antyoksydacyjnymi, przeciwbakteryjnymi, przeciwzapalnymi oraz przeciwnowotworowymi. Polifenole stanowią zróżnicowaną grupę organicznych związków chemicznych, których podstawową cechą strukturalną jest obecność jednej lub więcej grup hydroksylowych przyłączonych do pierścienia aromatycznego. Na podstawie budowy chemicznej polifenole dzieli się na dwie główne klasy: kwasy fenolowe oraz flawonoidy. Kwasy fenolowe obejmują pochodne kwasu benzoowego i kwasu

cynamonowego, natomiast flawonoidy charakteryzują się układem trójpierścieniowym, składającym się z dwóch pierścieni benzenowych (A i B), połączonych heterocyklicznym pierścieniem piranu (C). Flawonoidy można dalej klasyfikować na podgrupy, takie jak flawony, flawonole, flawanony, flawan-3-ole, izoflawony oraz antocyjany, różniące się liczbą i rozmieszczeniem grup hydroksylowych oraz stopniem utlenienia pierścienia C. Strukturalna różnorodność polifenoli determinuje ich właściwości chemiczne, w tym zdolność do chelatowania metali przejściowych oraz neutralizacji reaktywnych form tlenu, co przekłada się na ich aktywność biologiczną [44].

Polifenole są naturalnymi związkami chemicznymi występującymi w roślinach, gdzie pełnią istotne funkcje ochronne przeciwko szkodnikom, patogenom oraz promieniowaniu UV. Najwyższe stężenia polifenoli można znaleźć w owocach, warzywach, nasionach, a także w herbacie, kawie, winie oraz przyprawach [45].

Związki polifenolowe są ważnym składnikiem różnych preparatów stosowanych w medycynie naturalnej. Są one wykorzystywane w formie ekstraktów, suplementów diety, naparów oraz jako składniki maści, kremów i emulsji, gdzie pełnią funkcję substancji aktywnych o właściwościach przeciwutleniających, przeciwzapalnych i antybakteryjnych. Wybór odpowiedniej formy preparatu zależy od specyficznych właściwości farmakologicznych, zamierzonego efektu terapeutycznego oraz indywidualnych potrzeb pacjenta.

Badania wykazały, że niektóre związki polifenolowe mogą wpływać na regulację ekspresji genów i wpływać na różne szlaki sygnalizacyjne w komórkach, co przyczynia się do ich roli w modulowaniu procesów fizjologicznych w organizmie. Ponadto polifenole wykazują właściwości neuroprotektoryjne i antyoksydacyjne w mózgu, chroniąc przed uszkodzeniami oraz chorobami neurodegeneracyjnymi, takimi jak choroba Parkinsona czy choroba Alzheimera [45], [46], [47].

Wyżej opisane biologiczne właściwości polifenoli na poziomie komórkowym i tkankowym mają również zastosowanie w profilaktyce przeciwzapalnej i przeciwnowotworowej w obrębie tkanki kostnej. Na rynku dostępne są preparaty zawierające te związki, a przykładem jest Proflexin, który zawiera ekstrakty roślinne, takie jak imbir i kadzidłowiec indyjski. Dzięki właściwościom antyoksydacyjnym i modulującym procesy osteogenezy, składniki te wspierają równowagę między resorpcją a tworzeniem kości, co może przyczynić się do ochrony przed osteoporozą i innymi schorzeniami układu kostnego.

1.1.5.1 WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWPALNE

Polifenole to zróżnicowana grupa naturalnie występujących związków w roślinach, znanych ze swoich właściwości przeciwzapalnych. Związki te działają poprzez różne mechanizmy, takie jak hamowanie enzymów prozapalnych i modulowanie ścieżek sygnałowych zaangażowanych w stan zapalny. Na przykład związki polifenolowe zawarte w ekstrakcie z Kacip Fatimah wykazały skuteczne hamowanie enzymów COX-2 i elastazy, co wskazuje na ich potencjał jako naturalnych alternatyw dla konwencjonalnych niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) [48]. Innym przykładem działania przeciwzapalnego polifenoli jest wykorzystanie wyłoków z winogron w napełniaczach ceramicznych stosowanych w implantologii, gdzie wykazano ich działanie przeciwbakteryjne, przeciwzapalne i osteogenne [49]. Badania te podkreślają potencjalną rolę polifenoli w opracowywaniu skutecznych terapii przeciwzapalnych.

1.1.5.2 WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWBAKTERYJNE

Polifenole roślinne charakteryzują się silnym działaniem antybakteryjnym, spowodowanym ich właściwościami chemicznymi, które zakłócają różne procesy życiowe bakterii. Badanie przeprowadzone przez Czerkasa et al. (2024) wykazało, że taniny, będące rodzajem polifenoli, mają zdolność do zmiany płynności błony komórkowej *Streptococcus mutans* oraz do interakcji z białkami błonowymi. Prowadzi to do zaburzenia fizjologii bakterii i hamowania ich wzrostu [50]. Dodatkowo, polifenole wyekstrahowane z *Haplophyllum tuberculatum* wykazały zdolność do hamowania wzrostu Gram-dodatnich bakterii takich jak *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis*, a także umiarkowane działanie przeciwko *Pseudomonas aeruginosa* [51]. W kontekście przemysłowym polifenole pozyskiwane z produktów ubocznych przemysłu rolno-spożywczego wykazały potencjał jako alternatywa dla antybiotyków w żywieniu zwierząt, zmniejszając namnażanie się *E. coli* [52]. Ponadto, literatura dotycząca regeneracji tkanki kostnej wskazuje na możliwość wykorzystania polifenoli jako bioaktywnych składników wspomagających gojenie oraz zwalczanie infekcji. Na przykład, polifenole stosowane w cemencie kostnym na bazie krzemianu wapnia wykazały skuteczne działanie antybakteryjne przeciwko *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*, jednocześnie wspomagając procesy osteogenne. Przedstawia to je jako obiecujące komponenty do zwalczania zakażeń kostnych (osteomyelitis) oraz wspomaganie regeneracji kości [53].

1.1.5.3 WŁAŚCIWOŚCI ANTYOKSYDACYJNE

Polifenole są w stanie zmniejszać stres oksydacyjny oraz chronić komórki przed uszkodzeniami powodowanymi przez wolne rodniki. Stres oksydacyjny to proces

biochemiczny, podczas którego dochodzi do uszkodzenia struktur komórkowych na skutek nadprodukcji wolnych rodników, powstających w wyniku metabolizmu lub działania czynników zewnętrznych, takich jak promieniowanie UV czy zanieczyszczenia środowiska. Polifenole, jako silne przeciwutleniacze, neutralizują te reaktywne cząsteczki, przez co zapobiegają zniszczeniu błon komórkowych, zmianom w strukturze DNA oraz uszkodzeniom innych ważnych składników komórek. Badania zarówno *in vitro*, jak i na zwierzętach pokazały, że polifenole mogą zmniejszyć stres oksydacyjny oraz stan zapalny w tkankach, chroniąc w ten sposób przed chorobami związanymi z procesami oksydacyjnymi, takimi jak choroby układu sercowo-naczyniowego oraz choroby neurodegeneracyjne [47]. Badania Cerqueni et al. (2021) wykazały, że stres oksydacyjny odgrywa kluczową rolę w degradacji tkanki kostnej, prowadząc do jej osłabienia i zwiększonego ryzyka resorpcji. Polifenole, dzięki właściwościom antyoksydacyjnym, skutecznie neutralizują reaktywne formy tlenu (ROS), przez co chronią komórki kostne i macierz zewnątrzkomórkową przed uszkodzeniem [54]. Zdolność polifenoli do redukcji stresu oksydacyjnego przyczynia się do poprawy homeostazy kości oraz wspomaga regenerację tkanki kostnej. Badania nad wpływem polifenoli na osteoblasty i osteoklasty potwierdzają tę tezę. Dodatkowo, badania Iantomasi et al. (2022) wskazują, że dieta bogata w polifenole może skutecznie ograniczać oksydacyjne uszkodzenia komórek kostnych, zmniejszając ryzyko osteoporozy oraz innych chorób związanych z osłabieniem struktur kostnych [55].

Mechanizmy działania polifenoli sprawiają, że są one nie tylko potencjalnym narzędziem w prewencji schorzeń układu kostnego, ale także obiecującym elementem strategii wspomagających regenerację kości, zwłaszcza w warunkach zwiększonego stresu oksydacyjnego.

1.1.5.4 WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWNOWOTWOROWE

Polifenole wykazują działania: antyproliferacyjne, proapoptotyczne i przeciwutleniające, które są korzystne w zapobieganiu i leczeniu nowotworów. Literatura wskazuje, że polifenole hamują proliferację komórek nowotworowych, blokując cykl komórkowy i indukując apoptozę, czyli śmierć programowaną komórki nowotworowej. Polifenole również hamują rozwój nowotworu poprzez modulację procesów angiogenezy i zapobieganie tworzeniu naczyń krwionośnych, które są niezbędne dla rozwoju guza. W badaniach przeprowadzonych na różnych typach nowotworów, takich jak nowotwór piersi, jelita grubego, trzustki, prostaty i płuc, wykazano, że polifenole zwiększają skuteczność terapii konwencjonalnej. Dodatkowo, polifenole mają zdolność do indukcji procesu autofagii, który jest związany z utrzymaniem homeostazy komórkowej i może przeciwdziałać rozwojowi nowotworów poprzez eliminację uszkodzonych komórek. W badaniach klinicznych stwierdzono, że spożycie żywności bogatej

w polifenole, takiej jak owoce, warzywa, herbata i czerwone wino, jest związane z obniżeniem ryzyka rozwoju nowotworów [56].

1.1.5.5 WŁAŚCIWOŚCI OSTEOGENNE

Niektóre polifenole mogą działać osteogennie na tkanki ludzkie. Wykazano, że ekstrakt z oliwek zwiększa ekspresję genów związanych z różnicowaniem osteoblastów oraz stymuluje wytwarzanie kolagenu i innych składników macierzy pozakomórkowej, co wskazuje na jego osteogeny wpływ na te komórki. Podobnie badania na komórkach tkanki kostnej pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów wykazały, że związek pochodzący z korzenia żeń-szenia stymuluje różnicowanie komórek progenitorowych w osteoblasty i zwiększa ekspresję genów związanych z kościotworzeniem. Wyniki te sugerują, że polifenole mogą mieć potencjał jako suplementy diety lub leki osteogenne, które mogą pomóc w leczeniu chorób kości [47], [57].

1.1.5.6 WŁAŚCIWOŚCI ANGIOGENNE

Polifenole wykazują złożone właściwości angiogenne, które mogą mieć istotne znaczenie w procesie regeneracji tkanki kostnej. Badania przeprowadzone przez Sáncheza-Gomara i współpracowników (2022) wskazują, że polifenole zawarte w ekstraktach z liści mango, liści oliwnych oraz wyłoków z czerwonych winogron posiadają właściwości proangiogenne poprzez redukcję stresu oksydacyjnego, hamowanie apoptozy, modulację procesów zapalnych oraz stymulację proliferacji i różnicowania komórek śródbłonna. Jak wynika z ich badań, silne właściwości antyoksydacyjne polifenoli zmniejszają produkcję reaktywnych form tlenu i zapobiegają oksydacyjnemu uszkodzeniu śródbłonna, co sprzyja regeneracji naczyń krwionośnych. Ponadto, autorzy wykazali, że ekstrakty, szczególnie te pochodzące z liści mango, zwiększają zdolność komórek progenitorowych śródbłonna (ECFCs) do tworzenia struktur kapilarnych, co może być związane z aktywacją szlaków PI3K/AKT oraz MAPK/ERK. Wykazano również, że ekstrakty z oliwek i winogron wykazują silne działanie przeciwapoptotyczne, zmniejszając liczbę komórek w stanie pre- apoptozy i późnej apoptozy, co sprzyja przeżyciu ECFCs oraz ich różnicowaniu w dojrzałe komórki śródbłonna. Ponadto stwierdzono, że polifenole redukują ekspresję molekuł adhezyjnych, takich jak VCAM-1 i E-selektyna, co prowadzi do ograniczenia procesów zapalnych. Efekt angiogeny polifenoli może również wynikać ze zwiększonej ekspresji czynników wzrostu, takich jak VEGF, które stymulują neowaskularyzację [58].

1.1.6. KONCEPCJA WYKORZYSTANIA ZWIĄZKÓW POLIFENOLOWYCH JAKO SUBSTANCJI AKTYWNYCH W BIOMATERIAŁACH DO REGENERACJI TKANKI KOSTNEJ

W ostatnich latach rozwój biomateriałów trzeciej generacji koncentruje się na projektowaniu materiałów, które nie tylko zapewniają odpowiednie wsparcie mechaniczne dla regenerującej się tkanki, ale także spełniają liczne zaawansowane wymagania konieczne do skutecznego wspomaganie procesów regeneracyjnych. Mimo znaczących postępów w tej dziedzinie, leczenie rozległych ubytków kostnych – szczególnie tych związanych z zakażeniami kości lub będących wynikiem resekcji nowotworów – wciąż stanowi istotne wyzwanie kliniczne. Dodatkowym problemem związanym z implantacją biomateriałów jest wysokie ryzyko infekcji w otoczeniu implantu, wynikające z łatwej kolonizacji porowatych powierzchni przez drobnoustroje. Kolejnym istotnym zagadnieniem jest odpowiedź zapalna wywołana obecnością implantu, pełniąc dwójką rolę: faza ostra po implantacji stymuluje procesy regeneracyjne, natomiast nadmierna lub przewlekła reakcja zapalna, związana z obecnością patogenów lub nadmierną aktywacją układu immunologicznego, może prowadzić do zaburzeń osteointegracji i regeneracji tkanek, a w skrajnych przypadkach do resorpcji kości wokół implantu. W związku z tym istnieje pilna potrzeba opracowywania nowych, wielofunkcyjnych biomateriałów, które będą w stanie sprostać tym złożonym wyzwaniom w kontekście inżynierii tkanki kostnej.

Jedną z obiecujących strategii poprawy biofunkcjonalności rusztowań wykorzystywanych w inżynierii tkanki kostnej jest wprowadzenie do biomateriałów aktywnych substancji, takich jak antybiotyki, chemioterapeutyki, leki przeciwzapalne czy biomolekuły, które stymulują regenerację tkanki, np. czynniki wzrostu. Takie rusztowania pełnią podwójną funkcję: z jednej strony działają jako tymczasowa macierz pozakomórkowa, wspierająca naturalne procesy regeneracji tkanki, z drugiej strony umożliwiają kontrolowane dostarczanie leków. Pomimo licznych korzyści, takich jak zwiększona biodostępność substancji aktywnych, wyzwaniem pozostają kwestie związane z opornością na antybiotyki oraz toksycznością niektórych leków. W związku z tym, trwają intensywne poszukiwania alternatywnych związków, które mogłyby zastąpić tradycyjne substancje terapeutyczne lub działać synergistycznie, minimalizując negatywne efekty. Polifenole wzbudzają szczególne zainteresowanie w kontekście ich szerokiego zakresu aktywności biologicznej. Wykazują właściwości przeciwzapalne, antybakteryjne oraz przeciwutleniające, co czyni je obiecującymi kandydatami do zastosowania w systemach terapeutycznych. Znane z badań żywieniowych właściwości polifenoli, takie jak zdolność do zmiatania wolnych rodników czy ich działanie przeciwutleniające, zostają w tym przypadku wykorzystane w nowy sposób – nie w kontekście suplementacji dietetycznej, lecz jako aktywne komponenty biomateriałów inżynierii tkankowej, mające na celu wspomaganie regeneracji tkanki oraz kontrolowane

dostarczanie leków. Badania wskazują, że polifenole korzystnie wpływają na metabolizm tkanki kostnej, stymulując osteoblastogenezę i hamując aktywność osteoklastów, co może być istotne w terapii osteoporozy (patrz rozdział ...). Jednak ich ograniczona stabilność oraz trudności w kontrolowaniu czasu działania stanowią istotną barierę w ich praktycznym zastosowaniu. W związku z tym, badane są strategie, takie jak włączenie polifenoli do osnów polimerowych lub napełniaczy ceramicznych, które mogłyby regulować ich uwalnianie oraz aktywność biologiczną. Pomimo znaczących postępów w zakresie zastosowania polifenoli w inżynierii tkankowej, wciąż istnieje istotna luka badawcza, dotycząca pełnej oceny ich potencjału jako zamienników tradycyjnych biomolekuł oraz leków. Dotychczasowe badania skupiały się głównie na wybranych właściwościach biologicznych polifenoli, takich jak działanie przeciwzapalne, antybakteryjne i osteogenne, jednak brakuje kompleksowych badań systemowych, które analizowałyby wszystkie aspekty ich zastosowania, w tym stabilność, kinetykę kontrolowanego uwalniania oraz długoterminową efektywność w środowisku biologicznym. W szczególności niewystarczająco zbadane pozostają mechanizmy kontrolowanego uwalniania polifenoli z osnów polimerowych oraz ich interakcje z różnymi napełniaczami, co ma kluczowe znaczenie dla stabilności i aktywności biologicznej tych związków.

W związku z powyższym, niniejsza praca ma na celu wypełnienie istniejącej luki badawczej poprzez przeprowadzenie kompleksowych badań nad możliwością zastosowania polifenoli jako alternatywnych biomolekuł i leków w inżynierii tkankowej. Skoncentrowano się na optymalizacji właściwości fizykochemicznych oraz biologicznych kompozytów polimerowych zawierających polifenole, a także na analizie interakcji tych związków z nowoczesnymi napełniaczami ceramicznymi i węglowymi, które mogą odgrywać kluczową rolę w kontrolowaniu ich aktywności biologicznej oraz stabilności. Wyniki niniejszych badań mogą stanowić istotny krok w kierunku opracowania nowej generacji biomateriałów kompozytowych, spełniających złożone wymagania w obszarze inżynierii tkanki kostnej.

2. CELE I HIPOTEZY PRACY

Badania realizowane w ramach niniejszej pracy doktorskiej miały na celu:

- Zaprojektowanie i wytworzenie wielofunkcyjnych, bioresorbowalnych materiałów kompozytowych stanowiących nośnik związków polifenolowych wyekstrahowanych z szalwii lekarskiej.

Hipoteza zakłada, że wprowadzenie polifenoli do kompozytów polimerowych modyfikowanych fazą ceramiczną i węglową umożliwi uzyskanie materiałów o zmodyfikowanych lub zupełnie nowych właściwościach biologicznych i materiałowych (fizykochemicznych, mechanicznych) – w tym poprawę bioaktywności oraz potencjalnych efektów terapeutycznych.

- Ocena możliwości kontrolowania właściwości materiałowych i biologicznych biomateriałów kompozytowych, poprzez zastosowanie zróżnicowanych napełniaczy

Druga hipoteza zakłada, że modyfikacja osnowy polimerowej materiałów kompozytowych wzbogaconych w związki polifenolowe przy użyciu napełniaczy o zróżnicowanej charakterystyce (właściwościach teksturalnych i chemicznych), umożliwi modulowanie aktywności biologicznej oraz innych właściwości fizykochemicznych, w tym wynikających z obecności związków aktywnych, opracowanych materiałów.

W ramach prowadzonych badań opracowano bioresorbowalne kompozyty polimerowe wzbogacone związkami polifenolowymi oraz modyfikowane różnymi napełniaczami, takimi jak cząstki szkła bioaktywnego (BG) i wielościennie nanorurki węglowe (MWCNTs). Badania obejmowały ocenę wpływu (i) parametrów napełniaczy, w tym właściwości teksturalnych oraz składu chemicznego szkła bioaktywnego, a także rodzaju grup funkcyjnych na powierzchni wielościennych nanorurek węglowych; (ii) rodzaju materiału osnowy polimerowej poli(ϵ -kapolakton) (PCL) i kopolimeru laktydu i glikolidu (PLGA) oraz (iii) stężenia zastosowanych związków polifenolowych na właściwości fizykochemiczne i biologiczne uzyskanych biomateriałów. Wytworzone kompozyty zostały poddane szczegółowej charakterystyce w zakresie:

- Mikrostruktury i parametrów powierzchni;
- Właściwości mechanicznych;
- Stopnia krystaliczności osnowy polimerowej;
- Bioaktywności w warunkach *in vitro*;
- Aktywności antyoksydacyjnej i przeciwzapalnej materiałów kompozytowych;
- Degradacji hydrolitycznej w warunkach *in vitro*;
- Odpowiedzi komórek osteoblastycznych w warunkach *in vitro*.
- Właściwości przeciwnowotworowych w warunkach *in vitro*.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. PRZYGOTOWANIE EKSTRAKTÓW ROŚLINNYCH

Użyty ekstrakt roślinny został pozyskany z szafwii lekarskiej, pochodzącej z upraw własnych Uniwersytetu Rolniczego im. H. Kołłątaja w Krakowie. Przeprowadzono szereg eksperymentów ekstrakcji PPh z materiału roślinnego, przy użyciu rozpuszczalników organicznych (DCM/THF/acetone/DIOX oraz ich mieszaniny) stosowanych do rozpuszczania wybranych polimerów syntetycznych (PCL, PLGA). Na podstawie analizy przygotowanych roztworów do dalszych badań wybrano mieszaninę ekstrakcyjną o składzie: 1,4 Dioksan/woda destylowana w stosunku objętościowym 4:1. Rozdrobnione w młódku zliofilizowane liście szafwii lekarskiej połączono z mieszaniną ekstrakcyjną w stosunku objętościowym 1:20(w/v). Ekstrakcję przeprowadzono w ciemności przez wytrząsanie w temperaturze otoczenia przez 24h. Następnie ekstrakt poddano procesowi filtracji przy pomocy bibuły filtracyjnej. Ostatecznie usunięto rozpuszczalnik z ekstraktu za pomocą wyparki próżniowej (Rotavapor R-300 Buchi, Szwajcaria) w temperaturze 30 st. C. oraz liofilizacji (liofilizator Christ Alpha 1-2 LD) w celu otrzymania ekstraktu w formie stałej. Uzyskany ekstrakt był przechowywany w temperaturze -20°C.

Tab. 1. Stężenie wybranych związków fenolowych w ekstrakcie wyznaczone za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

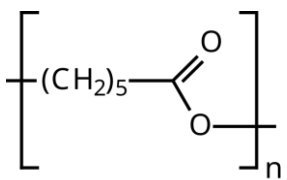
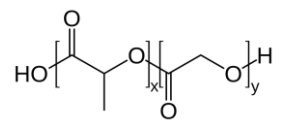
Związek fenolowy	Stężenie w ekstrakcie (mg/dm ³)
Kwasy fenolowe	
Kwas galusowy	0,09±0,00
Kwas chlorogenowy	0,75±0,18
Kwas kawowy	1,85±0,00
Kwas wanilinowy	0,15±0,00
Kwas syringowy	2,01±0,00
Kwas p-kumarowy	0,15±0,01

Związek fenolowy	Stężenie w ekstrakcie (mg/dm³)
Kwas ferulowy	1,41±0,00
Kwas synapinowy	0,23±0,02
Kwas rozmarynowy	17,43±1,09
Kwas 4-hydroksybenzoesowy	1,19±0,02
Flawonoidy	
Naryngenina	4,32±0,18
Rutyna	1,55±0,09
Hesperydyna	0,08±0,00
Mirycetyna	2,20±0,14
Kwercetyna	0,89±0,00
Luteolina	0,28±0,01
Kaempferol	0,34±0,00
Apigenina	0,26±0,01
Izoramnetyna	0,45±0,01
Herbacetyna	0,47±0,01
Epikatechina	15,45±0,08
Katechina	1,49±0,01
Akacetyna	0,16±0,00
Diterpeny fenolowe	
Karnosol	47,35±0,03
Kwas karnozowy	7,10±0,10

3.2. ZASTOSOWANE POLIMERY

W ramach niniejszej pracy doktorskiej przygotowano kompozyty, w których osnowę stanowił poli(ϵ -kaprolakton) (PCL, Sigma-Aldrich) i kopolimer laktydu i glikolidu (PLGA 85/15, Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN). Wybrane parametry zastosowanych polimerów zamieszczono w tabeli (Tab. 2).

Tab 2. Charakterystyka zastosowanych polimerów.

	Masa cząsteczkowa	Współczynnik dyspersyjności	Stopień krystaliczności	Wzór strukturalny
PCL	80 kDa	<2	~40%	
PLGA	80 kDa	<2.5	amorficzny	

3.3. WYTWORZENIE BIOAKTYWNYCH SZKIEŁ

Fazę rozproszoną stanowiły cząstki bioaktywnych szkielek. Cząstki bioaktywnych szkielek otrzymano metodą topienia, niskotemperaturową metodą zol-żel oraz techniką zol-żel z procesem samoorganizacji indukowanej odparowaniem (EISA, ang. *Evaporation-Induced Self-Assembly*). W pracy zastosowano bioaktywne szkła z układu SiO₂-CaO-P₂O₅, różniące się stosunkiem molowym poszczególnych składników i rodzajem dotowanych jonów terapeutycznych. Składy poszczególnych szkielek przedstawiono w Tab 3.

Tab. 3. Skład tlenkowy zastosowanych szkieł.

Szkło	Metoda otrzymywania	Skład tlenkowy (mol%)				
		SiO ₂	CaO	P ₂ O ₅	CuO	MgO
A2 top	topienie	40	54	6	-	-
A2 z-z	zol-żel	40	54	6	-	-
A2 mez	zol-żel połączona z techniką samoorganizacji indukowanej odparowaniem	40	54	6	-	-
MSGG1	zol-żel połączona z techniką samoorganizacji indukowanej odparowaniem	70	25	5	-	-
MSGG2	zol-żel połączona z techniką samoorganizacji indukowanej odparowaniem	70	22	5	3	-
MSGG3	zol-żel połączona z techniką samoorganizacji indukowanej odparowaniem	70	17	5	3	5

Poszczególne tlenki zostały wprowadzone do układu za pomocą surowców wymienionych w poniższej tabeli (Tab. 4).

Tab. 4. Zastosowane surowce.

Metoda topienia	
Tlenek	
SiO ₂	SiO ₂ CZDA
CaO	CaCO ₃ CZDA
P ₂ O ₅	P ₂ O ₅ CZDA
Metoda zol-żel	
Tlenek	
SiO ₂	Si(OC ₂ H ₅) ₄ (TEOS)
CaO	Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O
P ₂ O ₅	OP(OC ₂ H ₅) ₃ (TEP)
CuO	Cu(NO ₃) ₂ · 3H ₂ O
MgO	Mg(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O

Proces topienia zestawów przeprowadzono w tyglach platynowo-rodowych PtRh10 w temperaturze 1450° C przez 1.5h w komorowym piecu elektrycznym. Następnie zastosowano szybkie chłodzenie stopów w wodzie, uzyskując frytę szklaną.

Proces syntezy metodą zol-żel przeprowadzono w środowisku wodno-alkoholowym, przy użyciu kwasu solnego (HCl) jako katalizatora. Otrzymane żele poddano stopniowej obróbce termicznej, stopniowo zwiększając temperaturę do 800°C. W przypadku modyfikowanej syntezy zol-żel, połączonej z techniką samoorganizacji indukowanej odparowaniem (EISA), zastosowano surfaktant Pluronic P123, który jest trójblokowym kopolimerem (PEO)20(PPO)70(PEO)20. W wyniku odparowywania alkoholu doszło do formowania miceli, które pełniły rolę matrycy do tworzenia mezoporowatej struktury materiału.

Otrzymane szkła bioaktywne rozdrobniono w młódcie agatowym i przesiano przez sito 45 μm . Dodatkowo, bioaktywne szkła zmielono w młynie typu artrytor w środowisku alkoholu izopropylowego, używając młyników cyrkonowych, aż do osiągnięcia wielkości cząstek $d_{50} \sim 2 \mu\text{m}$.

3.4. MODYFIKACJA WIEŁOŚCIENNYCH NANORUREK WĘGLOWYCH

Jako fazę rozproszoną kompozytów wykorzystano trzy rodzaje wielościennych nanorurek węglowych (NanoAmor), oznaczonych jako HO, HNH oraz HDEA:

- Nanorurki HO – utlenione w mieszaninie kwasów H_2SO_4 i HNO_3 co doprowadziło do wbudowania około 16% atomów tlenu, w tym grup hydroksylowych, karboksylowych i karbonylowych;
- Nanorurki HNH – uzyskane przez aktywację grup karboksylowych i hydroksylowych nanorurek HO w obecności DCC (dicyclohexylcarbodiimide), a następnie amidyzację amoniakiem;
- Nanorurki HDEA – uzyskane przez aktywację grup karboksylowych i hydroksylowych nanorurek HO w obecności DCC (dicyclohexylcarbodiimide), a następnie amidyzację z dietyloaminą.

3.5. OTRZYMYWANIE MATERIAŁÓW KOMPOZYTOWYCH

W ramach niniejszej pracy opracowano materiały kompozytowe zróżnicowane pod kątem zastosowanego polimeru (PCL, PLGA), napełniacza (bioaktywne szkło, nanorurki węglowe), udziału związków polifenolowych ekstrahowanych z szalwii lekarskiej (*Salvia Officinalis* L). Wszystkie materiały zostały wykonane w formie folii.

Materiały w postaci folii wytworzono metodą odlewania z roztworu. Najpierw odpowiednią ilość pozyskanego ekstraktu roślinnego (1.0, 1.5, 3.0, 4.5% mas.) rozpuszczono w mieszaninie 1,4 Dioksan/woda destylowana w stosunku 4:0,3. Stosunek ten był najbardziej efektywny pod względem całkowitego rozpuszczenia ekstraktu oraz jednorodności folii, co potwierdziły obserwacje własne. Następnie przygotowane roztwory poddano działaniu ultradźwięków przez 5 min w łaźni ultradźwiękowej. Dalszy proces przygotowania folii zależał od rodzaju materiału.

Folie polimerowe (PCL/PPh)
Do roztworu ekstraktu (odpowiednio 1.0%, 1.5%, 3.0% lub 4.5% mas.) dodano granulki PCL (10% w/v) i mieszano na mieszadle magnetycznym przez 24 h.
Kompozyty o osnowie polimerowej modyfikowane bioszklem (PCL-A2/PPh)
Do roztworu ekstraktu (odpowiednio 1.0%, 1.5%, 3.0% lub 4.5% mas.) dodano cz ę stki bioaktywnego szk ła (30% w/w). Zawiesin ę poddano działaniu ultrad z wi ę k ów w ł azni ultrad z wi ę kowej przez 5 min i kolejno homogenizowano na mieszadle magnetycznym przez 1 h. Nast ę pnie dodano granulki PCL (10% w/v) i mieszano na mieszadle magnetycznym przez nast ę pn ę 24 h.
Kompozyty o osnowie polimerowej modyfikowane nanorurkami (PCL-HO/PPh, PCL-HNH/PPh, PCL-HDEA/PPh)
I metoda (PCL-HO/PPh /1, PCL-HNH/PPh /1, PCL-HDEA/PPh /1)
Do roztworu ekstraktu (2.5% w/w) dodano zawiesin ę MWCNTs w roztworze 1,4-Dioksan/woda destylowana (0,25% w/w). Zawiesin ę poddano działaniu ultrad z wi ę k ów przez 30 s i kolejno homogenizowano na mieszadle magnetycznym przez 24 h. Dodatkowo rozpuszczono granulki PCL w mieszaninie 1,4-dioksan/woda destylowana (stos. obj. 4:0,3). Po up ł ywie 24 h po ł aczono zawiesin ę PPh+MWCNTs z roztworem polimeru. Ca ł o ść homogenizowano na mieszadle magnetycznym przez 1 h i poddano działaniu ultrad z wi ę k ów przez 30 s.
II metoda (PCL-HO/PPh /2, PCL-HNH/PPh /2, PCL-HDEA/PPh /2)
Homogenizowany przez 24 h na mieszadle magnetycznym roztw ór PCL+1,4-dioksan/woda destylowana (stos. obj. 4:0,3) po ł aczono z zawiesin ą nanorurek w ę glowych (w roztworze 1,4-Dioksan/woda destylowana) i mieszano na mieszadle magnetycznym przez 1 h. Nast ę pnie poddano działaniu ultrad z wi ę k ów przez 30 s i po ł aczono z roztworem ekstraktu (2.5% w/w). Ca ł o ść homogenizowano na mieszadle magnetycznym przez 1 h, a nast ę pnie poddano działaniu ultrad z wi ę k ów przez 30 s.

Uzyskane roztwory materiałowych odlano na politetrafluoroetylenowe szalki i suszono pod przykryciem szklanej pokrywki szalki Petriego w temperaturze 40°C przez 7 dni. Po zakończeniu tego okresu, próbki były suszone prózniowo w temperaturze otoczenia przez 24h. Materiały przyjęły formę folii. W każdej grupie materiałowych wykonano próbki odniesienia – materiały bez udziału związków polifenolowych i/lub częstek bioaktywnego szkła/nanorurek węglowych.

3.6. METODY ANALIZY MATERIAŁÓW

Wszystkie materiały zostały poddane badaniom pozwalającym na dokonanie ich kompleksowej charakterystyki. Wybór metod badawczych obejmował techniki z zakresu inżynierii materiałowej, nauk biologicznych oraz analizy związków biologicznie aktywnych. Podczas oceny właściwości powierzchniowych, obie strony folii zostały poddane analizie. Powierzchnia mająca kontakt z oparami rozpuszczalnika podczas procesu suszenia oznaczona jako AS, natomiast powierzchnię stykającą się z szalką oznaczono jako GS. Przeprowadzono osobną analizę każdej z powierzchni, ze względu na różnice w procesach fizykochemicznych, które wynikały z odmiennych warunków formowania powierzchni.

3.6.1. MIKROSTRUKTURA

Do oceny mikrostruktury materiałów użyto skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) z detektorem elektronów wtórnych (Nova NanoSEM 200 FEI Europe Company) sprzężonym ze spektrometrem dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (EDX) pozwalającym na analizę składu chemicznego materiałów. Próbkę materiałów została napyłona cienką warstwą węgla.

3.6.2. TOPOGRAFIA, ZWILŻALNOŚĆ ORAZ ENERGIA POWIERZCHNIOWA

Chropowatość powierzchni otrzymanych materiałów została zbadana za pomocą profilometru kontaktowego HOMMEL-ETAMIC T1000 wave (Jenoptik AG). Pomiar odbywał się na odcinku l_m o długości 2,5 mm w 10 powtórzeniach.

Otrzymane materiały poddano również szczegółowej charakterystyce pod kątem zwilżalności oraz energii powierzchniowej. Zwilżalność materiałów oraz energię powierzchniową wyznaczono metodą „siedzącej kropli” za pomocą automatycznego systemu analizy kształtu kropli DSA 25 (Kruss, Niemcy). W celu wyznaczenia składowej polarnej i dyspersyjnej energii powierzchniowej zastosowano dwie cieczy pomiarowe o zróżnicowanej polarności – wodę i diiodometan (Sigma-Aldrich, Niemcy). Chropowatość powierzchni, kąt zwilżania i energię powierzchniową obliczono jako średnią z 10 pomiarów i wyrażono jako średnią \pm odchylenie standardowe (SD).

3.6.3. WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNE

Właściwości mechaniczne materiałów zostały zbadane za pomocą statycznej próby jednoosiowego rozciągania na maszynie wytrzymałościowej (Inspekt Table Blue 5kN z ogniwnem obciążnikowym 100N, Hegewald and Peschke Meß- und Prüftechnik GmbH, Niemcy). Wymiary próbek wynosiły 30 mm \times 5 mm. Testowano je z siłą obciążenia

wstępnego 0,1N i prędkością 10 mm min⁻¹. Wyznaczono następujące parametry: wytrzymałość na rozciąganie (σ_M), moduł Younga (E_t) oraz wydłużenie przy maksymalnej sile (ε_b).

3.6.4. ANALIZA TERMICZNA

Dodatkowo została przeprowadzona analiza termiczna w celu dokładnego wyznaczenia stopnia krystaliczności (χ_c) oraz temperatury topnienia osnowy polimerowej (T_m). W celu wyznaczenia parametrów termicznych badanych materiałów, w tym stopnia krystaliczności (χ_c) i temperatury topnienia osnowy polimerowej (T_m), wykorzystano metodę różnicowej kalorymetrii skaningowej z kompensacją mocy (DSC, PerkinElmer DSC-7) przy pojedynczym cyklu ogrzewania. Podczas pomiaru wykorzystano standardowe tygle aluminiowe. W zależności od osnowy polimerowej badanych biokompozytów, stosowano dwa zakresy temperatur – kompozyty o osnowie PCL 20°C-80°C, w przypadku osnowy PLGA 20°C-160°C z szybkością ogrzewania 10°C min⁻¹ w atmosferze gazu obojętnego (azot). Stopień krystaliczności PCL został oszacowany na podstawie wzoru:

$$\chi_c = \frac{\Delta H_m}{(1-x-y)\Delta H_m^0}$$

gdzie ΔH_m – entalpia topnienia próbki

ΔH_m^0 – entalpia w pełni krystalicznego polimeru PCL (139,5 J g⁻¹)

x – ułamek wagowy cząstek bioszklą

y – ułamek wagowy PPh.

W przypadku kompozytów o osnowie PLGA, ze względu na brak danych literaturowych dotyczących entalpii topnienia w pełni krystalicznego PLGA, przedstawiono wyłącznie wartości entalpii topnienia, które są wprost proporcjonalne do stopnia krystaliczności polimeru.

Przy użyciu dyfraktometru rentgenowskiego X'Pert Pro (PANalytical, Holandia) z promieniowaniem Cu-K α w zakresie 2 θ 10°-35° i przy 5° min⁻¹ przeprowadzono pomiar szerokokątnego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego (WAXS). Na podstawie uzyskanych refleksów dyfrakcji rentgenowskiej wyznaczono za pomocą równania Scherrera rozmiar krystalitów polimeru PCL (L_{hkl}):

$$L_{hkl} = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta},$$

gdzie K – współczynnik Scherrera (0,89)

λ – długość fali promieniowania rentgenowskiego (0,154 nm)

θ – kąt dyfrakcji

$$\beta = \sqrt{B^2 - b_0^2}$$

β – szerokość linii dyfrakcyjnej próbki

B – szerokość linii dyfrakcyjnej mierzona w połowie wysokości refleksu

b_0 – instrumentalne poszerzenie (0,0565°)

3.6.5. ANALIZA MASY CZĄSTECZKOWEJ

Zmiany średniej masy cząsteczkowej próbek (M_w) określano metodą chromatografii żelowej (*ang. gel permeation chromatography*, GPC) z zastosowaniem detektora współczynnika załamania światła (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA). Wycinki folii rozpuszczono w chloroformie do wysokosprawnej chromatografii ciekłowej (*ang. high-performance liquid chromatography*, HPLC) uzyskując stężenie 2,5 mg ml⁻¹. Cząstki bioszklę zostały usunięte z roztworów kolejno poprzez odwirowanie, a następnie przesączenie przez 0,2 μ m membranę poli(tetrafluoroetylenową) (PTFE). Zastosowano próbki o objętości 100 μ l i szybkość przepływu eluentu 0,7 ml min⁻¹. Rozdzielanie GPC przeprowadzono przy użyciu dwóch kolumn SEC połączonych szeregowo (PLgel 5 μ m MIXED-C, UK, 300 x 7,5 mm) w 35°C. Kalibrację wykonano przy użyciu 12 wzorców polistyrenowych (Sigma Aldrich, PL) o masach cząsteczkowych (M_p) w zakresie od 474 g mol⁻¹ do 1,8 · 10⁶ g mol⁻¹.

Spadek masy cząsteczkowej obliczono następująco:

$$\Delta M_w = \frac{M_0 - M_t}{M_0} \cdot 100\%$$

gdzie M_0 to początkowa M_w próbki, a M_t to M_w po zadanym czasie inkubacji.

3.6.6. SPEKTROSKOPIA RAMANA

Analizę Ramana przeprowadzono przy użyciu systemu Confocal Raman Imaging System Witec alpha 300 M+ wyposażonego w obiektyw powietrzny 100× (Zeiss EC Epiplan-Neofluar Dic, NA = 0,9). Pomiary wykonywano z wykorzystaniem lasera na ciele stałym chłodzonego powietrzem, pracującego przy długości fali 488 nm. Z każdej próbki losowo wybrano dziesięć widm Ramana, które zebrano za pomocą 2 skanów, z czasem integracji wynoszącym 10 s. Wstępnie przetworzone widma uśredniono i przedstawiono z odchyleniem standardowym. Obrazy ramanowskie uzyskano z rozdzielczością przestrzenną 0,5 μm , czasem całkowania dla pojedynczego widma wynoszącym 1 s i rozdzielczością 3 cm^{-1} .

Analizę danych przeprowadzono przy użyciu oprogramowania WITec Project Plus i OPUS. Zebrane widma poddano wstępnej obróbce, która obejmowała usunięcie pików kosmicznych, wygładzenie i normalizację wektorową w całym zakresie widmowym. Obrazy rozkładu Ramana uzyskano poprzez obliczenia całkowitej intensywności pasm Ramana w zakresach widm 935–985 cm^{-1} i 1142–1187 cm^{-1} , odpowiednio dla hydroksyapatytu i PPh. Obrazy te normalizowano od 0 do najwyższej intensywności pomiędzy grupami.

3.6.7. WŁAŚCIWOŚCI BIOAKTYWNE

W niniejszej pracy analizowano zdolność formowania warstwy hydroksyapatytu na powierzchni materiałów w warunkach *in vitro*. W tym celu materiały poddano inkubacji w symulowanym płynie ustrojowym (SBF, ang. *simulated body fluid*) o składzie jonowym zbliżonym do ludzkiego osocza. SBF przygotowano według procedury Kokubo i in [89]. Próbkę inkubowano w temperaturze 37°C przez 3,7,14 dni. Stosunek masy próbki do objętości SBF wynosił 10⁻³ g ml⁻¹. Po okresie inkubacji próbki przemyto bezwodnym etanolem (Avantor Performance Materials, Polska) i wysuszono w temperaturze otoczenia. Następnie zbadano zmiany morfologii oraz składu chemicznego powierzchni badanych kompozytów za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM), detektorem EDX oraz spektroskopii w podczerwieni (FTIR-ATR). W tym celu wykorzystano spektrometr Vertex 70V (Bruker, USA) wyposażony w kryształ ZnSe ATR. Widma zebrano w zakresie liczby falowej 550–4000 cm^{-1} , stosując rozdzielczości 4 cm^{-1} , uśredniając 128 skanów. Zmianę koncentracji jonów wapniowych, fosforanowych oraz krzemianowych w płynie inkubacyjnym, a tym samym kinetykę tworzenia warstwy fosforanowo-wapniowej, przeanalizowano techniką atomowej spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem w plazmie indukowanej (ICP-OES).

3.6.8. WŁAŚCIWOŚCI ANTYOKSYDACYJNE

Właściwości antyoksydacyjne materiałów analizowano wykorzystując trzy testy:

- Test ABTS ((2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu)) – spektrofotometryczny pomiar zmian intensywności zabarwienia roztworu barwnego kationorodnika ABTS •+ zredukowanego przez aktywność przeciwutleniacza przy długości fali 734 nm;
- Test DPPH (2,2-diphenylo-1-pikrylohydrazyl) – spektrofotometryczny pomiar zmian intensywności zabarwienia roztworu wolnego rodnika DPPH przez aktywność przeciwutleniacza przy długości fali 515 nm;
- Test FRAP(ang. *ferric ion reducing antioxidant parameter*) – spektrofotometryczny pomiar zmian zabarwienia roztworu związku TPTZ (kompleks żelazowo-2,4,6- tripirydylo-S-tiazyny) pod wpływem redukcyjnego działania przeciwutleniacza przy długości fali 593 nm;

Próbki inkubowano z wytrząsaniem w roztworach roboczych ABTS, DPPH i FRAP przez 10 min w ciemności w temperaturze 30°C. Stosunek masy próbki do objętości roztworu roboczego wynosił 10^{-3} g ml⁻¹. Pomiar zmian absorbancji wykonano dla trzech próbek za pomocą spektrofotometru (UV-1800, RayLeigh, Chiny) i wyrażono jako średnią ± odchylenie standardowe (SD).

W przypadku testów ABTS i DPPH właściwości antyutleniające badanych materiałów zostały wyrażone jako zdolność zmiatania wolnych rodników (RSC) obliczona według wzoru:

$$RSC = \frac{A_0 - A_S}{A_0},$$

gdzie A_0 – absorbancja roztworu roboczego

A_S – absorbancja roztworu po inkubacji próbki.

Wyniki testu FRAP wyrażono w postaci zmierzonej absorbancji.

3.6.9. WŁAŚCIWOŚCI CYTOTOKSYCZNE

Obie powierzchnie materiałów w postaci krążków o średnicy 12 mm poddano sterylizacji światłem UV-C przez 15 min. Materiały zostały umieszczone w 48-dołkowych płytkach hodowlanych (Nunc™, Dania). Próbki zostały ustabilizowane na dnie dołków hodowlanych przy pomocy pierścieni z ultraczystego szkła kwarcowego (Continental Trade, Polska). Dołki nie zawierające próbek materiału stanowiły kontrolę. Komórki zostały wysiane na powierzchni GS materiałów.

Do oceny cytotoxyczności materiałów zastosowano ludzkie fibroblasty tchawicze linii Hs 680.Tr (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA) hodowane w pożywce (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA). Pożywka zawierała 10% dodatku płodowej surowicy bydlęcej (ang. Fetal Bovine Serum, FBS), 4 mM L-glutaminy, 4500 mg/l glukozy, 1 mM pirogronianu sodu i 1500 mg/l wodorowęglanu sodu. Hodowlę prowadzono w warunkach wskazanych przez producenta, osiągając zagęszczenie $2 \cdot 10^4$ komórek na mililitr roztworu formie 1-mililitrowych próbek. Aktywność metaboliczną komórek zmierzono dwukrotnie, po upływie 3 oraz 7 dni od rozpoczęcia hodowli. W tym celu przeprowadzono testy z użyciem odczynnika PrestoBlue Cell Viability Reagent (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA). Pomiar fluorescencji przeprowadzono za pomocą czytnika płytek POLARstar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Niemcy), przy wartościach wzbudzenia wynoszących 560 nm oraz emisji 590 nm. Toksyczność badanych materiałów na poziomie komórkowym oraz wpływ ich obecności na proliferację komórek oceniono zestawami ToxiLight BioAssay Kit i ToxiLight 100% Lysis Reagent Set (Lonza, Bazylea, Szwajcaria). Zawartość kinazy adenylanowej oznaczono w lizacie i supernatancie, wyznaczając odpowiednio liczebność komórek żywych oraz uszkodzonych. Każda badana grupa składała się z 8 próbek, dla których wyniki zostały uśrednione (z podaniem odchylenia standardowego, SD).

4. WYNIKI I DYSKUSJA

4.1. KOMPOZYTY O OSNOWIE POLI(E-KAPROLAKTON) ORAZ KOPOLIMERU GLIKOLIDU

I LAKTYDU MODYFIKOWANE CZĄSTKAMI BIOAKTYWNEGO SZKŁA

Niniejsze badania przeprowadzono w celu oceny wpływu stężenia związków polifenolowych w materiałach wytworzonych na bazie obu polimerów – PCL i PLGA – na ich właściwości fizyczne, chemiczne oraz biologiczne. Postawiono hipotezę, że PCL, jako polimer semikrystaliczny z mniejszą liczbą wiązań estrowych, oraz amorficzny PLGA, charakteryzujący się większą liczbą takich wiązań, mogą w odmienny sposób oddziaływać z modyfikatorami nieorganicznymi (bioszkło) oraz związkami polifenolowymi, co może prowadzić do zróżnicowanych efektów strukturalnych i funkcjonalnych w otrzymanych materiałach.

Aby określić wpływ rodzaju osnowy polimerowej na właściwości biokompozytów opracowano materiały polimerowe na bazie PCL i PLGA oraz kompozyty z osnową PCL/PLGA modyfikowane cząstkami bioaktywnego szkła otrzymanego metodą zol-żel w stężeniu 30% w/w, wzbogacone związkami polifenolowymi o stężeniach 1,5% w/w, 3,0% w/w i 4,5% w/w. Materiały poddano analizie w zakresie właściwości powierzchniowych, mechanicznych, termicznych, antyoksydacyjnych, bioaktywności oraz cytotoksyczności.

4.1.1. WŁAŚCIWOŚCI POWIERZCHNIOWE

MIKROSTRUKTURA

Mikrostrukturę i skład pierwiastkowy wytworzonych materiałów scharakteryzowano za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej z mikroanalizą pierwiastkową EDX. Ze względu na sposób preparatyki folii (rozdz....) analizowano zarówno dolną (GS), jak i górną powierzchnię (AS) próbek.

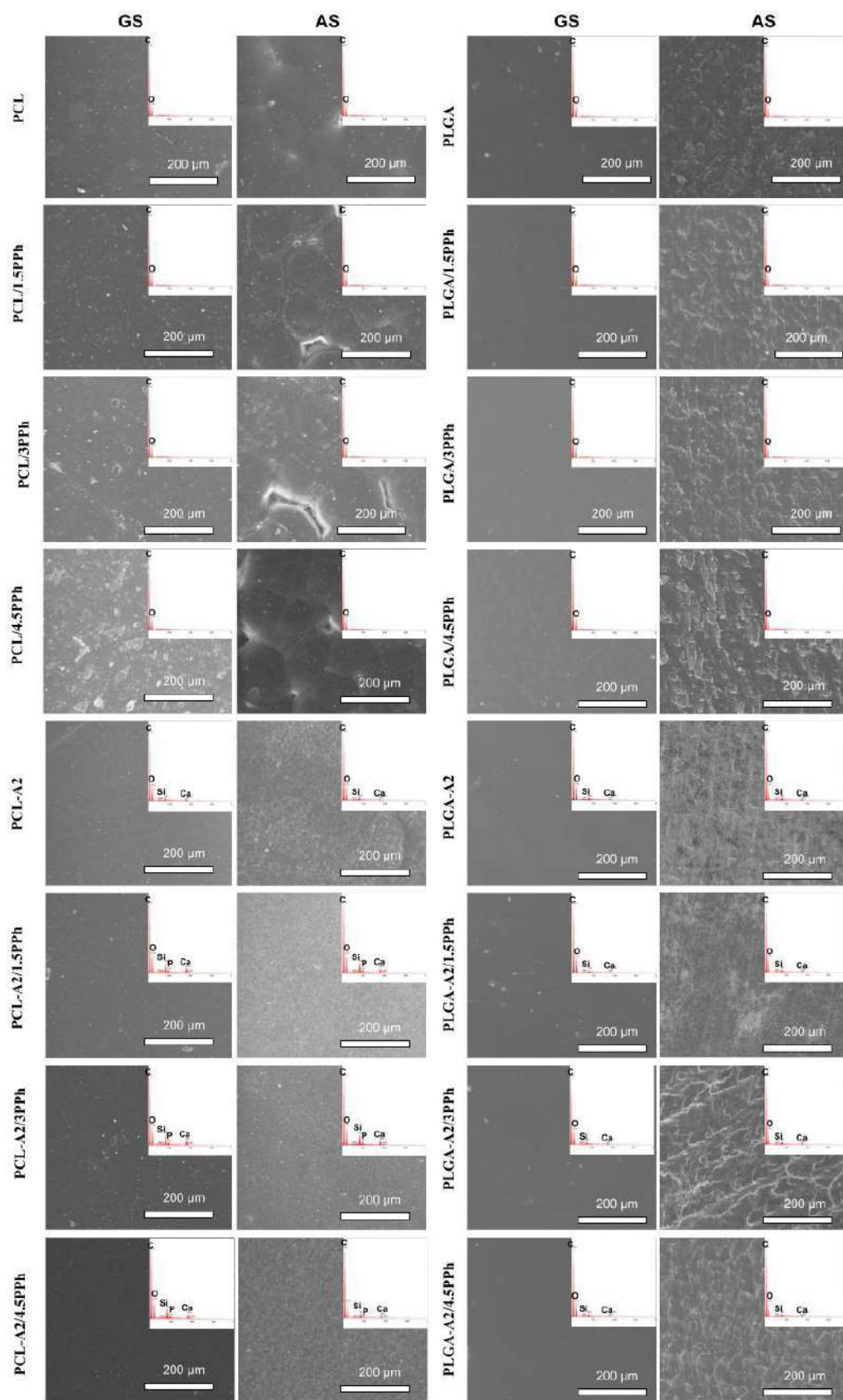


Fig. 1. Obrazy SEM z analizą EDX powierzchni dolnej (GS) i górnej (AS) badanych materiałów polimerowych i kompozytowych.

Na powierzchni AS wszystkich badanych folii polimerowych na bazie PCL zaobserwowano sferolity, które są charakterystyczne dla polimerów semikrystalicznych. Modyfikacja folii PCL związkami polifenolowymi spowodowała, że granice sferolitów stały się wyraźniejsze, a ich fibrylarna morfologia bardziej widoczna. Ponadto obserwowane na powierzchni AS sferolity były mniejsze i liczniejsze. Wyjaśnieniem tego zjawiska może być sposób, w jaki polifenole oddziałują z polimerem. Jak wykazała analiza DSC oraz WAXS polifenole wspierają proces krystalizacji PCL, co prowadzi do wzrostu stopnia krystaliczności i zwiększenia rozmiarów krystalitów PCL. Dzięki temu granice poszczególnych sferolitów stają się bardziej dostrzegalne, a ich fibrylarna struktura lepiej widoczna. Należy również zaznaczyć, że sferolityczne skupiska nie wystąpiły na powierzchni GS.

Proces odparowywania rozpuszczalnika oraz powstający gradient stężenia łańcuchów PCL tłumaczą odmienności w morfologii powierzchniowej zarówno powierzchni AS, jak i GS, a także różnice we właściwościach folii wykonanych z czystego PCL oraz kompozytów. W trakcie odparowywania następuje intensywne migracja cząsteczek rozpuszczalnika wraz z łańcuchami polimeru w kierunku powierzchni AS, co prowadzi do tworzenia się żelu lub miejscowych roztworów polimer-rozpuszczalnik. Dodatkowo, malejąca zawartość rozpuszczalnika – w kierunku prostopadłym do szalki – powoduje, że pojawia się gradient stężenia łańcuchów PCL. W rezultacie łańcuchy PCL przy powierzchni AS mają większą swobodę ruchu i więcej czasu na zorganizowanie się w uporządkowane struktury krystaliczne niż przy powierzchni GS, co skutkuje powstawaniem dobrze rozwiniętych sferolitów [59].

Modyfikacja folii PCL z wykorzystaniem związków polifenolowych (PPh) prowadzi do istotnych zmian w morfologii powierzchni GS. Powierzchnia ta wykazuje regularne rozmieszczenie porów o zróżnicowanej wielkości, a wraz ze wzrostem stężenia PPh obserwuje się zwiększenie ich zagęszczenia.

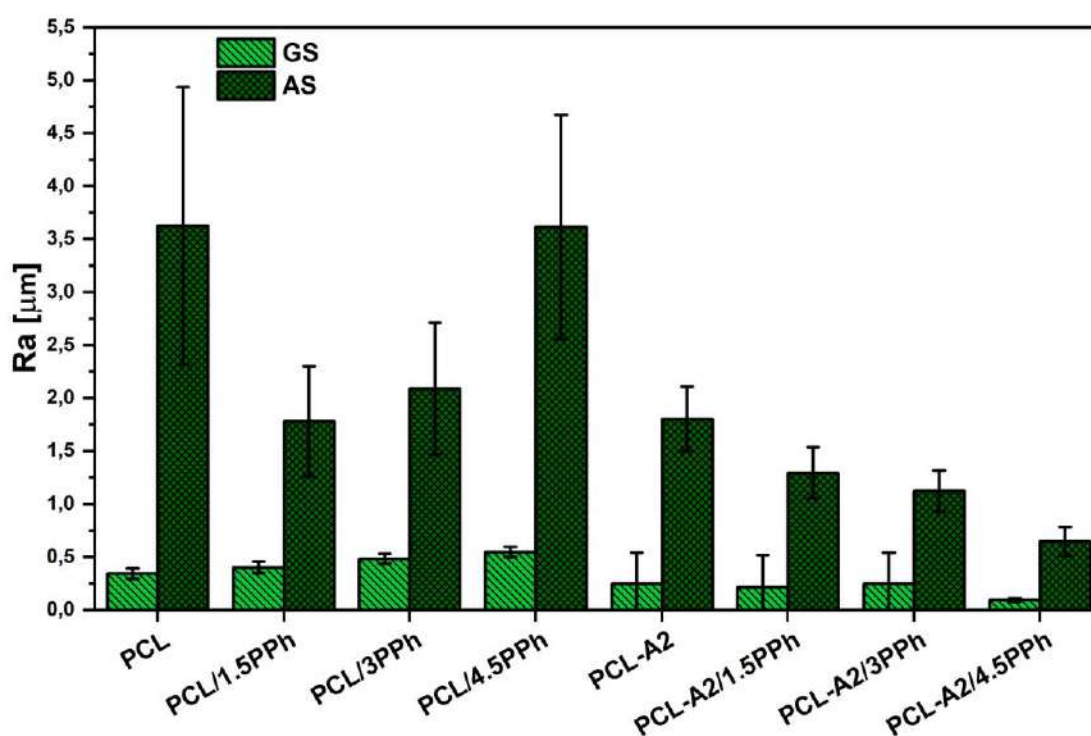
Analiza powierzchni AS folii kompozytowych PCL-A2 wykazała obecność licznych nitkowatych form, które różnią się od morfologii sferolitycznej polimeru PCL. Zmiana ta jest spowodowana ograniczeniem ruchomości łańcuchów PCL przez dodane cząstki bioaktywnego szkła. Powierzchnie AS charakteryzowała większą porowatość i większe rozwinięcie powierzchni w porównaniu do powierzchni folii polimerowych oraz powierzchni GS w foliach kompozytowych [60]. Dodatek związków polifenolowych zwiększył rozwinięcie powierzchni AS kompozytów. Powierzchnie GS były jednolite i nieporowate, bez zauważalnych zmian morfologicznych związanych z dodatkiem związków polifenolowych.

Analiza powierzchni GS materiałów polimerowych i kompozytów na bazie PLGA z różnym stężeniem związków polifenolowych nie wykazała istotnych różnic morfologicznych. Powierzchnie te pozostały gładkie, jednorodne i nieporowate. Natomiast na powierzchniach AS materiałów polimerowych oraz kompozytowych zauważalne były nierówności, które stawały się bardziej wyraźne wraz ze wzrostem stężenia związków polifenolowych.

Istotne różnice w morfologii powierzchni materiałów na bazie PCL i PLGA wynikają z odmiennej struktury tych polimerów. PCL charakteryzuje się obecnością sferolitów, które są typowe dla polimerów semikrystalicznych. Natomiast PLGA jako polimer amorficzny - nie tworzy uporządkowanych struktur krystalicznych [61]. Folie PLGA posiadają gładkie i jednolite powierzchnie.

CHROPOWATOŚĆ

W celu oceny wpływu dodatku związków polifenolowych na topografię powierzchni badanych materiałów, przeanalizowano parametry chropowatości Ra i Rz. Badaniom poddano zarówno materiały polimerowe, jak i kompozytowe na bazie PCL oraz PLGA, uwzględniając odrębnie dolną (GS) i górną (AS) powierzchnię każdej próbki. Na wykresach Fig. 2. przedstawiono zmiany chropowatości w zależności od rodzaju materiału oraz stężenia związków polifenolowych.



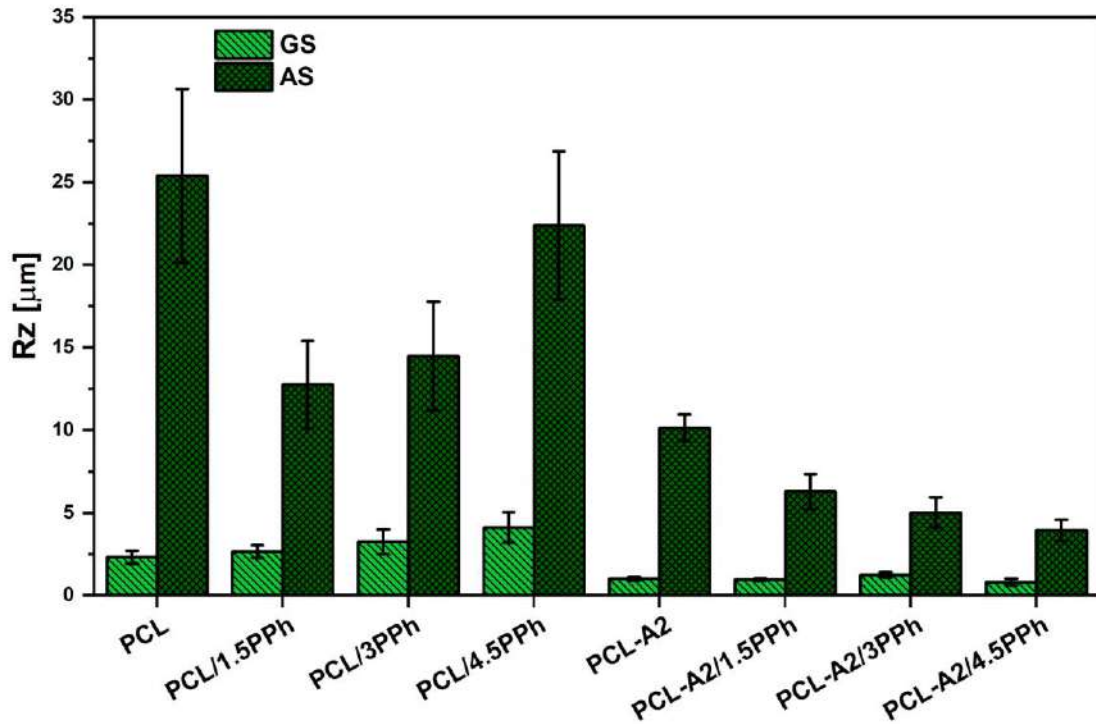


Fig. 2. Parametr R_a i R_z powierzchni AS i GS badanych materiałów polimerowych i kompozytowych na bazie PCL.

Wprowadzenie związków polifenolowych do folii PCL wpłynęło na zmianę chropowatości powierzchni AS. Przy najniższym stężeniu tych związków zaobserwowano początkowe obniżenie wartości parametrów chropowatości, co może wskazywać na wygładzanie powierzchni. Jednak dalsze zwiększanie stężenia polifenoli prowadziło do stopniowego wzrostu parametrów chropowatości, choć ich wartości wciąż pozostawały niższe lub porównywalne do tych, które zmierzono przed modyfikacją materiału. Wartości uzyskane dla powierzchni GS były niższe niż dla powierzchni AS. Prawdopodobną przyczyną tej różnicy była obecność sferolitów na powierzchni AS, podczas gdy na powierzchni GS nie doszło do ich formowania, co potwierdzono obrazowaniem SEM. Podobne obserwacje odnotowali w swojej pracy Simon i współautorzy, wykazując, że chropowatość powierzchni PCL koreluje z wielkością sferolitów [62]. Niemniej jednak na powierzchniach GS folii PCL badanych w ramach niniejszej pracy zaobserwowano także wzrost chropowatości w miarę zwiększania stężenia PPh.

W przypadku powierzchni AS materiałów kompozytowych uzyskane wyniki były niższe w porównaniu do folii polimerowych. Wpływać na to mogła nieobecność sferolitów na powierzchniach kompozytów związanych z obecnością cząstek szkła (PCL-A2). Zwiększenie stężenia PPh w kompozytach prowadziło do dalszej redukcji chropowatości na powierzchni

AS, przy czym wartości dla powierzchni GS pozostały zbliżone, z wyjątkiem najwyższego stężenia PPh, gdzie odnotowano obniżenie wartości Ra.

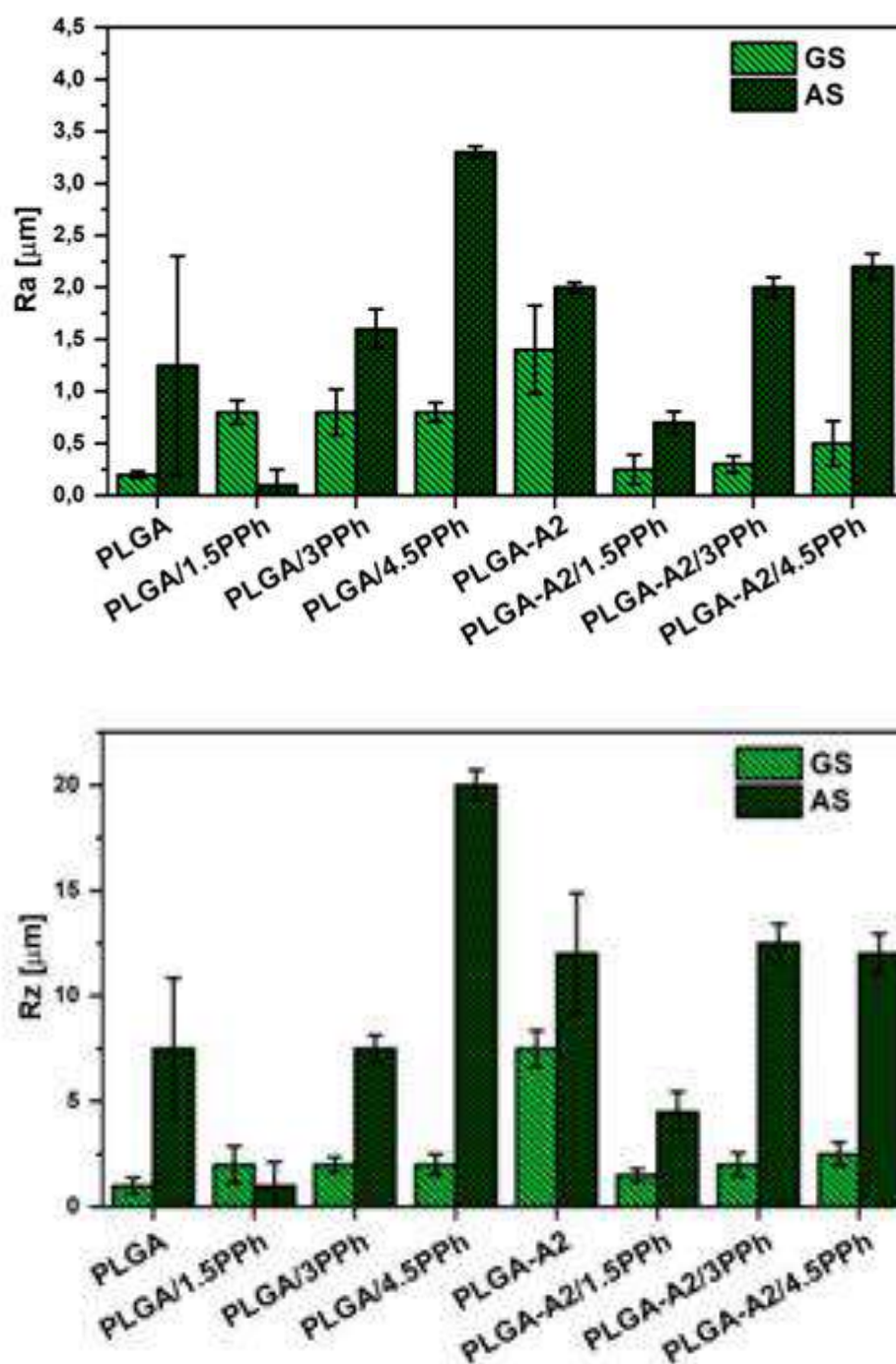


Fig. 4. Parametr Ra i Rz powierzchni AS i GS badanych materiałów polimerowych i kompozytowych na bazie PLGA.

Wartości parametrów chropowatości powierzchni AS folii polimerowych na bazie PLGA początkowo zmniejszyły się po wprowadzeniu najmniejszego stężenia związków polifenolowych (PPh). Jednak, wraz ze wzrostem koncentracji PPh, zaobserwowano

stopniowy wzrost chropowatości, który można przypisać interakcji polifenoli z osnową polimerową. Badania Noofa A. Alenazi et al. (2024) wskazują na tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy grupami hydroksylowymi kurkuminy a grupami karbonyłowymi PLGA, co prowadzi do lokalnych reorganizacji układu łańcuchów polimeru [63]. W odróżnieniu od materiałów na bazie PCL, folie PLGA z wyższym stężeniem PPh wykazywały wyższe wartości chropowatości w porównaniu do materiałów niezawierających związków polifenolowych.

Wprowadzenie PPh do folii PLGA skutkowało wzrostem wartości Ra i Rz na powierzchni GS, przy czym zmiany te pozostawały na zbliżonym poziomie niezależnie od zastosowanego stężenia związków polifenolowych.

Modyfikacja PLGA cząstkami szkła skutkowało wzrostem chropowatości na obu powierzchniach (AS, GS). Z kolei wprowadzenie związków polifenolowych prowadziło do obniżenia parametrów chropowatości zarówno powierzchni AS jak i GS, dla koncentracji 1,5PPh. Wzrost koncentracji PPh prowadził do stopniowego wzrostu wartości parametrów Ra i Rz, co szczególnie widoczne było dla powierzchni AS, przy czym mechanizm odpowiedzialny za to zjawisko pozostaje nieznan.

ZWILŻALNOŚĆ I ENERGIA POWIERZCHNIOWA

Materiały polimerowe i kompozytowe wzbogacone związkami polifenolowymi poddano pomiarom statycznego kąta zwilżania i energii powierzchniowej dla obu powierzchni (AS i GS). Otrzymane wyniki zaprezentowano na Fig. 5.

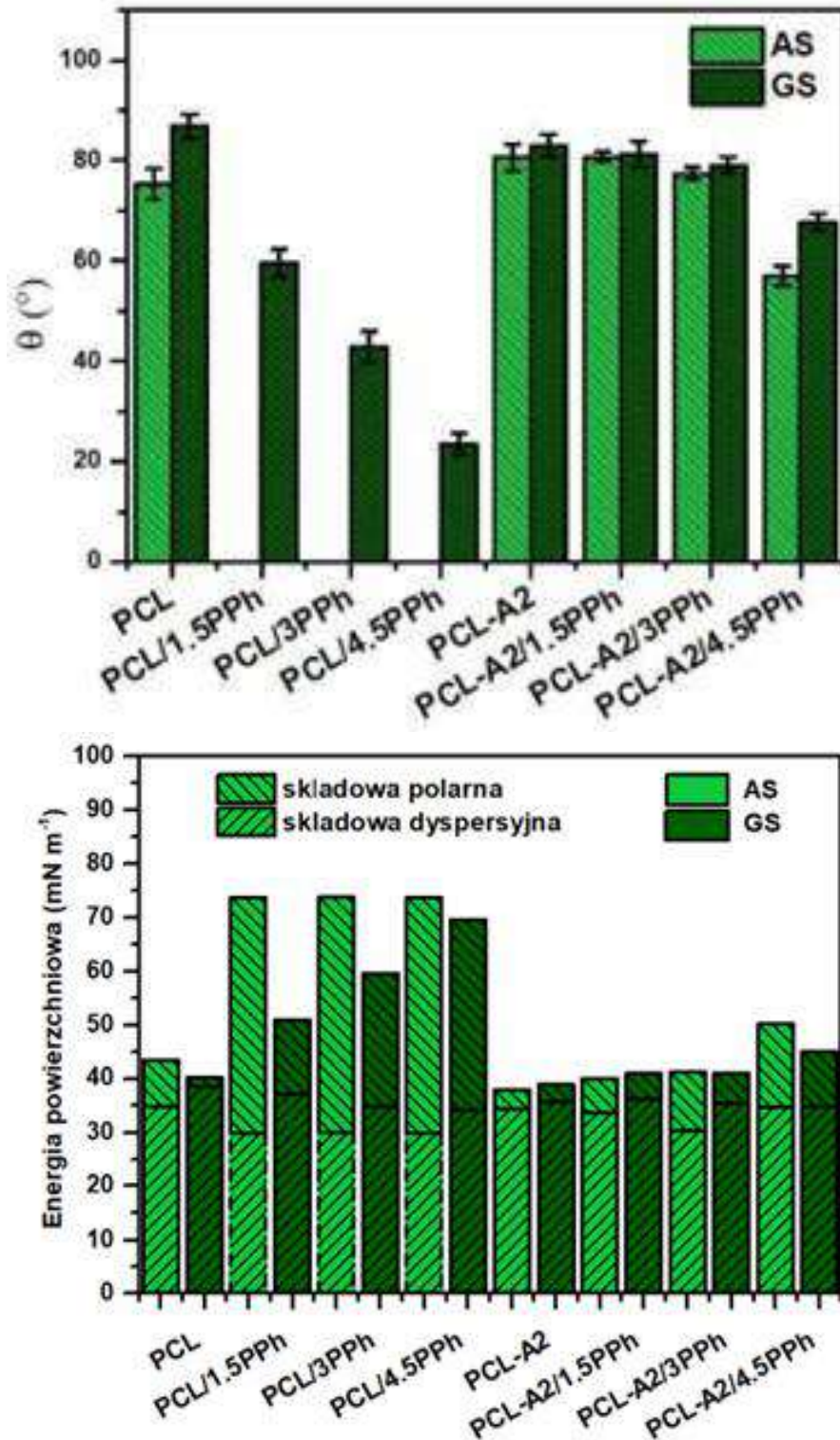


Fig. 5. Statyczny kąt zwilżania i całkowita energia powierzchniowa wraz z jej składnikami dyspersyjnymi (σD) i polarnymi (σP) powierzchni AS i GS folii na bazie polimeru PCL.

Analiza statycznego kąta zwilżania wykazała, że wprowadzenie związków polifenolowych (PPh) do folii polimerowych na bazie PCL zwiększyło ich zwilżalność, co potwierdza zmniejszenie wartości kąta zwilżania oraz wzrost polarnej składowej energii

powierzchniowej. W przypadku powierzchni AS zaobserwowano znaczącą poprawę zwilżalności już przy najniższym stężeniu PPh, natomiast dla powierzchni GS stwierdzono stopniowy, niemal liniowy wzrost hydrofilowości wraz ze wzrostem koncentracji PPh.

Literatura wskazuje, że zwiększona hydrofilowość zmodyfikowanych materiałów może wynikać z eksponowania hydrofilowych grup hydroksylowych (-OH) pochodzących ze struktur polifenolowych na powierzchni folii [64], [65]. Heterogeniczne rozmieszczenie PPh pomiędzy powierzchniami AS i GS może być związane z różnicami w mechanizmach migracji tych związków w roztworze polimerowym. Polifenole wykazują znaczną mobilność ze względu na niską masę cząsteczkową, co podczas procesu odparowywania rozpuszczalnika mogło prowadzić do ich relokacji w kierunku powierzchni AS. Wynikiem tego było zwiększenie koncentracji PPh na powierzchni folii, co doprowadziło do całkowitej zwilżalności powierzchni AS.

Modyfikacja osnowy polimerowej PCL poprzez wprowadzenie cząstek bioaktywnego szkła wpłynęła na zmianę zwilżalności materiału. Wyniki pokazały wzrost wartości statycznego kąta zwilżania dla powierzchni AS oraz jego niewielkie obniżenie dla powierzchni GS. Proces ten może być związany z obecnością cząstek bioaktywnego szkła przy powierzchni GS folii podczas jej suszenia. Zgodnie z danymi z literatury [66], obecność cząstek bioaktywnego szkła zwiększa hydrofilowość hydrofobowych polimerów, takich jak PCL. W badanych materiałach stężenie tych cząstek na powierzchni GS mogło być wyższe, co spowodowało obniżenie statycznego kąta zwilżania, podczas gdy powierzchnię AS charakteryzowała wysoka koncentracja PCL.

W przypadku kompozytów PCL-A2 wprowadzenie PPh skutkowało redukcją kąta zwilżania dla obu analizowanych powierzchni (AS i GS), niezależnie od ich stężenia. Najbardziej znaczące efekty zaobserwowano przy najwyższym stężeniu PPh, podczas gdy w przypadku niższych wartości efekt ten był mniej wyraźny. Może to wynikać z wiązania polifenoli przez cząstki bioaktywnego szkła w objętości kompozytu, co ogranicza ich migrację na powierzchnię i redukuje ich wpływ na kąt zwilżania oraz energię powierzchniową materiału.

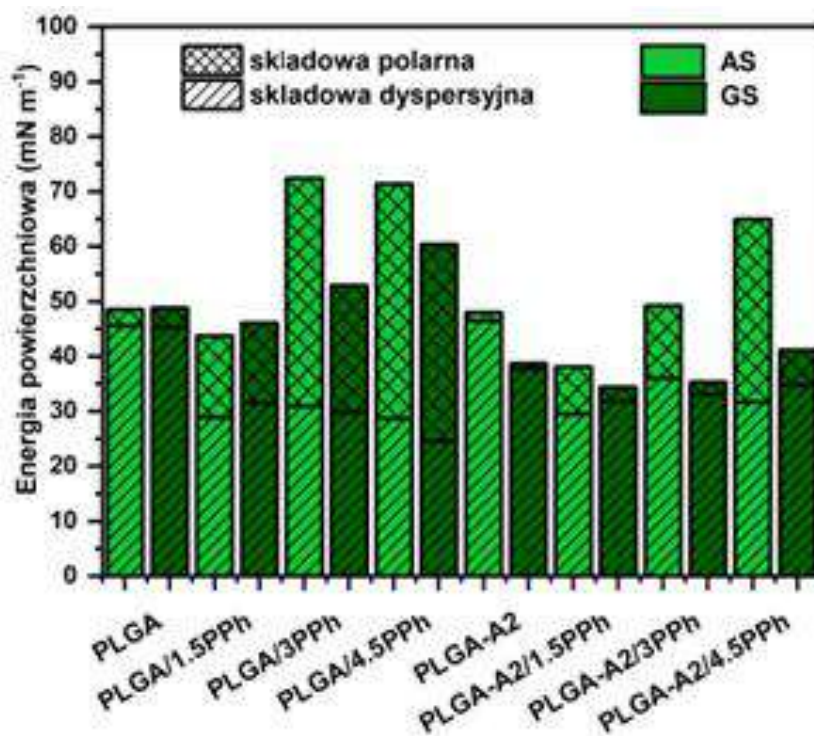
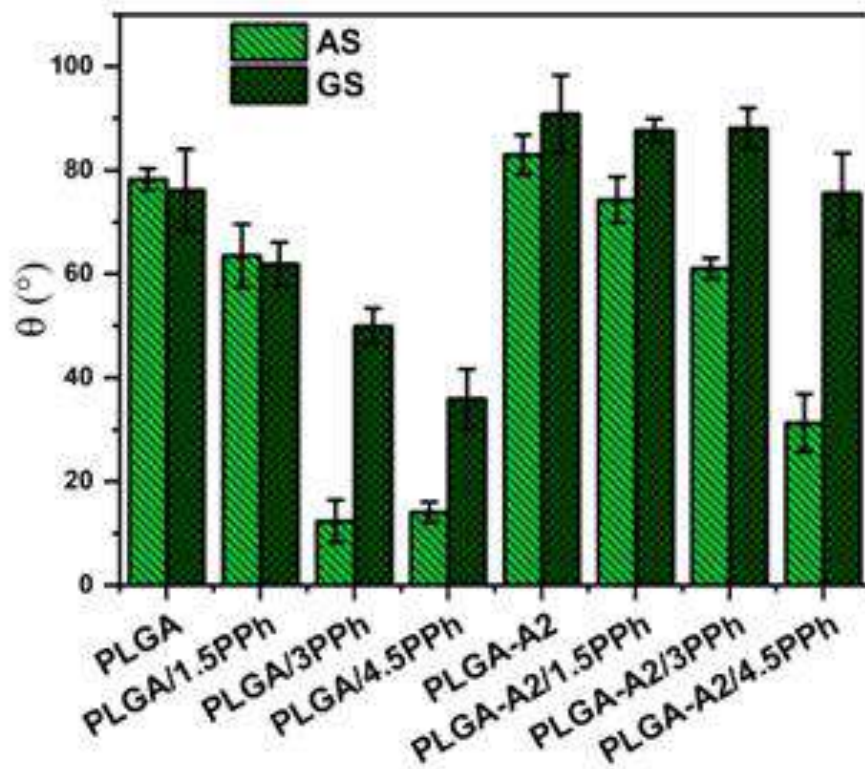


Fig. 6. Statyczny kąt zwilżania i całkowita energia powierzchniowa wraz z jej składnikami dyspersyjnymi (σD) i polarnymi (σP) powierzchni AS i GS folii na bazie polimeru PLGA.

Analiza statycznego kąta zwilżania i całkowitej energii powierzchniowej, w tym składowych dyspersyjnych (σ_D) i polarnych (σ_P) dla obu powierzchni (AS i GS) folii na bazie polimeru PLGA, wykazała istotne zmiany w wyniku wprowadzenia związków polifenolowych (PPh). Statyczny kąt zwilżania dla powierzchni AS i GS spada wraz ze wzrostem stężenia PPh, co wskazuje na poprawę zwilżalności materiału. Zjawisko to można przypisać obecności grup hydroksylowych (-OH) związków polifenolowych na powierzchni folii, szczególnie na powierzchni AS, gdzie zaobserwowano większy spadek wartości kąta zwilżania [65].

W przypadku folii PCL (powierzchnia AS) osiągnięto pełną zwilżalność już przy najniższych stężeniach PPh, podczas gdy folia PLGA charakteryzowała się stopniowym spadkiem kąta zwilżania i wzrostem polarnej składowej energii powierzchniowej. Wynika to prawdopodobnie z podwyższonej zdolności PLGA do efektywnego wiązania związków polifenolowych w objętości materiału. Wyższa hydrofilowość łańcuchów PLGA sprzyja lepszej interakcji związków polifenolowych, co może prowadzić do ich wbudowywania się między łańcuchy polimeru, ograniczając tym samym koncentrację PPh na powierzchni materiałów [67].

W przypadku kompozytów PLGA-A2 kąt zwilżania powierzchni GS był wyższy niż powierzchni AS, w przeciwieństwie do folii polimerowej PLGA. Prawdopodobnie wynika to z obecności cząstek szkła przy tej powierzchni materiałów. Wprowadzenie związków polifenolowych spowodowało zmniejszenie kąta zwilżania zarówno na powierzchni AS, jak i GS, przy czym spadek na powierzchni AS był znacznie większy i wykazywał niemal liniową zależność od stężenia ekstraktu w materiale. Prawdopodobnie wynika to — podobnie jak w przypadku kompozytów PCL-A2 — ze zwiększonej koncentracji związków polifenolowych przy górnej powierzchni, będącej wynikiem ich migracji w trakcie procesu suszenia. W przeciwieństwie do kompozytów na osnowie PCL, w przypadku materiałów PLGA-A2 zaobserwowano znacznie większy spadek kąta zwilżania, co może sugerować, że polifenole są w nich słabiej wiązane w objętości niż w kompozytach PCL-A2.

4.1.2. WŁAŚCIWOŚCI TERMICZNE

W celu oceny właściwości termicznych i strukturalnych badanych materiałów zastosowano różnicową kalorymetrię skaningową (DSC) oraz rentgenowską analizę dyfrakcyjną pod dużymi kątami (WAXS). Uzyskane wyniki dla folii polimerowych i kompozytowych przedstawiono poniżej.

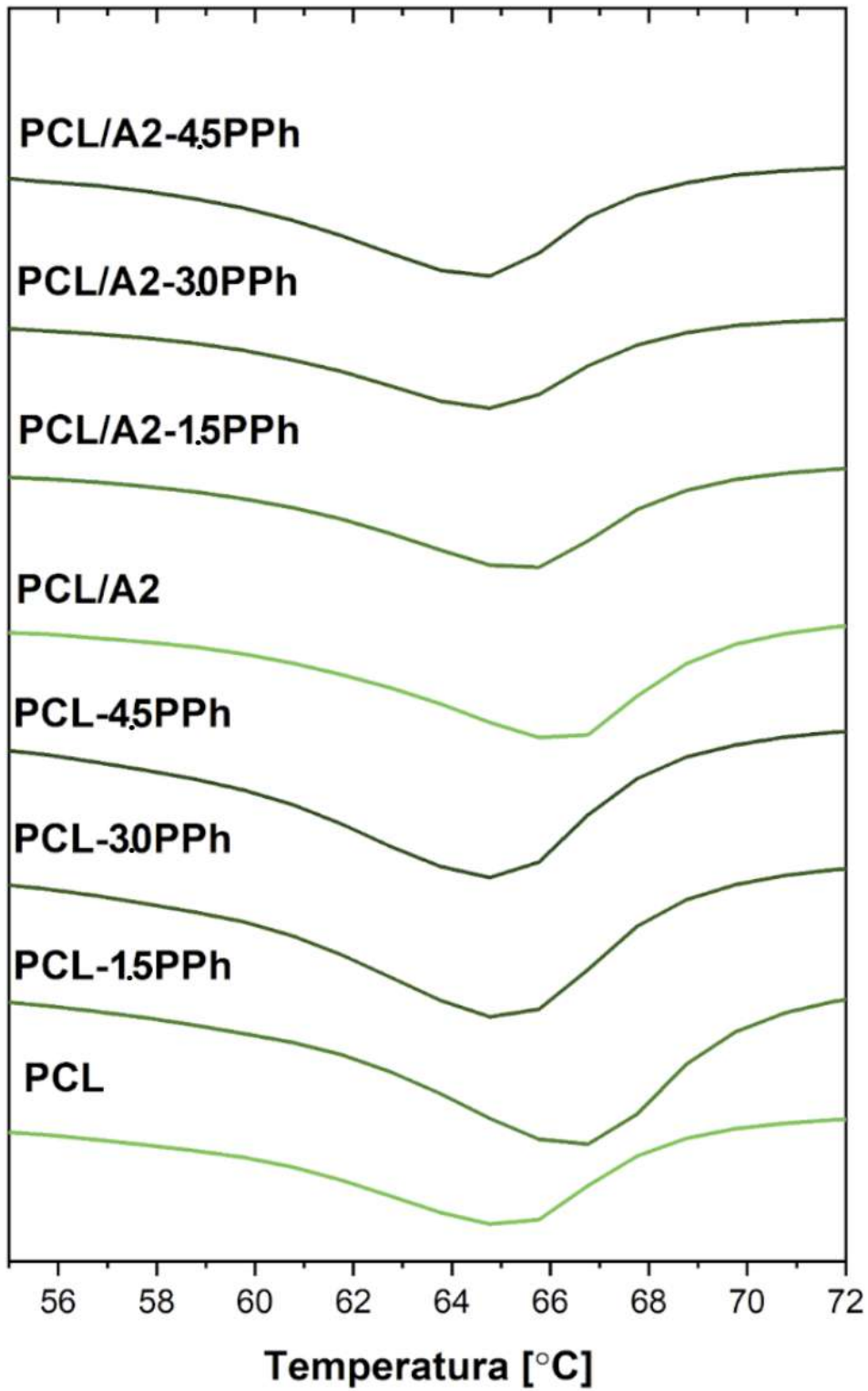


Fig. 7. Termogramy DSC dla materiałów na bazie PCL.

Tab. 5. Temperatura topnienia, stopień krystaliczności i wielkość krystalitów badanych materiałów polimerowych i kompozytowych na bazie PCL.

Nazwa materiału	DSC		WAXS	
	T _m [°C]	X _c [%]	L110 [nm]	L200 [nm]
PCL	65,2	29,3	8,9	10,2
PCL/1.5 PPh	65,4	44,2	24,3	20,7
PCL/3 PPh	65,0	44,0	11,7	12,8
PCL/4.5 PPh	64,4	41,2	20,9	18,5
PCL-A2	65,0	45,0	19,5	15,5
PCL-A2/1.5 PPh	64,6	39,7	14,4	12,8
PCL-A2/3 PPh	64,2	34,2	15,4	15,4
PCL-A2/4.5 PPh	64,1	42,8	12,7	13,9

W przypadku materiałów polimerowych, wprowadzenie PPh prowadziło do nieznacznego wzrostu, a następnie spadku temperatury topnienia wraz z rosnącym stężeniem związków polifenolowych. Zjawisko to można przypisać funkcji związków polifenolowych jako plastyfikatorów [68] [69].

Oddziaływanie polifenoli na strukturę PCL zostało szczegółowo zbadane przez Zhu et al. (2003), którzy analizowali wpływ katechiny na PCL. Katechina to naturalny związek chemiczny należący do grupy polifenoli, który występuje w różnych roślinach, szczególnie w herbacie, kakao, jabłkach, jagodach i winie. Wyniki tych badań wskazują, że wiązania wodorowe między grupami karbonyłowymi PCL a grupami hydroksylowymi katechiny prowadzą do zmian w strukturze polimeru. Powstawanie tych wiązań powoduje zniesienie części międzycząsteczkowych oddziaływań pomiędzy łańcuchami polimeru, co może prowadzić do zwiększonej mobilności łańcuchów polimerowych, wpływając na proces krystalizacji oraz na mechaniczne i termiczne właściwości materiałów kompozytowych zawierających katechiny. Efekt ten – przypominający działanie plastyfikatorów – może świadczyć o tym, że związki polifenolowe wykazują podobną aktywność [70] [69]. Zwiększona mobilność łańcuchów polimerowych sprzyja procesowi krystalizacji, który

tłumaczy wzrost stopnia krystaliczności i powiększenie rozmiaru krystalitów w foliach PCL, wzbogaconych związkami polifenolowymi.

Modyfikacja osnowy polimerowej PCL cząstkami bioaktywnego szkła skutkowałą zwiększeniem stopnia krystaliczności, co może wskazywać na ich funkcję jako efektywnych nukleatorów procesu krystalizacji. Jednocześnie odnotowano wzrost średniej wielkości krystalitów, co sugeruje, że obecność tych cząstek sprzyja kontrolowanemu wzrostowi fazy krystalicznej. Z kolei analiza kompozytów PCL-A2 wzbogaconych o związki polifenolowe (PCL-A2/1.5PPh, PCL-A2/3.0PPh, PCL-A2/4.5PPh) wykazała istotny spadek stopnia krystaliczności w porównaniu do materiału bez dodatku PPh. Obniżeniu uległa również wielkość tworzących się krystalitów.

Wyniki badań wskazują, że zarówno wprowadzenie związków polifenolowych, jak i modyfikacja cząstkami bioaktywnego szkła wpływają na zmiany stopnia krystaliczności polimeru. Podczas gdy modyfikacja cząstkami szkła sprzyja krystalizacji, jednoczesna obecność z PPh w kompozytach polimerowo-ceramicznych prowadzi do efektu odwrotnego - redukcji stopnia krystaliczności oraz zmniejszenia rozmiaru krystalitów.

Zjawisko to może wynikać z synergicznego oddziaływania cząstek bioaktywnego szkła i związków polifenolowych. Cząstki bioaktywnego szkła mogą ograniczać mobilność segmentów łańcuchów polimerowych, co utrudnia ich reorganizację w dobrze wykształcone obszary krystaliczne [60]. Dodatkowo, związki polifenolowe mogą wiązać się z powierzchnią cząstek szkła, modyfikując ich zdolność wiązania z osnową polimerową i wpływając na przebieg procesu krystalizacji [71]. Kompleksowe oddziaływania pomiędzy szkłem bioaktywnym, polifenolami oraz osnową polimerową sprawiają, że proces krystalizacji staje się bardziej złożony, prowadząc do zmniejszenia stopnia krystaliczności materiału.

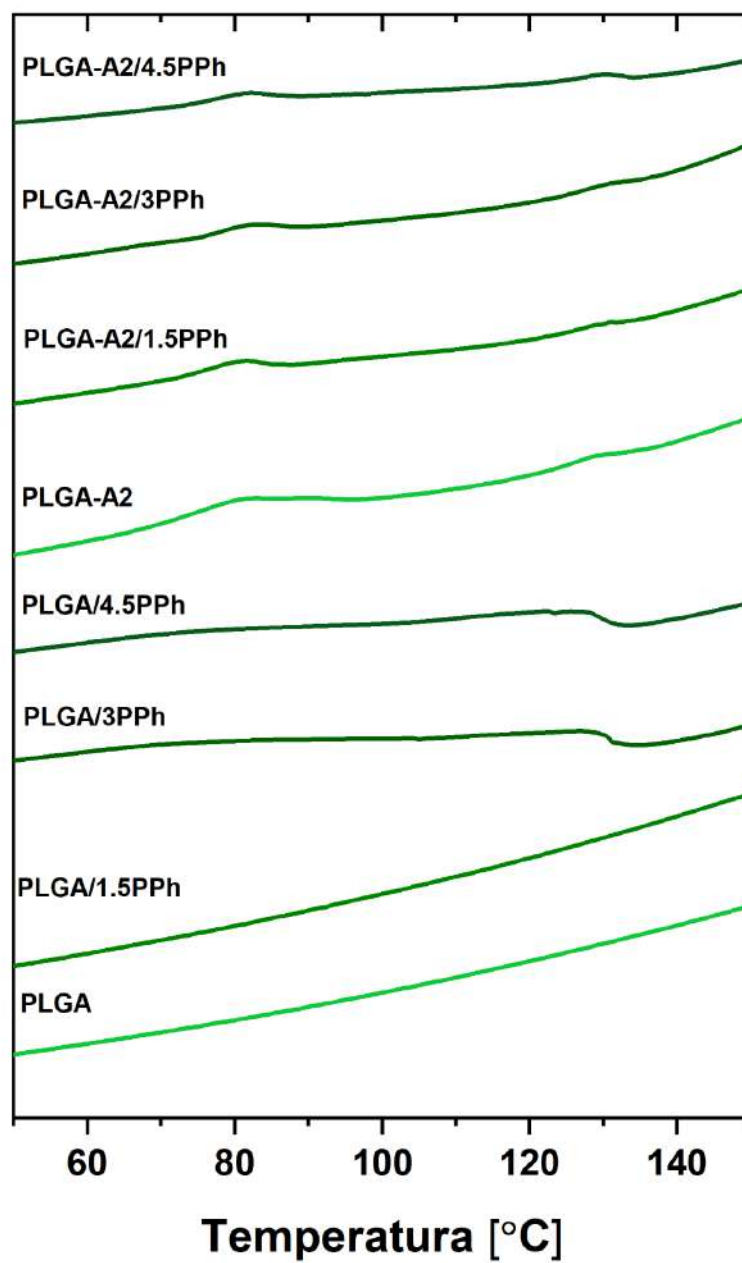


Fig. 8. Termogramy DSC dla materiałów na bazie PLGA.

Tab. 6. Temperatura topnienia, entalpia topnienia badanych materiałów polimerowych i kompozytowych na bazie PLGA.

Nazwa materiału	DSC	
	T_m [°C]	ΔH (J/g)
PLGA	133,2	1,8
PLGA/1.5 PPh	137,5	2,1
PLGA/3 PPh	136,5	18,3
PLGA/4.5 PPh	135,5	18,0
PLGA-A2	138,5	4,0
PLGA-A2/1.5 PPh	137,1	4,2
PLGA-A2/3 PPh	136,8	4,5
PLGA-A2/4.5 PPh	136,8	4,8

W przeprowadzonych badaniach, przy wykorzystaniu techniki różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC), zaobserwowano, że wprowadzenie PPh do amorficznego kopolimeru PLGA prowadzi do pojawienia się endotermicznego efektu topnienia, obserwowanego na termogramach w próbkach zawierających wyższe stężenia PPh. Już przy najniższym stężeniu PPh (1.5%) obserwowany był słaby efekt topnienia, co może wskazywać na inicjację procesu krystalizacji nawet przy niewielkim dodatku PPh. Wraz ze wzrostem stężenia PPh obserwowano wyraźny wzrost entalpii topnienia, co może potwierdzać ich rolę w promowaniu krystaliczności. Temperatura topnienia początkowo rosła, jednak przy wyższych stężeniach polifenoli nieznacznie malała, co może świadczyć o działaniu PPh jako plastyfikatora.

Modyfikacja PLGA cząstkami szkła powoduje pojawienie się dodatkowych efektów topnienia, a wraz ze wzrostem stężenia związków polifenolowych obserwuje się jednoczesny wzrost entalpii topnienia (ΔH). Sugeruje to synergiczne działanie obu dodatków w promowaniu procesu krystalizacji PLGA.

Choć brakuje badań szczegółowo analizujących wpływ obu dodatków do PLGA na jego właściwości termiczne, w literaturze opisano badania potwierdzające oddziaływanie napełniaczy ceramicznych na zmianę tych właściwości [72]. Autorzy sugerują, że zmiany termiczne mogą wynikać z relaksacji naprężeń w łańcuchach polimerowych, zachodzącej podczas nagrzewania materiału. Z kolei wyniki przedstawione przez Si et al. wskazują, że zmiany właściwości termicznych PLLA modyfikowanego tiobisfenolem mogą wynikać z tworzenia wiązań wodorowych z grupami estrowymi polimeru, co hamuje mobilność łańcuchów i ogranicza ich zdolność do krystalizacji, skutkując wzrostem udziału fazy amorficznej oraz obniżeniem temperatury topnienia i krystalizacji [73].

4.1.3. WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNE

W celu oceny wpływu wzbogacenia polifenoliami na właściwości mechaniczne badanych materiałów, przeprowadzono analizę trzech parametrów: modułu Younga (E_t), wytrzymałości na rozciąganie (σ_M) oraz wydłużenia przy maksymalnej sile (ϵ_M). Wyniki przedstawiono na Fig. 9.

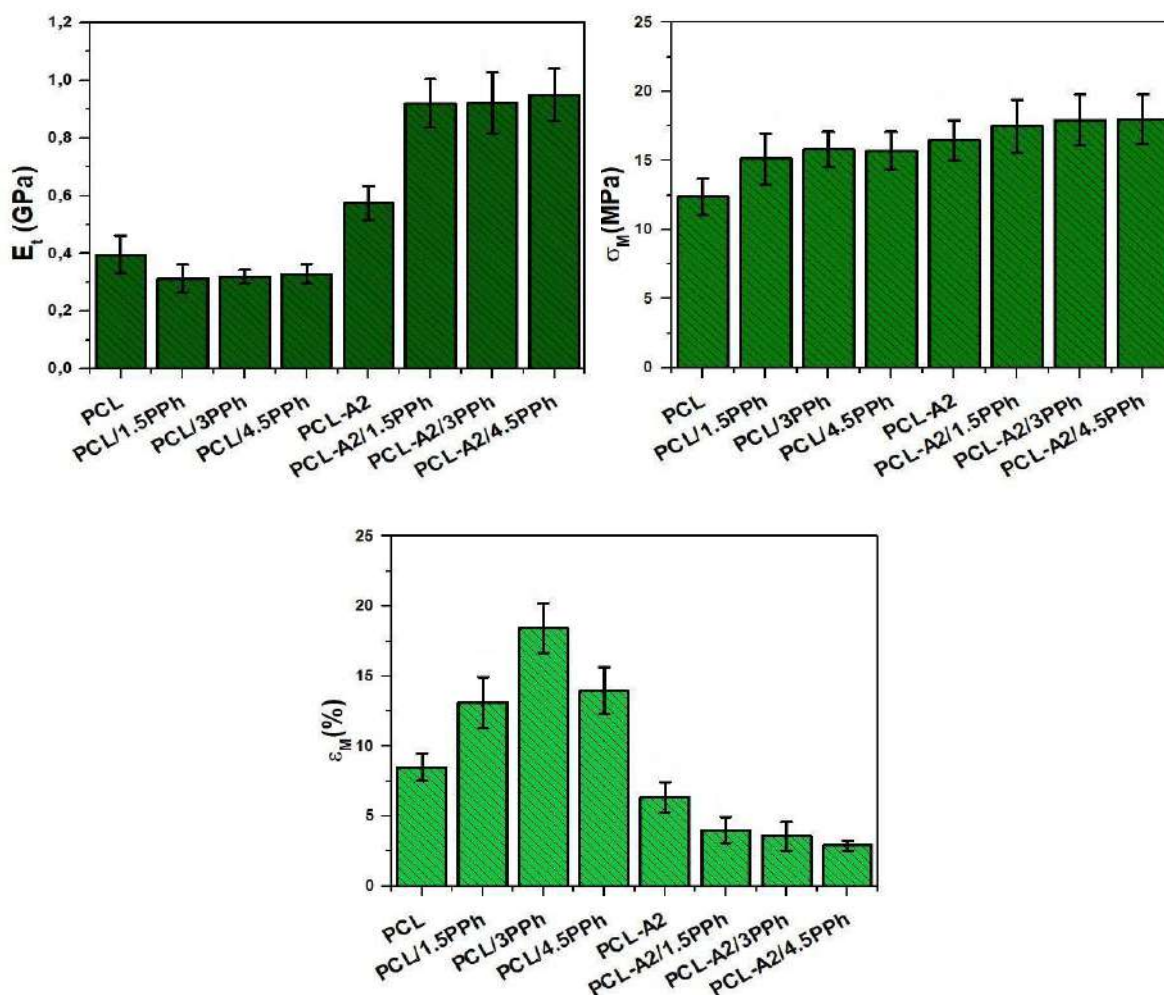


Fig. 9. Moduł Younga (E_t), wytrzymałość na rozciąganie (σ_M) i wydłużenie (ϵ_M) przy maksymalnej sile materiałów na bazie PCL.

Wprowadzenie związków polifenolowych do folii polimerowych indukuje zmiany w ich właściwościach mechanicznych. Zaobserwowany spadek wartości modułu Younga dla folii PCL/PPh może być interpretowany jako bezpośrednia konsekwencja działania PPh jako plastyfikatora polimeru. Wzrost wytrzymałości na rozciąganie oraz wydłużenia przy maksymalnej sile sugeruje zwiększenie mobilności łańcuchów polimerowych, co jest charakterystycznym efektem wprowadzenia plastyfikatora do osnowy polimerowej.

Podobne wyniki dotyczące wpływu związków polifenolowych na właściwości mechaniczne polimerów zostały przedstawione przez Cerruti et al. (2011). W swojej analizie oceniali wpływ ekstraktu z bioodpadów winiarskich (EP) jako modyfikatora właściwości mechanicznych polimerów na bazie skrobi (Mater-Bi). Stwierdzili, że EP wykazuje działanie plastyfikujące, prowadząc do zwiększenia elastyczności materiału oraz podwyższenia wartości wydłużenia przy zerwaniu. Efekt ten przypisano zdolności EP do oddziaływania z łańcuchami polimerowymi, osłabiając ich wzajemne oddziaływania, co ułatwia ich przesuwanie się względem siebie pod wpływem sił mechanicznych [74].

Wprowadzenie modyfikatora w postaci cząstek bioaktywnego szkła do osnowy polimerowej spowodowało wzrost modułu Younga, wzrost wytrzymałości na rozciąganie i spadek wydłużenia przy maksymalnej sile. Zwiększenie sztywności folii polimerowych po wprowadzeniu cząstek szkła znajduje potwierdzenie w badaniach innych autorów [60], [75]. Obecność związków polifenolowych w materiałach kompozytowych prowadzi do wzrostu wartości modułu Younga, co sugeruje, że PPh mogą pełnić rolę środków dwusprzęgających. Ich zdolność do oddziaływania zarówno z powierzchnią cząstek szkła bioaktywnego, jak i z łańcuchami polimerowymi może sprzyjać poprawie adhezji międzyfazowej, co skutkuje lepszymi właściwościami mechanicznymi kompozytu.

Wartości modułu Younga i wytrzymałości na rozciąganie nie wykazały istotnej zależności od stężenia PPh w przypadku materiałów kompozytowych, sugerując osiągnięcie efektu wzmacniającego już przy najniższym stężeniu PPh.

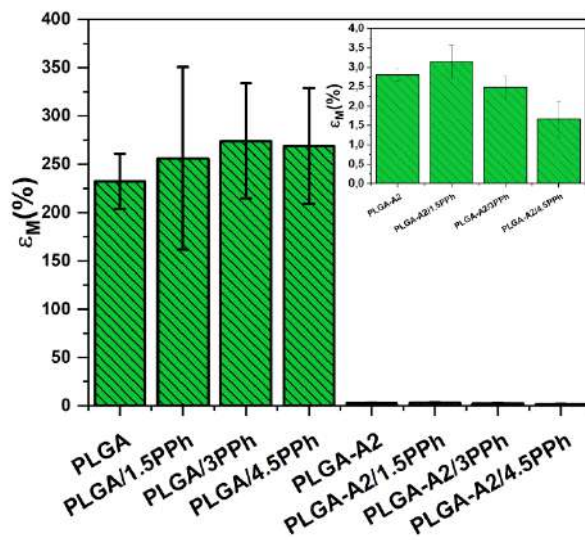
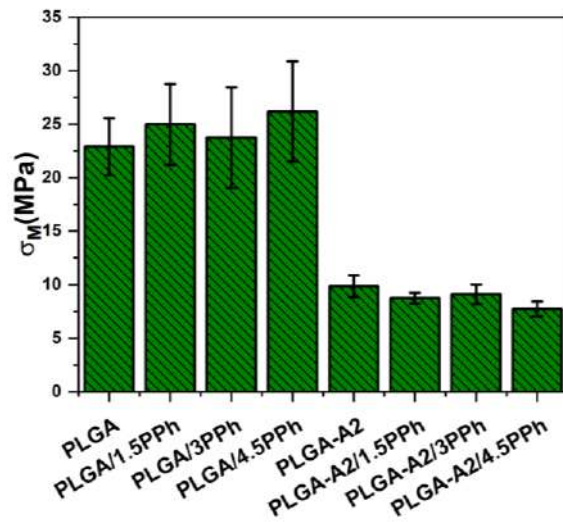
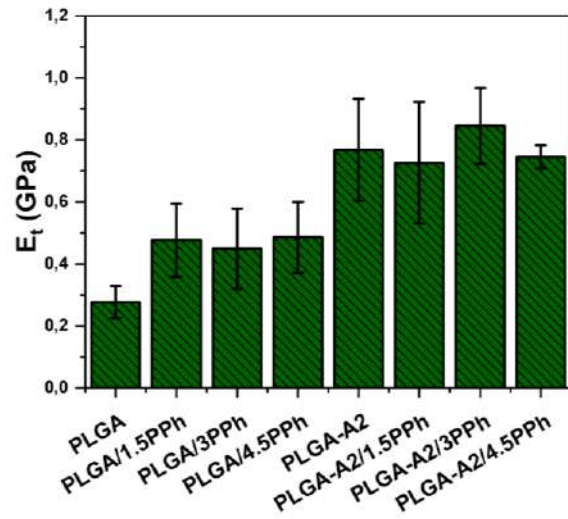


Fig. 10. Moduł Younga (E_t), wytrzymałość na rozciąganie (σ_M) i wydłużenie (ϵ_M) przy maksymalnej sile folii na bazie PLGA

Wprowadzenie bioaktywnych związków polifenolowych do folii polimerowych PLGA powoduje modyfikacje właściwości mechanicznych materiału, w szczególności wpływając na moduł Younga (E_t). Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że dodatek związków polifenolowych do folii polimerowych skutkuje znaczącym zwiększeniem wartości modułu Younga w porównaniu z materiałem polimerowym na bazie PLGA niewzbogaconym w ekstrakt. Możliwe, że obserwowany wzrost wartości modułu Younga jest efektem pojawiającej się krystaliczności polimeru, spowodowanej przez dodatek związków polifenolowych.

Podobne wyniki przedstawili Gentile et al. (2014), którzy wykazali, że wprowadzenie bioaktywnego szkła do polimeru prowadzi do znacznego wzrostu wartości modułu Younga. W przypadku kompozytów opartych na PLGA, obecność bioaktywnego szkła znacząco poprawiła ich wytrzymałość mechaniczną, co przypisano silnym interakcjom na granicy faz pomiędzy szkłem a łańcuchami polimerowymi [76].

Odmienne efekty zaobserwowano w przypadku kompozytów o osnowie PLGA zawierających związki polifenolowe. Wprowadzenie ekstraktu do materiałów kompozytowych na bazie PLGA nie wpłynęło istotnie na poprawę właściwości mechanicznych – główne zmiany były związane z obecnością bioaktywnego szkła, które odpowiada za wzrost modułu Younga, przy jednoczesnym spadku wytrzymałości na rozciąganie i wydłużenia przy maksymalnej sile. W przypadku kompozytów z osnową PCL zaobserwowano natomiast wyraźny wzrost modułu sprężystości po wprowadzeniu polifenoli. Różnice te mogą wynikać z odmiennych właściwości strukturalnych obu polimerów: PCL jako materiał semikrystaliczny może lepiej wiązać związki polifenolowe wewnątrz objętości kompozytu, co wpływa korzystnie na wiązania międzyfazowe oraz procesy krystalizacji. Z kolei amorficzny charakter PLGA może ograniczać tę zdolność [67]. Analiza właściwości powierzchniowych (zwilżalność) również wskazała na słabsze wiązanie polifenoli w kompozytach PLGA-A2, co może pośrednio tłumaczyć mniejszy wpływ tych związków na właściwości mechaniczne materiału.

4.1.4. WŁAŚCIWOŚCI ANTYOKSYDACYJNE

W ramach niniejszej pracy przeprowadzono ocenę właściwości antyoksydacyjnych materiałów polimerowych oraz kompozytów wzbogaconych w związki polifenolowe, w celu określenia ich zdolności do neutralizacji reaktywnych form tlenu (ROS) oraz potencjału redukcyjnego, w zależności od rodzaju zastosowanej fazy modyfikującej. Zastosowane testy

ABTS, DPPH oraz FRAP umożliwiły ilościową analizę aktywności przeciwutleniającej badanych materiałów. Wyniki przedstawiono na Fig. 11.

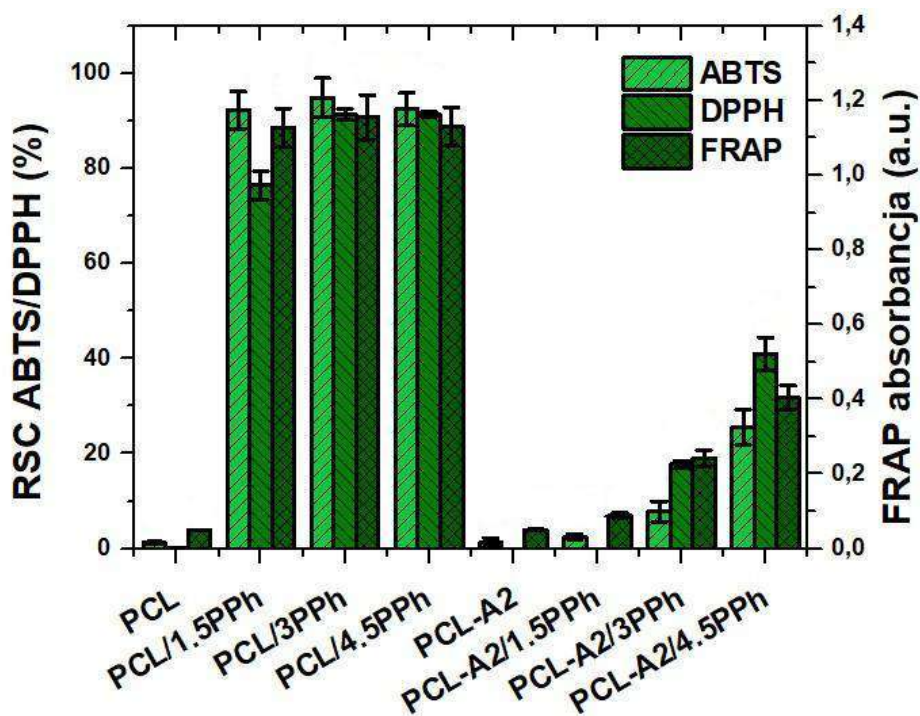


Fig. 11. Zdolność zmiatania rodników (RSC) ABTS •• i DPPH • oraz zdolność redukowania jonów żelaza (III) (FRAP) przez badane materiały.

Analiza właściwości antyoksydacyjnych metodami ABTS, DPPH i FRAP ujawniła istotne różnice w zdolności badanych materiałów do neutralizacji reaktywnych form tlenu (ROS) oraz redukcji jonów żelaza. Folie PCL wzbogacone w związki polifenolowe wykazywały wysoką skuteczność w zmiataniu rodników (RSC) oraz właściwości redukcyjne, co można bezpośrednio przypisać obecności polifenoli. Interesującym zjawiskiem było jednak to, że aktywność antyoksydacyjna tych folii nie zależała od stężenia polifenoli, co sugeruje możliwość nasycenia powierzchni materiału aktywnymi związkami polifenolowymi sprzyjającymi reakcjom z ROS, już przy najmniejszej badanej koncentracji PPh.

Natomiast kompozyty PCL-A2 wzbogacone w polifenole wykazywały stopniowy wzrost zdolności do zmiatania rodników oraz właściwości redukcyjnych wraz ze wzrostem zawartości polifenoli, jednak wartości te były niższe w porównaniu do czystych folii PCL/PPh. Prawdopodobnie było to wynikiem oddziaływań polifenoli z cząstkami szkła obecnymi w objętości kompozytu, co mogło ograniczać ich dostępność na powierzchni materiału, a tym samym wpływać na skuteczność interakcji z ROS oraz zdolność redukcji jonów żelaza. Badania przeprowadzone przez Onychina et. al. wskazują, że liczba i pozycja grup -OH w cząsteczce polifenolu istotnie wpływają na jego zdolności antyoksydacyjne [77]. Podobnie

Santos et al. wskazuje w swojej pracy, że aktywność antyoksydacyjna jest ściśle powiązana z liczbą grup -OH oraz ich ułożeniem w strukturze cząsteczki [78].

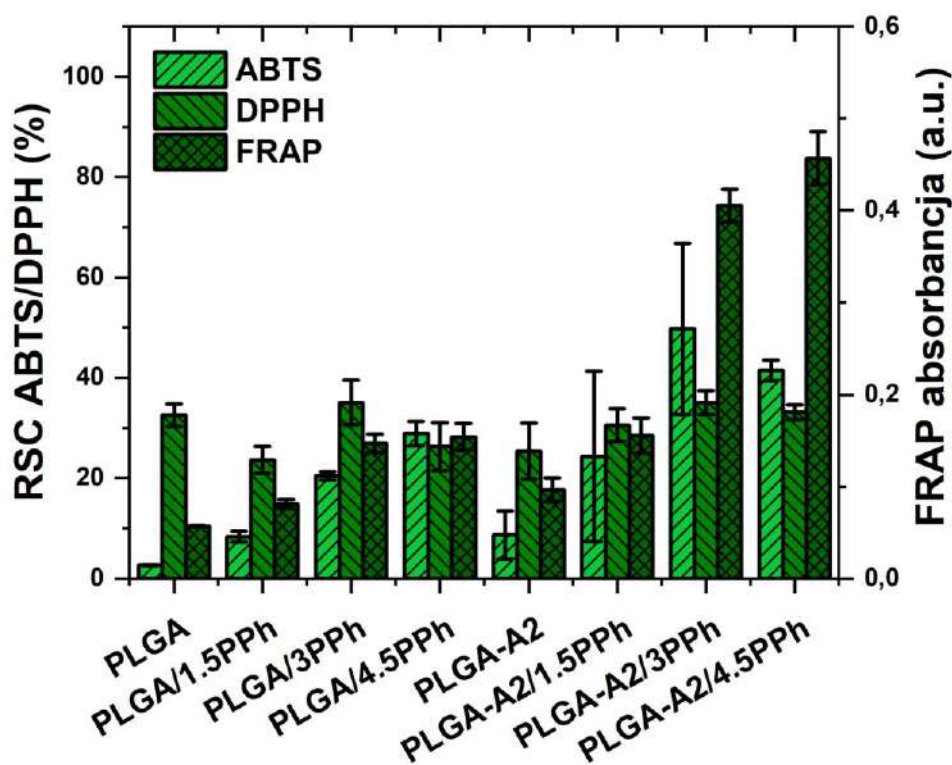


Fig. 11a. Zdolność zmiatania rodników (RSC) ABTS •+ i DPPH • oraz zdolność redukcji jonów żelaza (III) (FRAP) przez badane materiały.

Wyniki badań właściwości antyoksydacyjnych przeprowadzonych metodami ABTS, DPPH i FRAP wykazały niższą aktywność przeciwutleniającą folii na bazie PLGA w porównaniu do folii PCL, co najprawdopodobniej wynika z ograniczonej dostępności związków polifenolowych na powierzchni materiału. Omawiane wcześniej wyniki badań powierzchniowych folii polimerowych potwierdziły, że PLGA wykazuje zdolność do wiązania związków polifenolowych w objętości folii, co prowadzi do ich zmniejszonej ekspozycji na powierzchni i tym samym ograniczonej interakcji z reaktywnymi formami tlenu (ROS), skutkując niższą zdolnością antyoksydacyjną w porównaniu do materiałów polimerowych PCL.

Modyfikacja PLGA poprzez wprowadzenie cząstek bioaktywnego szkła (A2), w połączeniu z różnymi stężeniami związków polifenolowych, doprowadziła do wzrostu zdolności zmiatania rodników oraz absorbancji w teście FRAP w porównaniu do czystych folii polimerowych. Oznacza to, że dodatek cząstek szkła do folii polimerowej spowodował wzrost aktywności antyoksydacyjnej materiału potwierdzony testami ABTS i FRAP. Brak istotnych

różnic w teście DPPH najprawdopodobniej wynika z innego rodzaju wolnego rodnika użytego w tej metodzie. Dalsze wzbogacenie materiału polifenolami przyczyniło się do wzrostu zdolności do zmiatania wolnych rodników i redukcji jonów żelaza, osiągając wartości wyższe niż w przypadku folii na bazie PLGA wzbogaconych różnymi koncentracjami związków polifenolowych. Może to sugerować, że PLGA skuteczniej wiąże związki polifenolowe wewnątrz objętości materiału niż kompozyty PLGA-A2, co ogranicza ich dostępność na powierzchni, a w konsekwencji zmniejsza efektywność interakcji z ROS. Natomiast w kompozytach proces wbudowywania polifenoli zachodzi w mniejszym stopniu, co zwiększa ich dostępność na powierzchni i poprawia zdolności antyoksydacyjne.

Kompozyty na bazie PCL uzyskały niższe wyniki w testach antyoksydacyjnych niż odpowiadające im kompozyty PLGA-A2. Może to wynikać z silniejszych oddziaływań między polifenolami a cząstkami bioaktywnego szkła w układzie PCL-A2, co ogranicza ich swobodę migracji na powierzchnię i zmniejsza skuteczność neutralizacji ROS. W przypadku kompozytów PLGA-A2 efekt ten był mniej widoczny, co sugeruje, że polifenole pozostawały bardziej dostępne i aktywne w reakcjach przeciwutleniających.

Zdolności antyoksydacyjne fitozwiązków są szeroko opisywane w literaturze, często w połączeniu z różnymi materiałami i związkami, co podkreśla ich kluczową rolę jako głównych czynników poprawiających właściwości antyoksydacyjne materiałów. Zhao et al. (2023) również opisali, że dodanie kwasu garbnikowego (związek polifenolowy z grupy tanin) do nanoosników z albuminy poprawiało ich właściwości antyoksydacyjne [79]. W przypadku kompozytów PLGA wzbogaconych w polifenole, ich aktywność antyoksydacyjna rosła proporcjonalnie do stężenia polifenoli, co jest zgodne z zebranymi wynikami przez Zhang et al. [80]. Ponadto, badania Iviglia et al. (2021) podkreślają znaczenie polifenoli w poprawie właściwości biomateriałów, takich jak ceramiczne napełniacze kostne na bazie hydroksyapatytu i β TPC wzbogacone ekstraktem z wyłoków winogronowych, które wykazały właściwości antyoksydacyjne, przeciwzapalne i proosteogenne, co ma istotne znaczenie dla terapii regeneracyjnych [81].

KINETYKA UWALNIANIA ZWIĄZKÓW POLIFENOLOWYCH

W celu oceny profilu uwalniania związków polifenolowych z opracowanych materiałów przeprowadzono analizę kinetyki ich uwalniania w warunkach *in vitro*. Wyniki zaprezentowano na Fig. 12.

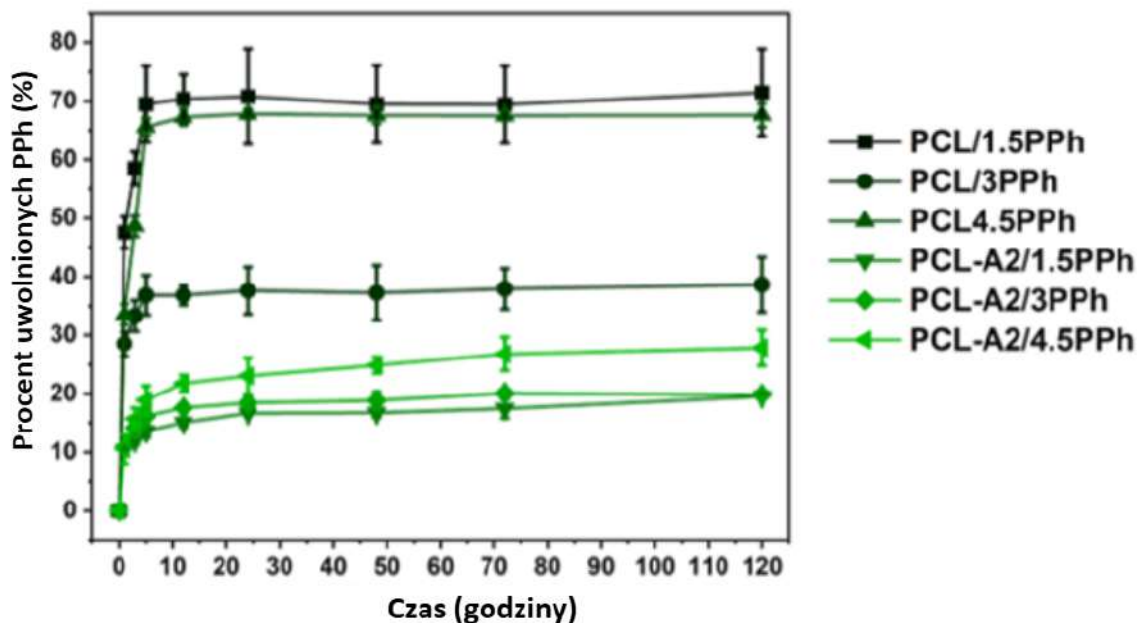


Fig. 12. Procent uwolnionych związków polifenolowych w stosunku do początkowej zawartości w materiałach na bazie PCL.

Proces uwalniania związków polifenolowych z materiałów polimerowych i kompozytowych odgrywa kluczową rolę w ich potencjalnych zastosowaniach terapeutycznych. Efektywność tego procesu zależy od właściwości fizykochemicznych nośnika oraz stężenia związków polifenolowych. W celu określenia dynamiki uwalniania przeprowadzono analizę procentowej ilości polifenoli uwolnionych w stosunku do ich początkowej zawartości w badanych materiałach.

Analiza wykazała, że zarówno folie polimerowe, jak i kompozytowe rozpoczęły proces uwalniania w ciągu pierwszych godzin inkubacji. Tempo tego zjawiska było jednak zróżnicowane i zależne od składu materiału. W przypadku folii polimerowych zaobserwowano intensywne uwalnianie polifenoli, osiągające maksimum w ciągu 5 godzin. Po tym czasie ilość uwolnionych związków polifenolowych utrzymywała się na zbliżonym poziomie.

Materiały kompozytowe charakteryzowały się wolniejszą kinetyką uwalniania, przy czym – podobnie jak dla materiałów polimerowych – najintensywniejsze uwalnianie PPh widoczne było w pierwszych godzinach inkubacji. Największą ilość polifenoli zaobserwowano po 72 godzinach inkubacji, a całkowita ilość uwolnionych związków była niższa niż w foliach polimerowych. Wyniki sugerują, że obecność fazy nieorganicznej w strukturze kompozytu wpływa na retencję polifenoli wewnątrz objętości materiału, ograniczając ich migrację na powierzchnię, co prowadzi do ich stopniowego uwalniania. Mechanizm ten sprzyja

kontrolowanemu uwalnianiu bioaktywnych związków, a to ma istotne znaczenie w kontekście zastosowań biomedycznych. Podobne obserwacje poczynili Słota et al., którzy zastosowali hydroksyapatyt jako modyfikator osnowy polimerowej na bazie PVP, alginianu sodu i żelatyny wzbogaconej ekstraktem z liści szałwii lekarskiej, badając profil uwalniania zawartych w niej związków polifenolowych [82]. Stopniowe uwalnianie może przyczynić się do przedłużonego efektu terapeutycznego, co jest pożądane w materiałach przeznaczonych do długotrwałej aktywności biologicznej [83]

4.1.5. WŁAŚCIWOŚCI BIOAKTYWNE

Ocenę właściwości bioaktywnych otrzymanych materiałów przeprowadzono stosując inkubację w symulowanym płynie fizjologicznym (SBF) w przedziale czasowym 3-14 dni. Analizowano zmianę morfologii oraz składu chemicznego obu powierzchni (AS i GS), wykorzystując skaningową mikroskopię elektronową (SEM) w połączeniu z analizą składu chemicznego powierzchni (EDS). Celem potwierdzenia obserwowanych zmian powierzchni, przeprowadzono analizę strukturalną FTIR, natomiast w oparciu o analizę składu chemicznego płynu fizjologicznego podjęto próbę oceny szybkości chemisorpcji jonów z SBF oraz rozpuszczania cząstek szkła bioaktywnego. Obrazy SEM i widma EDX dla powierzchni GS i AS po inkubacji zostały przedstawione na Fig. 13.

SEM

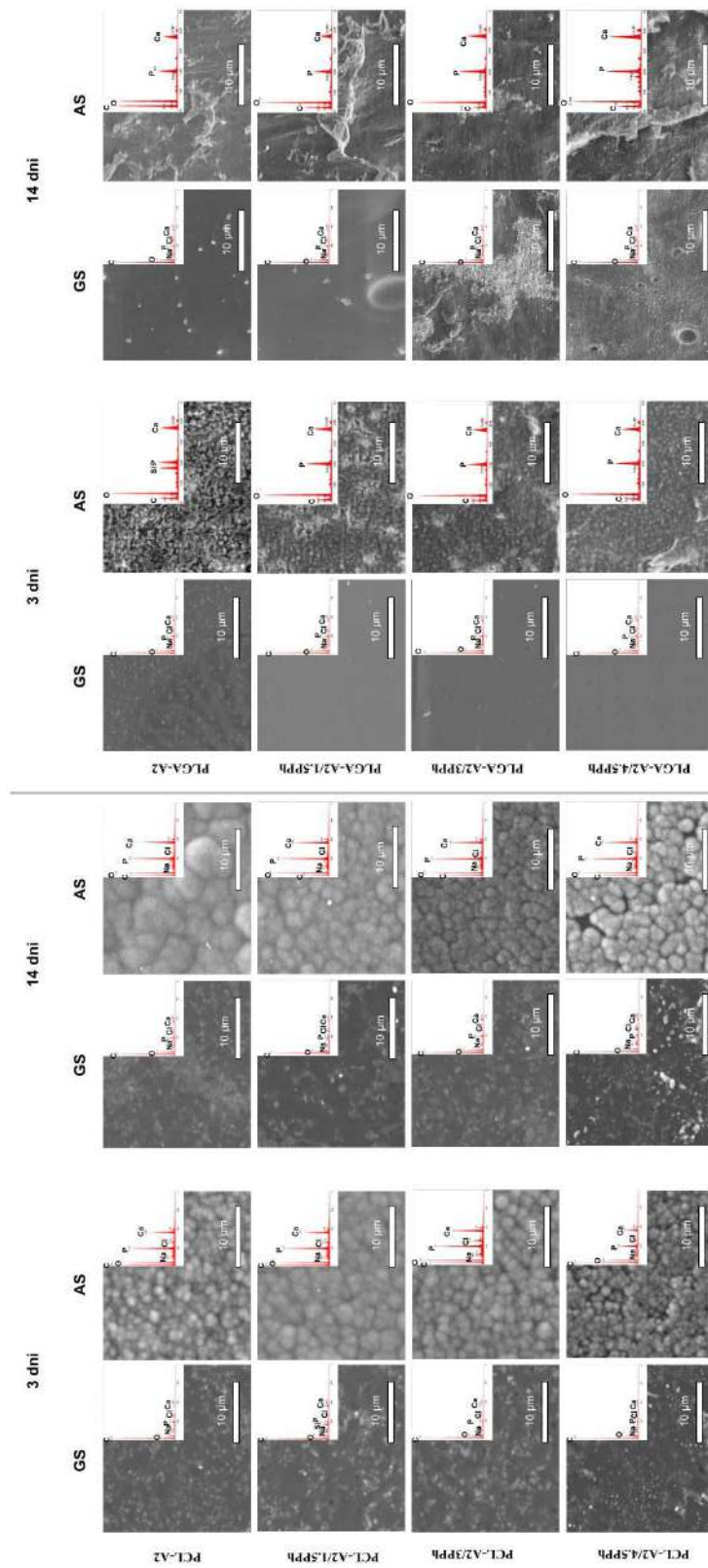


Fig 13. Obrazy SEM wraz z analizą EDX powierzchni AS i GS folii przed i po 3- i 14-dniowej inkubacji w SBF.

WYNIKI INKUBACJI MATERIAŁÓW NA BAZIE PCL

Żadna z powierzchni folii PCL oraz PCL/PPh nie wykazała zmian chemicznych ani morfologicznych po 14 dniach inkubacji (dane nie zostały przedstawione).

W przypadku wszystkich folii kompozytowych, już po 3 dniach inkubacji, powierzchnie GS zostały pokryte jednolitą warstwą zawierającą niewielkie ilości wapnia i fosforu. Natomiast na powierzchniach AS kompozytów PCL-A2 oraz PCL-A2/PPh zaobserwowano sferyczne, kalafiorowate wytrącenia, charakterystyczne dla formującej się warstwy hydroksyapatytu. Rozmiar sferycznych form zmniejszał się wraz ze wzrostem stężenia PPh, co może wynikać z ich potencjalnego wpływu na proces nukleacji i wzrostu warstwy fosforanowo-wapniowej. Po 14 dniach inkubacji powierzchnie AS wykazywały dalszą intensyfikację mineralizacji – ilość i gęstość wytrąceń wzrosła, tworząc bardziej zwartą warstwę fosforanowo-wapniową

WYNIKI INKUBACJI MATERIAŁÓW NA BAZIE PLGA

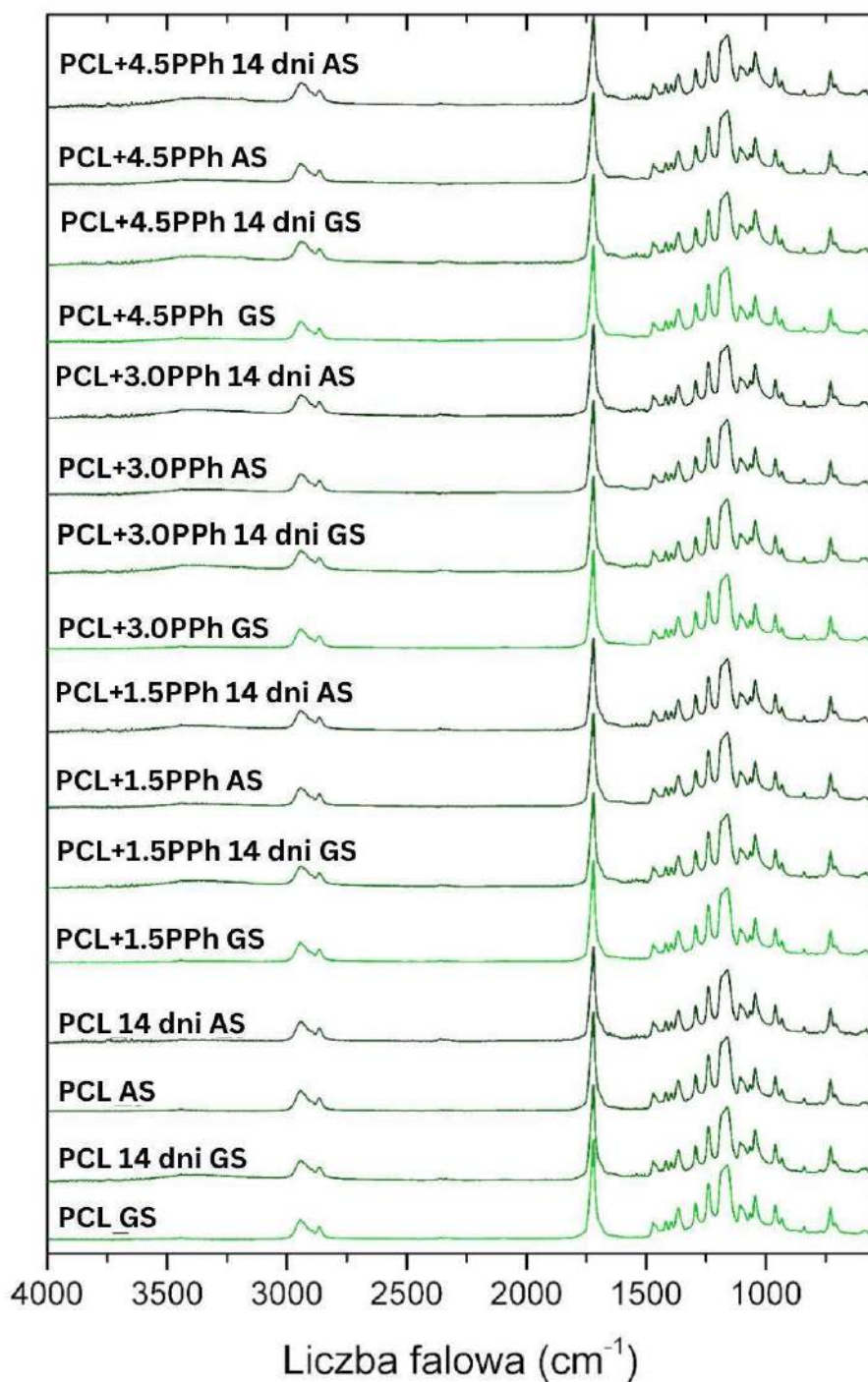
Badania bioaktywności kompozytów o osnowie PLGA, wzbogaconych związkami polifenolowymi wykazały istotne różnice w mikrostrukturze powierzchni próbek po 3 i 14 dniach inkubacji.

Po 3 dniach inkubacji powierzchnie GS wszystkich próbek pozostały morfologicznie jednorodne i nie wykazywały wyraźnych zmian, niezależnie od stężenia PPh. Natomiast na powierzchniach AS zaobserwowano znaczące różnice w mikrostrukturze, zależne od zawartości polifenoli. Powierzchnia AS próbki PLGA-A2 była pokryta drobnymi sferycznymi wytrąceniami, co sugeruje początkową fazę formowania się warstwy bioaktywnej. W przypadku kompozytów zawierających polifenole (PLGA-A2/PPh) powierzchnia AS była pokryta mniejszymi, drobno upakowanymi sferycznymi formami. Wzrost stężenia PPh powodował zwiększenie gęstości i równomierności warstwy CaP, co sugeruje udział PPh w procesie mineralizacji.

Po 14 dniach inkubacji kompozyty na bazie PLGA wykazywały znaczące zmiany morfologiczne. Powstała warstwa CaP (na powierzchni AS) była znacznie grubsza w porównaniu do tej obserwowanej po 3 dniach i różniła się od form obserwowanych dla kompozytów PCL – zamiast typowych kalafiorowatych form wytrąceń, na powierzchniach AS kompozytów PLGA powstała bardziej jednolita warstwa mineralna, bogata w wapń i fosfor.

FTIR

Materiały dodatkowo poddano analizie FTIR celem zbadania zmian w intensywności i położeniu **pasm** odpowiadających grupom fosforanowym i węglanowym, wskazujących na tworzenie warstwy apatytowej po inkubacji. Wyniki przedstawiono na Fig. 14.



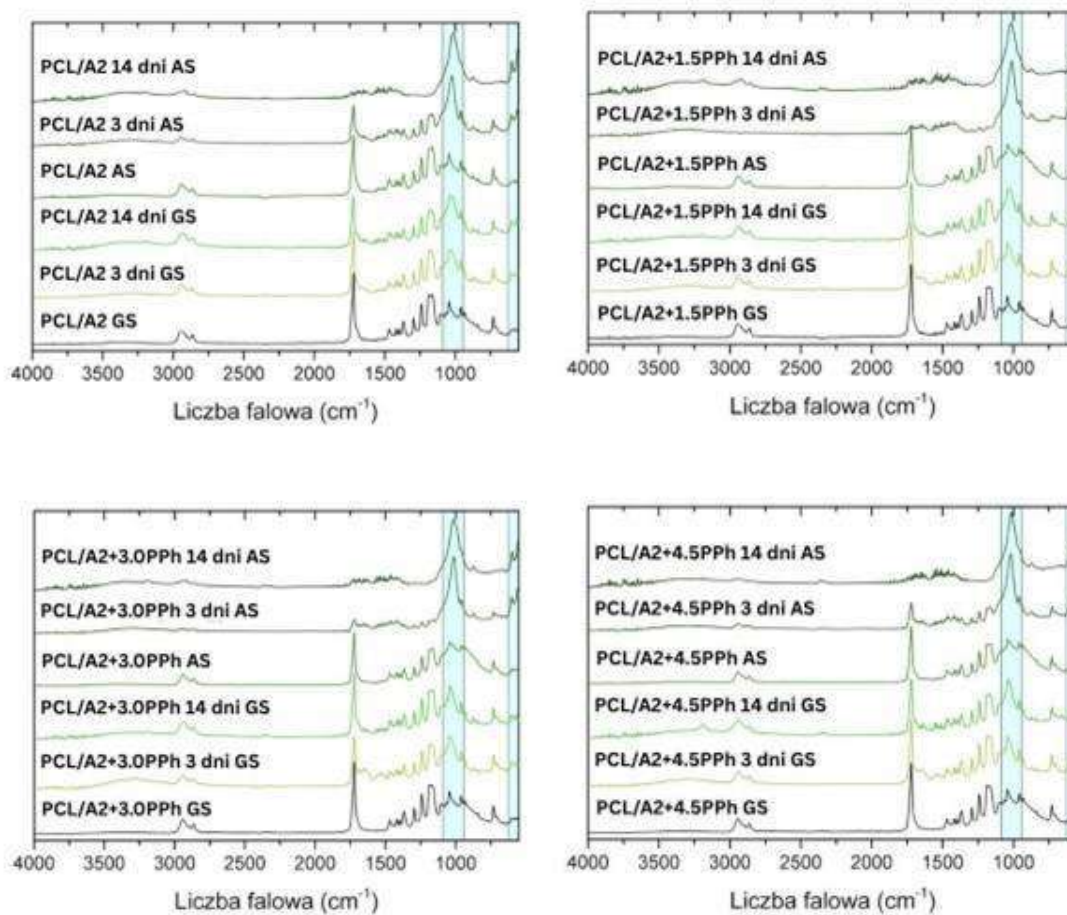


Fig. 14. Widma ATR-FTIR AS i GS folii polimerowych i kompozytowych przed i po 3- i 14-dniowej inkubacji w SBF.

Wyniki spektroskopii ATR-FTIR dla materiałów polimerowych PCL i PCL/PPh, po 14-dniowej inkubacji w symulowanym płynie ustrojowym (SBF) nie wykazały istotnych zmian w widmach.

W badaniach nad kompozytami polimerowymi (PCL), inkubowanymi w symulowanym płynie ustrojowym (SBF), już po 3 dniach inkubacji na widmach FTIR odnotowano pojawienie się nowych pasm w zakresie liczb falowych $560\text{--}602\text{ cm}^{-1}$ oraz $910\text{--}1180\text{ cm}^{-1}$, odpowiadających drganiom zginającym O-P-O i rozciągającym P-O w grupach fosforanowych PO_4^{3-} . Obecność pasma o niskiej intensywności przy 875 cm^{-1} , przypisywanego drganiom rozciągającym P-OH jonów HPO_4^{2-} oraz drganiom zginającym poza płaszczyznę jonów CO_3^{2-} , sugeruje formowanie się niestechiometrycznego nanokrystalicznego apatytu [84].

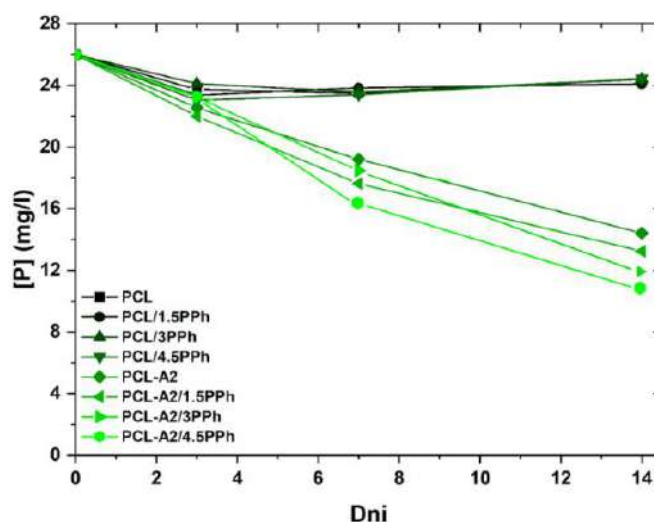
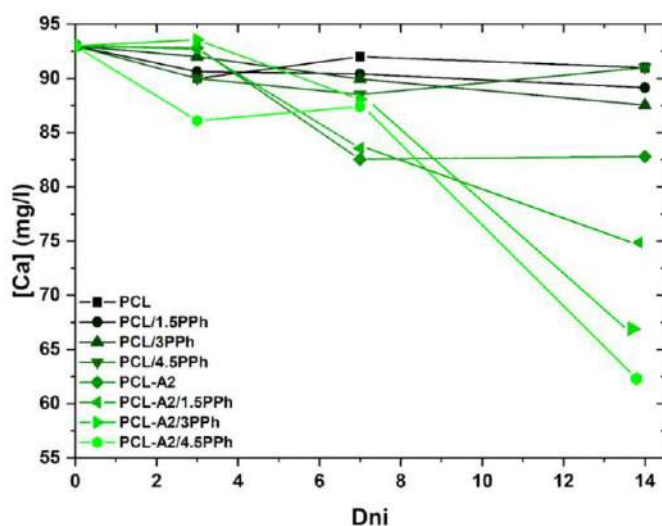
Analiza powierzchni AS i GS kompozytów wykazała, że warstwa apatytu tworzyła się szybciej na powierzchniach AS. Szybszy spadek intensywności pasm charakterystycznych dla PCL na

tych powierzchniach może wskazywać na efektywniejszą mineralizację, co potwierdzono obserwacjami mikroskopowymi (SEM).

W miarę wydłużania czasu inkubacji, intensywność pasm charakterystycznych dla apatytu wzrastała, przy zauważalnym spadku intensywności pasm przypisanych PCL. Sugeruje to stopniowe zwiększanie się grubości i ciągłości hydroksyapatytowej warstwy na powierzchni kompozytów. Po trzech dniach inkubacji stwierdzono, że intensywność pasm pochodzących od polimeru była niższa w przypadku materiałów wzbogaconych o PPh w porównaniu z kompozytami bez tych dodatków, co może wskazywać na szybszy proces tworzenia się warstwy fosforanowo-wapniowej na powierzchni kompozytów z dodatkiem polifenoli.

ICP

Płyn inkubacyjny poddano analizie ICP-OES celem oceny zmian stężeń jonów wapniowych, fosforanowych oraz krzemianowych. Pomiarzy prowadzono w przedziale czasowym 3-14 dni.



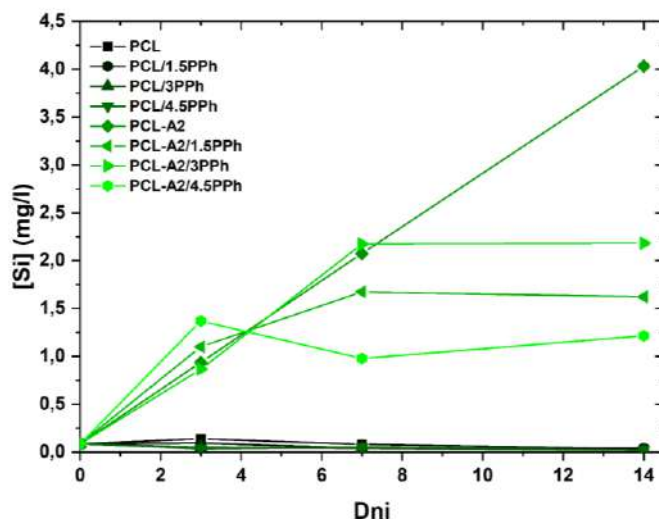


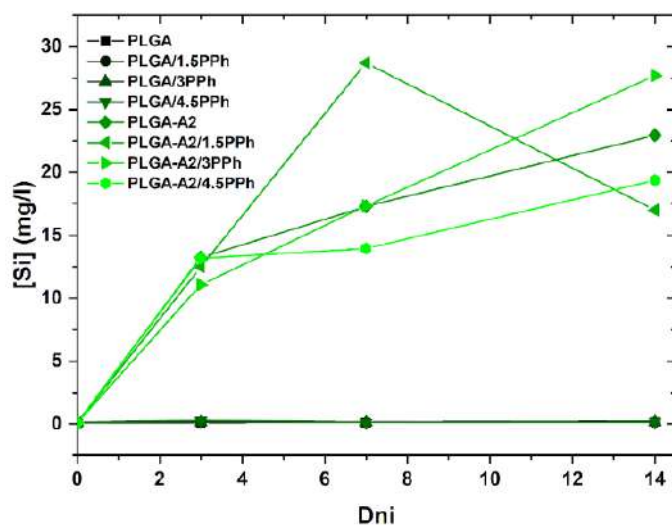
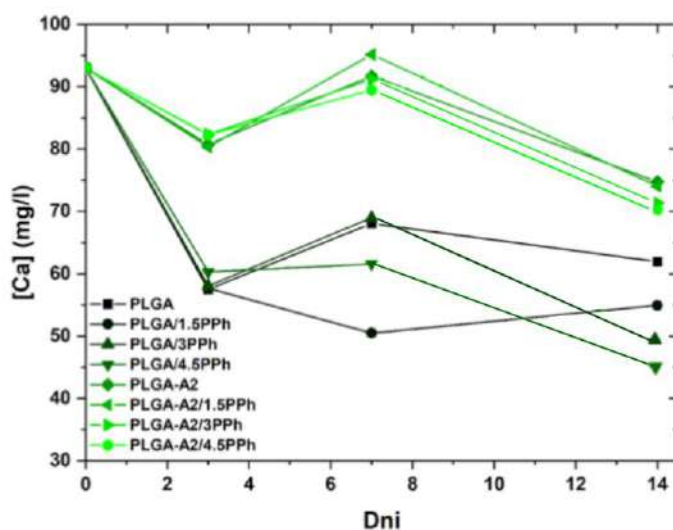
Fig. 15. Zmiany stężenia jonów wapniowych, fosforanowych i krzemianowych w SBF podczas inkubacji folii.

Analiza zmian stężeń jonów wapniowych, fosforanowych i krzemianowych w płynie inkubacyjnym (SBF) wykazała istotne różnice w zależności od rodzaju badanego materiału. W przypadku polimerowych folii PCL nie zaobserwowano znaczących zmian w stężeniach tych jonów w trakcie całego okresu inkubacji, co sugeruje ich ograniczoną interakcję z medium inkubacyjnym. Natomiast w płynie inkubacyjnym materiałów polimerowych wzbogaconych o PPh odnotowano nieznaczny spadek stężenia jonów wapniowych. Może to świadczyć o zdolności tych materiałów do adsorpcji jonów na swojej powierzchni. Istotnym czynnikiem wpływającym na ten proces mogła być zwiększona hydrofilowość powierzchni zmodyfikowanych materiałów, objawiająca się spadkiem kąta zwilżania i wzrostem składowej polarnej oraz bardziej rozwinięta topografia powierzchni, wynikająca z wprowadzenia związków polifenolowych. Potwierdza to literatura, wskazująca na kluczową rolę topografii w procesie zarodkowania hydroksyapatytu [75].

W przypadku materiałów kompozytowych na bazie PCL widoczny był znaczący spadek stężenia jonów wapniowych i fosforanowych w płynie inkubacyjnym SBF już po 7 dniach inkubacji, przy czym w przedziale 0-3 dni obserwowano wzrost koncentracji jonów Ca^{2+} związany z rozpuszczaniem cząstek szkła. Co istotne, intensywność procesu chemisorpcji jonów z płynu była proporcjonalna do zawartości PPh w materiale, co sugeruje, że wprowadzenie ekstraktu z szałwii lekarskiej przyspiesza proces mineralizacji warstwy fosforanowo-wapniowej. Jednocześnie materiały kompozytowe wzbogacone związkami polifenolowymi charakteryzowały się zmniejszoną szybkością uwalniania jonów

krzemianowych z bioaktywnego szkła do SBF, co prawdopodobnie wynikało z przyspieszonego formowania warstwy CaP na powierzchni materiału.

Podsumowując, obecność związków polifenolowych w badanych materiałach wpływa na dynamikę procesu mineralizacji. Ich działanie może wynikać z obecności dodatkowych grup hydroksylowych, które oddziałują z jonami wapniowymi obecnymi w płynie inkubacyjnym, inicjując proces nukleacji i wspomagając formowanie warstwy biomimetycznego apatytu [85].



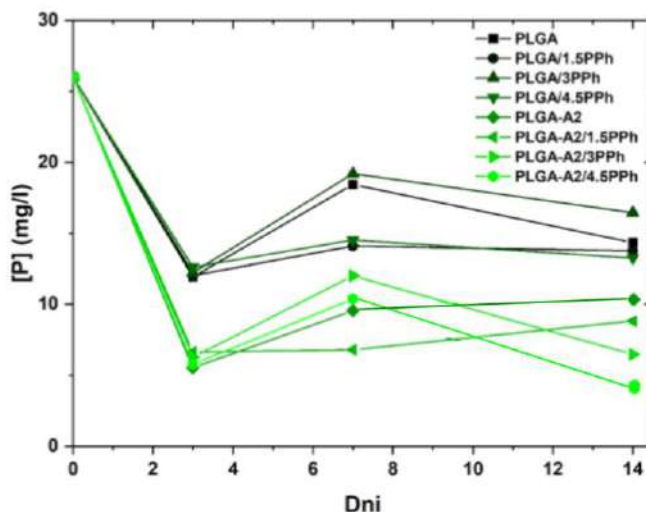


Fig. 16. Zmiany stężeń jonów wapniowych, fosforanowych i krzemianowych w SBF podczas inkubacji folii na bazie PLGA.

W przypadku folii PLGA, niezawierających ekstraktu z *Salvia officinalis* L. (szałwii lekarskiej), stężenie jonów wapniowych w płynie inkubacyjnym wykazało istotny spadek w ciągu pierwszych 48 godzin, po czym ustabilizowało się na poziomie około 60 mg/L. Wprowadzenie do folii na bazie PLGA związków polifenolowych skutkowało dalszą redukcją stężenia jonów wapniowych w SBF, co sugeruje silne oddziaływania tych związków z jonami wapniowymi. **Najprawdopodobniej polifenole, dzięki obecności licznych grup hydroksylowych, wykazują zdolność do kompleksowania jonów wapniowych oraz ich adsorpcji na powierzchni materiału, co prowadzi do zmniejszenia ich dostępności w roztworze.** Zaobserwowano także zależność pomiędzy stężeniem polifenoli a intensywnością tego efektu – wyższa zawartość związków polifenolowych w osnowie skutkowała większym ubytkiem jonów wapniowych w płynie inkubacyjnym, przy czym największy spadek zanotowano w przypadku próbki o najwyższym udziale polifenoli.

W kompozytach modyfikowanych bioaktywnym szkłem A2 (PLGA-A2) stężenie wapnia w medium inkubacyjnym wykazało bardziej złożony przebieg – początkowy spadek, następnie wzrost, a ostatecznie ponowną redukcję. Początkowy spadek może być związany z intensywną adsorpcją jonów wapniowych na powierzchni folii kompozytowych, co wskazuje na udział cząstek bioaktywnego szkła w procesie nukleacji i wzrostu warstwy hydroksyapatytu. Następujący wzrost stężenia wapnia można przypisać procesowi stopniowej degradacji osnowy polimerowej i uwalnianiu jonów wapniowych z bioaktywnego szkła do medium inkubacyjnego. W końcowej fazie inkubacji ponowny spadek stężenia wapnia w roztworze odnotowano wraz z wyższym stężeniem związków polifenolowych.

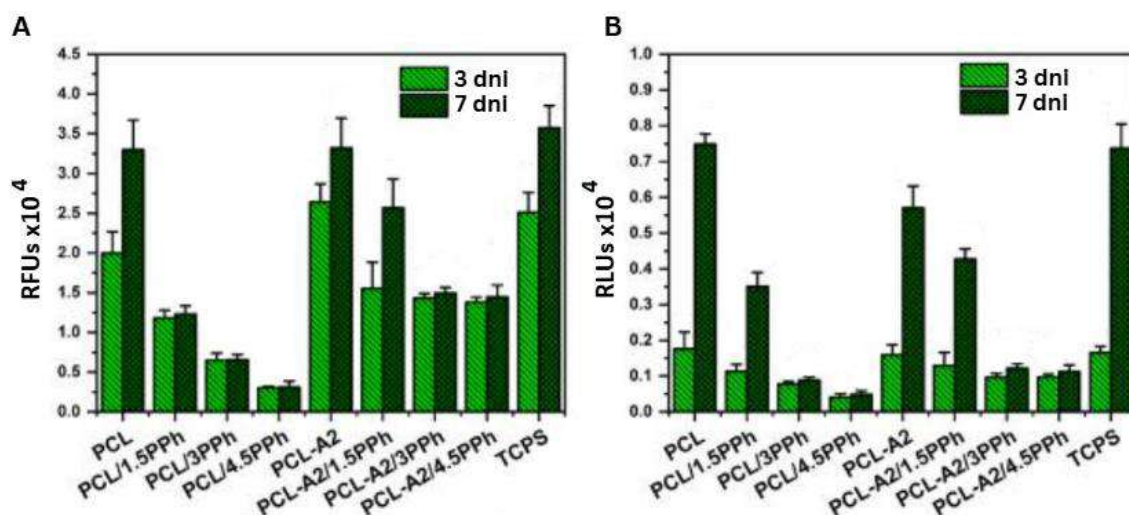
Można przypuszczać, że związki te wpływały na przyspieszone tworzenie warstwy hydroksyapatytowej, prowadząc do intensywniejszej adsorpcji jonów wapniowych z medium inkubacyjnego na powierzchni kompozytu.

Stężenie jonów fosforanowych w płynie inkubacyjnym wszystkich badanych materiałów na bazie PLGA początkowo ulegało obniżeniu, po czym następował niewielki wzrost ich koncentracji, a w dalszej fazie ponowny spadek. Dynamika tych zmian była konsekwencją procesów wymiany jonowej, w których jony fosforanowe (PO_4^{3-}) były początkowo uwalniane z bioaktywnego szkła, a następnie ulegały adsorpcji na powierzchni kompozytu, uczestnicząc w procesie biomimetycznej mineralizacji i formowaniu warstwy CaP. Wprowadzenie związków polifenolowych skutkowało większą redukcją jonów fosforanowych w medium. Spadek ten był zależny od stężenia związków polifenolowych.

W przypadku kompozytów PLGA-A2 modyfikowanych bioaktywnym szkłem zaobserwowano natomiast istotny wzrost koncentracji jonów krzemianowych w medium, co jest bezpośrednim wynikiem procesu rozpuszczania cząstek bioaktywnego szkła. Wzrost ten nie wykazywał jednoznacznej korelacji ze stężeniem związków polifenolowych w próbce, co sugeruje, że polifenole nie mają bezpośredniego wpływu na kinetykę uwalniania jonów krzemianowych.

CYTOTOKSYCZNOŚĆ

W celu oceny wpływu badanych materiałów na komórki ludzkie, przeprowadzono analizę aktywności metabolicznej fibroblastów oraz ocenę cytotoksyczności. Badania pozwoliły na określenie zależności między składem materiałów a odpowiedzią komórkową, w szczególności w kontekście obecności i stężenia związków polifenolowych.



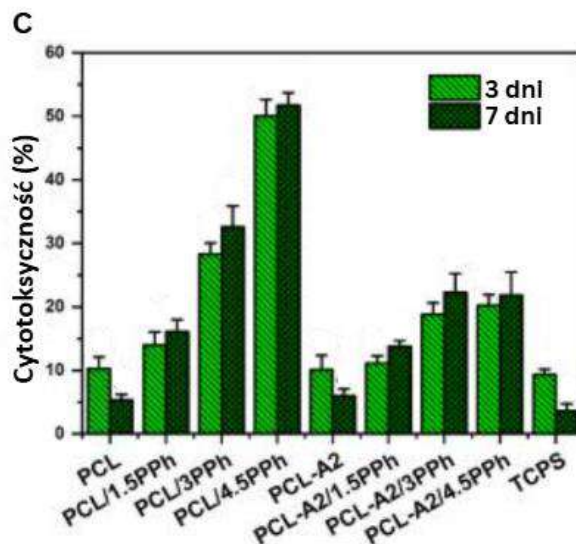


Fig. 17. Aktywność metaboliczna fibroblastów (A), poziom kinazy adenylowej w lizacie jako wskaźnik liczby nienaruszonych komórek adherentnych (B) oraz poziom kinazy adenylowej w supernatancie względem poziomu kinazy adenylowej jako wskaźnik cytotoksyczności materiału (C).

Analiza wpływu związków polifenolowych na aktywność metaboliczną fibroblastów oraz cytotoksyczność badanych materiałów wykazała istotne zależności pomiędzy ich koncentracją a odpowiedzią komórkową.

AKTYWNOŚĆ METABOLICZNA FIBROBLASTÓW

Ocena aktywności metabolicznej fibroblastów w obecności badanych materiałów polimerowych i kompozytowych wykazała, że wprowadzenie związków polifenolowych (PPh) wpływa na procesy metaboliczne komórek w sposób zależny od ich stężenia. Dla materiałów zawierających polifenole zaobserwowano obniżenie aktywności metabolicznej fibroblastów (*in vitro*), przy czym w przypadku materiałów kompozytowych odnotowano liniową zależność pomiędzy zawartością związków polifenolowych a spadkiem aktywności metabolicznej komórek. Sugeruje to dawkozależny efekt oddziaływania tych substancji na fibroblasty.

Po trzech dniach inkubacji aktywność metaboliczna fibroblastów w obecności materiałów kompozytowych ze wszystkimi analizowanymi stężeniami polifenoli była porównywalna, lecz niższa w odniesieniu do próbek niezawierających tych związków.

Interesującą zależność zaobserwowano dla materiałów polimerowych wzbogaconych w związki polifenolowe – w ich przypadku aktywność metaboliczna fibroblastów była niższa niż w kompozytach o analogicznej zawartości ekstraktu z *Salvia officinalis* L. Prawdopodobnie wynika to ze zdolności cząstek bioaktywnego szkła do adsorpcji polifenoli,

co ogranicza ich dostępność na powierzchni materiału i redukuje bezpośrednio oddziaływanie na komórki. W konsekwencji materiały kompozytowe mogą wykazywać stopniowe, kontrolowane uwalnianie związków polifenolowych, co może ograniczać ich cytotoksyczność.

CYTOTOKSYCZNOŚĆ BADANYCH MATERIAŁÓW

Ocena cytotoksyczności wykazała, że obecność związków polifenolowych wpływa na wzrost cytotoksyczności materiałów polimerowych i kompozytowych w sposób proporcjonalny do ich stężenia. Niemniej cytotoksyczność folii polimerowych i kompozytowych o najniższym stężeniu związków polifenolowych nie przekraczała odpowiednio 20% i 15%. Dodatkowo, w przedziale czasowym pomiędzy trzecim a siódmym dniem hodowli zaobserwowano wzrost liczby fibroblastów na powierzchni materiałów o najniższym stężeniu polifenoli (PCL/1.5PPh oraz PCL-A2/1.5PPh). Może to sugerować, że najniższa koncentracja polifenoli nie wywierają efektu hamującego, a wręcz mogą wspomagać proliferację fibroblastów.

Na podstawie uzyskanych wyników materiały o najniższym stężeniu związków polifenolowych zostały wytypowane do dalszych badań komórkowych.

PODSUMOWANIE

Materiały polimerowe i kompozytowe wzbogacono w związki polifenolowe ekstrahowane z *Salvia officinalis* L. Uzyskane wyniki badań wskazują na wpływ wprowadzonych związków polifenolowych na materiały o różnych osnowach polimerowych, semikrystalicznych i amorficznych, modulując ich właściwości powierzchniowe, mechaniczne, termiczne antyoksydacyjne i bioaktywne. Wspomniane właściwości mogą być modulowane poprzez użycie różnych stężeń związków polifenolowych oraz przez modyfikację matrycy PCL i PLGA za pomocą cząstek bioaktywnego szkła otrzymanego metodą zol-żel, zdolnych do wiązania związków polifenolowych. Najważniejsze wnioski wynikające z przeprowadzonych badań są następujące:

- Materiały polimerowe na bazie PLGA wykazują większą zdolność do wiązania związków polifenolowych niż materiały na bazie PCL. Jednak w kompozytach modyfikowanych cząstkami bioaktywnego szkła, otrzymanych metodą zol-żel, obserwowano odwrotną zależność – związki te wiązały się słabiej w materiałach o osnowie PLGA niż PCL;
- Związki polifenolowe wykazują działanie nukleacyjne, powodując zmniejszenie rozmiarów sferolitów i wzrost gęstość zarodkowania, wpływając na mikrostrukturę i topografię powierzchni oraz właściwości termiczne materiałów;

- Z jednej strony, związki polifenolowe mogą być rozpatrywane jako plastyfikatory dla polimerów PCL i PLGA, z drugiej strony mogą działać jako środki sprzęgające w materiałach kompozytowych, poprawiając ich właściwości mechaniczne;
- Dodatkowo związki polifenolowe wpływają na poprawę hydrofilowości powierzchni badanych materiałów polimerowych i kompozytowych;
- Wzbogacenie materiałów polimerowych i kompozytowych ekstraktem z szałwii lekarskiej przyczynia się do zwiększenia ich aktywności antyoksydacyjnej, przy czym efekt ten jest zależny od rodzaju matrycy polimerowej wpływającej na zdolność wiązania PPh, jak również modyfikacji cząstkami bioszkieł;
- Dodatek związków polifenolowych do materiałów kompozytowych korzystanie wpływa na właściwości bioaktywne modulując kinetykę tworzenia warstwy fosforanowo-wapniowej.

4.2. KOMPOZYTY MODYFIKOWANE BIOAKTYWNYMI SZKŁAMI O ZRÓŻNICOWANYM SKŁADZIE CHEMICZNYM I WŁAŚCIWOŚCIACH TEKSTURALNYCH

Zdolność biomateriałów kompozytowych do wiązania i kontrolowanego uwalniania substancji bioaktywnych, takich jak związki polifenolowe, może być istotnie modulowana poprzez odpowiedni dobór fazy modyfikującej. Literatura przedmiotu jednoznacznie wskazuje, że skład chemiczny, tekstura oraz porowatość szkła bioaktywnego mogą mieć istotny wpływ na kinetykę uwalniania substancji czynnych, umożliwiając dostosowanie ich działania do wymagań terapeutycznych [86], [87].

W niniejszym rozdziale przedstawiono analizę właściwości kompozytów na bazie poli(ϵ -kapolaktonu) modyfikowanych trzema rodzajami wysokowapniowego szkła bioaktywnego o identycznym składzie chemicznym ($A_2, 40SiO_2-54CaO-6P_2O_5$ mol%), lecz otrzymywanym różnymi metodami: poprzez topienie, metodą zol-żel oraz metodą zol-żel z wykorzystaniem procesu samoorganizacji indukowanej odparowaniem (EISA). Ponadto, zastosowano również szkła o wysokiej zawartości krzemionki, dotowane jonami terapeutycznymi miedzi i magnezu, otrzymane metodą zol-żel-EISA ($MSGG, 70SiO_2-(25-x-y)CaO-xCuO-yMgO-5P_2O_5$ mol%).

Zastosowane metody otrzymywania oraz modyfikacje składu chemicznego wpływały istotnie na właściwości teksturalne badanych materiałów, takie jak powierzchnia właściwa, porowatość oraz zawartość grup silanolowych (Si-OH), które mogą determinować zdolność cząstek szkła bioaktywnego do wiązania związków polifenolowych. Szkła otrzymane metodą zol-żel, zwłaszcza te o strukturze mezoporowate, wytworzone z zastosowaniem procedury EISA, charakteryzowały się znacznie większym rozwinięciem powierzchni i większą koncentracją grup Si-OH w porównaniu do szkła topionego oraz otrzymanego tradycyjną techniką zol-żel, co potwierdziła analiza BET, TEM oraz FTIR (Tab.6., Fig. 18.). Może się to przekładać na ich wyższe powinowactwo do związków polifenolowych, jednocześnie modyfikując inne właściwości kompozytu, takie jak zwilżalność, bioaktywność (oceniana poprzez zdolność do formowania warstwy apatytu w warunkach *in vitro*), właściwości mechaniczne oraz aktywność biologiczną [88], [89].

Tab. 6. Powierzchnia właściwa, objętość porów właściwa oraz średnia średnica porów bioaktywnych szkieł (zmierzone metodą BET).

Szkło bioaktywne	Powierzchnia właściwa SBET (m ² /g)	Objętość porów właściwa (cm ³ /g)	Średnia średnica porów (nm)
A2 top	0,26	-	-
A2 z-z	62,54	0,21	9,76
A2 mez	168,91	0,35	3,59
MSGG1	240,59	0,42	7,11
MSGG2	191,93	0,21	6,76
MSGG3	176,05	0,27	6,20

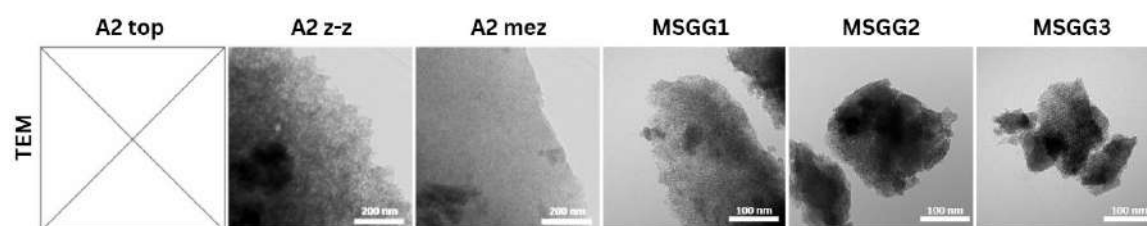


Fig. 18. Obrazy TEM bioaktywnych szkieł.

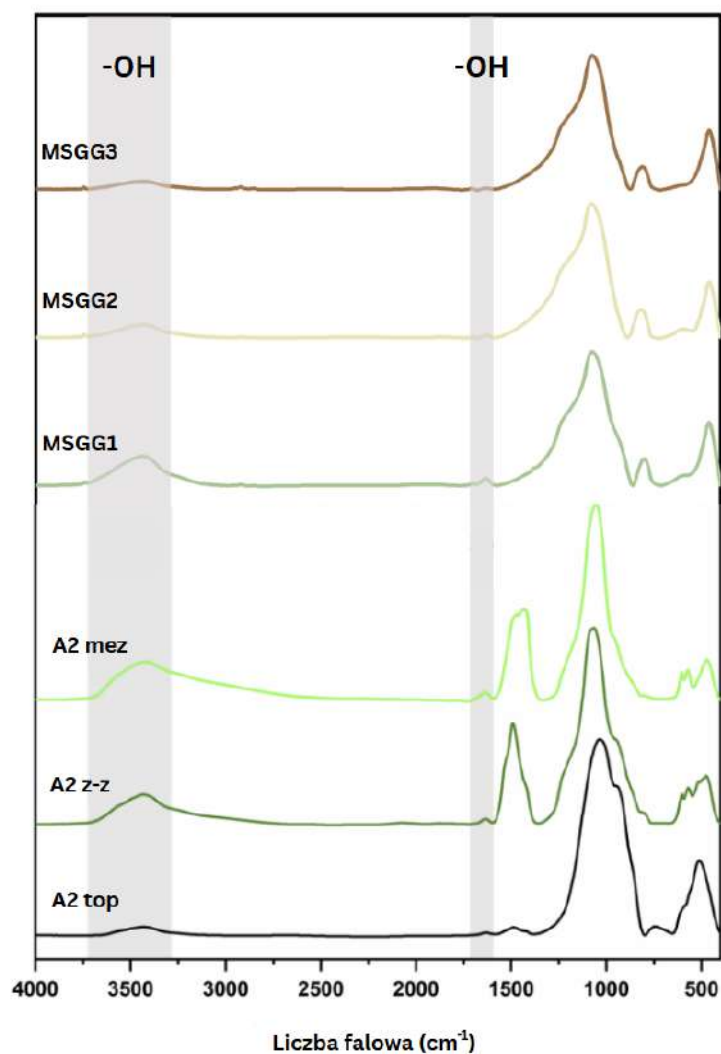


Fig. 19. Widma FTIR zastosowanych szkieł bioaktywnych (zarejestrowane w trybie transmisyjnym w pastylkach KBr).

W rozdziale przeprowadzono kompleksową analizę wpływu metod syntezy i składu chemicznego szkieł bioaktywnych, pełniących rolę fazy modyfikującej w kompozytach polimerowo-ceramicznych, na ich zdolność do wiązania związków polifenolowych, a w konsekwencji – na właściwości fizykochemiczne, mechaniczne i biologiczne otrzymanych kompozytów.

4.2.1. WŁAŚCIWOŚCI POWIERZCHNIOWE

MIKROSTRUKTURA

Analiza morfologii powierzchni AS i GS badanych materiałów została przeprowadzona za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) w połączeniu z analizą składu chemicznego powierzchni (EDX).

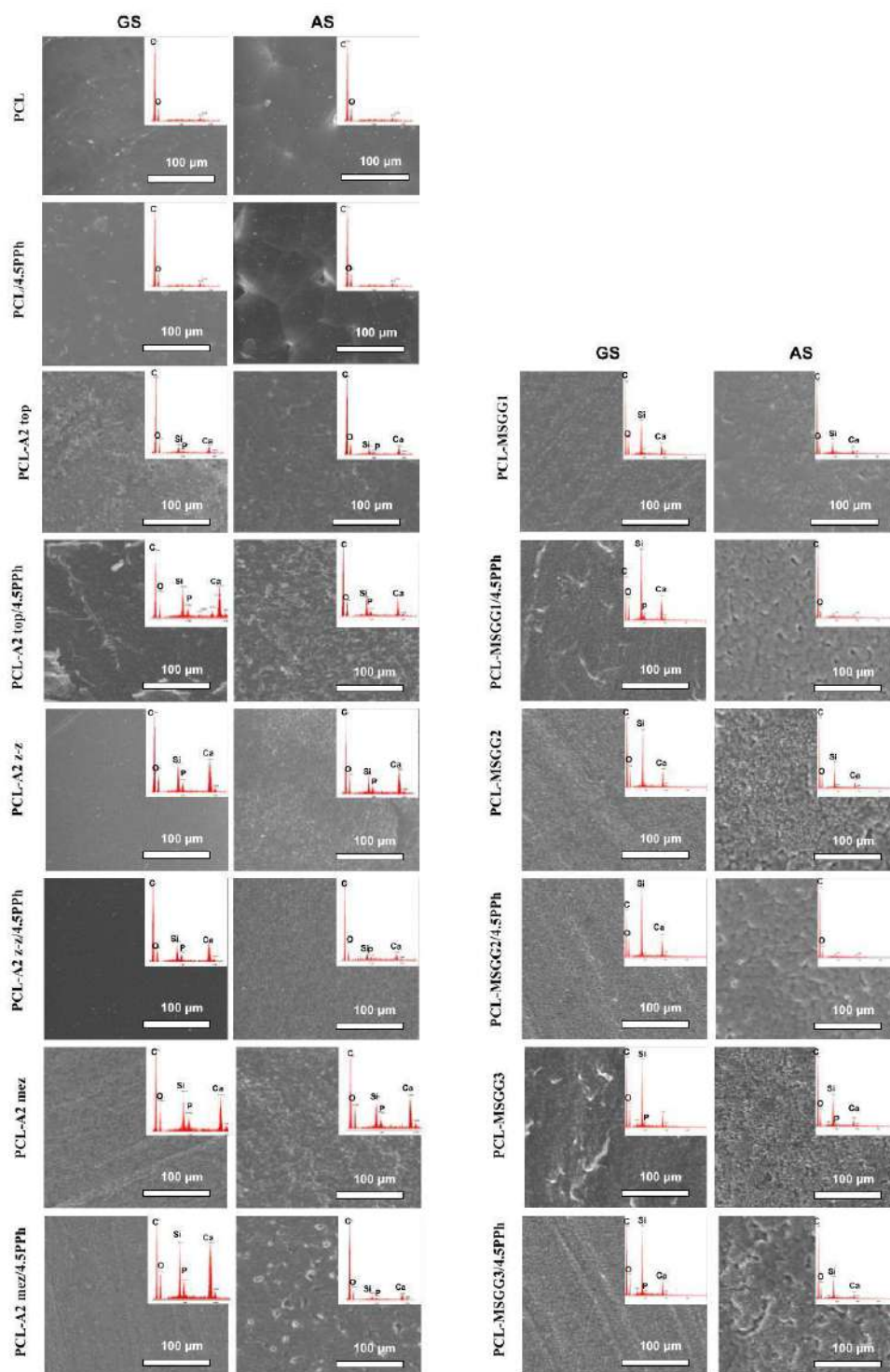


Fig. 20. Obrazy SEM z analizą EDX materiałów polimerowych i kompozytowych.

Na powierzchni AS folii polimerowej zaobserwowano obecność sferolitów – form charakterystycznych dla semikrystalicznego polimeru, jakim jest poli(ϵ -kaprolakton) (PCL). Wprowadzenie związków polifenolowych przyczyniło się do zmniejszenia rozmiaru sferolitów. Powierzchnia GS folii była gładka, natomiast wprowadzenie związków polifenolowych spowodowało pojawienie się porowatości. Szczegółowa charakterystyka tych folii, wraz z omówieniem potencjalnych mechanizmów zachodzących zmian, została przedstawiona w rozdziale 4.1.

Na wszystkich powierzchniach AS badanych materiałów kompozytowych można było zaobserwować liczne nitkowate formy, które nie tworzyły charakterystycznych sferolitów, podczas gdy powierzchnie GS pozostały gładkie. Potencjalne wytłumaczenie tego zjawiska, dokładnie opisane w rozdziale poprzednim, wskazuje na wpływ ograniczonej ruchomości łańcuchów PCL w roztworach przez wprowadzenie cząstek bioaktywnego szkła [60]. Mimo że związki polifenolowe wpływają na morfologię powierzchni materiałów polimerowych, w analizowanych kompozytach nie stwierdzono wyraźnych różnic morfologicznych w zależności od rodzaju zastosowanej fazy modyfikującej.

Analiza składu chemicznego materiałów bez dodatku związków polifenolowych wykazała wyższą zawartość krzemu, wapnia i fosforu na powierzchni GS w porównaniu z powierzchnią AS, w szczególności w przypadku materiałów modyfikowanych szklami MSGG, co może sugerować większe nagromadzenie cząstek szkła przy powierzchni GS. Ponadto wprowadzenie związków polifenolowych do kompozytów spowodowało zmiany składu chemicznego powierzchni AS i GS. Koncentracja krzemu, wapnia i fosforu na powierzchni AS uległa dalszej redukcji, natomiast na powierzchni GS wzrastała. **Może to świadczyć o wpływie polifenoli na dystrybucję cząstek bioaktywnego szkła w osnowie polimerowej.**

Zaobserwowane różnice w składzie chemicznym pomiędzy powierzchniami AS i GS mogą wynikać z przemieszczania się cząstek bioaktywnego szkła w objętości kompozytu, będącego konsekwencją zmian **właściwości reologicznych roztworu po wprowadzeniu plastyfikatora, takiego jak związki polifenolowe.** Cerruti et al. (2011) wykazali, że dodatek ekstraktu polifenolowego z wyciągów winogron do biopolimeru skrobiowego Mater-Bi powodował obniżenie lepkości roztworu [74]. Spadek lepkości może sprzyjać migracji fazy modyfikującej – w tym przypadku cząstek bioaktywnego szkła – w kierunku powierzchni GS pod wpływem sił grawitacyjnych.

CHROPOWATOŚĆ

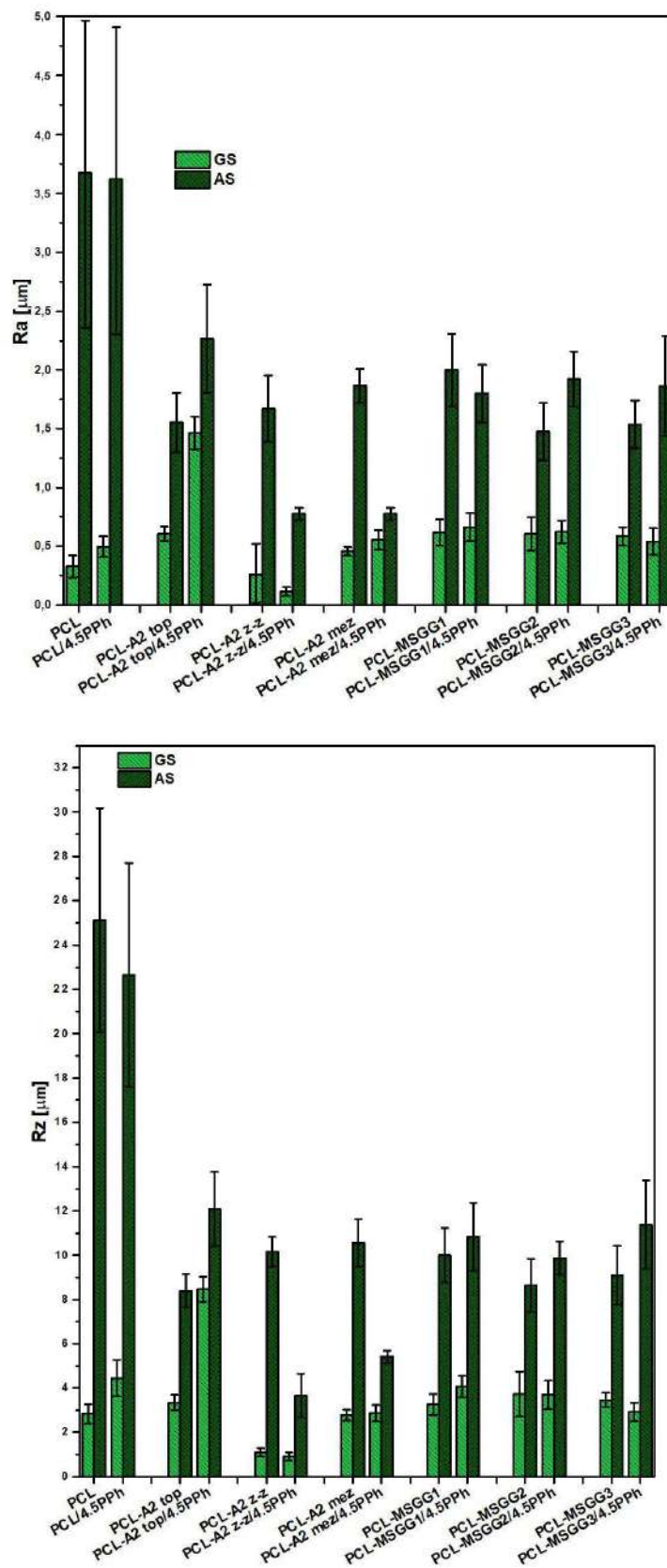


Fig. 21. Parametry Ra i Rz powierzchni AS i GS badanych materiałów polimerowych i kompozytowych.

Powierzchnie AS i GS materiałów polimerowych i kompozytowych poddano analizie chropowatości. Wyniki badań wykazały, że dla wszystkich analizowanych materiałów powierzchnia AS charakteryzowała się wyższymi wartościami parametrów Ra i Rz w porównaniu do powierzchni GS. **Zaobserwowana różnica może być związana z obecnością sferolitów/nitkowatych form na powierzchni AS** [62]. Wprowadzenie związków polifenolowych do badanych materiałów powodowało zmiany parametrów chropowatości.

W przypadku kompozytów modyfikowanych szkłem topionym (PCL-A2 top/4.5PPh) nastąpił wzrost wartości parametrów Ra i Rz. Materiał ten uzyskał najwyższe wartości parametrów Ra i Rz dla obu powierzchni po wzbogaceniu związkami polifenolowymi, spośród wszystkich badanych materiałów kompozytowych.

Kompozyty modyfikowane szkłem otrzymanym metodą zol-żel oraz zol-żel-EISA, po wprowadzeniu związków polifenolowych, wykazały wyraźny spadek parametrów Ra i Rz w szczególności dla powierzchni AS. W przypadku pozostałych kompozytów modyfikowanych szkłem mezoporowatym (MSGG1, MSGG2, MSGG3) zmiany były zdecydowanie mniej wyraźne w porównaniu do wyżej omawianych materiałów i nie wykazywały jednoznacznego trendu.

Zróżnicowane efekty obserwowane dla kompozytów modyfikowanych szkłem topionym oraz szkłem uzyskanym metodami zol-żel mogą wynikać z odmiennych właściwości teksturalnych i chemii powierzchni tych faz modyfikujących. **Metoda topienia prowadzi do otrzymania cząstek szkła o niskim rozwinięciu powierzchni, co może ograniczać ich zdolność wiązania związków polifenolowych (PPh) do powierzchni** [90], [91]. **Z kolei cząstki szkła bioaktywnego otrzymywane metodą zol-żel oraz zol-żel-EISA charakteryzują się porowatą strukturą i znacznie wyższą zawartością grup silanowych (Si-OH) na powierzchni** [90], [92], [93]. **Cząstki bioaktywnego szkła, różniące się zdolnością do wiązania PPh, modulują zawartość związków polifenolowych w osnowie polimerowej i na powierzchni kompozytów, co może wpływać na ich właściwości powierzchniowe, m.in. przez modyfikację procesu krystalizacji PCL, w tym również proces formowania sferolitów, który może wpływać na odnotowywane różnice w morfologii i chropowatości powierzchni materiałów.**

ZWILŻALNOŚĆ I ENERGIA POWIERZCHNIOWA

Kolejnymi analizowanymi parametrami powierzchni materiałów były: kąt zwilżania oraz całkowita energia powierzchniowa, wraz z jej składowymi: polarną i dyspersyjną, ocenione metodą „siedzącej kropli”.

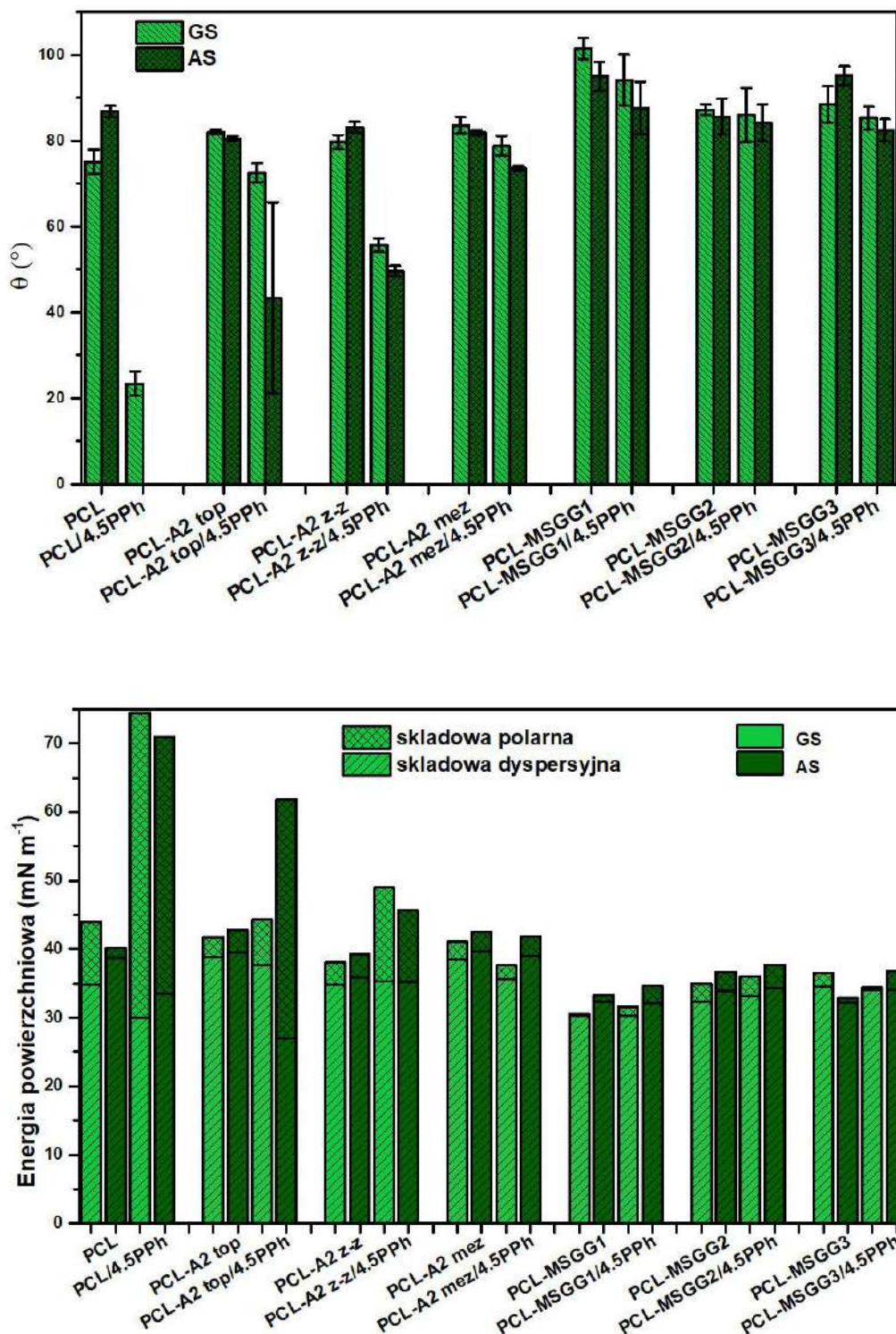


Fig. 22. Kąt zwilżania oraz całkowita energia powierzchniowa wraz z jej składową dyspersyjną (σ_D) i polarną (σ_P) dla powierzchni AS i GS folii polimerowych i kompozytowych.

Analiza kąta zwilżania oraz energii powierzchniowej folii polimerowych wykazała, że wprowadzenie związków polifenolowych prowadziło do znaczącego obniżenia kąta zwilżania powierzchni AS, osiągającego wartości bliskie 0°, co wskazuje na pełną zwilżalność powierzchni. Jednocześnie zaobserwowano wzrost całkowitej energii powierzchniowej,

głównie poprzez zwiększenie jej składowej polarnej (zjawisko to opisano w poprzednim rozdziale). Prawdopodobną przyczyną obniżenia kąta zwilżania i wzrostu składowej polarnej jest intensywna migracja cząsteczek związków polifenolowych, zawierających **liczne polarne grupy hydroksylowe** do powierzchni AS podczas odparowania rozpuszczalnika w trakcie otrzymywania folii.

Spośród wszystkich analizowanych materiałów kompozytowych największy spadek kąta zwilżania po wprowadzeniu związków polifenolowych zaobserwowano dla kompozytów modyfikowanych cząstkami szkła topionego (PCL-A2_{top}/4.5PPh). Nieco mniejszy efekt uzyskano w przypadku kompozytów z udziałem szkła bioaktywnego otrzymywanego metodą zol-żel (PCL-A2_{z-z}/4.5PPh), natomiast najmniejszy spadek kąta zwilżania stwierdzono dla materiałów zawierających szkła mezoporowate otrzymywane metodą zol-żel-EISA (PCL-A2_{mez}/4.5PPh) oraz wszystkich folii typu PCL-MSGG/4.5PPh. W przypadku tych ostatnich, najmniejsze zmiany zwilżalności powierzchni w stosunku do materiałów niemodyfikowanych polifenolami sugerują ograniczoną dostępność związków polifenolowych na powierzchni tych kompozytów.

Niezależnie od rodzaju zastosowanego szkła, dla wszystkich badanych materiałów wzbogaconych w związki polifenolowe, na powierzchni AS odnotowano niższe wartości kąta zwilżania i wyższe wartości energii powierzchniowej, w porównaniu z powierzchnią GS. Może to wynikać z nagromadzenia związków polifenolowych przy powierzchni AS.

Zróznicowanie wpływu poszczególnych rodzajów szkła na zwilżalność powierzchni materiałów można tłumaczyć ich różną zdolnością do wiązania związków polifenolowych. Szkła mezoporowate, dzięki bardzo wysokiej porowatości, dużej powierzchni właściwej oraz obecności licznych grup silanolowych [93], [97], wykazują wysoką zdolność do wiązania PPh. Ogranicza to ich zawartość w samej osnowie polimerowej oraz na powierzchni kompozytów, redukując wpływ na zmiany kąta zwilżania. Odmienną charakterystykę wykazują szkła topione, które ze względu na najmniejszą powierzchnię właściwą oraz ograniczoną liczbę grup funkcyjnych cechują się znacznie mniejszą zdolnością do wiązania związków polifenolowych. W rezultacie dochodzi do ich akumulacji w pobliżu powierzchni AS materiału [89], [93]. Co istotne, sam skład chemiczny szkieł otrzymanych metodą zol-żel-EISA nie miał istotnego wpływu na zmiany zwilżalności powierzchni po wprowadzeniu do kompozytów polifenoli. Wynika to ze znacznie wyższego rozwinięcia powierzchni tych szkieł (w stosunku do innych zastosowanych modyfikatorów).

4.2.2. WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNE

W celu oceny wpływu zastosowanej fazy modyfikującej materiałów oraz wzbogacenia związkami polifenolowymi na właściwości mechaniczne materiałów przeprowadzono testy statycznego rozciągania, na podstawie których wyznaczono moduł sprężystości podłużnej (E_t), wytrzymałość na rozciąganie (σ_M) oraz wydłużenie przy maksymalnej sile (ε_M).

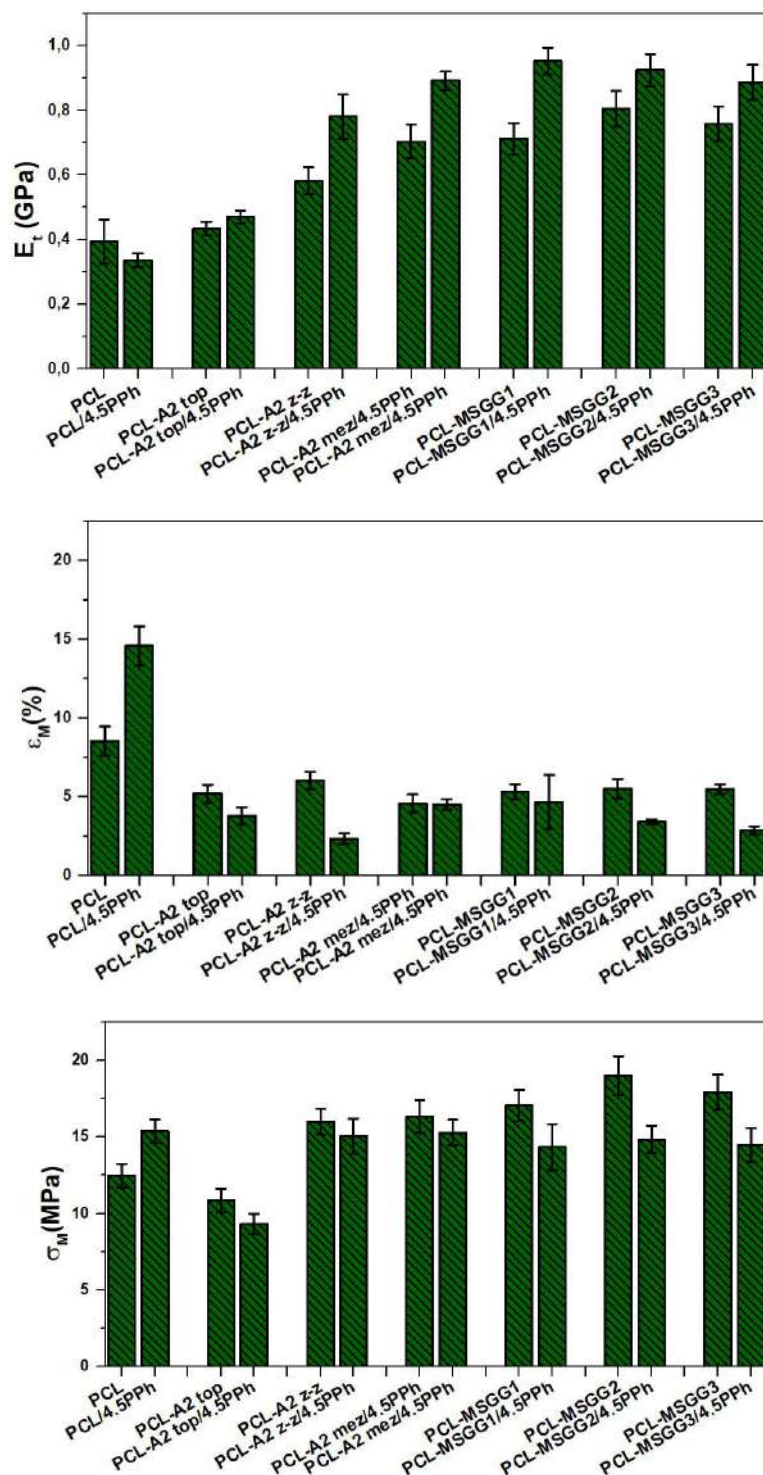


Fig. 23. Moduł Younga (E_t), wytrzymałość na rozciąganie (σ_M) i wydłużenie przy maksymalnej sile (ε_M) badanych materiałów na bazie PCL

Dodatek związków polifenolowych do folii polimerowych na bazie PCL spowodował spadek wartości modułu Younga (E_t) oraz jednocześnie wzrost wytrzymałości na rozciąganie (σ_M) i wydłużenia przy maksymalnej sile (ϵ_M). Efekty te są prawdopodobnie wynikiem działania PPh jako plastyfikatora, który modyfikuje oddziaływania pomiędzy łańcuchami PCL. Szczegółowy mechanizm działania polifenoli jako plastyfikatorów zostało omówione w poprzednim rozdziale.

W przypadku materiałów kompozytowych modyfikowanych cząstkami szkła, analiza właściwości mechanicznych wykazała ogólny wzrost modułu Younga i spadek wydłużenia przy maksymalnej sile w porównaniu do folii polimerowych. Ponadto, poza kompozytem modyfikowanym szkłem topionym (PCL-A2 top), zaobserwowano istotny wzrost wytrzymałości na rozciąganie. Dodatek polifenoli do kompozytów skutkowało dalszym zwiększeniem wartości E_t we wszystkich przypadkach, niezależnie od obecnej fazy modyfikującej. Zjawisko to można tłumaczyć działaniem polifenoli jako środka sprzęgającego, który wpływa na oddziaływanie na granicy faz pomiędzy fazą nieorganiczną a osnową polimerową.

W szczególności obecność grup hydroksylowych w strukturze związków polifenolowych sprzyjała tworzeniu wiązań wodorowych zarówno z grupami silanolowymi na powierzchni bioaktywnego szkła, jak i z grupami karbonyłowymi PCL. Interakcje te mogą poprawiać przenoszenie naprężeń na granicy faz, prowadząc do wzmocnienia mechanicznego kompozytów [94].

Wśród analizowanych kompozytów – zarówno bez, jak i z dodatkiem polifenoli – najwyższe wartości E_t zaobserwowano w foliach kompozytowych modyfikowanych bioaktywnym szkłem otrzymanych metodą zol-żel i zol-żel-EISA, co można przypisać wysokiej powierzchni właściwej i reaktywności powierzchniowej, wynikającej z obecności grup hydroksylowych tych szkieł. Z jednej strony, dzięki wysokiej porowatości i rozwinięciu powierzchni, może dochodzić do fiksacji mechanicznej cząstek szkieł z osnową polimerową. Z drugiej zaś, szczególnie w przypadku materiałów zawierających polifenole, istotną rolę w polepszeniu właściwości mechanicznych mogą odgrywać dodatkowe międzycząsteczkowe oddziaływania na granicy dwóch faz [95].

Przeprowadzone analizy wykazały, że metoda syntezy bioaktywnego szkła ma istotny wpływ na właściwości mechaniczne otrzymanych kompozytów. Zastosowanie szkieł o wyższej porowatości oraz większej zawartości grup silanolowych sprzyjało tworzeniu silniejszych

oddziaływać ze związkami polifenolowymi, co skutkowało korzystną modyfikacją właściwości mechanicznych materiałów.

4.2.3. WŁAŚCIWOŚCI TERMICZNE

W niniejszym podrozdziale przedstawiono analizę wpływu zastosowanego szkła bioaktywnego oraz obecności związków polifenolowych na temperaturę topnienia i stopień krystaliczności osnowy polimerowej w postaci poli(ϵ -kaprolaktonu). Ocena została przeprowadzona metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC).

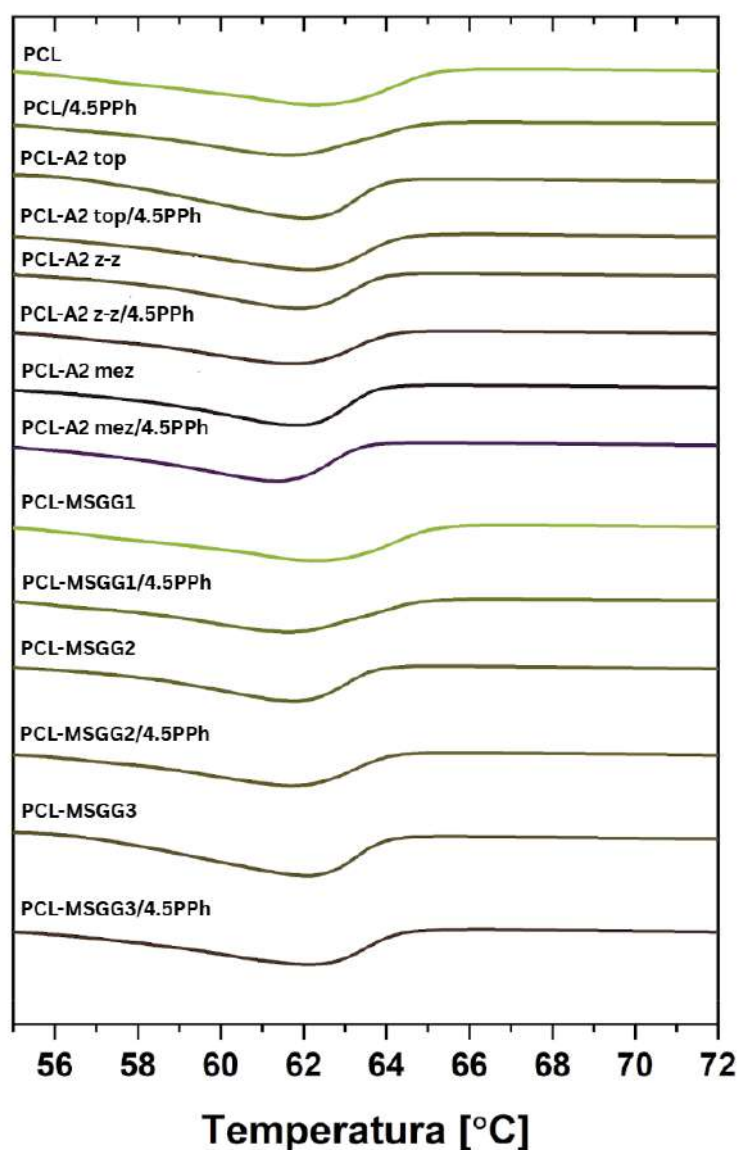


Fig. 23. Termogramy DSC dla materiałów polimerowych i kompozytowych.

Wyniki analizy różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) potwierdziły, że modyfikacja osnowy polimerowej (PCL) zarówno za pomocą bioaktywnego szkła, jak i po wzbogaceniu związkami polifenolowymi (PPh), prowadzi do zmian temperatury topnienia (T_m) oraz stopnia krystaliczności (X_c).

Tab. 7. Temperatura topnienia i stopień krystaliczności badanych materiałów polimerowych i kompozytowych.

Nazwa materiału	DSC	
	T_m [°C]	X_c [%]
PCL	65,2	29,3
PCL/4.5 PPh	64,4	41,2
PCL-A2 top	65,1	45,1
PCL-A2 top/4.5 PPh	64,9	44,8
PCL-A2 z-z	65,0	45,0
PCL-A2z-z/4.5 PPh	64,8	42,8
PCL-A2 mez	62,7	44,9
PCL-A2 mez/4.5PPh	62,3	43,1
PCL-MSGG1	62,2	38,3
PCL-MSGG1/4.5PPh	61,5	36,1
PCL-MSGG2	61,7	34,9
PCL-MSGG2/4.5PPh	61,7	33,5
PCL-MSGG3	61,7	34,9
PCL-MSGG3/4.5PPh	61,7	32,5

Wprowadzenie polifenoli do materiału polimerowego PCL skutkowało niewielkim obniżeniem temperatury topnienia, co można przypisać działaniu polifenoli jako plastyfikatorów, osłabiających oddziaływania międzyłańcuchowe i zwiększających mobilność łańcuchów PCL. Podobny efekt zaobserwowano w przypadku materiałów

kompozytowych. Bioszko otrzymane metodą topienia (A2 top), zastosowane jako faza modyfikująca, spowodowało nieznaczne obniżenie T_m , natomiast szkła mezoporowate, otrzymane metodą zol-żel-EISA, prowadziły do wyraźniejszego spadku temperatury topnienia. Co istotne, dalsze wzbogacenie kompozytów w związki polifenolowe nie powodowało znaczących zmian T_m , co sugeruje, że kluczową rolę w kształtowaniu właściwości termicznych kompozytów odgrywa zastosowana faza nieorganiczna.

W odróżnieniu od temperatury topnienia, stopień krystaliczności (X_c) wykazał bardziej złożone zależności. Wprowadzenie związków polifenolowych do materiału polimerowego skutkowało istotnym wzrostem stopnia krystaliczności. Efekt ten można przypisać zwiększonej mobilności łańcuchów PCL, sprzyjającej ich uporządkowanej reorganizacji i powstawaniu obszarów krystalicznych – jak wykazano w poprzednim rozdziale. Podobnie, zastosowanie fazy modyfikującej w postaci szkła bioaktywnego otrzymanego metodą zol-żel, prowadziło do wzrostu krystaliczności, co sugeruje, że cząstki te mogą pełnić funkcję nukleatorów krystalizacji polimeru. Jednakże w przypadku kompozytów zawierających zarówno cząstki bioaktywnych szkieł i związki polifenolowe, zaobserwowano odmienny efekt – stopień krystaliczności uległ obniżeniu, w porównaniu do materiału zawierającego wyłącznie ceramiczną fazę modyfikującą. Wyniki te mogą potwierdzać obecność wspomnianych wcześniej oddziaływań związków polifenolowych z osnową polimerową, jak i z napełniaczem organicznym.

4.2.4. WŁAŚCIWOŚCI ANTYOKSYDACYJNE

Ocena właściwości antyoksydacyjnych badanych folii polimerowych oraz kompozytowych na bazie poli(ϵ -kaprolaktonu) (PCL), niewzbogaconych oraz wzbogaconych w związki polifenolowe (PPh), została przeprowadzona z wykorzystaniem testów ABTS \cdot^+ , DPPH \cdot oraz FRAP.

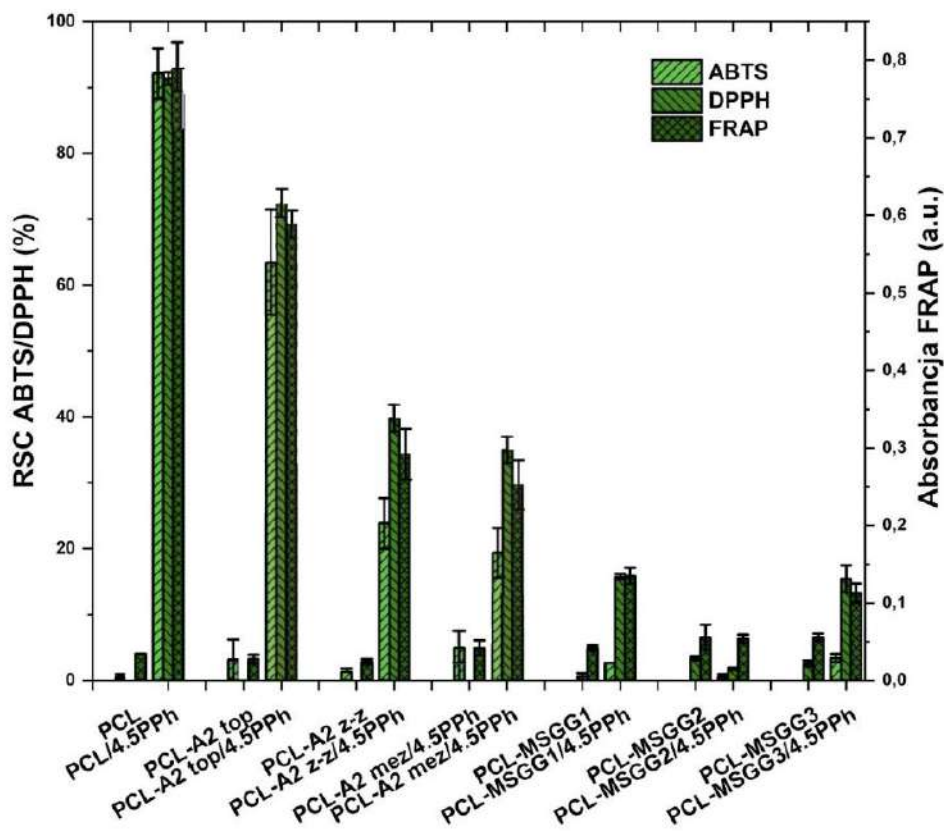


Fig. 24. Zdolność zmiatania rodników (RSC) ABTS •+ i DPPH • oraz zdolność redukowania jonów żelaza (III) (FRAP) przez badane materiały.

Wyniki wykazały, że najwyższą aktywność antyoksydacyjną (wyrażoną jako zdolność zmiatania wolnych rodników i potencjał redukujący jony żelaza) odnotowano dla folii PCL/4.5PPh. Tak wysoki poziom aktywności można przypisać obecności związków polifenolowych, zarówno tych związanych na powierzchni materiału, a także ulegających szybkiemu uwolnieniu do roztworu [77], [78]. Właściwości antyoksydacyjne folii PCL wzbogaconych związkami polifenolowymi zostały szczegółowo omówione w rozdziale 4.1.

Wprowadzenie cząstek bioaktywnego szkła do folii wzbogaconych w polifenole skutkowało obniżeniem aktywności antyoksydacyjnej. Obserwowana zmniejszona aktywność antyoksydacyjna wszystkich badanych folii kompozytowych w porównaniu z foliami polimerowymi może wynikać ze zdolności wiązania związków polifenolowych przez fazę modyfikującą. Ogranicza to ich dostępność na powierzchni, a w konsekwencji mniejsza liczba związków polifenolowych uczestniczy w procesach neutralizacji wolnych rodników oraz redukcji jonów żelaza [78].

Najwyższą aktywność antyoksydacyjną spośród wszystkich kompozytów wykazał materiał PCL-A2top/4.5PPh, czyli kompozyt zawierający szkło otrzymane metodą topienia. Tłumaczyć

to można ograniczoną zdolnością szkła topionego do wiązania polifenoli, co skutkuje większą ilością związków polifenolowych dostępnych na powierzchni kompozytu. Zjawisko to potwierdzają również wcześniejsze obserwacje dotyczące zwilżalności i energii powierzchniowej – materiały z A2top/4.5PPh wykazywały najwyższą hydrofilowość powierzchni AS spośród kompozytów, co sugeruje większe nagromadzenie polifenoli przy tej powierzchni.

Zauważalne jest obniżenie właściwości antyoksydacyjnych materiału kompozytowego modyfikowanego cząstkami szkła wzbogacone jonami miedzi (PCL-MSGG2/4.5PPh) w porównaniu z kompozytami PCL-MSGG1/4.5PPh i PCL-MSGG3/4.5PPh. Potencjalną przyczyną tego zjawiska może być zdolność uwalniania jonów miedzi. Związki polifenolowe obecne na powierzchni materiałów lub uwalniane do roztworu mogą brać udział w redukcji jonów metalu przejściowego jakim jest miedź, a tym samym nie uczestniczą w neutralizacji wolnych rodników ani w redukcji jonów żelaza [96], [97]. Wzrost zdolności zmiatania wolnych rodników oraz redukcji jonów żelaza w przypadku kompozytów PCL-MSGG3, które są dotowane dodatkowo jonami magnezu, może wynikać ze zmodyfikowanej (zredukowanej) rozpuszczalności szkła, w tym jonów miedzi, jednak wymaga to dalszych badań.

4.2.5. WŁAŚCIWOŚCI BIOAKTYWNE

Otrzymane materiały polimerowe i kompozytowe poddano inkubacji w płynie SBF przez 3, 7 i 14 dni, co umożliwiło ocenę ich bioaktywności poprzez obserwację zmian morfologii oraz składu chemicznego powierzchni z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) wraz z analizą fluorescencji rentgenowskiej z dyspersją energii (EDX).

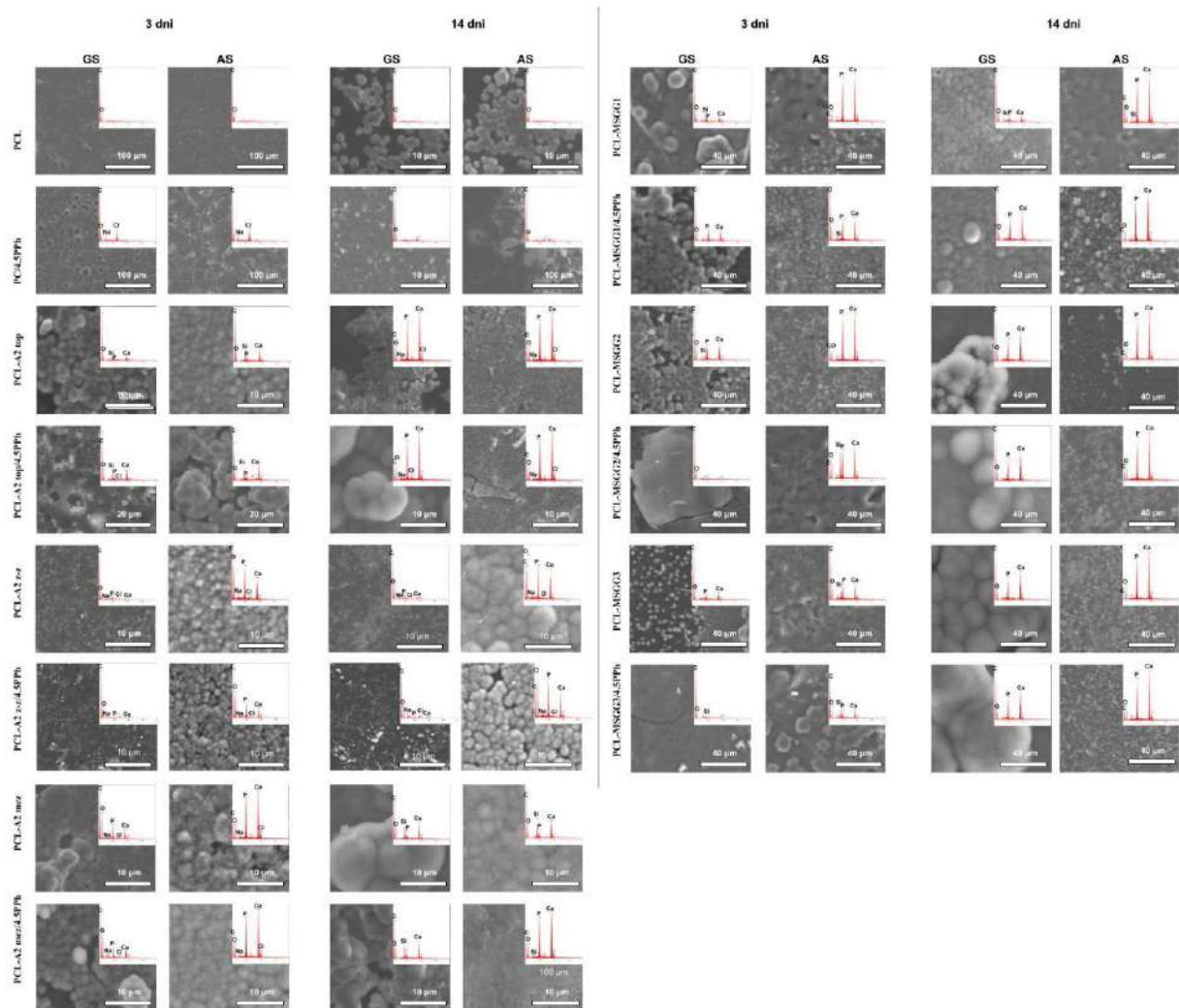


Fig. 25. Obrazy SEM z analizą EDX materiałów polimerowych i kompozytowych po inkubacji w SBF.

Po trzech dniach inkubacji powierzchnie folii polimerowych były gładkie i jednolite, a analiza składu pierwiastkowego wykazała obecność chlorku sodu. W przypadku wszystkich badanych kompozytów, zarówno na powierzchniach AS, jak i GS, zaobserwowano powstanie warstwy fosforanowo-wapniowej w trakcie inkubacji, co potwierdzono analizą składu chemicznego powierzchni (wysoka zawartość Ca i P).

W kompozytach modyfikowanych cząstkami bioaktywnego szkła topionego wprowadzenie związków polifenolowych wpłynęło na powstanie grubszej warstwy, która równomiernie pokrywała powierzchnie AS i GS. Na powierzchni GS warstwa ta przyjmowała dodatkowo charakterystyczne, kalafiorowate formy.

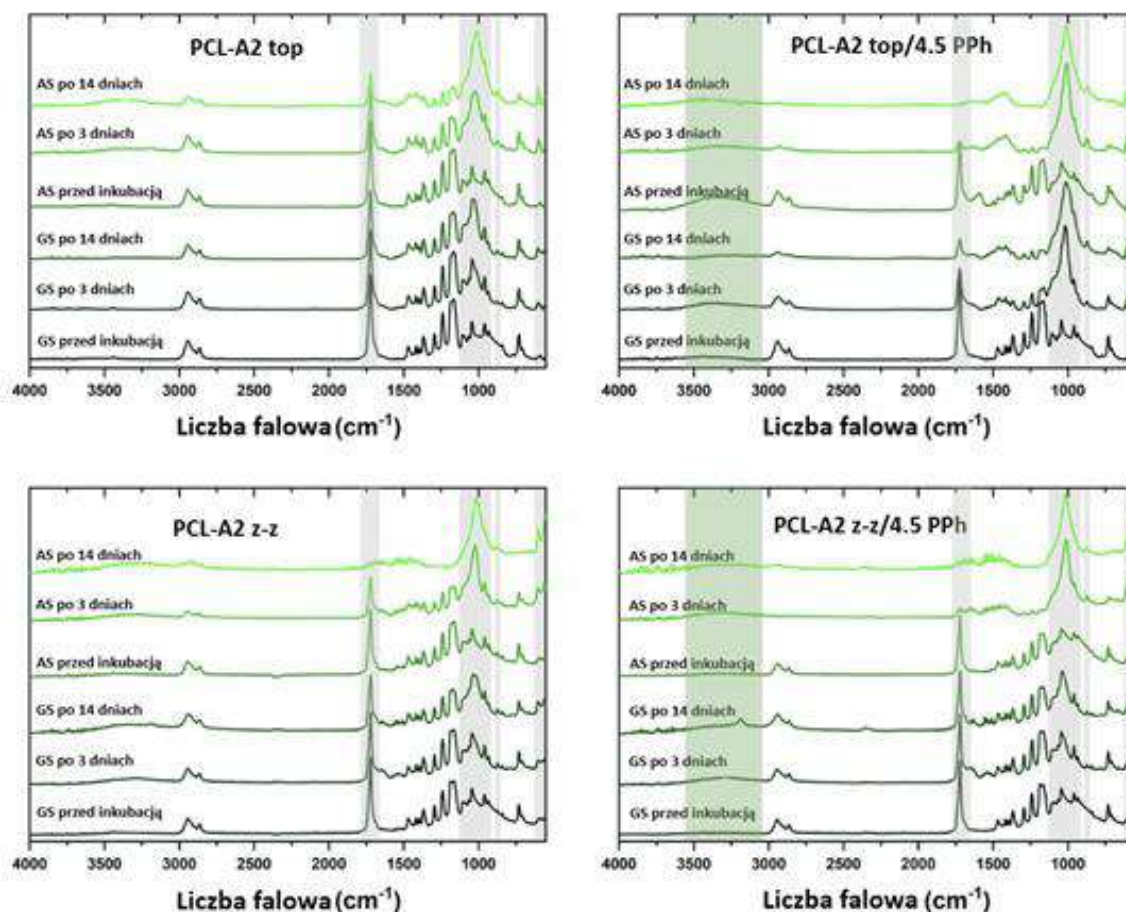
W kompozytach modyfikowanych szkłem otrzymanym metodą zol-żel również zaobserwowano kalafiorowate formy, jednak po dodaniu związków polifenolowych stawały

się one drobniejsze i bardziej upakowane, co może świadczyć o zwiększonej gęstości nukleacji warstwy fosforanowo-wapniowej. Szczegółowy opis obserwacji morfologii tej warstwy został przedstawiony w poprzednim rozdziale.

Wszystkie kompozyty zawierające bioaktywne szkło mezoporowate pokryte były warstwą o kalafiorowatej morfologii, przy czym dodatek związków polifenolowych przyczyniał się do zwiększenia jej grubości i zagęszczenia na powierzchni materiału. Wskazuje to na możliwe efektywne współdziałanie reaktywnych cząstek szkła bioaktywnego i powierzchniowo dostępnych grup hydroksylowych związków polifenolowych w promowaniu tworzenia się apatytu [98], [99].

FTIR-ATR

W celu oceny zmian chemicznych zachodzących na powierzchni materiałów polimerowych i kompozytowych w wyniku inkubacji w płynie SBF przeprowadzono analizę widm w podczerwieni (ATR-FTIR). Widma zarejestrowano przed inkubacją oraz po 3 i 14 dniach inkubacji w SBF, zarówno dla powierzchni AS jak i GS badanych próbek.



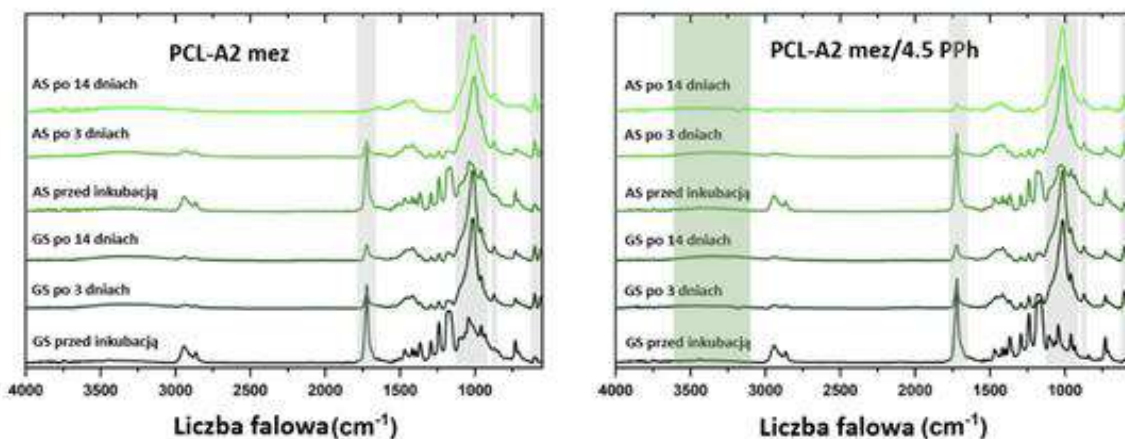


Fig. 26. Widma ATR-FTIR powierzchni AS i GS folii kompozytowych przed i po 3- i 14-dniowej inkubacji w SBF.

Dla materiałów polimerowych PCL, na widmach FTIR nie zaobserwowano istotnych zmian, wskazujących na formowanie się warstwy CaP. Ponadto, charakterystyczne pasma w okolicach 1720 cm^{-1} (drżania rozciągające wiązań w grupach C=O) oraz 1170 cm^{-1} (drżania rozciągające wiązań w grupach C-O-C) pozostają niezmiennie przez cały okres inkubacji, co sugeruje brak znaczących zmian w strukturze samego polimeru. Wprowadzenie związków polifenolowych zarówno do materiałów polimerowych, jak i kompozytowych doprowadziło do pojawienia się pasma w zakresie $3200\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$, przypisywanego drżaniom rozciągającym grup hydroksylowych (-OH) charakterystycznych dla fenoli [100], [101]. W przypadku folii polimerowych oraz kompozytów modyfikowanych szkłem topionym pasmo to wykazało wysoką intensywność, szczególnie dla powierzchni AS, natomiast w kompozytach zawierających szkło otrzymane metodą zol-żel i zol-żel-EISA, jego intensywność była bardzo niska. **Może to świadczyć o silniejszym wiązaniu związków polifenolowych przez szkła pochodzące z syntezy niskotemperaturowej zol-żel.**

Analiza widm FTIR-ATR dla kompozytów inkubowanych w SBF przez 3 i 14 dni wskazuje na formowanie się na powierzchni materiałów warstwy bioaktywnej.

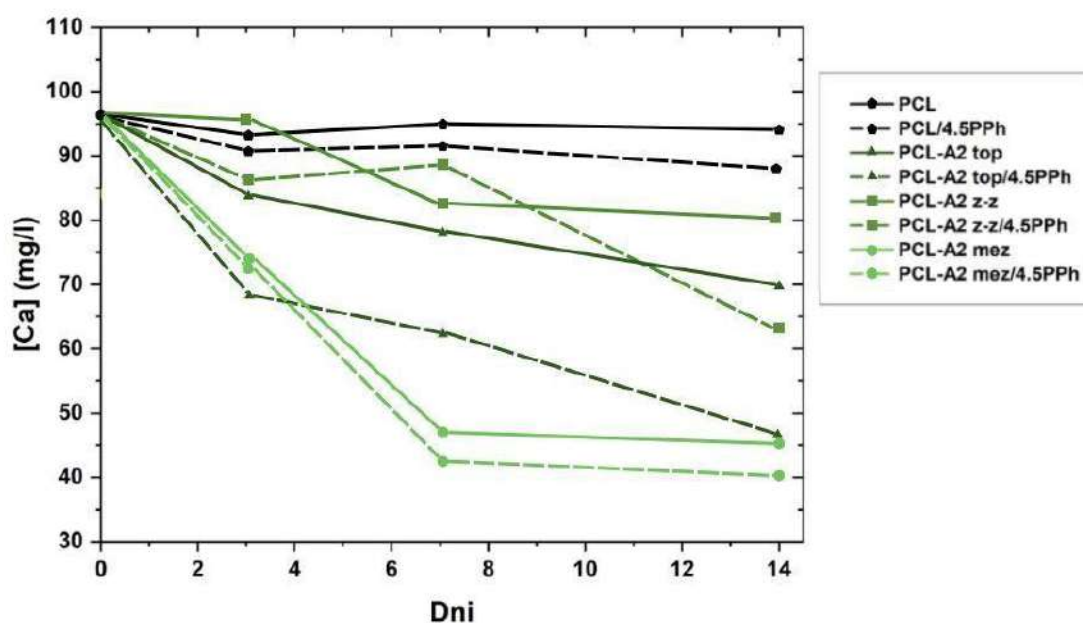
We wszystkich kompozytach już po 3 dniach inkubacji pojawiły się nowe pasma w zakresie $560\text{--}602\text{ cm}^{-1}$ oraz $910\text{--}1180\text{ cm}^{-1}$, które można przypisać odpowiednio drżaniom zginającym i rozciągającym wiązań charakterystycznych dla nanokrystalicznego, niestechiometrycznego apatytu [84], [102]. Dodatkowo, obecność pasma przy liczbie falowej 875 cm^{-1} (oznaczone kolorem szarym na widmach) przypisano rozciąganiu wiązania P-O w HPO_4^{2-} i/lub deformacjom poza płaszczyznę w CO_3^{2-} [102]. **Intensywność pasm przypisywanych warstwie fosforanowo-wapniowej stopniowo wzrastała, czemu towarzyszył spadek intensywności, a w niektórych przypadkach nawet zanik pasm charakterystycznych**

dla PCL (przede wszystkim 1170 cm^{-1} i 1720 cm^{-1}), co świadczy o narastaniu grubości nowo powstającej warstwy wraz z czasem inkubacji. Obecność związków polifenolowych spowodowała wyraźnie szybszą zmianę intensywności wspomnianych pasm (wzrost intensywności pasm charakterystycznych dla apatyty i spadek intensywności pasm pochodzących od PCL) dla kompozytów PCL-A2 top/4.5PPh i PCL-A2 z-z/4.5PPh.

W przypadku materiałów modyfikowanych cząstkami bioaktywnego szkła na powierzchniach AS odnotowano wyraźnie szybszy wzrost intensywności pasm przypisywanych obecności warstwy apatyty w porównaniu do GS, co koreluje z obserwacjami SEM. Podobnie przyspieszone zmiany stwierdzono w materiałach PCL-A2 top/4.5PPh, PCL-A2 mez i PCL-A2 mez/4.5PPh, co wskazuje na bardziej efektywne tworzenie warstwy apatyty dla tych materiałów [102].

ICP-OES

Aby określić zdolność badanych materiałów do tworzenia warstwy fosforanowo-wapniowej, przeprowadzono oznaczenie stężenia jonów wapniowych, fosforanowych i krzemowych w płynie SBF z wykorzystaniem spektrometrii emisyjnej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP-OES). Pomiar wykonano po 3, 7 i 14 dniach inkubacji, co pozwoliło na śledzenie zmian stężenia poszczególnych jonów w czasie.



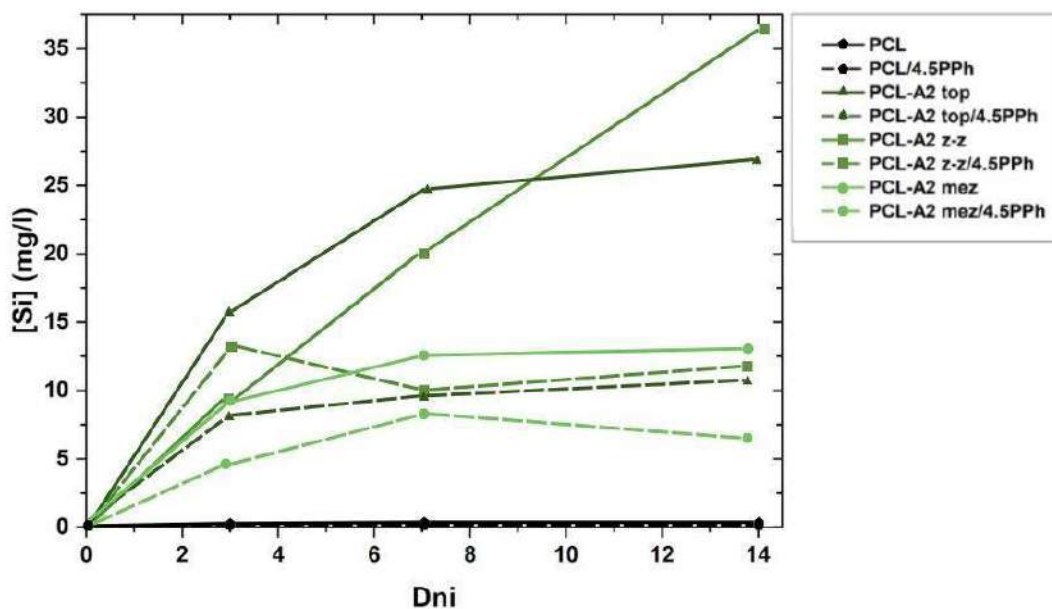
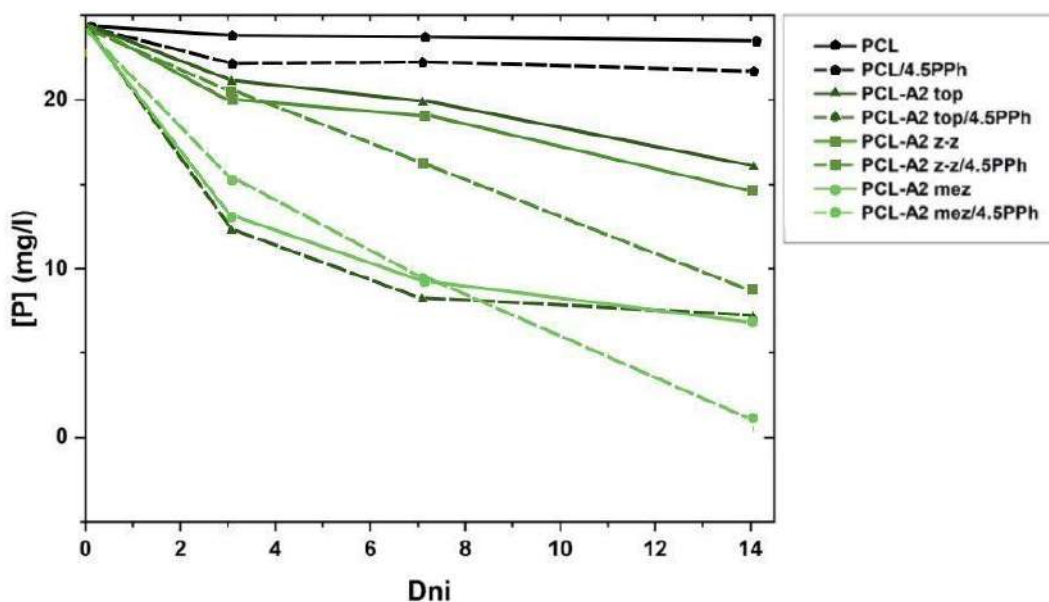


Fig. 27. Zmiany stężeń jonów wapniowych, fosforanowych i krzemowych w SBF podczas inkubacji folii.

Wyniki analizy ICP-OES przedstawiają zmiany stężeń jonów Ca^{2+} , PO_4^{3-} i Si^{4+} w roztworze SBF podczas inkubacji badanych materiałów. W przypadku folii PCL nie odnotowano istotnych zmian zawartości poszczególnych jonów. Dodatek polifenoli do folii PCL (PCL/4.5PPh) skutkowało niewielkim spadkiem stężeń jonów Ca^{2+} i PO_4^{3-} . Z kolei materiały kompozytowe wykazywały stopniowe obniżanie się poziomu tych jonów, przy czym tempo

zmian różniło się w zależności od rodzaju zastosowanego szkła bioaktywnego oraz obecności PPh.

Najbardziej dynamiczny spadek zawartości jonów wapniowych i fosforanowych zaobserwowano dla kompozytu PCL-A2 mez, w porównaniu do PCL-A2 top i PCL-A2 z-z, które wykazywały zbliżony przebieg zmian. Obecność polifenoli w materiale przyspieszała spadek jonów Ca^{2+} i PO_4^{3-} w płynach inkubacyjnych wszystkich kompozytów. Materiał PCL-A2top/4.5PPh charakteryzował się wyraźnie większym spadkiem stężeń analizowanych jonów niż materiały modyfikowane szkłem zol-żel, mimo że bez dodatku PPh zmiany stężeń badanych jonów w płynach obu materiałów były zbliżone co do wartości i trendu.

Zmiany stężeń jonów krzemowych były zgodne z obserwacjami dotyczącymi jonów wapniowych i fosforanowych – niższe uwalnianie jonów Si^{4+} było charakterystyczne dla materiałów, w których obserwowano szybszy spadek stężeń jonów Ca^{2+} i PO_4^{3-} . Sugeruje to skuteczniejsze i szybsze formowanie warstwy apatytowej, które ograniczało rozpuszczalność szkła bioaktywnego. Po 7 dniach inkubacji zaobserwowano wyraźne zmniejszenie tempa uwalniania Si^{4+} ze wszystkich badanych materiałów wzbogaconych w związki polifenolowe.

Wyniki obrazowania SEM, analizy EDX, FTIR i ICP-OES wskazują, że obecność polifenoli może wspomagać i przyspieszać formowanie się warstwy apatytu na powierzchni materiałów kompozytowych. Spostrzeżenia te są zgodne z wcześniejszymi moimi badaniami, w których udokumentowano korzystny wpływ związków polifenolowych na bioaktywność materiałów kompozytowych PCL/cząstki bioszkl. Również inne publikacje literaturowe wskazują, że cząstki bioszkieł modyfikowane ekstraktami roślinnymi bogatymi w związki polifenolowe (m.in. z liści zielonej herbaty, skórki czerwonych winogron czy pąków dzikiej róży) wykazują lepsze właściwości bioaktywne [103], [104].

Efekt można tłumaczyć obecnością licznych grup hydroksylowych na powierzchni kompozytów wzbogaconych w związki polifenolowe. Grupy te mogą tworzyć kompleksy z jonami wapniowymi i stanowić zarodki krystalizacji apatytu [105], [106]. Dodatkowo, poprawiona zwilżalność oraz zwiększona energia powierzchniowa – zwłaszcza jej składowa polarna – w materiałach zawierających związki polifenolowe, mogą wspierać procesy nukleacji [107].

PODSUMOWANIE

W niniejszym rozdziale cząstki bioaktywnego szkła, otrzymane z wykorzystaniem różnych metod syntezy – w tym również szkła mezoporowate zawierające jony o potencjale terapeutycznym (CuO lub MgO; MSGG) – zostały zastosowane jako faza modyfikująca w kompozytach na bazie poli(ϵ -kaprolaktonu) (PCL), wzbogaconych w związki polifenolowe wyekstrahowane z szafwii lekarskiej. Związki te wykazały korzystny wpływ na właściwości fizykochemiczne materiałów kompozytowych – przyczyniały się do poprawy hydrofilowości, zdolności formowania warstwy apatytu oraz właściwości mechanicznych. Jednocześnie zapewniały one materiałom aktywność antyoksydacyjną.

Zróznicowane właściwości teksturalne (powierzchnia właściwa, porowatość) oraz chemia powierzchni (zawartość grup silanolowych) cząstek BG, wynikające z zastosowanych technik syntezy (topienie, zol-żel, zol-żel-EISA), istotnie wpływały na ich zdolność do wiązania związków polifenolowych. Cząstki o wyższej powierzchni właściwej i porowatości, a także o zwiększonej zawartości grup silanolowych (Si-OH), wykazywały większe powinowactwo do polifenoli, co bezpośrednio przekładało się na zmienność stopnia ich wiązania i dostępności w osnowie kompozytu i na jego powierzchni.

W konsekwencji, zastosowany typ szkła bioaktywnego determinował poziom hydrofilowości, intensywność odpowiedzi antyoksydacyjnej oraz efektywność tworzenia warstwy fosforanowo-wapniowej w warunkach *in vitro*. Kompozyty zawierające szkła mezoporowate otrzymane metodą zol-żel-EISA, ze względu na swoją wysoką reaktywność i rozwiniętą powierzchnię, okazały się najbardziej efektywne w wiązaniu polifenoli oraz promowaniu bioaktywności.

W przypadku materiałów modyfikowanych szkłem mezoporowatym (MSGG1, MSGG2, MSGG3) różnice w składzie chemicznym w porównaniu z pozostałymi badanymi napełniaczami nie wpływały istotnie na właściwości powierzchniowe, termiczne, mechaniczne ani bioaktywne kompozytów. Różnice zaobserwowano natomiast w zakresie właściwości antyoksydacyjnych. Kompozyty zawierające tlenki miedzi charakteryzowały się obniżoną aktywnością antyoksydacyjną – co może być skutkiem redoksowej interakcji miedzi z grupami fenolowymi – natomiast obecność tlenków magnezu sprzyjała zachowaniu właściwości antyoksydacyjnych. Równocześnie wszystkie napełniacze MSGG wykazywały intensywną zdolność do formowania warstwy apatytowej, szczególnie w obecności polifenoli.

Przeprowadzone badania potwierdzają, że właściwości kompozytów z udziałem związków polifenolowych mogą być kontrolowane poprzez odpowiedni dobór fazy modyfikującej w postaci cząstek szkła bioaktywnego o zmiennej charakterystyce teksturalnej i chemii powierzchni.

4.3. KOMPOZYTY MODYFIKOWANE NANORURKAMI WĘGLOWYMI

Nanomateriały węglowe, w tym nanorurki węglowe (CNTs, ang. carbon nanotubes), są coraz częściej rozważane jako potencjalne składniki nowoczesnych biomateriałów. Literatura wskazuje, że CNTs mogą pełnić funkcję nośników szerokiego zakresu substancji czynnych, w tym leków przeciwdrobnoustrojowych, przeciwnowotworowych oraz immunomodulujących, a także wykazywać zdolność modulowania aktywności biologicznej komórek [108], [109].

Właściwości nanorurek węglowych w dużej mierze zależą od ich chemii powierzchni, która warunkuje zarówno ich stabilność dyspersji, jak i zdolność do wiązania związków bioaktywnych. Zastosowanie odpowiednich modyfikacji chemicznych pozwala na wprowadzenie funkcjonalnych grup polarnych, takich jak grupy karboksylowe ($-\text{COOH}$), hydroksylowe ($-\text{OH}$), karbonylowe ($\text{C}=\text{O}$) oraz amidowe ($-\text{CONH}_2$), które mogą uczestniczyć w tworzeniu wiązań wodorowych, oddziaływań elektrostatycznych oraz interakcji typu $\pi-\pi$ z wybranymi cząsteczkami [110]. Wysoki stopień utlenienia CNTs zwiększa udział grup $\text{C}=\text{O}$ i COOH , poprawiając ich zdolność do adsorpcji i stabilizacji związków aktywnych w środowiskach wodnych [111].

Nanorurki o mniejszej długości i wysokim stopniu funkcjonalizacji wykazują lepszą zdolność do dyspersji i większą powierzchnię aktywną dostępną do wiązania cząsteczek, co czyni je szczególnie przydatnymi jako składniki systemów dostarczania lub magazynowania substancji bioaktywnych [110]. Wprowadzenie grup amidowych, uzyskiwanych m.in. poprzez modyfikację CNTs związkami amonowymi, prowadzi do zmiany charakterystyki chemicznej ich powierzchni. Takie modyfikacje mogą wpływać na rodzaj i siłę oddziaływań z substancjami czynnymi, co potencjalnie zmienia ich powinowactwo i efektywność wiązania [110], [111].

W niniejszym rozdziale oceniono wpływ zastosowania wielościennych nanorurek węglowych (MWCNTs) zawierających zróżnicowane grupy funkcyjne na właściwości kompozytów na bazie PCL wzbogaconych związkami polifenolowymi. W pracy wykorzystano trzy rodzaje MWCNTs, zróżnicowanych pod względem grup funkcyjnych (HO, HNH oraz HDEA) oraz dwie różne techniki ich wprowadzenia do osnowy PCL, różniące się m.in. czasem kontaktu ze związkami polifenolowymi.

4.3.1. WŁAŚCIWOŚCI POWIERZCHNIOWE

MIKROSTRUKTURA

Do analizy mikrostruktury otrzymanych materiałów wykorzystano skaningową mikroskopię elektronową (Fig. 28). Na powierzchni AS wszystkich badanych materiałów widoczne są charakterystyczne dla semikrystalicznego poli(ϵ -kaprolaktonu) (PCL) formy sferolityczne, które odpowiadają za zwiększone rozwinięcie powierzchni oraz mogą wpływać na zwiększoną chropowatość. Przeciwnie, powierzchnie GS są znacznie gładkie i nie wykazują obecności sferolitów.

Wprowadzenie związków polifenolowych do materiału polimerowego PCL spowodowało powstanie porów na powierzchni GS, a także doprowadziło do powiększenia sferolitów obserwowanych na powierzchni AS. Materiały polimerowe z dodatkiem związków polifenolowych zostały szerzej scharakteryzowane w rozdziale 4.1.

Mikrostruktura powierzchni GS folii nie uległa istotnym zmianom po wprowadzeniu nanorurek węglowych, powierzchnie pozostawały gładkie, bez wyraźnych sferolitów. Z kolei wprowadzenie MWCNTs – niezależnie od ich typu – skutkowało zmniejszeniem rozmiaru sferolitów na powierzchni AS. Dodatkowo, w przypadku materiałów modyfikowanych nanorurkami HDEA zaobserwować można wzrost porowatości.

W przypadku kompozytów PCL/MWCNTs wzbogaconych w związki polifenolowe, również zaobserwowano obecność porów na powierzchni GS, jednak ich liczba była mniejsza niż w przypadku folii polimerowych. Z kolei powierzchnia AS materiałów z dodatkiem zarówno nanorurek węglowych, jak i polifenoli charakteryzuje się obecnością sferolitów o dużo większych rozmiarach w porównaniu do próbek zawierających jedynie nanorurki. Wielkość sferolitów była zbliżona do wielkości form sferolitycznych obserwowanych dla folii polimerowej.

Na podstawie przeprowadzonej analizy mikroskopowej trudno jednoznacznie określić wpływ metody otrzymywania folii z dodatkiem MWCNTs na mikrostrukturę obu ich powierzchni. Zmiany wielkości sferolitów mogą być związane z różną gęstością nukleacji PCL. Redukcja ich rozmiarów po wprowadzeniu nanorurek sugeruje, że MWCNTs działają jako efektywne nukleatory krystalizacji PCL. Badania Jana et al. wykazały, że obecność funkcjonalizowanych nanorurek węglowych w matrycy PCL prowadzi do zmniejszenia rozmiarów sferolitów oraz zwiększenia ich liczby. Autorzy tłumaczą ten efekt działaniem MWCNTs jako centrów nukleacji, co zostało potwierdzone poprzez obserwację sferolitycznej struktury z nanorurkami zlokalizowanymi w ich centrum. Jednocześnie stwierdzono

obniżenie energii aktywacji procesu krystalizacji, co wskazuje na inicjację wzrostu krystalitów w wyniku heterogenicznej nukleacji [112]. Podobne wnioski sformułowali Zhao et al., którzy wykazali, że dobrze rozproszone, funkcjonalizowane MWCNTs przyspieszają krystalizację PCL już przy bardzo małym dodatku (0,1% wag.). Według autorów, obserwowane przyspieszenie krystalizacji jest wynikiem efektywnego działania nanorurek jako nukleatorów, ułatwiających uporządkowanie łańcuchów PCL, dzięki dobrej adhezji międzyfazowej i wysokiemu stopniowi rozproszenia [113].

Jednocześnie, obserwowany w obecności polifenoli wzrost wielkości sferolitów w kompozytach zawierających MWCNTs może wynikać z aglomeracji nanorurek. Podobne obserwacje opisali Shao et al., którzy badali kompozytowe nanowłókna PCL/MWCNTs zawierające ekstrakt z zielonej herbaty jako źródło polifenoli. Autorzy wskazali na możliwość występowania niekowalencyjnych oddziaływań typu π - π pomiędzy MWCNTs a związkami polifenolowymi, co może prowadzić do ich adsorpcji na powierzchni nanorurek. Tego rodzaju interakcje mogą wpływać na stopień rozproszenia MWCNTs w matrycy polimerowej, co — jak zaznaczono — ma istotne znaczenie dla ich efektywności jako centrów nukleacji. Pogorszenie dyspersji, szczególnie przy wyższych zawartościach polifenoli, może ograniczać liczbę aktywnych miejsc zarodkowania, co znajduje odzwierciedlenie w zmianach morfologii kompozytu [114].

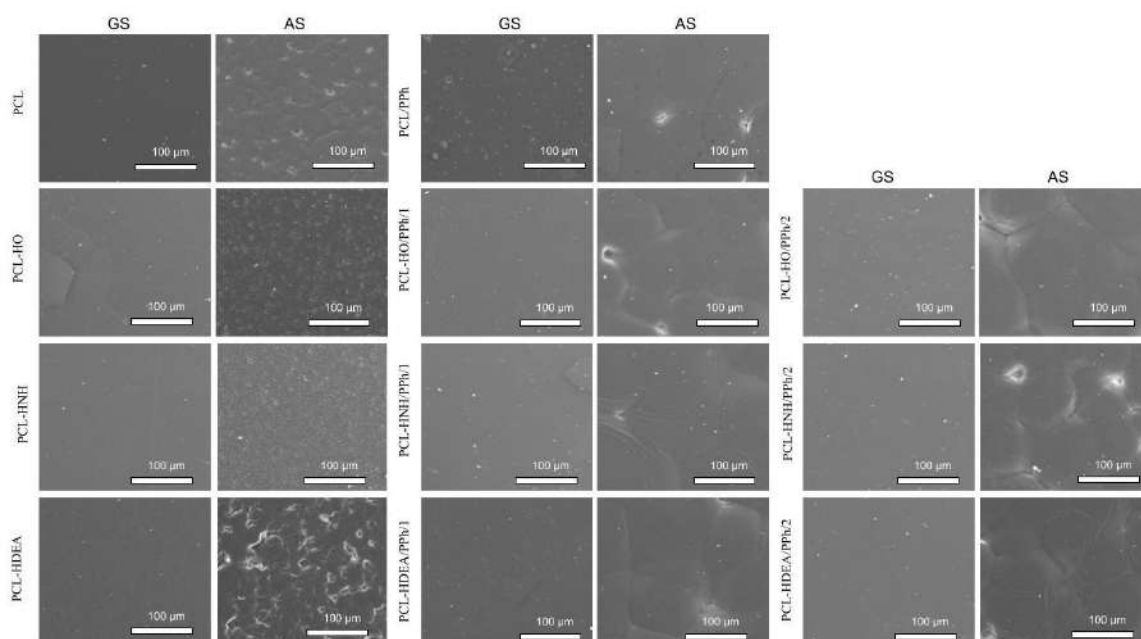


Fig. 28. Obrazy SEM powierzchni AS i GS badanych materiałów polimerowych i kompozytowych.

CHROPOWATOŚĆ

Chropowatość powierzchni badanych folii oceniono na podstawie dwóch parametrów: średniej arytmetycznej chropowatości (Ra) oraz maksymalnej wysokości profilu (Rz). Wyniki pomiarów przedstawiono na Fig. 29.

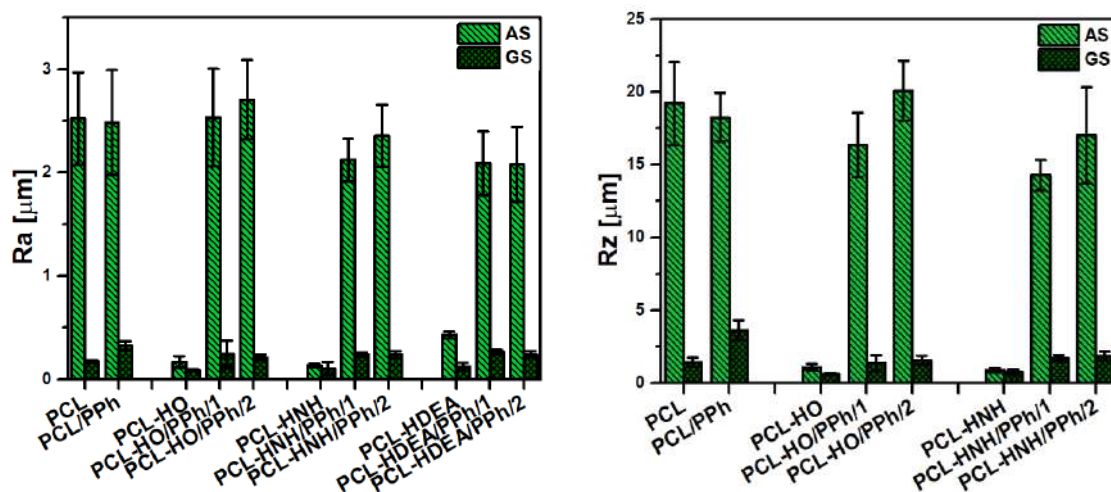


Fig. 29. Parametry Ra i Rz powierzchni AS i GS badanych materiałów polimerowych i kompozytowych.

Wprowadzenie związków polifenolowych do materiałów polimerowych PCL skutkowało nieznacznym wzrostem chropowatości dolnej powierzchni (GS), natomiast górna powierzchnia (AS) pozostała praktycznie bez zmian.

Zastosowanie nanorurek węglowych jako fazy modyfikującej PCL prowadziło do znacznego obniżenia chropowatości, przy czym znacznie większe zmiany obserwowano dla powierzchni AS. Analizując chropowatość powierzchni AS materiałów kompozytowych, najwyższymi wartościami obu parametrów charakteryzował się materiał PCL-HDEA. Wartości parametrów Ra i Rz dla wszystkich materiałów kompozytowych wzbogaconych w związki polifenolowe kształtują się na podobnym poziomie do wartości parametrów odnotowanych dla folii polimerowych (PCL, PCL/PPh). Wyniki te korelują ze zmianami wielkości sferolitów wraz z dodatkiem poszczególnych rodzajów nanorurek węglowych, obserwowanych przy pomocy SEM.

ZWILŻALNOŚĆ I ENERGIA POWIERZCHNIOWA

Wyniki analizy kąta zwilżania (θ) oraz energii powierzchniowej (SE) wraz z jej składowymi dyspersyjnymi (σ_D) i polarnymi (σ_P) dla obu powierzchni (AS i GS) folii zostały zaprezentowane na Fig. 30.

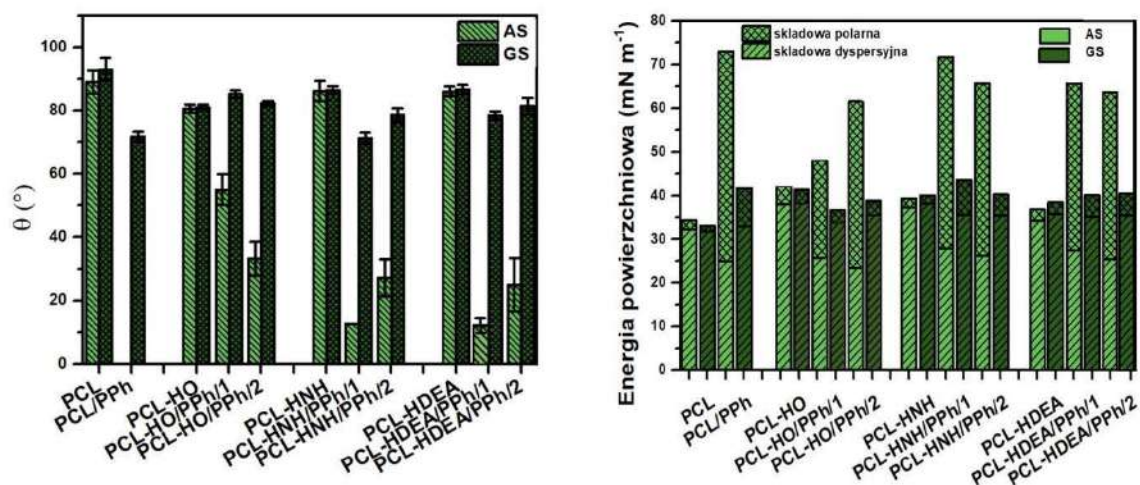


Fig. 30. Kąt zwilżania oraz całkowita energia powierzchniowa wraz z jej składową dyspersyjną (σ_D) i polarną (σ_P) dla powierzchni AS i GS folii na bazie PCL.

Wprowadzenie związków polifenolowych do materiałów polimerowych doprowadziło do całkowitej zwilżalności powierzchni AS oraz wyraźnego obniżenia kąta zwilżania powierzchni GS. Szczegółowa analiza i interpretacja tych wyników została przedstawiona w rozdziale 4.1. Wprowadzenie nanorurek węglowych do osnowy polimerowej spowodowało nieznaczny spadek kąta zwilżania, szczególnie powierzchni GS, dla wszystkich materiałów kompozytowych. **Najbardziej zauważalne zmiany dotyczyły materiałów modyfikowanych nanorurkami HO. Nanorurki te, poddane wcześniejszemu utlenianiu w mieszaninie H_2SO_4/HNO_3 , zawierają największą ilość grup hydrofilowych, w tym hydroksylowych, karboksylowych i karbonylowych. Obecność tych grup w MWCNTs może być przyczyną wzrostu wartości całkowitej energii powierzchniowej, w tym składowej polarnej oraz obniżenia kąta zwilżania. W porównaniu do HO, nanorurki HNH i HDEA posiadają mniej wolnych grup karboksylowych, ponieważ część z nich została przekształcona w grupy amidowe podczas procesu funkcjonalizacji, co może tłumaczyć ich mniejszy wpływ na poprawę zwilżalności powierzchni materiałów [115], [116].**

Dodatek polifenoli zwiększał zwilżalność powierzchni kompozytów, co skutkowało spadkiem wartości kąta zwilżania, szczególnie powierzchni górnej (AS) i wzrostem wartości całkowitej energii powierzchniowej, w tym szczególnie składowej polarnej. Może to świadczyć o zwiększonej koncentracji związków polifenolowych przy powierzchni AS materiału. Prawdopodobnym mechanizmem jest migracja polifenoli ku powierzchni podczas parowania rozpuszczalnika – cząsteczki te, ze względu na niewielką masę cząsteczkową i wysoką

mobilność, przemieszczają się ku powierzchni AS, gdzie mogą eksponować swoje grupy hydroksylowe (-OH).

Obecność MWCNTs w materiałach wzbogaconych w polifenole modulowała zwilżalność ich powierzchni, w szczególności AS. Najmniejszy spadek kąta zwilżania po wprowadzeniu polifenoli zaobserwowano w przypadku materiałów modyfikowanych nanorurkami HO. Może to sugerować najwyższą zdolność do wiązania polifenoli przez ten rodzaj MWCNTs, co skutkuje zmniejszoną koncentracją związków aktywnych na powierzchni materiałów. Warto zauważyć, że kompozyty PCL/HO/PPh otrzymane pierwszą metodą charakteryzowały się wyższą wartością kąta zwilżania niż te otrzymane drugą techniką, co sugeruje, że dłuższy czas kontaktu polifenoli z nanorurkami podczas procesu wytwarzania folii sprzyja ich wiązaniu z powierzchnią nanonapełniacza, a zatem powoduje redukcję ich koncentracji w osnowie polimerowej oraz na powierzchni materiałów. W przypadku kompozytów z nanorurkami HDEA i HNH spadek kąta zwilżania wraz z wprowadzeniem polifenoli był większy, co sugeruje, że ich wiązanie z MWCNTs było mniej skuteczne. Zaskakującym wynikiem jest polepszona zwilżalności kompozytów otrzymywanych pierwszą metodą w stosunku do materiałów uzyskanych techniką, w której kontakt MWCNTs z polifenolami był znacznie krótszy. Spodziewano się, podobnie jak w przypadku zastosowania nanorurek HO, odwrotnego efektu.

Zdolność nanorurek węglowych do wiązania polifenoli zależy od rodzaju grup chemicznych wprowadzonych na ich powierzchnię podczas funkcjonalizacji [115]. Proces amidyzacji, zastosowany w przypadku nanorurek HNH i HDEA, przekształca grupy karboksylowe w grupy amidowe, które wykazują mniejsze powinowactwo do grup hydroksylowych polifenoli. W efekcie cząsteczki polifenoli mogą wiązać się słabiej z nanorurkami zmodyfikowanymi grupami amidowymi, co może sprzyjać ich wyższemu stężeniu w osnowie polimeru, a także na powierzchni kompozytów.

Na podstawie wyników Wu et al. (2013) potwierdzają, że wzrost stężenia grup hydroksylowych i karboksylowych na powierzchni nanorurek węglowych prowadzi do silniejszego wiązania z cząsteczkami organicznymi posiadającymi grupy polarne, w tym -OH. Polifenole, jako związki zawierające liczne grupy hydroksylowych, mogą wykazywać zwiększoną zdolność adsorpcyjną do nanorurek z większą liczbą grup -OH na powierzchni, co autorzy badania wiążą z możliwością tworzenia wiązań wodorowych [117]. Również Lin i Xing (2008) stwierdzili, że nanorurki węglowe wykazują wysoką zdolność wiązania związków fenolowych dzięki zdolności tworzenia wiązań wodorowych i oddziaływań typu π - π [118].

4.3.2. WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNE

Właściwości mechaniczne materiałów kompozytowych oceniono za pomocą statycznej próby rozciągania. Wyniki badań przedstawiono na Fig. 31.

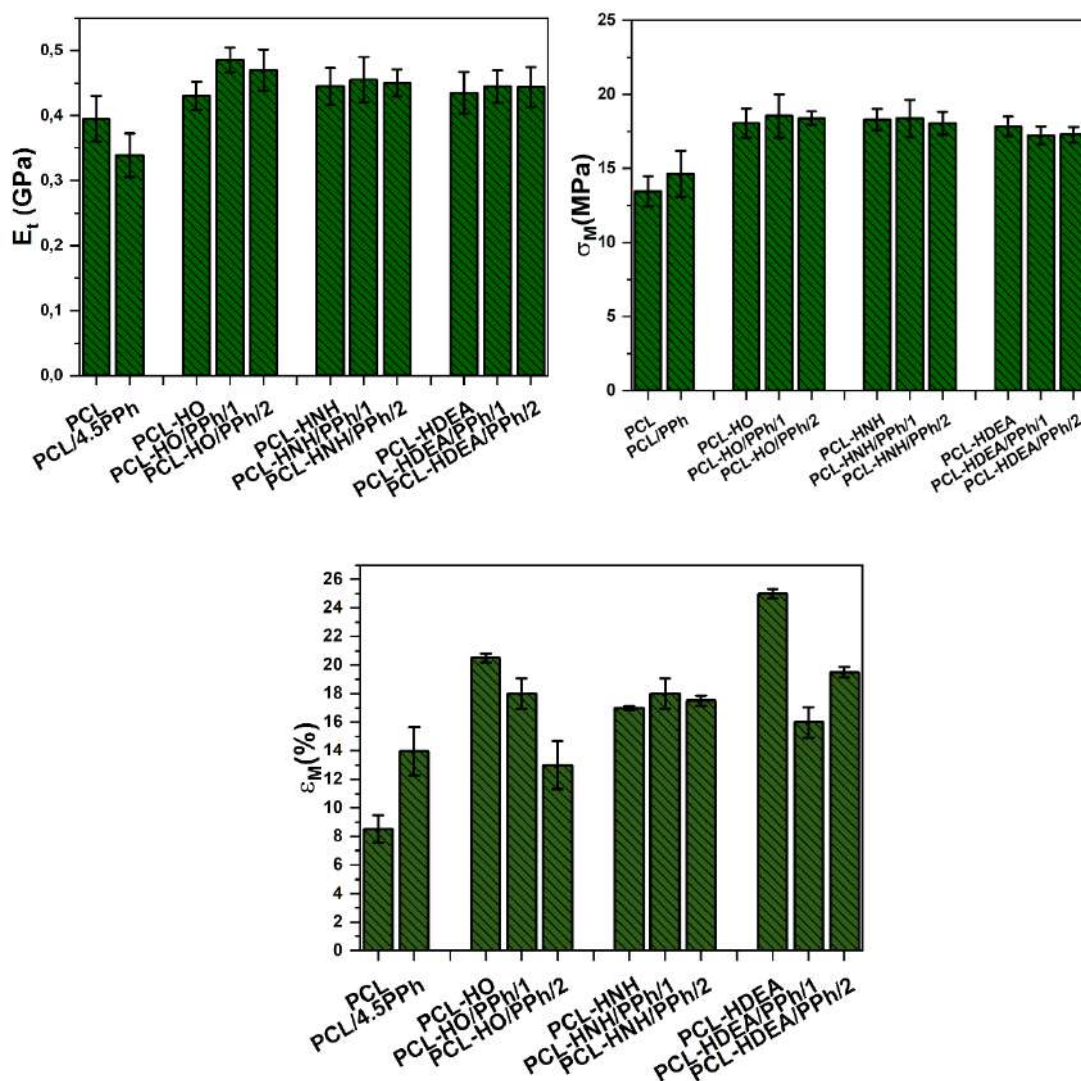


Fig. 31. Moduł Younga (E_t), wytrzymałość na rozciąganie (σ_M) i wydłużenie (ϵ_M) przy maksymalnej sile materiałów polimerowych i kompozytowych.

Dodatek związków polifenolowych do materiału polimerowego skutkowało obniżeniem wartości modułu Younga oraz wzrostem wartości wydłużenia przy maksymalnej sile. Efekt ten może być związany z działaniem polifenoli jako plastyfikatorów, które poprzez interakcje z łańcuchami polimerowymi zwiększają ich ruchliwość, obniżając tym samym sztywność materiału. Szczegółowa analiza tego mechanizmu została omówiona w rozdziale 4.1.

Z kolei wprowadzenie nanorurek węglowych do folii PCL wyraźnie zwiększyło wartość modułu Younga oraz wytrzymałości na rozciąganie, niezależnie od rodzaju użytych

nanonapełniaczy. Liczne doniesienia naukowe potwierdzają, że wprowadzenie nanorurek węglowych do materiału polimerowego może prowadzić do poprawy właściwości mechanicznych [114], [119], [120]. Skuteczność takiego wzmocnienia wynika przede wszystkim z jakości ich rozproszenia w matrycy oraz siły adhezji na granicy faz kompozytu. To właśnie odpowiednie połączenie między nanonapełniaczem a polimerem pozwala na efektywne przenoszenie naprężeń w kompozycie, co przekłada się na zmianę właściwości mechanicznych całego materiału [119], [120].

Dodatek związków polifenolowych do materiałów kompozytowych przede wszystkim modyfikował wartości modułu Younga oraz wydłużenia przy maksymalnej sile, jednak nie wpływał istotnie na wytrzymałość na rozciąganie. Największy wzrost modułu Younga i wytrzymałości na rozciąganie zaobserwowano dla kompozytów modyfikowanych nanorurkami HO. Z kolei, kompozyty zawierające nanorurki HNH oraz HDEA wykazywały tylko niewielkie zmiany wartości tego parametru. Efekt ten można tłumaczyć większym powinowactwem nanorurek HO do związków polifenolowych, które – tworząc wiązania zarówno z nanonapełniaczem, jak i z matrycą polimerową – mogą pełnić funkcję środków sprzęgających [117]. Podobne zjawiska zaobserwowano również w przypadku innych rodzajów napełniaczy, co zostało szczegółowo opisane we wcześniejszych częściach pracy.

Zróznicowanie wyników obserwowano także w zależności od zastosowanej metody otrzymywania kompozytów. Metoda pierwsza, polegająca na 24-godzinnej inkubacji polifenoli z nanorurkami, sprzyjała bardziej efektywnemu ich wiązaniu, co szczególnie widoczne było dla nanorurek HO. Prawdopodobnie prowadziło to do wzmocnienia interakcji między fazami kompozytu. W rezultacie uzyskiwano materiały o zmienionych właściwościach mechanicznych.

4.3.3. WŁAŚCIWOŚCI TERMICZNE

Analiza termiczna materiałów została przeprowadzona metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC), w celu wyznaczenia temperatury topnienia (T_m) oraz stopnia krystaliczności (X_c). Wyniki przedstawiono w Tab. 8.

Tab. 8. Temperatura topnienia (T_m) oraz stopień krystaliczności (X_c) badanych materiałów.

Próbka	T_m [°C]	X_c [%]
PCL	65,2	29,3
PCL/PPH	64,4	41,2
PCL-HO	63,5	37,0
PCL-HO/PPh/1	62,0	39,1
PCL-HO/PPh/2	61,7	38,3
PCL-HNH	63,5	37,5
PCL-HNH/PPh/1	62,3	33,9
PCL-HNH/PPh/2	61,4	33,4
PCL-HDEA	63,8	36,6
PCL-HDEA/PPh/1	61,4	31,9
PCL-HDEA/PPh/2	61,7	32,2

Wprowadzenie związków polifenolowych do materiałów polimerowych spowodowało obniżenie temperatury topnienia oraz wzrost stopnia krystaliczności, co przypisuje się ich działaniu jako plastyfikatorów. Zjawisko to zostało szczegółowo przeanalizowane w rozdziale 4.1.

Uzyskane wyniki wskazują, że modyfikacja materiału polimerowego PCL za pomocą nanorurek węglowych różnych typów spowodowała wzrost jego stopnia krystaliczności, przy czym największy efekt odnotowano w przypadku kompozytów modyfikowanych nanorurkami HO. Autorzy Wurm et al. (2014) badali mechanizm wpływu wielościennych nanorurek węglowych (MWCNT) na krystalizację poli(ϵ -kapolaktonu) (PCL) i wykazali, że nanorurki te pełnią funkcję silnych centrów nukleacji heterogenicznej. Wskazują oni, że obecność MWCNT przyspiesza proces krystalizacji i zwiększa gęstość nukleacji, co potwierdziły obserwacje SEM. Proponowany mechanizm opiera się na epitaksjalnym wzroście lamelarnych kryształów PCL bezpośrednio na powierzchni nanorurek, prowadząc do powstania tzw. struktur typu „hybrid shish-kebab”, w których łańcuchy polimeru ułożone są równoległe do powierzchni nanonapełniacza [121]. Liczne badania naukowe potwierdzają, że rodzaje grup funkcyjnych obecnych na powierzchni nanorurek węglowych wywierają istotny, zróżnicowany wpływ na przebieg krystalizacji osnowy polimerowej w kompozytach z ich udziałem. Różnice te wynikają głównie z odmiennej zdolności poszczególnych grup do

inicjowania nukleacji oraz ich interakcji międzyfazowych z łańcuchami polimerowymi [122], [123]. W pracy Bulbul i Dilsiz (2024) autorzy ocenili wpływ nanorurek węglowych funkcjonalizowanych grupami hydroksylowymi (-OH) oraz karboksylowymi (-COOH) na krystaliczność nanowłókien z poli(ϵ -kapolaktonu) (PCL). Stwierdzili, że dodatek obu typów nanorurek prowadzi do wzrostu uporządkowania struktury polimeru, przy czym wyraźniejszy efekt zaobserwowano dla nanorurek z grupami -COOH. Autorzy tłumaczą to lepszą dyspersją oraz silniejszymi oddziaływaniami międzyfazowymi między grupami -COOH a łańcuchami PCL, zwłaszcza poprzez tworzenie wiązań wodorowych z grupami karbonylowymi. To z kolei sprzyja formowaniu centrów krystalizacji i ułatwia wzrost uporządkowanych struktur. W przypadku grup -OH oddziaływania wodorowe również występują, jednak są słabsze, co skutkuje mniejszym efektem. Autorzy podkreślają, że odpowiednia funkcjonalizacja powierzchni CNTs odgrywa istotną rolę w inicjowaniu procesu krystalizacji, w przeciwieństwie do niezmodyfikowanych nanorurek, które wykazują ograniczoną aktywność w tym zakresie [124].

Dodatek związków polifenolowych do kompozytów prowadził do obniżenia stopnia krystaliczności. Poza większą tendencją nanorurek do aglomeracji w obecności polifenoli, obecność tych związków, dodatkowo związanych częściowo z powierzchnią nanorurek węglowych, prawdopodobnie modyfikuje interakcje nanonapełniacza z osnową polimerową, co w konsekwencji może zaburzać proces krystalizacji PCL.

Wartości stopnia krystaliczności uzyskane dla materiałów otrzymanych obiema metodami były zbliżone, co sugeruje, że sposób wytwarzania kompozytu nie wpływa istotnie na ten parametr. Zarówno modyfikacja osnowy polimerowej nanorurkami węglowymi, jak i związkami polifenolowymi powodowała niewielki spadek temperatury topnienia, co może wskazywać na formowanie się mniejszych krystalitów w strukturze PCL [125].

FTIR-ATR

W celu oceny skuteczności wprowadzenia związków polifenolowych do materiałów polimerowych i kompozytowych przeprowadzono analizę metodą ATR-FTIR. Wyniki analizy przedstawiono na Fig. 32.

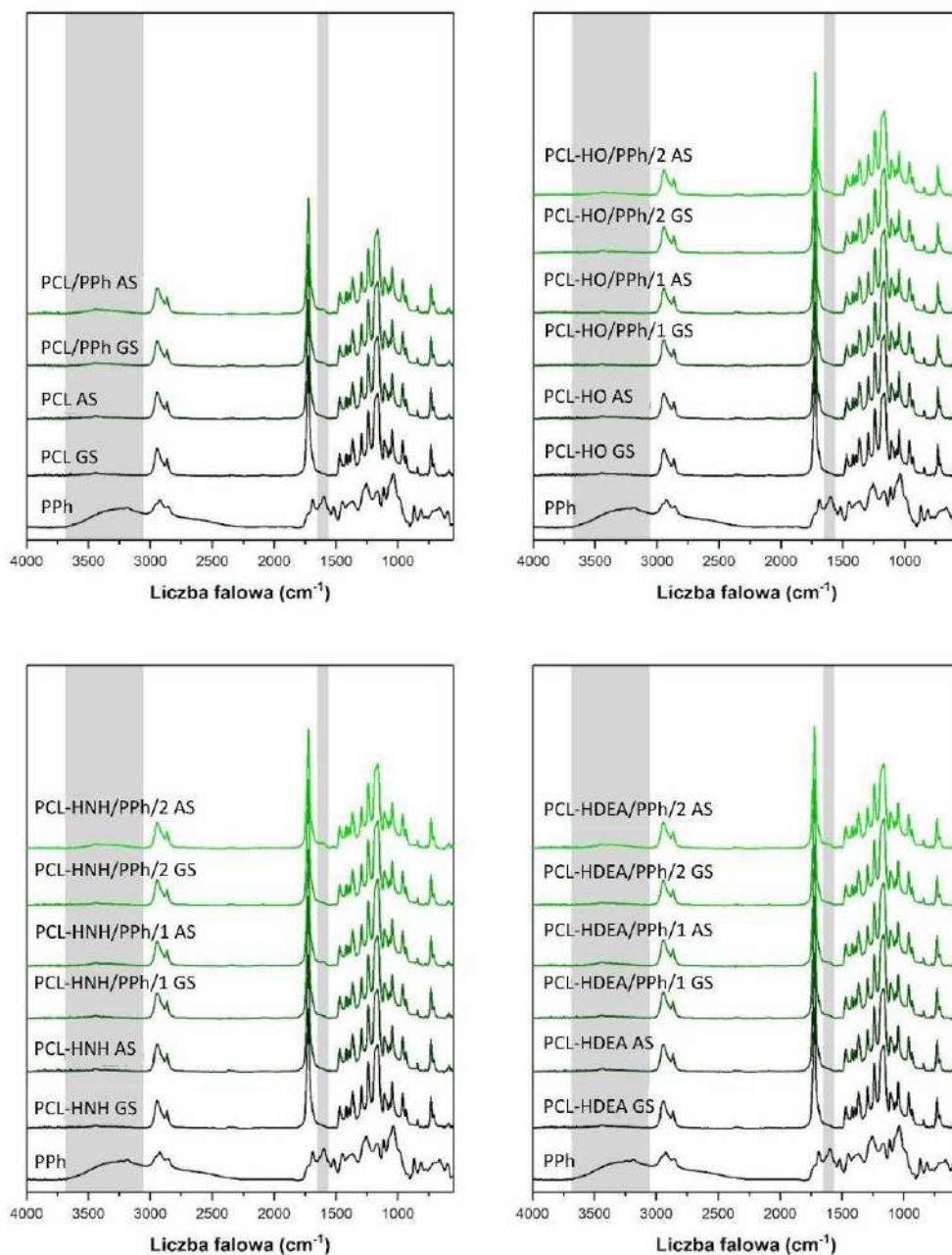


Fig. 32. Widma ATR-FTIR materiałów PCL, PCL-HO, PCL-HNH, PCL-HDEA wzbogaconych polifenolami. Dla porównania zamieszczono również widmo związków polifenolowych.

Na widmach oznaczono kolorem szarym zakresy pasm charakterystycznych dla związków polifenolowych. **Pasmo w okolicy 3250 cm^{-1} odpowiada drganiom rozciągającym grup hydroksylowych (-OH) w strukturze polifenoli, natomiast pasmo przy 1600 cm^{-1} związane jest z drganiami układu aromatycznego tych cząsteczek** [126], [127].

W przypadku kompozytu PCL/HO otrzymanego metodą pierwszą, widma obu powierzchni nie wykazują wyraźnych pasm pochodzących od związków polifenolowych. Natomiast w kompozycie uzyskanym metodą drugą można zaobserwować pasma o niskiej intensywności, co może wskazywać na obecność PPh w niewielkim stężeniu. Wyniki te mogą

świadczą o wysokim powinowactwie nanorurek HO do związków polifenolowych i ich silnym wiązaniu, które ogranicza akumulację PPh na powierzchni materiału [126]. Dodatkowo, dłuższy czas kontaktu polifenoli z nanonapełniaczem w metodzie pierwszej może sprzyjać temu zjawisku.

Z kolei w przypadku kompozytów zawierających nanorurki HNH i HDEA, pasma charakterystyczne dla związków polifenolowych są bardziej intensywne, co może wskazywać na mniejszą zdolność tych nanorurek do ich oddziaływania z nanorurkami.

We wszystkich analizowanych materiałach pasma charakterystyczne dla PPh wykazywały wyższą intensywność w widmach zarejestrowanych dla powierzchni AS, co jest zgodne z obserwacjami dotyczącymi zwilżalności i sugeruje większe nagromadzenie związków polifenolowych na tej powierzchni materiałów. **Dodatkowo, przesunięcie pasma odpowiadającego grupom -OH w kierunku wyższych liczb falowych w materiałach zawierających PPh może wskazywać na występowanie oddziaływań pomiędzy polifenolami a osnową polimerową oraz nanorurkami węglowymi [127].**

4.3.4. WŁAŚCIWOŚCI ANTYOKSYDACYJNE

W celu oceny właściwości antyoksydacyjnych badanych materiałów polimerowych i kompozytowych wzbogaconych związkami polifenolowymi, przeprowadzono analizy z wykorzystaniem testów ABTS, DPPH oraz FRAP. Wyniki przedstawiono na Fig. 33.

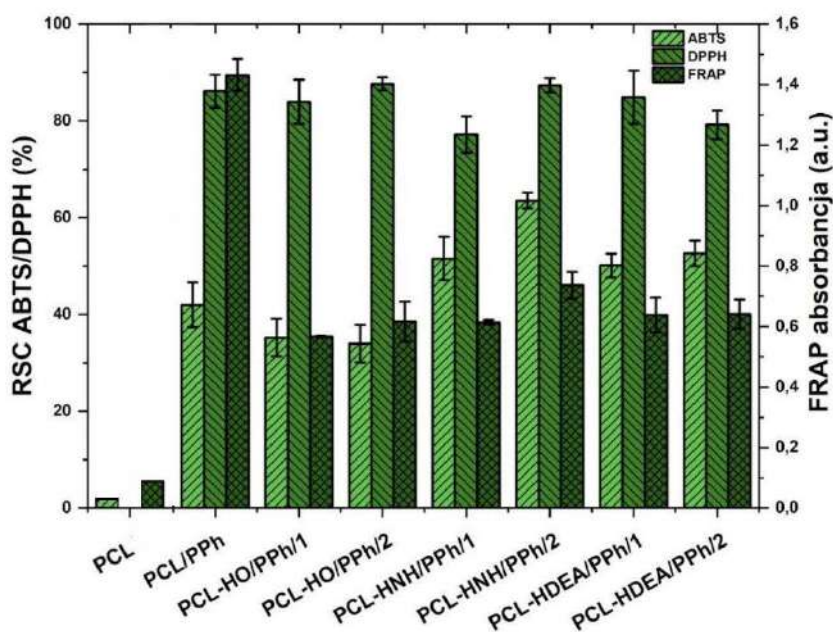


Fig. 33. Zdolność zmiatania rodników (RSC) ABTS •• i DPPH • oraz zdolność redukcji jonów żelaza (III) (FRAP) przez badane materiały.

Materiał polimerowy wzbogacony w PPh osiągnął najwyższe wartości spośród badanych materiałów we wszystkich przeprowadzonych testach, co potwierdza jego wysoki potencjał antyoksydacyjny. Szczegółowy opis tych wyników znajduje się w rozdziale 4.1. Kompozyty wzbogacone w związki polifenolowe wykazywały natomiast niższe wartości niż materiały polimerowe. Prawdopodobnie wynika to ze zdolności wiązania związków polifenolowych przez nanonapełniacz, co obniża jednocześnie ich stężenie na powierzchni materiałów, a także zdolność do ich uwalniania z materiału.

Spośród wszystkich badanych kompozytów, te modyfikowane nanorurkami HNH i HDEA wykazały wyższe wartości zmiatania wolnych rodników oraz redukcji jonów żelaza, co można obecności większej koncentracji związków polifenolowych na powierzchni materiału [78], [128], [129].

Z kolei kompozyty modyfikowane nanorurkami typu HO charakteryzowały się najniższą zdolnością zmiatania wolnych rodników i redukcji jonów żelaza spośród wszystkich materiałów. Może to wynikać z najwyższej skuteczności wiązania związków polifenolowych przez ten rodzaj nanorurek. Jednocześnie test DPPH wykazał zbliżone wartości we wszystkich próbkach, niezależnie od zastosowanej fazy modyfikującej i metody otrzymania materiału. Może to sugerować ograniczoną czułość tego testu na zmiany w dostępności powierzchniowej związków polifenolowych lub różnice w mechanizmie działania w porównaniu z pozostałymi testami dla tych materiałów. Dodatkowo, nie zaobserwowano jednoznacznego wpływu sposobu wprowadzania związków polifenolowych na właściwości antyoksydacyjne badanych materiałów.

PODSUMOWANIE

W wyniku przeprowadzonych badań zaobserwowano, że nanorurki węglowe mogą efektywnie wiązać się z polifenolami, co ma istotny wpływ na właściwości wytworzonych materiałów kompozytowych. Zastosowanie zróżnicowanych grup funkcyjnych do modyfikacji powierzchni nanorurek umożliwia kontrolowanie właściwości fizycznych i chemicznych materiałów. Dodatkowo, zróżnicowany czas kontaktu nanonapełniacza ze związkami aktywnymi podczas otrzymywania materiałów może stanowić dodatkowe narzędzie pozwalające na modyfikację właściwości kompozytów.

Wyniki badań wskazują, że polifenole oraz nanorurki węglowe, zarówno samodzielnie, jak i w połączeniu, wpływają na proces krystalizacji polimeru, co może prowadzić do zmian w mikrostrukturze oraz topografii powierzchni materiałów. Obecność polifenoli w materiałach kompozytowych wpływa na zwilżalność oraz energię powierzchniową folii.

Parametry te mogą być dodatkowo modyfikowane w zależności od rodzaju nanorurek węglowych (ze względu na różnorodność grup funkcyjnych) oraz stosowanej metody otrzymywania folii, w tym czasu kontaktu nanorurek z polifenolami.

Potwierdzono również, że nanorurki węglowe w osnowie polimerowej istotnie zwiększają sztywność oraz wytrzymałość na rozciąganie otrzymanych folii. Dodatkowo, wprowadzenie polifenoli do materiałów prowadzi do dalszych modyfikacji właściwości mechanicznych tych kompozytów. Ponadto, obecność związków polifenolowych w materiałach zapewnia im silne właściwości antyoksydacyjne, które mogą podlegać modyfikacji w zależności od rodzaju grup funkcyjnych nanorurek węglowych.

5. BADANIA DŁUGOTERMINOWEJ DEGRADACJI HYDROLITYCZNEJ

Dotychczas w pracy wykazano, że modyfikacja materiałów polimerowych cząstkami bioaktywnego szkła (BG), zarówno samodzielnie, jak i w połączeniu ze związkami polifenolowymi (PPh), wpływa znacząco na ich właściwości fizykochemiczne, takie jak zwilżalność, topografia powierzchni, porowatość oraz krystaliczność. Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy, właściwości te odgrywają kluczową rolę w przebiegu procesu degradacji polimerów, który ma fundamentalne znaczenie w kontekście zastosowań biomedycznych, takich jak regeneracja tkanek oraz systemy kontrolowanego uwalniania leków. **Proces degradacji biomateriału umożliwia stopniowe zastępowanie go przez tkanki gospodarza oraz zapewnia możliwość lokalnego, kontrolowanego uwalniania cząsteczek terapeutycznych – w tym przypadku związków polifenolowych.**

Jak wskazują wyniki dotychczasowych badań, obecność polifenoli może nie tylko nadawać materiałom właściwości przeciwutleniające, lecz również sprzyjać procesowi mineralizacji bioaktywnej warstwy apatytu na ich powierzchni. Dodatkowo, literatura opisuje szerokie spektrum ich aktywności biologicznej, w tym działanie przeciwbakteryjne, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe oraz przeciwgrzybicze, przy jednoczesnej niskiej toksyczności i ograniczonych działaniach niepożądanych.

Pomimo rosnącego zainteresowania tą tematyką, dotychczas nie przeprowadzono kompleksowych badań dotyczących długoterminowego przebiegu degradacji materiałów polimerowych wzbogaconych w związki polifenolowe. **W związku z powyższym, niniejszy rozdział został poświęcony szczegółowej analizie procesu degradacji materiałów opartych na dwóch biodegradowalnych polimerach – poli(ϵ -kaprolaktonie) (PCL) oraz kopolimerze kwasu mlekowego i glikolowego (PLGA) – różniących się istotnie pod względem struktury oraz szybkości degradacji w środowisku wodnym. PCL, jako materiał półkrystaliczny, ulega powolnej degradacji w czasie 2–3 lat, natomiast amorficzny PLGA degraduje znacznie szybciej (w przedziale od 1 do 6 miesięcy), przy czym tempo tego procesu zależne jest od stosunku jednostek kwasu mlekowego do glikolowego w łańcuchu polimerowym.**

Celem analizy jest ocena wpływu obecności związków polifenolowych pochodzących z szalwii lekarskiej (*Salvia officinalis* L.) na długoterminowy proces degradacji *in vitro* materiałów na bazie PCL i PLGA, jak również kompozytów modyfikowanych bioaktywnym szkłem otrzymanym metodą zol-żel.

5.1. WARUNKI PROWADZENIA EKSPERYMENTÓW

Materiały do badań zostały przygotowane zgodnie z procedurami opisanymi we wcześniejszym rozdziale (Rozdział ...), z wykorzystaniem metody odlewania z roztworu. Do oceny procesu degradacji *in vitro* przygotowano 12 prostokątnych próbek folii o wymiarach 50 × 5 mm, wykonanych z PCL oraz PLGA, jak również kompozytów zawierających 30% (w/w) cząstek bioaktywnego szkła (BG) oraz 1,5 lub 4,5% (w/w) polifenoli (PPh) ekstrahowanych z szałwii lekarskiej (*Salvia officinalis* L.).

Badania prowadzono w warunkach *in vitro*, symulujących środowisko ludzkiego płynu ustrojowego. Próbki umieszczono w szczelnie zamkniętych polipropylenowych pojemnikach zawierających roztwór buforowanej soli fizjologicznej (ang. *phosphate buffered saline*, PBS; pH 7,4). Inkubację prowadzono w temperaturze 37°C. W celu zapewnienia stabilnych warunków, medium inkubacyjne wymieniano na świeże co 30 dni, zachowując stosunek masy próbki do objętości roztworu wynoszący 10⁻² g/ml⁻¹.

Degradacja materiałów była monitorowana poprzez okresowy pomiar pH medium inkubacyjnego przy użyciu pH-metru S210-BASIC (Mettler Toledo, Greifensee, Szwajcaria). Próbki były wyjmowane z pojemników po określonym czasie inkubacji: odpowiednio po 3, 6 i 12 miesiącach dla systemów opartych na PCL oraz po 2 tygodniach, 1 i 3 miesiącach dla układów z PLGA. Po wyjęciu z roztworu próbki płukano bezwodnym etanolem, a następnie suszono w temperaturze 40°C w suszarce próżniowej, aż do uzyskania stałej masy.

Ubytek masy próbek (m%) obliczono za pomocą następującego wzoru:

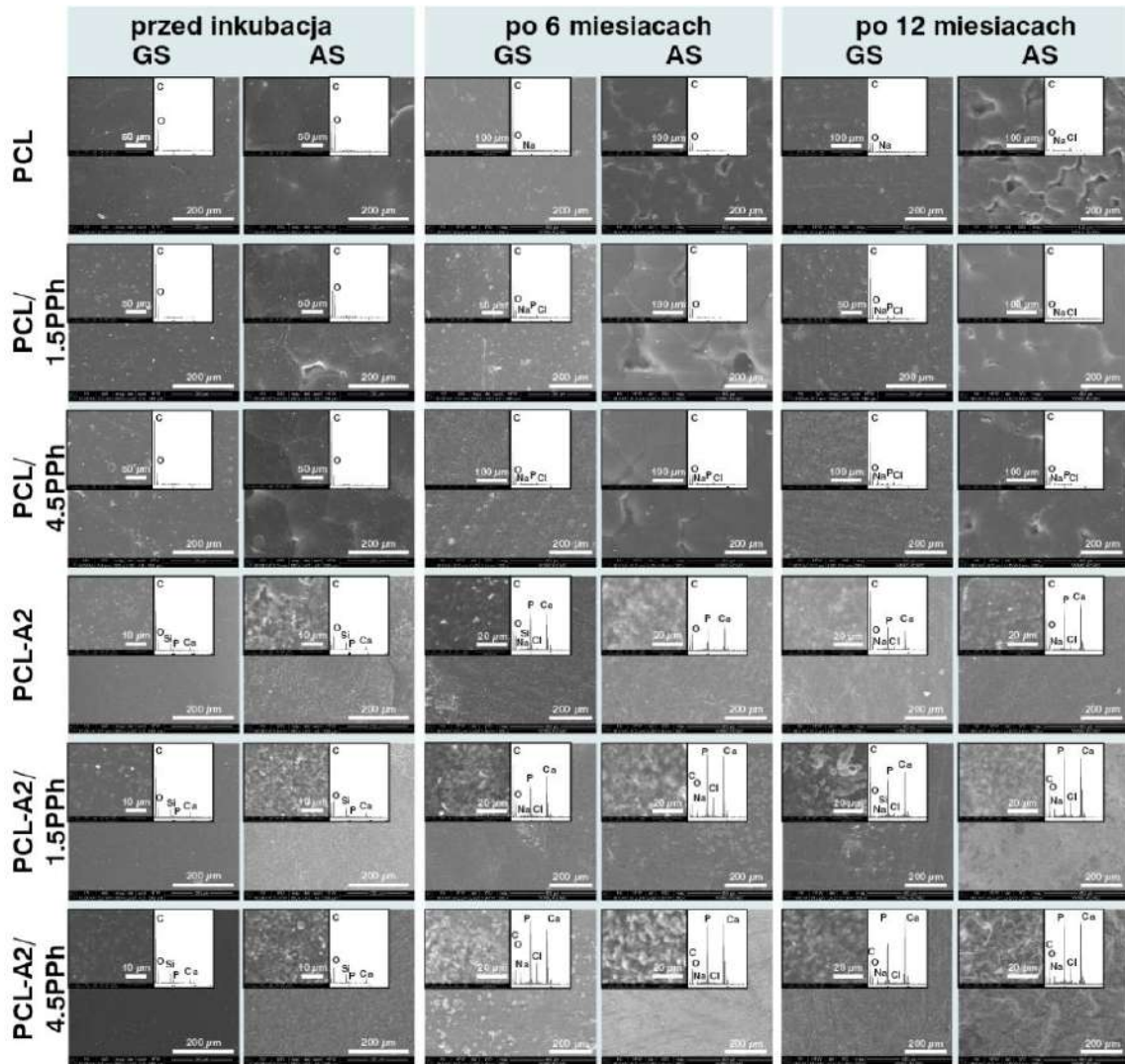
$$\Delta m(\%) = \frac{m_0 - m_t}{m_0} \cdot 100\%$$

gdzie m_0 jest początkową masą próbki, a m_t jest masą suchej próbki po zadany czasie inkubacji.

Materiały zostały ocenione pod kątem zmian morfologii powierzchni (SEM/EDX), masy, właściwości termicznych (DSC/TG), mechanicznych, masy cząsteczkowej (GPC), oraz właściwości strukturalnych (spektroskopia FTIR i Ramana). Analizie podlegały również zmiany pH i składu płynu inkubacyjnego (ICP-OES).

5.2. WYNIKI BADAŃ I WNIOSKI

5.2.1. MORFOLOGIA POWIERZCHNI



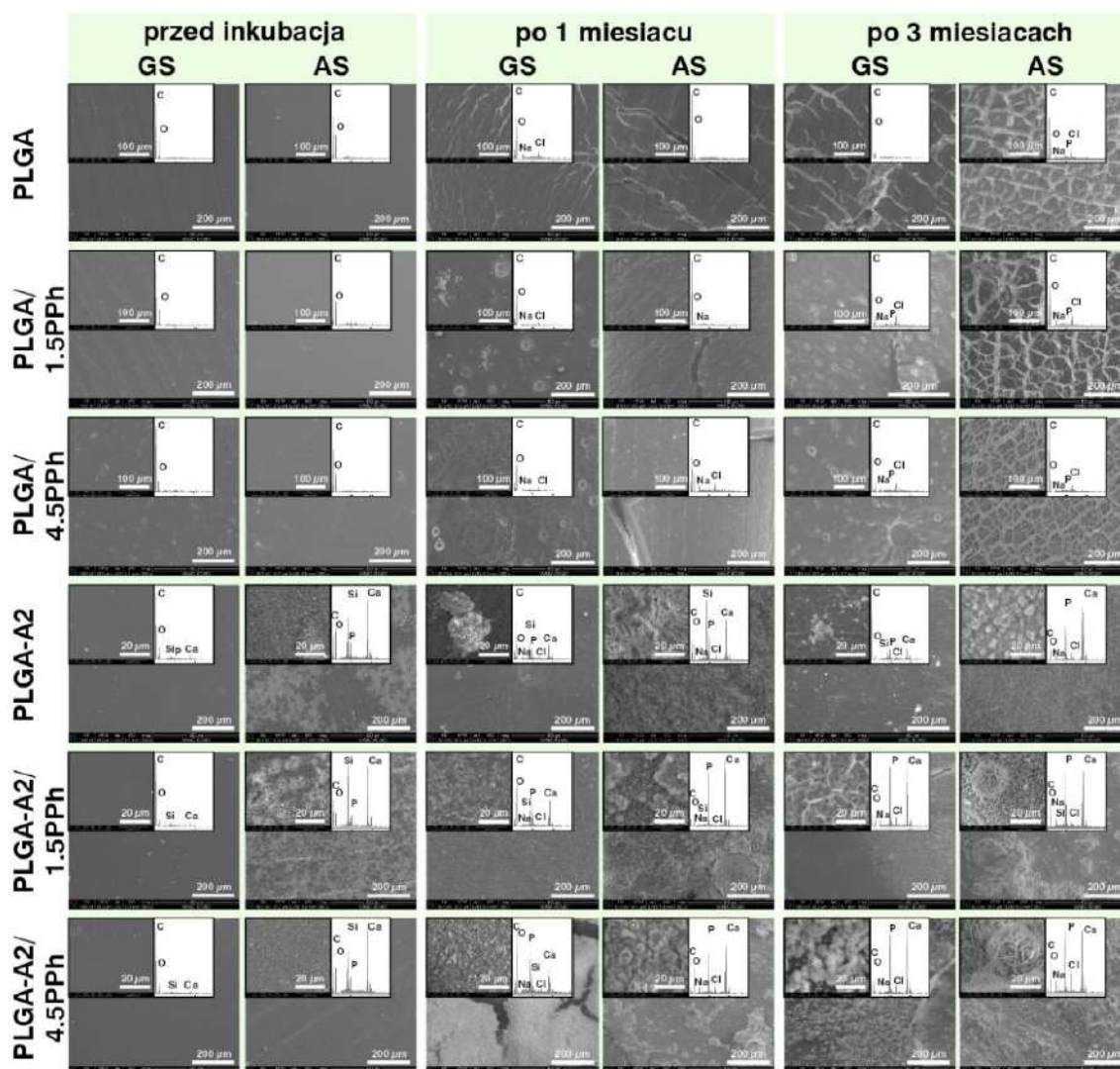


Fig. 34. Obrazy SEM i widma EDX powierzchni AS i GS folii na bazie PCL i PLGA przed i po inkubacji w PBS.

Obrazy SEM oraz widma EDX powierzchni AS i GS folii na bazie PCL i PLGA przed oraz po inkubacji w PBS przedstawiono na Fig. 34. Folia PCL nie wykazała istotnych zmian morfologicznych po inkubacji. W przypadku materiałów polimerowych wzbogaconych w związki polifenolowe obserwowano wzrost porowatości powierzchni GS wraz z wydłużaniem czasu inkubacji, przy czym powierzchnia GS folii o wyższym stężeniu związków polifenolowych charakteryzowała się wyraźnie wyższą porowatością. Inkubacja nie wpłynęła istotnie na morfologię powierzchni AS folii PCL/1.5PPh, natomiast w przypadku PCL/4.5PPh porowatość pojawiła się podczas inkubacji. Na obu powierzchniach folii PLGA rozwinęły się liczne pęknięcia już w trakcie inkubacji. W materiałach polimerowych wzbogaconych w związki polifenolowe pęknięcia były obecne na powierzchni AS, natomiast na powierzchni GS pojawiały się pory. Po trzymiesięcznej inkubacji na powierzchni AS

wszystkich folii PLGA zaobserwowano gęstą sieć pęknięć, przy czym folia PLGA/4.5PPh wydawała się najbardziej uszkodzona.

Warstwa bogata w wapń (Ca) i fosfor (P) pokrywała zarówno powierzchnię AS, jak i GS kompozytów PCL-A2 oraz PLGA-A2. W trakcie inkubacji obserwowano stopniową zmianę jej morfologii od form słabo rozwiniętych do dobrze skryształizowanych, przy czym tempo zmian różniło się w zależności od rodzaju materiału i badanej powierzchni. Proces przebiegał szybciej na powierzchni AS, w materiałach zawierających związki polifenolowe oraz w foliach PLGA-A2. Na powierzchni AS folii PCL-A2 kuliste kryształy fosforanu wapnia (CaP) pojawiły się dopiero po 12 miesiącach, natomiast w kompozytach PCL-A2/PPh już wcześniej uformowała się słabo rozwinięta morfologia igiełkowata. W foliach PLGA-A2 zaobserwowano przejście od morfologii o słabej krystaliczności do morfologii igiełkowatej, natomiast w kompozytach PLGA-A2/PPh kryształy przekształcały się z form igiełkowatych w dobrze rozwinięte formy płytkowe. Po zakończeniu inkubacji obie powierzchnie wszystkich folii wykazywały obecność sodu (Na) i chloru (Cl), z widocznymi pojedynczymi wytrąceniami NaCl.

5.2.2. ZMIANA MASY

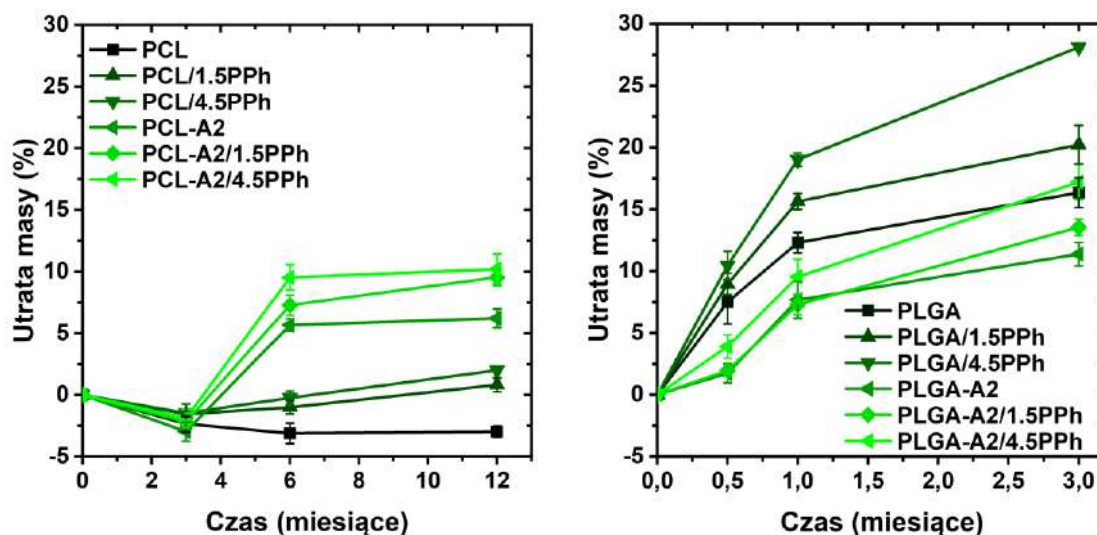


Fig. 35. Utrata masy materiałów podczas inkubacji w PBS.

W celu oceny wpływu zawartości związków polifenolowych (PPh) na szybkość degradacji materiałów polimerowych i kompozytowych, przeprowadzono analizę ubytku masy próbek inkubowanych w roztworze PBS. Wyniki przedstawiono na rysunku (Fig. 35), uwzględniając

procentowy ubytek masy dla materiałów na bazie poli(ϵ -kaprolaktonu) (PCL) oraz kopolimeru laktydu i glikolidu (PLGA).

Folia PCL wykazywała systematyczny, niewielki wzrost masy przez cały okres inkubacji. W przypadku folii PCL zmodyfikowanych polifenolami, masa wzrastała jedynie w pierwszych sześciu miesiącach inkubacji, a po dwunastu miesiącach zaobserwowano niewielki ubytek masy. Co istotne, zwiększone stężenie związków polifenolowych w foliach polimerowych prowadziło do szybszej redukcji masy, co sugeruje, że obecność polifenoli przyspiesza degradację materiału.

Zrozumienie tego zagadnienia może wymagać uwzględnienia różnych współdziałających mechanizmów. W poprzednich rozdziałach przedstawiono i szczegółowo omówiono wyniki badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy, które wykazały poprawę zwilżalności zarówno materiałów polimerowych, jak i kompozytowych po wprowadzeniu związków polifenolowych. W literaturze można znaleźć liczne doniesienia wskazujące, że obecność hydrofilowych substancji aktywnych w materiale sprzyja intensywniejszemu wnikaniu wody do jego wnętrza. Te same opracowania sugerują również, że związki o charakterze kwasowym mogą katalizować rozpad wiązań estrowych – identycznych z tymi, które występują w głównym łańcuchu polimerowym PCL – co pozwala przypuszczać, że analogiczny mechanizm może zachodzić także w przypadku analizowanych materiałów. Zjawisko to związane jest z obecnością pierścienia aromatycznego oraz atomu wodoru w grupie hydroksylowej cząsteczki fenolowej, co nadaje związkom polifenolowym właściwości słabych kwasów.

Innym możliwym czynnikiem wyjaśniającym przyspieszoną degradację folii polimerowych zawierających polifenole jest ich zachowanie jako naturalnych plastyfikatorów, co zostało zaobserwowane w ramach niniejszych badań. Wprowadzenie polifenoli do osnowy polimerowej może prowadzić do osłabienia oddziaływań międzyłańcuchowych, zwiększając mobilność łańcuchów polimerowych i ułatwiając ich wzajemne przemieszczanie się. Taki efekt sprzyja wnikaniu wody do materiału i może przyspieszać jego degradację. Dodatkowo, analiza morfologii powierzchni próbek przeprowadzona metodą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM), zaprezentowana w rozdziale 4.1, wykazała wzrost porowatości materiałów wraz ze zwiększaniem udziału związków polifenolowych. Obecność porów może również sprzyjać wnikaniu wody do wnętrza próbki, co może dodatkowo intensyfikować proces degradacji.

Kompozyty PCL-A2 wykazywały wzrost masy w ciągu pierwszych trzech miesięcy inkubacji, po czym nastąpiła redukcja masy, szczególnie intensywna w okresie od trzeciego do szóstego miesiąca. Spadek masy w przypadku tych materiałów był znacznie większy niż w przypadku folii polimerowych, co wskazuje na znaczący wpływ dodatku cząstek bioaktywnego szkła na przyspieszenie procesu degradacji. Ponadto, stężenie związków polifenolowych w kompozytach PCL-A2 miało bezpośredni wpływ na intensyfikację ubytku masy.

Mechanizm tego zjawiska można wiązać z przerwaniem ciągłości osnowy polimerowej przez hydrofilową fazę nieorganiczną, co prowadzi do powstawania mikroszczelin i obszarów o zwiększonej dostępności dla wody. Zwiększona hydrofilowość kompozytu oraz lokalne zmiany pH wywołane rozpuszczaniem się cząstek szkła mogą sprzyjać katalizie zasadowej wiązań estrowych. Choć roztwór buforowy utrzymuje stabilne pH, lokalnie – w bezpośrednim otoczeniu cząstek szkła – może dochodzić do alkalizacji środowiska inkubacyjnego, co może dodatkowo intensyfikować proces degradacji.

Materiały polimerowe na bazie PLGA wykazywały znacznie większy ubytek masy w porównaniu do folii na bazie poli(ϵ -kapolakton). Folie PLGA wzbogacone w polifenole charakteryzowały się znacznie wyższą utratą masy w porównaniu do materiałów niemodyfikowanych. Wyższe stężenie polifenoli w foliach PLGA prowadziło do większej redukcji masy, co sugeruje, że polifenole przyspieszają proces degradacji tych materiałów.

PLGA, ze względu na swoją strukturę amorficzną i obecność hydrofilowych jednostek glikolidu, degradowe znacznie szybciej niż PCL, generując produkty o charakterze kwaśnym, które sprzyjają lokalnej autokatalizie. Związki polifenolowe – poprzez mechanizmy wspomniane wcześniej – dodatkowo intensyfikują proces degradacji.

Interesujące wyniki uzyskano w przypadku kompozytów PLGA-A2, w których obecność BG prowadziła do obniżenia tempa degradacji. Redukcja ubytku masy może być związana z neutralizacją kwaśnych produktów rozkładu przez jony wapniowe uwalniane z BG oraz formowaniem się na powierzchni próbek warstwy fosforanu wapnia (CaP). Obecność tej warstwy może ograniczać dyfuzję wody i działać jako fizyczna bariera spowalniająca degradację. Co więcej, grubsza i bardziej jednorodna warstwa CaP była obserwowana na powierzchni próbek zawierających PPh, co wskazuje na potencjalną rolę grup hydroksylowych jako miejsc nukleacji fosforanu wapnia. Choć PPh intensyfikują degradację PLGA poprzez zwiększenie hydrofilowości i katalizę kwasową, obecność BG może częściowo kompensować te efekty, spowalniając przebieg procesów degradacyjnych.

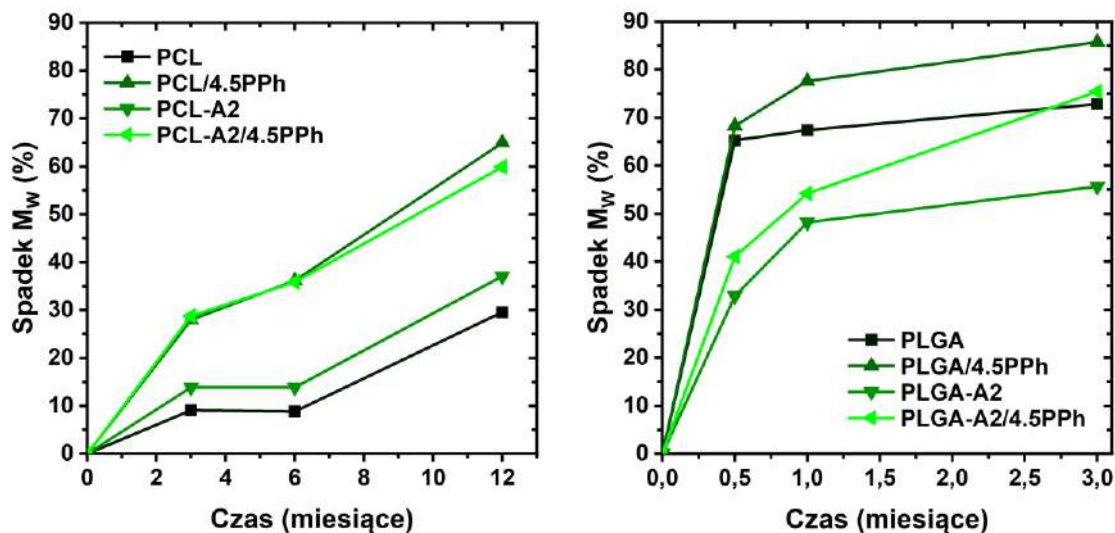


Fig. 36. Spadek wagowo średniej masy cząsteczkowej M_w materiałów podczas inkubacji.

Wpływ związków polifenolowych oraz cząstek bioaktywnego szkła na proces degradacji materiałów znajduje potwierdzenie również w zmianach wagowo średniej masy cząsteczkowej (M_w) folii podczas inkubacji. Zaobserwowano, że masa cząsteczkowa wszystkich badanych materiałów systematycznie malała w trakcie trwania eksperymentu. Jednakże folie na bazie PLGA wykazywały znacznie większy spadek M_w w porównaniu do folii na bazie PCL.

W grupie materiałów opartych na PCL największy wpływ na redukcję M_w miała obecność związków polifenolowych. Zarówno folie PCL/4.5PPh, jak i PCL-A2/4.5PPh wykazywały podobny profil zmian M_w , obejmujący znacznie większy spadek w porównaniu do folii niewzbogaconych (PCL i PCL-A2). Wprowadzenie cząstek BG do folii bez dodatku PPh skutkowało nieco większym spadkiem M_w we wszystkich analizowanych punktach czasowych. W przypadku filmów PCL zaobserwowano trzy etapy degradacji:

1. **Faza początkowa (0-3 miesiąc):** gwałtowny i szybki spadek M_w , szczególnie wyraźny w materiałach zawierających PPh,
2. **Faza przejściowa (3-6 miesiąc):** wolniejszy spadek M_w w przypadku folii zawierających PPh lub stabilny, umiarkowany spadek w materiałach bez PPh,
3. **Faza późna (po 6 miesiącu):** ponowne przyspieszenie degradacji, widoczne we wszystkich próbkach, lecz najbardziej intensywny w obecności związków fenolowych.

W materiałach na bazie PLGA, spadek M_w był znacznie bardziej intensywny niż w przypadku PCL, co potwierdza ich wyższą podatność na degradację w wyniku hydrolizy wiązań estrowych. Tutaj dominujący wpływ miała zarówno obecność PPh, jak i cząstek BG, przy czym folie polimerowe (PLGA i PLGA/4.5PPh) ulegały szybszej degradacji niż ich kompozytowe odpowiedniki (PLGA-A2 i PLGA-A2/4.5PPh). Mimo że cząstki bioaktywnego szkła również odgrywały istotną rolę w spowolnieniu procesu degradacji, to wpływ związków polifenolowych powodował wzrost redukcji średniej masy cząsteczkowej materiałów. Dla grupy PLGA wyróżniono dwa główne etapy degradacji:

1. **Faza początkowa (do 2 tygodnia):** gwałtowny i szybki spadek M_w , szczególnie intensywny w materiałach polimerowych z dodatkiem PPh,
2. **Faza przejściowa (1–2 miesiąc):** wolniejszy i bardziej stabilny spadek M_w , obserwowany w całej grupie materiałów na bazie PLGA, niezależnie od obecności BG lub PPh.

Zaobserwowane zmiany masy cząsteczkowej są zgodne z wynikami przedstawionymi w poprzednim rozdziale i potwierdzają wcześniejsze obserwacje dotyczące właściwości fizykochemicznych badanych materiałów. Mechanizmy prowadzące do degradacji w obecności związków polifenolowych oraz ceramicznej fazy modyfikującej mogą obejmować polepszoną zwilżalność powierzchni, hydrolityczną katalizę wiązań estrowych inicjowaną związkami polifenolowymi, działanie plastyfikujące tych związków, a także wzrost porowatości oraz lokalne zmiany pH wywołane obecnością cząstek bioaktywnego szkła. Te synergiczne efekty przyspieszają proces degradacji hydrolitycznej.

5.2.3. ZMIANA KRYSZALICZNOŚCI I ENTALPII TOPNIENIA

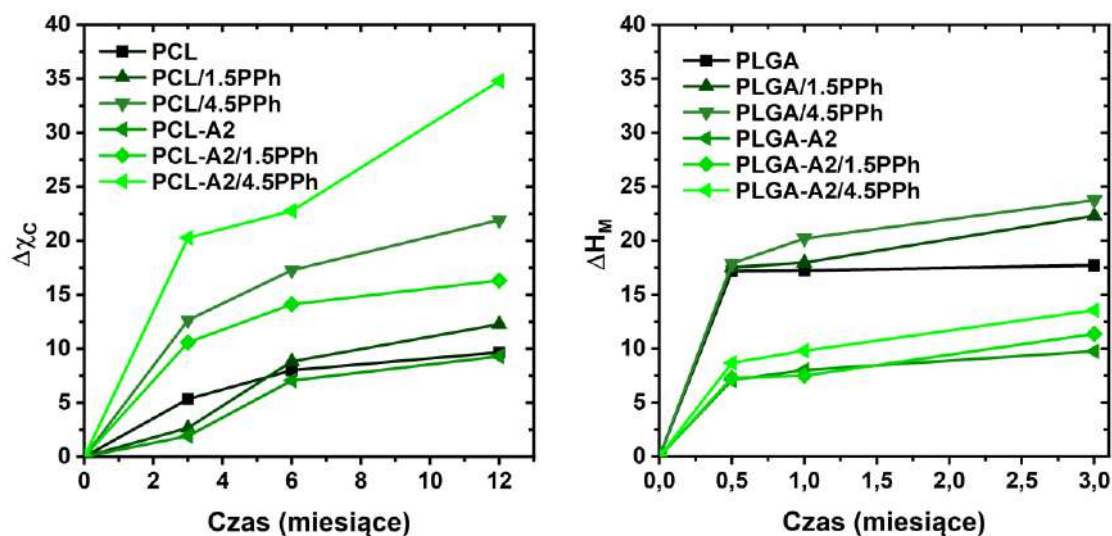


Fig. 37 Zmiany krystaliczności ($\Delta\chi_c$) i entalpii topnienia (ΔH_m) materiałów w trakcie inkubacji.

Analiza zmian krystaliczności (χ_c) i entalpii topnienia (H_m) wykazała istotny wpływ obecności związków polifenolowych na właściwości termiczne folii polimerowych na bazie PCL i PLGA podczas inkubacji w roztworze PBS. Folie polimerowe i kompozytowe oparte na PCL pozbawione dodatku PPh, charakteryzowały się zbliżonym przebiegiem zmian krystaliczności w czasie. Wprowadzenie najniższego stężenia związków polifenolowych (PCL/1.5PPh) nie wywołało zauważalnych różnic w stosunku do folii polimerowych nie wzbogaconych ekstraktem. Natomiast przy najwyższym stężeniu PPh w osnowie PCL zaobserwowano wyraźny wzrost krystaliczności, szczególnie w początkowym okresie inkubacji.

W przypadku kompozytów PCL-A2 tendencja była jeszcze bardziej wyraźna – im większe stężenie związków polifenoli w materiale, tym silniejszy wzrost krystaliczności. Warto podkreślić, że wszystkie folie zawierające związki polifenolowe (z wyjątkiem PCL/1.5PPh) wykazywały gwałtowną zmianę krystaliczności już w ciągu pierwszych trzech miesięcy, po czym tempo wzrostu wyraźnie spadało.

W przypadku folii na bazie PLGA, zarówno obecność związków polifenolowych, jak i dodatek cząstek bioaktywnego szkła wywierały istotny wpływ na zmiany entalpii topnienia podczas inkubacji. Materiały polimerowe (PLGA i PLGA/4.5PPh) wykazywały znacznie większy wzrost entalpii topnienia w porównaniu do ich kompozytowych odpowiedników (PLGA-A2/4.5PPh). Najbardziej intensywne zmiany entalpii topnienia w próbkach PLGA obserwowano w ciągu pierwszych dwóch tygodni inkubacji. Zwiększająca się zawartość

związków polifenolowych prowadziła do przyspieszenia zmian entalpii topnienia, przy czym efekt ten był wyraźniejszy w foliach polimerowych niż w materiałach kompozytowych.

Choć wzrost krystaliczności i entalpii topnienia teoretycznie powinien ograniczać podatność materiałów na degradację, w analizowanych próbkach nie zaobserwowano takiego efektu, co sugeruje, że dominujący wpływ na przebieg procesów degradacyjnych mogły mieć inne mechanizmy omówione we wcześniejszych częściach pracy.

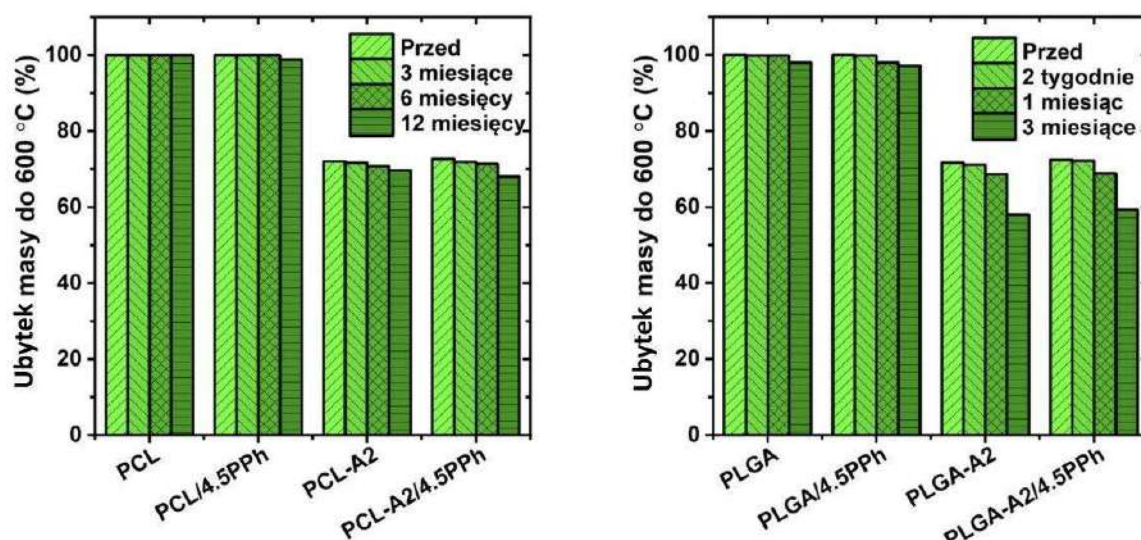


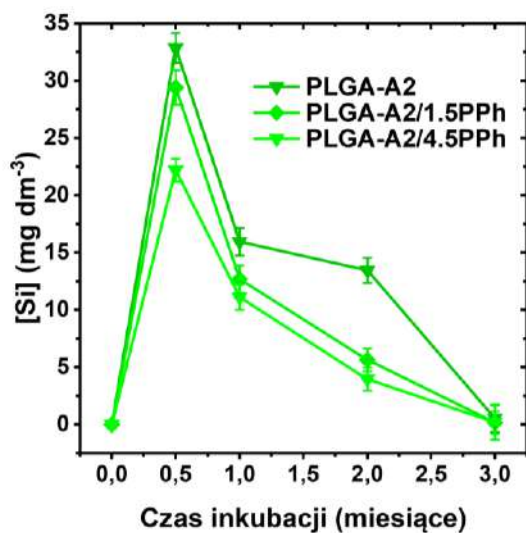
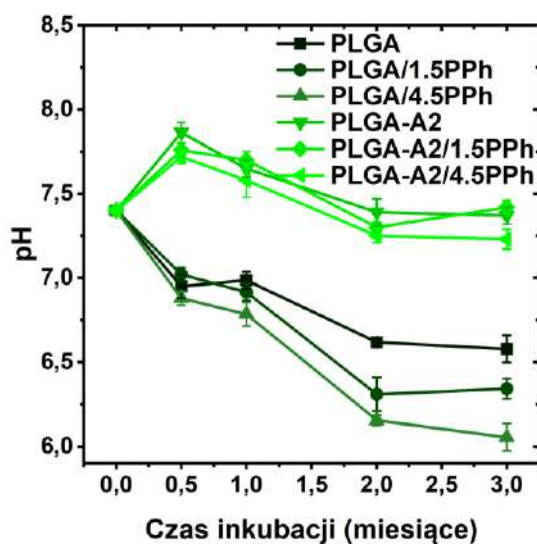
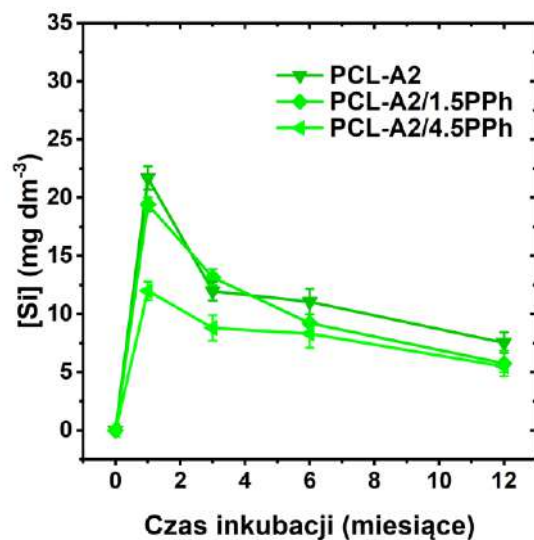
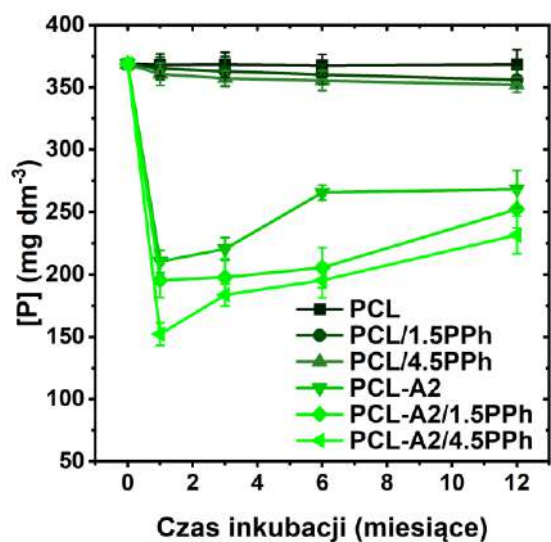
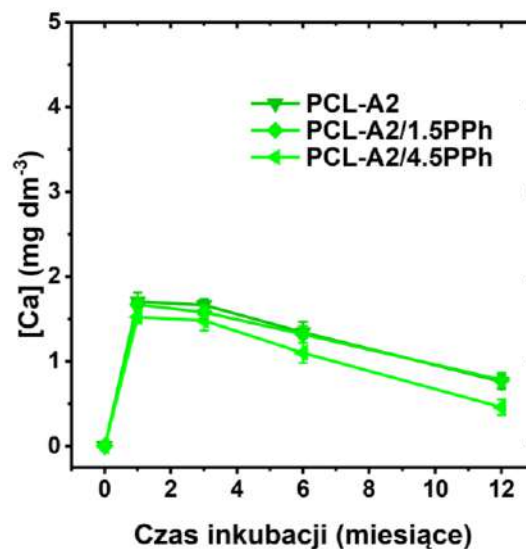
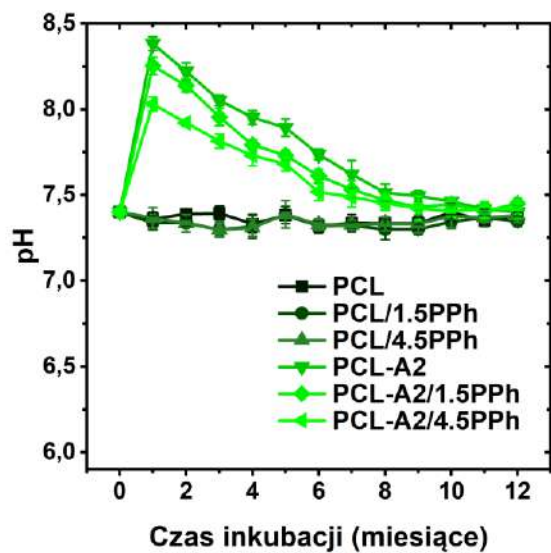
Fig. 38. Ubytek masy folii polimerowych do 600°C w zależności od czasu inkubacji.

Badanie termograwimetryczne (TGA) przeprowadzono w celu oceny zmian masy folii polimerowych na bazie PCL i PLGA przed oraz po ekspozycji na PBS. Analiza prowadzona do temperatury 600 °C wykazała, że przed inkubacją wszystkie próbki – niezależnie od składu – ulegały niemal całkowitemu rozkładowi termicznemu.

Po inkubacji zaobserwowano wyraźny spadek stopnia ubytku masy. Efekt ten był szczególnie widoczny w próbkach PLGA/4.5PPh, gdzie stopniowo zmniejszający się ubytek masy – osiągający około 97% po dwóch miesiącach – może świadczyć o wytrącaniu się NaCl na powierzchni materiału.

W przypadku kompozytów zawierających bioaktywne szkło (PCL-A2 i PLGA-A2), utrata masy przed inkubacją wynosiła około 70%, co odpowiada teoretycznej zawartości fazy nieorganicznej (30% wag.). Mniejsze wartości ubytku masy w przypadku kompozytów mogą sugerować tworzenie się fazy mineralnej na powierzchni materiałów, co jest zgodne z wcześniejszymi wynikami krótkoterminowej inkubacji w SBF, omówionymi w poprzednich rozdziałach.

5.2.4. ZMIANA PH ORAZ SKŁADU PŁYNU INKUBACYJNEGO



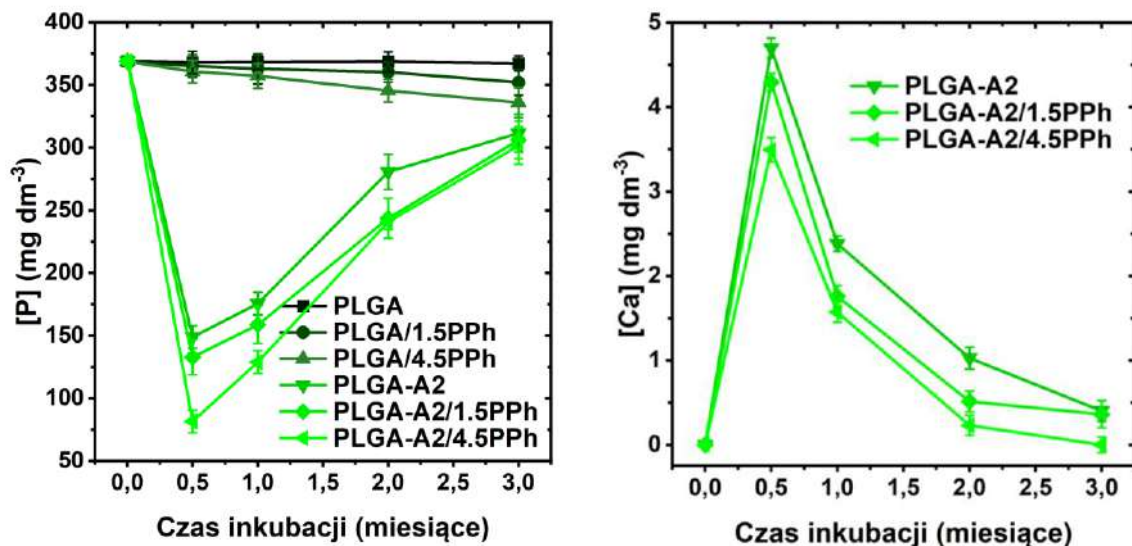


Fig. 39. Zmiana pH oraz stężenia jonów wapniowych, fosforanowych i krzemianowych w płynie inkubacyjnym.

Zmiany pH roztworu PBS w trakcie inkubacji folii przedstawiono na Fig. 39. Dla materiałów polimerowych opartych na PCL wartości pH pozostawały stabilne i przez cały okres inkubacji utrzymywały się w okolicach poziomu fizjologicznego (ok. 7,4). Odmienne charakter zmiany zaobserwowano w kompozytach zawierających bioaktywne szkło (PCL-A2), gdzie już w pierwszym miesiącu inkubacji nastąpił wyraźny wzrost pH. W przypadku materiałów zawierających wyższe stężenia związków polifenolowych początkowe wartości pH były niższe, a następnie stopniowo rosły, osiągając wartość około 7,4 po dziesięciu miesiącach. [130], [131].

Folie polimerowe na bazie PLGA charakteryzowały się stopniowym spadkiem pH roztworu w trakcie inkubacji, przy czym największe obniżenie odnotowano do drugiego miesiąca. Efekt zakwaszenia był szczególnie wyraźny w próbkach zawierających wyższe stężenia związków polifenolowych, co może mieć istotny wpływ na intensyfikację procesu degradacji tych materiałów. W kompozytach PLGA-A2 początkowo zaobserwowano niewielki wzrost pH w ciągu pierwszych dwóch tygodni inkubacji, jednak zmiana ta była mniej intensywna niż w przypadku kompozytów PCL-A2. W kolejnych tygodniach następował stopniowy spadek pH, który ustabilizował się na poziomie fizjologicznym około drugiego miesiąca.

Wyniki analizy zmian stężeń jonów fosforanowych (P), wapniowych (Ca) i krzemianowych (Si) w roztworze buforowym PBS w trakcie okresu inkubacji zilustrowano na Fig. 39. Początkowa faza inkubacji charakteryzowała się znaczącym spadkiem stężenia jonów fosforanowych w płynach inkubacyjnych wszystkich badanych folii kompozytowych, co może

wskazywać na intensywne tworzenie się warstwy fosforanowo-wapniowej (CaP) na ich powierzchni. Równoległe do obniżenia stężenia fosforanu, obserwowano również spadki stężeń jonów wapniowych i krzemianowych, szczególnie w pierwszym etapie inkubacji. Takie zmiany mogą świadczyć o równoczesnym uwalnianiu jonów wapniowych z bioaktywnego szkła i ich zużyciu podczas formowania się fazy CaP – proces ten, z jednej strony, wyczerpuje jony z roztworu, a z drugiej ogranicza dalsze uwalnianie wapnia i krzemu z materiału. Największą redukcję stężenia jonów fosforanowych i krzemianowych odnotowano w przypadku folii kompozytowych PLGA-A2, gdzie końcowe stężenia były bliskie zeru, co wyraźnie odróżnia je od kompozytów na bazie PCL, w których wartości te były wyższe. Zauważono, że wyższe stężenie ekstraktu w materiale wiązało się z większym spadkiem stężenia fosforanów w roztworze – efekt ten był szczególnie widoczny w materiałach na bazie PLGA.

Szczególne znaczenie mają wyniki dotyczące folii PCL/PPh i PLGA/PPh, które choć nie zawierały bioaktywnej fazy modyfikującej, wykazywały zdolność do stopniowego obniżania stężenia jonów fosforanowych, wapniowych i krzemianowych w roztworze. Może to wynikać z obecności grup hydroksylowych obecnych w PPh, które mogą pełnić rolę miejsc nukleacji dla warstwy CaP. Interakcje między tymi grupami a jonami wapniowymi z roztworu mogły sprzyjać krystalizacji fazy mineralnej na powierzchni materiału. Zjawisko to mogło być dodatkowo wspierane przez poprawioną zwilżalność i zwiększoną energię powierzchniową tych folii, szczególnie jej składową polarną, co zostało szerzej zbadane i przeanalizowane w poprzednich rozdziałach. Jednocześnie, mimo że PPh mógł przyspieszać inicjację tworzenia się warstwy CaP, nie zaobserwowano, by miało to istotny wpływ na tempo degradacji samych materiałów.

5.2.5. SPEKTROSKOPOWA ANALIZA ZMIAN POWIERZCHNI

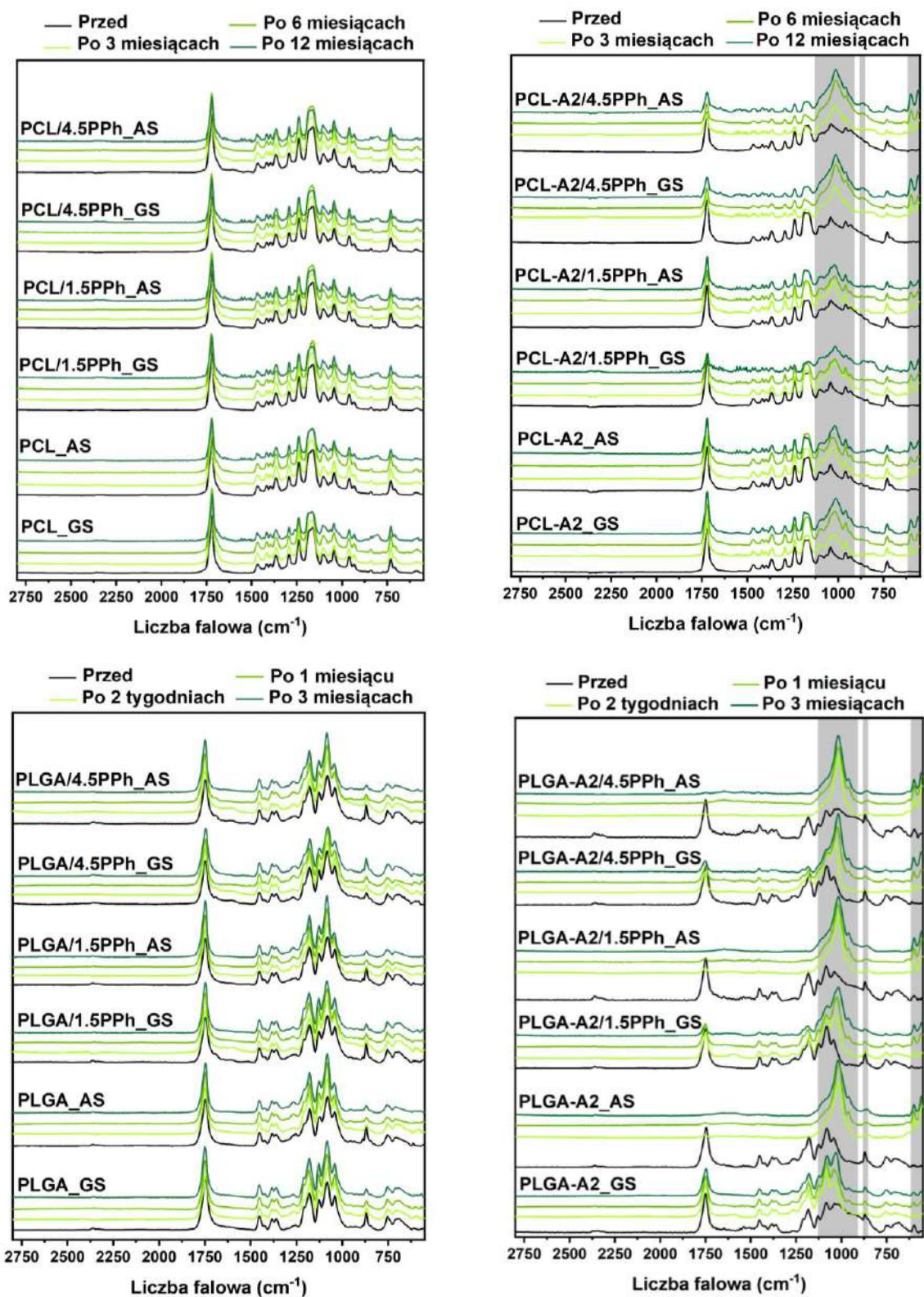


Fig. 40. Widma ATR-FTIR AS i GS folii polimerowych oraz kompozytowych na bazie PCL/PCL-A2 i PLGA/PLGA-A2 przed i po inkubacji w PBS.

Techniką spektroskopii ATR-FTIR przeprowadzono szczegółową analizę strukturalną powierzchni materiałów (Fig. 40), dzięki czemu prześledzono zmiany zachodzące na niej w trakcie inkubacji. Folie polimerowe na bazie poli(ϵ -kapolaktonie) (PCL) oraz poli(laktydo-glikolidu) (PLGA) nie wykazały żadnych znaczących zmian w widmach FTIR podczas okresu inkubacji.

Analiza widm wszystkich badanych materiałów kompozytowych wykazała pojawienie się nowych pasm w zakresach $560\text{--}602\text{ cm}^{-1}$ oraz $910\text{--}1180\text{ cm}^{-1}$. Pasma te są przypisane odpowiednio drganiom zginającym wiązań O-P-O oraz drganiom rozciągającym wiązań PO, co jest charakterystyczne dla fosforanów wapnia. Dodatkowo, zidentyfikowano słabe pasmo przy 870 cm^{-1} , które można przypisać drganiom rozciągającym wiązań P-OH w jonach HPO_4^{2-} oraz trybom zginania poza płaszczyznę w jonach CO_3^{2-} . Obecność tych pasm sugeruje krystalizację nanokrystalicznego, niestechiometrycznego apatytu, co potwierdza literatura [132], [133].

Podczas inkubacji, zaobserwowano stopniowy wzrost intensywności pasm charakterystycznych dla apatytu oraz spadek intensywności pasm przypisanych polimerom PCL lub PLGA. Zjawisko to wskazuje na postępujący proces formowania warstwy CaP na powierzchni folii. Warto podkreślić, że zmiany te były znacznie bardziej dynamiczne w przypadku kompozytów opartych na PLGA-A2 w porównaniu z foliami PCL-A2. Ponadto, zaobserwowano, że we wszystkich badanych materiałach kompozytowych wzrost stężenia związków polifenolowych prowadził do przyspieszenia procesu krystalizacji CaP.

Szczególnie znaczące zmiany zaobserwowano na górnej powierzchni materiałów (AS), co potwierdza obserwacje inkubacji krótkoterminowej materiałów w SBF opisane szerzej w rozdziale 4.1.

Podsumowując, wzrost intensywności pasm charakterystycznych dla apatytu oraz zmniejszenie intensywności pasm związanych z polimerami PCL lub PLGA jednoznacznie wskazywały na postęp w procesie krystalizacji CaP. Szczególnie dynamiczne zmiany zaobserwowano w kompozytach PLGA-A2 oraz na górnej powierzchni materiałów (AS). Dodatkowo, znaczący wpływ na szybkość formowania warstwy apatytowej miała obecność polifenoli. Wzrost stężenia PPh prowadził do przyspieszenia procesu krystalizacji CaP, co potwierdzają obserwacje inkubacji krótkoterminowej.

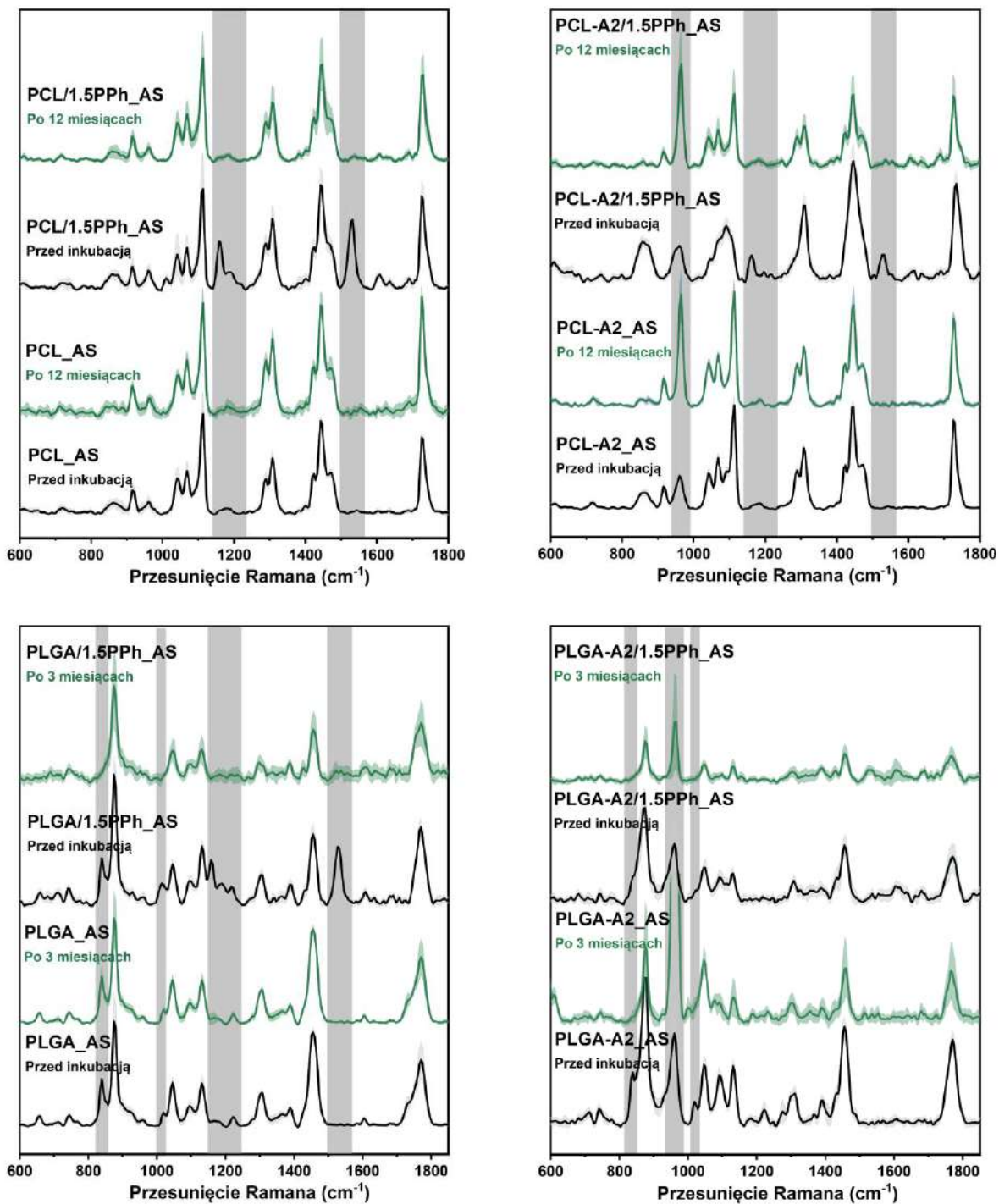


Fig. 41. Uśrednione widma Ramana z odchyleniem standardowym powierzchni AS folii przed i po inkubacji w PBS.

Tworzenie się warstwy fosforanu wapnia (CaP) na powierzchni AS kompozytów na bazie PCL i PLGA zostało potwierdzone na podstawie analizy Ramana (Fig. 41.). Po inkubacji próbek w roztworze PBS w widmach uzyskanych dla tych materiałów widoczne było wyraźne pasmo przy liczbie falowej 964 cm^{-1} , przypisywane drganiom rozciągającym wiązania P-O w apatytowej warstwie.

Obecność związków polifenolowych w foliach polimerowych potwierdzały pasma przy liczbie falowej 1530 cm^{-1} oraz w zakresie $1160\text{--}1220\text{ cm}^{-1}$, które jednak zanikły po inkubacji, co wskazuje na uwolnienie PPh z powierzchni materiału [134], [135].

Dodatkowo, po trzymiesięcznej inkubacji folii na bazie PLGA w PBS, zaobserwowano zanik pasm odpowiadających jednostkom glikolowym (840 cm^{-1} i 1020 cm^{-1}) w widmach materiałów wzbogaconych w związki polifenolowe. Może stanowić to dodatkowe potwierdzenie roli PPh w intensyfikacji degradacji tych materiałów [136].

5.2.6. WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNE

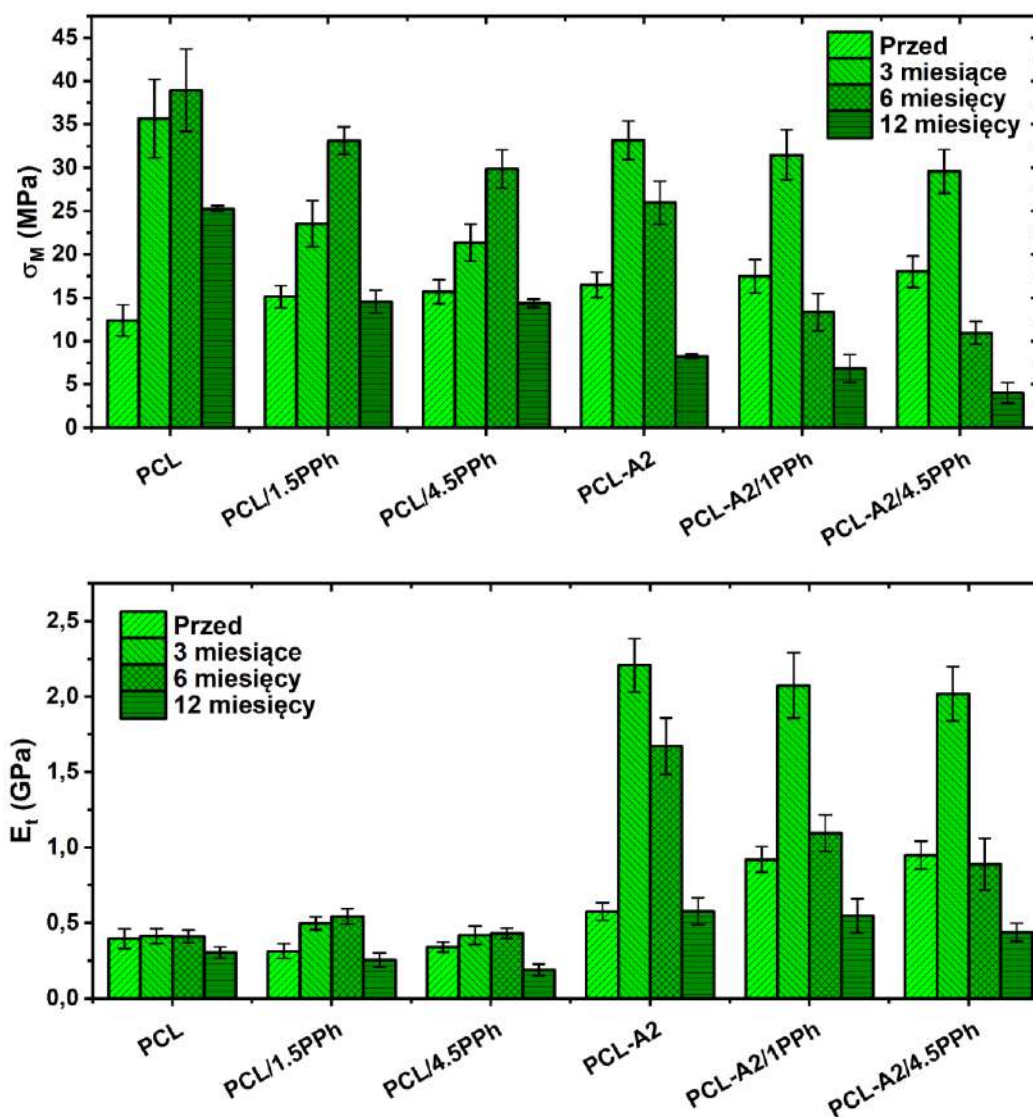


Fig. 42. Zmiany modułu Younga i wytrzymałości na rozciąganie folii na bazie PCL podczas inkubacji w PBS.

Materiały na bazie PCL jako jedyne zachowały wystarczającą integralność przez cały okres inkubacji, co umożliwiło przeprowadzenie badań mechanicznych. W przeciwieństwie do

nich, folie na bazie PLGA stawały się kruche i podatne na uszkodzenia mechaniczne, co uniemożliwiło ich dalsze badania w tym zakresie.

Zmiany modułu Younga oraz wytrzymałości na rozciąganie folii na bazie PCL podczas inkubacji w PBS zaprezentowano na Fig. 42. W analizowanych foliach polimerowych z dodatkiem ekstraktu i bez niego zaobserwowano zbliżony przebieg zmian obu parametrów. Folie PCL miały zbliżony moduł sprężystości w czasie inkubacji, natomiast w przypadku PCL/PPh odnotowano niewielki wzrost modułu Younga do około szóstego miesiąca. Zaobserwowane zwiększenie wartości modułu Younga może być związane ze wzrostem krystaliczności materiału. Po dłuższym czasie inkubacji, szczególnie po dwunastu miesiącach, zarówno w foliach PCL, jak i PCL/PPh, wartości modułu Younga zaczęły spadać, co może świadczyć o postępującej degradacji materiałów.

Kompozyty PCL-A2 wykazywały istotny wzrost sztywności już po trzech miesiącach inkubacji, który następnie systematycznie malał. Wzrost ten można wiązać z tworzeniem się na ich powierzchni warstwy fosforanowo-wapniowej (CaP), która mogła tymczasowo poprawiać właściwości mechaniczne materiału.

W zakresie wytrzymałości na rozciąganie (σ_M) obserwowano wzrost wartości do szóstego miesiąca w przypadku folii polimerowych oraz do trzeciego miesiąca w kompozytach, po czym następował systematyczny spadek wartości tego parametru. W kompozytach obniżenie parametrów mechanicznych następowało szybciej – już po sześciu miesiącach, podczas gdy w materiałach polimerowych zmiany te stawały się większe dopiero po roku inkubacji. Wraz z wydłużeniem czasu inkubacji obserwowany był większy spadek wartości wytrzymałości na rozciąganie, zwłaszcza w próbkach z wyższym stężeniem PPh. Zależność ta była zauważalna zarówno dla folii polimerowych, jak i kompozytowych, co może sugerować, że obecność zarówno cząstek bioaktywnego szkła, jak i związków polifenolowych przyspieszała proces degradacji materiałów PCL.

PODSUMOWANIE

Uzyskane wyniki wskazują, że modyfikacja polimerów biodegradowalnych – poli(ϵ -kapolaktonu) (PCL) oraz kopolimeru laktydu i glikolidu (PLGA) – poprzez wprowadzenie cząstek bioaktywnego szkła oraz związków polifenolowych, wpływa istotnie na przebieg ich degradacji w warunkach długoterminowej inkubacji.

Obecność cząstek bioaktywnego szkła wpłynęła na przyspieszenie degradacji materiałów kompozytowych o osnowie PCL, natomiast w kompozytach o osnowie PLGA obserwowano

efekt odwrotny – spowolnienie procesów degradacyjnych. Zredukowany proces degradacji kompozytów o osnowie PLGA przypisuje się formowaniu warstwy fosforanowo-wapniowej na powierzchni materiału oraz uwalnianiu jonów zasadowych, co mogło ograniczać autokatalityczne działanie grup karboksylowych PLGA.

Z kolei związki polifenolowe, niezależnie od rodzaju zastosowanej osnowy, przyczyniały się do intensyfikacji procesu degradacji. Mechanizm ten prawdopodobnie wynikał z jednoczesnego działania kilku czynników, takich jak zwiększona zwilżalność materiału, wzrost porowatości, efekt plastyfikujący związków polifenolowych oraz udział reakcji katalizowanych kwasowo. Warto podkreślić, że w kompozytach o osnowie PLGA zawierających zarówno bioaktywne szkło, jak i związki polifenolowe, dominujący wpływ na tempo degradacji przypisano obecności fazy nieorganicznej.

5.3. WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE

Biomateriały dedykowane do zastosowań w inżynierii tkankowej powinny charakteryzować się nie tylko odpowiednimi właściwościami fizykochemicznymi, ale przede wszystkim aktywnością biologiczną, ukierunkowaną na wspomaganie i przyspieszenie procesów regeneracyjnych. Rosnące oczekiwania wobec materiałów do regeneracji tkanki kostnej wynikają z konieczności skutecznego leczenia ubytków powstałych na skutek urazów, resekcji nowotworów, a także w przypadkach, kiedy gojenie jest utrudnione przez obecność stanu zapalnego lub infekcję.

Do kluczowych właściwości biologicznych pożądaných w kontekście regeneracji tkanki kostnej należą: działanie osteogenne, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne oraz – w określonych przypadkach – aktywność przeciwnowotworowa. Takie kompleksowe podejście jest szczególnie istotne w sytuacjach klinicznych, gdzie infekcja bakteryjna bądź przewlekły stan zapalny mogą znacząco obniżyć efektywność terapii oraz zwiększyć ryzyko powikłań [7].

Na szczególną uwagę zasługują właściwości przeciwnowotworowe, które zyskują znaczenie zwłaszcza w przypadku biomateriałów stosowanych do odbudowy ubytków kostnych po resekcjach onkologicznych. W takich przypadkach biomateriał powinien nie tylko wspomagać regenerację tkanki, ale także przeciwdziałać ryzyku nawrotu choroby nowotworowej [137]. Jest to szczególnie istotne w kontekście kostniakomięsaka (osteosarcoma) – złośliwego nowotworu najczęściej diagnozowanego u dzieci i młodych dorosłych, który stanowi jedno z największych wyzwań współczesnej medycyny regeneracyjnej tkanki kostnej. Pomimo stosowania intensywnej chemioterapii oraz chirurgicznego usunięcia zmiany, rokowania długoterminowe są nadal niekorzystne ze względu na wysoką częstość nawrotów i przerzutów, głównie do płuc. Co więcej, komórki kostniakomięsaka wykazują wysoką oporność na leki cytostatyczne, a ich leczenie wiąże się z poważnymi działaniami niepożądanymi, wynikającymi z braku selektywności konwencjonalnych chemioterapeutyków [138], [139]. W świetle tych ograniczeń rośnie zapotrzebowanie na nowoczesne, wielofunkcyjne materiały implantacyjne, które nie tylko stymulują odbudowę tkanki kostnej, lecz również wykazują miejscowe, selektywne działanie przeciwnowotworowe przy minimalnym wpływie na zdrowe komórki [137].

Literatura wskazuje, że ekstrakt z szałwii lekarskiej (*Salvia officinalis* L.), którym wzbogacone zostały materiały badane w niniejszej pracy, stanowi cenne źródło naturalnych polifenoli

o udokumentowanym działaniu przeciwzapalnym, przeciwutleniającym, antybakteryjnym, a także przeciwnowotworowym [48], [55], [81].

W szczególności wykazano wysoką aktywność biologiczną takich związków jak kwas rozmarynowy, karnozol oraz kwas karnozynowy wobec licznych linii komórek nowotworowych, w tym także komórek kostniakomięsa. Jak donoszą liczne badania, polifenole te mogą hamować proliferację i migrację komórek nowotworowych, indukować apoptozę oraz zwiększać wrażliwość komórek nowotworowych na klasyczne leki cytostatyczne, przeciwdziałając w ten sposób mechanizmom oporności. Ich kluczową zaletą jest wysoka selektywność działania – polifenole wykazują minimalną toksyczność wobec zdrowych komórek, co czyni je obiecującą alternatywą lub uzupełnieniem dla konwencjonalnej chemioterapii, znanej z niskiej specyficzności i licznych działań niepożądanych [140].

W niniejszym rozdziale przedstawiono wyniki badań biologicznych, mających na celu ocenę następujących właściwości materiałów:

- **Właściwości osteogenne** badano przy użyciu prawidłowych ludzkich osteoblastów NHOst. Oceniano ekspresję kluczowych markerów różnicowania osteoblastów, takich jak fosfataza zasadowa (ALP), osteokalcyna (OC) oraz osteopontyna (OP), które odpowiadają za inicjację i przebieg mineralizacji macierzy pozakomórkowej [109].
- **Właściwości przeciwzapalne** analizowano przy użyciu makrofagów mysich linii RAW 264.7, na podstawie poziomu wewnątrzkomórkowej produkcji reaktywnych form tlenu (ROS), stanowiącego wskaźnik odpowiedzi zapalnej i stresu oksydacyjnego.
- **Właściwości przeciwbakteryjne i antybiofilmowe** określono na podstawie liczby komórek bakterii Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus*) i Gram-ujemnych (*Pseudomonas aeruginosa*) przylegających do powierzchni materiałów.
- **Właściwości przeciwnowotworowe** oceniono z wykorzystaniem komórek ludzkiego kostniakomięsa (Saos-2). Analizie poddano wskaźniki stresu oksydacyjnego, zatrzymania cyklu komórkowego oraz aktywacji szlaków apoptycznych, takie jak produkcja ROS, ekspresja GADD45G, fosforylacja CDK2 oraz aktywność kaspaz-3/7. Równocześnie badania prowadzono dla prawidłowych osteoblastów ludzkich (NHOst).

Do badań wykorzystano dwie grupy materiałów. Właściwości osteogenne, przeciwzapalne i antybakteryjne analizowano dla materiałów na osnowie z PCL, modyfikowanych bioaktywnym szkłem A2 otrzymanym metodą zol-żel. Z kolei aktywność przeciwnowotworowa została oceniona dla materiałów na bazie PCL, w których fazą modyfikującą były cząstki bioaktywnego szkła wytworzonego trzema różnymi metodami: topienia, techniką zol-żel oraz zol-żel-EISA.

5.3.1. PRZYGOTOWANIE MATERIAŁÓW I TECHNIKI BADAŃ

BADANIA WŁAŚCIWOŚCI ANTYBAKTERYJNYCH

W celu zbadania wpływu badanych materiałów na rozwój kolonii bakterii wykorzystano szczepy gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*, DSM 24167, DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Braunschweig, Niemcy) i pałeczki ropy błękitnej (*Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 27853, American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA). Posiewy inkubowano przez 18 godzin w 37°C w pożywce BD Tryptic Soy Broth (TSB, Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, Niemcy). Zawiesinę komórek bakteryjnych przygotowano i oczyszczono z resztek pożywki poprzez zebranie kolonii, odwirowanie (13,4 obr./min. przez 5 min.), trzykrotne przemycie sterylnym roztworem soli fizjologicznej (0,9% NaCl) i rozcieńczenie do stężenia 10^6 jednostek tworzących kolonię (jtk, ang. colony-forming unit, CFU) na mililitr roztworu. Następnie umieszczono po 1 ml zawiesiny bakteryjnej na dołek w 24-dołkowej jałowej testowej płytce hodowlanej, gdzie wprowadzono po jednej próbce na dołek. Dno dołków płytki stanowiło kontrolę. Po 4 godzinach próbki wyciągnięto i usunięto z ich powierzchni niezaadherowane bakterie poprzez trzykrotne delikatne przemycie sterylnym roztworem soli fizjologicznej. Następnie umieszczono próbki materiałów w dołkach nowej jałowej płytce tego samego rodzaju i zmyto przytwierdzone bakterie z ich powierzchni do wnętrza dołków poprzez przepłukanie jałowym roztworem 0,9% NaCl. Otrzymane zawiesiny rozcieńczano w jałowym roztworze soli fizjologicznej w stosunkach 1:10, 1:100, 1:1000 i przeniesiono po 100 μ l każdego roztworu na podłoże hodowlane. Jako pożywkę wykorzystano standardowe podłoże Mueller-Hinton Agar. Inkubację tlenową prowadzono przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Wyniki wyrażono w CFU/cm², oznaczając tym samym ilość bakterii adherentnych. W ramach każdego doświadczenia inkubacje przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości wraz z odchyleniami standardowymi (SD).

Materiały do badań komórkowych zostały przygotowane w sposób przedstawiony uprzednio (Rozdział 4). Następnie obie powierzchnie folii poddano sterylizacji światłem UV-C przez 15 min na każdej stronie. Materiały, w postaci krążków o średnicy 12 mm, zostały umieszczone w 48-dołkowych płytkach hodowlanych (Nunc™, Dania). W celu stabilizacji materiałów na dnie dołka hodowlanego zastosowano wkładki z ultraczystego szkła krzemionkowego (Continental Trade, Polska). Dołki nie zawierające próbek materiału stanowiły kontrolę. Komórki zostały wysiane na powierzchni GS materiałów.

BADANIA WŁAŚCIWOŚCI OSTEOGENNYCH

Osteogenność otrzymanych materiałów oceniono z wykorzystaniem prawidłowych osteoblastów ludzkich (Lonza, Bazylea, Szwajcaria) hodowanych w pożywce OGM BulletKit tego samego producenta. Poza 10% FBS, pożywka ta składała się z 0,1% kwasu askorbinowego, 0,1% mieszaniny antybiotyków GA-1000, (gentamycyna, amfoterycyna B.). Hodowlę prowadzono przy zagęszczeniu $1,5 \cdot 10^4$ komórek na mililitr. Każdą z próbek wzbogacono dodatkowo o czynnik wzrostu w OGM Diff. SingleQuot tego samego producenta. Analizowano stężenie fosfatazy alkalicznej (ang. alkaline phosphatase, ALP), osteokalcyny (ang. osteocalcin, OC) i osteopontyny (ang. osteopontin, OP) po 7, 14 i 28 dniach hodowli. Dla oceny aktywności ALP przeprowadzono pomiary fluorescencji wartościach (wzbudzenie 360 nm/emisja 440 nm) po 1-godzinnej inkubacji lizatu z odczynnikiem 4-MUP (Sigma-Aldrich, Burlington, Massachusetts, USA) za pomocą czytnika płytek POLARstar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Niemcy). Dla OC i OP zastosowano odpowiednio zestawy testowe Human Osteocalcin ELISA Kit and Human Osteopontin ELISA Kit (Assay Genie, Dublin, Ireland). Wszystkie wyniki zostały znormalizowane w odniesieniu do liczby komórek ocenionej przy użyciu testów z wykorzystaniem ToxiLight BioAssay Kit i ToxiLight 100% Lysis Reagent Set (Lonza, Bazylea, Szwajcaria). Wszystkie analizy przeprowadzono w 8 powtórzeniach i przedstawiono wraz z odchyleniem standardowym (SD).

BADANIA WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWZAPALNYCH

Zbadaniu przeciwzapalnych właściwości omawianych materiałów posłużyła linia komórkowa mysich makrofagów RAW 264.7 (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA). Komórki były hodowane w pożywce DMEM w zagęszczeniu $5 \cdot 10^4$ komórek na mililitr. Pomiaru wewnątrzkomórkowej zawartości reaktywnych form tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS) dokonano po 1 i 3 dniach od rozpoczęcia hodowli. W tym celu przepłukano komórki roztworem buforowanej soli fizjologicznej (ang. phosphate-buffered saline, PBS) i inkubowano w inkubatorze przez 30 min z wykorzystaniem 400 μ l 10- μ M odczynnika diocjanu 2',7'- dichlorodihydrofluorescyny (ang. 2,7-dichlorodihydrofluorescein

diacetate, DCFH-DA; Sigma-Aldrich, Burlington, Massachusetts, USA). Pomiarów fluorescencji (wzbudzenie 485 nm/emisja 520 nm) dokonano za pomocą czytnika POLARstar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Niemcy). Podobnie jak w przypadku uprzednich pomiarów, każda z grup badanych składała się z 8 próbek, dla których wyniki uśredniono i podano odchylenia standardowe (SD).

BADANIA WŁAŚCIWOŚCI ANTYNOWOTWOROWYCH

Do badań właściwości antynowotworowych wykorzystano komórki ludzkiego kostniakomięsa Saos-2 (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA). Równocześnie prowadzono badania dla prawidłowych osteoblastów ludzkich (NH0st). Hodowlę prowadzono w inkubatorze Heracell (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) w temperaturze 37°C, w wilgotnej atmosferze z dodatkiem 5% CO₂. Osteoblasty hodowano na pożywce OBM Basal Medium (Lonza, Bazylea, Szwajcaria), zawierającej 10% FBS. Komórki SaoS-2 hodowano na zmodyfikowanej pożywce McCoy's 5A (Grand Island Biological Company, GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) z dodatkiem 10% FBS. W przypadku obu rodzajów komórek na materiały wysiano po około 50 tys. komórek. Jałowe testowe płytki hodowlane z komórkami umieszczono w inkubatorze Heracell w temperaturze 37°C, w wilgotnej atmosferze z dodatkiem 5% CO₂. Testy przeprowadzono po 24 godzinach, 3 dniach i 5 dniach od rozpoczęcia hodowli.

ANALIZA STATYSTYCZNA

Do analizy wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z testem post-hoc Duncana, przeprowadzoną przy użyciu oprogramowania Statistica 13 (StatSoft, USA). Za statystycznie istotne uznawano różnice przy poziomie istotności $p < 0,05$.

5.3.2. WYNIKI BADAŃ I WNIOSKI

Wstępne analizy biologiczne, szczegółowo opisane w rozdziale 4.1, wykazały, że dodatek związków polifenolowych wpływa na aktywność metaboliczną fibroblastów oraz cytotoksyczność analizowanych materiałów. Stwierdzono, że wzrost zawartości polifenoli korelował ze zwiększoną cytotoksycznością materiałów polimerowych i kompozytowych, co wskazuje na zależność efektu biologicznego od stężenia zastosowanego dodatku. Materiały wzbogacone o najniższe ilości związków polifenolowych nie wykazywały działania cytotoksycznego, dlatego też zostały wyselekcjonowane do dalszych badań in vitro. Wyższe stężenia związków polifenolowych, ze względu na podwyższoną cytotoksyczność, zostały wykorzystane wyłącznie w badaniach właściwości antybakteryjnych.

5.3.2.1. WŁAŚCIWOŚCI ANTYBAKTERYJNE

W badaniu oceniano właściwości przeciwbakteryjne materiałów wobec dwóch typów bakterii: Gram-dodatniego *Staphylococcus aureus* (bakterie z grupy ziarenkowców) i Gram-ujemnego *Pseudomonas aeruginosa* (bakterie z grupy pałeczek), różniących się morfologią oraz budową ściany komórkowej. Wskaźnik przeżywalności tych bakterii po inkubacji z badanymi materiałami oraz obrazy SEM przedstawiające *S. aureus* i *P. aeruginosa* na powierzchniach folii PCL/4.5PPh oraz PCL-A2/4.5PPh zaprezentowane są na Fig. 43 (str.140/141).

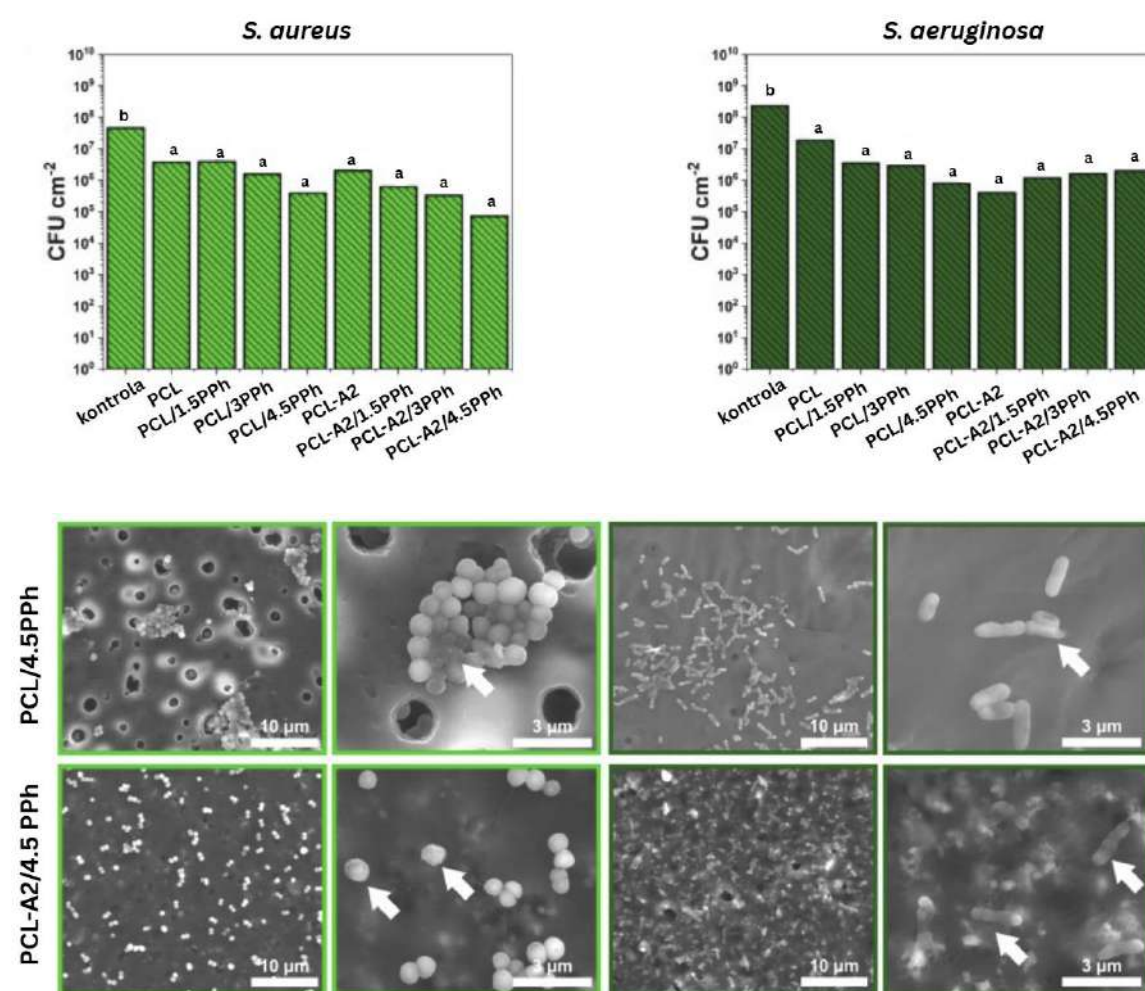


Fig. 43. Wskaźnik przeżywalności *S. aureus* i *P. aeruginosa* po inkubacji z badanymi materiałami oraz obrazy SEM przedstawiające *S. aureus* i *P. aeruginosa* na powierzchniach folii PCL/4.5PPh oraz PCL-A2/4.5PPh. Różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) między badanymi próbkami a grupą kontrolną oznaczono za pomocą kolejnych małych liter. Próbkę oznaczoną różnymi literami różni się od siebie w sposób statystycznie istotny.

Największą skuteczność bakteriostatyczną wykazały folie polimerowe i kompozytowe wzbogacone w związki polifenolowe (PCL/4.5PPh oraz PCL-A2/4.5PPh) – liczba przeżywających komórek *S. aureus* spadła w ich przypadku nawet o dwa rzędy wielkości

względem próbki kontrolnej, a *P. aeruginosa* – o jeden rząd wielkości. Choć inne badane materiały nie wzbogacone związkami polifenolowymi również wykazywały działanie ograniczające wzrost bakterii, ich skuteczność była niższa. Obserwacje mikroskopowe (SEM) potwierdziły różnice w interakcjach bakterii z powierzchnią materiałów. Na powierzchni folii PCL/4.5PPh obserwowano formowanie skupisk komórek bakteryjnych, z widocznymi uszkodzeniami części z nich. Z kolei powierzchnia PCL-A2/4.5PPh wykazywała bardziej równomierne rozmieszczenie komórek, przy czym liczne bakterie cechowały się naruszoną integralnością ściany komórkowej, co zostało zaznaczone białymi strzałkami na obrazach SEM.

Uzyskane wyniki wskazują, że dodatek związków polifenolowych w materiałach prowadzi do istotnego ograniczenia zarówno adhezji, jak i przeżywalności patogenów. Efekt ten najprawdopodobniej wynika z połączenia oddziaływań fizycznych powierzchni materiałów z komórkami bakteryjnymi i działaniem bakteriostatycznym polifenoli.

Dane literaturowe wskazują, że zarówno związki polifenolowe (PPh), jak i bioaktywne szkło (BG) mogą wykazywać właściwości przeciwdrobnoustrojowe, przy czym różnią się mechanizmami działania. W przypadku związków polifenolowych, aktywność przeciwdrobnoustrojowa przypisywana jest głównie obecności grup hydroksylowych, których liczba, rozmieszczenie oraz struktura szkieletu cząsteczki warunkują zdolność do interakcji z błoną komórkową mikroorganizmów [140]. Natomiast cząstki bioaktywnego szkła wykazują działanie antybakteryjne głównie poprzez uwalnianie jonów, takich jak jony wapniowe, co prowadzi do podwyższenia pH środowiska, zmian ciśnienia osmotycznego oraz zaburzeń potencjału błony komórkowej bakterii [141]. Można przypuszczać, że w kompozytach PCL-A2 wzbogaconych w PPh jednocześnie obecność obu składników przyczynia się do zwiększenia skuteczności przeciwdrobnoustrojowej. Niewykluczone, że oddziaływanie pomiędzy BG a PPh dodatkowo wpływają na dostępność grup hydroksylowych, modyfikując tym samym aktywność biologiczną materiału.

5.3.2.2. WŁAŚCIWOŚCI OSTEOGENNE

Różnicowanie osteoblastów w bezpośrednim kontakcie z materiałami oceniano na podstawie ekspresji markerów charakterystycznych dla procesu kościotworzenia: fosfatazy alkalicznej (ALP), osteopontyny (OPN) oraz osteokalcyny (OC). Wyniki przedstawiono na Fig. 44.

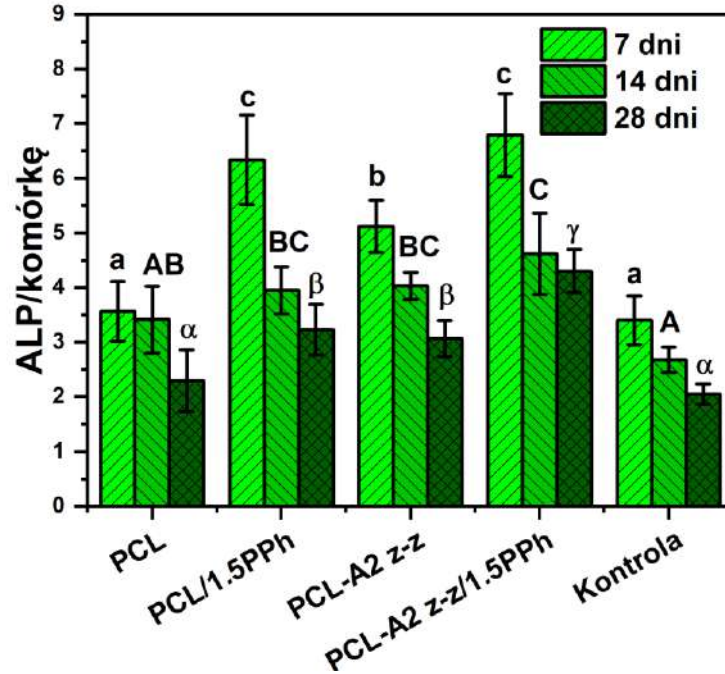


Fig.44. Odpowiedź NHOst: aktywność fosfatazy zasadowej (ALP). Istotne statystycznie różnice ($p < 0,05$) pomiędzy materiałami a kontrolą po 7-, 14- i 28-dniowym okresie hodowli komórkowej oznaczono odpowiednio małymi literami łacińskimi, wielkimi literami łacińskimi oraz literami greckimi. Różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice.

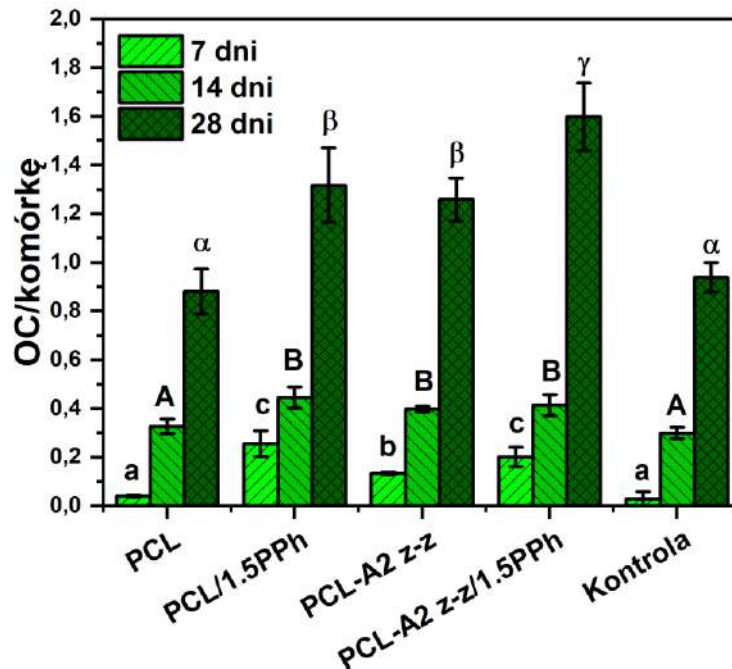


Fig. 45. Odpowiedź NHOst: ekspresja osteokalcyny (OC). Istotne statystycznie różnice ($p < 0,05$) pomiędzy materiałami a kontrolą po 7-, 14- i 28-dniowym okresie hodowli komórkowej oznaczono odpowiednio małymi literami łacińskimi, wielkimi literami łacińskimi oraz literami greckimi. Różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice.

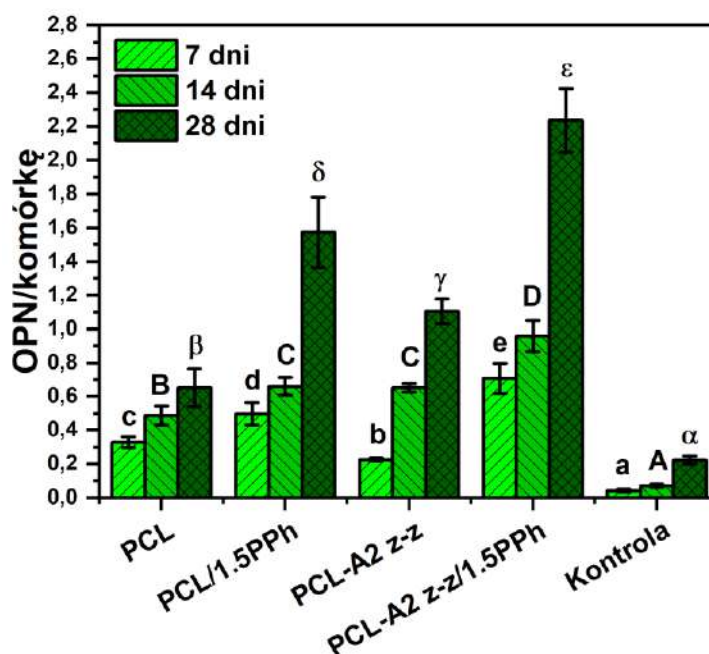


Fig. 46. Odpowiedź NHOst: ekspresja osteopontyny (OP). Istotne statystycznie różnice ($p < 0,05$) pomiędzy materiałami a kontrolą po 7-, 14- i 28-dniowym okresie hodowli komórkowej oznaczono odpowiednio małymi literami łacińskimi, wielkimi literami łacińskimi oraz literami greckimi. Różne litery oznaczają istotne statystycznie różnice.

Przeprowadzone badania wykazały, że materiały wzbogacone w związki polifenolowe, w szczególności kompozyty modyfikowane cząstkami bioaktywnego szkła, wykazują potencjał w stymulowaniu różnicowania osteoblastów. Po 7 dniach, komórki hodowane w bezpośrednim kontakcie z materiałami zawierającymi polifenole, charakteryzowały się znacznie wyższą aktywnością fosfatazy zasadowej (ALP) – enzymu uznawanego za wczesny marker osteogenezy – w porównaniu do komórek hodowanych na powierzchni folii PCL, kompozytu PCL-A2 oraz powierzchni kontrolnej. Pomimo obniżenia poziomu aktywności ALP w późniejszych punktach czasowych (14. i 28. dzień hodowli), w przypadku kompozytu PCL-A2/1.5PPh wartość tego parametru pozostawała najwyższa spośród analizowanych grup również po 28 dniach. Jednocześnie ekspresja późnych markerów różnicowania osteoblastów, takich jak osteokalcyna (OC) i osteopontyna (OP), systematycznie rosła, co świadczyło o postępującym procesie różnicowania. Po 28 dniach najwyższe wartości tych markerów osiągnął materiał kompozytowy wzbogaconych związkami polifenolowymi (PCL-A2/1.5PPh), co może potwierdzać jego najwyższą skuteczność w stymulowaniu różnicowania osteoblastów. Wyniki te sugerują, że dodatek związków polifenolowych i bioaktywnego szkła może potencjalnie wpływać korzystnie na proces terminalnego różnicowania osteoblastów – ekspresji składników macierzy zewnątrzkomórkowej oraz jej mineralizację.

Otrzymane rezultaty znajdują potwierdzenie w literaturze. Rojasawasthien et al. (2021) wykazali, że polifenole roślinnego pochodzenia, na przykład związki wyizolowane z fasoli *Vigna angularis*, promują różnicowanie komórek linii osteoblastycznych poprzez zwiększenie aktywności ALP oraz ekspresji genów osteogennych, takich jak *Runx2* i *Osterix* [142]. Autorzy sugerują, że mechanizm ten może być związany z aktywacją szlaków sygnalizacyjnych Wnt, BMP oraz IGF, jak również z modulacją receptorów estrogenowych. Zbliżone obserwacje przedstawiły Marie-Noëlle Horcajada i Elizabeth A. Offord (2012), wskazując, że związki polifenolowe oddziałują na metabolizm kości poprzez angażowanie złożonych sieci szlaków sygnalizacyjnych anabolicznych, takich jak szlaki BMP oraz szlaki zależne od receptorów estrogenowych [143].

5.3.2.3. WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWPALNE

Jednym z istotnych elementów odpowiedzi zapalnej na materiał implantacyjny jest produkcja reaktywnych form tlenu (ROS) przez makrofagi. Poniżej przedstawiono wyniki stężenia poziomu ROS w komórkach RAW 264.7 hodowanych na badanych materiałach bez i z dodatkiem ekstraktu z szałwii lekarskiej bogatego w związki polifenolowe.

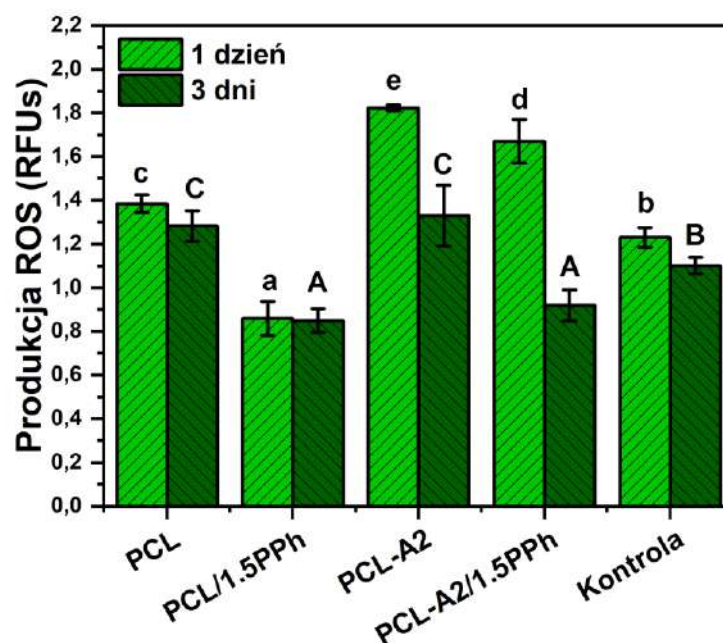


Fig. 47. Odpowiedź makrofagów RAW 264.7: wewnątrzkomórkowa produkcja reaktywnych form tlenu (ROS). Statystycznie istotne różnice ($p < 0,05$) między badanymi materiałami a kontrolą po 1- i 3-dniowych okresach hodowli komórek są zaznaczone odpowiednio kolejnymi małymi i wielkimi literami. Różne litery wskazują na statystycznie istotne różnice.

Wyniki badań wykazały, że materiały niezawierające związków polifenolowych (PPh), takie jak PCL i PCL-A2, stymulowały produkcję reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach

makrofagów, co jest typową odpowiedzią zapalną na ciało obce. Natomiast obecność związków polifenolowych w materiałach (PCL/1.5PPh i PCL-A2/1.5PPh) istotnie obniżała poziom ROS już po 3 dniach hodowli, a po dłuższym czasie (7 dni) ich poziom był nawet niższy niż dla dołka kontrolnego. Co więcej, zaobserwowana redukcja poziomu ROS koreluje z uzyskanymi wynikami badań antyoksydacyjnych opisanymi szerzej w Rozdziale 4, gdzie zastosowano metody bezkomórkowe ABTS, DPPH i FRAP do oceny zdolności antyoksydacyjnych materiałów. Badania te potwierdziły wysoką aktywność antyoksydacyjną materiałów wzbogaconych związkami polifenolowymi.

Obniżenie produkcji ROS ma kluczowe znaczenie, ponieważ przewlekły stan zapalny i stres oksydacyjny mogą prowadzić do zahamowania regeneracji tkanek, resorpcji tkanki kostnej wokół implantu, a nawet jego odrzucenia. Wysoki poziom ROS sprzyja różnicowaniu preosteoklastów w kościogubne osteoklasty i jednocześnie indukuje apoptozę kościotwórczych osteoblastów, co zaburza procesy naprawcze kości. Związki polifenolowe, takie jak te obecne w badanych materiałach, wykazują silne działanie przeciwzapalne, co potwierdzają liczne doniesienia literaturowe [44], [48], [49].

5.3.2.4. WŁAŚCIWOŚCI ANTYNOWOTWOROWE

W kolejnej części badań skupiono się na ocenie właściwości antynowotworowych wytworzonych materiałów. W tym celu wykorzystano materiały polimerowe (PCL i PCL/1.5PPh) i kompozyty zawierające trzy rodzaje szkła bioaktywnego A2, otrzymane różnymi metodami: topienia (A2 top), zol-żel (A2 z-z) oraz zol-żel-EISA (A2 mez). Jak wykazano w badaniach szczegółowo opisanych w rozdziale 4.2, zastosowanie cząstek bioaktywnego szkła, otrzymanych różnymi metodami, jako napełniacza w materiałach kompozytowych, umożliwia kontrolowanie dostępności związków aktywnych jakimi są związki polifenolowe, co może mieć znaczenie dla osiągnięcia selektywnego działania przeciwnowotworowego. Poniżej zaprezentowano wyniki pomiaru aktywności kinazy adenylanowej, pozwalającej na ocenę proliferacji komórek NH0st i Saos-2 oraz cytotoksyczności materiałów.

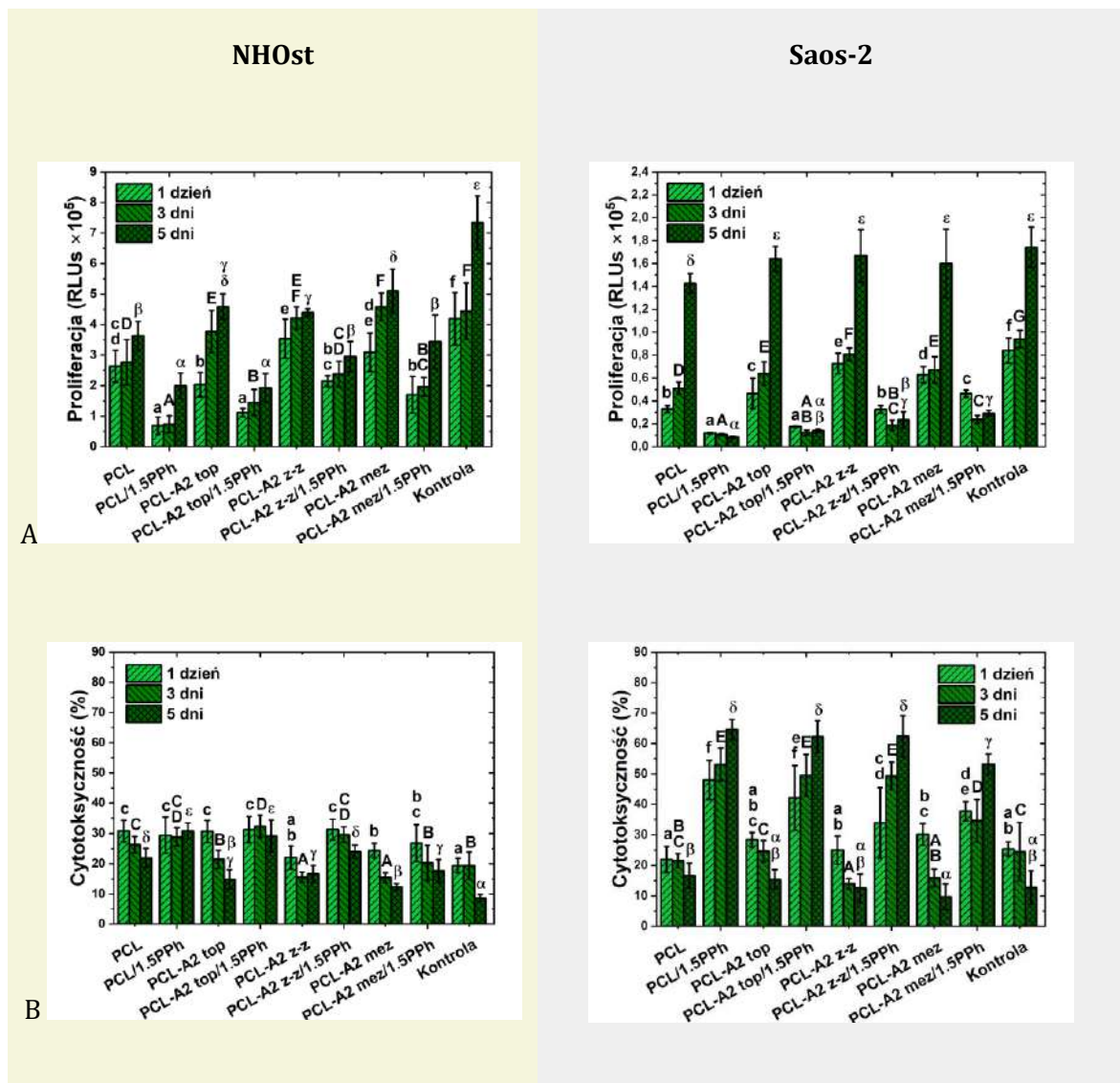


Fig. 48 Poziom kinazy adenylowej w lizacie jako wskaźnik liczby nienaruszonych komórek adherentnych (A) oraz poziom kinazy adenylowej w nadsączu względem poziomu kinazy adenylowej w lizacie jako wskaźnik cytotoksyczności materiału (B).

Wszystkie materiały sprzyjały namnażaniu komórek NHOst. W przypadku komórek nowotworowych, materiały bez dodatku ekstraktu również wspierały ich proliferację, natomiast liczba komórek Saos-2 na foliach wzbogaconych o związki polifenolowe systematycznie malała.

Po 5 dniach hodowli, istotny spadek liczby komórek NHOst zaobserwowano jedynie dla materiałów PCL/1.5PPh oraz PCL-A2 top/1.5PPh, podczas gdy wyniki dla pozostałych materiałów z dodatkiem PPh nie różniły się istotnie od materiału PCL. Liczebność komórek NHOst i Saos-2 na powierzchni materiałów wzbogaconych związkami polifenolowymi rosła według następującej tendencji: PCL/1.5PPh < PCL-A2 top/1.5PPh < PCL-A2 z-z/1.5PPh < PCL-A2 mez/1.5PPh.

Ocena cytotoksyczności wobec prawidłowych komórek osteoblastycznych (NH₀St) wykazała tendencję spadkową dla większości analizowanych materiałów w miarę wydłużania czasu hodowli. Wyjątek stanowiły próbki PCL/1.5PPh oraz PCL-A2 top/1.5PPh, dla których nie zaobserwowano istotnych zmian w czasie, a poziom cytotoksyczności po 5 dniach hodowli był wyższy w porównaniu do materiału referencyjnego (PCL). Mimo to, żadna z wartości nie przekroczyła 31%, nie wykazując tym samym istotnej cytotoksyczności.

W przypadku komórek nowotworowych cytotoksyczność materiałów bez udziału związków polifenolowych zmniejszała się z czasem i po 5 dniach osiągała poziom równy lub niższy niż dla folii PCL. Natomiast materiały z dodatkiem polifenoli wykazywały istotnie wyższą toksyczność wobec komórek Saos-2, która dodatkowo wzrastała w czasie hodowli.

W celu zbadania potencjalnych mechanizmów leżących u podstaw działania przeciwnowotworowego materiałów wzbogaconych związkami polifenolowymi przeprowadzono ocenę produkcji reaktywnych form tlenu (ROS), ekspresji białka GADD45G, poziomu fosforylacji kinazy CDK2 w pozycji Tyr15 oraz aktywności kaspazy-3 i kaspazy-7 (Fig. 49.) w osteoblastach prawidłowych (NH₀St) i komórkach kostniakomiesaka (Saos-2), hodowanych w bezpośrednim kontakcie z tymi materiałami. Wskaźniki te są ściśle związane z odpowiedzią komórkową na stres, zatrzymaniem cyklu komórkowego i apoptozą.

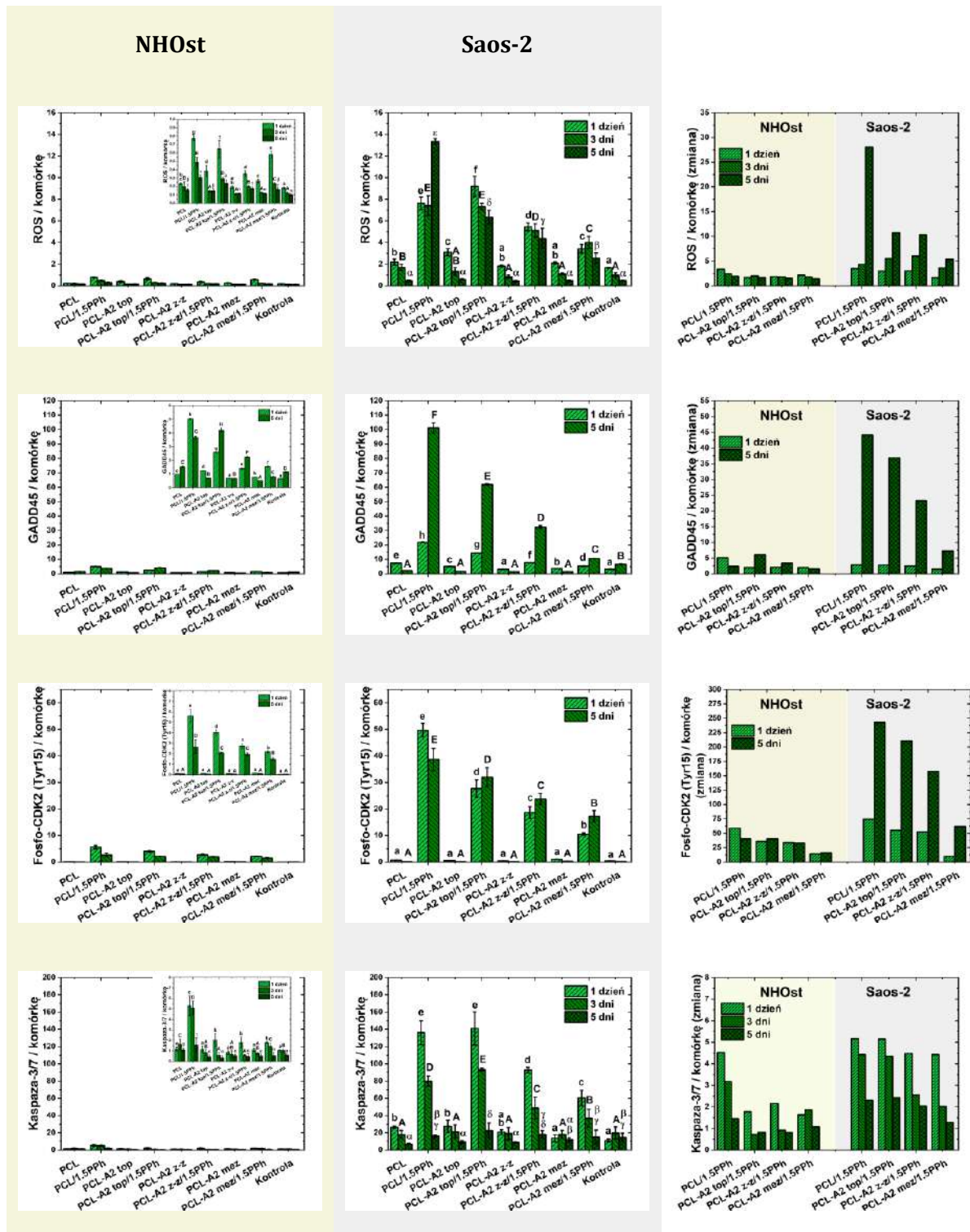


Fig. 49. Produkcja ROS (A), ekspresja białka GADD45G (B), poziom fosforylowanego CDK2 (Tyr15) (C) oraz aktywność kaspaz-3/7 (D) zostały przedstawione jako wartości bezwzględne (pierwsza i druga kolumna) oraz jako zmiany względem materiału bez dodatku PPh (trzecia kolumna), znormalizowane względem liczby komórek. Istotność statystyczna różnic ($p < 0,05$) pomiędzy filmami a kontrolą po 1., 3. i 5. dniu hodowli oznaczona została odpowiednio małymi literami tacińskimi, wielkimi literami tacińskimi oraz literami greckimi. Różne litery wskazują na istotne statystycznie różnice.

Obecność związków polifenolowych w materiałach skutkowała istotnym wzrostem wszystkich analizowanych markerów odpowiedzi komórkowej – zarówno w komórkach prawidłowych (NH0st), jak i nowotworowych (Saos-2) – przy czym intensywność tej odpowiedzi była znacznie wyższa w komórkach nowotworowych. Po 5 dniach hodowli komórek Saos-2 odnotowano zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu (ROS), wzrost ekspresji białka GADD45G oraz fosforylowanego CDK2, odpowiednio w zakresie od 5 do 28 razy, od 7 do 44 razy i od 62 do 243 razy względem wartości odnotowanych dla materiałów niemodyfikowanych polifenolami. W komórkach prawidłowych wzrosty te były mniejsze (odpowiednio do 2-, 6- i 40-krotności).

Najwyższy wzrost aktywności kaspazy-3 i kaspazy-7 w osteoblastach prawidłowych, hodowanych na materiałach wzbogaconych związkami polifenolowymi, odnotowano dla materiału PCL/1.5PPh – odpowiednio 4,5-krotny i 3,2-krotny po 1. i 3. dniu hodowli. W przypadku komórek Saos-2 największą aktywność kaspazy-3 i kaspazy-7 zarejestrowano dla próbek PCL/1.5PPh oraz PCL-A2 top/1.5PPh.

Zebrane dane sugerują, że obecność związków polifenolowych w badanych materiałach wywołuje nasilony stres oksydacyjny, który prowadzi do aktywacji szlaków odpowiedzi komórkowej, obejmujących zatrzymanie cyklu komórkowego oraz indukcję programowanej śmierci komórki (apoptozy), szczególnie w komórkach nowotworowych [144]. Podwyższony poziom ROS można uznać za kluczowy czynnik inicjujący ten proces, ponieważ prowadzi do uszkodzeń struktur komórkowych, w tym DNA i białek komórkowych, co stymuluje komórki do aktywacji ścieżek odpowiedzi na stres.

Zwiększona ekspresja białka GADD45G, szczególnie wyraźna w komórkach nowotworowych linii Saos-2, sugeruje aktywację szlaków odpowiedzi komórkowej na uszkodzenia DNA oraz zatrzymanie cyklu komórkowego w fazach cyklu komórkowego G1/S i G2/M. Białko GADD45G pełni kluczową rolę jako marker stresu genotoksycznego oraz niegenotoksycznego, uczestnicząc w mechanizmach naprawy DNA, regulacji cyklu komórkowego i inicjacji apoptozy. Jednocześnie odnotowany istotny wzrost poziomu fosforylowanej kinazy CDK2 (Tyr15) potwierdza zatrzymanie cyklu komórkowego w punkcie kontrolnym G1/S. Mechanizm ten może być związany z nasilonym stresem oksydacyjnym generowanym przez materiały zawierające związki polifenolowe, które – jak wykazano – indukują nadprodukcję reaktywnych form tlenu (ROS), wpływając na integralność genomu i aktywację szlaków stresu komórkowego [145].

Z kolei podwyższona aktywność kaspazy-3 i kaspazy-7, będących enzymami efektorowymi szlaku apoptozy zależnej od kaspaz, jednoznacznie wskazuje na aktywację programowanej śmierci komórek. Co istotne, w komórkach nowotworowych aktywacja kaspaz była bardziej nasiloną niż w osteoblastach prawidłowych, a jej najwyższy poziom obserwowano na wczesnych etapach hodowli (1. i 3. dzień). Zmniejszenie aktywności kaspaz przy jednoczesnym wzroście cytotoksyczności w późniejszych dniach może sugerować, że poza apoptozą, mogą być aktywowane również alternatywne mechanizmy śmierci komórkowej, takie jak autofagia, apoptoza niezależna od kaspaz, a także nekroza [146].

Zaobserwowana zależność między rodzajem zastosowanego szkła a nasileniem odpowiedzi komórkowej sugeruje, że może być modyfikowana poprzez wybór rodzaju modyfikatora w kompozytach. Materiały zawierające szkło o niższej zdolności do wiązania polifenoli (np. A2 top) wykazywały silniejsze działanie cytotoksyczne i proapoptotyczne, co może wynikać z szybszego i intensywniejszego uwalniania związków aktywnych z materiałów kompozytowych [147].

Powyższe wyniki potwierdzają, że mechanizm działania przeciwnowotworowego materiałów modyfikowanych polifenolami opiera się na selektywnym wzbudzaniu stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych, co prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego i aktywacji śmierci komórkowej. Niemniej wpływ na komórki prawidłowe jest ograniczony, co wskazuje na potencjalną selektywność terapeutyczną tych materiałów [148]. Warto zauważyć, że wcześniejsze wyniki wskazały, iż kompozyty wzbogacone w związki polifenolowe zwiększają ekspresję białek macierzy pozakomórkowej oraz aktywność fosfatazy alkalicznej w prawidłowych osteoblastach, podczas gdy poziom ROS w makrofagach ulega obniżeniu. Wyniki te sugerują, że materiały te mogą nie tylko wykazywać selektywne działanie przeciwnowotworowe, ale również posiadać właściwości osteogenne i przeciwzapalne.

PODSUMOWANIE

Opracowane materiały polimerowe i kompozytowe, wzbogacone związkami polifenolowymi pozyskanymi z szałwii lekarskiej (*Salvia Officinalis* L.), wykazały szereg korzystnych właściwości biologicznych, czyniących je obiecującymi materiałami do zastosowań w leczeniu ubytków tkanki kostnej. W szczególności, materiały z najniższym stężeniem polifenoli (1.5% w/w) były niecytotoksyczne wobec prawidłowych ludzkich osteoblastów, stymulując jednocześnie ich aktywność osteogenną poprzez zwiększenie aktywności fosfatazy zasadowej oraz poziomu ekspresji osteokalcyny i osteopontyny. Równocześnie

zaobserwowano zmniejszenie wewnątrzkomórkowego poziomu reaktywnych form tlenu w hodowli makrofagów, co wskazuje na potencjał przeciwzapalny materiałów.

Obecność związków polifenolowych nadawała również materiałom właściwości przeciwdrobnoustrojowe i antybiofilmowe, ograniczając adhezję i przeżywalność bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Obecność ekstraktu z szałwii wykazywała dodatkowo działanie antyoksydacyjne i przeciwnowotworowe. W przypadku kompozytów istotną rolę odgrywały właściwości teksturalne i chemia powierzchni cząstek bioaktywnego szkła (BG), takie jak porowatość, powierzchnia właściwa czy obecność grup silanowych, które wpływały na adsorpcję oraz kontrolowane uwalnianie polifenoli, a tym samym na aktywność biologiczną kompozytów.

Szczególnie istotnym wynikiem badań było wykazanie selektywnych właściwości przeciwnowotworowych materiałów wobec komórek ludzkiego kostniakomięsa przy zachowanej cytozgodności wobec prawidłowych ludzkich osteoblastów. Związki polifenolowe indukowały w komórkach nowotworowych zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu, aktywację szlaku GADD45G oraz fosforylację kinazy CDK2 (Tyr15), prowadząc do zatrzymania cyklu komórkowego i aktywacji kaskady apoptozy z udziałem kaspazy-3 i -7. Uzyskane wyniki wskazują, że opisywane kompozyty mogą stanowić wielofunkcyjne biomateriały o właściwościach osteogennych, przeciwzapalnych, przeciwdrobnoustrojowych oraz selektywnej aktywności przeciwnowotworowej. Ich zastosowanie może być szczególnie uzasadnione w terapii ubytków kostnych po resekcjach onkologicznych. Niemniej jednak, niezbędne są dalsze badania *in vivo* w celu potwierdzenia skuteczności i bezpieczeństwa stosowania tych materiałów.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W ramach niniejszej pracy opracowano, wytworzono, a także kompleksowo scharakteryzowano szeroką gamę biodegradowalnych kompozytów polimerowych pełniących rolę nośnika związków polifenolowych wyekstrahowanych z szalwii lekarskiej (*Salvia Officinalis* L.). Osnowę kompozytów stanowił homopolimer i kopolimer z grupy poliestrów alifatycznych - poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) oraz kopolimer laktydu i glikolidu (PLGA). Zastosowaną fazą rozproszoną w kompozytach były napełniacze ceramiczne w postaci cząstek bioaktywnych szkieł o zróżnicowanym składzie chemicznym i właściwościach teksturalnych oraz modyfikatory węglowe w formie wielościennych nanorurek węglowych zróżnicowanych pod względem powierzchniowych grup funkcyjnych. W ramach przeprowadzonych badań oceniono wpływ (i) właściwości faz modyfikujących, w tym tekstury, chemii powierzchni oraz składu chemicznego bioaktywnych szkieł, a także rodzaju grup funkcyjnych nanorurek węglowych; (ii) rodzaju osnowy polimerowej (PCL, PLGA) zróżnicowanej przede wszystkim pod względem stopnia krystaliczności, stopnia hydrofobowości oraz tempa degradacji; oraz (iii) stężenia włączonych do materiałów związków polifenolowych na szereg właściwości fizykochemicznych, mechanicznych i biologicznych otrzymanych materiałów kompozytowych.

W toku przeprowadzonych prac wykazano, iż wprowadzenie do materiałów kompozytowych związków polifenolowych pozwala na uzyskanie materiałów wielofunkcyjnych, charakteryzujących się selektywnym działaniem przeciwnowotworowym, właściwościami osteogennymi, przeciwzapalnymi oraz aktywnością bakteriostatyczną i antybiofilmową. Co więcej, związki te w istotny sposób modyfikują szereg właściwości fizykochemicznych i mechanicznych opracowanych materiałów. Zastosowanie napełniaczy ceramicznych i węglowych, w tym w szczególności o zróżnicowanej charakterystyce teksturalnej i chemii powierzchni, stanowi skuteczne narzędzie pozwalające na modulowanie aktywności biologicznej oraz innych właściwości materiałowych.

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski:

1. Wykazano, że zdolność materiałów kompozytowych do wiązania związków polifenolowych zależy od właściwości osnowy oraz zastosowanego napełniacza – materiały na bazie PLGA wiążą PPh skuteczniej niż materiały na bazie PCL, natomiast wprowadzenie cząstek bioaktywnego szkła o zróżnicowanej charakterystyce teksturalnej i chemii powierzchni umożliwi dalszą modyfikację stopnia wiązania związków aktywnych, tym samym modulując szereg

właściwości materiałów (w tym zwilżalność powierzchni, właściwości antyoksydacyjne, kinetykę uwalniania polifenoli, właściwości antynowotworowe).

2. Zaobserwowano, że zdolność cząstek bioaktywnego szkła do wiązania związków polifenolowych rośnie wraz ze wzrostem ich powierzchni właściwej, porowatości oraz zawartości grup silanowych (Si-OH), co bezpośrednio przekłada się na zwiększoną retencję PPh w kompozytach i modyfikację ich właściwości materiałowe oraz biologiczne.
3. Wykazano, że wielościennie nanorurki węglowe, podobnie jak bioaktywne szkło, skutecznie wiążą związki polifenolowe, przy czym ich zdolność sorpcyjna zależy od rodzaju grup funkcyjnych, a tym samym ich zdolności do oddziaływania z PPh (w tym tworzenia wiązań wodorowych) oraz od czasu kontaktu z związkami aktywnymi.
4. Wyniki badań wskazują, że związki polifenolowe wprowadzone do materiałów na bazie polimeru półkryształicznego – PCL – działają jako plastyfikatory polimeru, a w przypadku kompozytów modyfikowanych fazą ceramiczną i węglową – jako środki sprzęgające, wzmacniając oddziaływanie na granicy osnowa-faza modyfikująca.
5. Wykazano, że związki polifenolowe modyfikują proces krystalizacji polimerów, co w bezpośredni sposób wpływa na właściwości powierzchniowe (mikrostrukturę, topografię) oraz mechaniczne materiałów.
6. Potwierdzono, że polifenole polepszają właściwości bioaktywne *in vitro* (tworzenie warstwy apatytu na powierzchni kompozytów w płynie SBF) materiałów kompozytowych zawierających bioaktywne szkła.
7. Wykazano, że polifenole polepszają zwilżalność powierzchni materiałów polimerowych i kompozytowych.
8. Wykazano, że obecność cząstek bioaktywnego szkła przyspiesza degradację kompozytów o osnowie PCL, natomiast w przypadku materiałów opartych na PLGA prowadzi do jej spowolnienia. Z kolei związki polifenolowe, niezależnie od rodzaju osnowy, przyspieszają proces degradacji materiałów.
9. Potwierdzono, że materiały wzbogacone w polifenole charakteryzowały się silnymi właściwościami antyoksydacyjnymi, redukując wewnątrzkomórkowy poziom reaktywnych form tlenu w makrofagach, wykazując tym samym

potencjalne właściwości przeciwzapalne, jak również aktywnością prooksydacyjną w komórkach ludzkiego kostniakomięsa, wywołując selektywny efekt antynowotworowy.

10. Udowodniono, że materiały zawierające polifenole wykazują działanie osteogenne oraz bakteriostatyczne i antybiofilmowe, a dodatkowa modyfikacja materiałów bioaktywnym szkłem powoduje wzmocnienie tych właściwości.

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] I. Kanazawa *i in.*, „Executive summary of clinical practice guide on fracture risk in lifestyle diseases”, *J. Bone Miner. Metab.*, t. 38, nr 6, s. 746–758, lis. 2020, doi: 10.1007/s00774-020-01149-3.
- [2] C. E. Metzger, D. B. Burr, i M. R. Allen, „Anatomy and Structural Considerations”, w *Encyclopedia of Bone Biology*, M. Zaidi, Red., Oxford: Academic Press, 2020, s. 218–232. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.62234-1.
- [3] E. Bilgiç, Ö. Boyacıoğlu, M. Gizer, P. Korkusuz, i F. Korkusuz, „Chapter 6 - Architecture of bone tissue and its adaptation to pathological conditions”, w *Comparative Kinesiology of the Human Body*, S. Angin i I. E. Şimşek, Red., Academic Press, 2020, s. 71–90. doi: 10.1016/B978-0-12-812162-7.00006-0.
- [4] G. Voggenreiter *i in.*, „Immuno-inflammatory tissue reaction to stainless-steel and titanium plates used for internal fixation of long bones”, *Biomaterials*, t. 24, nr 2, s. 247–254, sty. 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(02)00312-5.
- [5] D. L. Eisenson, Y. Hisadome, i K. Yamada, „Progress in Xenotransplantation: Immunologic Barriers, Advances in Gene Editing, and Successful Tolerance Induction Strategies in Pig-To-Primate Transplantation”, *Front. Immunol.*, t. 13, s. 899657, maj 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.899657.
- [6] E. Chiarello *i in.*, „Autograft, allograft and bone substitutes in reconstructive orthopedic surgery”, *Aging Clin. Exp. Res.*, t. 25, nr S1, s. 101–103, paź. 2013, doi: 10.1007/s40520-013-0088-8.
- [7] L. L. Hench i I. Thompson, „Twenty-first century challenges for biomaterials”, *J. R. Soc. Interface*, t. 7, nr suppl_4, sie. 2010, doi: 10.1098/rsif.2010.0151.focus.
- [8] E. Pamuła, *Biomateriały dla inżynierii tkankowej: badania nad kształtowaniem struktury i właściwości biologicznych poliestrów alifatycznych*. w *Prace Monograficzne / Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica. Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki. Inżynieria Biomateriałów = Monographs / AGH University of Science and Technology. Faculty of Materials Science and Ceramics. Engineering of Biomaterials*, no. vol. 1, 2008. Kraków: Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów : Wydawnictwo Naukowe „Akapit”, 2008.
- [9] G. L, G. M. J, i U. P, „NATURAL BIOMATERIALS FOR SKIN TISSUE ENGINEERING:

- REPAIR AND REGENERATION - A SHORT REVIEW”, *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, t. 11, nr 11, s. 16, lis. 2018, doi: 10.22159/ajpcr.2018.v11i11.26343.
- [10] A. Shabbir Ali, R. Gul, H. Usman, i F. Naseer, „Applications of Natural Polymers in Regenerative Medicine and Tissue Engineering”, *Pharm. Commun.*, t. 2, nr 1, s. 47–61, cze. 2023, doi: 10.55627/pharma.002.01.0299.
- [11] Y. Wang, R.-J. van Putten, A. Tietema, J. R. Parsons, i G.-J. M. Gruter, „Polyester biodegradability: importance and potential for optimisation”, *Green Chem.*, t. 26, nr 7, s. 3698–3716, 2024, doi: 10.1039/D3GC04489K.
- [12] M. Labet i W. Thielemans, „Synthesis of polycaprolactone: a review”, *Chem. Soc. Rev.*, t. 38, nr 12, s. 3484–3504, lis. 2009, doi: 10.1039/B820162P.
- [13] E. H. Backes *i in.*, „Polycaprolactone usage in additive manufacturing strategies for tissue engineering applications: A review”, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, t. 110, nr 6, s. 1479–1503, cze. 2022, doi: 10.1002/jbm.b.34997.
- [14] „Polymers | Free Full-Text | Electrospun Polycaprolactone (PCL) Degradation: An In Vitro and In Vivo Study”. Dostęp: 17 wrzesień 2024. [Online]. Dostępne na: <https://www.mdpi.com/2073-4360/14/16/3397>
- [15] P. Gentile, V. Chiono, I. Carmagnola, i P. V. Hatton, „An Overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering”, *Int. J. Mol. Sci.*, t. 15, nr 3, Art. nr 3, mar. 2014, doi: 10.3390/ijms15033640.
- [16] Y. Bu, J. Ma, J. Bei, i S. Wang, „Surface Modification of Aliphatic Polyester to Enhance Biocompatibility”, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, t. 7, maj 2019, doi: 10.3389/fbioe.2019.00098.
- [17] D. S. Gomes, A. M. C. Santos, G. A. Neves, i R. R. Menezes, „A brief review on hydroxyapatite production and use in biomedicine”, *Cerâmica*, t. 65, s. 282–302, cze. 2019, doi: 10.1590/0366-69132019653742706.
- [18] A. Haider, S. Haider, S. S. Han, i I.-K. Kang, „Recent advances in the synthesis, functionalization and biomedical applications of hydroxyapatite: a review”, *RSC Adv.*, t. 7, nr 13, s. 7442–7458, sty. 2017, doi: 10.1039/C6RA26124H.
- [19] Michał DZIADEK, Justyna PAWLIK, Katarzyna CHOLEWA-KOWALSKA, „Szkła bioaktywne w inżynierii tkankowej — Bioactive glasses for tissue engineering”, w *Acta Bio-Optica et Informatica Medica*, t. 20, 2014, s. 156–165.
- [20] C. O. Okereke, J. O. Onaifo, S. O. Omorogbe, A. I. Ogbu, i I. H. Ifijen, „Bioactive Glasses

- for Bone Repair Application: A Review of Osteointegration and Controlled Ion Release Capabilities”, w *TMS 2024 153rd Annual Meeting & Exhibition Supplemental Proceedings*, Cham: Springer Nature Switzerland, 2024, s. 311–326. doi: 10.1007/978-3-031-50349-8_28.
- [21] M. H. Kaou, M. Furkó, K. Balázs, i C. Balázs, „Advanced Bioactive Glasses: The Newest Achievements and Breakthroughs in the Area”, *Nanomaterials*, t. 13, nr 16, Art. nr 16, sty. 2023, doi: 10.3390/nano13162287.
- [22] D. U. Tulyaganov, S. Agathopoulos, K. Dimitriadis, H. R. Fernandes, R. Gabrieli, i F. Baido, „The Story, Properties and Applications of Bioactive Glass “1d”: From Concept to Early Clinical Trials”, *Inorganics*, t. 12, nr 8, Art. nr 8, sie. 2024, doi: 10.3390/inorganics12080224.
- [23] F. Branda, „Synthesis and Functionalization of Mesoporous Bioactive Glasses for Drug Delivery”, w *Clinical Applications of Biomaterials: State-of-the-Art Progress, Trends, and Novel Approaches*, G. Kaur, Red., Cham: Springer International Publishing, 2017, s. 257–286. doi: 10.1007/978-3-319-56059-5_7.
- [24] T. Matic *i in.*, „Multifunctional Sr,Mg-Doped Mesoporous Bioactive Glass Nanoparticles for Simultaneous Bone Regeneration and Drug Delivery”, *Int. J. Mol. Sci.*, t. 25, nr 15, Art. nr 15, sty. 2024, doi: 10.3390/ijms25158066.
- [25] U. Pantulap, M. Arango-Ospina, i A. R. Boccaccini, „Bioactive glasses incorporating less-common ions to improve biological and physical properties”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, t. 33, nr 1, s. 3, sty. 2022, doi: 10.1007/s10856-021-06626-3.
- [26] R. Sergi, D. Bellucci, R. Salvatori, A. Anesi, i V. Cannillo, „A Novel Bioactive Glass Containing Therapeutic Ions with Enhanced Biocompatibility”, *Materials*, t. 13, nr 20, s. 4600, paź. 2020, doi: 10.3390/ma13204600.
- [27] T. Tite *i in.*, „Independent and complementary bio-functional effects of CuO and Ga₂O₃ incorporated as therapeutic agents in silica- and phosphate-based bioactive glasses”, *J. Materiomics*, t. 8, nr 4, s. 893–905, lip. 2022, doi: 10.1016/j.jmat.2021.12.009.
- [28] M. Monthieux *i in.*, „Carbon nanotubes”, w *Nanotechnology Handbook*, t. 4th edition, B. Bhushan, Red., Springer-Verlag, 2017, s. 193–247. doi: 10.1007/978-3-662-54357-3_8.
- [29] J. Simon, E. Flahaut, i M. Golzio, „Overview of Carbon Nanotubes for Biomedical Applications”, *Materials*, t. 12, nr 4, luty 2019, doi: 10.3390/ma12040624.

- [30] School of Chemical Engineering, College of Engineering, Universiti Teknologi MARA, Selangor, Malaysia, S. Amri, A. Mohd Akhir, School of Chemical Engineering, College of Engineering, Universiti Teknologi MARA, Selangor, Malaysia, N. Rahmat, i School of Chemical Engineering, College of Engineering, Universiti Teknologi MARA, Selangor, Malaysia and UiTM Green Centre, Universiti Teknologi MARA, Selangor, Malaysia, „Carbon nanotubes for bone tissue osseointegration engineering: A review”, *Malays. J. Chem. Eng. Technol.*, t. 5, nr 2, paź. 2022, doi: 10.24191/mjcet.v5i2.13324.
- [31] H.-M. D. Wang, P. Thakur, i A. Thakur, „Biocompatibility, Bio-Clearance, and Toxicology”, w *Integrated Nanomaterials and their Applications*, D. Suhag, A. Thakur, i P. Thakur, Red., Singapore: Springer Nature, 2023, s. 201–221. doi: 10.1007/978-981-99-6105-4_10.
- [32] Z. Wang i in., „Advances and Prospects in Antibacterial-Osteogenic Multifunctional Dental Implant Surface”, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, t. 10, maj 2022, doi: 10.3389/fbioe.2022.921338.
- [33] P. Emecen-Huja i B. Leblebicioglu, „Peri-Implant Wound Healing and Clinical Outcomes”, *Curr. Oral Health Rep.*, t. 11, nr 3, s. 215–225, wrz. 2024, doi: 10.1007/s40496-024-00381-4.
- [34] J. R. Ball, T. Shelby, F. Hernandez, C. K. Mayfield, i J. R. Lieberman, „Delivery of Growth Factors to Enhance Bone Repair”, *Bioengineering*, t. 10, nr 11, Art. nr 11, lis. 2023, doi: 10.3390/bioengineering10111252.
- [35] M. Naeem, M. I. Malik, T. Umar, S. Ashraf, i A. Ahmad, „A Comprehensive Review About Bioactive Peptides: Sources to Future Perspective”, *Int. J. Pept. Res. Ther.*, t. 28, nr 6, s. 155, paź. 2022, doi: 10.1007/s10989-022-10465-3.
- [36] N. Abedi, Z. S. Sajadi-Javan, M. Kouhi, L. Ansari, A. Khademi, i S. Ramakrishna, „Antioxidant Materials in Oral and Maxillofacial Tissue Regeneration: A Narrative Review of the Literature”, *Antioxidants*, t. 12, nr 3, Art. nr 3, mar. 2023, doi: 10.3390/antiox12030594.
- [37] B. Safari, S. Davaran, i A. Aghanejad, „Osteogenic potential of the growth factors and bioactive molecules in bone regeneration”, *Int. J. Biol. Macromol.*, t. 175, s. 544–557, kwi. 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.052.
- [38] P. Konya, M. N. Konya, B. K. Yilmaz, E. Kaga, S. Kaga, i Y. Çetinkol, „Comparison of the Therapeutic Efficacy of Antibiotic-Loaded Polymeric Tissue Scaffold and Bone Cement in the Regeneration of Infected Bone Tissue”, *Cureus*, t. 15, nr 10, s. e46487,

doi: 10.7759/cureus.46487.

- [39] X. Shen *i in.*, „Bone regeneration and antibacterial properties of calcium-phosphorus coatings induced by gentamicin-loaded polydopamine on magnesium alloys”, *Biomed. Technol.*, t. 5, s. 87–101, mar. 2024, doi: 10.1016/j.bmt.2023.06.002.
- [40] D. Träger, „Zastosowania systemów uwalniania wankomycyny do regeneracji tkanki kostnej”, *Inż. Mater.*, t. 1, nr 4, s. 20–26, sie. 2023, doi: 10.15199/28.2023.4.2.
- [41] C. T. Johnson i A. J. García, „Scaffold-based Anti-infection Strategies in Bone Repair”, *Ann. Biomed. Eng.*, t. 43, nr 3, s. 515–528, mar. 2015, doi: 10.1007/s10439-014-1205-3.
- [42] R. C. D. F. i B. Ml, „Drug delivery using composite scaffolds in the context of bone tissue engineering”, *Clin. Cases Miner. Bone Metab. Off. J. Ital. Soc. Osteoporos. Miner. Metab. Skelet. Dis.*, t. 10, nr 3, wrz. 2013, Dostęp: 18 wrzesień 2024. [Online]. Dostępne na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24554923/>
- [43] P. Ahangar, E. Akoury, A. S. Ramirez Garcia Luna, A. Nour, M. H. Weber, i D. H. Rosenzweig, „Nanoporous 3D-Printed Scaffolds for Local Doxorubicin Delivery in Bone Metastases Secondary to Prostate Cancer”, *Materials*, t. 11, nr 9, Art. nr 9, wrz. 2018, doi: 10.3390/ma11091485.
- [44] S. C. Santos, G. A. C. Fortes, L. T. F. M. Camargo, A. J. Camargo, i P. H. Ferri, „Antioxidant effects of polyphenolic compounds and structure-activity relationship predicted by multivariate regression tree”, *LWT*, t. 137, s. 110366, luty 2021, doi: 10.1016/j.lwt.2020.110366.
- [45] M. Rudrapal, Red., *Polyphenols: food, nutraceutical, and nanotherapeutic applications*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2024.
- [46] D. K. Ghosh, Red., *Nutraceuticals in brain health and beyond*. London ; San Diego, CA: Academic Press, 2021.
- [47] J. Ji *i in.*, „A polyphenol rich sugarcane extract as a modulator for inflammation and neurological disorders”, *PharmaNutrition*, t. 12, s. 100187, cze. 2020, doi: 10.1016/j.phanu.2020.100187.
- [48] S. N. Syed Hassan, R. Hasham, S. H. Hashim, i M. A. A. Mohd Hamzah, „Anti-inflammatory Activity of Polyphenols from Labisia pumila Leaves Extract”, *Malays. J. Fundam. Appl. Sci.*, t. 20, nr 2, s. 482–496, kwi. 2024, doi: 10.11113/mjfas.v20n2.3369.
- [49] E. Torre, M. Morra, C. Cassinelli, i G. Iviglia, „Anti-Bacterial and Anti-Inflammatory

- Effects of a Ceramic Bone Filler Containing Polyphenols from Grape Pomace”, *Ceramics*, t. 7, nr 3, s. 975–988, lip. 2024, doi: 10.3390/ceramics7030063.
- [50] K. Czerkas, E. Olchowik-Grabarek, M. Łomanowska, N. Abdulladjanova, i S. Sękowski, „Antibacterial Activity of Plant Polyphenols Belonging to the Tannins against *Streptococcus mutans*—Potential against Dental Caries”, *Molecules*, t. 29, nr 4, s. 879, luty 2024, doi: 10.3390/molecules29040879.
- [51] D. Djouahra Fahem *i in.*, „Characterization and antibacterial activity of alkaloids and polyphenols extracts from *Haplophyllum tuberculatum* (Forssk.) A. Juss.”, *Int. J. Second. Metab.*, t. 10, nr 4, s. 495–510, grudz. 2023, doi: 10.21448/ijsm.1248044.
- [52] A. C. Anghel i I. Țăranu, „Antimicrobial potential of polyphenols obtained from agro-industrial by-products”, *Arch. Zootech.*, t. 26, nr 2, s. 96–115, paź. 2023, doi: 10.2478/azibna-2023-0017.
- [53] I.-T. Wu, Y.-H. Chu, Y.-R. Huang, C.-C. Chen, i S.-J. Ding, „Antibacterial ability and osteogenic activity of polyphenol-tailored calcium silicate bone cement”, *J. Mater. Chem. B*, t. 10, nr 24, s. 4640–4649, 2022, doi: 10.1039/D2TB00944G.
- [54] G. Cerqueni, A. Scalzone, C. Licini, P. Gentile, i M. Mattioli-Belmonte, „Insights into oxidative stress in bone tissue and novel challenges for biomaterials”, *Mater. Sci. Eng. C*, t. 130, s. 112433, lis. 2021, doi: 10.1016/j.msec.2021.112433.
- [55] T. Iantomasi *i in.*, „Dietary polyphenols and osteoporosis: molecular mechanisms involved”, *Int. J. Bone Fragility*, t. 2, nr 3, s. 97–101, grudz. 2022, doi: 10.57582/IJBF.220203.097.
- [56] A. Szypuła, B. Michalik, I. Galasińska, K. Hajduk-Maślak, A. Skóra, i M. Sęk, „The role of polyphenols in the prevention and treatment of cancer”, *J. Educ. Health Sport*, t. 59, s. 126–144, luty 2024, doi: 10.12775/JEHS.2024.59.008.
- [57] J. B. M. Md, E. Z. Md, M. A. F. Md, i P. J. C. Md, „Overview and Emerging Trends in the Treatment of Osteoradionecrosis”, *Curr. Treat. Options Oncol.*, t. 22, nr 12, s. 115, grudz. 2021, doi: 10.1007/s11864-021-00915-3.
- [58] I. Sánchez-Gomar *i in.*, „Pro-Angiogenic Effects of Natural Antioxidants Extracted from Mango Leaf, Olive Leaf and Red Grape Pomace over Endothelial Colony-Forming Cells”, *Antioxidants*, t. 11, nr 5, s. 851, kwi. 2022, doi: 10.3390/antiox11050851.
- [59] S. Huang *i in.*, „Solvent micro-evaporation and concentration gradient synergistically induced crystallization of poly(ϵ -lactide) and ring banded supra-structures with radial periodic variation of thickness”, *CrystEngComm*, t. 16, nr 1, s. 94–101, 2014,

doi: 10.1039/C3CE41664J].

- [60] M. Dziadek, E. Menaszek, B. Zagrajczuk, J. Pawlik, i K. Cholewa-Kowalska, „New generation poly(ϵ -caprolactone)/gel-derived bioactive glass composites for bone tissue engineering: Part I. Material properties”, *Mater. Sci. Eng. C*, t. 56, s. 9–21, lis. 2015, doi: 10.1016/j.msec.2015.06.020.
- [61] Y. Lu, D. Cheng, B. Niu, X. Wang, X. Wu, i A. Wang, „Properties of Poly (Lactic-co-Glycolic Acid) and Progress of Poly (Lactic-co-Glycolic Acid)-Based Biodegradable Materials in Biomedical Research”, *Pharmaceuticals*, t. 16, nr 3, s. 454, mar. 2023, doi: 10.3390/ph16030454.
- [62] D. Simon, A. Holland, i R. Shanks, „Poly(caprolactone) thin film preparation, morphology, and surface texture”, *J. Appl. Polym. Sci.*, t. 103, nr 2, s. 1287–1294, sty. 2007, doi: 10.1002/app.25228.
- [63] N. A. Alenazi, „Exploring curcumin interaction with PLGA nanoparticles via various functional groups: A dispersion-corrected density functional theory and molecular dynamics simulation approach”, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.*, t. 695, s. 134211, sie. 2024, doi: 10.1016/j.colsurfa.2024.134211.
- [64] M. Dziadek, K. Dziadek, A. Kopec, B. Zagrajczuk, i K. Cholewa-Kowalska, „Antioxidant activity of novel PCL/bioactive glass composites enriched with polyphenolic compounds extracted from fruits and leaves of sweet cherry (*Prunus avium* L.)”, *Mater. Lett.*, t. 203, s. 28–31, wrz. 2017, doi: 10.1016/j.matlet.2017.05.112.
- [65] Z. Wu, J. Tian, L. Wu, i C. Zhang, „A hydrophilic coating capable of withstanding acid and alkali to modify PVDF membrane”, *J. Water Process Eng.*, t. 45, s. 102519, luty 2022, doi: 10.1016/j.jwpe.2021.102519.
- [66] E. Tamjid, R. Bagheri, M. Vossoughi, i A. Simchi, „Effect of particle size on the in vitro bioactivity, hydrophilicity and mechanical properties of bioactive glass-reinforced polycaprolactone composites”, *Mater. Sci. Eng. C*, t. 31, nr 7, s. 1526–1533, paź. 2011, doi: 10.1016/j.msec.2011.06.013.
- [67] C. E. Rapiet, K. J. Shea, i A. P. Lee, „Investigating PLGA microparticle swelling behavior reveals an interplay of expansive intermolecular forces”, *Sci. Rep.*, t. 11, nr 1, s. 14512, lip. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-93785-6.
- [68] J. Zhou, Z. Lin, Y. Ju, Md. A. Rahim, J. J. Richardson, i F. Caruso, „Polyphenol-Mediated Assembly for Particle Engineering”, *Acc. Chem. Res.*, t. 53, nr 7, s. 1269–1278, lip. 2020, doi: 10.1021/acs.accounts.0c00150.

- [69] M. Gilbert, „Relation of Structure to Thermal and Mechanical Properties”, w *Brydson's Plastics Materials*, Elsevier, 2017, s. 59–73. doi: 10.1016/B978-0-323-35824-8.00004-9.
- [70] B. Zhu, J. Li, Y. He, N. Yoshie, i Y. Inoue, „Hydrogen-Bonding Interaction and Crystalline Morphology in the Binary Blends of Poly(ϵ -caprolactone) and Polyphenol Catechin”, *Macromol. Biosci.*, t. 3, nr 11, s. 684–693, lis. 2003, doi: 10.1002/mabi.200350034.
- [71] M. Cazzola, I. Corazzari, E. Prenesti, E. Bertone, E. Vernè, i S. Ferraris, „Bioactive glass coupling with natural polyphenols: Surface modification, bioactivity and anti-oxidant ability”, *Appl. Surf. Sci.*, t. 367, s. 237–248, mar. 2016, doi: 10.1016/j.apsusc.2016.01.138.
- [72] B. Damadzadeh, H. Jabari, M. Skrifvars, K. Airola, N. Moritz, i P. K. Vallittu, „Effect of ceramic filler content on the mechanical and thermal behaviour of poly-l-lactic acid and poly-l-lactic-co-glycolic acid composites for medical applications”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, t. 21, nr 9, s. 2523–2531, wrz. 2010, doi: 10.1007/s10856-010-4110-9.
- [73] P. Si, F. Luo, P. Xue, i D. Yan, „Crystallization mechanism, microstructure and mechanical property of poly (L-lactic acid) modified by introduction of hydrogen bonding”, *J. Polym. Res.*, t. 23, nr 6, s. 118, cze. 2016, doi: 10.1007/s10965-016-1010-9.
- [74] P. Cerruti *i in.*, „Effect of a natural polyphenolic extract on the properties of a biodegradable starch-based polymer”, *Polym. Degrad. Stab.*, t. 96, nr 5, s. 839–846, maj 2011, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2011.02.003.
- [75] E. Pamula *i in.*, „Degradation, Bioactivity, and Osteogenic Potential of Composites Made of PLGA and Two Different Sol–Gel Bioactive Glasses”, *Ann. Biomed. Eng.*, t. 39, nr 8, s. 2114–2129, sie. 2011, doi: 10.1007/s10439-011-0307-4.
- [76] P. Gentile, V. Chiono, I. Carmagnola, i P. V. Hatton, „An Overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering”, *Int. J. Mol. Sci.*, t. 15, nr 3, Art. nr 3, mar. 2014, doi: 10.3390/ijms15033640.
- [77] K. K. Onychina, E. R. Radosteva, E. R. Gazizullina, E. L. Gerasimova, E. N. Sharafutdinova, i A. V. Ivanova, „Research antioxidant properties of natural and synthetic polyphenols”, zaprezentowano na ACTUAL PROBLEMS OF ORGANIC CHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY (OCBT2020): Proceedings of the International Scientific Conference, Ekaterinburg, Russia, 2022, s. 020056. doi: 10.1063/5.0069285.

- [78] S. C. Santos, G. A. C. Fortes, L. T. F. M. Camargo, A. J. Camargo, i P. H. Ferri, „Antioxidant effects of polyphenolic compounds and structure-activity relationship predicted by multivariate regression tree”, *LWT*, t. 137, s. 110366, luty 2021, doi: 10.1016/j.lwt.2020.110366.
- [79] Y. Zhao, J. Wang, S. Chen, Z. Wei, Y. Xie, i C. Zhao, „Polyphenol-assisted albumin-based biomineralization nanocarriers with NIR-II-targeted photothermal performance towards broad-spectrum radical scavenging”, *J. Mater. Chem. B*, t. 11, nr 23, s. 5108–5116, 2023, doi: 10.1039/D3TB00541K.
- [80] X. Zhang *i in.*, „Polyphenol scaffolds in tissue engineering”, *Mater. Horiz.*, t. 8, nr 1, s. 145–167, 2021, doi: 10.1039/D0MH01317J.
- [81] G. Iviglia, E. Torre, C. Cassinelli, i M. Morra, „Functionalization with a Polyphenol-Rich Pomace Extract Empowers a Ceramic Bone Filler with In Vitro Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Pro-Osteogenic Properties”, *J. Funct. Biomater.*, t. 12, nr 2, s. 31, maj 2021, doi: 10.3390/jfb12020031.
- [82] D. Słota *i in.*, „Preparation, Characterization, and Biocompatibility Assessment of Polymer-Ceramic Composites Loaded with *Salvia officinalis* Extract”, *Materials*, t. 14, nr 20, s. 6000, paź. 2021, doi: 10.3390/ma14206000.
- [83] M. Huang, Z. Cai, i S. Liu, „Strategies for long-acting drug design”, *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, t. 45, nr 1, s. 206–212, sty. 2025, doi: 10.12122/j.issn.1673-4254.2025.01.24.
- [84] Md. Sahadat Hossain i S. Ahmed, „FTIR spectrum analysis to predict the crystalline and amorphous phases of hydroxyapatite: a comparison of vibrational motion to reflection”, *RSC Adv.*, t. 13, nr 21, s. 14625–14630, 2023, doi: 10.1039/D3RA02580B.
- [85] L. He *i in.*, „Novel tea polyphenol-modified calcium phosphate nanoparticle and its remineralization potential”, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, t. 103, nr 8, s. 1525–1531, lis. 2015, doi: 10.1002/jbm.b.33333.
- [86] M. Aaddouz *i in.*, „Multifunctional Biocomposites: Synthesis, Characterization, and Prospects for Regenerative Medicine and Controlled Drug Delivery”, *Molecules*, t. 29, nr 15, s. 3483, lip. 2024, doi: 10.3390/molecules29153483.
- [87] Q. Yu *i in.*, „Multifunctional composite capsules in drug delivery systems: bridging pharmaceutical and biomedical applications”, *Adv. Compos. Hybrid Mater.*, t. 8, nr 1, s. 118, sty. 2025, doi: 10.1007/s42114-024-01203-y.
- [88] R. K. Kankala, Y.-H. Han, H.-Y. Xia, S.-B. Wang, i A.-Z. Chen, „Nanoarchitected

- prototypes of mesoporous silica nanoparticles for innovative biomedical applications”, *J. Nanobiotechnology*, t. 20, nr 1, Art. nr 1, grudz. 2022, doi: 10.1186/s12951-022-01315-x.
- [89] G. Petrisor *i in.*, „Mesoporous Silica Systems Loaded with Polyphenols”, w *Priochem 2021*, MDPI, mar. 2022, s. 15. doi: 10.3390/chemproc2022007015.
- [90] E. Fiume, C. Migneco, E. Verné, i F. Baino, „Comparison between Bioactive Sol-Gel and Melt-Derived Glasses/Glass-Ceramics Based on the Multicomponent SiO₂-P₂O₅-CaO-MgO-Na₂O-K₂O System”, *Materials*, t. 13, nr 3, Art. nr 3, sty. 2020, doi: 10.3390/ma13030540.
- [91] A. Wajda, W. H. Goldmann, R. Detsch, A. R. Boccaccini, i M. Sitarz, „Influence of zinc ions on structure, bioactivity, biocompatibility and antibacterial potential of melt-derived and gel-derived glasses from CaO-SiO₂ system”, *J. Non-Cryst. Solids*, t. 511, s. 86–99, maj 2019, doi: 10.1016/j.jnoncrsol.2018.12.040.
- [92] „A Structural Comparison of Ordered and Non-Ordered Ion Doped Silicate Bioactive Glasses.”, *Materials*, t. 13, nr 4, s. 992, luty 2020, doi: 10.3390/MA13040992.
- [93] B. Zagrajczuk, M. Dziadek, Z. Olejniczak, K. Cholewa-Kowalska, i M. Laczka, „Badania strukturalne i chemiczne materiałów bioaktywnych uzyskanych z żelu z układów SiO₂-CaO i SiO₂-CaO-P₂O₅”, *Ceram. Int.*, t. 43, nr 15, s. 12742–12754, paź. 2017, doi: 10.1016/j.ceramint.2017.06.160.
- [94] N. Jiménez, N. Ballard, i J. M. Asua, „Hydrogen Bond-Directed Formation of Stiff Polymer Films Using Naturally Occurring Polyphenols”, *Macromolecules*, t. 52, nr 24, s. 9724–9734, grudz. 2019, doi: 10.1021/acs.macromol.9b01694.
- [95] B. Zagrajczuk, M. Dziadek, Z. Olejniczak, K. Cholewa-Kowalska, i M. Laczka, „Structural and chemical investigation of the gel-derived bioactive materials from the SiO₂-CaO and SiO₂-CaO-P₂O₅ systems”, *Ceram. Int.*, t. 43, nr 15, s. 12742–12754, paź. 2017, doi: 10.1016/j.ceramint.2017.06.160.
- [96] L. Campanella, M. Costanza, i M. E. Conti, „The influence of copper ions on antioxidant activity: preliminary study”, *Int. J. Environ. Health*, t. 1, nr 2, s. 328, 2007, doi: 10.1504/IJENVH.2007.014638.
- [97] L. Tabrizi, D. Q. Dao, i T. A. Vu, „Experimental and theoretical evaluation on the antioxidant activity of a copper(II) complex based on lidocaine and ibuprofen amide-phenanthroline agents”, *RSC Adv.*, t. 9, nr 6, s. 3320–3335, 2019, doi: 10.1039/C8RA09763A.

- [98] Z. Steiner, H. Rapaport, Y. Oren, i R. Kasher, „Effect of Surface-Exposed Chemical Groups on Calcium-Phosphate Mineralization in Water-Treatment Systems”, *Environ. Sci. Technol.*, t. 44, nr 20, s. 7937–7943, paź. 2010, doi: 10.1021/es101773t.
- [99] „Synthesis and growth mechanism of calcium phosphate layer on SiC-coated carbon/carbon composites with surface pre-oxidation”, *Appl. Surf. Sci.*, t. 495, s. 143427, lis. 2019, doi: 10.1016/J.APSUSC.2019.07.169.
- [100] A. M. Fedor i M. J. Toda, „Investigating Hydrogen Bonding in Phenol Using Infrared Spectroscopy and Computational Chemistry”, *J. Chem. Educ.*, t. 91, nr 12, s. 2191–2194, grudz. 2014, doi: 10.1021/ed500563w.
- [101] T. Hamashima, K. Mizuse, i A. Fujii, „Spectral Signatures of Four-Coordinated Sites in Water Clusters: Infrared Spectroscopy of Phenol-(H₂O)_n (~20 ≤ n ≤ ~50)”, *J. Phys. Chem. A*, t. 115, nr 5, s. 620–625, luty 2011, doi: 10.1021/jp111586p.
- [102] C. Bossard *i in.*, „Mechanism of Calcium Incorporation Inside Sol–Gel Silicate Bioactive Glass and the Advantage of Using Ca(OH)₂ over Other Calcium Sources”, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, t. 5, nr 11, s. 5906–5915, lis. 2019, doi: 10.1021/acsbiomaterials.9b01245.
- [103] M. Cazzola, I. Corazzari, E. Prenesti, E. Bertone, E. Vernè, i S. Ferraris, „Bioactive glass coupling with natural polyphenols: Surface modification, bioactivity and anti-oxidant ability”, *Appl. Surf. Sci.*, t. 367, s. 237–248, mar. 2016, doi: 10.1016/j.apsusc.2016.01.138.
- [104] G. Ferlenda *i in.*, „Surface Functionalization of a Silica-Based Bioactive Glass with Compounds from *Rosa canina* Bud Extracts”, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, t. 7, nr 1, s. 96–104, sty. 2021, doi: 10.1021/acsbiomaterials.0c01170.
- [105] R. Zhou, S. Si, i Q. Zhang, „Water-dispersible hydroxyapatite nanoparticles synthesized in aqueous solution containing grape seed extract”, *Appl. Surf. Sci.*, t. 258, nr 8, s. 3578–3583, luty 2012, doi: 10.1016/j.apsusc.2011.11.119.
- [106] B. Tang, H. Yuan, L. Cheng, X. Zhou, X. Huang, i J. Li, „Effects of gallic acid on the morphology and growth of hydroxyapatite crystals”, *Arch. Oral Biol.*, t. 60, nr 1, s. 167–173, sty. 2015, doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.09.011.
- [107] S. Bodhak, S. Bose, i A. Bandyopadhyay, „Role of surface charge and wettability on early stage mineralization and bone cell–materials interactions of polarized hydroxyapatite”, *Acta Biomater.*, t. 5, nr 6, s. 2178–2188, lip. 2009, doi: 10.1016/j.actbio.2009.02.023.

- [108] C. Bussy i K. Kostarelos, „Carbon nanotubes in medicine and biology — Safety and toxicology”, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, t. 65, nr 15, s. 2061–2062, grudz. 2013, doi: 10.1016/j.addr.2013.11.001.
- [109] M. F. L. De Volder, S. H. Tawfick, R. H. Baughman, i A. J. Hart, „Carbon Nanotubes: Present and Future Commercial Applications”, *Science*, t. 339, nr 6119, s. 535–539, luty 2013, doi: 10.1126/science.1222453.
- [110] A. Benko *i in.*, „Anticancer and antibacterial properties of carbon nanotubes are governed by their functional groups”, *Nanoscale*, t. 15, nr 45, s. 18265–18282, 2023, doi: 10.1039/D3NR02923A.
- [111] A. Benko *i in.*, „Covalently bonded surface functional groups on carbon nanotubes: from molecular modeling to practical applications”, *Nanoscale*, t. 13, nr 22, s. 10152–10166, 2021, doi: 10.1039/D0NR09057C.
- [112] R. N. Jana i C. Im, „Isothermal Crystallization Behavior of Poly(ϵ -Caprolactone) Diol/Functionalized-Multiwalled Carbon Nanotube Composites”, *Int. J. Polym. Anal. Charact.*, t. 14, nr 5, s. 418–436, lip. 2009, doi: 10.1080/10236660903031074.
- [113] T.-H. Zhao, K.-L. Yang, R.-T. Zeng, A.-K. Du, M. Wang, i J.-B. Zeng, „Crystallization Behavior of Poly(sodium 4-styrenesulfonate)-Functionalized Carbon Nanotubes Filled Poly(ϵ -caprolactone) Nanocomposites”, *Ind. Eng. Chem. Res.*, t. 55, nr 7, s. 1881–1889, luty 2016, doi: 10.1021/acs.iecr.5b03419.
- [114] S. Shao *i in.*, „Controlled green tea polyphenols release from electrospun PCL/MWCNTs composite nanofibers”, *Int. J. Pharm.*, t. 421, nr 2, s. 310–320, grudz. 2011, doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.09.033.
- [115] R. Dubey, D. Dutta, A. Sarkar, i P. Chattopadhyay, „Functionalized carbon nanotubes: synthesis, properties and applications in water purification, drug delivery, and material and biomedical sciences”, *Nanoscale Adv.*, t. 3, nr 20, s. 5722–5744, paź. 2021, doi: 10.1039/D1NA00293G.
- [116] N. Janudin, L. C. Abdullah, N. Abdullah, F. M. Yasin, N. M. Saidi, i N. A. Mohd Kasim, „Characterization of Amide and Ester Functionalized Multiwalled Carbon Nanotubes”, *Asian J. Chem.*, t. 30, nr 7, s. 1613–1616, 2018, doi: 10.14233/ajchem.2018.21274.
- [117] W. Wu, W. Jiang, W. Zhang, D. Lin, i K. Yang, „Influence of Functional Groups on Desorption of Organic Compounds from Carbon Nanotubes into Water: Insight into Desorption Hysteresis”, *Environ. Sci. Technol.*, s. 130726083137003, lip. 2013, doi: 10.1021/es401567g.

- [118] D. Lin i B. Xing, „Adsorption of Phenolic Compounds by Carbon Nanotubes: Role of Aromaticity and Substitution of Hydroxyl Groups”, *Environ. Sci. Technol.*, t. 42, nr 19, s. 7254–7259, paź. 2008, doi: 10.1021/es801297u.
- [119] V. Patel, U. Joshi, i A. Joshi, „Investigating the mechanical properties of nonfunctionalized MWCNT reinforced polymer nanocomposites”, *Mater. Today Proc.*, t. 43, s. 3511–3515, 2021, doi: 10.1016/j.matpr.2020.09.812.
- [120] P. Zygoń, M. Gwoździk, J. Peszke, i Z. Nitkiewicz, „Comparison of Properties of Polymer Composite Materials Reinforced with Carbon Nanotubes”, *Arch. Metall. Mater.*, t. 60, nr 1, s. 193–198, kwi. 2015, doi: 10.1515/amm-2015-0031.
- [121] A. Wurm *i in.*, „Crystallization of poly(ϵ -caprolactone)/MWCNT composites: A combined SAXS/WAXS, electrical and thermal conductivity study”, *Polymer*, t. 55, nr 9, s. 2220–2232, kwi. 2014, doi: 10.1016/j.polymer.2014.02.069.
- [122] Y.-Y. Liang, J.-Z. Xu, X.-Y. Liu, G.-J. Zhong, i Z.-M. Li, „Role of surface chemical groups on carbon nanotubes in nucleation for polymer crystallization: Interfacial interaction and steric effect”, *Polymer*, t. 54, nr 23, s. 6479–6488, lis. 2013, doi: 10.1016/j.polymer.2013.09.027.
- [123] L. Pan, X. Pei, R. He, Q. Wan, i J. Wang, „Multiwall carbon nanotubes/polycaprolactone composites for bone tissue engineering application”, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, t. 93, s. 226–234, maj 2012, doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.01.011.
- [124] Y. E. Bulbul i N. Dilsiz, „Polycaprolactone-Based Composite Electrospun Nanofibers as Hybrid Biomaterial Systems Containing Hydroxyl- or Carboxylic Acid-Functionalized Multiwall Carbon Nanotubes”, *Fibers Polym.*, t. 25, nr 5, s. 1701–1712, maj 2024, doi: 10.1007/s12221-024-00548-x.
- [125] Y. Xue, Q. Zhao, i C. Luan, „The Thermodynamic Relations between the Melting Point and the Size of Crystals”, *J. Colloid Interface Sci.*, t. 243, nr 2, s. 388–390, lis. 2001, doi: 10.1006/jcis.2001.7837.
- [126] R. N. Oliveira *i in.*, „FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing”, *Matér. Rio Jan.*, t. 21, nr 3, s. 767–779, wrz. 2016, doi: 10.1590/S1517-707620160003.0072.
- [127] D. R. Pompeu, Y. Larondelle, H. Rogez, O. Abbas, J. A. F. Pierna, i V. Baeten, „Characterization and discrimination of phenolic compounds using Fourier transform Raman spectroscopy and chemometric tools”, *BASE*, s. 13–28, 2018, doi: 10.25518/1780-4507.16270.

- [128] R. M. Lucente-Schultz *i in.*, „Antioxidant Single-Walled Carbon Nanotubes”, *J. Am. Chem. Soc.*, t. 131, nr 11, s. 3934–3941, mar. 2009, doi: 10.1021/ja805721p.
- [129] P. Vardakas *i in.*, „Pristine, carboxylated, and hybrid multi-walled carbon nanotubes exert potent antioxidant activities in in vitro-cell free systems”, *Environ. Res.*, t. 220, s. 115156, mar. 2023, doi: 10.1016/j.envres.2022.115156.
- [130] Y. Tang i J. Singh, „Controlled delivery of aspirin: Effect of aspirin on polymer degradation and in vitro release from PLGA based phase sensitive systems”, *Int. J. Pharm.*, t. 357, nr 1–2, s. 119–125, cze. 2008, doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.01.053.
- [131] A. Frank, S. K. Rath, i S. S. Venkatraman, „Controlled release from bioerodible polymers: effect of drug type and polymer composition”, *J. Controlled Release*, t. 102, nr 2, s. 333–344, luty 2005, doi: 10.1016/j.jconrel.2004.10.019.
- [132] G. R. Sauer, W. B. Zunic, J. R. Durig, i R. E. Wuthier, „Fourier transform raman spectroscopy of synthetic and biological calcium phosphates”, *Calcif. Tissue Int.*, t. 54, nr 5, s. 414–420, maj 1994, doi: 10.1007/BF00305529.
- [133] C. Rey, O. Marsan, C. Combes, C. Drouet, D. Grossin, i S. Sarda, „Characterization of Calcium Phosphates Using Vibrational Spectroscopies”, w *Advances in Calcium Phosphate Biomaterials*, B. Ben-Nissan, Red., Berlin, Heidelberg: Springer, 2014, s. 229–266. doi: 10.1007/978-3-642-53980-0_8.
- [134] K. L. Larsen i S. Barsberg, „Theoretical and Raman Spectroscopic Studies of Phenolic Lignin Model Monomers”, *J. Phys. Chem. B*, t. 114, nr 23, s. 8009–8021, cze. 2010, doi: 10.1021/jp1028239.
- [135] T. Ko, W. Kuo, i Y. Chang, „Raman study of the microstructure changes of phenolic resin during pyrolysis”, *Polym. Compos.*, t. 21, nr 5, s. 745–750, paź. 2000, doi: 10.1002/pc.10229.
- [136] E. A. Sagitova *i in.*, „Raman analysis of polyethylene glycols and polyethylene oxides”, *J. Phys. Conf. Ser.*, t. 999, s. 012002, kwi. 2018, doi: 10.1088/1742-6596/999/1/012002.
- [137] Y. Wang *i in.*, „Innovative Biomaterials for Bone Tumor Treatment and Regeneration: Tackling Postoperative Challenges and Charting the Path Forward”, *Adv. Healthc. Mater.*, t. 13, nr 16, s. 2304060, cze. 2024, doi: 10.1002/adhm.202304060.
- [138] J. Gill i R. Gorlick, „Advancing therapy for osteosarcoma”, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, t. 18, nr 10, s. 609–624, paź. 2021, doi: 10.1038/s41571-021-00519-8.

- [139] J. Bian *i in.*, „Research progress in the mechanism and treatment of osteosarcoma”, *Chin. Med. J. (Engl.)*, t. 136, nr 20, s. 2412–2420, paź. 2023, doi: 10.1097/CM9.0000000000002800.
- [140] C. M. Yang, K. Chaturanga, J. S. Lee, i W. H. Park, „Effects of polyphenols on the thermal decomposition, antioxidative, and antimicrobial properties of poly(vinyl alcohol) and poly(vinyl pyrrolidone)”, *Polym. Test.*, t. 116, s. 107786, grudz. 2022, doi: 10.1016/j.polymertesting.2022.107786.
- [141] D. Zhang *i in.*, „Antibacterial effects and dissolution behavior of six bioactive glasses”, *J. Biomed. Mater. Res. A*, t. 93A, nr 2, s. 475–483, maj 2010, doi: 10.1002/jbm.a.32564.
- [142] T. Rojasawasthien *i in.*, „Vignacyanidin Polyphenols Isolated from Vigna Angularis Bean Promote Osteoblast Differentiation”, *In Vivo*, t. 35, nr 2, s. 883–888, 2021, doi: 10.21873/invivo.12328.
- [143] M.-N. Horcajada i E. Offord, „Naturally Plant-Derived Compounds: Role in Bone Anabolism”, *Curr. Mol. Pharmacol.*, t. 5, nr 2, s. 205–218, maj 2012, doi: 10.2174/1874467211205020205.
- [144] H. Slika *i in.*, „Therapeutic potential of flavonoids in cancer: ROS-mediated mechanisms”, *Biomed. Pharmacother.*, t. 146, s. 112442, luty 2022, doi: 10.1016/j.biopha.2021.112442.
- [145] S. Carpi *i in.*, „miRNA Modulation and Antitumor Activity by the Extra-Virgin Olive Oil Polyphenol Oleacein in Human Melanoma Cells”, *Front. Pharmacol.*, t. 11, s. 574317, wrz. 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.574317.
- [146] Y.-C. Lo *i in.*, „Carnosol-Induced ROS Inhibits Cell Viability of Human Osteosarcoma by Apoptosis and Autophagy”, *Am. J. Chin. Med.*, t. 45, nr 08, s. 1761–1772, sty. 2017, doi: 10.1142/S0192415X17500951.
- [147] M. Cazzola *i in.*, „Bioactive glasses functionalized with polyphenols: in vitro interactions with healthy and cancerous osteoblast cells”, *J. Mater. Sci.*, t. 52, nr 15, s. 9211–9223, sie. 2017, doi: 10.1007/s10853-017-0872-5.
- [148] O. Karadas, G. Mese, i E. Ozcivici, „Cytotoxic Tolerance of Healthy and Cancerous Bone Cells to Anti-microbial Phenolic Compounds Depend on Culture Conditions”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, t. 188, nr 2, s. 514–526, cze. 2019, doi: 10.1007/s12010-018-02934-7.

