

POLITECHNIKA POZNAŃSKA

WYDZIAŁ TECHNOLOGII CHEMICZNEJ

Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej

Zakład Polimerów



Rozprawa doktorska

**Projektowanie i otrzymywanie funkcjonalnych polimerów
gwiaździstych o działaniu antybakteryjnym i kontrastującym
do modyfikacji cementów kostnych**

mgr inż. Grzegorz Przesławski

Promotor: dr hab. inż. Agnieszka Marcinkowska, prof. PP

Promotor pomocniczy: dr inż. Katarzyna Szcześniak

Poznań 2025

"What doesn't kill you makes you wish you were dead"

Bring Me The Horizon

Serdecznie dziękuję

Pani dr hab. inż. Agnieszce Marcinkowskiej, prof. PP

*za inspirujące rozmowy, cenne uwagi, wskazówki,
pomoc merytoryczną, zaangażowanie, bezustanną wiarę i motywację
oraz przekazaną wiedzę i możliwość rozwoju pod jej skrzydłami.*

Serdecznie dziękuję

Pani dr inż. Katarzynie Szcześniak

za cenne rady, zaangażowanie, pomoc i wsparcie

oraz przekazaną wiedzę i możliwość rozwoju.

*Szczególne podziękowania kieruję do moich rodziców i najbliższych,
za obecność, wsparcie, dobre słowo i wiarę w moje możliwości.*

Streszczenie

Pomimo zaawansowanych badań nad skutecznością uwalniania leków z cementów kostnych i poprawą ich właściwości antybakteryjnych, wciąż istnieje potrzeba udoskonalenia ich parametrów funkcjonalnych. Dlatego celem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie innowacyjnych modyfikatorów właściwości cementów kostnych nadających im rozszerzoną funkcjonalność, umożliwiających przedłużone uwalnianie substancji aktywnych oraz zapewniających trwałą aktywność antybakteryjną i kontrastującą.

W ramach pracy zaprojektowano i przeprowadzono modyfikację związków o właściwościach antybakteryjnych i kontrastujących, umożliwiającą wprowadzenie do ich struktury grup funkcyjnych reaktywnych w procesie polimeryzacji. Otrzymano również polimery gwiaździste (ang. *star polymers*, STR), metodą kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej ATRP, mające pełnić funkcję nośników substancji aktywnych (antybakteryjnych i kontrastującego) zarówno wbudowanych kowalencyjnie w ich strukturę jak i immobilizowanych na drodze tworzenia kompleksów. W strukturę polimerów gwiaździstych kowalencyjnie włączono pochodne ampicyliny i eugenolu, w celu nadania im właściwości antybakteryjnych, jak również pochodną gadolinu, nadającą właściwości kontrastujące. Dodatkowo antybiotyki, jak również nanocząstki srebra (AgNPs) oraz eugenol (EU), wprowadzono w strukturę polimerów gwiaździstych w wyniku niekowalencyjnych oddziaływań fizycznych (kompleksy polimer gwiaździsty : substancja aktywna). Równolegle przeprowadzono syntezę polidopaminy, mającą pełnić funkcję czynnika bioaktywnego. Następnie analizowano wpływ przygotowanych dodatków na właściwości cementów kostnych. Ponadto badania uzupełniono o wpływ eugenolu i antybiotyków.

Modyfikowane środki antybakteryjne i kontrastujące oraz polimery gwiaździste analizowano metodą magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ATR-FTIR), chromatografii żelowej (GPC) i gazowej (GC), dynamicznego rozpraszania światła (DLS) oraz w przypadku środków kontrastujących metodą rezonansu magnetycznego (MRI). Następnie wprowadzono je do fazy proszkowej metakrylowych cementów kostnych opracowanych na bazie kopolimerów metakrylowych i metakrylanu metylu, modyfikowanych metakrylanem 2-hydroksyetylu i dimetakrylanem glikolu trietylenowego, lub do komercyjnych cementów, a uzyskane materiały poddano ocenie zgodności z wymaganiami normy ISO 5833:2002 (tj. wytrzymałość na ściskanie, czas wiązania, maksymalna temperatura utwardzania). Zastosowane modyfikacje pozwoliły na uzyskanie materiałów o wytrzymałości na ściskanie > 90 MPa, kontrolowanej kinetyce utwardzania oraz maksymalnej temperaturze utwardzania poniżej 60 °C, co może ograniczyć ryzyko martwicy tkanek. Ponadto, analiza metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) wykazała wysoki stopień konwersji wiązań podwójnych grup metakrylowych (ponad 95%). Cementy kostne badano również pod kątem uwalniania substancji aktywnych metodą spektroskopii w zakresie nadfioletu i promieniowania widzialnego (UV-Vis).

Zastosowanie odpowiednich modyfikatorów, jak kompleksy polimerów gwiaździstych, polidopamina, znacząco poprawiło stężenie uwalnianych antybiotyków nawet o kilkaset procent. Badania aktywności przeciwbakteryjnej wobec szczepów *E. coli* i *S. aureus* wykazały skuteczne działanie materiałów zawierających pochodne eugenolu oraz kompleksy polimeru gwiaździstego i czynnika antybakteryjnego (STR:AMP, STR:RIF, STR:EU, STR-AgNPs), a także modyfikowane polimery gwiaździste (STR-EU-MAA, STR-AMP). Metoda ATR-FTIR umożliwiła identyfikację i potwierdzenie występowania oddziaływań pomiędzy składnikami, natomiast metodą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) potwierdzono jednorodne rozmieszczenie nośników w matrycy cementu kostnego oraz jego porowatą strukturę, która wpłynęła na poprawę uwalniania leków. Dodatkowo metodą MRI potwierdzono działanie kontrastujące otrzymanych pochodnych gadolinu.

Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowanie zaprojektowanych w ramach pracy dodatków modyfikujących właściwości cementów kostnych, w tym przede wszystkim wielofunkcyjnych polimerów gwiaździstych, pozwala na opracowanie materiałów nowej generacji, które mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu złamań, infekcji kostnych oraz jako podłoże dla implantów, łącząc w jednej strukturze materiałowej właściwości terapeutyczne i mechaniczne.

Abstract

Despite extensive research on improving drug release efficiency from the bone cements and enhancing their antibacterial properties, there remains a need to further optimize their functional parameters. Therefore, the objective of this doctoral dissertation was to develop innovative bone cement modifiers with extended functionalities, enabling prolonged release of active substances while ensuring sustained antibacterial and contrast-enhancing activity.

In this work, antibacterial and contrast agents were designed and modified to introduce polymerizable functional groups into their structures. Star polymers (STR) were synthesized *via* atom transfer radical polymerization (ATRP) to serve as a carriers of active substances (both antibacterial and contrast agents), incorporated either covalently into their structure or immobilized through complex formation. Ampicillin and eugenol derivatives were covalently introduced into the star polymer framework to impart antibacterial properties, while a gadolinium derivative was incorporated to provide contrast functionality. Additionally, antibiotics, silver nanoparticles (AgNPs), and eugenol (EU) were introduced into the star polymer structure through noncovalent physical interactions (star polymer : active substance complexes). In parallel, polydopamine was synthesized to act as a bioactive component. The effects of these additives on bone cement properties were subsequently investigated, alongside complementary studies on the influence of eugenol and antibiotics.

The modified antibacterial and contrast agents, as well as the star polymers, were analyzed using nuclear magnetic resonance (NMR), attenuated total reflectance infrared spectroscopy (ATR-FTIR), gel permeation chromatography (GPC), gas chromatography (GC), dynamic light scattering (DLS), and, in the case of contrast agents, magnetic resonance imaging (MRI). The obtained systems were then incorporated into the powder phase of methacrylate-based bone cements prepared from methacrylate copolymers and methyl methacrylate, modified with 2-hydroxyethyl methacrylate and triethylene glycol dimethacrylate, or into commercial bone cements. The resulting materials were evaluated according to ISO 5833:2002 requirements (i.e. compressive strength, setting time, maximum polymerization temperature). The applied modifications yielded materials with compressive strength > 90 MPa, controlled curing kinetics, and a maximum polymerization temperature below 60 °C, thereby reducing the risk of tissue necrosis. Differential scanning calorimetry (DSC) confirmed a high degree of double-bond conversion in methacrylate groups (> 95%). Drug release from bone cements was further evaluated using UV-Vis spectroscopy.

The application of advanced modifiers such as star polymer complexes and polydopamine significantly increased the release of antibiotics, in some cases by several hundred percent. Antibacterial activity assays against *E. coli* and *S. aureus* confirmed the efficacy of materials containing eugenol derivatives, star polymer–antibacterial agent complexes (STR:AMP, STR:RIF,

STR:EU, STR-AgNPs), and covalently modified star polymers (STR-EU-MAA, STR-AMP). ATR-FTIR spectroscopy enabled identification and confirmation of interactions between components, while scanning electron microscopy (SEM) demonstrated uniform distribution of carriers within the bone cement matrix and its porous structure, which facilitated enhanced drug release. Furthermore, MRI confirmed the contrast-enhancing performance of gadolinium derivatives.

The results indicate that the developed bone cement modifiers, particularly multifunctional star polymers, enable the design of next-generation materials that integrate therapeutic and mechanical functions within a single system. These materials hold great potential for applications in fracture treatment, management of bone infections, and as implant-supporting scaffolds.

Spis treści

Spis skrótów	13
Wprowadzenie	18
I. Część literaturowa	20
1. Cementy kostne	20
1.1. Rodzaje cementów kostnych	20
2. Akrylowe cementy kostne	22
2.1. Historia cementów kostnych	22
2.2. Skład cementów kostnych	24
2.3. Właściwości cementów kostnych	26
2.3.1. Parametry utwardzania cementu	26
2.3.2. Lepkość	28
2.3.3. Skurcz polimeryzacyjny	28
2.3.4. Właściwości mechaniczne	29
2.3.5. Uwalnianie niezwiązanych reagentów z cementu kostnego	30
2.3.6. Biokompatybilność	30
2.3.7. Porowatość	31
3. Sposoby modyfikacji akrylowych cementów kostnych	32
3.1. Właściwości mechaniczne	32
3.2. Temperatura maksymalna i czas utwardzania	36
3.3. Właściwości antybakteryjne	39
3.3.1. Dodatek antybiotyków	39
3.3.2. Inne środki antybakteryjne	43
3.3.3. Poprawa uwalniania substancji antybakteryjnych	45
4. Polimeryzacja rodnikowa	48
4.1. Polimeryzacja wolnorodnikowa	48
4.2. Polimeryzacja rodnikowa z przeniesieniem atomu	59
4.3. Polimery gwiaździste	61
II. Cel pracy	66
III. Część eksperymentalna	70
1. Metodyka badawcza	70
1.1. Odczynniki	70
1.1.1. Monomery	70
1.1.2. Kopolimery i oligomery	72
1.1.3. Cementy komercyjne	72

1.1.4.	Inicjatory i katalizatory	72
1.1.5.	Dodatki i modyfikatory	74
1.1.6.	Rozpuszczalniki	76
1.2.	Sprzęt i aparatura badawcza	76
1.2.1.	Aparatura	76
1.2.2.	Sprzęt laboratoryjny	77
1.3.	Metodyka badawcza	77
1.3.1.	Syntezy	77
1.3.1.1.	Synteza modyfikowanych monomerów	77
1.3.1.2.	Synteza polidopaminy (PDA)	79
1.3.1.3.	Synteza polimerów gwiaździstych	80
1.3.1.4.	Otrzymywanie związków kompleksowych	82
1.3.1.5.	Synteza cementów kostnych	83
1.3.2.	Charakterystyka otrzymanych materiałów	84
1.3.2.1.	Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera – FTIR	84
1.3.2.2.	Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego – NMR	84
1.3.2.3.	Chromatografia żelowa (GPC)	85
1.3.2.4.	Chromatografia gazowa (GC)	85
1.3.2.5.	Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS)	86
1.3.2.6.	Spektroskopia UV-Vis	86
1.3.2.7.	Izotermiczna różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC)	87
1.3.2.8.	Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)	88
1.3.2.9.	Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)	88
1.3.2.10.	MRI	88
1.3.2.11.	Czas wiązania cementu kostnego i maksymalna temperatura	89
1.3.2.12.	Wytrzymałość na ściskanie (σ)	89
2.	Wyniki i dyskusja	93
2.1.	Syntezy	93
2.1.1.	Synteza modyfikowanych monomerów	93
2.1.2.	Synteza polidopaminy	110
2.1.3.	Synteza polimerów gwiaździstych	111
2.1.4.	Otrzymywanie kompleksów	127
2.2.	Dobór składu cementu	146
2.2.1.	Dobór monomerów	146
2.2.2.	Dobór stężenia składników układu inicjującego	150

2.3.	Modyfikacje cementów kostnych.....	159
2.3.1.	Modyfikacje antybiotykami.....	160
2.3.1.1.	Antybiotyki.....	160
2.3.1.2.	Kompleks polimer gwiazdzisty:ryfampicyna.....	165
2.3.1.3.	Kompleks polimer gwiazdzisty:ampicylina	171
2.3.1.4.	Polimer gwiazdzisty modyfikowany ampicyliną	173
2.3.2.	Modyfikacje eugenolem	174
2.3.2.1.	Eugenol	175
2.3.2.2.	Kompleksy CP:EU i STR:EU.....	182
2.3.2.3.	Pochodne eugenolu (EU-DT)	187
2.3.2.4.	Polimery gwiazdziste z wbudowanym eugenolem.....	197
2.3.2.5.	Eugenol i pochodne eugenolu wraz z antybiotykami.....	202
2.3.3.	Modyfikacje polimerami gwiazdzistymi ze srebrem	207
2.3.4.	Modyfikacje gadolinem	213
2.3.5.	Modyfikacje polidopamina.....	220
IV.	Wnioski i podsumowanie prowadzonych badań	229
V.	Bibliografia	234
	Spis rysunków.....	255
	Spis tabel	261
	Dorobek naukowy	262

Spis skrótów

Skrót	Nazwa
AA	kwas akrylowy (ang. <i>acrylic acid</i>)
Ace	aceton (ang. <i>acetone</i>)
AE	skuteczność antybiotyku (ang. <i>antibiotic effectiveness</i>)
AgNPs	nanocząstki srebra (ang. <i>silver nanoparticles</i>)
ALBC	cement kostny z dodatkiem antybiotyku (ang. <i>antibiotic-loaded bone cement</i>)
ALN	alendronian (ang. <i>alendronate</i>)
AMP	ampicylina (ang. <i>ampicillin</i>)
AMP-PMMA	poli(metakrylan metylu) modyfikowany ampicyliną (ang. <i>poly(methyl methacrylate) modified with ampicillin</i>)
ASTM	Amerykańskie Stowarzyszenie Badań i Materiałów (ang. <i>American Society for Testing and Materials</i>)
ATR-FTIR	spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia (ang. <i>attenuated total reflectance</i>) w podczerwieni z transformacją Fouriera
ATRP	polimeryzacja rodnikowa z przeniesieniem atomu (ang. <i>atom transfer radical polymerization</i>)
AuNPs	nanocząstki złota (ang. <i>gold nanoparticles</i>)
BC	cement kostny (ang. <i>bone cement</i>)
BG	bioaktywne szkło (ang. <i>bioactive glass</i>)
BMA	metakrylan butylu (ang. <i>butyl methacrylate</i>)
BPO	nadtlenek benzoilu (ang. <i>benzoyl peroxide</i>)
BTTMA	metakrylan pochodzący z benzotiazolu (ang. <i>benzothiazole-based methacrylate</i>)
CD	cyklodekstryna (ang. <i>cyclodextrin</i>)
CMC	karboksymetyloceluloza (ang. <i>carboxymethylcellulose</i>)
CNT	nanorurki węglowe (ang. <i>carbon nanotubes</i>)
COSY	dwuwymiarowa korelacyjna spektroskopia NMR (ang. <i>correlation spectroscopy</i>)
CP	Captisol® - sól sodowa sulfobutyloeteru β -cyklodekstryny (ang. <i>sulfobutylether-β-cyclodextrin sodium salt</i>)
CPC	cement fosforanowo-wapniowy (ang. <i>calcium-phosphate cement</i>)
CPI	hamowanie proliferacji komórek (ang. <i>cyclin-dependent kinase inhibitor</i>)
CRP	kontrolowana polimeryzacja żyjąca (ang. <i>controlled radical polymerization</i>)
$\bar{D}$	dyspersyjność (ang. <i>dispersity</i>)
DCC	<i>N,N'</i> -dicykloheksylokarbodiimid (ang. <i>N,N'-dicyclohexylcarbodiimide</i>)
DCM	dichlorometan (ang. <i>dichloromethane</i>)
DCU	dicykloheksylomocznik (ang. <i>dicyclohexylurea</i>)
DAHCl	chlorowodorek dopaminy (ang. <i>dopamine hydrochloride</i>)
DLS	dynamiczne rozpraszanie światła (ang. <i>dynamic light scattering</i>)
DMA	<i>N,N</i> -dimetyloanilina (ang. <i>N,N-dimethylaniline</i>)
DMAEMA	metakrylan 2-(dimetyloamino)etylu (ang. <i>2-(dimethylamino)ethyl methacrylate</i>)
DMAP	4-dimetyloaminopirydyna (ang. <i>4-dimethylaminopyridine</i>)
DMF	<i>N,N</i> -dimetyloformamid (ang. <i>N,N-dimethylformamide</i>)
DMPT	<i>N,N</i> -dimetylo- <i>p</i> -toluidyna (ang. <i>N,N-dimethyl-p-toluidine</i>)

DOSY	spektroskopia dyfuzyjna (ang. <i>diffusion-ordered spectroscopy</i>)
DOX	doksorubicyna (ang. <i>doxorubicin</i>)
DP	stopień polimeryzacji (ang. <i>degree of polymerization</i>)
DPSC	komórki macierzyste miazgi zębowej (ang. <i>dental pulp stem cells</i>)
DSC	różnicowa kalorymetria skaningowa (ang. <i>differential scanning calorimetry</i>)
DSDMA	disiarczek bis(2-metakryloilo)oksyetylu (ang. <i>bis(2-methacryloyl)oxyethyl disulfide</i>)
EA	akrylan etylu (ang. <i>ethyl acrylate</i>)
EBiB	α -bromoizomaślan etylu (ang. <i>ethyl α-bromoisobutyrate</i>)
EGDM	dimetakrylan glikolu etylenowego (ang. <i>ethylene glycol dimethacrylate</i>)
EMCM	European Medical Contract Manufacturing B.V.
EtOH	etanol (ang. <i>ethanol</i>)
EU	eugenol (ang. <i>eugenol</i>)
EU-DT	pochodne eugenolu (ang. <i>eugenol derivatives</i>)
EU-MAA	metakrylan eugenolu (ang. <i>eugenol methacrylate</i>)
EU-T2	4-(3((2-(2-(merkaptioetoksy)etoksy)etylo)tio)propylo)-2-metoksyfenol (ang. <i>4-(3((2-(2-(mercaptoethoxy)ethoxy)ethyl)thio)propyl)-2-methoxyphenol</i>)
FDA	Amerykańska Agencja Żywności i Leków (ang. <i>Food and Drug Administration</i>)
FGM	funkcjonalne materiały grafenowe (ang. <i>functional graphene materials</i>)
FTIR	spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
G	grafen (ang. <i>graphene</i>)
Gd(MAA) ₃	metakrylan gadolinu (III) (ang. <i>gadolinium(III) methacrylate</i>)
GIC	cementy szkło-jonomerowe (ang. <i>glass ionomer cements</i>)
GO	tlenek grafenu (ang. <i>graphene oxide</i>)
GPC	chromatografia żelowa (ang. <i>gel permeation chromatography</i>)
GS	siarczan gentamycyny (ang. <i>gentamicin sulfate</i>)
GTMC	gentamycyna (ang. <i>gentamicin</i>)
HA	hydroksyapatyt (ang. <i>hydroxyapatite</i>)
HEMA	metakrylan 2-hydroksyetylu (ang. <i>2-hydroxyethyl methacrylate</i>)
HMBC	heteronuklearna spektroskopia korelacji wiązań wielokrotnych (ang. <i>heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy</i>)
HMTETA	1,1,4,7,10,10-heksametylotrietylenotetramina (ang. <i>1,1,4,7,10,10-Hexamethyltriethylenetetramine</i>)
HPMC	hydroksypropylometyloceluloza (ang. <i>hydroxypropylmethylcellulose</i>)
HQ	hydrochinon (ang. <i>hydroquinone</i>)
HSQC	heteronuklearna spektroskopia korelacji pojedynczych kwantów (ang. <i>heteronuclear single quantum coherence</i>)
H_{tot}	całkowite ciepło reakcji polimeryzacji (ang. <i>total reaction heat</i>)
In [•]	pierwotne rodniki inicjujące (ang. <i>primary initiating radicals</i>)
ISO	Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (ang. <i>International Organization for Standardization</i>)
k_p	ogólna stała szybkości propagacji (ang. <i>propagation kinetic parameter</i>)
L	faza ciekła (ang. <i>liquid phase</i>)
LA	kwas linolenowy (ang. <i>linolenic acid</i>)

MA	akrylan metylu (ang. <i>methyl acrylate</i>)
MAA	kwas metakrylowy (ang. <i>methacrylic acid</i>)
MALS	detektor wielokątowego rozpraszania światła (ang. <i>multi-angle light scattering detector</i>)
MDR	rozporządzenie w sprawie wyrobów medycznych (ang. <i>Medical Device Regulation</i>)
MeOH	metanol (ang. <i>methanol</i>)
MI	makroinicjator (ang. <i>macroinitiator</i>)
MIC	minimalny poziom inhibicji (ang. <i>minimum inhibitory concentration</i>)
MMA	metakrylan metylu (ang. <i>methyl methacrylate</i>)
MMT	montmorylonit (ang. <i>montmorillonite</i>)
M_n	liczbowo średnia masa cząsteczkowa (ang. <i>numer average molecular weight</i>)
$M_{n,abs}$	absolutna masa cząsteczkowa (ang. <i>absolute molecular weight</i>)
$M_{n,app}$	względna liczbowo średnia masa cząsteczkowa (ang. <i>number average molecular weights</i>)
MPS	γ -metakryloksypropylotrimetoksylan (ang. <i>γ-methacryloxypropyltrimethoxysilane</i>)
MRSA	gronkowiec złocisty oporny na metycylinę (ang. <i>methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>)
MSC	mezenchymalne komórki zrębowe (ang. <i>mesenchymal stem cells</i>)
MSN	mezoporowate nanocząstki krzemionki (ang. <i>mesoporous silica nanoparticles</i>)
MSSA	gronkowiec złocisty wrażliwy na metycylinę (ang. <i>methicillin-sensitive Staphylococcus aureus</i>)
M_w	wagowo średnia masa cząsteczkowa (ang. <i>weight average molecular weight</i>)
MWCO	membrana o określonej masie cząsteczkowej (ang. <i>molecular weight cut-off membrane</i>)
MWD	rozkład masy cząsteczkowej (ang. <i>molecular-weight distribution</i>)
nBMA	metakrylan n-butylu (ang. <i>n-butyl methacrylate</i>)
NMR	magnetyczny rezonans jądrowy (ang. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
NOESY	spektroskopia jądrowego efektu Overhausera (ang. <i>nuclear overhauser effect spectroscopy</i>)
P	faza proszkowa (ang. <i>powder phase</i>)
PAA	poli(kwas akrylowy) (ang. <i>poly(acrylic acid)</i>)
PAMAM	poliamidoamina (ang. <i>Poly(amidoamine)</i>)
PBS	wodny roztwór soli fizjologicznej (0,9% NaCl) buforowanej fosforanami (ang. <i>phosphate buffered saline</i>)
PDA	polidopamina (ang. <i>polidopamine</i>)
PDI	wskaźnik polidispersyjności (ang. <i>polydispersity index</i>)
PDO	polidioksanon (ang. <i>polydioxanone</i>)
PEA	O-fosfoetanolamina (ang. <i>O-phosphoethanolamine</i>)
PEG	poli(glikol etylenowy) (ang. <i>poly(ethylene glycol)</i>)
PEG ₆ MA	metakrylan poli(glikolu etylenowego) $M_w = 360$ (ang. <i>poly(ethylene glycol) methacrylate</i>)
PEG ₉ MEM	metakrylan eteru metylowego poli(glikolu etylenowego) $M_w = 500$ (ang. <i>poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate</i>)

PEG ₄₅ MEM	metakrylan eteru metylowego poli(glikolu etylenowego) $M_w = 2080$ (ang. <i>poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate</i>)
PEG ₄ Br	2-bromo-N-(2-(2-(2-hydroksyetoxy)etoksy)etylo)-2-metylopropanoamid (ang. <i>2-bromo-N-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-2-methylpropanoamide</i>)
PEO	poli(tlenek etylenu) (ang. <i>poly(ethylene oxide)</i>)
PET	poli(tereftalan etylenu) (ang. <i>polyethylene terephthalate</i>)
p^f	końcowy stopień przereagowania (ang. <i>final conversion</i>)
PR	komercyjny cement kostny Palacos R (ang. <i>commercially available bone cement Palacos R</i>)
PR+G	komercyjny cement kostny z gentamycyną Palacos R+G (ang. <i>commercially available bone cement with gentamicin Palacos R+G</i>)
PLLA	poli(kwas L-mlekowy) (ang. <i>poly-L-lactic acid</i>)
p^{max}	stopień przereagowania, przy którym układ osiąga maksymalną szybkość polimeryzacji (ang. <i>conversion at which the polymerization rate reaches the maximum</i>)
PMDETA	<i>N,N,N',N'',N'''</i> -pentametylodietietylenotriamina (ang. <i>N,N,N',N'',N'''-Pentamethyldiethylenetriamine</i>)
PMMA	poli(metakrylan metylu) (ang. <i>poly(methyl methacrylate)</i>)
PNIPAAm	poli(<i>N</i> -izopropylakrylamid) (ang. <i>poly(N-isopropyl acrylamide)</i>)
PPF	polipropylformit (ang. <i>polypropylformit</i>)
PSD	rozkład wielkości cząstek (ang. <i>particle size distribution</i>)
PTFE	politetrafluoroetylen (ang. <i>polytetrafluoroethylene</i>)
PU	poliuretan (ang. <i>polyurethane</i>)
QAMA	jodek piperazynooktyloamoniowy (ang. <i>piperazine-octylammonium iodide</i>)
rGO	zredukowany tlenek grafenu (ang. <i>reduced graphene oxide</i>)
RIF	ryfampicyna (ang. <i>rifampicin</i>)
R_p	szybkość polimeryzacji (ang. <i>polymerization rate</i>)
R_p^{max}	maksymalna szybkość polimeryzacji (ang. <i>maximum polymerization rate</i>)
RP	komercyjny cement kostny Refabocin Plus (ang. <i>commercially available bone cement Refabocin Plus</i>)
SCPS	sferyczne cząsteczki fosforanu wapnia domieszkowane strontem (ang. <i>spherical calcium phosphate particles doped with strontium</i>)
SD	odchylenie standardowe (ang. <i>standard deviation</i>)
SEM	skaningowy mikroskop elektronowy (ang. <i>scanning electron microscope</i>)
semi-IPN	półprzenikająca sieć polimerowa (ang. <i>semi-interpenetrating polymer network</i>)
SF	sól fizjologiczna (ang. <i>physiological saline solution</i>)
SLA	stereolitografia (ang. <i>stereolithography</i>)
Sn(EH) ₂	2-etyloheksanian cyny(II) (ang. <i>tin(II) 2-ethylhexanoate</i>)
SP	polimer gwiazdzisty (ang. <i>star polymer</i>)
STR	podstawowy polimer gwiazdzisty zsyntezowany w ramach niniejszej pracy
STR-AMP-PMMA	polimer gwiazdzisty na bazie poli(metakrylanu metylu) modyfikowanego ampicyliną (ang. <i>poly(methyl methacrylate) modified with ampicillin-based star polymer</i>)
STR-D-EU-MAA	polimer gwiazdzisty modyfikowany metakrylanem eugenolu z monomerem funkcyjnym DMAEMA (ang. <i>star polymer with EU-MAA</i>)

STR–EU-MAA	polimer gwiazdzisty modyfikowany metakrylanem eugenolu (ang. <i>star polymer with EU-MAA</i>)
STR–Gd(MAA) ₃	polimer gwiazdzisty z gadolinem (ang. <i>gadolinium-based star polymer</i>)
t_1	czas ewolucji (ang. <i>evolution time</i>)
T2	1,2-bis(2-merkaptotoksy)etan (ang. <i>1,2-bis(2-mercaptoethoxy)ethane</i>)
T_{amb}	temperatura otoczenia (ang. <i>ambient temperature</i>)
TBAEMA	metakrylan 2-(tert-butyloamino)etylu (ang. <i>2-(tert-butylamino)ethyl methacrylate</i>)
T_c	górną graniczną temperaturę polimeryzacji (ang. <i>ceiling temperature</i>)
TCP	fosforan trójwapniowy (ang. <i>tricalcium phosphate</i>)
t_D	doughing time
TEGDM	dimetakrylan glikolu trietylenowego (ang. <i>triethylene glycol dimethacrylate</i>)
THF	tetrahydrofuran (ang. <i>tetrahydrofuran</i>)
TNT	nanostrukturalne rurki dwutlenku tytanu (ang. <i>nanostructured titanium dioxide tubes</i>)
TKA	całkowita endoprotezoplastyka stawu kolanowego (ang. <i>total knee arthroplasty</i>)
T_{max}	maksymalna temperatura polimeryzacji (ang. <i>maximum polymerization temperature</i>)
t_{max}	czas osiągnięcia maksymalnej szybkości polimeryzacji (ang. <i>time to reach maximum polymerization rate</i>)
TPMA	tris(2-pirydylometylo)amina (ang. <i>Tris(2-pyridylmethyl)amine</i>)
t_{set}	czas utwardzania (ang. <i>setting time</i>)
T_{set}	temperatura utwardzania (ang. <i>setting temperature</i>)
TtEGDM	dimetakrylan glikolu tetraetylenowego (ang. <i>tetraethylene glycol dimethacrylate</i>)
UV-Vis	światło z zakresu promieniowania ultrafioletowego-widzialnego (ang. <i>ultraviolet-visible light</i>)
ΔH_p	ciepło polimeryzacji (ang. <i>polymerization heat</i>)
ΔH_T	całkowita entalpia reakcji (ang. <i>total reaction enthalpy</i>)
σ	wytrzymałość na ściskanie (ang. <i>compressive strength</i>)

Wprowadzenie

Postęp w dziedzinie biomateriałów odgrywa kluczową rolę w rozwoju współczesnej medycyny, szczególnie w zakresie implantologii oraz ortopedii rekonstrukcyjnej. Rosnące potrzeby rynku medycznego, związane z wydłużaniem średniej długości życia oraz wzrostem liczby zabiegów ortopedycznych, generują konieczność opracowywania materiałów o ulepszonych parametrach – zarówno pod względem biogodności, jak i trwałości oraz bezpieczeństwa stosowania. Metakrylowe cementy kostne stanowią grupę materiałów, które dzięki swoim właściwościom mechanicznym i fizykochemicznym znalazły szerokie zastosowanie kliniczne jako wypełniacze ubytków kostnych oraz materiały mocujące implanty. Ich popularność wynika z dobrych właściwości mechanicznych, możliwości łatwego przygotowania oraz krótkiego czasu wiązania w warunkach klinicznych. Jednak pomimo wielu zalet, klasyczne cementy kostne mają istotne ograniczenia, takie jak wysoka temperatura egzotermicznej polimeryzacji mogąca powodować martwicę tkanek, słaba bioaktywność czy niska zdolność do uwalniania substancji aktywnych, dlatego ich skład, mikrostruktura oraz mechanizmy oddziaływania z tkanką kostną wciąż stanowią przedmiot intensywnych badań, ukierunkowanych na optymalizację ich parametrów użytkowych.

W ostatnich latach podejmowane są liczne próby modyfikacji metakrylowych cementów kostnych poprzez wprowadzanie nośników leków, bioaktywnych dodatków czy zmodyfikowanych struktur polimerowych. Jednak większość dostępnych rozwiązań opiera się na wprowadzaniu składników, które tylko częściowo spełniają oczekiwania kliniczne. Dotychczas nie opisano systemów opartych na polimerach gwiazdzystych (ang. *star polymers*), które mogłyby stanowić odpowiedź na wymagania współczesnej praktyki klinicznej, pełniąc jednocześnie funkcję nośnika antybiotyku, czy środka kontrastującego oraz modyfikatora właściwości reologicznych i porowatości cementu kostnego.

Polimery gwiazdziste, ze względu na możliwość projektowania ich właściwości, jak również złożoną architekturę, a także zdolność do kompleksowania substancji aktywnych mogą potencjalnie znaleźć zastosowanie jako inteligentne dodatki do cementów kostnych. Ich struktura umożliwia jednocześnie sprzęgnięcie cząsteczek terapeutycznych różnego typu, czy środków kontrastujących, co pozwala na uzyskanie materiału o właściwościach wielofunkcyjnych. Dodatkowo, odpowiedni dobór składu polimerów i ich integracja z tworzącą się podczas utwardzania matrycą polimerową może prowadzić do powstania porowatej struktury gotowego materiału, co jest korzystne dla wzrostu tkanki kostnej i osteointegracji przy jednoczesnym zachowaniu właściwości mechanicznych cementów kostnych.

Tematyka niniejszej rozprawy doktorskiej jest próbą odpowiedzi na rosnące potrzeby medycyny w zakresie projektowania nowoczesnych cementów kostnych, łączących wysoką funkcjonalność mechaniczną z możliwością integracji biologicznej. Jej celem jest zaprojektowanie

i opracowanie innowacyjnych, wielofunkcyjnych cementów kostnych modyfikowanych polimerami gwiaździstymi, obejmujące w szczególności modyfikację środków antybakteryjnych, proces otrzymywania i funkcjonalizacji polimerów gwiaździstych metodą kontrolowanej polimeryzacji ATRP, a także ich integrację z kompozycją cementu kostnego, a następnie ocenę właściwości fizykochemicznych, mechanicznych, biologicznych i funkcjonalnych uzyskanych materiałów. Zaprojektowane cementy kostne mają spełniać wymagania normy ISO 5833:2002 „*Implants for surgery — Acrylic resin cements*”, która określa standardy jakości i bezpieczeństwa dla tego typu materiałów. Dodatkowo powinny charakteryzować się bardziej efektywnym od komercyjnie dostępnych cementów kostnych uwalnianiem leków, zwiększoną aktywnością przeciwbakteryjną oraz zdolnością do obrazowania w rezonansie magnetycznym, co czyni je obiecującymi kandydatami do zastosowań w ortopedii regeneracyjnej i rekonstrukcyjnej.

I. Część literaturowa

1. Cementy kostne

Wydłużenie życia populacji, starzenie się społeczeństwa, a także zmiana stylu życia, diety i ograniczenie aktywności fizycznej wynikające z rozwoju technologicznego powodują, że coraz więcej osób cierpi z powodu złożonych złamań kości, które wynikają ze skutków zdarzeń traumatycznych, takich jak urazy sportowe, wypadki samochodowe, upadki, lub różnych chorób, takich jak nowotwór kości, zwyrodnienie kości czy osteoporoza [1,2]. W każdym z tych przypadków wymagana jest odpowiednia wewnętrzna lub zewnętrzna stabilizacja uszkodzonych części kości. Stabilizację wewnętrzną uszkodzonych obszarów można wykonać za pomocą, m.in. drutów, prętów, śrub, płytek lub cementu kostnego (BC). Cementy kostne są biomateriałami przeznaczonymi do stabilizacji złożonych złamań, a także do mocowania implantów [3] i można je sklasyfikować jako materiały strukturalne, które wyróżniają się wysoką wytrzymałością i odpornością na różnego rodzaju obciążenia: obciążenia statyczne – ścinanie, ściskanie, rozciąganie, skręcanie lub obciążenia dynamiczne – udarność [4]. Zasadniczo cementy kostne powinny tworzyć silne połączenia z tkanką kostną i odpowiadać za prawidłową stabilizację. Wśród nich wyróżnia się kilka rodzajów materiałów (zarówno syntetycznych, jak i naturalnych), jednak żaden z nich nie odpowiada wszystkim wymaganiom stawianym materiałom do tego typu zastosowań, dlatego cały czas trwają prace nad ich modyfikacją.

1.1. Rodzaje cementów kostnych

W ortopedii, cementy kostne stosowane są do mocowania endoprotez czy wypełniania ubytków kostnych. Możemy podzielić je na polimerowe, fosforanowo-wapniowe, kompozytowe, hydrożelowe czy bioaktywne akrylowe cementy kostne [5].

Cementy fosforanowo-wapniowe (CPC) to heterogeniczne systemy składające się z fazy proszkowej (P) zawierającej jedną lub więcej zdyspergowanych aktywnych faz (wypełniaczy) i utwardzalnej fazy ciekłej (L), tzw. bindera. Najczęściej stosowanymi wypełniaczami są suche cząstki fosforanu wapnia takie jak: strącony apatyt, o składzie chemicznym zbliżonym do hydroksyapatytu (HA), dwuwodny fosforan dwuwapniowy i amorficzny fosforan wapnia, fosforan czterowapniowy czy bezwodny fosforan dwuwapniowy. Natomiast jako faza ciekła stosowane są woda, a także wodne roztwory różnych soli lub kwasu fosforowego [6,7]. Zmieszanie tych dwóch faz (P+L) powoduje rozpoczęcie reakcji chemicznej, której towarzyszy wiązanie i późniejsze twardnienie cementu. Cementy CPC łączą w sobie takie cechy jak osteo-przewodnictwo komórek osteogennych, biokompatybilność, czy brak negatywnych reakcji ze strony organizmu. Materiały te są przeznaczone zarówno do plastycznego wypełniania ubytków kostnych, jak i łączenia fragmentów kości. Cechuje je formowalność, czyli zdolność do wypełniania ubytków o złożonej konfiguracji, przy czym mogą być one aplikowane

bezpośrednio do kości poprzez iniekcję. Regulacja składu CPC umożliwia kontrolowanie szybkości ich biodegradacji. Kinetyka tego procesu powinna być zgodna z szybkością tworzenia kości, co jest niezbędnym warunkiem dla możliwości zastosowania materiału w technologii regeneracji tkanki kostnej [6,8]. Dzięki temu wraz z odbudowywaniem przez organizm tkanki kostnej następuje zanik wprowadzonego cementu. CPC są pozbawione wad cementów polimerowych opartych na poli(metakrylanie metylu), jak na przykład nieprzereagowane monomery, które mogą być toksyczne dla otaczających ich tkanek. Zdecydowanymi zaletami CPC są niewielki efekt egzotermiczny reakcji, dzięki czemu temperatura wytwarzana podczas utwardzania cementu nie powoduje martwicy okolicznych tkanek, a także mały skurcz podczas wiązania, co zapewnia szczelność połączenia, integrację z tkanką kostną czy integralność mechaniczną [7]. Stałe CPC mogą charakteryzować się strukturą gęstą, która zapewnia odpowiednio wysoką wytrzymałość mechaniczną lub strukturą porowatą, która sprzyja przerastaniu tkanki kostnej i wymianie płynów. Cementy te mogą łączyć również zalety obu form w strukturze mieszanej.

W inżynierii tkankowej często stosowane są hydrożele, które naśladują macierz zewnątrzkomórkową tkanek miękkich. Ze względu na wysoce porowatą strukturę sieci i hydrofilowość, zapewniają one wysoką zdolność absorpcji wody. Dzięki temu można osiągnąć odpowiednie szybkości dyfuzji składników odżywczych i czynników biologicznych, co daje możliwość enkapsulacji bioaktywnych leków, a nawet żywych komórek [9]. Poli(tlenek etylenu) (PEO) jest powszechnie stosowanym polimerem bazowym do budowy trójwymiarowych matryc hydrożelowych ze względu na jego cytokompatybilność i dostępność w szerokim zakresie mas cząsteczkowych [10]. Wprowadzenie etapu mineralizacji *in situ* występującego jednocześnie z tworzeniem hydrożelu pozwala na zastosowanie systemów hydrożelowych do regeneracji twardych tkanek kostnych [11]. Gkioni i współpracownicy [12] podsumowali strategię mineralizacji hydrożelowej w trzech grupach: I) biomimetyczne podejście do mineralizacji, II) chemiczna modyfikacja hydrożelu za pomocą substancji wiążących jony oraz III) mineralizacja poprzez dodanie cząstek nieorganicznych. Dzięki temu możliwe jest otrzymanie kompozytów hydrożelowych opartych na matrycy hydrożelowej powstałej w wyniku sieciowania prepolimeru z wypełnieniem mineralnym do zastosowań w regeneracji tkanki kostnej [9,11–13].

Materiały polimerowe odgrywają istotną rolę w biomedycynie – znajdują zastosowanie m.in. w klejach chirurgicznych, wypełniaczach kostnych, rurkach cewników oraz opatrunkach wspomagających gojenie ran. W grupie cementów polimerowych wyróżnia się materiały poliuretanowe, na bazie polipropyloformitu (PPF), a także formułacje akrylowe, w tym na bazie poli(metakrylanu metylu) (PMMA). Polimery poliuretanowe mogą oddziaływać z tkanką kostną zarówno na drodze oddziaływań fizycznych, poprzez tworzenie wiązań wodorowych, jak i chemicznych, polegających na tworzeniu wiązań mocznikowych w reakcji grup karbaminianowych z aminami obecnymi w zmineralizowanej, kolagenowej macierzy zewnątrzkomórkowej kości. Jednak ich długoterminowa stabilność w środowiskach

biomedycznych jest nadal przedmiotem dyskusji [14]. Jednym z przykładów tego typu cementów jest Kryptonite™, zatwierdzony przez Amerykańską Agencję Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration – FDA*) w 2009 r., który jest polimerem poliuretanowym otrzymywanym na bazie oleju rycynowego, reaktywnego izocyjanianu i węgla wapnia. Znajduje on zastosowanie m.in. w zamknięciu mostka [15]. Polipropyloformit (PPF) jest jednym z polimerów stosowanych w medycynie regeneracyjnej. Dzięki rozwojowi metody druku 3D (np. stereolitografia – SLA) materiały oparte na tym polimerze znalazły zastosowanie szczególnie w zakresie regeneracji tkanki kostnej oraz kontrolowanego dostarczania leków [16]. Natomiast cement akrylowy lub na bazie PMMA należy do najstarszej i najbardziej znanej grupy cementów kostnych. W ortopedii pełni on rolę swoistego „kleju”, który stosuje się do mocowania protez, wypełniania ubytków kostnych podczas wertebroplastyki, gdzie może pełnić również rolę nośnika leków. W chirurgii stawów materiał taki działa jak tymczasowy „zastępca” – stosowany jest w formie „wypełniacza” (z ang. *spacer*) podczas wymiany endoprotez. Ponadto materiał ten znajduje zastosowanie w stabilizacji wewnętrznej złamań, pełniąc funkcję trwałego rusztowania, które wspiera proces odbudowy i rekonstruowania tkanki kostnej [17]. Cement kostny na bazie PMMA wyróżnia się szeregiem korzyści, takich jak bioodporność, wysoka wytrzymałość mechaniczna, jak również łatwość użycia i relatywnie niska cena co sprawia, że jest on powszechnie uważany za idealny cement kostny [18,19].

Bioaktywne cementy kostne otrzymuje się poprzez wprowadzenie bioaktywnych dodatków, głównie ceramicznych, do akrylowych cementów kostnych. Jednym z takich dodatków są włókna bioszklane. Dodatek ten nie zmienia właściwości mechanicznych cementu, jednakże wpływa na wytworzenie bioaktywnej powierzchni w kontakcie z kością [17]. Innym dodatkiem jest fluorek sodu, który wywiera podwójne działanie na tkankę kostną: efekt biochemiczny wynikający z połączenia ze strukturą chemiczną kości [20] oraz efekt biologiczny dzięki bezpośredniej stymulacji proliferacji i różnicowania osteoblastów, a w konsekwencji wzrost objętości kości beleczkowej (gąbczastej) [21], która pełni w organizmie bardzo ważną rolę, stanowiąc środowisko dla szpiku kostnego czerwonego oraz uczestnicząc w magazynowaniu i uwalnianiu jonów wapnia i fosforu.

2. Akrylowe cementy kostne

2.1. Historia cementów kostnych

Historia rozwoju cementów kostnych sięga końca XIX w., kiedy to Gluck zamocował protezę kolana z kości słoniowej przy użyciu cementu wykonanego z gipsu i kalafonii [22]. Natomiast, opublikowanie przez Röhme’a w 1901 roku pracy na temat termoutwardzalnych usieciovanych łańcuchów metakrylowych doprowadziło do szybkiego rozwoju polimerów, które są podstawowymi materiałami dla cementów kostnych [23].

W 1936 r. firma Kulzer opatentowała termoutwardzalny materiał otrzymany przez zmieszanie poli(metakrylanu metylu) (PMMA) z metakrylanem metylu (MMA) i inicjatorem wrażliwym na ciepło, który utwardzano w temperaturze 100 °C. Doprowadziło to do pierwszego klinicznego zastosowania PMMA w 1938 roku, którym była naprawa wad czaszki u małp. Lepsze zrozumienie systemów opartych na PMMA, pozwoliło na wykorzystanie tych materiałów w chirurgii rekonstrukcyjnej u ludzi. Utwardzany termicznie polimer Paladon (Heraeus Kulzer, Hanau, Niemcy) został zastosowany do rekonstrukcji ubytków kostnych czaszki u ludzi poprzez wytworzenie płytek w warunkach laboratoryjnych, a następnie ich dopasowanie przycinając utwardzony materiał *in situ* [24]. W 1943 roku firmy Degussa i Kulzer opracowały pierwszy cement samoutwardzalny w temperaturze pokojowej, w którego składzie zastosowano trzeciorzędowe aminy aromatyczne. Opracowane wówczas procedury do dziś stanowią podstawę produkcji cementu kostnego [23–25].

W 1949 r. bracia Judet jako pierwsi wykorzystali PMMA do produkcji protezy stawu biodrowego, jednakże z powodów biologicznych i mechanicznych nie mogła być ona wprowadzona do ciała [26]. Już kilka lat później, w 1958 r., sir Charnley z powodzeniem zamocował protezę głowy kości udowej przy użyciu samopolimeryzującego cementu kostnego PMMA, który nazwał „akrylowym cementem kostnym” [24,25,27]. Następnie do roku 1961 przeprowadzał on, z dobrymi wynikami, operacje wymiany stawu biodrowego używając cementu na bazie PMMA, który był stosowany przez dentystów do mocowania podstaw protez. Od tego czasu endoprotezoplastyka stawu biodrowego przeszła liczne zmiany w zakresie technik chirurgicznych, materiałów stosowanych w protezach, konstrukcji protez, czy technik cementowania; jednak podstawowy skład cementu kostnego pozostał niezmieniony [27].

Pomimo postępu w zakresie opracowywania i udoskonalania materiałów cementowych, operacje endochirurgiczne, takie jak endoprotezoplastyka, nadal pozostają skomplikowanymi zabiegami chirurgicznymi obciążonymi istotnym ryzykiem powikłań. Tego typu procedury niosą ze sobą ryzyko wystąpienia infekcji, a ze względu na to, że antybiotyki dostarczane ogólnoustrojowo mogą być niewystarczające do zapobiegania infekcjom w miejscu implantacji, wprowadzono praktykę dodawania środków antybakteryjnych do kompozycji cementu kostnego. Takie rozwiązanie pozwala na uzyskanie odpowiednio wysokiego stężenia antybiotyku w pobliżu implantu. W 1969 roku Buchholz podjął pierwsze próby dodania antybiotyków do składu cementu kostnego, dając tym samym początek antybiotykowym cementom kostnym [25]. Jednakże dopiero po 12 latach, w 1981 roku, Buchholz i współpracownicy [28] stwierdzili, że proszek gentamycyny zmieszany z cementem PMMA jest stabilny i oferuje odpowiednie spektrum aktywności antybakteryjnej. Cement kostny z dodatkiem antybiotyku (ang. *antibiotic-loaded bone cement* – ALBC) opracowany przez Buchholz’a stał się prekursorem licznych modyfikacji cementów kostnych, nie tylko w kierunku polepszenia właściwości antybakteryjnych, ale także właściwości

mechanicznych, użytkowych oraz biologicznych. Na przestrzeni lat naukowcy modyfikowali skład cementów kostnych poprzez wprowadzanie różnego rodzaju monomerów do fazy ciekłej, czy polimerów, kopolimerów i napełniaczy do fazy proszkowej. Modyfikacje te dokładniej opisano rozdziale 3. *Sposoby modyfikacji akrylowych cementów kostnych*, w punkcie 3.3.1. *Dodatek antybiotyków*.

2.2. Skład cementów kostnych

Akrylowe cementy kostne to dwukomponentowe układy składające się z fazy stałej (P) i fazy ciekłej (L). W skład fazy stałej wchodzi proszkowe kopolimery metakrylanu metylu (MMA) z innymi monomerami winylowymi, inicjator reakcji polimeryzacji oraz takie dodatki jak antybiotyki czy środki kontrastujące. Faza ciekła składa się z monomeru – metakrylanu metylu (MMA), innych metakrylanów lub mieszaniny monomerów, ko-inicjatora (reduktora) oraz stabilizatora [23,29].

Faza proszkowa (P) komercyjnych cementów kostnych składa się w 80 – 90 %mas. z kopolimerów akrylowych, 10 – 15 %mas. ze środków kontrastujących i od 1 do 2,5 %mas. inicjatora (nadtlenek benzoilu – BPO). Dodatkowo cementy kostne mogą zawierać antybiotyki [30–33]. Proszek polimerowy stanowi mieszaninę sferycznych cząstek prepolimeru poli(metakrylanu metylu) (PMMA) i/lub kopolimerów kwasu akrylowego (AA) (akrylan etylu, EA); akrylanu metylu (MA); MMA i styrenu [18]. Typowa wielkość cząstek PMMA waha się w zakresie od 5 do 150 μm średnicy, natomiast masa cząsteczkowa (M_w) zawiera się w przedziale od 44 000 do 400 000 g/mol [30,34,35]. Jednakże, jak podają inne źródła [36], M_w komercyjnych cementów Palacos R może sięgać nawet 870 000 g/mol. Dostępne komercyjnie cementy kostne zawierają również w swoim składzie środki kontrastujące, jak siarczan baru (BaSO_4) lub tlenek cyrkonu (ZrO_2) [22,37]. Dodatkowo w przypadku cementów kostnych modyfikowanych antybiotykiem, wprowadza się do nich środek leczniczy, przy czym najczęściej jest to gentamycyna (GTMC). Niemniej jednak, do kompozycji cementów kostnych z powodzeniem wprowadzono również inne antybiotyki, jak wankomycyna, tobramycyna, erytromycyna, cefuroksym, kolistyna itp. [22,31], dzięki temu rozszerzając możliwość profilaktyki i leczenia zakażeń okołoprotezowych.

Faza ciekła (L) komercyjnych cementów kostnych zawiera głównie MMA w ilości 85,0 – 98,5 %mas., ale może również zawierać inne monomery metakrylowe, jak np. metakrylan butylu (BMA) (ok. 13%). Jako ko-inicjatory systemu inicjującego polimeryzację stosowane są III-rzędowe aminy, z których najpopularniejszą jest *N,N*-dimetylo-p-toluidyna (DMPT) dodawana w ilości od 0,6 do 2,7 %mas. Stosuje się również inhibitor reakcji polimeryzacji, który zapobiega przedwczesnej reakcji w czasie magazynowania i transportu systemu cementu kostnego. Najczęściej jest to hydrochinon (HQ) dodawany w ilości 20 – 75 ppm [18,31,32]. Do niektórych cementów kostnych dodaje się również niewielkie ilości chlorofilu jako barwnika

(200 ppm), w celu poprawy wizualizacji w trakcie operacji i łatwiejszej identyfikacji cementu po zabiegu, szczególnie podczas zabiegów rewizyjnych [37].

Zmieszanie obu faz (P+L) powoduje zapoczątkowanie reakcji polimeryzacji, w wyniku której następuje samoutwardzanie materiału [34]. Zazwyczaj fazę stałą z fazą ciekłą miesza się w stosunku masowym P:L = 2:1 [23], przy czym różni producenci stosują różne proporcje P:L, co wynika z różnic w składzie materiału. Wpływ na ten stosunek ma masa cząsteczkowa polimeru fazy proszkowej, która waha się od 270 000 g/mol do 1 200 000 g/mol [35]. W przypadku cementu kostnego Cemex (TECRES Company, Włochy) stosunek fazy stałej do ciekłej wynosi 3:1, z kolei dla C-Ment 3 (European Medical Contract Manufacturing B.V. (EMCM)) oraz CerafixLV (CERAVER, Francja) stosunek P:L = 2,5:1 [38]. Tak przygotowany cement kostny działa jak zaprawa, wypełniając puste przestrzenie między kością a implantem, tworząc mechaniczną blokadę. Dwoma podstawowymi rolami cementu kostnego są zapewnienie natychmiastowego mocowania implantu do kości i rozłożenie sił z implantu na otaczającą go kość [39,40]. Badania pokazują, że w całkowitej endoprotezoplastyce stawu kolanowego (TKA, ang. *total knee arthroplasty*) zastosowanie cementu kostnego oferuje większą stabilność i wydłuża czas funkcjonowania implantów w porównaniu z procedurami, w których cement nie jest stosowany. Ponadto zastosowanie procedury TKA z wykorzystaniem cementu kostnego zapewnia natychmiastowe mocowanie, podczas gdy artroplastyka bezcementowa wymaga co najmniej 6 miesięcy wzrostu kości zanim zostanie uznana za dobrze zamocowaną [29,41,42]. Podobne rezultaty pokazują badania dotyczące całkowitej endoprotezoplastyki stawu biodrowego czy barkowego [41,43,44].

Pomimo wielu zalet, zastosowanie cementów kostnych niesie ze sobą również wiele zagrożeń. PMMA jest materiałem, który nie ulega biodegradacji, charakteryzuje się stosunkowo słabą przyczepnością do różnego rodzaju powierzchni, a ciepło wydzielane podczas reakcji polimeryzacji o silnie egzotermicznym charakterze może uszkodzić otaczające tkanki, a także utrudnić mechaniczne połączenie się tego materiału z kością [32,45,46]. Temperatura utwardzania cementu kostnego waha się w granicach od 80 do 124 °C wewnątrz cementu, natomiast na granicy cement – kość od 48 do 105 °C [18,47]. Jednak, jak wskazują wyniki badań klinicznych prowadzonych *in vivo*, temperatura na granicy cement – kość jest niższa i wynosi 40 – 48 °C dla warstwy cementu o maksymalnej grubości 3 mm, co spowodowane jest krążeniem krwi i rozpraszaniem ciepła do tkanek obwodowych [25,47,48]. Ponadto, niektóre składniki cementu kostnego mogą być toksyczne dla organizmu ludzkiego. Jest to przede wszystkim nieprzereagowany monomer – MMA. Działanie takie mogą wykazywać również niektóre dodatki, tj. *N,N*-dimetylo-*p*-toluidyna, nadtlenek benzoilu, siarczany baru, a także wolne rodniki wytwarzane podczas procesu polimeryzacji [18,32,49]. Najbardziej znane negatywne reakcje organizmu obejmują martwicę tkanek, zwłóknienie lub upośledzoną przebudowę kości w pobliżu implantu [50–52]. Dodatkowo uwolnienie monomeru MMA o właściwościach toksycznych może

powodować powstanie warstwy tkanki miękkiej składającej się z tkanki włóknistej zawierającej makrofagi i komórki olbrzymie. Dzieje się tak, ponieważ MMA jest hydrolizowany do kwasu metakrylowego przez karboksyloesterazę, który z kolei jest przekształcany w fizjologicznych szlakach metabolicznych i wchodzi do cyklu kwasu cytrynowego poprzez metylomalonylo-CoA i bursztynylo-CoA [29,53]. Po wprowadzeniu do organizmu, cementy kostne mogą wpływać również na składniki krwi, a niektóre BC stosowane do implantacji mogą wpływać na hemostazę z powodu hiperaktywacji lub nawet inaktywacji płytek krwi [54]. Cement PMMA jest materiałem obojętnym, który nie stymuluje osteointegracji protezy. W konsekwencji połączenie między cementem a kością ma charakter wyłącznie mechaniczny, co może prowadzić do mikroruchów implantu i tym samym do jego obluzowania. Ponadto powierzchnia cementu może być podatna na zanieczyszczenia różnymi gatunkami bakterii i drobnoustrojów, co sprzyja tworzeniu biofilmu i zakażeniom okołoprotezowym [55,56].

Modyfikacje składu cementów kostnych prowadzą do eliminacji ich negatywnych właściwości, co jest przedmiotem licznych badań naukowych. Wpływ tych modyfikacji na właściwości cementów kostnych przedstawiono w rozdziale 3. *Sposoby modyfikacji akrylowych cementów kostnych.*

2.3. Właściwości cementów kostnych

Cementy kostne jako materiały do zastosowań klinicznych, muszą spełnić szereg wymogów dotyczących właściwości biologicznych, fizycznych, jak i użytkowych. W tym rozdziale omówiono najważniejsze z tych właściwości.

2.3.1. Parametry utwardzania cementu

Jak podano wyżej, akrylowy cement kostny otrzymuje się przez zmieszanie fazy proszkowej z fazą ciekłą. W fazie proszkowej zawarty jest inicjator polimeryzacji, a w fazie ciekłej ko-inicjator, dzięki czemu po zmieszaniu faz dochodzi do reakcji redoks pomiędzy tymi składnikami i wytworzenia rodników inicjujących polimeryzację rodnikową. W wyniku przebiegającej reakcji polimeryzacji powstaje utwardzony materiał. Przygotowanie cementu kostnego można przeprowadzić tzw. metodą ręczną, gdzie składniki kompozycji miesza się ręcznie, przy pomocy szpatułki, lub z wykorzystaniem systemu mieszania i aplikacji, dostarczanego przez producenta. W procesie przygotowania cementów kostnych możemy zatem wyróżnić następujące etapy [24,25]:

- 1) faza mieszania – trwa do 1 minuty – podczas niej następuje homogenizacja fazy proszkowej z fazą ciekłą;
- 2) faza oczekiwania (*doughing time*, t_D) – trwa do kilku minut – dokładne tłumaczenie, to czas wyrabiania ciasta, czyli osiągnięcia przez materiał konsystencji odpowiedniej

do aplikacji w miejscu przeznaczenia, określa się go jako czas potrzebny do uzyskania przez cement konsystencji nieprzywierającej do rękawiczki lateksowej;

- 3) faza aplikacji/pracy – trwa od 2 do 8 minut – cement może zostać wprowadzony do miejsca aplikacji;
- 4) faza utwardzania (czas utwardzania, inaczej wiązania, ang. *setting time*, t_{set}) – trwa od 1 do 2 minut – cement osiąga twardość uniemożliwiającą jego dalszą aplikację.

Wyznaczenie parametrów odpowiadających poszczególnym fazom przygotowania cementu opisuje norma ISO 5833:2002: „*Implants for surgery - Acrylic resin cements*”. Opisuje ona badanie takich parametrów jak *doughing time* (t_D), czas utwardzania (t_{set}) oraz maksymalna temperatura polimeryzacji (T_{max}). Norma ta określa maksymalny *doughing time*, który wynosi 5 minut [38]. Po jego osiągnięciu możliwa jest praca z cementem kostnym w miejscu operowanym.

Czas utwardzania (t_{set}) zdefiniowany jest jako czas, w którym cement kostny osiągnie temperaturę utwardzania (T_{set}), to jest wartość będącą średnią arytmetyczną pomiędzy temperaturą maksymalną (T_{max}) a temperaturą otoczenia (T_{amb}), wyznaczoną ze wzoru (1):

$$T_{set} = \frac{T_{max} + T_{amb}}{2} \quad (1)$$

Czas wiązania (t_{set}) odczytuje się z wykresu zależności temperatury masy polimeryzującej od czasu podczas utwardzania cementu kostnego. Zgodnie z normą ISO 5833:2002 dla cementów kostnych przeznaczonych do zastosowania ręcznego czas t_{set} powinien mieścić się w zakresie od 3 do 15 minut [38].

Temperatura maksymalna T_{max} , jaką może osiągnąć cement kostny podczas procesu utwardzania, w wyniku przebiegającej egzotermicznej reakcji polimeryzacji, jest jedną z najważniejszych właściwości użytkowych cementów kostnych. Jeśli osiągnie zbyt wysoką wartość może spowodować wystąpienie nekrozy tkanki kostnej i tkanek otaczających miejsce aplikacji [57]. Poddanie tkanki kostnej działaniu temperatury T_{max} w zakresie 44 – 47 °C przez okres 1 minuty może upośledzać regenerację kości. Jeśli temperatura ta osiągnie jeszcze wyższą wartość, wówczas czas narażenia tkanki powodujący upośledzenie regeneracji kości ulega skróceniu. Działanie temperatury 50 °C przez 1 minutę lub 47 °C przez 5 minut na tkankę kostną powoduje upośledzenie działania tkanki, utratę komórek, resorpcję i zastąpienie ich komórkami tłuszczowymi. Temperatura 47 °C została uznana za temperaturę progową, na którą może być narażona kość przed wystąpieniem martwicy [24]. Jednakże, norma przewiduje badanie temperatury wewnątrz cementu, która jest znacznie wyższa niż na jego powierzchni. Norma ASTM F451: „*Standard Specification for Acrylic Bone Cement*” precyzuje, że temperatura maksymalna dla polimeryzacji cementów kostnych nie może przekraczać 90 °C, aby uniknąć uszkodzenia tkanki [58].

2.3.2. Lepkość

Lepkość systemu po zmieszaniu fazy proszkowej z fazą ciekłą (P+L) determinowana jest głównie przez skład kompozycji poszczególnych faz cementu kostnego, głównie M_w polimeru w fazie proszkowej, jak również przez stosunek fazy proszkowej do fazy ciekłej [24]. Wpływa ona na przygotowanie cementu kostnego i jego penetrację w głąb kości, a co za tym idzie, na jakość i trwałość cementu kostnego. Optymalna lepkość pozwala na penetrację kości przez cement w celu uzyskania dobrego zamocowania, tj. cement musi być wystarczająco płynny, aby mógł zostać dostarczony w miejsce przeznaczenia, a następnie wnikać w szczeliny kości. Z drugiej strony, lepkość cementu kostnego powinna być wystarczająco wysoka, aby wytrzymać ciśnienie krwawienia wstecznego, co zapobiegnie wnikaniu krwi do cementu [59]. Wśród komercyjnych cementów kostnych występują materiały o różnej lepkości, tj. niskiej, średniej i wysokiej.

Cementy o niskiej lepkości. Cementy te pozostają w stanie płynnym przez znacznie dłuższy okres w porównaniu do cementów o średniej lub wysokiej lepkości. Zazwyczaj mają długą fazę oczekiwania (3 minuty lub dłużej). Rzeczywisty czas pracy, w którym cement może być aplikowany jest zazwyczaj krótki, ponieważ lepkość szybko wzrasta, a czas wiązania może być różny i trwa kilka minut [24,59].

Cementy o średniej lepkości, oferują wszechstronność dla różnych procedur. Charakteryzują się zarówno niską, jak i wysoką lepkością, w zależności od czasu, w którym cement kostny jest dostarczany. Podczas mieszania charakteryzują się niską lepkością, co pozwala na łatwe i jednorodne wymieszanie proszku z cieczą [59].

Cementy o wysokiej lepkości, w fazie proszkowej zawierają głównie PMMA, bez dodatku innych kopolimerów, jak np. kopolimer poli(metakrylan metylu-co-styren), który jest stosowany w cementach o niższej lepkości. Natychmiast po wymieszaniu cement ma konsystencję plastyczną i jest gotowy do ręcznego nakładania na powierzchnię implantu, a jego lepkość pozostaje stała w początkowej fazie aplikacji i powoli zwiększa się z czasem. Czas pracy dla cementów o wysokiej lepkości musi być ściśle monitorowany, ponieważ nie zawsze można określić koniec czasu pracy, zanim cement osiągnie zbyt dużą sztywność, uniemożliwiającą skuteczne połączenie z tkanką kostną [24,59].

2.3.3. Skurcz polimeryzacyjny

Polimeryzacja MMA charakteryzuje się skurczem polimeryzacyjnym, zwanym skurczem objętościowym, na poziomie 21%. Jednak w układzie z proszkowym PMMA skurcz ten ulega redukcji do 6 – 7%, natomiast rzeczywisty skurcz polimeryzacyjny cementów kostnych występujący w miejscu aplikacji jest na poziomie 3 – 5% [24]. Obawy związane z występowaniem skurczu materiału podczas utwardzania koncentrują się przede wszystkim na stabilności implantu

– zbyt duży skurcz może spowodować jego obłuzowanie i nie będzie on spełniał swojego zadania. Przy mieszaniu próżniowym (system mieszania i aplikacji) skurcz objętościowy może wzrosnąć do 5 – 7% w różnych cementach. Badania nie pokazują jednak różnic w skurczu polimeryzacyjnym między cementem przygotowanym z odwirowaniem i bez, gdy stosowany jest cement o zmniejszonej porowatości [60]. Skurcz w obrębie kości gąbczastej można uznać za korzystny, ponieważ niektóre szczeliny międzyfazowe umożliwiają rewaskularyzację. Analiza *in vitro* modeli kości udowej świni wykazała 85% kontakt na styku implant-cement i 90% kontakt na styku kość-cement, co skutkuje skurczem objętościowym wynoszącym 10 – 15% [61]. Szczeliny w cemencie kostnym o wielkości $<100\ \mu\text{m}$ i $>500\ \mu\text{m}$ umożliwiają wrastanie kości, co skutkuje dobrym zakotwiczeniem implantu, zmniejszając ryzyko aseptycznego obłuzowania [25].

2.3.4. Właściwości mechaniczne

Jak wspomniano wyżej, cementy kostne są stosowane w stabilizacji skomplikowanych złamań, wertebroplastyce czy mocowaniu implantów, co wymaga od tych materiałów odporności na działanie różnego rodzaju obciążeń, zarówno statycznych (ściskanie, ściskanie, rozciąganie czy skręcanie) jak i dynamicznych (udarność) [4,57]. Zatem, cementy kostne powinny tworzyć silne połączenia z tkanką kostną, jednocześnie zapewniając odpowiednią stabilizację. W mocowaniu endoprotezy stawu samoutwardzalny cement kostny wypełnia wolną przestrzeń między protezą a kością. Przenoszenie sił z kości na implant i z implantu na kość jest podstawową funkcją cementu kostnego. Zdolność do wykonywania tego zadania w sposób niezawodny przez długi czas ma kluczowe znaczenie dla długoterminowego okresu użytkowania implantu. Jeśli generowane ekstremalne naprężenia przekraczają zdolność cementu kostnego do przenoszenia i pochłaniania sił, możliwe jest złamanie zmęczeniowe [24]. Aby spełnić swoje zadanie cement kostny musi wykazywać dobre właściwości mechaniczne, które są określone przez odpowiednie normy:

- ISO 5833: „*Implants for surgery – Acrylic resin cements*”
- ISO 13586: „*Plastics – Determination of fracture toughness (GIC and KIC). Linear elastic fracture mechanics (LEFM) approach and impact strength*”
- ISO 179: „*Tworzywa sztuczne – Oznaczanie udarności metodą Charpy'ego*”
- ISO 180: „*Tworzywa sztuczne – Oznaczanie udarności metodą Izoda*”
- ASTM F451: „*Standard Specification for Acrylic Bone Cement*”
- ASTM D732: „*Standard Test Method for Shear Strength of Plastics by Punch Tool*”
- ASTM E399: „*Standard Test Method for Linear-Elastic Plane-Strain Fracture Toughness of Metallic Materials*”

Zgodnie z normą ISO 5833, która jest najpowszechniej stosowana, cementy stosowane do mocowania implantów powinny wykazywać następujące właściwości:

- wytrzymałość na ściskanie $\sigma > 70\ \text{MPa}$

- wytrzymałość na zginanie $\sigma_g > 50$ MPa
- moduł zginania $E > 1800$ MPa
- wytrzymałość na rozciąganie R_m – brak wartości minimalnej

2.3.5. Uwalnianie niezwiązanych reagentów z cementu kostnego

Polimeryzacja MMA w cemencie kostnym nie przebiega ze 100% wydajnością, co spowodowane jest utrudnioną ruchliwością (dyfuzją) monomeru przy wysokim stopniu przereagowania, związaną z dużą lepkością materiału. Powoduje to pozostanie nieprzereagowanego monomeru w strukturze polimeru i możliwość jego wypłukiwania przez płyny ustrojowe. Poimplantacyjne uwalnianie MMA do otaczających tkanek może wpływać toksycznie na tkanki, a także negatywnie na połączenie implantu z kością. Jego uwalnianie powiązane z ryzykiem niepowodzenia implantacji protez, wynikającym z występującej chemicznej martwicy tkanki kostnej, a także pogorszenia właściwości mechanicznych cementu kostnego [24,62].

Dzięki udoskonalaniu składu cementu kostnego, pozostałość nieprzereagowanego monomeru zaraz po utwardzeniu waha się w granicach od 2% do 7% i spada do ok. 0,5% po pierwszych 2 – 3 tygodniach [24,25]. Dodatkowo, pozostały monomer powinien pozostać uwięziony w matrycy cementu kostnego przez wiele lat po aplikacji. Jak dowodzą badania, większość pozostałego monomeru powoli polimeryzuje (ok. 80%) [63], a mała część jest metabolizowana do tlenku węgla (IV) (CO_2) i wody (H_2O) w cyklu Krebsa [64].

2.3.6. Biokompatybilność

Cementy kostne wprowadzane są bezpośrednio do organizmu, dlatego kluczowe jest ustalenie możliwości wystąpienia jawnej toksyczności, a także niepożądanych skutków ubocznych, w tym poważnych stanów zapalnych lub nowotworów. Klasyfikacja wyrobów medycznych stanowi podstawowy element regulacji prawnych określanych zarówno przez amerykańską Agencję Żywności i Leków (FDA), jak i rozporządzenie Parlamentu Europejskiego *Medical Device Regulation 2017/745 (MDR)*. Urządzenia dzieli się na klasy w zależności od stopnia ryzyka związanego z ich stosowaniem, przy czym kryteria obejmują rodzaj i czas trwania kontaktu z organizmem pacjenta, a także potencjalny wpływ na jego funkcje życiowe.

Wyróżnia się trzy główne grupy: klasa I obejmuje wyroby nieinwazyjne o najniższym stopniu ryzyka; klasa II dotyczy urządzeń o umiarkowanym ryzyku, w tym przeznaczonych do przechowywania, transportu lub modyfikacji płynów ustrojowych i tkanek przed ich podaniem do organizmu; natomiast klasa III obejmuje wyroby o najwyższym stopniu ryzyka, w tym implanty, produkty wchodzące w bezpośredni kontakt z sercem, układem krążenia czy nerwowym, a także urządzenia mające działanie biologiczne lub ulegające wchłonięciu w organizmie.

Wraz ze wzrostem klasy ryzyka rosną wymagania dotyczące badań biokompatybilności i badań klinicznych. Cementy kostne należą do III klasy produktów ze względu na bezpośredni kontakt z tkankami miękkimi oraz tkanką kostną [4]. Badanie biokompatybilności wyrobów medycznych reguluje seria norm ISO 10993 „*Biologiczna ocena wyrobów medycznych*”. Jedną z najważniejszych metod w określaniu biokompatybilności jest badanie cytotoksyczności materiału zgodnie z Częścią 5: „*Badania cytotoksyczności in vitro*”. Metody badawcze opisane w normie odnoszą się do inkubacji hodowanych komórek w kontakcie z materiałem badanym lub ekstraktami z materiału, bezpośrednio lub przez dyfuzję, przy czym ogólnie przyjętym parametrem określającym toksyczność jest hamowanie proliferacji komórek (CPI). Stopień toksyczności *in vitro* określa się działając ekstraktem z cementu kostnego na komórki hodowlane. Dla materiałów "wysokiej toksyczności" – $CPI \geq 50\%$, "średniej toksyczności" – $50\% > CPI > 25\%$, "niskiej toksyczności" – $CPI \leq 25\%$, i "braku toksyczności" – $CPI = 0$ [65].

2.3.7. Porowatość

Porowatość jest bardzo ważnym parametrem cementu kostnego, gdyż wpływa bezpośrednio na właściwości mechaniczne materiału, uwalnianie antybiotyku, a także osteointegrację.

Ręczne przygotowanie (mieszanie) cementu kostnego prowadzi do wytworzenia pęcherzyków powietrza wewnątrz materiału, a tym samym uzyskania porowatej struktury. Zwiększona porowatość ma negatywny wpływ na właściwości mechaniczne, co potwierdziły badania porowatości cementów kostnych [66]. Jednocześnie, zwiększenie porowatości cementów kostnych, np. przez wprowadzenie porogenów, może wpłynąć na poprawę uwalniania leków z tego materiału [67].

Mechanizm uwalniania leku związany jest z wymywaniem antybiotyku z powierzchni cementu kostnego, a następnie z jego wnętrza. Płyny wnikają do wnętrza materiału i rozpuszczają antybiotyk, który wmywany jest z pustych przestrzeni i pęknięć (porów). Moojen i współpracownicy oraz Bertazzoni i współpracownicy wykazali [68,69], że uwalnianie tylko w pierwszych godzinach jest proporcjonalne do chropowatości powierzchni, natomiast w kolejnych dniach jest proporcjonalne do porowatości cementu.

Należy również podkreślić, że porowatość cementu kostnego umożliwia tkance kostnej osteointegrację, czyli wnikanie w pory materiału komórek kostnych i ich proliferację. Jest to proces długotrwały, lecz umożliwia połączenie strukturalne i funkcyjne implantu z tkanką kostną [70,71]. Optymalny rozmiar porów, gwarantujący prawidłowy przebieg tego procesu to 200 – 400 μm .

3. Sposoby modyfikacji akrylowych cementów kostnych

Jak już wcześniej wspomniano, akrylowe cementy kostne wykazują wiele zalet, takich jak niski koszt otrzymania, łatwość aplikacji, korzystne właściwości mechaniczne i biostabilność w organizmie człowieka, ale charakteryzują się także wieloma wadami i ograniczeniami. Wśród nich wyróżnić możemy silny efekt egzotermiczny reakcji polimeryzacji prowadzący do znacznego wzrostu temperatury cementu, obecność nieprzereagowanego monomeru, który może się uwalniać do otaczających tkanek, skurcz polimeryzacyjny, obniżenie parametrów wytrzymałościowych po wprowadzeniu środków kontrastujących i antybakteryjnych, a także niska aktywność biologiczna [18,22]. Należy przy tym podkreślić, że dodatki wprowadzane przez badaczy w celu eliminacji poszczególnych wad często oddziałują równocześnie na wiele właściwości materiału, co wymaga starannego doboru ich rodzaju i stężenia. W poniższym rozdziale przedstawiono modyfikacje cementów kostnych w celu ograniczenia ich wad oraz wpływ zastosowanych modyfikacji na właściwości mechaniczne i antybakteryjne, a także temperaturę utwardzania cementów kostnych.

3.1. Właściwości mechaniczne

Właściwości mechaniczne cementów kostnych zależą od wielu czynników, zarówno zewnętrznych jak i wewnętrznych. Wśród czynników zewnętrznych wyróżnia się szybkość i czas mieszania oraz metodę mieszania, wstępne schładzanie fazy ciekłej, a także stopień porowatości. Natomiast do czynników wewnętrznych zaliczyć można skład fazy ciekłej i proszkowej, głównie masę cząsteczkową polimeru (kopolimerów), wielkość jego cząstek, ich kształt i rozkład, a także stosunek fazy proszkowej do ciekłej, czy dodatek antybiotyków, domieszek oraz zanieczyszczenia obecne w polu operacyjnym. Wśród tych ostatnich możemy wyróżnić krew, fragmenty tkanki kostnej lub roztwór soli fizjologicznej [35,72]. Poniżej przedstawiono wpływ składu kompozycji na właściwości mechaniczne cementów kostnych.

Rodzaj zastosowanego polimeru, a także stosunek fazy proszkowej do ciekłej wyraźnie wpływają na parametry mechaniczne cementów kostnych. Jak pokazują badania [35], większe masy cząsteczkowe oraz rozmiary cząstek polimeru powodują zmniejszenie wytrzymałości na ściskanie cementów kostnych. Jest to spowodowane gorszym zwilżaniem i rozpuszczaniem polimeru przez monomer, co dodatkowo utrudnia większą regularność i sferyczność cząstek. Chen i inni [73] zaobserwowali nieznacznie zwiększoną wytrzymałość na ściskanie cementów o wyższym stosunku cieczy do proszku, co jest sprzeczne z ustaleniami Belkoffa i współpracowników [74], którzy stwierdzili, że te właściwości materiału pogarszały się wraz ze wzrostem stosunku fazy płynnej do proszkowej. Natomiast Pascual i inni [39] zasugerowali, że stosunek fazy ciekłej do fazy proszkowej ma niewielki wpływ na parametry

ściskania. Z kolei, w badaniach nad wpływem rodzaju polimeru, Tham i współpracownicy [30] zaobserwowali, że zastąpienie liniowego PMMA o $M_w = 12000$ g/mol, 4-ramienną gwiazdą PMMA o $M_w = 45000$ g/mol, powoduje obniżenie wytrzymałości na zginanie i modułu zginania o odpowiednio 4% i 10%.

Przygotowywanie cementów kostnych na sali operacyjnej również może wpływać na ich właściwości mechaniczne. Karpiński i inni w swoich pracach [72,75] badali wpływ domieszkowania masy cementowej zanieczyszczeniami w postaci płynów fizjologicznych naturalnie występujących w polu operacyjnym (krew i 0,9% roztwór soli fizjologicznej) na właściwości mechaniczne. Uzyskane wyniki wyraźnie pokazują, że zanieczyszczenie cementu kostnego krwią oraz solą fizjologiczną znacząco wpływa na jego wytrzymałość na ściskanie, której wartość spada o 20 – 25% przy zawartości zanieczyszczeń na poziomie 10%. Co ciekawe, w małych zakresach zanieczyszczeń (do około 2%), szczególnie w przypadku soli fizjologicznej średnie wartości wytrzymałości na ściskanie wzrosły w stosunku do średnich wartości uzyskanych dla czystych cementów.

Kolejnym czynnikiem wpływającym na właściwości mechaniczne cementów kostnych jest dodatek środków kontrastujących czy antybakteryjnych. Dodatki te są nieodłącznym elementem kompozycji cementów kostnych, jednakże wpływają negatywnie na wytrzymałość mechaniczną. Dodatek siarczanu (VI) baru ($BaSO_4$) czy tlenku cyrkonu (ZrO_2) w ilości 10 %mas. powoduje nieznaczne pogorszenie wytrzymałości na ściskanie oraz rozciąganie, a także żywotność zmęczeniową cementów kostnych [29,76], natomiast wzrost zawartości do 20% wpływa na nieznaczne zmiany wytrzymałości, a do 40% powoduje drastyczny spadek poniżej wymagań normy ISO 5833 [76,77]. Z kolei, jak wynika z danych literaturowych, właściwości takie jak wytrzymałość na ściskanie i rozciąganie oraz moduł Young'a nie ulegają znaczącym zmianom po dodaniu antybiotyków, jednakże zależy to od ilości i rodzaju wprowadzonego antybiotyku [38,78,79]. Małe dawki antybiotyków (2g antybiotyku na 60g cementu) powodują jedynie niewielki spadek wytrzymałości na ściskanie (<5%) i rozciąganie (<5%) [76]. Zwiększenie ilości gentamycyny do poziomu 5g antybiotyku na 60g cementu znacząco pogarsza wytrzymałość na ściskanie cementów kostnych [80]. Podobne obserwacje poczyniono dla innych antybiotyków. Lilikais i inni w swoich badaniach [81] pokazali, że dodatek 2,5% oraz 5% wankomycyny nieznacznie wpływa na właściwości mechaniczne cementu kostnego Palamed (spadek wytrzymałości na ściskanie o odpowiednio o 2% i 8,2%), natomiast dodatek 2,5% oraz 5% i 10% wankomycyny do cementu Palamed-G obniża wytrzymałość o odpowiednio 12,4%, 9,6% i 18,1%, co potwierdzają również inne badania [82]. Ponadto, wprowadzenie ryfampicyny do cementów kostnych powoduje drastyczny spadek wytrzymałości na ściskanie cementów kostnych, poniżej wymagań określonych normą [82,83]. Prowadzono również badania nad wprowadzeniem antybiotyków w postaci ciekłej do cementów kostnych. Powodują one jednak znacznie większy spadek

wytrzymałości na ściskanie cementów kostnych, tj. o 35%, 37% i 55% w próbkach zawierających odpowiednio płynną wankomycynę, gentamycynę i amfoterycynę B [84,85].

Inne środki antybakteryjne stosowane w cementach kostnych, takie jak: nanocząstki srebra (AgNPs), nanocząstki złota (AuNPs), hydroksyapatyt (HA), grafen, olejki eteryczne również wpływają na właściwości mechaniczne BC. Badania Slane i innych [86] pokazują, że dodatek AgNPs nie miał znacznego wpływu na wytrzymałość na zginanie cementów kostnych, natomiast wytrzymałość na ściskanie cementów nieznacznie spadła, przy czym ich wartości były nadal znacznie wyższe niż te określone w normie ISO 5833. Russo i współpracownicy [87] wykazali, że dodatek 1% AuNPs nieznacznie poprawił moduł ściskania cementu kostnego. Robu i inni [31] badali cementy kostne z dodatkiem nanocząsteczek srebra wbudowanych w szkło ceramiczne i hydroksyapatytu impregnowanego olejkiem eterycznym z mięty pieprzowej. Wyniki pokazują, że dodatek hydroksyapatytu impregnowanego olejkiem eterycznym prowadzi do spadku średniej wartości modułu sprężystości w porównaniu z próbką referencyjną (o 9%), natomiast wprowadzenie AgNPs w szkło ceramiczne w ilości 2% i 4% prowadzi do wzrostu tego parametru o odpowiednio 9% i 1%. W przypadku wytrzymałości na ściskanie, po dodaniu nanocząstek srebra do szkła ceramicznego, odnotowano spadek o około 9%, podczas gdy po dodaniu hydroksyapatytu impregnowanego olejkiem z mięty pieprzowej obserwuje się większy spadek, tj. o 12%. Z kolei, wyniki badań wytrzymałości na zginanie przeprowadzonych przez Vallo i innych [88] wykazały, że wprowadzenie 2,5 – 15 %mas. HAP do cementu kostnego zwiększa jego moduł zginania i odporność na pękanie. Wynika to z faktu, że HAP działa jako stała faza wzmacniająca, która poprawia właściwości mechaniczne BC na bazie PMMA.

Niski stopień uwalniania leków z cementów kostnych spowodował rozwój badań w kierunku jego poprawy. Działania te zakładają wprowadzenie do kompozycji cementu kostnego systemów uwalniania leków. Jednak te poprawiając uwalnianie jednocześnie wpływają na pogorszenie właściwości mechanicznych. Wekwejt i inni [89] wprowadzili do cementu kostnego celulozę, chitozan, magnez, polidioksanon (PDO) oraz fosforan trójwapniowy (TCP). Jak pokazują wyniki ich badań, modyfikacja spowodowała wzrost porowatości oraz obniżenie wytrzymałości na ściskanie cementów zawierających chitozan, celulozę i PDO odpowiednio o 13%, 17% i 24%. Wpływ dodatku chitozanu na właściwości mechaniczne badali również Zapata i inni [90]. Ich badania pokazują spadek wytrzymałości na ściskanie cementów kostnych wraz ze wzrostem udziału chitozanu. Shen i inni [56] wykazali, że zastosowanie nanoprętów hydroksyapatytu, nanorurek węglowych (CNT) i mezoporowatych nanocząstek krzemionki (MSN) jako nośników leków w cementach kostnych wpływa na ich właściwości mechaniczne. Dodatek odpowiedniej ilości HA i CNT do uzyskania poprawy uwalniania powoduje odpowiednio 50% i 90% spadek wytrzymałości na ściskanie. Natomiast dodatek MSN powoduje obniżenie modułu zginania o 10 – 20%, przy zachowaniu niezmiennionej wytrzymałości na ściskanie. W innym badaniu Qin i współpracownicy [91] wykazali, że dodatek 10% sferycznych cząsteczek fosforanu wapnia

domieszkowanych strontem (SCPS) nie wpływa na wytrzymałość na ściskanie oraz moduł sprężystości. Podobnie, Shen i inni [92] wykazali, że właściwości mechaniczne cementów kostnych na bazie PMMA nie uległy zmianie po dodaniu nanostrukturalnych rurek dwutlenku tytanu (TiO_2 TNT).

Trwałość *in vivo* cementowanych implantów jest ściśle powiązana z właściwościami mechanicznymi cementu kostnego. Badacze spekulowali, że mechaniczne uszkodzenie cementu inicjuje aseptyczne obluzowanie implantu [93]. Zastosowanie cementów kostnych o wyższej odporności na pękanie i wyższej odporności na pełzanie może być korzystne. Dodanie napełniaczy do cementu kostnego PMMA jest uważane za jedną z potencjalnych metod poprawy jego właściwości mechanicznych [35].

Kompozyty cementu kostnego z nanocząstkami, takimi jak wielościenne nanorurki węglowe i nanometryczne włókna tytanowe, były przedmiotem wielu badań. Uzyskano wymierną poprawę wytrzymałości na zginanie o 12,8% dla cementów kostnych z dodatkiem nanorurek węglowych. Natomiast przy optymalnym stężeniu 1 %mas., włókna nanotytanowe dają znaczny wzrost odporności na pękanie (67%), wytrzymałości na zginanie (20%) i modułu zginania (22%), w porównaniu z kontrolnym cementem PMMA [76]. Paz i inni [94] określili wpływ grafenu (G) i tlenku grafenu (GO) na właściwości mechaniczne cementów kostnych. Cementy kostne z GO wykazały poprawę odporności na zginanie, podczas gdy cementy kostne z G wykazały zmniejszenie wydajności przy badaniu zginania czteropunktowego (o 15 – 24% - wytrzymałość na zginanie i 8 – 18% - moduł zginania). Wytrzymałość na ściskanie cementu PMMA zmniejszyła się, gdy dodano grafen, aczkolwiek różnice były mniej wyraźne. Natomiast dodatek 0,1% GO spowodował wzrost wytrzymałości na ściskanie o 12,6%. Naukowcy postulują, że wysoka funkcjonalizacja GO w porównaniu z G ułatwiła tworzenie silniejszej adhezji międzyfazowej między GO a PMMA, co przełożyło się na lepsze właściwości materiału. W innych badaniach Wright i współpracownicy [95] testowali metakrylowy cement kostny wypełniony funkcjonalnymi materiałami grafenowymi (FGM). Jak pokazują wyniki, dodatek 1 %mas. FGM, powoduje spadek wytrzymałości na ściskanie o ok. 10%, co może być spowodowane agregacją cząstek FGM. Pahlevanzadeh i inni [96] badali wpływ dodatku nanorurek węglowych (CNT) i zredukowanego tlenku grafenu (rGO) na właściwości mechaniczne cementów kostnych. Oba dodatki spowodowały poprawę właściwości mechanicznych cementu kostnego, jednakże materiał wzmocniony rGO wykazywał lepsze właściwości, co może wynikać z wysokiego stopnia funkcjonalizacji powierzchni rGO, prowadzącego do silnego pomarszczenia powierzchni, a tym samym wysokiej przyczepności i zazębiania się nanocząsteczkowego wzmocnienia z matrycą cementu kostnego. Po dodaniu 0,5 %mas. rGO wytrzymałość na ściskanie i rozciąganie cementu kostnego wzrosła z $92,1 \pm 0,7$ MPa i $40,0 \pm 0,7$ MPa do odpowiednio $187,5 \pm 5,8$ MPa i $64,9 \pm 0,8$ MPa. W swoich badaniach Al-Janabi i inni [97] wykazali, że właściwości mechaniczne cementów

kostnych wzrastały także po dodaniu do 1 %mas. TiO_2NPs modyfikowanych silanowym środkiem sprzęgającym, jednakże dalsze zwiększenie ilości dodatku skutkowało pogorszeniem właściwości.

Jak wykazano powyżej, wiele czynników wpływa na właściwości mechaniczne cementów kostnych. Cechą wspólną wpływu wszystkich typów modyfikatorów jest spadek właściwości mechanicznych cementu ze wzrostem stężenia modyfikatora, dlatego należy dążyć do uzyskania pożądanych właściwości materiału poprzez jego modyfikację z użyciem możliwie najmniejszych ilości dodatków.

3.2. Temperatura maksymalna i czas utwardzania

Jak przedstawiono w rozdziale 2.2. *Skład cementów kostnych*, polimeryzacja związków metakrylowych jest silnie egzotermiczna (ciepło konwersji grup metakrylowych wynosi 56 kJ/mol), a temperatury utwardzania cementów kostnych osiągają wartości, które mogą powodować uszkodzenia otaczających je tkanek. Ryzyko uszkodzenia tkanek, a nawet wystąpienia nekrozy skłoniło badaczy do modyfikacji kompozycji cementów kostnych w kierunku obniżenia temperatury utwardzania.

Na zmianę temperatury maksymalnej utwardzania (T_{max}) oraz czasu utwardzania (t_{set}) cementów kostnych można wpływać poprzez zmianę stosunku L:P lub zmianę składu kompozycji tych faz. Badania Nussbauma i innych [98] wykazały, że wyższy stosunek L:P powoduje uzyskanie wyższych temperatur T_{max} przy jednoczesnym wydłużeniu czasu wiązania. Przy wysokich stosunkach L:P duże stężenie mieszaniny monomerów reagujących egzotermicznie, zwiększa maksymalną temperaturę polimeryzacji. Jednakże wysoki stosunek L:P zmniejsza również względne stężenie inicjatora (składnika, który zawarty jest proszku), co wpływa na zmniejszenie szybkości reakcji inicjowania, tym samym zmniejszając szybkość polimeryzacji, co wydłuża czas wiązania BC. Efekt cieplny oraz czas reakcji polimeryzacji zależą również od stężenia składników układu inicjującego. Zwiększenie stężenia BPO z 0,5 g na 100 ml MMA do 2,75 g na 100 ml MMA (przy stałym stężeniu DMPT 0,2 ml na 100 ml MMA) skróciło czas wiązania z 28,3 minut do 9,3 minut. Podobnie, zwiększenie stężenia DMPT z 0,2 ml na 100 ml MMA do 4,9 ml na 100 ml MMA (przy stałym stężeniu BPO wynoszącym 0,5 g na 100 ml MMA) skróciło czas wiązania z 28,2 minut do 5,5 minuty [98]. Pascual i współpracownicy [99] natomiast otrzymali wyniki wskazujące na mniejszy wpływ stężenia BPO i DMPT na czas utwardzania. Jak wynika z ich badań, zwiększenie stężenia BPO z 0,75% do 2% skróciło czas wiązania o 20%, a temperatura polimeryzacji wzrosła średnio o 3 – 6 °C. Kiedy zwiększono ilość DMPT z 1% do 2%, a BPO zwiększono z 0,75% do 2%, temperatura wzrosła średnio o 10 °C.

Wielkość cząstek polimeru i ich masa cząsteczkowa również mają wpływ na temperaturę polimeryzacji i czas wiązania BC. Cementy kostne zawierające PMMA o większych średnicach cząstek i szerokiej dyspersji M_w miały niższe maksymalne temperatury polimeryzacji i dłuższe czasy utwardzania. Gdy średnica cząstek wzrosła z 33 μm do 65 μm , a zakres wielkości od 10 – 60 μm

do 10 – 140 μm , temperatura maksymalna polimeryzacji spadła z około 88 °C do 62 °C, a czas wiązania wydłużył się dwukrotnie [99,100]. W innych badaniach [35] powiązano wzrost M_w zastosowanego PMMA z wydłużeniem t_D oraz t_{set} od 2 i 6 min dla $M_w = 120000$ do odpowiednio 4 i 12 min dla $M_w = 400000$. Tham i współpracownicy [30] zaobserwowali, że zastąpienie liniowego PMMA o $M_w = 12000$ g/mol, 4-ramiennym polimerem gwiaździstym PMMA o $M_w = 45000$ g/mol, powoduje obniżenie T_{max} o 4% i wydłużenie t_{set} o 9%.

Wprowadzenie do fazy ciekłej BC monomerów o różnej budowie chemicznej może wpłynąć zarówno na zmianę efektu cieplnego polimeryzacji, jak i czasu jej trwania. Metakrylan 2-hydroksyetylu (HEMA) i dimetakrylan glikolu etylenowego (EGDM) oraz dimetakrylan glikolu trietylenowego (TEGDM) wpływają zarówno na t_{set} jak i T_{max} . Chen i współpracownicy [101] wykazali, że dodanie HEMA powoduje wydłużenie czasu wiązania cementu. Cementy z dodatkiem 10% HEMA wykazywały $t_{set} = 25,9$ min, który skracał się wraz z dalszym wzrostem stężenia monomeru, a temperatura T_{max} wynosiła 76,4 °C, co oznacza spadek o 18% w porównaniu do próby kontrolnej. Zwiększenie ilości HEMA do 60% spowodowało skrócenie czasu wiązania do 17,5 min, natomiast temperatura T_{max} wzrosła do 100,4 °C (wzrost o 1%). Elvira i współpracownicy [102] zauważyli, że dodanie HEMA w ilościach między 9 a 40% powoduje wzrost T_{max} o 1,35 – 1,45%. Dla porównania, dodanie EGDM lub TEGDM jako monomerów wielofunkcyjnych skraca okres indukcji polimeryzacji i powoduje wzrost wydzielania ciepła [103].

Wprowadzanie do kompozycji cementów kostnych dodatków niebiorących udziału w reakcji, m.in. antybiotyków, czynników antybakteryjnych, środków kontrastujących, wypełniaczy, czy nośników leków i dodatków poprawiających uwalnianie leków również wpływa na temperaturę i czas reakcji. Pahlevanzadeh i współpracownicy [104] zaobserwowali obniżenie T_{max} z 74,7 °C do 73,2 °C przy jednoczesnym wydłużeniu t_{set} z 14,5 do 15,4 min dla cementów kostnych po dodaniu 10% klindamycyny. Grupa badawcza pod kierunkiem Wekwejtę [105] wykazała skrócenie czasu utwardzania o 8% po dodaniu antybiotyków oraz statystycznie nieistotną zmianę po dodaniu AgNPs. Co więcej, wykazali, że wprowadzenie do cementu kostnego AgNPs powoduje wzrost T_{max} o 5 – 10% [106], natomiast dodatek AgNPs na bioaktywnym szkło (BG-AgNPs) wydłużenie t_{set} (o 4 – 7%) oraz obniżenie T_{max} (o 10 – 12%) [107].

Dodatek porogenów mających poprawić uwalnianie antybiotyków z cementów kostnych wpływa nie tylko na właściwości mechaniczne, ale także na sam proces utwardzania cementu kostnego. Chen i współpracownicy [108] w celu zwiększenia porowatości cementu dodali do jego kompozycji żelatynę jako środek tworzący pory i nośnik leku. Dodatek ten spowodował wydłużenie t_D z 2 – 3 minut do 4 min dla 10% żelatyny, do nawet 11 min przy zawartości 50% tego modyfikatora. Żelatyna działała nie tylko jako porogen, ale też jako retarder polimeryzacji, powodujący wydłużenie t_{set} oraz obniżenie T_{max} o nawet 40%. Podobne wyniki uzyskali w innych swoich badaniach [109]. *Doughing time* po dodaniu żelatyny wzrósł z 3,3 min do 3,5 min

(10% żelatyny) i 4,5 min (20% żelatyny), T_{max} obniżył się o ok. 15%, a t_{set} wydłużył się do nawet 11,9 min (20% żelatyny). Naukowcy postulują, że główną przyczyną zaobserwowanych zmian jest brak możliwości reakcji danej substancji z fazą ciekłą cementu kostnego. Ponadto, zwiększona zawartość żelatyny w fazie stałej ogranicza liczbę składników aktywnie uczestniczących w procesie polimeryzacji, co może wpływać na właściwości końcowe materiału.

Wielu badaczy w celu poprawienia biokompatybilności oraz procesu uwalniania leków wprowadzało do cementu kostnego substancje naturalne, takie jak m.in. chitozan, celuloza czy hydroksyapatyt. Zapata i współpracownicy [90] zmodyfikowali cement kostny dodatkiem chitozanu w ilości 5 – 20%. Spowodowało to obniżenie T_{max} oraz wydłużenie t_{set} wraz ze wzrastającą ilością chitozanu o odpowiednio 2 – 22% i 4 – 54%. Wekwejt i współpracownicy [89] wprowadzili do cementu kostnego celulozę, chitozan, magnez, polidioskson i fosforan trójwapniowy w ilości 10%. Dodatki te (z wyjątkiem magnezu – wzrost o 5%) spowodowały nieznaczny spadek T_{max} (2 – 7%) oraz wydłużenie t_{set} (z wyjątkiem magnezu i TCP – spadek o 10% i 9%). W innych badaniach [110], dodanie HA oraz TCP wydłużyło t_{set} oraz obniżyło T_{max} wraz ze wzrostem ilości modyfikatorów. Z kolei, Wang i współpracownicy [46] wprowadzili do ALBC karboksymetylocelulozę (CMC). Czas wiązania uległ nieznacznemu skróceniu po dodaniu niewielkich ilości CMC ($\leq 3\%$), podczas gdy wprowadzenie 4% CMC spowodowało nieznaczne wydłużenie t_{set} . Dodanie uwodnionego CMC i wynikająca z tego zwiększona porowatość poprawiły przewodzenie ciepła, a to wpłynęło na obniżenie T_{max} z $62,5 \pm 1,2$ °C dla cementu bez CMC do temperatur poniżej 37 °C po dodaniu 4% CMC.

W innych badaniach Qin i współpracownicy [91] wykazali, że dodatek 10% sfer z fosforanu wapnia (SCPS) wydłuża *doughing time* o 50 sekund w porównaniu do wyjściowego cementu kostnego. W kolejnych badaniach [111] zmodyfikowano cement kostny z dodatkiem ketoprofenu poprzez wprowadzenie usieciowanej soli sodowej poli(metylometakrylanu kwasu akrylowego) do cementu kostnego. Spowodowało to nieznaczne wydłużenie czasu oraz obniżenie temperatury utwardzania o odpowiednio 16% i 2%.

Chęć poprawy właściwości mechanicznych cementów kostnych doprowadziła do ich modyfikacji dodatkiem wielu różnego rodzaju napełniaczy, które jednocześnie wpływały na parametry utwardzania cementów kostnych. W swoich badaniach, Paz i inni [112] wprowadzili do cementów kostnych grafen oraz grafen sfunkcjonalizowany poprzez silanizację, co wpłynęło na parametry T_{max} i t_{set} . Dodatek grafenu spowodował nieznaczny wzrost T_{max} , natomiast modyfikowany grafen obniżył tę temperaturę o 20%, przy niemal niezmiennym t_{set} . Dodatek zredukowanego tlenku grafenu spowodował nieznaczne wydłużenie t_{set} o 5,6% oraz obniżenie T_{max} o 4,2%, natomiast dodatek nanorurek węglowych wydłużył t_{set} o 5,9% oraz obniżył T_{max} o 2,4%. Zjawisko to przypisuje się spowolnieniu reakcji polimeryzacji, wynikającemu z aktywnej roli, jaką nanomateriały mogą odgrywać w procesie polimeryzacji rodnikowej, działając jako zmiataacze rodników w trakcie reakcji na skutek swojej wysokiej

reaktywności [113,114]. W innych badaniach, Nien [115] dowiódł, że modyfikacja cementu kostnego wielościennymi nanorurkami węglowymi powoduje nieznaczny wzrost T_{max} , a także znaczne wydłużenie t_{set} .

Grupa badawcza pod kierunkiem Wang [116], wprowadziła do cementów kostnych metakrylan 2-(tert-butyloamino)etylu (TBAEMA), γ -metakryloksypropylotrimetoksylan (MPS) oraz octan wapnia. Czas wiązania BC wzrastał wraz ze wzrostem zawartości TBAEMA i do zawartości 10% spełniał wymagania normy ISO 5833. Dalszy wzrost ilości TBAEMA powodował wydłużenie t_{set} do 25 min (20% TBAEMA), a nawet 45 min przy 40% TBAEMA. Temperatura maksymalna obniżała się wraz ze wzrostem zawartości TBAEMA o 28%, 30%, 45% i 63%, dla odpowiednio 2%, 3%, 5% i 10% TBAEMA. Robo i inni [117] do komercyjnego cementu kostnego wprowadzili kwas linolenowy (LA), co spowodowało wydłużenie czasu utwardzania i *doughing time* o 11,7% i 35,2%, jednocześnie spadek T_{max} o 57,8%.

3.3. Właściwości antybakteryjne

Jednym z najpoważniejszych powikłań związanych z całkowitą wymianą stawu jest rozwój infekcji, która może być spowodowana bezpośrednim zanieczyszczeniem biomateriału lub otaczającej tkanki, a także zakażeniem krwi i kości lub rozprzestrzenianiem się infekcji powierzchniowej. Chociaż częstość występowania infekcji wynosi zaledwie od 0,5% do 3%, to w niektórych przypadkach może prowadzić do śmierci [118]. W przypadku operacji wszczepienia endoprotezy spektrum bakterii prowadzących do zakażeń pooperacyjnych jest szerokie i obejmuje: gronkowce koagulazo-ujemne; paciorkowce; enterokoki; pałeczki Gram-ujemne; beztlenowce; liczne patogeny lub nieznane drobnoustroje [119,120]. Z tego względu stosuje się szeroką gamę środków antybakteryjnych, o zróżnicowanym działaniu.

3.3.1. Dodatek antybiotyków

Najpowszechniej stosowanymi środkami antybakteryjnymi w leczeniu infekcji są antybiotyki. W przypadku infekcji wymagana jest wysoka dawka antybiotyków dostarczanych ogólnoustrojowo, aby osiągnąć skuteczne ich stężenie w miejscu implantacji. Niemniej jednak wysokie dawki antybiotyków mogą powodować różnego rodzaju skutki uboczne, jak wykształcenie antybiotykooporności przez bakterie, miejscowe działanie cytotoksyczne, nefrotoksyczność lub uszkodzenia układu nerwowego [121]. Zatem, aby zapobiec powstawaniu powikłań związanych z rozwojem infekcji, a jednocześnie uniknąć stosowania antybiotyku ogólnoustrojowo, stosuje się dodatek antybiotyków bezpośrednio do kompozycji cementu kostnego. Główną zaletą tego rozwiązania jest uwalnianie antybiotyków w miejscu implantacji, co pozwala na osiągnięcie wysokich stężeń w miejscu działania i minimalną toksyczność ogólnoustrojową lub jej brak [118,122]. Jednak stosowanie cementu kostnego obciążonego antybiotykiem w pierwotnej artroplastyce jest kontrowersyjne, ponieważ jego włączenie w skład BC może zmniejszyć

właściwości mechaniczne cementu, a jego stosowanie może powodować wytworzenie oporności bakterii po długotrwałej ekspozycji na antybiotyki [118,123–125].

Antybiotyk stosowany do BC powinien mieć szerokie spektrum działania przeciwbakteryjnego (obejmujące bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne) oraz niski odsetek gatunków opornych. Najczęściej stosowanymi antybiotykami w cementach kostnych są gentamycyna (GTMC) i tobramycyna (aminoglikozydy o szczególnej skuteczności przeciwko bakteriom Gram-ujemnym) i wankomycyna (glikopeptyd aktywny głównie na bakterie Gram-dodatnie, np. *Staphylococcus aureus*). Ponadto, ilość zastosowanego antybiotyku musi zapewniać jego miejscowe stężenie powyżej minimalnego poziomu inhibicji (*ang. minimum inhibitory concentration, MIC*) – najniższe stężenie substancji przeciwdrobnoustrojowej, które całkowicie hamuje wzrost mikroorganizmu *in vitro*, a zatem parametr ten różni się w zależności od konkretnego szczepu bakterii i środka antybakteryjnego [126]. Zmierzona wartość MIC antybiotyku może się znacznie różnić w zależności od profili oporności i wrażliwości oraz podgatunków bakterii. Innym ważnym parametrem jest skuteczność antybiotyku (z *ang. antibiotic effectiveness – AE*), która oznacza okres, w którym dawka leku jest w stężeniu powyżej MIC [127]. Ostatecznym celem jest osiągnięcie odpowiednich stężeń antybiotyków w tkankach i kościach, tak aby jednocześnie uniknąć toksycznego stężenia leku. To powoduje, że istotna jest rozpuszczalność antybiotyku w wodzie, i takie leki, które są rozpuszczalne w wodzie, sprawdzają się najlepiej [128,129]. Ponadto, ze względu na silnie egzotermiczny charakter reakcji polimeryzacji cementów kostnych podczas procesu utwardzania, antybiotyki przeznaczone do mieszania z cementem muszą być stabilne termicznie. Z drugiej strony nie powinny wpływać na reakcję polimeryzacji cementów kostnych czy ulegać chemicznej dezaktywacji przez komponenty tych materiałów [129]. Dlatego przy omawianiu ALBC trzy główne czynniki wpływające na cementy obciążone antybiotykami muszą być wzięte pod uwagę: właściwości mechaniczne (głównie wytrzymałość na ściskanie), uwalnianie antybiotyków i wzrost tkanki kostnej [58].

Antybiotykowe cementy kostne można podzielić, ze względu na ilość dodanego antybiotyku, na cementy z dodatkiem małej dawki (od 0,5 do 2 g antybiotyku na 40 g PMMA) oraz wysokiej dawki ALBC (≥ 5 g antybiotyku na 40 g proszku BC) [130]. Wielu autorów twierdzi, że w przypadku ostrych infekcji należy stosować wysokie dawki antybiotyków, powyżej 2 g na każde 40 g cementu, zwykle od 6 do 8 g na każde 40 g, w celu skutecznego uwalniania i przedłużonego działania przeciwko patogenom [128,131].

Pierwszym antybiotykiem wprowadzonym do cementów kostnych była gentamycyna. Jest ona również najszerzej stosowanym antybiotykiem w komercyjnych cementach kostnych zarówno pojedynczo, jak i w połączeniu z innym antybiotykiem [58]. Uwalnianie gentamycyny z cementów kostnych charakteryzuje się gwałtownym wzrostem ich stężenia w miejscu przeznaczenia (*ang. burst release*) w pierwszych 24h, po których następuje szybki spadek

uwalniania oraz niewielkie i stabilne uwalnianie w końcowej fazie badania [82]. Jednakże, całkowite uwalnianie gentamycyny z cementów kostnych jest na bardzo niskim poziomie i waha się od 1% do 5,3% dla cementów kostnych CMW (CMW1, CMW3, CMW Endurance, CMW 2000 – DePuy Synthes, Raynham, Massachusetts, USA) [132,133] przez 8,4% dla Palacos R (Heraeus Medical GmbH, Wehrheim, Niemcy) [134], do 17% dla cementu Palamed (Heraeus Medical GmbH, Wehrheim, Niemcy) [133]. Ponadto, cement kostny Palacos R+G nie zapewnia ciągłego, znaczącego uwalniania gentamycyny przez pierwsze 24 godziny [135]. Badania Van de Belta i współpracowników [134] na sześciu komercyjnych cementach kostnych z gentamycyną pokazały, że żaden z nich nie powoduje redukcji formowania biofilmu po 6 godzinach, w porównaniu do niemodyfikowanych cementów. Dla cementów CMW1 i Palacos R zaobserwowano redukcję powstawania biofilmu po 24 godzinach. Natomiast cementy CMW Endurance, CMW2000 and Palamed zaczęły wykazywać aktywność po 48 godzinach i 72 godzinach [134]. Dodatkowo, cement kostny Palacos R z gentamycyną wykazuje 93% aktywność wobec *P. aeruginosa* [136]. Co więcej, włączenie gentamycyny do cementów kostnych oraz jej powszechne stosowanie w praktyce medycznej, spowodowało nabycie oporności na gentamycynę przez szczepy *S. aureus* [137].

Z tego względu zaczęto poszukiwania innego, bardziej skutecznego antybiotyku. Uwagę naukowców zwróciła wankomycyna, która jest stabilnym termicznie antybiotykiem wykorzystywanym w walce z infekcjami wywołanymi przez *S. aureus* [126]. Ma ona właściwości fizyczne i chemiczne podobne do właściwości aminoglikozydów, z pewnymi ograniczeniami dotyczącymi trudności polimeryzacji cementu przy zastosowaniu wysokich dawek, jak i krótkiego okresu uwalniania [138]. Badania na różnych cementach (Cemex, Palacos, i Simplex) wykazały, że sama wankomycyna uwalniała się w mniejszym stopniu i mniej skutecznie w porównaniu z gentamycyną, co może być związane z jej właściwościami fizykochemicznymi czy masą cząsteczkową [139]. Jednakże przy wysokich dawkach wykazuje ona mniejszą toksyczność wobec osteoblastów niż gentamycyna [140]. Na podstawie przeprowadzonych badań, Masri i współpracownicy [141] zalecali, aby wankomycyna nie była stosowana bez wprowadzenia dodatkowego środka antybakteryjnego w cementach kostnych, jeśli tymczasowy implant ma być pozostawiony przez okres 4 miesięcy, ponieważ poziom antybiotyku spada poniżej granicy wrażliwości dla wankomycyny.

Z kolei, tobramycyna związana z PMMA jest bardzo efektywna w zapobieganiu i ograniczaniu infekcji wywołanych przez szerokie spektrum mikroorganizmów. Ponadto jest stabilna podczas egzotermicznej polimeryzacji cementu, a jej uwalnianie na powierzchni PMMA występuje w stężeniach, które zwykle hamują wzrost większości badanych bakterii [131,142]. Badania wykazały aktywność tobramycyny, dodanej do cementu Simplex, na poziomie 98% przeciwko szerokiemu spektrum patogenów w klinicznie istotnych zakażeniach ortopedycznych (tlenowe bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne, bakterie beztlenowe i prątki) [136,142].

Antybiotyk ten w porównaniu z wankomycyną wykazuje większe stężenie uwalnianego leku w początkowych kilku godzinach, jednakże spadek uwalniania w czasie przebiega z większą szybkością [141].

Gentamycyna, wankomycyna i tobramycyna są najczęściej dodawane do mieszanek cementowych ze względu na ich zdolność do zwalczania różnych bakterii Gram-dodatnich, takich jak takich jak *Staphylococcus aureus* wrażliwych na metycylinę (MSSA), *Staphylococcus aureus* opornych na metycylinę (MRSA), *Streptococcus* i bakterii Gram-ujemnych, takich jak *Pseudomonas aeruginosa*. Jednakże, ze względu na małe stężenia uwalnianych leków oraz lekooporność bakterii stosuje się również kombinacje tych antybiotyków ze sobą [118] czy z innymi lekami, a także inne antybiotyki różnego rodzaju, jak na przykład ampicylina czy ryfampicina i wiele innych [33,82,118].

Połączenie dwóch antybiotyków staje się coraz bardziej powszechną praktyką w infekcjologii ze względu na ich synergistyczne działanie (zwykle wankomycyna i aminoglikozydy są łączone ze względu na ich potencjalny efekt synergistyczny w leczeniu poważnych zakażeń wywołanych przez *S. aureus*) [131]. Połączenie gentamycyny z wankomycyną wykazuje większą efektywność w zwalczaniu infekcji w porównaniu do pojedynczych antybiotyków [69]. Dodanie do cementu tobramycyny z wankomycyną wywołuje efekt synergistyczny nazywany biernym oportunizmem (*ang. passive opportunism*), ponieważ drugi antybiotyk wydaje się działać po prostu jako rozpuszczalny bierny dodatek poprawiający uwalnianie obu antybiotyków [141,143,144]. Inne badanie pokazało, że synergistyczne działanie gentamycyny i teikoplaniny miało wyższą aktywność bakteriobójczą w porównaniu do gentamycyny i wankomycyny, a także że to połączenie wywołuje działanie bakteriobójcze zarówno przeciwko bakteriom Gram-ujemnym, jak i Gram-dodatnim [145]. Cement kostny zawierający gentamycynę i klindamycynę (cement kostny Copal G+C) charakteryzuje się uwalnianiem antybiotyków przez okres 28 dni, z przedłużonym hamowaniem szczepów *S. aureus* wrażliwych na gentamycynę i koagulazo-ujemnych *S. aureus* gentamycyno-opornych, w tym okresie [146]. Stosowane jest również wiele innych kombinacji antybiotyków, które wykazują efekt synergistyczny oraz poprawione uwalnianie i zwiększoną aktywność względem cementów z jednym antybiotykiem [118,147].

ALBC charakteryzują się uwalnianiem antybiotyków z matrycy polimerowej na niskim poziomie, a co za tym idzie koniecznością stosowania wysokich dawek substancji, w celu osiągnięcia stężenia wymaganego do walki z infekcją. Dodatek dużych ilości antybiotyków do BC powoduje pogorszenie ich właściwości mechanicznych, a także prowadzi do wytworzenia antybiotykooporności przez szczepy bakteryjne. Przeciwdziałanie tym zjawiskom pchnęło naukowców w kierunku testowania nieantybiotykowych środków antybakteryjnych.

3.3.2. Inne środki antybakteryjne

Problem niskiej skuteczności działania antybiotyków zawartych w cemencie kostnym stworzył potrzebę zbadania możliwości włączenia do ich kompozycji nowych czynników przeciwdrobnoustrojowych. Badaniom poddano różne środki antybakteryjne, takie jak nanocząstki srebra [107,119,148], złota [87,119] lub miedzi [32], a także hydroksyapatyt [149,150], bioaktywne szkło [107,151], nanocząstki tlenku grafenu [152–154], olejki eteryczne [119,155,156], na przykład olejek z mięty pieprzowej [31,119] lub różnego rodzaju metakrylowe pochodne substancji czynnych, takie jak metakrylan benzotiazolu (BTTMA) [157], dimetakrylan glikolu etylenowego modyfikowany jodkiem piperazynooktyloamoniowym (QAMA) [158] i inne.

W literaturze szeroko opisane są badania nad zastosowaniem nanocząstek srebra (AgNPs) jako środków antybakteryjnych. AgNPs inaktywują enzymy niezbędne dla bakterii i dezaktywują mechanizm replikacji bakteryjnego DNA. Testy przeciwdrobnoustrojowe wykazały również, że cementy z nanocząstkami srebra nie wykazują aktywności przeciwdrobnoustrojowej przeciwko bakteriom planktonowym, jednakże są w stanie ilościowo zmniejszyć tworzenie się biofilmu na powierzchni materiału [86]. Wyniki te sugerują, że cementy zawierające nanocząstki srebra mają duży potencjał do zastosowania w zabiegach artroplastyki, w których konieczne jest zapobieganie adhezji bakterii [86,89,159]. W przypadku cząstek o małej średnicy nie obserwuje się wystąpienia żadnych efektów bakteriobójczych, natomiast dla cementu kostnego obciążonego nanosrebrem o dużej średnicy cząstek zaobserwowano znaczną redukcję zakażenia gronkowcem złocistym opornym na metycylinę (MRSA) [160]. Robu i inni [119] wykazali, że dodatek AgNPs do cementów kostnych generuje wyraźne strefy zahamowania wzrostu o średnicach porównywalnych do próbek z gentamycyną, dla szczepów *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) i *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Podobnie Wekwejt i inni [32] pokazali, że cement kostny modyfikowany AgNPs wykazywał silniejsze działanie antybakteryjne i lepiej zapobiegał tworzeniu się biofilmu w porównaniu do cementu kostnego z antybiotykami. Ponadto, wykazywał dobrą cytokompatybilność bez zauważalnej hemolizy erytrocytów lub dysfunkcji płytek krwi oraz dobrą żywotność komórek macierzystych miazgi zębowej (DPSC).

Badania przedstawione w pracy [107] pokazują, że dodatek szkła bioaktywnego z AgNPs do cementów kostnych poprawia ich skuteczność antybakteryjną, jednakże pogarsza cytotoksyczność. W innym badaniu Robu i współpracownicy [31] wprowadzili AgNPs w szkło ceramiczne do cementów kostnych. Modyfikowane BC wykazały dobrą biokompatybilność i możliwość proliferacji osteoblastów (test MTT) wraz z niskim poziomem cytotoksyczności (test LDH). Wyniki badań Liu i współpracowników [161] wykazały, że włókno kompozytowe na bazie poli(kwasu L-mlekowego) (PLLA) i srebra (Ag), w którym nanocząstki srebra były równomiernie rozmieszczone na wewnętrznej powierzchni włókien PLLA ma doskonałe działanie przeciwbakteryjne przeciwko *E. coli* i *S. aureus* oraz dobre właściwości osteoindukcyjne i angiogenne. W kolejnej pracy [162] wykazano, że przygotowane kompozyty hybrydowe na bazie

montmorylonitu i AgNPs (MMT-AgNPs) charakteryzują się przedłużonym uwalnianiem jonów srebra i wykazują działanie przeciwbakteryjne.

Innymi nanocząstkami wykorzystanymi jako środki antybakteryjne są nanocząstki złota (AuNPs). Na przykład Russo i współpracownicy [26] wykazali ich aktywność antybakteryjną przeciwko opornym na metycylinę *Staphylococcus aureus* (MRSA) i szczepów *Pseudomonas aeruginosa*. W innych badaniach, Świeczko-Żurek i inni [163] do cementu PMMA dodali miedź o wielkości cząstek w zakresie 10 – 30 nm (Cu10) i 70 – 100 nm (Cu70) oraz AgCu i nikiel. W przypadku próbek zawierających Ni i AgCu bakterie przylegają do ich powierzchni i tworzy się na nich biofilm, natomiast na obu próbkach Cu10 i Cu70 nie zaobserwowano śladów ani bakterii, ani biofilmu. Efekt antybakteryjny w znacznym stopniu zależy zatem od rodzaju zastosowanego pierwiastka metalicznego. Jest on najbardziej widoczny w przypadku nanomiedzi, a pomijalny w przypadku nanocząstek AgCu i niklu. W innych badaniach Wekwejt i współpracownicy [32] badali cement kostny modyfikowany NPCu. Wykazywał on silniejsze działanie bakteriobójcze i lepiej zapobiegał tworzeniu się biofilmu w porównaniu do cementu kostnego obciążonego antybiotykami, jednakże nasilał hemolizę erytrocytów, zmniejszał agregację płytek krwi i obniżał żywotność DPSC. Uszkodzenie i rozpad krwinek czerwonych może prowadzić do lokalnych stanów zapalnych lub zaburzeń krzepnięcia, a to w konsekwencji ogranicza potencjał kliniczny zastosowania NPCu lub wymaga optymalizacji stężenia oraz sposobu ich immobilizacji w matrycy polimerowej.

Zastosowanie nanocząstek metali jako środków antybakteryjnych budzi wiele kontrowersji. Wiele badań wskazuje na brak wyraźnych niepożądanych efektów cementów kostnych modyfikowanych AgNPs, dobrą antybakteryjność i cytotosyczność [32,87,160,164,165]. Z drugiej jednak strony, inni badacze wskazują na ostrą toksyczność NPCu, która uszkadza wątrobę, nerki i śledzionę [166,167], a stosowanie NPCu poza granicami bezpieczeństwa (w zależności od wielu czynników) może prowadzić do poważnej cytotoksyczności [168,169]. Jednakże skuteczność bakteriobójcza, a także toksyczne działanie nanometali, zależy od ich rodzaju, dawki, rozmiaru, całkowitej powierzchni, a także aglomeracji [165].

Innym podejściem jest wykorzystanie związków chemicznych pochodzenia roślinnego, jak na przykład olejki eteryczne. Olejki eteryczne na bazie ekstraktów roślinnych, takich jak mięta pieprzowa, cynamon, cytryna i goździki wykazują działanie przeciwbakteryjne, przeciwzapalne i potencjał antyoksydacyjny [155]. Robu i współpracownicy [119] wprowadzili do cementów kostnych olejek z mięty pieprzowej zaimpregnowany na hydroksyapatycie. Ich badania wykazały działanie hamujące wzrost bakterii, generując wyraźne strefy zahamowania wzrostu o średnicach porównywalnych z próbką z gentamycyną dla *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) i *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Co więcej, ekstrakt z mięty pieprzowej został również włączony do nanowłókien na bazie poliuretanu (PU), a uzyskane materiały wykazywały kontrolowane

uwalnianie substancji aktywnej przez 144 godziny, osiągając skuteczność przeciwbakteryjną na poziomie 99,9% wobec *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. [170].

Innym obiecującym olejkiem eterycznym jest eugenol ekstrahowany z goździków [171,172]. Jest on stosowany w przemyśle farmaceutycznym jako środek przeciwbólowy, przeciwzapalny, przeciwwirusowy, przeciwgrzybiczy, antyseptyczny, przeciwskurczowy, przeciwwymiotny i miejscowo znieczulający. Wykazuje właściwości przeciwdrobnoustrojowe przeciwko bakteriom chorobotwórczym [48], zarówno bakteriom Gram-ujemnym, jak i Gram-dodatnim oraz właściwości przeciwutleniające [131,172]. Pomimo obiecujących właściwości, w literaturze brak jest doniesień na temat jego zastosowania jako środka antybakteryjnego w cementach kostnych, co stało się inspiracją do podjęcia badań przedstawionych w ramach niniejszej pracy.

Zastosowanie niekonwencjonalnych środków antybakteryjnych w cementach kostnych jest bardzo obiecujące w kontekście przeciwdziałania infekcji, jednakże wymaga szczegółowych badań cytotoksyczności uzyskanych materiałów, jak również wpływu dodatków na właściwości cementów kostnych. Niemniej jednak w kontekście wad stosowania antybiotyków ta ścieżka badań może przynieść wiele korzyści.

3.3.3. Poprawa uwalniania substancji antybakteryjnych

Uwalnianie antybiotyków z cementów kostnych przebiega na bardzo niskim poziomie, w wyniku czego większość wprowadzonego leku pozostaje w matrycy polimerowej i nie bierze udziału w zwalczaniu infekcji. Ponadto, ze względu na kinetykę uwalniania większości antybiotyków efekt antybakteryjny najsilniejszy jest przez kilka pierwszych godzin, po czym następuje obniżenie uwalniania, często poniżej efektywnej dawki. Konieczność poprawy tego parametru spowodowała ukierunkowanie badań na poprawę ilości uwalnianej substancji oraz przedłużenie okresu, w którym ono występuje. Jednakże, uwalnianie leków jest procesem bardzo skomplikowanym i zależy od wielu czynników, takich jak porowatość [173,174], chropowatość powierzchni i hydrofilowość [133] cementów kostnych, dlatego też testowano różnorodne metody poprawy tego procesu.

Jedną z metod poprawy procesu uwalniania antybiotyków z cementów kostnych jest zmiana struktury materiału. Można to uzyskać między innymi poprzez zmianę stosunku fazy ciekłej do fazy proszkowej kompozycji cementu kostnego wpływając na jego porowatość. Downes w swoich badaniach [175] wykazała, że zwiększenie ilości fazy proszkowej powoduje wzrost uwalniania gentamycyny z BC. Jednakże, uwalnianie to charakteryzuje się szybką elucją w początkowej fazie i wolniejszą, ciągłą następującą po niej.

Innym sposobem jest wprowadzenie porogenów do kompozycji cementu. Wu i współpracownicy [67] badali wpływ dwóch porogenów, tj. gąbki żelatynowej – Spongostan

i granulek ceramicznych – Bicera, na uwalnianie gentamycyny z cementów kostnych. Zarówno Spongostan, jak i Bicera poprawiły miejscowe uwalnianie antybiotyku, przy czym stopień uwalniania leku przez Spongostan był znacznie wyższy niż w przypadku Bicera. Wprowadzenie ksylitolu do cementów kostnych również spowodowało poprawę uwalniania antybiotyków z cementów kostnych (o 12% dla wankomycyny i 65% dla amfoterycyny B) w porównaniu do tradycyjnych ALBC [84]. Virto i inni [176] do komercyjnego cementu kostnego z gentamycyną wprowadzili modulatory uwalniania, takie jak laktoza i hydroksypropylometyloceluloza (HPMC). Oba dodatki spowodowały wzrost porowatości cementu kostnego, jednakże w przypadku HPMC nie przełożyło się to na poprawę uwalniania, w przeciwieństwie do modyfikacji laktozą, która spowodowała znaczny wzrost uwolnionej gentamycyny.

Zwiększenie porowatości cementu uzyskać można również wprowadzając antybiotyki w postaci ciekłej. Seldes i współpracownicy [85] wprowadzili płynną gentamycynę do cementu kostnego Palacos R. Większość antybiotyku uwolnione zostało w pierwszych 24 godzinach, jednakże stężenie powyżej MIC dla *E. coli* utrzymywało się przez 3 tygodnie. W innych badaniach, Heish i inni [85] wprowadzili gentamycynę w postaci ciekłej do niemodyfikowanych BC i BC modyfikowanych wankomycyną. Wyniki pokazują, że dodatek płynnej gentamycyny powoduje zwiększenie uwalniania wankomycyny o 146%, w porównaniu do cementu z samą proszkową wankomycyną oraz o 45% zwiększyło się uwalnianie gentamycyny w cemencie z wankomycyną w porównaniu do cementu z samą płynną gentamycyną. W innych badaniach, Chang i współpracownicy [84], wprowadzili płynną wankomycynę i amfoterycynę B do cementów kostnych, co spowodowało wzrost uwalniania antybiotyków odpowiednio o 234% i 265%. Jednakże ten sposób poprawy uwalniania znacząco pogarsza właściwości mechaniczne utwardzonych cementów kostnych, co ogranicza zastosowanie tej metody modyfikacji.

Poprawę uwalniania czynnika antybakteryjnego można uzyskać również poprzez wprowadzenie inertych cząstek do kompozycji cementów kostnych. W swoich badaniach, Nien i inni [111] poprawili uwalnianie ketoprofenu z cementów kostnych o ponad 65% poprzez wprowadzenie cząstek usieciowanej soli sodowej poli(metylometakrylanu kwasu akrylowego). Włączenie sfer fosforanu wapnia domieszkowanych strontem (SCPS) do cementów kostnych zwiększyło uwalnianie antybiotyku, dodatkowo dostarczając jony strontu, działające korzystnie na odbudowę i mineralizację kości, do otoczenia, a także zwiększyło właściwości kontrastujące samego cementu [91]. Shen i inni [92] wprowadzili do cementów kostnych z gentamycyną i wankomycyną nanostrukturalne nanorurki z dwutlenku tytanu (TiO_2 TNT), co spowodowało wzrost uwolnionej gentamycyny do 50% w 70 dni i wankomycyny do 55% w 80 dni. Wprowadzenie mezoporowatej krzemionki SBA-15, a także SBA-15 modyfikowanej poli(glikolem etylenowym) (PEG) do cementów kostnych poprawiło uwalnianie gentamycyny zwiększając je odpowiednio do 18% i 37% po 70 dniach [177].

Innym sposobem poprawy uwalniania antybiotyków z cementów kostnych jest ich enkapsulacja, w szczególności w mikro- i nanoskali, co ma potencjał przedłużonego i bardziej równomiernego uwalniania. W swoich badaniach Wei i inni [178] wprowadzili do cementów kostnych nanorurki haloizytowe obciążone gentamycyną, co skutkowało zwiększonym, a zarazem wolniejszym i przedłużonym uwalnianiem gentamycyny (60% w 250 godziny). Wprowadzenie nanocząsteczek liposomów zawierających gentamycynę do cementu kostnego Palacos R również przyczyniło się do poprawy uwalniania antybiotyku z 9% dla komercyjnego cementu do 22% [179].

W innych badaniach [56] zaimpregnowano gentamycyną materiały nanostrukturalne, takie jak nanopręty hydroksyapatytu, nanorurki węglowe (CNT) i mezoporowate nanocząstki krzemionki (MSN). Obecność 5,36% CNT w funkcjonalnym cemencie kostnym może prowadzić do ponad 75% uwalniania GTMC w ciągu 60 dni, a preparat z 10,19% MSN zwiększa całkowite uwalnianie leku do 60%. Dla porównania, obecność 11,56% nieporowatych nanocząstek HAP tylko nieznacznie zwiększa całkowite uwalnianie leku do około 10%. Z kolei, Al Thaher i współpracownicy [180] wprowadzili do cementu kostnego CNT impregnowane gentamycyną (CNT-GTMC) oraz gentamycynę i CNT osobno. Cement z CNT-GTMC wykazywał znacznie wyższy procent uwalniania (45%) niż drugi cement kostny (15%), jednak uwalnianie w obu przypadkach trwało 25 dni.

Cyphert i współpracownicy [83] zaproponowali wprowadzenie cyklodekstryny (CD) wypełnionej antybiotykiem do cementów kostnych, aby zapewnić bardziej długotrwałe dostarczanie szerszego zakresu leków. Wprowadzenie CD wypełnionej gentamycyną i tobramycyną skutkowało porównywalną aktywnością przeciwdrobnoustrojową do tradycyjnych ALBC, natomiast kompleksowanie wysoce hydrofobowej ryfampicyny (RIF) w CD umożliwiło uwalnianie jej z cementów kostnych, a także pozwoliło na bardziej spójny i wydłużony czas działania przeciwdrobnoustrojowego do 60 dni, co nie było możliwe w przypadku nieskompleksowanej ryfampicyny dodanej do cementu kostnego.

Aby zapewnić szybkie i ciągłe uwalnianie antybiotyków oraz długotrwałą terapię antyosteoporotyczną wprowadzono do cementu kostnego podwójnie obciążoną żelatynę (siarczanem gentamycyny (GS) i alendronianem (ALN)) [109]. Wyniki pokazują sekwencyjne uwalnianie GS i ALN, przy czym uwalnianie GS odgrywało główną rolę w ciągu pierwszych 24 godzin, a uwalnianie ALN dominowało po 3 tygodniach, co wynika ze stopniowanego rozkładu mikrosfer żelatynowych, a końcowy współczynnik uwalniania GS (73,6%) i ALN (68,5%) ze zmodyfikowanego cementu kostnego był znacznie wyższy niż z cementu kostnego PMMA.

Wprowadzenie antybiotyków w postaci proszkowej do cementów kostnych niesie ze sobą wiele ograniczeń, jak niskie uwalnianie, czy ograniczona efektywność antybakteryjna. Ponadto, w wielu przypadkach powoduje wytworzenie antybiotykoodporności bakterii, co znacznie utrudnia walkę z infekcjami. Problemy te częściowo zostały rozwiązane poprzez wprowadzenie nieantybiotykowych środków antybakteryjnych, takich jak m.in. nanometale. Te rozwiązania

wywołują jednak liczne dyskusje, m.in. ze względu na ich możliwe toksyczne działanie. Impregnacja tych substancji na różnorodnych nośnikach może ograniczyć problem toksyczności, jednakże badania w tym kierunku wciąż są prowadzone i nie dają jednoznacznych odpowiedzi. Poprawa uwalniania antybiotyków osiągnięta została poprzez wprowadzenie nośników leków do składu cementów kostnych, jednakże w wielu przypadkach nie wyeliminowała problemu z brakiem długotrwałej aktywności antybakteryjnej, pogorszeniem właściwości mechanicznych, a także koniecznością wprowadzania osobno środków kontrastujących. Mimo obiecujących wyników przedstawionych w tym rozdziale, wymagane są dalsze badania w kierunku wyeliminowania wszystkich wad modyfikowanych cementów kostnych.

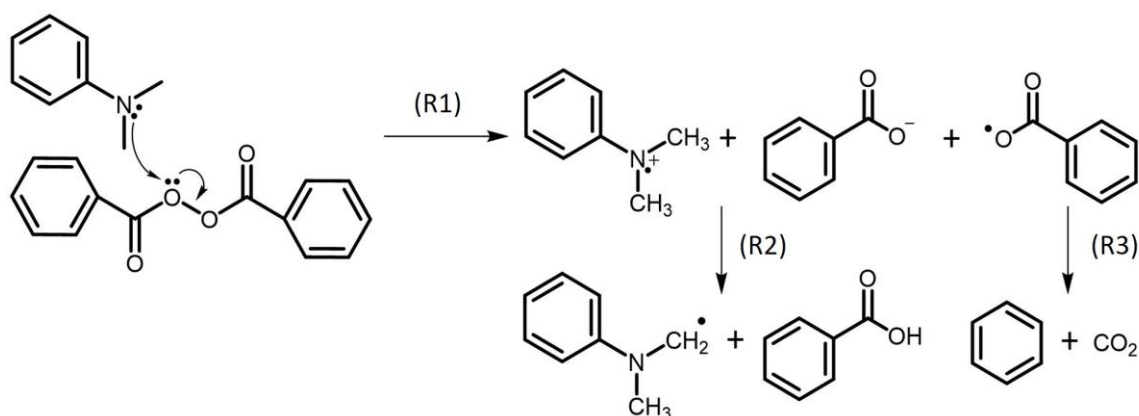
4. Polimeryzacja rodnikowa

4.1. Polimeryzacja wolnorodnikowa

Polimeryzacja rodnikowa jest najważniejszą metodą syntezy polimerów, tj. niemal 50% wszystkich syntetycznych polimerów jest wytwarzanych zgodnie z tym mechanizmem. Najważniejszymi zaletami polimeryzacji rodnikowej są dogodny zakres temperatur prowadzenia procesu (od 20 do 100 °C) i minimalne wymagania dotyczące oczyszczania monomerów, rozpuszczalników i innych składników mieszaniny reakcyjnej. Ponadto polimeryzacji rodnikowej ulega szeroki zakres monomerów winylowych, tj. większość monopodstawionych alkenów, a także niektóre dwupodstawione alkeny (jak metakrylany), prowadząc do otrzymania polimerów o dużym ciężarze cząsteczkowym. Wynika to z braku reaktywności wolnych rodników wobec protonów lub heteroatomów wielu grup funkcyjnych, w tym karboksylowych, hydroksylowych, aminowych itp. [181].

Polimeryzacja rodnikowa przebiega w trzech podstawowych etapach: inicjowania, propagacji i terminacji łańcucha polimeru. Inicjowanie obejmuje zazwyczaj dwa procesy: generowanie pierwotnych rodników inicjujących ($\text{In}^{\bullet}$) i reakcję addycji rodników pierwotnych do monomeru. Propagacja następuje poprzez powtarzalną addycję rosnącego rodnika do wiązania podwójnego monomeru. Natomiast terminacja między dwoma rosnącymi makrorodnikami może nastąpić albo przez rekombinację albo dysproporcjonowanie. Rekombinacja ma miejsce, gdy dwa rosnące makrorodniki ulegają addycji, tworząc jedną makrocząsteczkę przez wiązanie węgiel-węgiel. Natomiast dysproporcjonowanie zachodzi, gdy wodór przy atomie węgla β z jednego makrorodnika ulega przeniesieniu do drugiego makrorodnika, co prowadzi do otrzymania dwóch makrocząsteczek, z których jedna posiada wiązanie nienasycone, a druga nasycone na końcu łańcucha. Jeśli dominuje zakończenie reakcji polimeryzacji przez rekombinację, uzyskuje się polimery o wyższych masach cząsteczkowych i niższej dyspersyjności [181–183].

Generowanie pierwotnych rodników inicjujących następuje głównie poprzez dekompozycję cząsteczek inicjatorów w wyniku działania światła, podwyższonej temperatury lub reakcji redoks. Fotolityczny rozpad inicjatora polega na napromieniowaniu jego cząsteczek światłem o określonej długości fali w temperaturze pokojowej, co prowadzi do wzbudzenia cząsteczki inicjatora, a następnie jej dysocjacji z wytworzeniem rodników [182,184]. Wśród tego typu inicjatorów, tzw. fotoinicjatorów, wyróżniamy, m.in. 2,2-dimetoksy-2-fenylacetofenon (DMPA), 1-hydroksycykloheksylofenylo-ketonu (HCPK), tlenek fenylobis(2,4,6-trimetylobenzoil)fosfiny (BAPO) i inne. Termiczna dekompozycja inicjatora, tzw. inicjatora termicznego, z wytworzeniem rodników pierwotnych przebiega z reguły w zakresie temperatur 60 – 150 °C. Przykładem inicjatora termicznego jest nadtlenek benzoilu (BPO), który ulega dekompozycji w temperaturze ≥ 80 °C [183]. Inicjowanie redoks polega natomiast na wytworzeniu rodnika poprzez przeniesienie elektronu między cząsteczką aktywatora a cząsteczką inicjatora [57,185]. Przykładem układu inicjującego tego typu, jest BPO z aminą III rzędową, np. *N,N*-dimetyloaniliną (DMA), jako reduktorem (reakcje R1 – R3). W dalszej kolejności powstałe rodniki benzoiloksyłowe rozkładają się na rodniki fenylowe i dwutlenek węgla. Reakcje fragmentacji są na ogół korzystne przy niskich stężeniach monomerów, wysokich temperaturach i niskich ciśnieniach procesu. Ich znaczenie jest większe w przypadku wysokiej konwersji.



Wydajność inicjowania reakcji polimeryzacji rodnikowej jest zwykle mniejsza od 100%, ponieważ rodniki pierwotne mogą brać udział w innych reakcjach niż reakcja addycji do monomeru lub ulegać efektowi klatki rozpuszczalnika. Konwersja pierwotnych rodników do rodników inicjujących zależy od wielu czynników i zazwyczaj nie jest ilościowa. Pierwotne rodniki mogą ulec przegrupowaniu lub fragmentacji, co prowadzi do utworzenia nowych rodników lub mogą oddziaływać/reagować z rozpuszczalnikiem lub innymi substancjami niż monomer [186]. Reakcje rodników (zarówno pierwotnych, jak i powstałych w innych procesach) z monomerem mogą nie być całkowicie regioselektywne lub chemoselektywne. Co więcej, zwykle wydajność inicjowania zmniejsza się wraz z rozcieńczeniem monomeru oraz wzrostem konwersji. Wynika to z mniejszego stężenia monomeru i wyższej lepkości środowiska reakcji [181,186]. Dobór inicjatora polimeryzacji (termicznego, fotochemicznego, redoks itp.) powinien być

dostosowany do rodzaju monomeru lub mieszaniny monomerów, tak aby zminimalizować ryzyko powstawania niepożądanych grup końcowych lub, w razie potrzeby, umożliwić wprowadzenie określonej, pożądanej funkcjonalności do otrzymanego polimeru [186].

Ważnym efektem występującym w polimeryzacji rodnikowej jest okres indukcji, który charakteryzuje się brakiem rozpoczęcia polimeryzacji pomimo stworzenia wszystkich warunków do jej zainicjowania. Może wiązać się z obecnością inhibitorów w monomerze, które efektywnie wyłapują wolne rodniki w tym etapie reakcji.

W przypadku utwardzania cementów kostnych stosuje się układ inicjujący redoks, co pozwala na utwardzanie cementu w temperaturze pokojowej. Systemy fotoutwardzalne i termiczne są w tym przypadku niepraktyczne. Fotoinicjatory skutecznie utwardzają jedynie cienkie warstwy mieszaniny reakcyjnej, a promieniowanie UV może powodować uszkodzenie tkanek, w tym poparzenia i martwicę. Inicjatory termiczne wymagają temperatur powyżej 60 °C, podczas gdy denaturacja białka zachodzi już w temperaturze ok. 40 °C. Z tych powodów w cementach kostnych stosuje się system inicjujący redoks umożliwiającą polimeryzację w temperaturze pokojowej i bezpieczne stosowanie w warunkach operacyjnych.

Stężenie składników układu inicjującego (inicjatora i ko-inicjatora, utleniacza-reduktora) w polimeryzacji redoks wpływa na szybkość reakcji inicjowania (równanie (2)), a tym samym na proces polimeryzacji (równanie (3)) [187].

$$R_i = k_d[\text{reduktor}][\text{utleniacz}] \quad (2)$$

$$R_p = k_p[M] \left(\frac{k_d[\text{reduktor}][\text{utleniacz}]}{2k_t} \right)^{0,5} \quad (3)$$

W wielu procesach polimeryzacji inicjowanych przez system redoks, monomer może być zaangażowany w proces inicjowania. W literaturze [188,189] można znaleźć informację, że *N,N*-dimetyloanilina (DMA) lub jej pochodne, takie jak na przykład *N,N*-dimetylo-*p*-toluidyna, inicjują polimeryzację metakrylanu metylu, bez udziału nadttlenku benzoilu. Wynika to z powstania kompleksu przeniesienia ładunku, który tworzy się między aminą i monomerem. W tym przypadku szybkość procesu polimeryzacji jest zgodna z równaniem (4).

$$R_p = k[M]^{1,5}[\text{amina}]^{0,5} \quad (4)$$

Jednakże, jak pokazują wyniki pomiarów przeprowadzonych metodą DSC, przedstawione w naszych badaniach [57], podczas polimeryzacji kompozycji cementu kostnego zawierającego DMA, bez BPO, nie zaobserwowano wydzielania ciepła. To wskazuje, że inicjowanie polimeryzacji przez sam DMA nie zachodzi, a zatem w badanych układach szybkość polimeryzacji jest opisana równaniem (3).

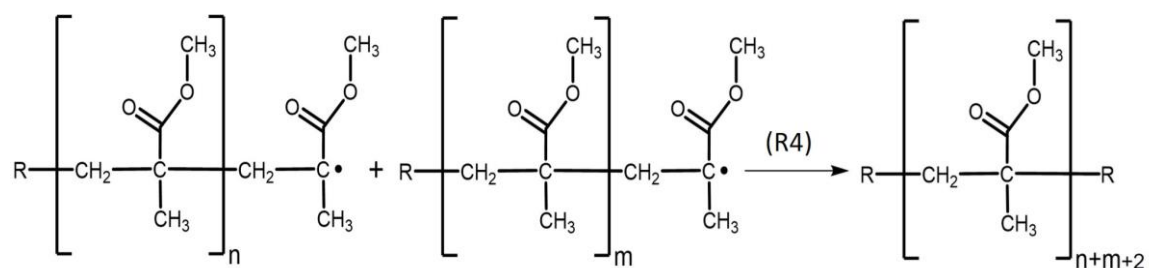
Etap propagacji polimeryzacji rodnikowej obejmuje sekwencję reakcji addycji rodnika (centrum aktywnego polimeryzacji) do podwójnych wiązań węgiel-węgiel monomeru. W celu otrzymania polimerów o dużej masie cząsteczkowej, centrum aktywne polimeryzacji musi wykazywać wysoki stopień specyficzności w reakcji z układami nienasyconymi C=C. Pomimo tego ograniczenia, w homopolimerach istnieją znaczne możliwości zmian strukturalnych. Propagacja jest wysoce chemoselektywna, a także stosunkowo regioselektywna, ale ma bardzo słabą stereoselektywność. Chemoselektywność propagacji przekracza 99,9%, natomiast addycja do podwójnych wiązań może nie być w pełni regio-specyficzna. Dominująca struktura "głowa do ogona" może być przerywana przez połączenia typu „głowa do głowy” i „ogon do ogona”. W rezultacie powstają polimery ataktyczne z niewielką preferencją dla racemicznej addycji monopodstawionych alkenów [181,186].

W większości polimerów otrzymywanych metodą polimeryzacji wolnorodnikowej dominuje addycja typu "głowa do ogona". Tylko niewielka część jednostek wykazuje połączenie typu „głowa do głowy” (1 – 2%) i jest charakterystyczna dla monomerów, jak octan winylu lub chlorek winylu, zawierających słabo stabilizujące podstawniki. Jeszcze niższą regioselektywność wykazuje fluorek winylu i trifluoroetylen (87%). Dieny polimeryzują głównie zgodnie z addycją 1,4-trans. Udział jednostek 1,4-trans w polibutadienie zbliża się do 60%, natomiast w polichloroprenie do 75% i do 80% w poliizoprenie. Dla tych dwóch ostatnich polimerów, ten typ addycji można dodatkowo zwiększyć do 90% przez polimeryzację w temperaturach poniżej temperatury otoczenia [181].

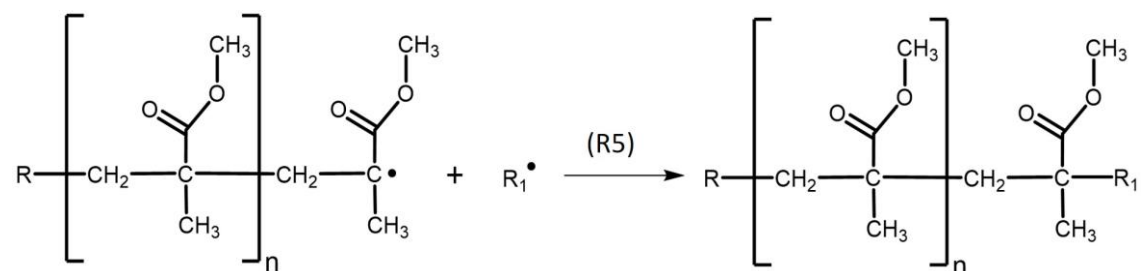
W większości reakcji polimeryzacji rodnikowych etapy propagacji charakteryzują się małą szybkością (k_p zwykle $> 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), ale są to procesy wysoce egzotermiczne. Ciepło polimeryzacji (ΔH_p) dla polimeryzacji addycyjnej można zmierzyć poprzez analizę równowagi między monomerem a polimerem [186,187]. Addycja makrorodników, a w szczególności propagacja makrorodników do układów nienasyconych C=C, jest potencjalnie procesem odwracalnym. Depropagacja jest faworyzowana przez entropię, dlatego jej stopień wzrasta wraz ze wzrostem temperatury. Temperatura, w której szybkość propagacji jest równa szybkości depropagacji, nazywana jest górną temperaturą graniczną polimeryzacji (ang. *ceiling temperature* – T_c). Powyżej temperatury T_c szybkość depropagacji jest większa niż szybkość propagacji, i trwały termodynamicznie jest tylko monomer. W przypadku większości popularnych monomerów szybkość reakcji depropagacji jest nieistotna w typowych temperaturach prowadzenia polimeryzacji. Dla procesu polimeryzacji MMA w temperaturze 100 °C, wartość stałej równowagi propagacja-depropagacja K_{eq} wynosi $<0,01$ [186].

Terminacja reakcji polimeryzacji, jak wspomniano powyżej, może nastąpić w wyniku reakcji rekombinacji, dysproporcjonowania czy reakcji przeniesienia łańcucha [182]:

- Rekombinacja z udziałem dwóch makrorodników



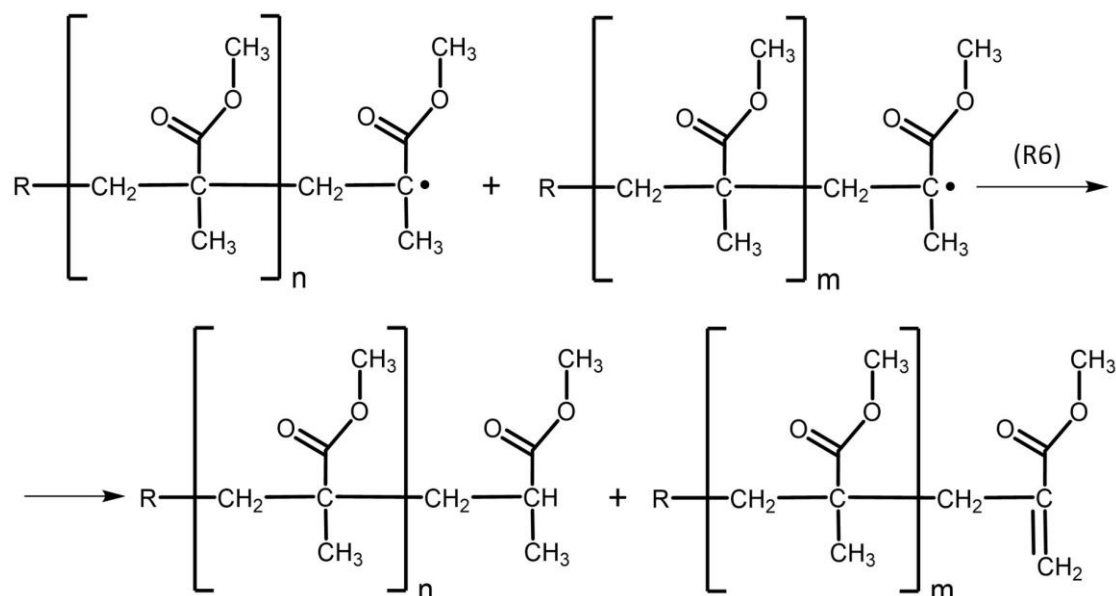
- Rekombinacja makrorodnika z udziałem innego rodnika pochodzącego z dekompozycji inicjatora (terminacja pierwotna) lub reakcji wtórnych



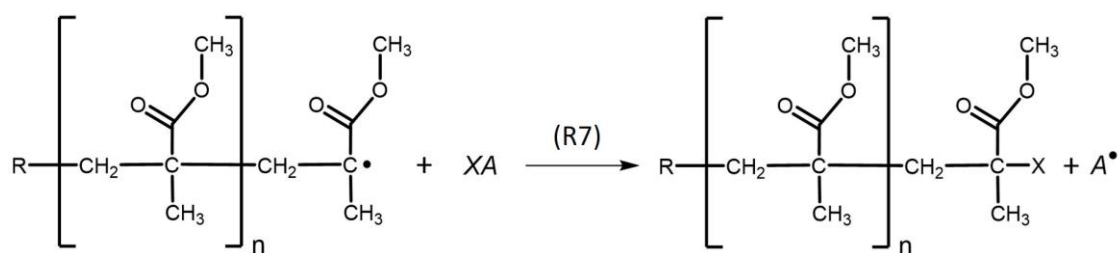
gdzie:

$\text{R}_1\cdot$ - rodnik powstały z dekompozycji inicjatora lub reakcji wtórnych

- Dysproporcjonowanie – reakcja dwóch makrorodników



- Przeniesienie aktywności łańcucha na cząsteczkę nieaktywną



gdzie:

XA – cząsteczka inicjatora, monomeru, polimeru, rozpuszczalnika bądź innej substancji,

X – przenoszony atom bądź grupa atomów.

Terminacja wzrostu łańcucha polimeru w reakcji addycji dwóch rodników jest ograniczona przez szybkość ich dyfuzji, która zmniejsza się wraz ze wzrostem konwersji z powodu wzrostu lepkości medium polimeryzującego w wyniku pojawiania się makrocząsteczek o dużej masie cząsteczkowej i splątania ich łańcuchów. Stała szybkości reakcji terminacji k_t (zwana również współczynnikiem) zależy zatem od lepkości reagującej mieszaniny, a także od długości łańcucha i zazwyczaj waha się pomiędzy $10^7 - 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [181]. Początkowe etapy polimeryzacji rodnikowej zależne są od dyfuzji translacyjnej i segmentowej, które odpowiadają za zbliżenie się do siebie makrorodników, a także ruchy segmentowe łańcuchów pozwalające na ich wzajemne splątanie oraz ruchy końców łańcuchów powodujące interakcje rodnikowych końców łańcucha [182]. W reakcji polimeryzacji wielofunkcyjnych monomerów terminacja przy maksymalnej szybkości reakcji zdominowana zostaje przez dyfuzję reakcyjną. Ten mechanizm terminacji zaobserwować można, kiedy *plateau* stałej szybkości terminacji jest proporcjonalne do stałej szybkości propagacji przy wyższej konwersji reaktywnych grup funkcyjnych [190,191].

Dla monopodstawionych alkenów, które generują drugorzędowe rodniki, preferowana jest reakcja rekombinacji (>90%). Jednak ze względów sterycznych i dostępności atomów H przy węglu β dla alkenów dwupodstawionych, takich jak MMA lub α -metylostyren, dysproporcjonowanie staje się dominującą ścieżką terminacji. Udział terminacji w wyniku reakcji dysproporcjonowania dla polimeryzacji metakrylanu metylu w temperaturze pokojowej wynosi 67%, natomiast w temperaturze 80 °C wzrasta do ponad 80% [181,183]. Przeniesienie aktywności łańcucha jest reakcją propagującego makrorodnika z obojętną cząsteczką i prowadzi do zakończenia wzrostu łańcucha polimeru oraz wytworzenia nowego rodnika, który może być zdolny do zainicjowania łańcucha polimeru (reinicjowania). Związkiem przenoszącym aktywność łańcucha może być dodatek celowo wprowadzony do układu, jak np. tiol, lub związek obecny w środowisku reakcji, jak inicjator, monomer, polimer, czy rozpuszczalnik, lub przypadkowe zanieczyszczenie. Przeniesienie aktywności łańcucha bez reakcji reinicjowania nazywane jest inhibicją. W wyniku tego procesu powstaje polimer i rodnik, który jest mniej reaktywny niż rodnik propagujący.

Polimeryzacja (met)akrylanów

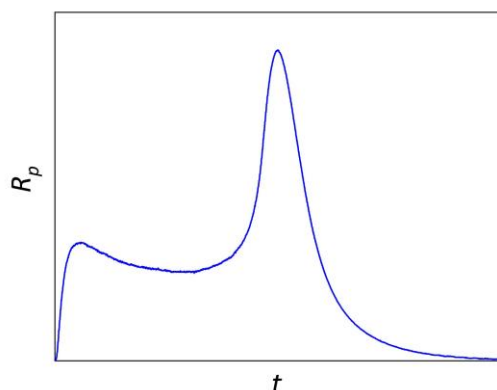
Polimery akrylowe i metakrylowe charakteryzują się obecnością grupy estrowej w cząsteczkach, którą można podstawić różnego typu grupami funkcyjnymi, jak hydroksylowa, glicydydylowa czy aminowa. Dzięki temu istnieje możliwość modyfikacji ich właściwości chemicznych i fizycznych. Przykładowo, poli(met)akrylany z grupą hydroksylową mają charakter hydrofilowy, dzięki czemu są rozpuszczalne w wodzie lub pęcznieją w jej obecności. Natomiast wprowadzenie grup glicydydylowych lub aminowych umożliwia nadanie polimerowi reaktywnej funkcjonalności. Z kolei, włączenie w ich strukturę długich łańcuchów alkilowych nadaje im charakter hydrofobowy [181].

Związki metakrylowe są wysoce reaktywne. Ilość ciepła wydzielanego w trakcie reakcji polimeryzacji wolnorodnikowej MMA, tj. addycji centrum aktywnego do wiązania nienasyconego C=C wynosi 56 kJ/mol [34]. To prowadzi do znacznego wzrostu temperatury polimeryzującego układu. Wzrost ten jest proporcjonalny do liczby moli wiązań podwójnych oraz objętości monomeru w mieszaninie reakcyjnej. Na szybkość reakcji oraz jej przebieg ma wpływ wiele czynników, jak na przykład temperatura otoczenia, stężenie inicjatorów oraz budowa chemiczna monomerów [57].

Podstawniki alkilowe w odpowiednich (met)akrylanach mają tylko niewielki wpływ na kinetykę, ale szybkość reakcji wzrasta wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego grupy estrowej. Dwupodstawione alkeny polimeryzują wolniej niż monopodstawione. Istnieje również ogólna wzajemna korelacja między reaktywnością monomerów i reaktywnością pochodnych rodników. Stałe szybkości propagacji są silniej zależne od struktury rodnika, co oznacza, że monomery o mniejszej reaktywności polimeryzują szybciej, ponieważ generują rodniki o większej reaktywności [181].

Kinetyka reakcji polimeryzacji (zależność szybkości reakcji od czasu jej prowadzenia) metakrylanu benzylu w masie wykazuje kilka charakterystycznych cech (rysunek 1). Początkowo, obserwuje się wzrost szybkości reakcji, ze względu na wytworzenie rodników inicjujących, a następnie plateau lub jej niewielki spadek z powodu zmniejszenia stężenia monomeru w mieszaninie reakcyjnej na skutek przebiegającej reakcji. Następnie, przy pewnym stopniu przereagowania dochodzi do szybkiego wzrostu szybkości reakcji do osiągnięcia wartości maksymalnej. Zachowanie to związane jest z wystąpieniem tzw. efektu żelu (efektu Trommsdorffa), na skutek zahamowania reakcji terminacji z powodu wzrostu lepkości środowiska reakcji w wyniku wzrostu masy cząsteczkowej polimeru i splątania łańcuchów. Czas życia makrorodników rośnie i zwiększa się ich stężenie w mieszaninie reakcyjnej. Jednocześnie dyfuzja cząsteczek monomeru jest niezakłócona i propagacja przebiega z dużą szybkością. Odnosząc się do równania na szybkość propagacji $R_p = k_p[M][M^*]$ widoczna jest zależność wzrostu szybkości procesu ze wzrostem stężenia makrorodników w mieszaninie reakcyjnej. Po osiągnięciu przez szybkość reakcji maksymalnej wartości, szybkość procesu zaczyna spadać z powodu zużycia

monomeru z mieszaniny reakcyjnej i spadku szybkości propagacji, która staje się również ograniczona przez dyfuzję – w tym przypadku monomeru. Ostatni z tych efektów jest określany jako autodeceleracja.



Rys. 1. Krzywa kinetyczna polimeryzacji metakrylanu benzylu w funkcji szybkości polimeryzacji (R_p) od czasu reakcji (t) [badania własne].

Ydens i współpracownicy [192] badali kopolimeryzację MMA z HEMA. Badania zależności konwersji komonomerów od czasu, dla stosunku molowego MMA:HEMA równego 95:5, pokazują, że HEMA jest zużywana szybciej niż MMA, a współczynnik reaktywności MMA określony przez Jaacksa wynosi $r_{MMA} = 0,56 \pm 0,04$. Po 3 godzinach prowadzenia reakcji stopień konwersji HEMA wynosił 72%, podczas gdy, MMA tylko 53,5%.

Oddziaływania między wodorem grupy hydroksylowej a tlenem karbonylowym estru metakrylowego monomeru HEMA zmniejszają gęstość elektronów wiązania podwójnego, zwiększając jego reaktywność, co wykryto prowadząc badania metodą spektroskopii w podczerwieni [193]. Dodatkowo tworzenie wiązań wodorowych między cząsteczkami monomeru HEMA powoduje ich fizyczne sieciowanie, co pozornie zwiększa funkcyjność monomeru. Stąd wartość k_p dla polimeryzacji HEMA w masie jest 2,5- krotnie wyższa niż dla metakrylanu butylu (BMA). Tworzenie wiązań wodorowych wpływa na zależność k_p od stężenia monomeru oraz względnej reaktywności komonomerów, co wykazano dla najbardziej znanych układów zawierających monomer z grupą hydroksylową, tj. akrylan hydroksyetylu (HEA) lub HEMA, i monomer z grupą karboksylową, tj. kwas akrylowy (AA) lub kwas metakrylowy (MAA).

Yang [103] badał wpływ metakrylanu 2-hydroksyetylu na proces polimeryzacji komercyjnego cementu kostnego Simplex P w warunkach izotermicznych. Dodatek HEMA powodował wydłużenie czasu indukcji wraz ze wzrostem zawartości HEMA i gwałtowny wzrost wydzielania ciepła. Ponadto, pomimo wydłużenia czasu polimeryzacji, konwersję monomeru uzyskano na tym samym poziomie (100%).

Borzacchiello i współpracownicy [194] badali kinetykę polimeryzacji cementu kostnego na bazie poli(metakrylanu etylu) z hydroksyapatytem (HA) i metakrylanem n-butylu (nBMA)

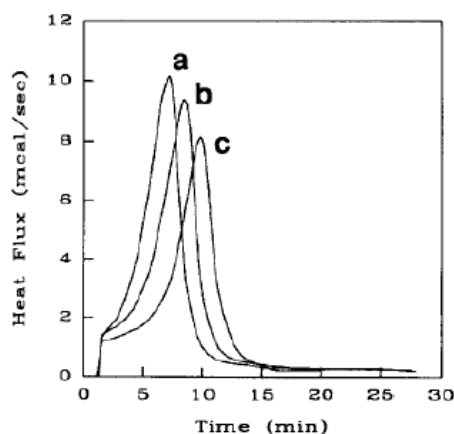
w warunkach izotermicznych w temperaturze 20 °C. Ciepło polimeryzacji nBMA wynosi 418 J/g, co jest niższą wartością, niż dla MMA, które wynosi 576 J/g. Zastosowanie nBMA skutkowało uzyskaniem niższej temperatury polimeryzacji, niż w przypadku polimeryzacji MMA.

Polimeryzacja wielofunkcyjnych monomerów (z dwiema lub więcej grupami metakrylowymi w jednej cząsteczce) zapewnia otrzymanie *in situ* polimerów o usieciowanej strukturze, znajdujących szerokie zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu. Wysoka gęstość usieciowania zwiększa mechaniczną i termiczną stabilność polimeru [190,191]. Zarówno przebieg reakcji homopolimeryzacji dimetakrylanu glikolu etylenowego, jak i struktura otrzymanego polimeru są radykalnie różne od kinetyki polimeryzacji i struktury polimerów liniowych monometakrylanów. W trakcie kopolimeryzacji monometakrylanu glikolu etylenowego z niewielkim dodatkiem sieciującego dimetakrylanu, otrzymuje się jednorodne materiały hydrofilowe, podczas gdy homopolimeryzacja dimetakrylanów prowadzi do uzyskania heterogenicznych, polimerów o wysokiej temperaturze zeszklenia. Ponadto, homopolimeryzacja dimetakrylanów wykazuje maksymalną konwersję wiązań nienasyconych C=C mniejszą niż 100% i charakteryzuje się monotonicznym wzrostem stężenia rodników. Badania eksperymentalne nad wolnorodnikowym sieciowaniem metakrylanów wykazały, że charakterystyka reakcji i struktura sieci zależą od stężenia i budowy monomeru sieciującego [195].

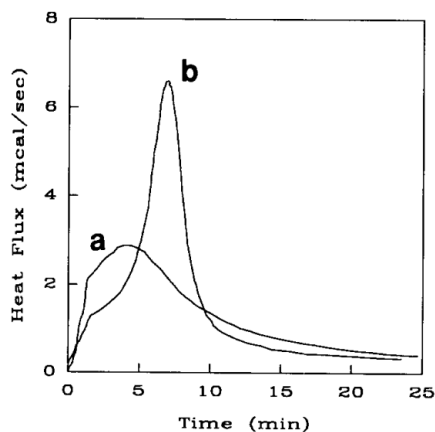
Układy zawierające monomery wielofunkcyjne wykazują złożone cechy, tj. autoakceleracja i autodeceleracja, które ograniczają konwersję wiązań podwójnych. Reakcja terminacji w tych systemach jest kontrolowana przez mechanizm dyfuzji reakcyjnej od początku polimeryzacji. Kinetyka polimeryzacji jest złożona ze względu na zmianę ruchliwości medium w miarę postępu reakcji. Tworzenie się sieci polimerowej powoduje, że segmentowe ruchy rodników stają się ograniczone, a terminacja zaczyna być zdominowana przez mechanizmy dyfuzji reakcyjnej. Zmniejszenie szybkości terminacji skutkuje wzrostem liczby aktywnych rodników (makrorodników), co prowadzi do zwiększenia szybkości propagacji. Zjawisko to, znane jako autoakceleracja, często występuje podczas polimeryzacji dimetakrylanów. W miarę postępu reakcji, wzrost lepkości i gęstości tworzącej się sieci polimerowej dodatkowo ogranicza ruchliwość cząsteczek, co powoduje, że reakcja propagacji również staje się zależna od dyfuzji. Ostatecznie prowadzi to do znacznego spadku szybkości polimeryzacji, gdy zarówno propagacja, jak i terminacja są kontrolowane przez ograniczenia dyfuzyjne. Zjawisko to określa się mianem autodeceleracji. Kiedy kinetyka polimeryzacji jest zdominowana przez dyfuzję, całkowita konwersja monomeru rzadko osiąga wartość 100%, co jest szczególnie widoczne podczas polimeryzacji układów o wysokich temperaturach zeszklenia, co dodatkowo ogranicza ruchliwość układu [57,190,191,196,197].

Scranton i współpracownicy [195] badali kinetykę wolnorodnikowej polimeryzacji metakrylanów i dimetakrylanów glikolu etylenowego metodą różnicowej kalymetrii skaningowej. Wykazali, że nawet niewielki dodatek dimetakrylanu glikolu etylenowego (EGDM)

wpływa na profil szybkości reakcji polimeryzacji (rysunek 2). Homopolimeryzacja EGDM wykazuje natychmiastowe przyspieszenie reakcji od początku jej trwania, a pik egzotermiczny charakteryzujący autoakcelerację jest szeroki. Jest to spowodowane dużą gęstością sieciowania, która wpływa na ruchliwość i dostępność reaktywnych rodników. W przypadku kopolimeryzacji monometakrylanu HEMA z dimetakrylanem EGDM obserwuje się stałą szybkość reakcji od jej początku, charakterystyczną dla homopolimeryzacji monometakrylanów (stan stacjonarny), po której następuje szybki wzrost szybkości reakcji do osiągnięcia maksimum. Czas osiągnięcia maksimum szybkości reakcji polimeryzacji R_p^{max} jest tym krótszy, im większy jest udział EGDM w składzie kompozycji, co oznacza, że stan stacjonarny ulega skróceniu i dla 2 %mas. dodatku EGDM prawie ulega zanikowi.



Rys. 2. Przepływ ciepła w czasie dla reakcji polimeryzacji HEMA z dodatkiem dimetakrylanu: a) 2 %mol EGDM; b) 1 %mol EGDM; c) 0 %mol EGDM. Inicjator: 0,5 %mas. AIBN [195].



Rys. 3. Przepływ ciepła w czasie dla reakcji dimetakrylanów ilustrujący wpływ długości mostka glikolu etylenowego. Profile uzyskane dla reakcji masowych z 0,5 %mas. AIBN: (a) EGDM; (b) TEGDM [195].

Nawet niewielki dodatek dimetakrylanu do monometakrylanu powoduje przyspieszenie wystąpienia efektu autoakceleracji, co wynika z ograniczonej ruchliwości makrorodników włączonych w strukturę sieci polimerowej. Rośnie również nieznacznie maksymalna szybkość polimeryzacji.

Dimetakrylan glikolu trietylenowego (TEGDM) wykazuje dwukrotnie większą maksymalną szybkość reakcji niż EGDM, mimo że TEGDM zawiera dłuższy łańcuch glikolu etylenowego (cztery powtarzające się jednostki w porównaniu do jednej) (rysunek 3). Ten trend można wyjaśnić drastycznie zmniejszoną ruchliwością sieci polimerowej, co prowadzi do braku dostępności wiązań podwójnych EGDM podczas reakcji. Ponadto, aktywne rodniki mogą być niedostępne dla nieprzereagowanego monomeru, tym samym obniżając wydajność inicjatora [195]. Czynniki te prowadzą do znacznego zmniejszenia stężenia rodników zdolnych do efektywnych zderzeń. Ponadto, ze względu na dużą gęstość sieciowania, propagacja staje się kontrolowana przez dyfuzję przy mniejszych stopniach konwersji dla EGDM niż TEGDM. Zwiększenie długości łańcucha glikolu etylenowego z jednej do trzech powtarzających się jednostek $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ zapewnia wiązaniu podwójnemu większą ruchliwość, ograniczając tym samym omówione efekty.

Okay i inni [198] badali wpływ reakcji cyklizacji na terminację kontrolowaną dyfuzją w kopolimeryzacji MMA z EGDM. Cyklizacja makrorodników może następować według dwóch mechanizmów: pierwotnego, gdy makrorodnik reaguje z wiązaniem podwójnym wiszącym występującym w tym samym łańcuchu oraz wtórnego, w którym makrorodnik atakuje wiązanie podwójne w łańcuchu bocznym wbudowanym w sieć polimerową. Wykazano, że cyklizacja wpływa na szybkość reakcji terminacji w układzie zawierającym do 4 %mol. EGDM. Zwiększenie wartości współczynnika terminacji wynika ze zmniejszenia rozmiarów makrorodników, jednakże wiązania wytworzone wewnątrz cyklicznych makrorodników powodują zmniejszenie ruchliwości segmentów i zmniejszenie współczynnika terminacji. Wyższe stężenie EGDM (do 75 %mol.), prowadzi do wzrostu cyklizacji, której rezultatem jest powstanie zwartych cząstek mikrożeli. Ograniczają one dostęp do centrów rodnikowych i wiszących grup winylowych na innych cząsteczkach polimeru. W rezultacie kontrolowana dyfuzją szybkość terminacji maleje wraz ze wzrostem stężenia monomeru sieciującego.

Zastosowanie monomeru sieciującego w polimeryzacji cementów kostnych prowadzi do uzyskania wielofazowej struktury polimerowej, która składa się z fazy usieciowanej, częściowo usieciowanej i liniowej [199]. Taka struktura nazywana jest półprzenikającą siecią polimerową (*ang. semi-interpenetrating polymer network* – semi-IPN). Struktury te są dwoma niezależnymi systemami polimerowymi, usieciowanym i liniowym, które nie są połączone wiązaniami chemicznymi [200]. Sieci semi-IPN można odróżnić od mieszanin polimerowych, kopolimerów blokowych i kopolimerów szczepionych. Najważniejszą cechą semi-IPN jest separacja faz, która prowadzi do powstania heterogenicznej sieci. Wynika to głównie z chemicznie różnej struktury składników tworzących układ IPN. Jednak proces separacji przebiega bardzo wolno ze względu na wysoką lepkość układu i splątania między łańcuchami [201]. Systemy semi-IPN generalnie wykazują wyższe przesunięcie temperatury zeszklenia w porównaniu z systemami IPN, z powodu silniejszej separacji faz w semi-IPN w porównaniu z IPN [202].

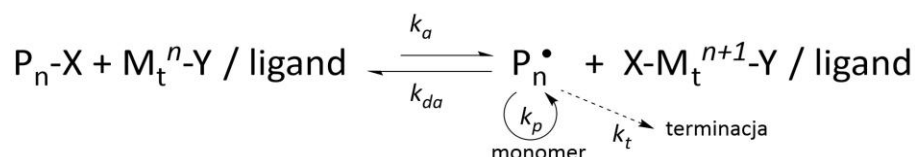
Pomimo separacji faz, semi-IPN wykazują kilka zalet. Obejmują one lepsze właściwości mechaniczne w porównaniu z właściwościami mechanicznymi pojedynczych polimerów tworzących sieć semi-IPN. W strukturach tych obserwuje się efekt synergistyczny wszystkich składników sieci. Na tej podstawie, poprzez odpowiedni dobór wyjściowych materiałów, możliwe jest uzyskanie sieci o pożądanych właściwościach mechanicznych. Stabilność termiczna i odporność chemiczna to kolejne korzystne właściwości prezentowane przez systemy semi-IPN. Ponadto, w porównaniu z innymi rodzajami mieszanin polimerowych, semi-IPN pęcznieją bez rozpuszczania w rozpuszczalnikach i mogą tłumić pękanie i płygnięcie [203,204].

Układy semi-IPNs mają wiele zastosowań, a ich sukces wynika głównie z usieciowanej struktury, która zapewnia lepszą od liniowych polimerów stabilność termiczną, właściwości mechaniczne i odporność chemiczną. Są tradycyjnie stosowane jako materiały tłumiące, materiały odporne na uderzenia i materiały adhezyjne. Aktualnie znajdują one zastosowanie nie tylko w technologiach inżynierskich, lecz także w obszarze biomedycznym i farmaceutycznym, jako responsywne hydrożele, implanty medyczne, porowate rusztowania oraz mikro- lub nanonośniki do dostarczania leków [199].

4.2. Polimeryzacja rodnikowa z przeniesieniem atomu

Polimeryzacja rodnikowa z przeniesieniem atomu (ang. *atom transfer radical polymerization*, ATRP) jest szczególnym rodzajem kontrolowanej żyjącej polimeryzacji (ang. *controlled radical polymerization*, CRP) [205]. Reakcja kontrolowana jest etapem przeniesienia atomu, podczas którego ustalana jest dynamiczna równowaga aktywacji-dezaktywacji między rodnikami i uśpionymi halogenkami alkilowymi, co pozwala na równomierny wzrost łańcuchów polimerowych [206,207].

Mechanizm polimeryzacji ATRP (rysunek 4) opiera się na reakcji redoks między jonem metalu przejściowego a halogenkiem alkilu. Rodniki wytwarzane są w reakcji metalu przejściowego (M_t^n -Y/ligand, gdzie Y jest ligandem lub przeciwjonem), który ulega utlenianiu poprzez przeniesienie jednego elektronu z metalu znajdującego się na niższym stopniu utlenienia, czemu towarzyszy jednocześnie oderwanie halogenowego atomu, X, z uśpionego rodnika, P_n -X (rysunek 4) [205,206].



Rys. 4. Schemat ATRP katalizowanej metalem przejściowym.

Rodniki reagują odwracalnie z utlenionymi kompleksami metali ($X-M_t^{n+1}$ /ligand, dezaktywator), aby odtworzyć uśpiony halogenek i aktywator [206]. Kompleksy stosowane

w metodzie ATRP opierają się na metalach, które nie tworzą innych związków metaloorganicznych, m.in. Cu(I), Ni(II), Fe(II) [208]. Ligandami są związki organiczne na bazie 2,2'-bipirydyny, np. *N,N,N',N'',N'''*-pentametylodietylenotriamina (PMDETA) czy 1,1,4,7,10,10-heksametylotrietylenotetramina (HMTETA) [205]. Ich dobór jest niezwykle ważny ze względu na wpływ na reaktywność kompleksu katalizatora, poprzez zmianę jego właściwości elektrochemicznych oraz sterycznych, jak i jego rozpuszczalność w środowisku reakcji [209,210]. W reakcji polimeryzacji ATRP kluczowe znaczenie mają takie czynniki jak rozpuszczalnik, temperatura, stężenie i rozpuszczalność wszystkich składników. W niektórych przypadkach również kolejność ich dodawania musi być wzięta pod uwagę [206].

Wzrost łańcucha następuje w wyniku nieprzerwanego, stopniowego dołączania monomeru. Początkowo formą uśpioną jest inicjator, który zakończony jest halogenkiem. Generuje on równowagę między formą uśpioną i aktywną i zapoczątkowuje wzrost łańcucha [211]. Zazwyczaj, po przyłączeniu jednego lub kilku monomerów, rodnik jest dezaktywowany i powraca do uśpionej formy. Szybka i efektywna dezaktywacja jest kluczowa dla syntezy polimerów o określonej masie cząsteczkowej (M_w) i wąskim rozkładzie mas cząsteczkowych (PDI, M_w/M_n) [207].

Terminacja w procesie ATRP jest mocno ograniczona ze względu na znacznie niższe stężenie rodników obecnych w medium reakcyjnym [207], jednakże wciąż występuje. Głównymi reakcjami odpowiedzialnymi za terminację są sprzęganie rodników lub dysproporcjonowanie, natomiast w dobrze kontrolowanej reakcji nie więcej niż kilka procent łańcuchów ulega terminacji [206].

Jak w typowej polimeryzacji żyjącej, średnia masa cząsteczkowa może być z góry określona przez stosunek zużytego monomeru i inicjatora ($DP_n = \Delta[M]/[I]_0$, DP – stopień polimeryzacji) przy zachowaniu stosunkowo wąskiego rozkładu mas cząsteczkowych ($1 < MWD < 1,5$), a w dobrze kontrolowanej polimeryzacji uzyskuje się $MWD < 1,1$ [206].

Ponadto precyzyjna kontrola nad chemią i strukturą inicjatora oraz aktywnej grupy końcowej pozwala na syntezę funkcjonalizowanych polimerów i kopolimerów blokowych. Dzięki temu pomyślnie zsyntezowano dobrze zdefiniowane polimery o masach cząsteczkowych w zakresie od 1000 do 100000, a w niektórych szczególnych przypadkach nawet przekraczającej kilka milionów. Jednakże, w procesie ATRP zachodzą również inne reakcje uboczne, które zyskują na znaczeniu podczas syntezy polimerów o wyższej masie cząsteczkowej [206].

ATRP jest procesem polimeryzacji rodnikowej, co sprawia, że wykazuje stosunkowo wysoką tolerancję na obecność wielu zanieczyszczeń oraz grup funkcyjnych. Niemniej jednak reakcje uboczne mogą utrudniać otrzymanie polimerów o zakładanej masie cząsteczkowej. Jednym z najczęściej obserwowanych zjawisk niepożądanych jest utlenianie jonów Cu(I) przez tlen, prowadzące do powstania nieaktywnej formy Cu(II). W przypadku metakrylanów, Nanda i inni

[212] stwierdzili, że wytworzony utleniony Cu(II)X(L)OO może reagować z monomerem dając birodnik $\cdot\text{CH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)\text{-(COOR)-OO}\cdot$, który może inicjować polimeryzację. Ten indukowany powietrzem birodnik został wykorzystany jako źródło rodników do odwrotnej polimeryzacji ATRP metakrylanów, gdzie w procesie inicjowania stosuje się konwencjonalny inicjator rodnikowy, taki jak AIBN [212–214]. Inną specyficzną reakcją uboczną w ATRP, którą odnotowano, jest eliminacja HBr z bromku alkilu [215,216]. Eliminacja zachodzi w obecności CuBr_2 , który reaguje zarówno z bromkiem alkilu, jak i rodnikiem alkilowym (propagującym) tworząc HBr i nienasycone formy polimeru [215].

Polimeryzacja ATRP dzięki swoim zaletom i kontrolowanemu przebiegowi pozwala na uzyskanie wielu rodzajów polimerów, kopolimerów, polimerów blokowych, polimerów gwiaździstych czy szczotek polimerowych. Polimery o zdefiniowanych kształtach i ściśle określonej masie cząsteczkowej i niskiej dyspersyjności mają niewątpliwą przewagę nad ich liniowymi odpowiednikami i mogą być stosowane w wielu gałęziach przemysłu, m.in. farmaceutycznym i (bio)medycznym.

4.3. Polimery gwiaździste

Polimery gwiaździste to złożone, trójwymiarowe struktury zbudowane z co najmniej trzech wielkocząsteczkowych łańcuchów (ramion) wychodzących z centralnie umieszczonego rdzenia, którym może być atom, mała molekula, rozgałęziona makrocząsteczka, nanożel, nanocząsteczka, itp. [217–220]. Charakteryzują się unikalną strukturą topologiczną i atrakcyjnymi właściwościami fizyko-chemicznymi. Ze względu na ich trójwymiarową strukturę kulistą wykazują one również wyjątkowe właściwości hydrodynamiczne i zdolność do enkapsulacji innych substancji. W porównaniu z liniowymi analogami o tej samej masie cząsteczkowej (M_w), polimery gwiaździste wykazują niższą lepkość roztworu w roztworach rozcieńczonych z powodu mniejszej liczby splątania ramion [221,222]. Ponadto, ich wewnętrzne i zewnętrzne grupy aktywne pozwalają na wprowadzanie różnych cennych grup funkcyjnych. Co więcej, polimery o architekturze gwiaździstej charakteryzują się zwiększoną wrażliwością na bodźce zewnętrzne, co wynika z wysokiej gęstości grup funkcyjnych. Pomimo kulistej struktury przypominającej polimery dendrytyczne, polimery gwiaździste różnią się od nich budową – posiadają liniowe ramiona zamiast silnie rozgałęzionych, co skutkuje mniejszą gęstością powłoki [221,223], która zmniejsza się wraz ze wzrostem długości ramion, powodując różnice we właściwościach, takich jak lepkość i elastyczność [224,225]. Dlatego też, ze względu na te doskonałe właściwości fizyczne i chemiczne, wielu badaczy skupiło się na polimerach gwiaździstych w celu zaprojektowania różnych zaawansowanych materiałów do zastosowań biomedycznych, w tym dostarczania leków lub genów, diagnostyki, powłok przeciwbakteryjnych i przeciwpowrostowych i wszczepialnych urządzeń medycznych [218,219,226,227].

Polimery gwiazdziste można podzielić na dwa typy: regularne (tzw. homoarm), o jednakowych ramionach i nieregularne (tzw. miktoarm) o asymetrycznej architekturze [227,228]. Synteza polimerów gwiazdzistych odbywa się przy użyciu jednej z trzech następujących strategii: *core-first*, *coupling-onto* i *arm-first* [229–232]. W strategii typu *core-first* synteza ramion polimerowych jest inicjowana bezpośrednio z wielofunkcyjnego rdzenia, który pełni rolę centrum inicjującego. Co istotne, aktywne centra inicjowania obecne w uprzednio otrzymanych strukturach gwiazdzistych mogą być ponownie wykorzystane do dalszej syntezy, umożliwiając wytworzenie np. blokowych kopolimerów gwiazdzistych. Strategia ta pozwala na syntezę polimerów gwiazdzistych z precyzyjną liczbą ramion poprzez dostosowanie funkcyjności rdzenia inicjującego. Metoda *coupling-onto* obejmuje wstępnie uformowane ramiona (liniowe polimery, oligomery) z końcowymi grupami funkcyjnymi sprzężonymi z wielofunkcyjnym rdzeniem poprzez wydajne reakcje sprzęgania. Na przykład jednymi z reprezentatywnych reakcji stosowanych w strategii *coupling-onto*, są reakcje "click" stosowane w syntezie polimerów gwiazdzistych o dobrze zdefiniowanej strukturze i wysokiej wydajności ze względu na wysoką wydajność sprzęgania. Przykładem najbardziej znanej reakcji „click”, która jest często stosowana w syntezie polimerów gwiazdzistych, jest reakcja Huisgena: cykloadycja 1,3-dipolowa azydki i alkinu (tzw. CuAAC – *copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*). W strategii *arm-first* dobrze zdefiniowane ramie polimeru gwiazdzistego (liniowy polimer) jest łączone wiązaniem kowalencyjnym z pewną ilością środka sieciującego w celu utworzenia rdzenia. Strategia ta pozwala na precyzyjną kontrolę długości ramion w syntezie polimerów gwiazdzistych typu miktoarm.

Polimery gwiazdziste do zastosowań biomedycznych powinny charakteryzować się dobrze zdefiniowaną architekturą, funkcjonalnością, dobrą odpowiedzią na bodźce, biokompatybilnością, biostabilnością czy biodegradowalnością. Dobrze zdefiniowaną strukturę polimerów gwiazdzistych określa się w odniesieniu do kompozycji oraz architektury molekularnej szczególnie z uwzględnieniem M_w , PDI i liczby ramion [227,232]. Unikalna budowa polimerów gwiazdzistych i duża liczba grup aktywnych oraz ich wysoka gęstość pozwalają na łatwą modyfikację w celu nadania pożądanych właściwości [233–235], jak adhezja do komórek [236–238] czy aktywność antybakteryjna [239–241]. Polimery gwiazdziste zdolne do reagowania na bodźce zewnętrzne są szeroko stosowane w dostarczaniu leków lub genów, a także biomateriałach z pamięcią kształtu. Biokompatybilność jest najważniejszym wymaganiem stawianym biomateriałom. Jej brak zwykle powoduje wiele niepożądanych reakcji, które w rezultacie mogą prowadzić do poważnych powikłań, jak cytotoksyczność, stany zapalne, karcynogeneza czy reakcja immunologiczna. Natomiast wymagania dotyczące biostabilności i biodegradacji są ściśle związane z końcowym zastosowaniem polimerów gwiazdzistych. Najbardziej pożądane jest, aby polimer gwiazdzisty był stabilny podczas implementacji i spełniania swojego zadania, po czym uległ szybko biodegradacji do niskocząsteczkowych, nietoksycznych związków, które następnie zostaną wydalone z organizmu.

Dzięki ich unikatowym właściwościom, takim jak niska lepkość w roztworach, mała struktura hydrodynamiczna i obecność dużej liczby grup funkcyjnych, polimery gwiazdzone są szeroko stosowane jako systemy dostarczania leków [226,242,243]. Ponadto ich architektura i M_w umożliwiają tworzenie rezerwuarów dla leków a następnie ich uwalnianie w miejscu przeznaczenia [244,245]. Wielu badaczy stosowało polimery gwiazdzone jako systemy dostarczania leków *in vivo*. Ze względu na możliwość stosowania dużych stężeń leków oraz ze względu na możliwość projektowania właściwości polimerów gwiazdzystych można je stosować w kontrolowanym uwalnianiu leku [246,247]. Miller i inni uzyskali nanozele gwiazdzone zdolne do kompleksowania różnego rodzaju substancji, jak hydrofobowe fluorofory czy terapeutyczne siRNA [247]. Możliwość projektowania struktury polimeru doprowadziła Zhanga i współpracowników [248,249] do otrzymania serii polimerów gwiazdzystych typu miktoarm na bazie termoresponsywnego poli(*N*-izopropylakrylamidu) (PNIPAAm) i innych hydrofobowych polimerów. Uzyskane micelle obciążone lekami antynowotworowymi wykazały znaczne uwalnianie leku zależne od temperatury, związane ze zmianami powłoki micelarnej. Zhu i inni [233] wytworzyli polimery gwiazdzone z hydrofobowym rdzeniem i wieloma hydrofilowymi ramionami na bazie PEG do dostarczania leków do kości. Efektywnie enkapsulowano dokсорubicynę (ang. *doxorubicin* - lek antynowotworowy, DOX), którą z powodzeniem dostarczono do kości [250].

Leki związane fizycznie z nośnikiem tracone są łatwo w procesie dostarczania. Powoduje to nie tylko obniżenie efektywności terapeutycznej, ale również wiąże się ze wzrostem ogólnej toksyczności ogólnoustrojowej. Rozwiązaniem tego problemu jest kowalencyjne związanie leku z nośnikiem, co może znacząco obniżyć utratę leku, a także pozwolić na kontrolowane uwalnianie poprzez degradację wiązania. Co więcej, to rozwiązanie pozwala na zwiększenie ilości leku w nośniku oraz poprawienie jego rozpuszczalności w wodzie. Między innymi Etrych i współpracownicy [251–253] otrzymali biodegradowalne polimery gwiazdzone z DOX, co pozwoliło na uzyskanie ich przedłużonej cyrkulacji we krwi oraz wysokiej efektywności antynowotworowej *in vivo*. Yang i inni [254] z kolei podłączyli penicylinę V do polimeru gwiazdzonego na bazie poli(glikolu etylenowego) i poliamidoaminy (PEG-PAMAM). Wyniki potwierdziły biodostępność zmodyfikowanej penicyliny po rozszczepieniu wiązania estrowego.

Polimery gwiazdzone wykazują również znaczący potencjał zastosowania w inżynierii tkankowej, szczególnie inżynierii tkanki kostnej lub chrzęstnej [255–257]. Adhikari i inni przygotowali biodegradowalne, wstrzykiwalne rusztowanie poliuretanowe na bazie gwiazdzystych polioli, co pozwoliło na wzrost kości i stopniową degradację rusztowania przez 6 miesięcy [255]. Wu i współpracownicy [258] otrzymali hydrożel na bazie czteroramiennego kopolimeru w kształcie gwiazdy (star-PAA(PEA)-PNIPAM), gdzie blok z poli(*N*-izopropylakrylamidu) i fosforylowany blok funkcyjny O-fosfoetanolaminy (PEA) były szczepione poli(kwasem akrylowym) (PAA(PEA))

do regeneracji kości *in situ*. Może on naśladować kwaśne białko macierzy zewnątrzkomórkowej, co wspiera adsorpcję jonów wapnia i mineralizację *in situ*, zarówno w eksperymentach *in vitro* oraz *in vivo*, co jest korzystne dla adhezji i proliferacji komórek. Schamel i inni [11] przygotowali wysoko zmineralizowane hydrożele na bazie sześcioramiennego polimeru gwiaździstego funkcjonalizowanego grupami izocyjanianowymi jako reaktywnymi końcami (NCO-sP(EO-stat-PO)), aby naśladować właściwości kości gąbczastej. Wyniki właściwości mechanicznych, tj. elastyczności, wytrzymałości na ściskanie i moduł Young'a potwierdziły poprawę wytrzymałości dla tak otrzymanego materiału. Po 1 – 28 dniach wiązania, właściwości mechaniczne, takie jak elastyczność (5,3-1,4%), wytrzymałość na ściskanie (11 – 23 MPa) i moduł E (211 – 811 MPa) otrzymane dla kompozytu z 30 %mas. NCO-sP(EO-stat-PO), były podobne do właściwości kości gąbczastej. Bennett i inni [259] natomiast opracowali polimerowy substytut kości, który składał się z czteroramiennego polimeru gwiaździstego poli(dioksanon-co-glikolid) zakończonego na każdym końcu biokompatybilnym sieciującym diizocyjanianem na bazie lizyny diizocyjanianu.

Timashev i inni [260] uzyskali biodegradowalne rusztowania 3D wykonane z polimerów gwiaździstych poli(D,L-laktydowych) (SSL) do regeneracji tkanki kostnej, które wspierały różnicowanie ludzkich komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej w kierunku linii osteogennej *in vitro*, a także rusztowania SSL zwiększały tworzenie zmineralizowanej tkanki z mysimi mezenchymalnymi komórkami zrębowymi (MSC). W badaniach Chung i inni [261] zsyntetyzowali kopolimer rozgałęziony i polimer gwiaździsty poli(metakrylan metylu-co-3-(trimetoksylilo)metakrylan propylu) (poli(MMA-co-TMSPMA)) z disiarczkiem bis(2-metakryloilo)oksyetylu (DSDMA) jako biodegradowalnym środkiem rozgałęziającym do regeneracji tkanki kostnej, co stwarza więcej możliwości do projektowania biodegradowalnych hybryd na bazie polimerów metakrylanowych dla medycyny regeneracyjnej.

Polimery gwiaździste stosowane są również do wytwarzania antybakteryjnych biomateriałów. Vigliotta i inni [262] zsyntezowali heteroramienne polimery gwiaździste z DMAEMA jako antybakteryjne jednostki funkcjonalne. Umożliwiło to otrzymanie materiałów o trwałych właściwościach antybakteryjnych, niewymagających dyfuzji środka czynnego z polimeru gwiaździstego do środowiska zewnętrznego, przy czym skuteczność ich działania utrzymywała się nawet po 20 cyklach użytkowania. Siedenbiedel i inni [263] opracowali antybakteryjne powłoki, nakładane z roztworu wodnego i odporne na krótkie cykle mycia, na bazie ampifilowych kopolimerów blokowych o strukturze gwiaździstej. Powłoki te wykazywały aktywność antybakteryjną po dziesiątkach cykli mycia.

Weng i współpracownicy [241] poprawili właściwości antybakteryjne cementów szkło-jonomerowych (GIC, glosjonomerowym) poprzez włączenie polimerów gwiaździstych zawierających poli(czwartorzędowe sole amoniowe) lub modyfikowanych furanonem. GIC wykazały wysoką wytrzymałość mechaniczną i doskonałe właściwości antybakteryjne.

Polimery gwiazdziste są stosowane również w cementach kostnych jako faza proszkowa lub czynnik sieciujący. Huynh i współpracownicy [264] zsyntezowali 4-ramienny polimer gwiazdzisty PMMA (4sPMMA) metodą ARGET ATRP (ATRP z aktywatorami regenerowanymi przez transfer elektronów), który użyto jako fazy proszkowej cementu kostnego. Otrzymali oni wysoko porowate, drobnocząstkowe sfery o średnicach w zakresie 1 – 30 μm , zbudowane z pierwotnych cząstek o rozmiarach submikronowych, natomiast proszek 4sPMMA, przeznaczony docelowo do zastosowania w cementach kostnych, charakteryzował się wielkością cząstek w przedziale 5 – 110 μm . W innych badaniach Tham i inni [30] uzyskali 4sPMMA o średniej masie cząsteczkowej około 45 000 g/mol. Cementy kostne na ich bazie wykazywały niższą T_{max} (63,9 °C) i niższą T_{set} (45,6 °C) niż maksymalne wartości podane w normie. Inne właściwości cementu kostnego 4sPMMA, takie jak wytrzymałość na zginanie (60,7 MPa), moduł zginania (3,31 GPa) i czas wiązania (7,84 min) również spełniały wymagania normy ISO 5833. W badaniach Szanka i innych [265] wielofunkcyjne makromonomery poli(metakrylan metylu-co-2-metakryloetylometakrylan), P(MMA-co-MEMA), wykorzystano jako środki sieciujące w fotoutwardzaniu MMA. Badacze postulują, że materiały te są potencjalnymi środkami sieciującymi w różnych zastosowaniach bezrozpuszczalnikowych, w których niski skurcz polimeryzacyjny i wysoka konwersja są krytycznymi wymaganiami, jak na przykład w cementach kostnych.

Polimery gwiazdziste wykazują szereg zalet. Ich unikatowe właściwości pozwalają na zastosowanie ich jako nośniki leków, genów, w inżynierii tkankowej, diagnostyce, wytwarzaniu antybakteryjnych biomateriałów czy implantów. Mimo szerokiego wachlarza leków dostarczanych przez polimery gwiazdziste, w tym również antybiotyków, nie są one stosowane jako systemy dostarczania leków w cementach kostnych. Niemniej jednak, polimery gwiazdziste stosuje się jako fazę proszkową cementów kostnych, przy czym nie wykazują właściwości antybakteryjnych, a w literaturze brak jest doniesień o zastosowaniu polimerów gwiazdzistych posiadających grupy funkcyjne nadające im specyficzne właściwości.

II. Cel pracy

Celem pracy było zaprojektowanie i opracowanie innowacyjnych środków antybakteryjnych i kontrastujących na bazie polimerów gwiazdzistych do zastosowań w metakrylowych cementach kostnych. Główną część pracy poświęcono syntezie polimerów gwiazdzistych modyfikowanych związkami o działaniu antybakteryjnym i czynnikiem kontrastującym metodą kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej ATRP. Szczególną uwagę poświęcono zastosowaniu naturalnego związku fenolowego obecnego m.in. w oleju goździkowym – eugenolu, antybiotyków (ampicyliny i ryfampicyny) oraz nanocząstek srebra oraz gadolinu. Dodatkowym celem było określenie możliwości wprowadzenia polidopaminy jako bioaktywnego napełniacza do metakrylowego cementu kostnego. Istotną część badań stanowiła ocena wpływu syntezowanych modyfikatorów na właściwości metakrylowych cementów kostnych, tj. właściwości mechaniczne, kinetykę procesu utwardzania, bioaktywność oraz profil uwalniania substancji czynnych. Wszystkie prowadzone modyfikacje cementów kostnych oceniano w aspekcie zgodności z wymaganiami normy ISO 5833:2002. Podstawę niniejszej pracy stanowią hipotezy badawcze sformułowane poniżej.

Pierwsza z nich zakłada, że zastosowanie polimerów i monomerów o odpowiedniej budowie i stężeniu, w tym stężenie składników systemu inicjującego redoks, pozwoli otrzymać cement kostny o odpowiednich właściwościach.

Następna hipoteza opiera się na założeniu, że modyfikacja cementu kostnego polimerami gwiazdzistymi o odpowiednio zaprojektowanej strukturze, zawierających kowalencyjnie wbudowane modyfikowane czynniki antybakteryjne o specjalnie przygotowanej budowie (antybiotyki, eugenol), jak i kompleksami polimerów gwiazdzistych z czynnikami antybakteryjnymi (antybiotyki, eugenol, nanocząstki srebra) pozwoli na otrzymanie materiałów o silniejszym, przedłużonym i bardziej efektywnym działaniu antybakteryjnym w porównaniu z konwencjonalnymi cementami z dodatkiem antybiotyków.

Ponadto wprowadzenie do cementu kostnego funkcjonalnych polimerów gwiazdzistych zawierających gadolin modyfikowany grupami metakrylowymi pozwoli uzyskać materiał o właściwościach kontrastujących, jak również dodatek polidopaminy do cementu kostnego poprawi jego bioaktywność oraz zwiększy efektywność uwalniania substancji czynnej (np. gentamycyny).

Sformułowano również hipotezę, zgodnie z którą synteza pochodnych eugenolu, jak i jego kompleksów, ograniczy negatywny wpływ tego oleju eterycznego na proces utwardzania cementów kostnych, jednocześnie poprawiając ich stabilność i biodostępność.

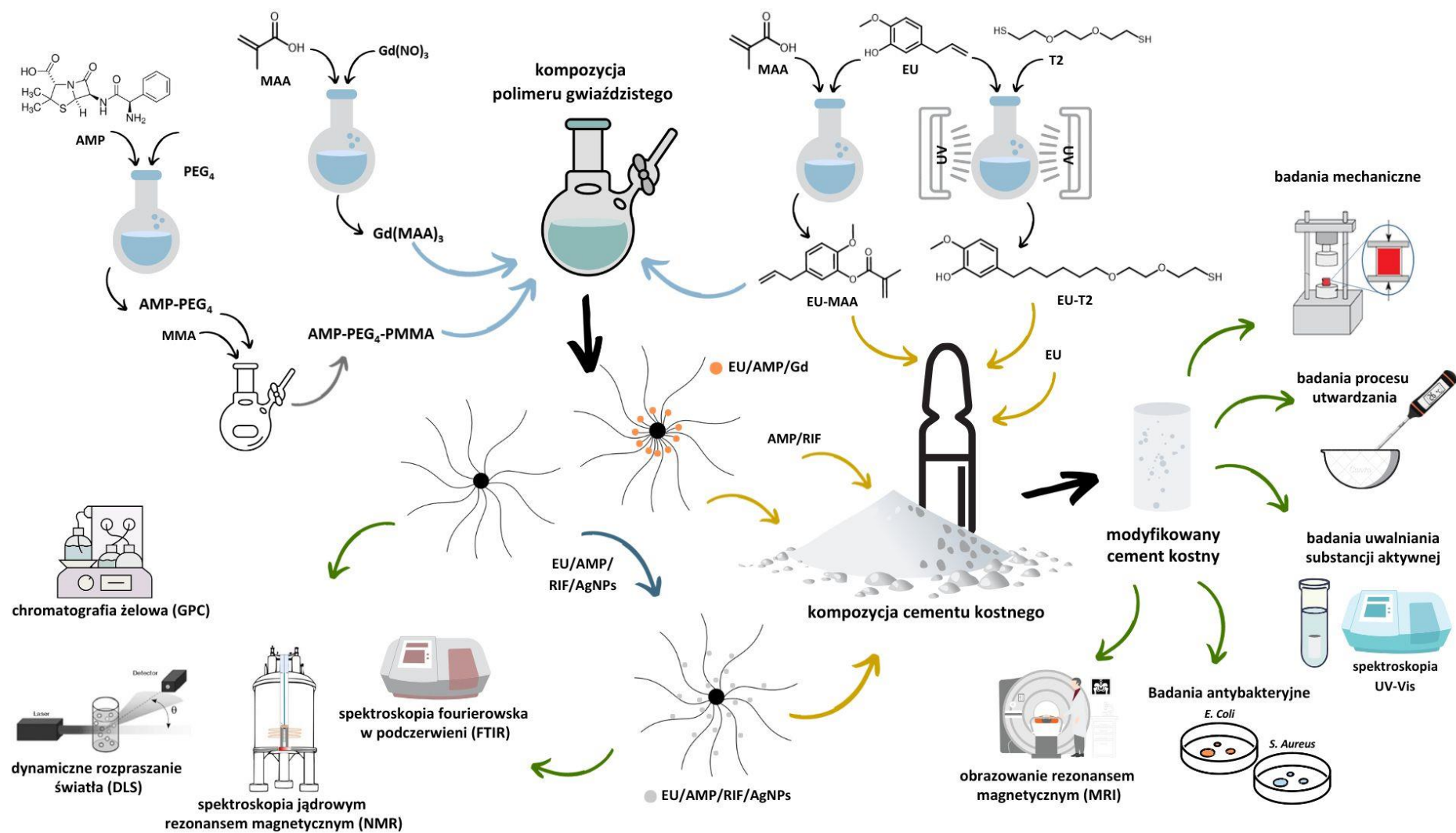
Zakłada się również, że przeprowadzone modyfikacje cementu kostnego pozwolą otrzymać materiały spełniające wymagania normy ISO 5833:2002, a ich właściwości (m.in. wytrzymałość na ścislenie, czas wiązania, temperatura utwardzania, aktywność antybakteryjna, właściwości

kontrastujące) będą je predysponować do zastosowania w chirurgii ortopedycznej jako cementy kostne nowej generacji o działaniu terapeutycznym i diagnostycznym.

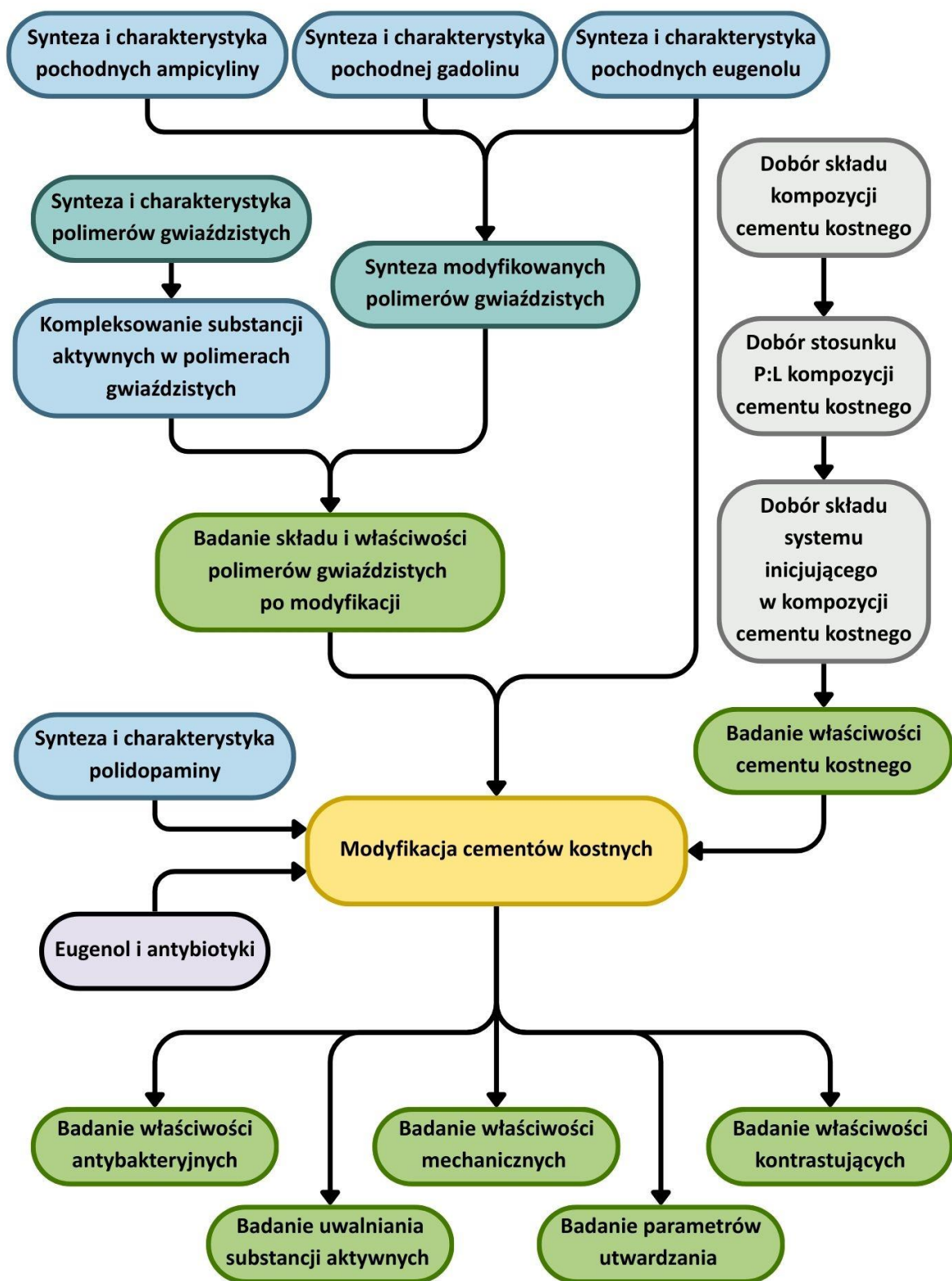
W ramach niniejszej pracy skupiono się na syntezie związków o właściwościach antybakteryjnych i kontrastujących oraz ich wpływie na właściwości fizykochemiczne i mechaniczne cementów kostnych. Dobór materiałów do badań (jak polimery gwiaździste, antybiotyki, eugenol, nonocząstki srebra), oparto na doniesieniach literaturowych jednoznacznie potwierdzających ich biogodność [220,266]. Dzięki temu możliwe było zawężenie zakresu badań do aspektów kluczowych dla realizacji założeń pracy. Na podstawie przyjętych hipotez badawczych opracowano plan badań, obejmujący następujące etapy:

- Dobór składników fazy proszkowej (polimerów) i fazy ciekłej (monomerów) cementu kostnego wraz z systemem inicjującym, jak i określenie stosunku masowego fazy proszkowej do fazy ciekłej.
- Modyfikację eugenolu, ampicyliny, gadolinu grupami funkcyjnymi reaktywnymi w procesie polimeryzacji.
- Syntezę polimerów gwiaździstych metodą ATRP w strategii *arm-first* w obecności monomerów funkcyjnych, takich jak metakrylan z grupą aminową DMAEMA, pochodne eugenolu, pochodne gadolinu, oraz pochodne ampicyliny.
- Przygotowanie kompleksów polimerów gwiaździstych i wybranych substancji antybakteryjnych, jak antybiotyki, eugenol, nanosrebro.
- Modyfikację cementów kostnych substancjami antybakteryjnymi i kontrastującymi, polimerami gwiaździstymi funkcjonalizowanymi związkami aktywnymi oraz kompleksami polimerów gwiaździstych i substancji aktywnych.
- Identyfikację oraz potwierdzenie struktury otrzymanych produktów z wykorzystaniem odpowiednich metod analitycznych (jak spektroskopia FTIR i UV-Vis, ¹H NMR, DOSY NMR, GPC oraz DLS).
- Badanie kinetyki utwardzania, temperatur charakterystycznych (temperatura wiązania, temperatura maksymalna), czasu wiązania i wytrzymałości cementu kostnego na ściskanie zgodnie z normą ISO 5833:2002.
- Badanie procesu uwalniania substancji aktywnych, właściwości biologicznych (tj. aktywności antybakteryjnej cementów i polimerów gwiaździstych wobec *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*), kontrastujących oraz morfologii otrzymanych materiałów.

Dla lepszego zrozumienia oraz przejrzystego przedstawienia zakresu badań zrealizowanych w niniejszej pracy przygotowano dwa uzupełniające się opracowania graficzne: ilustrację przedstawioną na schemacie 1 oraz diagram blokowy zaprezentowany na schemacie 2.



Schemat 1. Graficzne przedstawienie zakresu prowadzonych prac badawczych w ramach niniejszej pracy.



Schemat 2. Blokowy diagram metodyki badawczej.

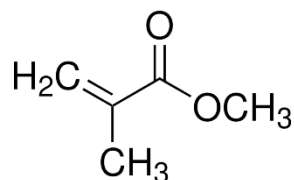
III. Część eksperymentalna

1. Metodyka badawcza

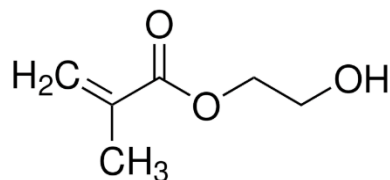
1.1. Odczynniki

1.1.1. Monomery

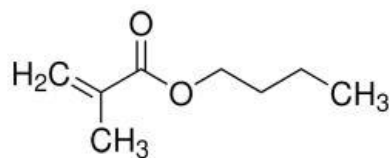
- metakrylan metylu (**MMA**, $M_w = 100,12$ g/mol, 99%, Sigma Aldrich)



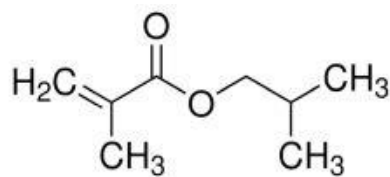
- metakrylan 2-hydroksyetylu (**HEMA**, $M_w = 130,14$ g/mol, 97%, Sigma Aldrich)



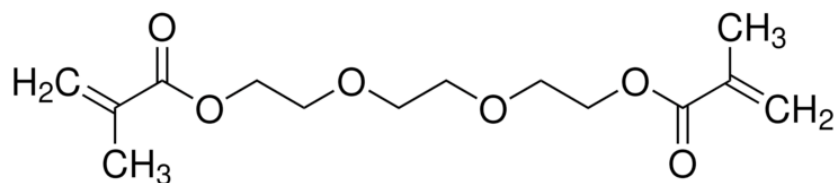
- metakrylan butylu (**BA**, $M_w = 142,20$ g/mol, 99%, Sigma Aldrich)



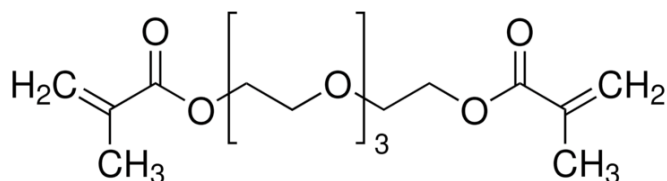
- metakrylan izobutylu (**IBM**, $M_w = 142,20$ g/mol, 97%, Sigma Aldrich)



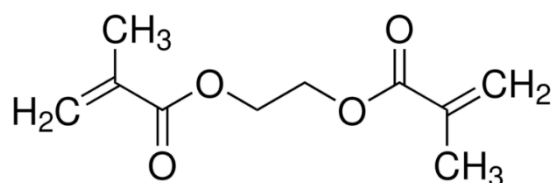
- dimetakrylan glikolu trietylenowego (**TEGDM**, $M_w = 286,32$ g/mol, 95%, Sigma Aldrich)



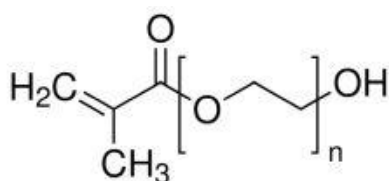
- dimetakrylan glikolu tetraetylenowego (**TtEGDM**, $M_w = 330,37$ g/mol, 95%, Sigma Aldrich)



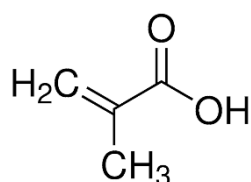
- dimetakrylan glikolu etylenowego (**EGDM**, $M_w = 198,22$ g/mol, 98%, Sigma Aldrich)



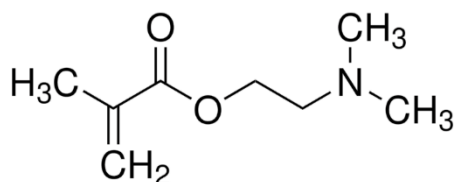
- metakrylan poli(glikolu etylenowego): $M_n = 360$ (**PEG₆MA**, Sigma Aldrich)



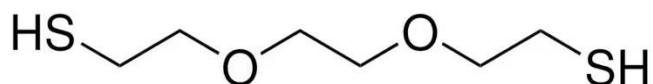
- kwas metakrylowy (**MAA**, $M_w = 86,06$ g/mol, $\geq 98\%$, Sigma Aldrich)



- metakrylan 2-(dimetyloamino)etylu (**DMAEMA**, $M_w = 157,21$ g/mol, 98%, Sigma Aldrich)

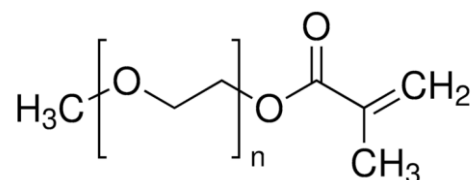


- 1,2-bis(2-merkaptetoetoksy)etan (**T2**, $M_w = 182,30$ g/mol, 95%, Sigma Aldrich)



1.1.2. Kopolimery i oligomery

- Eudragit L100 (**K1**) – kopolimer metakrylan metylu-kwas metakrylowy (1:1) ($M_w = 125000$ g/mol, Evonik)
- Eudragit L100-55 (**K2**) – kopolimer akrylan etylu-kwas metakrylowy (1:1) ($M_w = 135000$ g/mol, Evonik)
- metakrylan eteru metylowego poli(glikolu etylenowego): $M_n = 500$ (**PEG₉MEM**, Sigma Aldrich) i $M_n = 2080$ (**PEG₄₅MEM**, Sigma Aldrich)

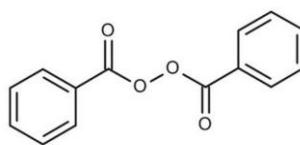


1.1.3. Cementy komercyjne

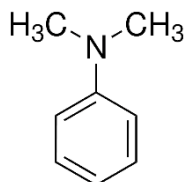
- Palacos R:
 - faza proszkowa: poli(metakrylan metylu) – PMMA, tlenek cyrkonu (IV) – ZrO_2 , nadtlenuk benzoilu – BPO, barwnik E141 - kompleks miedziowy chlorofilu;
 - faza ciekła: metakrylan metylu – MMA, *N,N*-dimetylo-*p*-toluidyna – DMPT, hydrochinon, barwnik E141
- Palacos R+G:
 - faza proszkowa: PMMA, siarczan gentamycyny, ZrO_2 , BPO, barwnik E141
 - faza ciekła: MMA, DMPT, hydrochinon, barwnik E141
- Refabocin Plus:
 - faza proszkowa: PMMA, siarczan gentamycyny, ZrO_2 , BPO
 - faza ciekła: MMA, DMPT, hydrochinon, chlorofil VIII
- Copal G+C:
 - faza proszkowa: poli(akrylan metylu/metakrylan metylu) – P(MA/MMA), siarczan gentamycyny, chlorowodorek klindamycyny, ZrO_2 , BPO, barwnik E141
 - faza ciekła: MAM, DMPT, hydrochinon, barwnik E141

1.1.4. Inicjatory i katalizatory

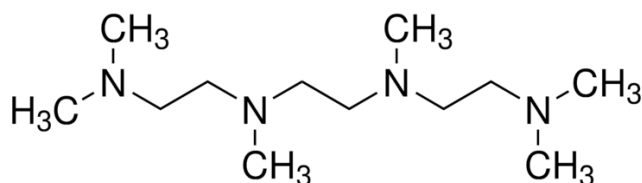
- nadtlenuk benzoilu (**BPO**, $M_w = 242.23$ g/mol, >97%, Sigma Aldrich)



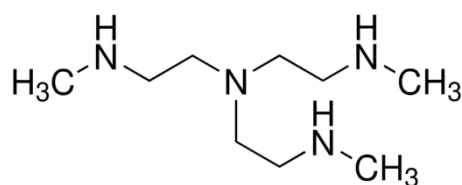
- *N,N*-dimetyloanilina (**DMA**, $M_w = 121.18$ g/mol, 99%, Sigma Aldrich)



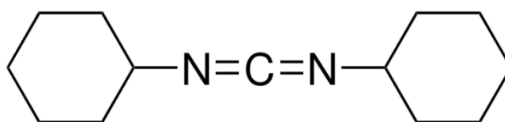
- 1,1,4,7,10,10-heksametylotrietylenotetramina (**HMTETA**, $M_w = 230.39$ g/mol, 97%, Sigma Aldrich)



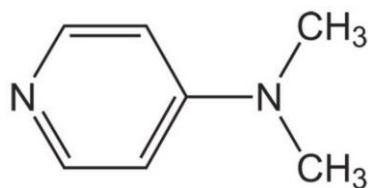
- tris(2-pirydylometylo)amina (**TPMA**, $M_w = 188.31$ g/mol, 97%, Sigma Aldrich)



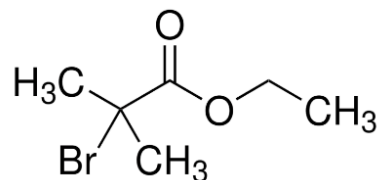
- *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimid (**DCC**, $M_w = 206.33$ g/mol, 99%, Sigma Aldrich)



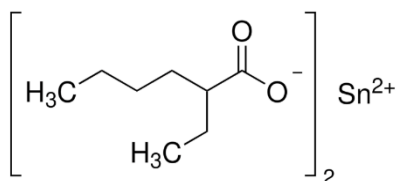
- *N,N*-dimetylopirydyno-4-amina (**DMAP**, $M_w = 122.17$ g/mol, $\geq 99\%$, Sigma Aldrich)



- bromek miedzi(II) (**CuBr₂**, $M_w = 223,35$ g/mol, 99%, Sigma Aldrich)
- bromek miedzi(I) (**CuBr**, $M_w = 143,45$ g/mol, 99,999% w przeliczeniu na metale śladowe, Sigma Aldrich),
- α -bromoizomaślan etylu (**EBiB**, $M_w = 195,05$ g/mol, 98%, Sigma Aldrich)

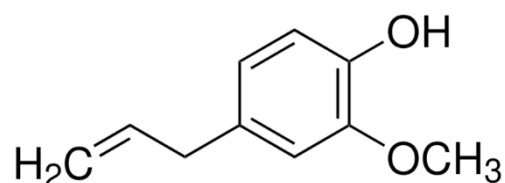


- 2-bromo-*N*-(2-(2-(2-hydroksyetoksy)etoksy)etoksy)etylo)-2-metylopropanoamid (**PEG₄Br**, $M_w = 286,17$ g/mol, zsyntetyzowany w ramach współpracy z CMU przez Hironobu Murata)
- 2-etyloheksanian cyny(II) (**Sn(EH)₂**, $M_w = 405,12$ g/mol, 92,5 – 100%, Sigma Aldrich)

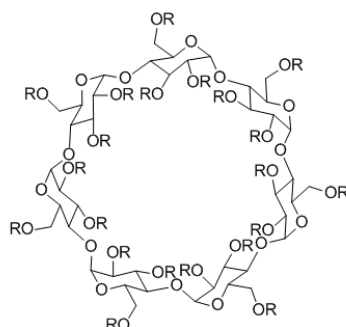


1.1.5. Dodatki i modyfikatory

- eugenol (**EU**, $M_w = 164,20$ g/mol, 99%, Sigma Aldrich)

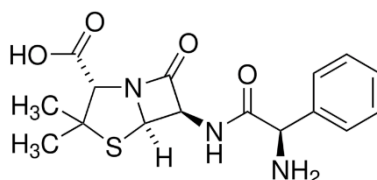


- Captisol® - sól sodowa sulfobutyloeteru β -cyklodekstryny (**CP**, $M_w = 2163$ g/mol, CyDex Pharmaceuticals, Inc.)

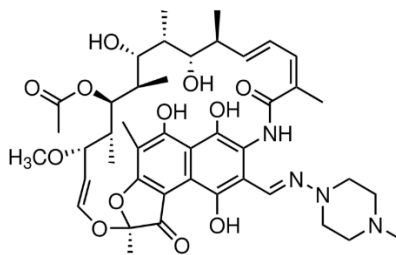


$R=(H)_{21-m}$ or $(C_4H_8SO_3^-Na^+)_{m}$, $m=6.0-7.1$

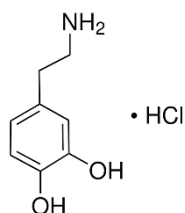
- ampicylina (**AMP**, $M_w = 349,40$ g/mol, 96 – 102 %, Sigma Aldrich)



- ryfampicyna (**RIF**, $M_w = 822,94$ g/mol, $\geq 95\%$, Sigma Aldrich)



- heksahydrat azotanu (V) gadolinu(III) (**Gd(NO₃)₃·6H₂O**, $M_w = 451,36$ g/mol, 99,9%, Sigma Aldrich)
- wodorotlenek sodu (**NaOH**, $M_w = 40,00$ g/mol, peletki, Sigma Aldrich)
- azotan srebra (**AgNO₃**, $M_w = 169,87$ g/mol, $>99\%$, Sigma Aldrich)
- chlorowodorek dopaminy (**DHCl**, $M_w = 189,64$ g/mol, $\geq 98\%$, Sigma Aldrich)



1.1.6. Rozpuszczalniki

- metanol (**MeOH**, $M_w = 32,04$ g/mol, Sigma Aldrich)
- etanol (**EtOH**, $M_w = 46,07$ g/mol, Sigma Aldrich)
- aceton (**Ace**, $M_w = 58,08$ g/mol, Sigma Aldrich)
- dichlorometan (**DCM**, p.a., $M_w =$ g/mol, $\geq 99,9\%$, Sigma Aldrich)
- *N,N*-dimetyloformamid (**DMF**, $M_w = 73,09$ g/mol, Sigma Aldrich)
- tetrahydrofuran (**THF**, $M_w = 72,11$ g/mol, Sigma Aldrich)
- toluen ($M_w = 92,14$ g/mol, 99,8%, Sigma Aldrich)
- anizol ($M_w = 108,14$ g/mol, 99,7%, bezwodny, Sigma Aldrich)
- wodny roztwór soli fizjologicznej (0,9% NaCl) buforowanej fosforanami (**PBS**, tabletki, pH 7,2 – 7,6, Sigma Aldrich)
- deuterowany chloroform (**CDCl₃**, $M_w = 120,38$ g/mol, 99,9%, Sigma Aldrich)
- deuterowana woda (**D₂O**, $M_w = 20,03$ g/mol, 99,9%, Sigma Aldrich)

1.2. Sprzęt i aparatura badawcza

1.2.1. Aparatura

- spektrofotometr FTIR Nicolet 5700 wyposażony w horyzontalną przystawkę transmisyjną firmy Thermo Electron oraz przystawkę tłumionego całkowitego odbicia (ATR) z kryształem diamentowym (badania kinetyczne i identyfikacja otrzymanych związków);
- różnicowy kalorymetr skaningowy DSC 6000 firmy Perkin – Elmer (badania kinetyczne);
- różnicowy kalorymetr skaningowy DSC1 firmy Mettler Toledo (badania kinetyczne);
- spektrometr NMR Bruker Avance III 600 pracujący z częstotliwością 600,27 MHz (identyfikacja i analiza otrzymanych związków)
- chromatograf żelowy Agilent wyposażony w detektor RI i detektor wielokątowego rozpraszania światła oraz kolumny PSS (Styrogel 105, 103, 102 Å) (badania kinetyczne oraz charakterystyka mas cząsteczkowych otrzymanych polimerów, oligmerów);
- skaningowy mikroskop elektronowy Jeol 7001TTLS firmy Akishima (badania morfologii powierzchni);
- spektroskop korelacji fotonów Zetasizer Nano ZS firmy Malvern Instrument (badania wielkości cząstek i ζ -potencjał);
- analizator wielkości cząstek Zetasizer Ultra firmy Malvern Instruments (badania wielkości cząstek);
- spektrofotometr diodowy UV/Vis Agilent model 8453 (badanie uwalniania eugenolu);

- spektrofotometr UV/Vis Jasco V-530 firmy Jasco (badanie uwalniania antybiotyków oraz strącania srebra na polimerach gwiaździstych);
- maszyna wytrzymałościowa Zwick/Roell Z020 firmy Zwick AG (badania wytrzymałości mechanicznej cementów kostnych)

1.2.2. Sprzęt laboratoryjny

- waga analityczna firmy Sartorius (dokładność do 0,1 mg);
- mikrowaga XP6 (dokładność do 0,1 µg) firmy Mettler – Toledo;
- radiometr DYMAX ACCU-CALtm-50
- wytrząsarka mechaniczna MS3 digital firmy IKA;
- suszarka laboratoryjna Memmert SF75 firmy Memmert GmbH + Co. KG
- suszarka próżniowa VD 53 (Binder)
- wyparka próżniowa BÜCHI Rotavapor R-205 wyposażona w kontroler próżni Vacuum Controller V-800 oraz kąpiel grzewczą Heating Bath B-490
- lampa UV-LED LC-L1, Hamamatsu
- lampa UV DYMAX BlueWave 50 AS
- termometr z wejściem na termoparę DeltaOHM HD 2108.1

1.3. Metodyka badawcza

1.3.1. Syntezy

1.3.1.1. Synteza modyfikowanych monomerów

- Pochodne eugenolu (EU-DT)
 - Metakrylowa pochodna eugenolu (EU-MAA)

Metakrylan eugenolu (EU-MAA) zsyntetyzowano na drodze estryfikacji Steglicha, polegającej na kondensacji grupy karboksylowej kwasu metakrylowego (MAA) z grupą hydroksylową eugenolu (EU). Reakcję prowadzono w dichlorometanie w obecności czynnika kondensującego w syntezie estrów – *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) oraz 4-dimetyloaminopirydyny (DMAP) jako katalizatora. W warunkach reakcji zastosowano nadmiar kwasu metakrylowego. Stosunek molowy reagentów EU i MAA wynosił 1:1,2 (3:1,8868 g). Środek kondensujący (DCC) zastosowano w stosunku molowym EU:DCC 1:1,6, a DMAP dodano w stosunku molowym EU:DMAP 1:1. Mieszaninę reakcyjną mieszano w atmosferze azotu w łaźni lodowej w temperaturze 0 °C przez 10 minut, a następnie w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Po tym czasie wytrącony produkt uboczny reakcji, tj. dicykloheksylomocznik (DCU), usunięto przez filtrację, a powstały produkt wyizolowano

za pomocą chromatografii kolumnowej. Otrzymany monomer EU-MAA oczyszczono odparowując rozpuszczalnik na wyparce próżniowej.

- Tiolowa pochodna eugenolu (EU-T2)

Do syntezy merkaptanu eugenolu (EU-T2) wykorzystano reakcję tiol-en, zachodzącą pomiędzy grupą tiolową (-SH) 1,2-bis(2-merkaptioetoksy)etanu (T2) i grupą allilową (C=C) eugenolu. Reakcję inicjowano w obecności fotoinicjatora DMPA pod wpływem światła emitującego promieniowanie z zakresu UV (lampa DYMAX BlueWave 50 AS). Natężenie światła padającego na mieszaninę reakcyjną, zmierzone przy użyciu radiometru, wynosiło 6 mW/cm². Do reakcji zastosowano równomolowy stosunek eugenolu (2,0079 g) do tiolu T2 (2,2239 g). Mieszaninę reagentów przygotowano w dichlorometanie. Fotoinicjator dodano w ilości 2 %mas. w przeliczeniu na masę reagentów. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 4 godziny, a jej postęp monitorowano metodą spektroskopii ATR-FTIR. Monomer oczyszczono z rozpuszczalnika przez odparowanie na próżniowej wyparce laboratoryjnej.

- Pochodne ampicyliny

- Synteza PMMA i jego modyfikacja

W pierwszym etapie syntezowano PMMA o masie cząsteczkowej 2000 oraz 7000 stosując jako inicjator 2-bromo-*N*-(2-(2-(2-hydroksyetoksy)etoksy)etoksy)etylo)-2-metylopropanoamid (PEG₄Br). W kolbie Shlenka umieszczono anizol oraz MMA, CuBr₂, TPMA i PEG₄Br w następującym stosunku molowym składników [PEG₄Br]₀: [MMA]₀: [CuBr₂]₀: [TPMA]₀ = 1:DP:0,006:0,018, gdzie DP = 40 lub 140. Przez mieszaninę przepuszczano gaz obojętny (N₂) przez 20 minut w celu usunięcia tlenu. Następnie przy stałym przepływie gazu obojętnego dodano 1 kroplę Sn(EH)₂. Reakcję prowadzono w temperaturze 65 °C przez 8 godzin (do uzyskania stopnia konwersji monomeru wynoszącego ok. 50%).

W drugim etapie przygotowane polimery PMMA o budowie liniowej zmodyfikowano prowadząc reakcję estryfikacji z AMP. W kolbie okrągłodennej o pojemności 500 ml umieszczono 300 ml DCM, 0,0688 g (0,000197 mol) AMP, 0,0440 g (0,000213 mol) DCC i 0,0241 g (0,000197 mol) DMAP. Następnie umieszczono ją w łaźni lodowej i mieszano przez 2 godziny w celu aktywacji ampicyliny. W kolejnym etapie dodawano kroplami 1,1986 g (0,000164 mol) przygotowanego wcześniej roztworu PMMA₇₀₀₀ w 20 ml DCM. Stosunek AMP:DCC:DMAP:PMMA₇₀₀₀ wynosił 1,2:1,3:1,2:1. Reakcję prowadzono przez 12 godzin w temperaturze pokojowej. Mieszaninę poreakcyjną przefiltrowano przez bibułę filtracyjną w celu usunięcia powstałego produktu ubocznego dicykloheksylomocznika (DCU). Pozostałość suszono przez odparowanie rozpuszczalnika na wyparce laboratoryjnej, a następnie ekstrahowano acetonem, w celu dalszego usunięcia DCU. Modyfikację PMMA₂₀₀₀ przeprowadzono zgodnie z tą samą metodyką.

- Synteza PMMA z inicjatora ampicylinowego (AMP-PEG₄Br)

W pierwszym etapie zmodyfikowano ampicylinę inicjatorem PEG₄Br. W kolbie okrągłodennej o pojemności 500 ml umieszczono 300 ml DCM, 3,64 g (0,0104 mol) AMP, 2,33 g (0,0113 mol) DCC i 1,27 g (0,0104 mol) DMAP. Następnie kolbę umieszczono w łaźni lodowej i mieszano przez 2 godziny w celu aktywacji ampicyliny. Kolejno dodano kroplami przygotowany wcześniej roztwór zawierający 2,52 g (0,0087 mol) PEG₄Br w 20 ml DCM. Stosunek AMP:DCC:DMAP:PEG₄Br wynosił 1,2:1,3:1,2:1. Reakcję prowadzono przez 12 godzin w temperaturze pokojowej. Mieszaninę poreakcyjną przefiltrowano przez bibułę filtracyjną w celu usunięcia powstałego produktu ubocznego dicykloheksylomocznika (DCU). Pozostałość wysuszono przez odparowanie rozpuszczalnika na wyparce laboratoryjnej, a następnie ekstrahowano acetonem, w celu dalszego usunięcia DCU.

W drugim etapie przeprowadzono syntezę PMMA o masie cząsteczkowej 7000 używając wcześniej przygotowanego AMP-PEG₄Br jako inicjatora. W kolbie Shlenka umieszczono anizol, MMA, CuBr₂, TPMA i AMP-PEG₄Br w stosunku [AMP-PEG₄Br]₀:[MMA]₀:[CuBr₂]₀:[TPMA]₀ = 1:140:0,006:0,018. Mieszaninę odgazowano przepuszczając przez nią gaz obojętny (azot) przez 10 minut. Przy stałym przepływie gazu obojętnego dodano 1 kroplę Sn(EH)₂. Reakcję prowadzono w temperaturze 65 °C, przez 8 h (do osiągnięcia ok. 50% przereagowania monomeru).

- Synteza metakrylowej pochodnej gadolinu

W kolbie okrągłodennej o pojemności 100 ml rozpuszczono 1,101 g (0,00321 mol) Gd(NO₃)₃ w 40 ml wody, a następnie do roztworu dodawano kroplami 1,5 ml roztworu NaOH (2,5 mol/dm³ – 0,00385 mol) przez 20 minut, przy ciągłym mieszaniu. Otrzymany w reakcji Gd(OH)₃ przefiltrowano, przepłukano nadmiarem wody i wysuszono w temperaturze 100 °C pod próżnią przez 12 godzin. Następnie w kolbie okrągłodennej o pojemności 40 ml umieszczono Gd(OH)₃ (0,199 g - 0,00096 mol), MAA (0,823 g – 0,0096 mol) i H₂O (0,346 g – 0,0192 mol) w stosunku molowym 1:10:20. Reakcję prowadzono przez 2 godziny, aż do całkowitego rozpuszczenia wszystkich substancji i uzyskania przezroczystego roztworu, który przefiltrowano na gorąco. Filtrat zawierający końcowy produkt przeprowadzonej reakcji (Gd(MAA)₃) zateżono destylując wodę przez 2 godziny. Pożądany produkt Gd(MAA)₃ wytrącano w etanolu. Osad przefiltrowano, przemyto etanolem i suszono przez 12 godzin pod próżnią.

1.3.1.2. Synteza polidopaminy (PDA)

Hydrochlorek dopaminy rozpuszczono w ultraczystej wodzie Mill-Q w ilości 5 g/l. Następnie do roztworu dodawano kroplami roztwór NaOH (1 mol/dm³), przy ciągłym mieszaniu. Reakcję prowadzono przez 24 godziny w temperaturze pokojowej przy stałym mieszaniu.

Otrzymaną polidopaminę oczyszczono przez trzykrotne odwirowanie na wirówce laboratoryjnej pracującej z szybkością 14 000 obr./min, za każdym razem płucząc ją ultraczystą wodą.

1.3.1.3. Synteza polimerów gwiaździstych

- Synteza podstawowego polimeru gwiaździstego (STR)

Do syntezy polimeru gwiaździstego metodą ATRP użyto następujący stosunek molowy reagentów:

$[\text{PEG}_{45}\text{MEM}]_0/[\text{DMAEMA}]_0/[\text{EGDMA}]_0/[\text{EBiB}]_0/[\text{CuBr}]_0/[\text{CuBr}_2]_0/[\text{HMTETA}]_0$
1/2/1/0,2/0,19/0,01/0,2 (STR)

Do kolby Schlenka dodano PEG₄₅MEM ($M_n = 2080$, 2,08 g, 1,0 mmol), DMAEMA (337 μl , 2,0 mmol), EGDMA (189 μl , 1,0 mmol), HMTETA (54 μl , 0,2 mmol), CuBr₂ (2 mg, 0,01 mmol), metanol (10 ml). Mieszaninę reakcyjną poddano procesowi odgazowania poprzez przepuszczanie gazowego azotu (N₂), celem usunięcia rozpuszczonego tlenu, a następnie – przy ciągłym przepływie N₂ – do układu dodano bromek miedzi(I) (CuBr; 27 mg, 0,19 mmol). Po uszczelnieniu kolby, całość umieszczono w łaźni olejowej utrzymywanej w temperaturze 60 °C, po czym do układu reakcyjnego wprowadzono inicjator etylobromizobutyranianu (EBiB; 29,6 μl , 0,2 mmol) za pomocą strzykawki. W określonych odstępach czasu pobierano próbki mieszaniny reakcyjnej w celu oznaczenia konwersji metodą spektroskopii NMR i masy cząsteczkowej polimeru metodą GPC. Reakcję zatrzymano po 24 godzinach przez schłodzenie i wystawienie mieszaniny reakcyjnej na działanie powietrza. Produkty końcowe oczyszczano przez 2 dni stosując torebkę dializacyjną (MWCO 25 kDa) wobec metanolu. Zgodnie z opisaną powyżej metodyką, zsyntezowano dodatkowo trzy inne polimery gwiaździste, które następnie wykorzystano w badaniach związanych z formowaniem nanocząstek srebra (AgNPs). W dwóch z tych struktur zastosowano jako ramiona PEG₉MEM, zapewniający dobre właściwości rozpuszczalności i elastyczności. Jednocześnie w każdej z tych dwóch syntez wykorzystano różne ilości DMAEMA – monomeru zawierającego grupy aminowe, które mogą koordynować jony srebra i wspomagać ich redukcję *in situ*. Różna zawartość DMAEMA w strukturze polimeru pozwoliła na uzyskanie materiałów o zróżnicowanej zdolności do stabilizacji i kontroli rozmiaru powstających nanocząstek, co było kluczowe dla dalszej oceny ich właściwości przeciwdrobnoustrojowych oraz przydatności w modyfikacji cementów kostnych. W syntezie polimerów gwiaździstych oznaczonych jako STR₁ – STR₃ zastosowano następujące ilości reagentów:

- 1) $[\text{PEG}_{45}\text{MEM}]_0/[\text{DMAEMA}]_0/[\text{EGDMA}]_0/[\text{EBiB}]_0/[\text{CuBr}]_0/[\text{CuBr}_2]_0/[\text{HMTETA}]_0$
1/4/1/0,2/0,19/0,01/0,2 (STR₁)
- 2) $[\text{PEG}_9\text{MEM}]_0/[\text{DMAEMA}]_0/[\text{EGDMA}]_0/[\text{EBiB}]_0/[\text{CuBr}]_0/[\text{CuBr}_2]_0/[\text{HMTETA}]_0$
1/2/1/0,2/0,19/0,01/0,2 (STR₂)

3) $[\text{PEG}_9\text{MEM}]_0/[\text{DMAEMA}]_0/[\text{EGDMA}]_0/[\text{EBiB}]_0/[\text{CuBr}]_0/[\text{CuBr}_2]_0/[\text{HMTETA}]_0$
 $1/4/1/0,2/0,19/0,01/0,2$ (STR_3)

- Synteza modyfikowanych polimerów gwiaździstych
 - Polimery gwiaździste modyfikowane EU-MAA (STR-D-EU-MAA i STR-EU-MAA)

Polimery gwiaździste z EU-MAA otrzymano stosując tę samą procedurę, co w przypadku podstawowego polimeru gwiaździstego, ale w pierwszym przypadku zastąpiono monomer DMAEMA syntezowanym monomerem EU-MAA, w drugim zaś zastosowano oba monomery w stosunku molowym DMAEMA:EU-MAA = 1:1. Co więcej, w celu zwiększenia stopnia przereagowania zastosowano metodę Gao i współpracowników [267], która polega na wprowadzeniu mieszaniny $[\text{EGDM}]/[\text{EBiB}]$ po 10 i 24 godzinach prowadzenia syntezy.

Do syntezy polimeru gwiaździstego metodą ATRP zastosowano następujący stosunek reagentów:

- 1) $[\text{PEG}_{45}\text{MEM}]_0/[\text{DMAEMA}]_0/[\text{EU-MAA}]_0/[\text{EGDMA}]_0/[\text{EBiB}]_0/[\text{CuBr}]_0/[\text{CuBr}_2]_0/[\text{HMTETA}]_0$
 $1/2/2/1/0,2/0,19/0,01/0,2$ (STR-D-EU-MAA)
- 2) $[\text{PEG}_{45}\text{MEM}]_0/[\text{EU-MAA}]_0/[\text{EGDMA}]_0/[\text{EBiB}]_0/[\text{CuBr}]_0/[\text{CuBr}_2]_0/[\text{HMTETA}]_0$
 $1/2/2/1/0,2/0,19/0,01/0,2$ (STR-EU-MAA)

- Polimery gwiaździste modyfikowane AMP-PMMA (STR-AMP-PMMA)

W kolbie Schlenka umieszczono 1 ml DMF i AMP-PEG₄-PMMA {AMP- PEG₄-PMMA – 0,892 g (0,129 mmol); AMP- PEG₄-PMMA₂₀₀₀ – 1,376 g (0,688 mmol); AMP- PEG₄-PMMA₇₀₀₀ – 1,656 g (0,215 mmol)}, a następnie dodano 10 ml anizolu, EGDM, DMAEMA oraz CuBr₂ i TPMA. Przez mieszaninę przepuszczano N₂ przez 20 minut. Pod stałym przepływem N₂ dodano EBiB i Sn(EH)₂. Reakcję prowadzono w temperaturze 65 °C. Podczas reakcji pobierano, w odpowiednich odstępach czasu, próbki by monitorować przebieg reakcji. Konwersję monomerów oznaczono metodą spektroskopii NMR, a masę cząsteczkową polimeru za pomocą GPC w DMF. Reakcję zatrzymano po 24 godzinach przez schłodzenie i wystawienie na działanie powietrza. Produkty końcowe oczyszczano przez 2 dni stosując torebkę dializacyjną (MWCO 25 kDa) wobec THF.

Do syntezy zastosowano następujący stosunek molowy reagentów:

$[\text{AMP-PEG}_4\text{-PMMA}]_0/[\text{DMAEMA}]_0/[\text{EGDM}]_0/[\text{EBiB}]_0/[\text{CuBr}_2]_0/[\text{TPMA}]_0$
 $1/1/5/0,0012/0,0036/0,01$

- Polimery gwiaździste modyfikowane $\text{Gd}(\text{MAA})_3$ (STR- $\text{Gd}(\text{MAA})_3$)

Do syntezy polimeru gwiaździstego metodą ATRP zastosowano następujący stosunek reagentów:

$[\text{PEG}_{45}\text{MEM}]_0/[\text{Gd}(\text{MAA})_3]_0/[\text{EGDM}]_0/[\text{EBiB}]_0/[\text{CuBr}_2]_0/[\text{TPMA}]_0$
 1/0,1/0,85/0,2/0,00022/0,00066/0,0022

W kolbie Schlenka umieszczono $\text{Gd}(\text{MAA})_3$ i 1,3 ml DMF, dodano oczyszczony $\text{PEG}_{45}\text{MEM}$ i 7,5 ml toluenu, następnie wprowadzono EGDM, CuBr_2 i TPMA. Przez mieszaninę przepuszczano N_2 przez 20 minut. Pod stałym przepływem N_2 dodano EBiB i $\text{Sn}(\text{EH})_2$. Reakcję prowadzono w temperaturze 65 °C. Zgodnie z procedurą zaproponowaną przez Gao i współpracowników [267], w celu zwiększenia stopnia przereagowania, po 10 godzinach do mieszaniny reakcyjnej dodano mieszaninę EGDM:EBiB w stosunku molowym 0,16:0,04. Następnie po 24 godzinach dodano kolejną porcję mieszaniny $[\text{EGDM}]/[\text{EBiB}]$ w stosunku molowym 0,21:0,05. W określonych odstępach czasu pobierano próbki by monitorować przebieg reakcji wykonując pomiar masy cząsteczkowej polimeru metodą GPC w DMF. Reakcję zatrzymano po 36 godzinach przez schłodzenie i wystawienie mieszaniny poreakcyjnej na działanie powietrza. Produkty końcowe oczyszczano przez 2 dni za pomocą worka z membraną dializacyjną 11 (MWCO 25 kDa) wobec DMF.

1.3.1.4. Otrzymywanie związków kompleksowych

- Kompleksy polimerów gwiaździstych

Kompleksy otrzymano przez wprowadzenie substancji aktywnej do wodnego roztworu polimeru gwiaździstego w odpowiednim stosunku molowym i mieszano w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Następnie roztwory kompleksu zamrażano w temperaturze -80 °C przez 24 godziny, i liofilizowano w liofilizatorze (CRYODOS-80, Telstar, Hiszpania), po czym suszono przez 24 godziny pod ciśnieniem 0,04 mbar w temperaturze skraplacza -50 °C, aby uzyskać produkt w formie proszku.

- Kompleks STR:EU

Kompleks otrzymano przez wprowadzenie eugenolu do wodnego roztworu podstawowego polimeru gwiaździstego w stosunku molowym STR:EU = 1:20.

- Kompleks STR:AMP

Kompleks otrzymano przez wprowadzenie AMP do wodnych roztworów STR oraz STR-EU-MAA w stosunku molowym STR/STR-EU-MAA:AMP = 1:7.

- Kompleks STR:RIF

Kompleks otrzymano przez wprowadzenie RIF do wodnych roztworów STR oraz STR–EU-MAA w stosunku molowym STR/STR–EU-MAA:RIF = 1:5.

- Kompleks STR–AgNPs

Kompleksy STR–AgNPs przygotowano w następujących rozpuszczalnikach: etanol (EtOH), mieszaninie etanol:aceton (EtOH-Ace) (w stosunku wagowym 4:1) oraz woda:aceton (H₂O-Ace) (w stosunku wagowym 4:1). Polimery gwiaździste (STR oraz STR–D–EU-MAA) rozpuszczono w stężeniu 4 mg/ml odpowiedniego rozpuszczalnika. Do roztworu polimeru gwiaździstego dodano 0,35 M roztwór AgNO₃ w odpowiednim rozpuszczalniku. Stosunek monomeru DMAEMA do jonów Ag⁺ wynosił 1:1. Kolby były przechowywane w ciemności. Postęp redukcji kontrolowano metodą spektroskopii UV-Vis. Otrzymane STR–AgNP wysuszono pod próżnią.

- Kompleks z Captisol®

Kompleks Captisol®:eugenol (CP:EU) otrzymano przez zmieszanie wodnego roztworu Captisol® (CP, 197,595 mg w 2 ml wody) z etanolowym roztworem eugenolu (EU, 15 mg (14,058 µl) w 200 µl EtOH) w stosunku molowym CP:EU 1:1. Mieszanie prowadzono przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie roztwory kompleksów zamrażano w temperaturze -80 °C przez 24 godziny i liofilizowano w liofilizatorze (CHRIST ALPHA 1-2 LO, Martin Christ, Niemcy), po czym suszono przez kolejne 24 godziny pod ciśnieniem 0,04 mbar i w temperaturze skraplacza -50 °C w celu uzyskania produktu w formie proszku.

1.3.1.5. Synteza cementów kostnych

- Kompozycja opracowana w ramach niniejszej pracy

Do celów badawczych przygotowano autorską kompozycję cementu kostnego składającą się, podobnie jak komercyjne cementy z dwóch faz, tj. fazy ciekłej zawierającej mieszaninę odpowiednich monomerów oraz fazy proszkowej zawierającej mieszaninę kopolimerów. Fazę ciekłą (L) przygotowano przez zmieszanie monomerów: HEMA (70 %mas.), MMA (15 %mas.) i TEGDM (15 %mas.). Kolejnym etapem było dodanie do mieszaniny monomerów czynnika redukującego układu inicjującego DMA w ilości 0,50 %mas., 0,83 %mas. lub 1,17 %mas. Stężenie DMA obliczono w stosunku do masy fazy ciekłej kompozycji cementu kostnego, tj. masy monomerów. Mieszaniny homogenizowano w wytrząsarce mechanicznej MS 3 digital (IKA, Staufen im Breisgau, Niemcy) w celu uzyskania jednorodnych kompozycji. Fazę proszkową (P) przygotowano oddzielnie, mieszając kopolimery metakrylowe w stosunku wagowym 80:20 (K1:K2), a następnie dodając nadtlenek benzoilu BPO (inicjator) w następujących ilościach: 0,3 % mas., 0,7 % mas. i 1 % mas. w stosunku do masy fazy ciekłej. Aby uzyskać próbkę

utwardzonego cementu kostnego do dalszych badań, fazę proszkową mieszano z fazą ciekłą w stosunku masowym 1:1,25. Niniejszą procedurę stosowano do uzyskania wszystkich próbek cementu. Dodatki wprowadzano w odpowiednich ilościach do fazy ciekłej (eugenol, pochodne eugenolu) lub fazy proszkowej (antybiotyki, polimery gwiazdziste, kompleksy, polidopamina, $\text{Gd}(\text{MAA})_3$) cementu kostnego w miejsce monomerów/kopolimerów, przy niezmiennych stosunkach masowych składników.

- Komercyjne cementy kostne

Próbki komercyjnych cementów kostnych przygotowano zgodnie z zaleceniami producenta. Fazę proszkową (P) mieszano z fazą ciekłą (L) w stosunkach: Palacos R – 2,13:1; Palacos R+G – 2,13:1; Refobacin Plus – 2,39:1; Copal G+C – 2,27:1. Dodatki wprowadzano w odpowiednich ilościach do fazy proszkowej (polimery gwiazdziste, kompleksy, polidopamina, $\text{Gd}(\text{MAA})_3$) w miejsce polimerów, nie zmieniając stosunku P:L.

1.3.2. Charakterystyka otrzymanych materiałów

1.3.2.1. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera – FTIR

Widma w podczerwieni wykonano metodą spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera na aparacie Nexus Nicolet 5700 (FTIR, Thermo Electron Scientific Instruments Corporation, Madison, WI, USA) metodą transmisyjną lub tłumionego całkowitego odbicia (ATR) w temperaturze pokojowej w zakresie liczb falowych $4000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ i rozdzielczości 4 cm^{-1} przy 64 skanach. Wykonano widmo tła, a następnie na kryształach diamentu przystawki umieszczano badane próbki cementu kostnego przed lub po procesie utwardzania w postaci dysku, proszku lub ciekłej i wykonywano pomiar. Analizowano konwersję monomerów w trakcie utwardzania, a także zmiany chemiczne spowodowane wprowadzeniem dodatków. Ponadto, analizowano skuteczność procesu kompleksowania substancji aktywnych przez polimery gwiazdziste. W przypadku syntezy eugenolu modyfikowanego monomerem tiolowym T2, tj. EU-T2, mieszaninę reakcyjną nakładano między płytki KBr, które następnie umieszczano w komorze pomiarowej aparatu celem wykonania analizy metodą transmisji. Prowadzone badanie pozwoliło ocenić postęp reakcji modyfikacji eugenolu.

1.3.2.2. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego – NMR

Widma NMR monomerów eugenolowych zarejestrowano w temperaturze $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ za pomocą spektrometru Agilent DD2 800 wyposażonego w 5 mm głowicę sondy $^1\text{H}\{^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\}$ i pracującego przy częstotliwości rezonansowej 799,677 i 201,097 MHz odpowiednio dla ^1H i ^{13}C . Przesunięcia chemiczne skalibrowano w odniesieniu do pików resztkowego rozpuszczalnika (CDCl_3 : 7,26 ppm dla ^1H , 77,16 ppm dla ^{13}C). Rezonanse zostały przypisane na podstawie eksperymentów

^1H , ^{13}C i 2D ^1H - ^1H COSY (dwuwymiarowa korelacyjna spektroskopia NMR, ang. *correlation spectroscopy*), ^1H - ^{13}C HSQC (heteronuklearna spektroskopia korelacji pojedynczych kwantów, ang. *heteronuclear single quantum coherence*) i ^1H - ^{13}C HMBC (heteronuklearna spektroskopia korelacji wiązań wielokrotnych, ang. *heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy*). Wyniki przetworzono w programie Mnova NMR.

Widma ^1H NMR dla polimerów gwiazdzistych oraz monomerów na bazie ampicyliny uzyskano za pomocą spektrometru Bruker Avance III 600 pracującego przy częstotliwości 600,27 MHz. Szerokość impulsu ^1H NMR 90° wynosiła 18 μs , opóźnienie relaksacji 10 s, czas akwizycji 2,73 s. Widma próbek polimerowych mierzono przy co najmniej 64 skanach. Wszystkie próbki zarejestrowano w temperaturze 25 $^\circ\text{C}$ przy użyciu CDCl_3 i D_2O jako rozpuszczalnika. Widma 2D ^1H - ^1H NOESY NMR (spektroskopia jądrowego efektu Overhausera, ang. *nuclear Overhauser effect spectroscopy*) roztworu wodnego STR:EU uzyskano na tym samym urządzeniu z oknem widmowym 4096 Hz w osiach częstotliwości f_1 i f_2 . Skumulowano 16 skanów w 512 przyrostach t_1 (czas ewolucji) z opóźnieniem relaksacji wynoszącym 5 s. Czasy mieszania stosowane w pomiarach wahały się w zakresie 100-1100 ms. Eksperymenty dyfuzji ^1H PFG (DOSY) przeprowadzono przy użyciu spektrometru Bruker Avance III 600 MHz NMR z użyciem głowicy DiffBB i wzmacniaczy gradientowych 40 A. Siłę gradientu zmieniano co najmniej w 8 krokach. W celu skorygowania efektów konwekcji zastosowano sekwencję Pulsed Field Gradient Double-Stimulated Echo. Czas gradientu impulsu δ wynosił 1 ms, a czas dyfuzji Δ wahał się od 20 do 70 ms [268]. Wyniki przetworzono w programie TopSpin 4.0.5 i Dynamic Center 2.7.

1.3.2.3. Chromatografia żelowa (GPC)

Masy cząsteczkowe (M_n) i dyspersyjność ($\mathcal{D}$) polimerów gwiazdzistych oraz polimerów liniowych mierzono względem wzorców poli(metakrylanu metylu) (PMMA) metodą chromatografii żelowej (GPC) przeprowadzonej z użyciem chromatografu żelowego (GPC) firmy Agilent z THF oraz DMF jako eluentem. Chromatograf GPC był wyposażony w RI i detektor wielokątowego rozpraszania światła (MALS) oraz kolumny PSS (Styrogel 105, 103, 102 $\text{\AA}$) w temperaturze 35 $^\circ\text{C}$ (THF) oraz 50 $^\circ\text{C}$ (DMF) i natężeniu przepływu 1 ml/min.

1.3.2.4. Chromatografia gazowa (GC)

Stopień przereagowania monomerów (p) podczas prowadzenia syntezy polimerów gwiazdzistych badano metodą chromatografii gazowej GC-FID (HP 5890II) z użyciem autosamplera i detektora płomieniowo-jonizacyjnego (FID). Objętość nastrzyku wynosiła 1 μl , a temperaturę dozownika i detektora ustawiono na 250 $^\circ\text{C}$. Chromatograf wyposażono w kolumnę MTX-5 (Restek, USA). Analizę przeprowadzono z użyciem helu jako gazu nośnego przy przepływie 1,75 ml/min. Początkowa temperatura kolumny wynosiła 60 $^\circ\text{C}$ (utrzymywana przez 3 min),

a następnie wzrastała z szybkością 20 °C/min do 200 °C. Jako wzorzec wewnątrz stosowano anizol, toluen lub DMF, a stopień przereagowania monomeru wyznaczano ze wzoru (5).

$$p = 100 \cdot \frac{b_1 - b_2 \cdot \frac{a_1}{a_2}}{b_1} \quad (5)$$

gdzie p – stopień przereagowania monomeru w %, b_1 – wysokość sygnału monomeru przed polimeryzacją, b_2 – wysokość sygnału monomeru w próbce po czasie t procesu polimeryzacji, a_1 – wysokość sygnału wzorca w próbce przed polimeryzacją, a_2 – wysokość sygnału wzorca w próbce po czasie t procesu polimeryzacji.

1.3.2.5. Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS)

Średnią średnicę, rozkład wielkości cząstek (wskaźnik polidispersyjności, PDI), a także potencjał ζ kompleksu CP:EU zmierzono metodą spektroskopii korelacji fotonów (PCS) za pomocą aparatu Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, Malvern, U.K.) w temperaturze 25 °C w ultraczystej wodzie. Pomiary przeprowadzono pod kątem 173° w stosunku do wiązki padającej w temperaturze 25 ± 1 °C dla każdej próbki dyspersyjnej. Dekonwolucję zmierzonej krzywej korelacji do rozkładu wielkości intensywności uzyskano za pomocą nieujemnego algorytmu najmniejszych kwadratów. Wartości potencjału ζ wyznaczono przy użyciu urządzenia Zetasizer Nano ZS Malvern Instrument wyposażonego w laser He-Ne o mocy $P = 4,0$ mW i długości fali $\lambda = 633$ nm. Wyniki podano jako średnią z trzech oddzielnych pomiarów w trzech różnych partiach $\pm$ odchylenie standardowe (SD).

Średnią średnicę oraz rozkład wielkości cząstek polimerów gwiaździstych określono przy użyciu Zetasizer Ultra (Malvern Instrument, Malvern, U.K.) w temperaturze 25 °C w wodzie oraz chloroformie (podstawowy polimer gwiaździsty i z eugenolem), THF (polimer gwiaździsty z AMP) lub DMF (polimer gwiaździsty z gadolinem) jako rozpuszczalnik. Próbki rozcieńczono przed pomiarem do stężenia ~ 10 mg/ml.

1.3.2.6. Spektroskopia UV-Vis

Badania uwalniania środków antybakteryjnych z cementów kostnych prowadzono metodą spektroskopii UV-Vis. Modyfikowane cementy kostne w kształcie cylindrów o wymiarach 12 mm wysokości i 6 mm średnicy umieszczano w 5 ml odpowiedniej mieszaniny. W przypadku cementów kostnych modyfikowanych eugenolem lub kompleksem CP:EU jako mieszaninę stosowano sól fizjologiczną (NaCl 0,9% w/w, FS) z dodatkiem etanolu (50% w/w, EtOH), przy czym stosunek objętościowy FS:EtOH wynosił 1:1. Natomiast w przypadku cementów kostnych modyfikowanych gentamycyną i ryfampicyną jako mieszaninę stosowano wodny roztwór soli fizjologicznej (0,9% NaCl) buforowanej fosforanami (PBS). Uwalnianie leków prowadzono w temperaturze $37 \pm 0,1$ °C. W ustalonych odstępach czasu pobierano 1 ml medium i analizowano za pomocą

spektroskopii UV-Vis na spektrofotometrze diodowym Agilent model 8453 przy użyciu kuwet kwarcowych o długości ścieżki 1 cm w temperaturze 25 °C (EU i CP:EU) oraz na spektrofotometrze Jasco V-530 przy użyciu kuwet kwarcowych o długości drogi optycznej 0,2 i 1 cm, w temperaturze 25 °C (odpowiednio dla gentamycyny i ryfampicyny). Uwolnioną ilość leku obliczano na podstawie wcześniej sporządzonej krzywej kalibracyjnej.

Ponadto, spektroskopię UV-Vis stosowano do badania kinetyki strącania nanocząstek srebra na polimerach gwiaździstych. Zastosowano aparat spektrofotometr Jasco V-530, kuwety kwarcowe o długości drogi optycznej 0,1 cm. Pomiar prowadzono w temperaturze 25 °C, a widmo roztworu STR-AgNPs analizowano w zakresie długości fal 300-600 nm.

1.3.2.7. Izotermiczna różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC)

Metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej badano kinetykę polimeryzacji syntezowanych cementów kostnych. W tym celu tuż przed pomiarem mieszano fazę proszkową z fazą ciekłą, a następnie mieszaninę wprowadzono do naczynka DSC w ilości 23 ± 2 mg (odważane na mikrowadze Mettler Toledo). Następnie naczynko DSC umieszczano w komorze aparatu DSC wraz z pustym naczynkiem jako odniesieniem i przemywano gazem obojętnym (Ar) z szybkością przepływu gazu wynoszącą 20 ml/min. Czas od rozpoczęcia mieszania do umieszczenia naczynka z próbką w aparacie DSC wynosił jedną minutę. Gaz obojętny przepuszczano przez komorę aparatu przez jedną minutę przed i przez cały czas trwania pomiaru. W ten sposób pomiary DSC rozpoczynano za każdym razem po dwóch minutach od rozpoczęcia mieszania fazy ciekłej z fazą proszkową. Badanie przeprowadzano na urządzeniu DSC 6000 (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA) w warunkach izotermicznych (25 °C). Strumień ciepła reakcji, W/g, rejestrowano w funkcji czasu prowadzenia pomiaru, aż do uzyskania stałej wartości mierzonego parametru. Szybkość reakcji ($R_p = dx/dt$) obliczano na podstawie szybkości wydzielania ciepła ($d(\Delta H)/dt$) z równania (5).

$$R_p = \frac{1}{\Delta H_T} \frac{d(\Delta H)}{dt} \quad (6)$$

gdzie ΔH_T oznacza całkowitą entalpię reakcji. Stopień konwersji wiązań nienasyconych C=C monomerów obliczono całkując obszar pomiędzy termogramami DSC i linią bazową. Linię bazową otrzymano dla pomiaru próbki po przeprowadzeniu procesu polimeryzacji, gdy podczas reakcji nie zaobserwowano żadnych zmian temperatury. Do obliczenia szybkości polimeryzacji i stopnia konwersji wiązań nienasyconych C=C przyjęto ciepło polimeryzacji jednej grupy metakrylowej równe 56 kJ/mol [57], a addycji tiol-en 82,5 kJ/mol [269]. Wszystkie eksperymenty przeprowadzono co najmniej trzykrotnie, a ich powtarzalność wynosiła około $\pm 3\%$.

Dla cementów kostnych modyfikowanych pochodnymi eugenolu przeprowadzono również pomiary nieizotermiczne w celu oszacowania ilości nieprzereagowanych monomerów,

pozostałych w cemencie kostnym po 24 godzinach od zmieszania jego składników. W tym celu, po zmieszaniu składników cementu kostnego, próbkę mieszaniny ($m = 20$ mg) umieszczono, podobnie jak w pomiarach izotermicznych, w naczynku DSC i zmierzono ciepło reakcji polimeryzacji, ogrzewając próbkę w zakresie temperatur $25 - 180$ °C, z szybkością ogrzewania 5 °C/min. Następnie próbkę umieszczono w suszarce laboratoryjnej w temperaturze $36,6$ °C. Po 24 godzinach od wymieszania składników, naczynko DSC z próbką ponownie umieszczono w komorze aparatu DSC i przeprowadzono pomiar w tych samych nieizotermicznych warunkach. Ilość nieprzereagowanego monomeru określono na podstawie równania (6).

$$\text{nieprzereagowany monomer} = \frac{H_t}{H_{tot}} \cdot 100\% \quad (7)$$

gdzie *nieprzereagowany monomer* to procent nieprzereagowanego monomeru pozostałego w cemencie kostnym po 24 godzinach utwardzania próbki, H_t to ciepło reakcji polimeryzacji po 24 godzinach, H_{tot} to całkowite ciepło reakcji polimeryzacji.

1.3.2.8. Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)

Morfologię cementów kostnych badano przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego JEOL 7001 F SEM (Akishima, Tokio, Japonia, detektor SEI, napięcie przyspieszenia 7 kV). Próbki o wymiarach 1×2 mm pokryto powłoką złota metodą napylania jonowego i poddano obrazowaniu.

1.3.2.9. Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

Pomiary za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego przeprowadzono przy użyciu mikroskopu JEM-1400 (JEOL, Tokio, Japonia) przy napięciu przyspieszającym 120 kV. Roztwory wodne polimerów przygotowano z proszków i rozcieńczono w stosunku $1:100$. Próbki naniesiono na dostępną w handlu siatkę Cu Lacey bez formvaru i wysuszono na powietrzu w temperaturze pokojowej.

1.3.2.10. MRI

Pomiary prowadzono na skanerze MRI Agilent $9,4$ T z wykorzystaniem cewki nadawczo-odbiorczej Milipede 40 o średnicy 40 mm. Obrazy ważone gęstością spinową oraz czasami T_1 wykonano z wykorzystaniem techniki echa spinowego za pomocą sekwencji SEMS (ang. *Single Echo Multi Slice*) stosując następujące parametry:

Obrazy cementów kostnych

- Pole widzenia - FOV (Fiel of View) - 10×10 mm
- Matryca 64×64
- Czas repetycji - T_r - 50 ms / 500 ms

- Czas echa - T_e - 9,63 ms
- Uśrednienia - A_v - 16
- Puste skany - dummy scans - 16
- Liczba warstw - slices - 3
- grubość warstwy - thicknes - 2mm

Obrazy cementów kostnych w otoczeniu wodnym

- Pole widzenia - FOV (Fiel of View) - 25 x 25 mm
- Matryca 128x128
- Czas repetycji - T_r - 50 ms / 1000 ms / 1500ms
- Czas echa - T_e - 1,63 ms
- Uśrednienia - A_v - 16 /1
- Puste skany - dummy scans - 16
- Liczba warstw - slices - 3
- grubość warstwy - thicknes - 2mm

1.3.2.11. Czas wiązania cementu kostnego i maksymalna temperatura

Przebieg procesu utwardzania cementów kostnych charakteryzowano określając maksymalną temperaturę (T_{max}) osiąganą przez cement w trakcie procesu utwardzania (polimeryzacji), temperaturę wiązania (T_{set}) i czas wiązania (t_{set}). Czas wiązania, jak podano w rozdziale 2.3.1. *Parametry utwardzania cementu*, definiuje się jako czas potrzebny do osiągnięcia temperatury pośredniej między temperaturą otoczenia a temperaturą maksymalną, czyli T_{set} . Zgodnie z normą ISO 5833:2002 temperaturę wiązania obliczano na podstawie równania (1).

W celu wykonania pomiaru mieszano ze sobą fazę proszkową z fazą ciekłą, a następnie wprowadzano do formy z politetrafluoroetylenem (PTFE), wykonanej zgodnie z normą ISO 5833:2002. Termoparę umieszczono na wysokości $3 \pm 0,5$ mm powyżej wewnętrznej powierzchni podstawy formy i temperaturę mierzono w funkcji czasu do momentu, gdy spadała o 5 °C po osiągnięciu wartości maksymalnej, tj. T_{max} . Wartość t_{set} dla każdej próbki wyznaczano z dokładnością do 5 s, a następnie obliczono średnią i zaokrąglono do najbliższych 15 s.

1.3.2.12. Wytrzymałość na ściskanie (σ)

Badania wytrzymałości mechanicznej przeprowadzono zgodnie z normą ISO 5833:2002. Przygotowaną mieszaninę fazy proszkowej i ciekłej cementu kostnego umieszczono w cylindrycznych formach z tworzywa sztucznego (PTFE) o wymiarach: 12 mm wysokości i 6 mm średnicy. Proces utwardzania przeprowadzono w suszarce laboratoryjnej (Memmert SF75, Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Niemcy) przez 1 godzinę w temperaturze 36,6 °C i stałej wilgotności (30%). Następnie uzyskany cement kostny wyjęto z formy i pozostawiono w suszarce na kolejne 23 godziny. Zatem, 24 ± 2 godziny po zmieszaniu dwóch faz (proszku i płynu) cementu, uzyskane próbki poddano testom wytrzymałości na ściskanie na maszynie wytrzymałościowej

Zwick/Roell Z020 (Zwick AG, Ulm, Niemcy). Zastosowano stałą prędkość trawersy 22,5 mm/min. Pomiar przeprowadzono do momentu pęknięcia próbki i powtórzono co najmniej pięć razy. Uzyskane wyniki wytrzymałości na ściskanie i modułu Younga przeliczono przy użyciu programu komputerowego dedykowanego dla maszyny wytrzymałościowej Zwick/Roell Z020.

1.3.2.13. Badania antybakteryjne

Przygotowaną mieszaninę fazy proszkowej i ciekłej cementu kostnego umieszczono w cylindrycznych formach z tworzywa sztucznego (PE) o wymiarach: wysokość 2 mm, średnica 8 mm. Masa uzyskanych próbek w formie dysków wynosiła $0,38 \pm 0,02$ g. Proces utwardzania przeprowadzono zgodnie z procedurą stosowaną dla próbek do badań wytrzymałości na ściskanie.

Ocenę żywotności komórek przeprowadzono z wykorzystaniem szczepu bakterii *E. coli*, uprzednio inkubowanego przez 24 godziny w bulionie odżywczym w temperaturze 30 °C. Następnie zawiesinę bakterii odwirowano (10 minut, 20 °C, 4000 g) i przemyto oraz zawieszono w minimalnym podłożu mineralnym do uzyskania gęstości optycznej $OD_{600} = 0,1$. Próbkę cementu w formie dysków umieszczono w zawiesinie bakteryjnej (2,5 ml) w probówkach typu falcon i inkubowano w temperaturze 30 °C. Po upływie 1, 24, 48 oraz 72 godzin pobierano po 100 µl zawiesiny, którą nanoszono do płytek 6-dołkowych, po czym dodawano 10 µl wskaźnika fluorescencyjnego (Alamar Blue®, Thermo Fisher, Niemcy). Pomiary fluorescencji (ekscytacja: 520 nm, emisja: 580–640 nm) prowadzono po 45 minutach, 1 godzinie, 1,5 godziny oraz 24 godzinach z użyciem czytnika płytek GlowMax (Promega, Niemcy).

Kinetyka wzrostu i żywotność bakterii: próbki cementów kostnych z eugenolem w formie dysków, po 24 godzinach, wysterylizowano przy użyciu lampy UV przez 1 godzinę. Następnie każdą próbkę umieszczono w pojedynczym dołku płytki 6-dołkowej, do którego dodano 7 ml pożywki LB zawierającej komórki *Staphylococcus aureus* oraz *Escherichia coli* o gęstości optycznej $OD_{570} \text{ nm}$ wynoszącej 0,1. Płytke umieszczono w inkubatorze w temperaturze 37 °C, prowadząc inkubację przy ciągłym mieszaniu (230 obr./min). Gęstość optyczną zawiesin mierzono co godzinę przez pierwsze 7 godzin, a następnie po 24 i 48 godzinach, przy użyciu czytnika mikropłytek, w celu oceny wzrostu i żywotności bakterii.

Właściwości przeciwbakteryjne cementu kostnego niemodyfikowanego oraz cementów modyfikowanych polidopaminą (PDA) w ilościach 0,1%, 0,2%, 0,5% i 1% masowych oceniano wobec szczepu *Staphylococcus aureus* pochodzącego z kolekcji ATCC (ang. *american type culture collection*). Do hodowli bakteryjnej zastosowano 15 µl zapasu glicerolowego bakterii, który zaszczerpiono do 10 ml pożywki LB Miller, a następnie inkubowano przez noc w temperaturze 37 °C na wytrząsarce orbitalnej ustawionej na 230 obr./min. Po inkubacji nocnej, 200 µl hodowli bakterii przeniesiono do probówek zawierających 5 ml pożywki LB Miller i prowadzono inkubację przez kolejne 2 godziny w identycznych warunkach. Po tym czasie do probówek wprowadzono

próbki cementów kostnych – niemodyfikowanych oraz modyfikowanych PDA w różnych stężeniach (0,1 – 1 %mas.). Hodowlę kontynuowano w tych samych warunkach.

Próbką kontrolną była hodowla bakterii *S. aureus* prowadzona bez dodatku cementu. Gęstość optyczną zawiesin mierzono przy długości fali 600 nm (OD_{600}), co godzinę przez pierwsze 7 godzin, a następnie po 24 godzinach. W celu wyeliminowania wpływu cementów kostnych na pomiary gęstości optycznej, wynikającego z rozpraszania światła przez zawiesinę, przygotowano próbki kontrolne (tzw. ślepą próbę, blank) – zawierające pożywkę LB oraz cement kostny w odpowiednim stężeniu, ale bez bakterii. Gęstość optyczną tych próbek odejmowano od wartości uzyskanych w próbkach badawczych zawierających bakterie. Wszystkie pomiary wykonano trzykrotnie ($n = 3$).

1.3.2.14. Hodowla komórkowa *in vitro*

Linie ludzkich komórek wątrobowych (HEP2G) pozyskano z ATCC. Komórki hodowano w minimalnej pożywce niezbędnej Eagle'a (ang. *Minimum Essential Medium Eagle*, EMEM, Sigma-Aldrich), suplementowanej 10% surowicą płodową bydlęcą (FBS, Sigma-Aldrich), 1% niezbędnych aminokwasów (Sigma-Aldrich), 1% pirogronianu sodu (Sigma-Aldrich) oraz 1% antybiotyków (penicylina 100 µg/ml, streptomycyna 100 µg/mL, Sigma-Aldrich). Hodowle prowadzono w standardowych warunkach hodowli komórkowej – w atmosferze nawilżonej, zawierającej 5% CO₂, w temperaturze 37 °C – aż do osiągnięcia 85% pokrycia naczynia hodowlanego przez komórki, tj. konfluencji. Komórki przenoszono (pasażowano) przy użyciu roztworu trypsyny/EDTA w stosunku 1:6.

1.3.2.15. Test żywotności komórek

W celu oceny cytotoksyczności zastosowano test WST-1. Komórki wysiano w ilości 6×10^3 komórek na studzienkę 96-dołkowej płytki i inkubowano przez noc. Próbkami cementów kostnych – niemodyfikowanych oraz modyfikowanych PDA (0,1%, 0,2%, 0,5% i 1%) – inkubowano w 6 ml pożywki EMEM przez noc w temperaturze 37 °C. Następnego dnia 100 µl tej pożywki, zawierającej wyługowane składniki cementu, przeniesiono do hodowanych komórek i inkubowano przez 24 godziny.

Po inkubacji, do każdej studzienki dodano 10 µl odczynnika WST-1 i pozostawiono na 120 minut w warunkach standardowej hodowli. Komórki traktowane 50% roztworem DMSO (obj./obj.) stanowiły kontrolę pozytywną, natomiast komórki niepoddane działaniu cementu – kontrolę negatywną. Absorbancję mierzono przy długości fali 450 nm z odniesieniem do 620 nm, za pomocą czytnika mikropłytek (Anthos Zenyth 340rt). Przed pomiarem każdą płytkę wytrząsano orbitalnie przez 30 sekund. Żywotność komórek [%] obliczono względem kontroli negatywnej. Dane przedstawiono jako średnie $\pm$ odchylenie standardowe z trzech niezależnych powtórzeń.

Część badań prowadzonych w ramach pracy wykonano we współpracy z dr hab. inż. Wojciechem Smułkiem z Politechniki Poznańskiej (badania antybakteryjne), dr Rafałem Konefałem z Instytutu Chemii Makromolekularnej, CAS, Praga, Czechy (badania NMR), dr hab. inż. Bartoszem Grześkowiakiem z Centrum NonoBioMedycznego Uniwersytetu Adama Mickiewicza (badania antybakteryjne), dr inż. Katarzyną Fiedorowicz z Centrum NonoBioMedycznego Uniwersytetu Adama Mickiewicza (badania antybakteryjne, hodowla komórkowa *in vitro* oraz test żywotności komórek), dr Tomaszem Zalewskim z Centrum NonoBioMedycznego Uniwersytetu Adama Mickiewicza (badania MRI) oraz dr hab. inż. Katarzyną Bielicką-Daszkiewicz z Politechniki Poznańskiej (chromatografia gazowa), a także we współpracy z zespołem badawczym profesora Matyjaszewskiego z Uniwersytetu Carnegie Mellon, Pittsburgh, USA (synteza polimerów gwiaździstych modyfikowanych AMP-PMMA oraz analiza metodą chromatografii żelowej (GPC)) oraz dr Antonino Mazzaglia z Instytutu Badań Materiałów Nanostrukturalnych, CNR, Mesyna, Włochy (badania nad cementami kostnymi z eugenolem i kompleksem CP:EU).

2. Wyniki i dyskusja

Na podstawie przeglądu literaturowego określono kierunki prowadzonych badań nad modyfikacją cementów kostnych polimerami gwiaździstymi modyfikowanymi czynnikami antybakteryjnymi, kontrastującymi czy wpływającymi na proces uwalniania i integracji komórkowej. W tym celu przeprowadzono modyfikację czynników antybakteryjnych i kontrastującego, aby umożliwić ich wbudowanie w strukturę polimeru gwiaździstego. Zastosowano szereg reakcji przebiegających zgodnie z mechanizmem estryfikacji Steglicha, reakcji tiol-en, kontrolowanej polimeryzacji żyjącej ATRP i polimeryzacji rodnikowej. Modyfikowane reagenty wprowadzono następnie do cementów kostnych, aby uzyskać materiały o pożądanych właściwościach antybakteryjnych, kontrastujących, mechanicznych, charakteryzujących się odpowiednimi parametrami utwardzania. W poniższych rozdziałach przedstawiono kolejno podejmowane kroki w celu weryfikacji hipotez postawionych w niniejszej pracy.

2.1. Syntezy

2.1.1. Synteza modyfikowanych monomerów

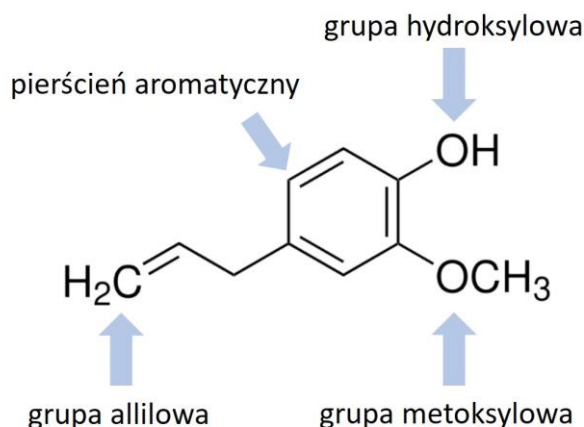
W ramach niniejszej pracy prowadzono modyfikację cementu kostnego czynnikiem antybakteryjnym naturalnego pochodzenia, tj. eugenolem. Jest to olejek eteryczny o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych i przeciwgrzybiczych. Przy wyborze tego związku kierowano się możliwością uzyskania materiału antybakteryjnego bez potrzeby stosowania antybiotyków. Te ostatnie, jak wiadomo, ze względu na zbyt częste ich stosowanie, mają coraz bardziej ograniczone właściwości z powodu lekooporności drobnoustrojów. Dodatkowo nadmierne ich stosowanie spowodowało zanieczyszczenie środowiska substancjami aktywnymi, co ma wpływ na organizmy żyjące na planecie, jak również na stan wód. Próba zastąpienia antybiotyków, czy zmniejszenia ich dawki w danym środku leczniczym, związkami pochodzenia naturalnego jest aktualnie szeroko testowana, a jej powodzenie może się przyczynić do poprawy zdrowia pacjentów, jak również do poprawy jakości środowiska. Powodzenie takiego podejścia ma zatem istotne znaczenie dla rozwoju nauki przyjaznej środowisku. Dodatkowo podjęto się również modyfikacji antybiotyku w celu uzyskania koniugatu polimer – lek, co mogłoby pozwolić na uzyskanie materiału o jego kontrolowanym uwalnianiu dzięki degradacji labilnego wiązania antybiotyk-polimer, jak również czynnika kontrastującego – gadolinu, związanego którego z cementem umożliwiłoby jego obrazowanie metodą MRI w razie potrzeby, bez dodatkowego wprowadzania środków kontrastujących do organizmu pacjenta.

Wprowadzenie każdej dodatkowej substancji, w tym czynnika leczniczego, do akrylowego cementu kostnego zwykle powoduje pogorszenie jego właściwości, głównie odporności mechanicznej. Podobnie wprowadzenie eugenolu do cementu kostnego wywołało pogorszenie właściwości mechanicznych produktu, ale pozytywnie wpłynęło na obniżenie temperatury

maksymalnej utwardzania, co przedstawione zostanie w dalszej części pracy, rozdz. 2.3.1. *Eugenol*. Stąd w ramach pracy zaproponowano modyfikację eugenolu związkami posiadającymi grupy reaktywne w procesie łańcuchowej polimeryzacji rodnikowej lub stopniowej polimeryzacji tiol-en. Kowalencyjne wbudowanie eugenolu w strukturę cementu może zapobiec pogorszeniu właściwości mechanicznych materiału. Modyfikacja substancji aktywnych farmaceutycznie umożliwia otrzymanie związków o zoptymalizowanych właściwościach, sprzyjających ich efektywnej integracji ze strukturą sieci polimerowej. Takie podejście pozwala nie tylko zminimalizować negatywny wpływ substancji aktywnych na proces polimeryzacji cementów kostnych, ale także zachować ich pożądane właściwości biologiczne, co ma kluczowe znaczenie dla ich funkcjonalności w zastosowaniach medycznych. W tym rozdziale omówione zostaną modyfikacje czynników antybakteryjnych, takich jak eugenol i ampicylina oraz czynnika kontrastującego – gadolinu.

- Pochodne eugenolu (EU-DT)

W celu otrzymania pochodnych eugenolu zawierających w strukturze grupy funkcyjne reaktywne w polimeryzacji przeprowadzono syntezę dwóch pochodnych eugenolu: metakrylanu 4-allilo-2-metoksyfenylu (EU-MAA) oraz 4-(3((2-(2-(merkaptioetoksy)etoksy)etylo)tio)propylo)-2-metoksyfenolu (EU-T2). Podjęcie się takiej modyfikacji było podyktowane wcześniej przeprowadzonymi badaniami modyfikacji BC eugenolem. Związek ten wpłynął na znaczącą redukcję temperatury maksymalnej utwardzania cementu kostnego [270,271], a także wywołał zwiększoną aktywność przeciwbakteryjną BC po jego modyfikacji [272], jednocześnie wpływając na proces utwardzania cementu kostnego i pogorszenie jego odporności na zginanie. Do modyfikacji EU wybrano monomer metakrylowy, dokładniej kwas metakrylowy (MAA), z uwagi na obecność grupy metakrylowej charakterystycznej również dla monomerów użytych w kompozycji cementu kostnego (faza ciekła) oraz grupę karboksylową, oraz tiol (1,2-bis(2-merkaptioetoksy)etan – T2) ze względu na tworzenie wiązania tioeterowego w reakcji tiol-en z wiązaniem nienasyconym C=C eugenolu, które jest labilne (co powinno wpłynąć na poprawę właściwości mechanicznych cementu) i, co ważne w zastosowaniach do wypełniania kości, biokompatybilne. W pierwszej kolejności zaplanowano wyżej wspomniane modyfikacje EU, a następnie sięgnięto do literatury przedmiotu, aby sprawdzić, czy takie syntezy zostały już z powodzeniem przeprowadzone. Natrafiono na szereg publikacji omawiających sposoby modyfikacji eugenolu, z wykorzystaniem różnych miejsc reaktywnych w cząsteczce tego związku, jak grupa hydroksylowa, metoksyłowa, wiązanie allilowe, czy pierścień aromatyczny (rysunek 5).



Rys. 5. Miejsca reaktywne w eugenolu.

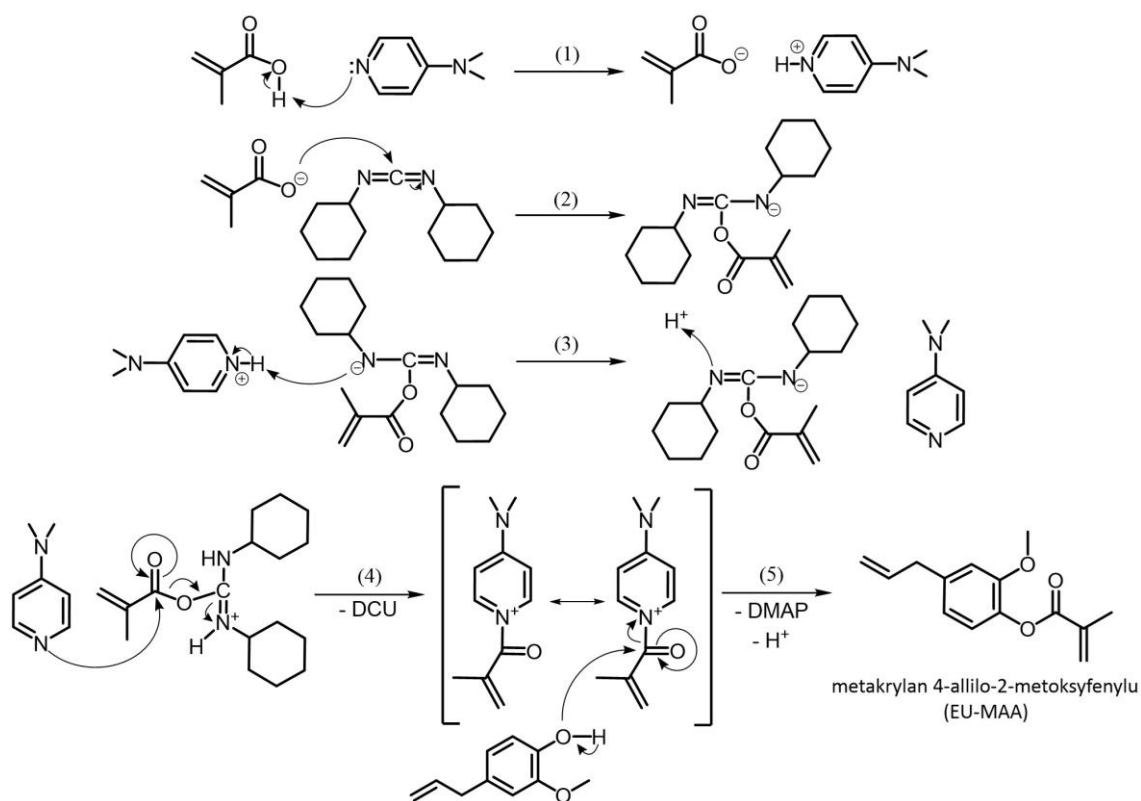
Jedną z metod modyfikacji EU polegała na termicznie inicjowanej reakcji tiol-en z wykorzystaniem AIBN jako inicjatora [273]. Zastosowano wielofunkcyjne tiole, tj. dwu-, trzy-, czterofunkcyjne oraz EU w stosunku molowym grup funkcyjnych SH:C=C 1:1, otrzymując eugenolowy dimer, trimer i tetramer, które następnie poddano reakcji estryfikacji z bezwodnikiem metakrylowym w $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$, otrzymując multimetakrylany eugenolu. Następnie pochodne eugenolu znalazły zastosowanie w syntezie sieci polimerowych metodą fotoinicjowanej reakcji tiol-en z wielofunkcyjnymi tiolami, co wykazano w literaturze [273]. Uzyskane materiały charakteryzowały się wysoką stabilnością termiczną oraz dobrą wytrzymałością mechaniczną, w szczególności na rozciąganie. W innych badaniach Lenardão i współpracownicy [274] opisali metodę funkcjonalizacji eugenolu za pomocą różnych aromatycznych tioli poprzez sprzęganie tiol-en bez użycia inicjatora i z wykorzystaniem glicerolu jako rozpuszczalnika. Po 6 godzinach prowadzenia reakcji w temperaturze $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ uzyskano jej umiarkowaną wydajność (57 – 67%), a uzyskane cząsteczki na bazie eugenolu wykazywały właściwości przeciwutleniające. W innym podejściu, badacze wykorzystali reakcję tiol-en inicjowaną światłem UV. Hu i inni [275] poddali eugenol i tioglikolan metylu reakcji typu „click” inicjowanej DMPA i światłem UV. Produkty posłużyły dalszej modyfikacji, a następnie syntezie poliesterów. Z kolei Guzmán i współautorzy [276] opracowali syntezę tritiolowej pochodnej eugenolu w dwuetapowym procesie. W pierwszym etapie przeprowadzili fotoinicjowaną (DMPA) reakcję triallylową pochodnej eugenolu z kwasem tiooctowym, a następnie produkt ten poddali hydrolizie, uzyskując pochodną tiolową z wydajnością na poziomie 84%. W innym podejściu, Cheng i współpracownicy [277] wykorzystali reakcję eteryfikacji metodą Williamsona do otrzymania O-allylowego eteru eugenolu poprzez sprzęganie z bromkiem allylu w acetonie i obecności K_2CO_3 . Powstały produkt zastosowano w syntezie polimerów samonaprawiających się, również w oparciu o mechanizm tiol-en. Otrzymane sieci wykazywały korzystne właściwości mechaniczne, w tym wysoką odporność na rozciąganie. Neda i inni [278] opisali syntezę eugenolu eteryfikowanego allylem (AEG) przy użyciu bromku allylu i wodorotlenku sodu (NaOH) w DMSO z wysoką wydajnością (96%). Podobną strategię eteryfikacji zastosowali Yoshimura i współpracownicy [279], którzy otrzymany

eter eugenolu poddali pirolitycznej reakcji przegrupowania Claisena, prowadzącej do powstania 2,4-diallil-6-metoksyfenolu. Związek ten poddano kolejnej eteryfikacji allilowej, a uzyskane monomery o charakterze dwu- i trójfunkcyjnym wykorzystano następnie w fotopolimeryzacji tiol-en, otrzymując sieci polimerowe o korzystnych właściwościach mechanicznych. Rojo i współpracownicy [280] przeprowadzili reakcję metakrylowania eugenolu i 2-eugenylowego etanolu, prowadzącą do powstania monomerów metakrylowanych na bazie eugenolu, w celu uzyskania kopolimerów w reakcji polimeryzacji rodnikowej do zastosowań w kompozytach dentystycznych i jako ortopedyczne cementy kostne. Metakrylowanie eugenolu przeprowadzono za pomocą chlorku metakryloilowego, który może reagować bezpośrednio z grupą fenolową, tworząc metakrylan 4-allilo-2-metoksyfenylu. Z drugiej strony, 2-(4-allil-2-metoksyfenoksy)etylo metakrylan uzyskano poprzez hydroksyetylację, a następnie reakcję z chlorkiem metakryloilowym [280,281]. Wprowadzenie dodatkowej grupy zmniejsza ryzyko hydrolizy grupy estrowej [282] i zapewnia większą swobodę steryczną, co wpływa na bioaktywność [281]. Wyniki tych badań wskazują na szerokie możliwości modyfikacji strukturalnej eugenolu w celu uzyskania funkcjonalnych materiałów polimerowych o podwyższonej wytrzymałości oraz specyficznych właściwościach fizykochemicznych.

W niniejszej pracy pochodne eugenolu syntetyzowano różnymi metodami ukierunkowanymi na różne grupy funkcyjne eugenolu, tj. grupę hydroksylową i allilową z wykorzystaniem nowatorskiej strategii, nieopisanej dotychczas w literaturze. Powstałe produkty scharakteryzowano za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Włączenie do struktury eugenolu grup funkcyjnych reaktywnych w reakcji polimeryzacji (grupa metakrylowa lub tiolowa) umożliwi kowalencyjne wbudowanie otrzymanych pochodnych eugenolu w strukturę cementu kostnego, co powinno wpłynąć pozytywnie na jego właściwości. Dodatkowo, kowalencyjne związanie monomerów eugenolu w strukturze cementu kostnego zapobiegnie wypłukiwaniu tego związku z utwardzonego materiału. To z kolei powinno skutkować przedłużonym działaniem środka przeciwbakteryjnego.

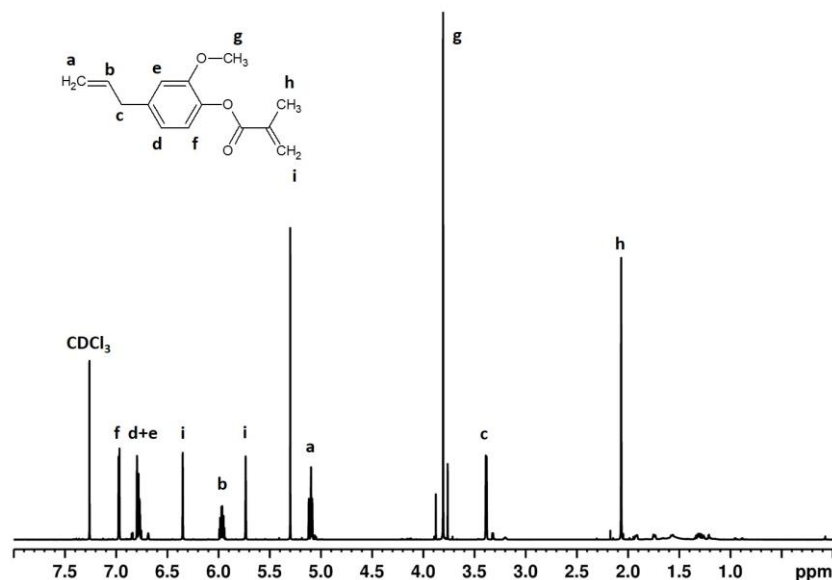
- Metakrylowa pochodna eugenolu (EU-MAA)

Reakcje modyfikacji strukturalnej eugenolu przeprowadzono poprzez estryfikację jego grupy hydroksylowej kwasem metakrylowym zgodnie z mechanizmem reakcji Steglicha. Mechanizm ten przedstawiono na rysunku 6 jako reakcje (1) - (5).

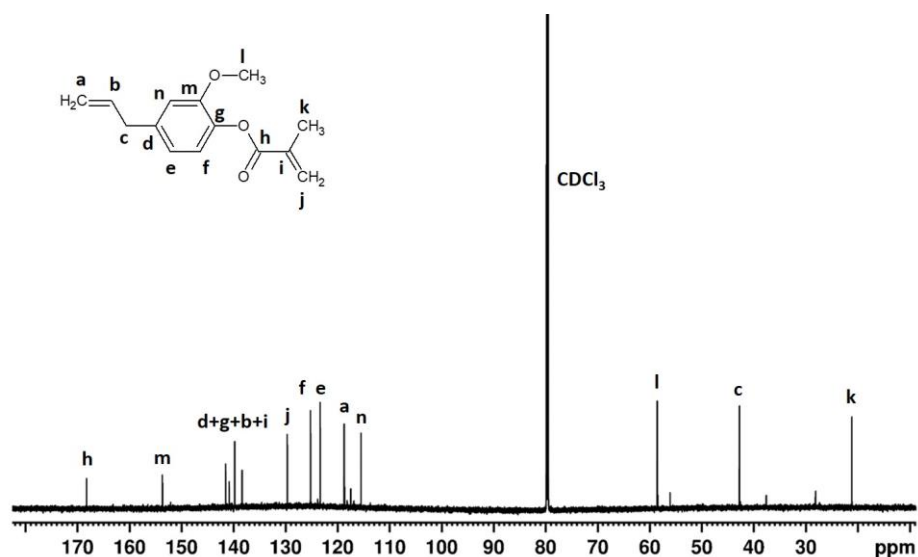


Rys. 6. Reakcje syntezy metakrylanu 4-allilo-2-metoksyfenylu (EU-MAA) z monomerów EU i MAA w obecności DCC i DMAP.

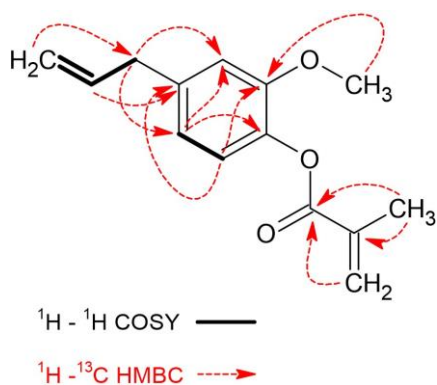
Wydajność reakcji wyniosła 80%. Strukturę pochodnej EU-MAA eugenolu zweryfikowano z wykorzystaniem spektroskopii NMR. Strukturę EU-MAA wraz z przypisanymi wartościami przesunięć chemicznych dla pomiarów ¹H i ¹³C NMR przedstawiono na widmach NMR (rysunek 7 i rysunek 8) oraz w tabeli 1, natomiast kluczowe korelacje obserwowane w widmach ¹H-¹H COSY i ¹H-¹³C HMBC przedstawiono na rysunku 9 oraz w tabeli 1.



Rys. 7. Widmo ¹H NMR dla EU-MAA zmierzone w CDCl₃ w temperaturze 298K.



Rys. 8. Widmo ^{13}C NMR dla EU-MAA zmierzone w CDCl_3 w temperaturze 298K.



Rys. 9. Dane NMR EU-MAA: kluczowe korelacje obserwowane w widmach $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY (pogrubione linie) i $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC (przerwane strzałki).

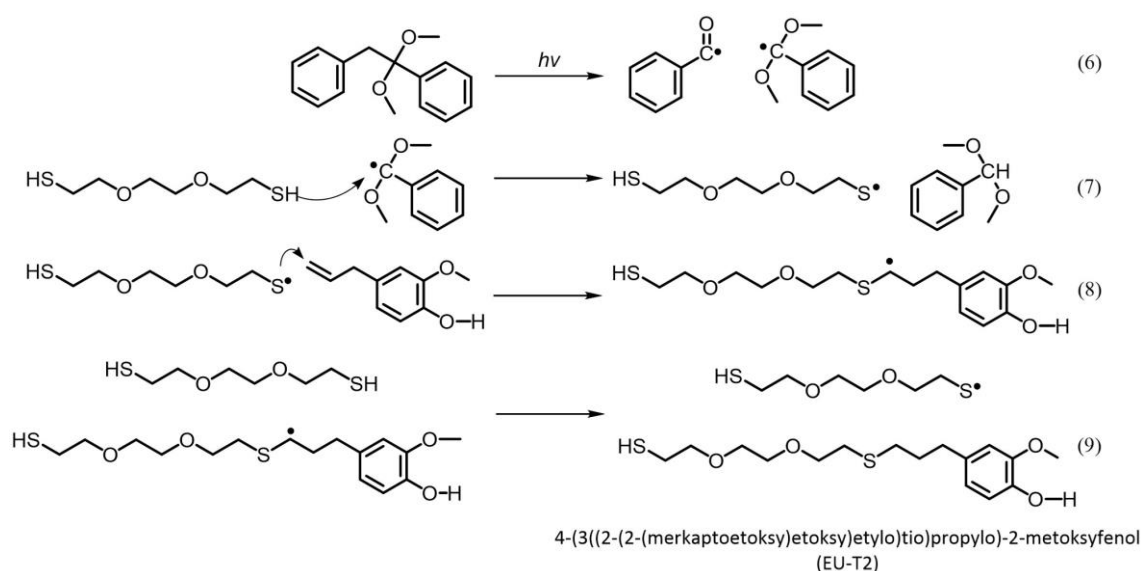
Tab. 1. Dane ^1H i ^{13}C NMR uzyskane dla EU-MAA, w tym kluczowe korelacje wyznaczone z widm $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC i $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC.

δ_{H} (ppm)	Wielokrotność ($J_{\text{H-H}}$ w Hz)	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC δ_{C} (ppm)	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC δ_{C} (ppm)			
2,07	dd (1,6, 1,0)	18,6	127,2	135,9	165,7	
3,38	M	40,2	113,0	116,2	120,8	137,3
			139,0			
3,81	S	56,1	151,2			
5,08 - 5,12	M	116,2	40,2	137,3		
5,73	p (1,5)	127,2	18,6	165,7		
5,97	ddt (16,8, 10,0, 6,7)	137,3	40,2	139,0		
6,35	M	127,2	18,6	135,9	165,7	
6,77	dd (8,0, 1,8)	120,8	40,2	113,0	138,3	139,0
6,80	d (1,8)	113,0	40,2	120,8	138,3	139,0
			151,2			
6,97	d (8,0)	122,7	113,0	138,3	139,0	151,2
Czwartorzędowe atomy węgla: 135,9, 138,3, 139,0, 151,2, 165,7 (ppm)						

Modyfikacja eugenolu pozwoliła otrzymać jego pochodną z metakrylową grupą funkcyjną reaktywną w polimeryzacji. Pozwoli to na kowalencyjne włączenie EU do matrycy polimerowej jako integralnej części łańcucha polimerowego. Ponadto, jak pokazują badania, synteza metakrylowych pochodnych eugenolu, poprzez reakcję z grupą OH pozwala na otrzymanie monomerów o porównywalnej [280], a nawet większej [272] aktywności antybakteryjnej od eugenolu. Co istotne, otrzymane związki zachowują zdolność do polimeryzacji rodnikowej, a ich obecność w układzie reakcyjnym prowadzi do obniżenia efektu egzotermicznego procesu polimeryzacji, bez istotnego wpływu na końcowy stopień konwersji wiązań nienasyconych C=C. Jednocześnie, monomery te wykazują trwałą aktywność biologiczną oraz dobrą cytocompatybilność z ludzkimi fibroblastami [271,280,281]. W związku z powyższym, uzyskane pochodne eugenolu stanowią obiecującą grupę związków do zastosowań w formulacjach cementów kostnych, umożliwiając jednocześnie obniżenie temperatury maksymalnej procesu podczas utwardzania materiału oraz nadanie mu właściwości antybakteryjnych.

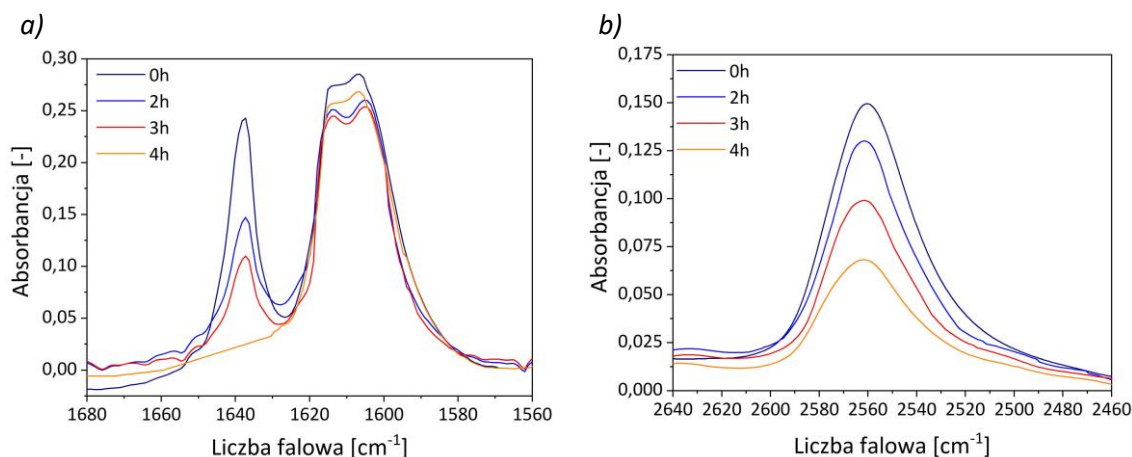
○ Tiolowa pochodna eugenolu (EU-T2)

Kolejną modyfikację strukturalną eugenolu przeprowadzono stosując jako modyfikator dwufunkcyjny tiol. Reakcja tiol-en inicjowana światłem w obecności fotoinicjatora DMPA zachodziła pomiędzy grupą allilową eugenolu a grupą SH merkaptanu. Jedna z grup tiolowych wzięła udział w reakcji tiol-en, umożliwiając modyfikację eugenolu. Druga natomiast pozostała nieprzereagowana, dzięki czemu eugenol może wbudować się kowalencyjnie w strukturę akrylowego cementu kostnego w reakcji tiol-metakrylan. Reakcja modyfikacji eugenolu przebiegała zgodnie z reakcjami (6) - (8) przedstawionymi na rysunku 10.



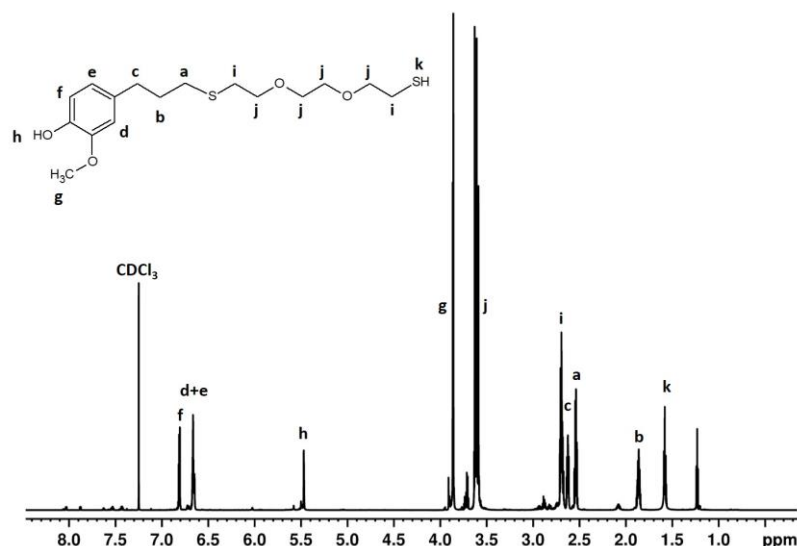
Rys. 10. Reakcje syntezy 4-(3((2-(2-(merkaptoetoksy)etoksy)etylo)tio)propylo)-2-metoksyfenolu (EU-T2) z monomerów EU i T2 w obecności DMPA.

Postęp reakcji monitorowano za pomocą spektroskopii w podczerwieni (FTIR). Reakcję prowadzono aż do zaniku pasma absorpcji drgań rozciągających wiązania podwójnego C=C eugenolu występującego w zakresie liczb falowych 1660 – 1620 cm^{-1} (rysunek 11a). Ponadto na widmach zaobserwowano spadek intensywności pasma absorpcji odpowiadającego drganiom rozciągającym grupy SH występującego w zakresie liczb falowych 2600 – 2500 cm^{-1} (rysunek 11b). Wydajność reakcji wyniosła 95%.

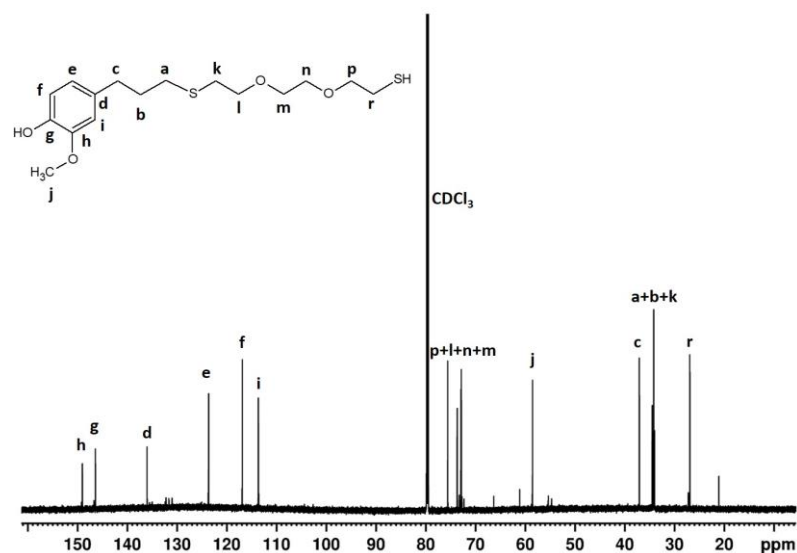


Rys. 11. Widma ATR-FTIR zarejestrowane podczas syntezy pochodnej EU-T2 w zakresie liczb falowych odpowiadających drganiom a) wiązania C=C eugenolu, b) grupy -SH tiolu T2.

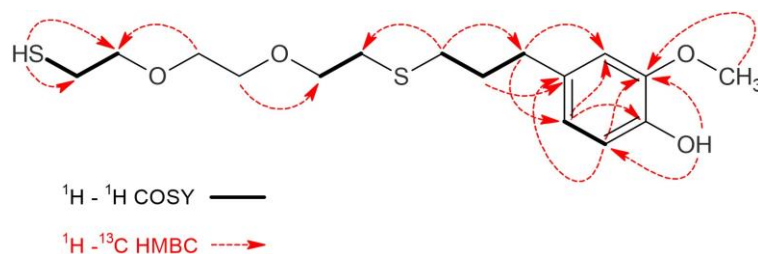
Otrzymane widma NMR wraz z strukturą monomeru EU-T2 i przypisanymi wartościami przesunięć chemicznych dla pomiarów ^1H i ^{13}C NMR pokazano na rysunku 12 i rysunku 13 oraz w tabeli 2, natomiast kluczowe korelacje obserwowane w widmach ^1H - ^1H COSY i ^1H - ^{13}C HMBC przedstawiono na rysunku 14 oraz w tabeli 2. Otrzymane wyniki potwierdzają strukturę otrzymanego zaprojektowanego związku.



Rys. 12. Widmo ^1H NMR dla EU-T2 zmierzone w CDCl_3 w temperaturze 298K.



Rys. 13. Widmo ^{13}C NMR dla EU-T2 zmierzone w CDCl_3 w temperaturze 298K.



Rys. 14. Dane NMR EU-T2: kluczowe korelacje obserwowane w widmach $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY (pogrubione linie) i $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC (przerwane strzałki).

Tab. 2. Dane ^1H i ^{13}C NMR uzyskane dla EU-T2, w tym kluczowe korelacje wyznaczone z widm $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC i $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC.

δ_{H} (ppm)	Wielokrotność ($J_{\text{H-H}}$ w Hz)	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC δ_{C} (ppm)	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC δ_{C} (ppm)			
1,59	m		24,4	73,1		
1,87	m	31,7	32,0	34,5	133,5	
2,55	m	32,0	31,5	31,7	34,5	
2,64	m	34,5	31,7	32,0	111,1	121,1
			133,5			
2,68 – 2,72	m	24,4, 31,5	32,0	71,2	73,1	
3,60 – 3,65	m	70,3, 70,4	24,4	31,5	70,3 - 70,4	
		71,2, 73,1	71,2	73,1		
3,87	s	56,0	146,5			
5,48	s		114,4	143,9	146,5	
6,67	dd (7,9, 1,9)	121,1	34,5	111,1	133,5	143,9
			146,5			
6,68	d (1,9)	111,1	34,5	114,4	121,1	133,5
			143,9	146,5		
6,82	d (7,9)	114,4	111,1	133,5	143,9	146,5
Czwartorzędowy atom węgla: 133,5, 143,9, 146,5 (ppm)						

Modyfikacja struktury eugenolu na drodze funkcjonalizacji chemicznej pozwoliła na otrzymanie pochodnej zawierającej grupę tiolową, zdolną do udziału w reakcjach polimeryzacji. Tego typu modyfikacje umożliwiają trwałe, kowalencyjne wbudowanie eugenolu w matrycę polimerową – zarówno jako końcowej grupy funkcyjnej łańcucha polimerowego, jak i jako aktywnego składnika struktury sieciującej. Przykładem takiego podejścia są wcześniej wspomniane badania opisane w literaturze [273–277]. Przytoczone badania wskazują, że funkcjonalizacja eugenolu poprzez reakcje z jego grupami alkilowymi prowadzi do powstania wielofunkcyjnych monomerów zdolnych do tworzenia sieci polimerowych o kontrolowanej architekturze i właściwościach mechanicznych. Co istotne, pochodne takie często wykazują zwiększoną aktywność przeciwdrobnoustrojową w porównaniu do niezmodyfikowanego eugenolu, co czyni je obiecującymi komponentami w projektowaniu bioaktywnych materiałów polimerowych do zastosowań biomedycznych [272].

- Pochodne ampicyliny
 - Synteza poli(metakrylanu metylu) (PMMA) i jego modyfikacja

Do syntezy pochodnej ampicyliny wybrano poli(metakrylan metylu) (PMMA), który jest jednym z najczęściej stosowanych biomateriałów, znajdującym szerokie zastosowanie w medycynie, zwłaszcza w produkcji cementów kostnych. Polimeryzacja metodą ATRP umożliwia precyzyjną kontrolę masy cząsteczkowej syntezowanego polimeru i wąski jej rozkład (dyspersyjność), co czyni ją jedną z najbardziej efektywnych metod syntezy funkcjonalizowanych polimerów. W niniejszym rozdziale opisano proces syntezy PMMA o ściśle określonej masie cząsteczkowej metodą ATRP z wykorzystaniem specjalnie zaprojektowanego na potrzeby niniejszej pracy, we współpracy z Hironobu Murata, inicjatora (PEG₄-Br) zawierającego grupę hydroksylową, która umożliwi późniejszą modyfikację polimeru poprzez estryfikację z ampicyliną. To pozwoli na uzyskanie liniowego PMMA, który będzie miał przyłączony kowalencyjnie antybiotyk, jak również będzie makroinicjatorem (MI) w dalszej syntezie polimerów gwiazdzystych. Zaprojektowane polimery gwiazdziste będą mogły pełnić rolę nośnika leku w cementach kostnych. W celu weryfikacji skuteczności przeprowadzonego procesu polimeryzacji oraz funkcjonalizacji otrzymanego PMMA przeprowadzono analizę otrzymanego produktu metodą spektroskopii NMR oraz chromatografii żelowej (GPC).

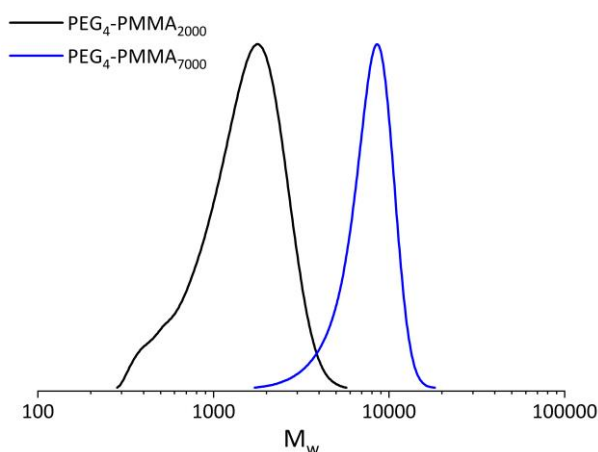
W pierwszym etapie badań wykonano syntezę liniowego PMMA o zaplanowanej masie cząsteczkowej 2000 ((PEG₄-PMMA₂₀₀₀) i 7000 (PEG₄-PMMA₇₀₀₀). Następnie obliczono konwersję monomeru na podstawie pomiarów przeprowadzonych metodą spektroskopii NMR, a jej wartości przedstawiono w tabeli 3. W przypadku syntezy PMMA o mniejszej masie cząsteczkowej uzyskano stopień konwersji wynoszący 71% natomiast w przypadku PMMA o większej masie cząsteczkowej nieco niższy, wynoszący 62%. Za pomocą GPC skalibrowanego do wzorców PMMA wyznaczono również względne liczbowo średnie masy cząsteczkowe ($M_{n,app}$) oraz absolutne masy cząsteczkowe

($M_{n,abs}$) (tabela 3) syntezowanych polimerów. Uzyskane polimery charakteryzują się zaprojektowanymi masami cząsteczkowymi i niską dyspersyjnością (rysunek 15 i tabela 3).

Tab. 3. Stopień konwersji monomeru, masa cząsteczkowa (względna liczbowo średnia masa cząsteczkowa - $M_{n,app}$, absolutna masa cząsteczkowa - $M_{n,abs}$) oraz dyspersyjność $\mathcal{D}$ otrzymanych polimerów liniowych PMMA.

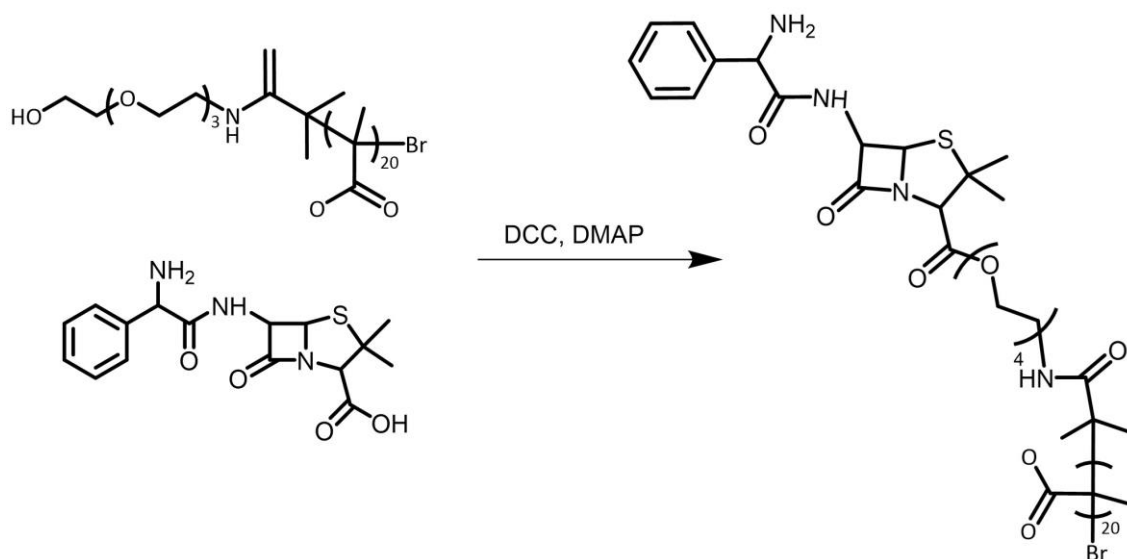
nazwa	konwersja (%) ^a	$M_{n,app}$ ^b	$M_{n,abs}$ ^c	$\mathcal{D}$ ^c
PEG ₄ -PMMA ₂₀₀₀	71	1 780	2 130	1,20
PEG ₄ -PMMA ₇₀₀₀	62	7 320	8 070	1,06

^aokreślono metodą spektroskopii ¹H NMR. ^bokreślono metodą analizy GPC (THF jako eluent) skalibrowanej do wzorców PMMA. ^cokreślono metodą GPC (THF jako eluent) wyposażonego w detektor wielokątowego rozpraszania światła.



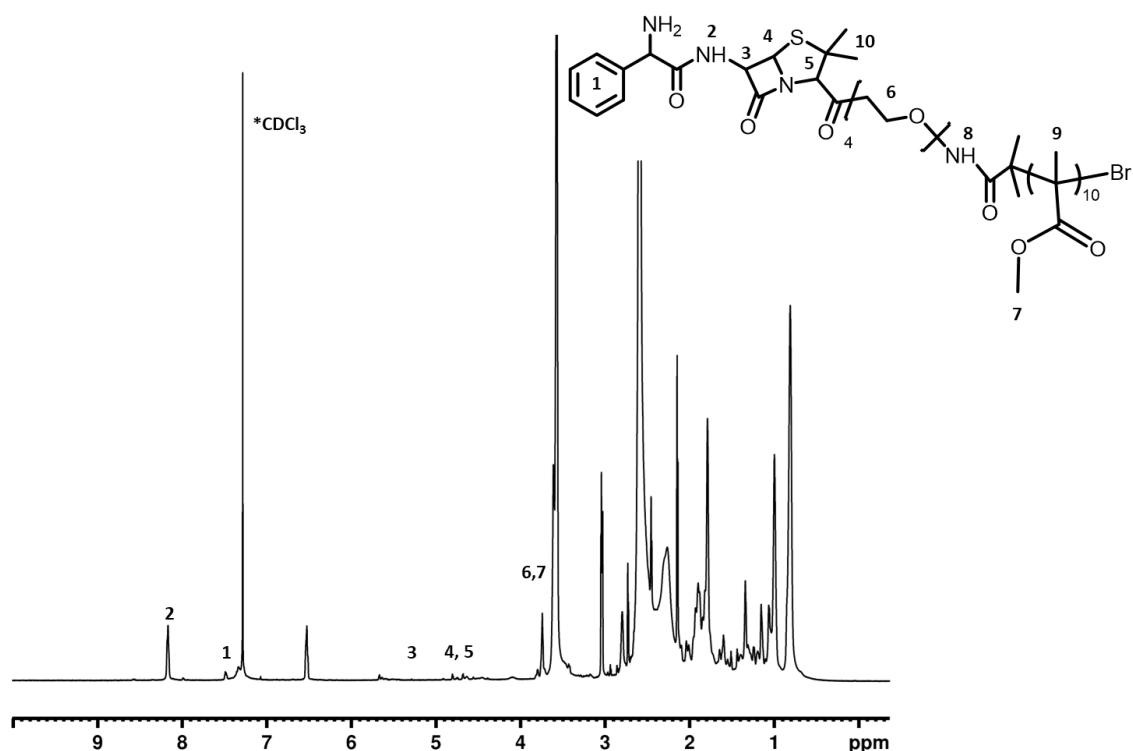
Rys. 15. Rozkład mas cząsteczkowych polimerów PEG₄-PMMA wyznaczony metodą GPC.

W dalszym etapie prac, tak przygotowane polimery poddano modyfikacji ampicyliną w reakcji estryfikacji Steglicha. Mechanizm reakcji przedstawiono na rysunku 16.

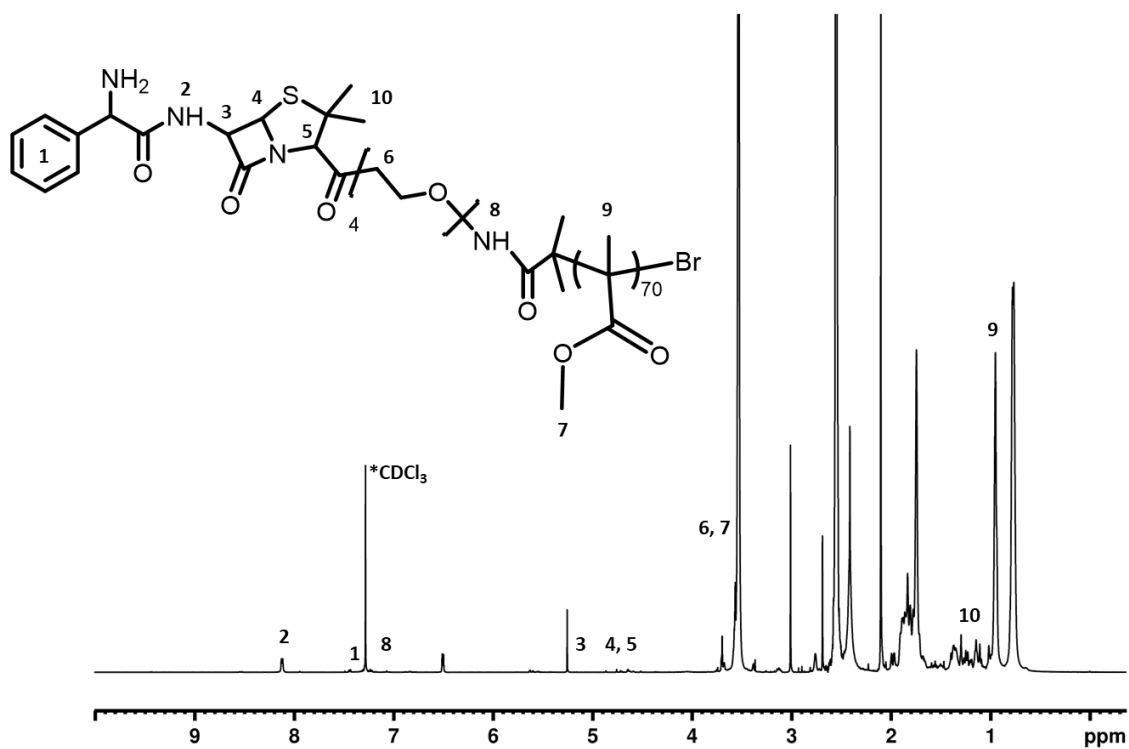


Rys. 16. Schemat reakcji syntezy AMP-PEG₄-PMMA.

Strukturę syntezowanych związków (AMP-PEG₄-PMMA₂₀₀₀ i AMP-PEG₄-PMMA₇₀₀₀) potwierdzono metodą spektroskopii NMR, a otrzymane widma wraz z przypisaniem poszczególnych sygnałów przedstawiono na rysunku 17 oraz rysunku 18.

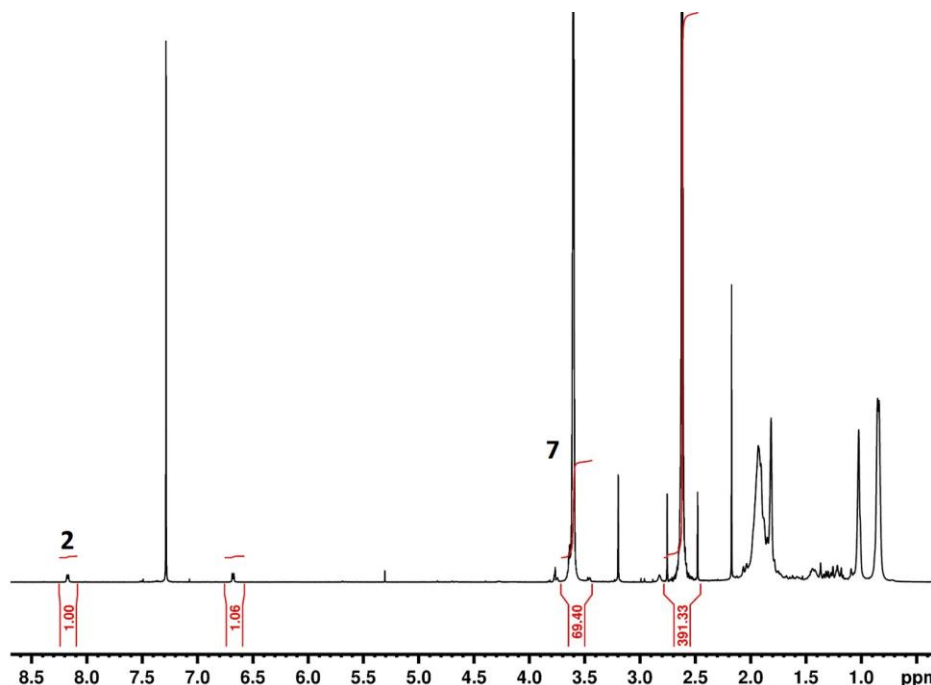


Rys. 17. Widmo ^1H NMR dla AMP-PEG₄-PMMA₂₀₀₀ zmierzone w CDCl_3 w temperaturze 295K.



Rys. 18. Widmo ^1H NMR dla AMP-PEG₄-PMMA₇₀₀₀ zmierzone w CDCl_3 w temperaturze 295K.

Małe intensywności sygnałów pochodzących od protonów grup ampicyliny świadczą o niskiej zawartości tego związku w badanej próbce. Integracja sygnału (2) pochodzącego od protonu grupy NH ampicyliny oraz sygnału (7) pochodzącego od grupy CH₃ metakrylanu metylu (rysunek 19), pozwoliła wyznaczyć zawartości AMP w próbce, która wynosiła ≈32% (ok. 1,4 %mol.).

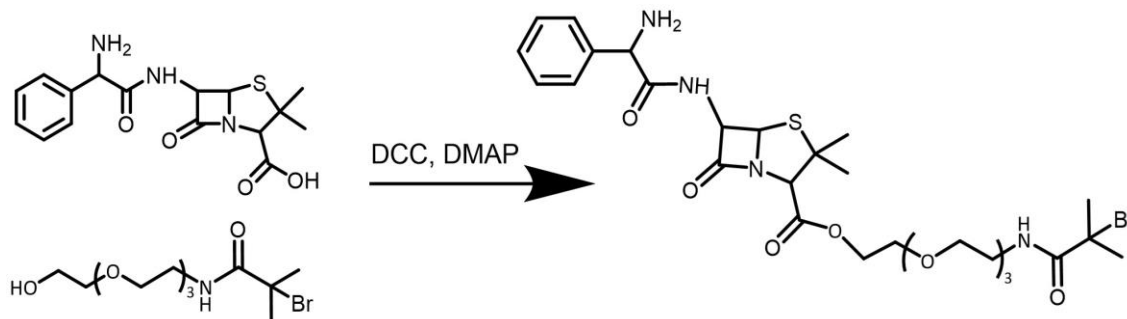


Rys. 19. Widmo ¹H NMR dla PEG₄-PMMA₇₀₀₀ zmierzone w CDCl₃ w temperaturze 295K wraz z integracją sygnałów pochodzących od AMP i PMMA.

Sukces syntezy liniowego PMMA zakończonego grupą hydroksylową oraz jego modyfikacja ampicyliną pozwoliły otrzymać makroinicjator, który w dalszej kolejności zostanie wykorzystany do syntezy polimerów gwiazdzystych. Doniesienia literaturowe wskazują, że niektóre estry acyloksymetylowe ampicyliny są efektywnie stosowane jako proleki w zastosowaniach klinicznych [283]. Rozpad wiązania estrowego prowadzi do odtworzenia ampicyliny, dzięki czemu może ona efektywnie działać [284]. Jak sugerują badania *in vivo* Sakamoto i innych [284] niektóre estry ampicyliny pełnią funkcję promotorów ampicyliny i wykazują 2,5 krotnie wyższe stężenie leku macierzystego w miejscu przeznaczenia w porównaniu z trihydratem ampicyliny. Co więcej, rodzaj estru wpływa na szybkość uwalniania leku, dzięki czemu, można zaprojektować promotor leku w taki sposób, aby uzyskać pożądany efekt antybakteryjny [284]. Oledzka i inni [285] wykazali 60% uwalnianie ampicyliny z rozgałęzionych polimerów na bazie polilaktydu. Ponadto, badania Hasana i innych [286] wykazały, że kowalencyjne włączenie ampicyliny do struktury polimerowej umożliwia uzyskanie nanocząstek charakteryzujących się wysoką efektywnością uwalniania leku. Wyniki te potwierdzają zasadność projektowania struktur takich jak AMP-PEG₄-PMMA do dalszego wykorzystania jako funkcjonalnych ramion w architekturze polimerów gwiazdzystych o kontrolowanym profilu uwalniania substancji aktywnej.

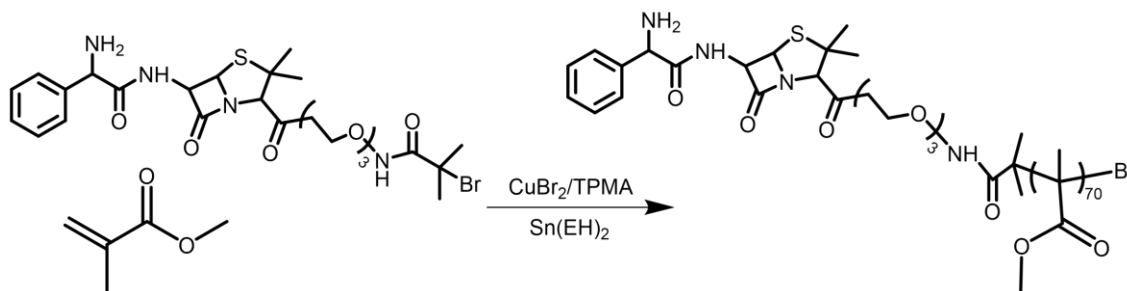
○ Synteza PMMA z inicjatora ampicylinowego (AMP-PEG₄Br)

W tej metodzie, w pierwszej kolejności wykonano modyfikację inicjatora PEG₄Br ampicyliną w reakcji Steglicha (rysunek 20) w celu otrzymania inicjatora polimeryzacji ATRP z wbudowanym antybiotykiem.



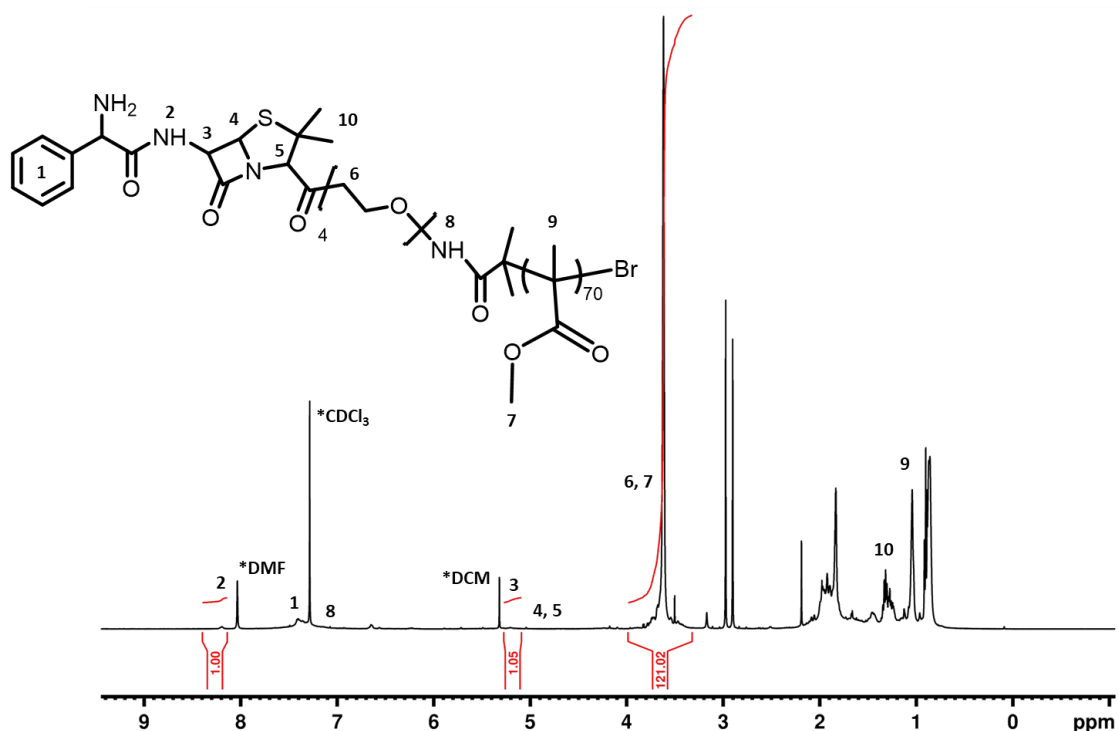
Rys. 20. Schemat reakcji syntezy inicjatora polimeryzacji ATRP: AMP-PEG₄Br.

W dalszej części prac przeprowadzono polimeryzację MMA z zastosowaniem uzyskanego związku AMP-PEG₄Br jako inicjatora polimeryzacji (rysunek 21).



Rys. 21. Schemat reakcji syntezy AMP-PEG₄-PMMA.

Następnie scharakteryzowano otrzymany produkt metodą GPC oraz NMR, aby potwierdzić strukturę otrzymanego związku. Na podstawie przeprowadzonych badań metodą GPC potwierdzono otrzymanie liniowego PMMA zawierającego w strukturze ampicylinę (AMP-PEG₄-PMMA) o zaprojektowanej masie cząsteczkowej ($M_{n,app} = 6900$) i niskiej dyspersyjności ($\mathcal{D} = 1,2$). Strukturę syntezowanego związku potwierdzono za pomocą spektrometrii NMR. Widmo NMR wraz z przypisaniem poszczególnych sygnałów do odpowiednich atomów przedstawiono na rysunku 22. Widoczne na widmie sygnały pochodzące od protonów grup ampicyliny charakteryzują się małą intensywnością, co świadczy o małej zawartości tego związku w badanej próbce. W celu określenia ilości AMP w otrzymanym produkcie wykonano integrację sygnału (2) pochodzącego od protonu grupy NH ampicyliny oraz sygnału (7) pochodzącego od grupy CH₃ metakrylanu metylu (rysunek 22). Na tej podstawie określono zawartość AMP w próbce na poziomie $\approx 55\%$ (ok. 2,3 %mol).



Rys. 22. Widmo ^1H NMR dla AMP-PEG₄-PMMA zmierzone w CDCl_3 w temperaturze 295K wraz z integracją sygnałów pochodzących od AMP i PMMA.

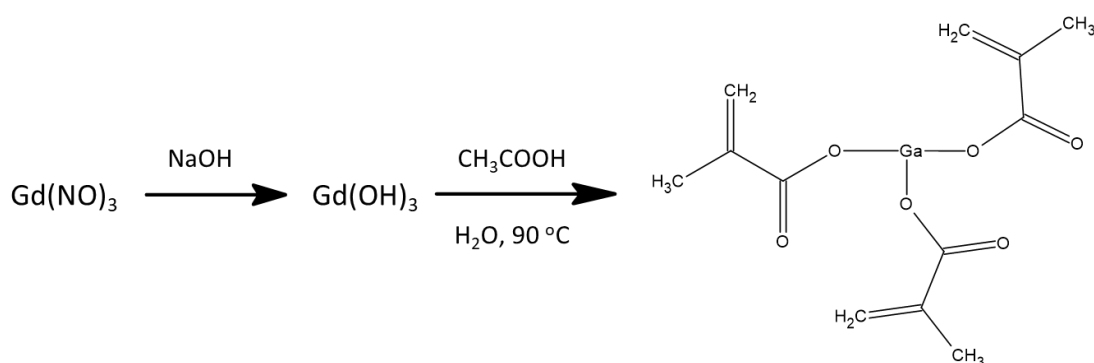
Sukces syntezy liniowego PMMA zakończonego grupą hydroksylową oraz jego modyfikacji ampicyliną pozwoliły na uzyskanie makroinicjatora, który w dalszej kolejności zastosowano w syntezie polimerów gwiaździstych modyfikowanych antybiotykiem.

- Synteza metakrylowej pochodnej gadolinu

Metakrylowa pochodna gadolinu ($\text{Gd}(\text{MAA})_3$) jest związkiem o dużym potencjale aplikacyjnym w inżynierii biomateriałów. Dzięki swojej trójfunkcyjnej strukturze może pełnić rolę monomeru sieciującego, wpływając na właściwości sieci polimerowej. Związek ten może być stosowany bezpośrednio w cementach kostnych, gdzie oprócz funkcji sieciującej będzie pełnić również rolę środka kontrastującego, co jest szczególnie istotne w diagnostyce obrazowej z wykorzystaniem rezonansu magnetycznego (MRI). $\text{Gd}(\text{MAA})_3$ można zastosować w syntezie polimerów gwiaździstych, gdzie pełniłby funkcję zarówno monomeru sieciującego w rdzeniu polimeru gwiaździstego, jak i komponentu kontrastującego. W niniejszym rozdziale przedstawiono metody syntezy metakrylowej pochodnej gadolinu oraz jej potencjalne zastosowania w biomateriałach.

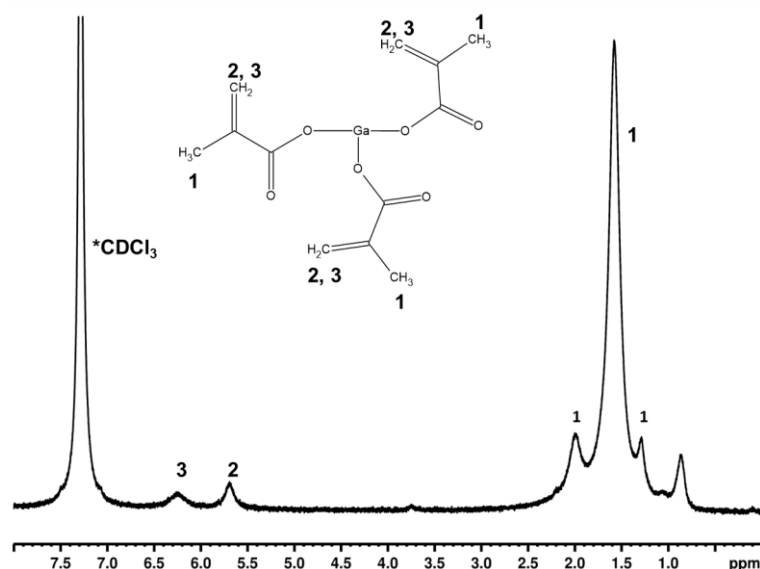
Doniesienia literaturowe wskazują na jedną próbę otrzymania tego związku. W swoich badaniach Wang i inni [287] uzyskali $\text{Gd}(\text{MAA})_3$, stosując następującą metodykę: tlenek gadolinu z kwasem metakrylowym i wodą w stosunku molowym 1:10:20 ogrzewano w temperaturze 90 °C, a następnie oczyszczono przez filtrację na gorąco, zagęszczanie roztworu przez destylację oraz wytrącanie etanolem, uzyskując biały osad o wydajności około 80%, który przemyto

i wysuszono pod próżnią. Jednakże ta metoda syntezy nie była odtwarzalna, dlatego w ramach niniejszej pracy opracowano inny sposób syntezy tego związku. Metakrylową pochodną gadolinu, $Gd(MAA)_3$, otrzymano zgodnie z przedstawionym schematem reakcji pokazanym na rysunku 23. Proces syntezy składał się z dwóch etapów i obejmował otrzymanie wodorotlenku gadolinu, a następnie jego reakcję z kwasem metakrylowym w ściśle kontrolowanej temperaturze ($T = 90\text{ }^{\circ}\text{C}$). Umożliwiło to uzyskanie pożądanego produktu o określonej strukturze chemicznej. Synteza ta charakteryzowała się wydajnością reakcji na poziomie 56,3%, co wskazuje na efektywność zastosowanej metody. Szczegółową analizę składu chemicznego i czystości uzyskanego związku przeprowadzono metodą spektroskopii IR, XRD oraz NMR, co pozwoliło na potwierdzenie jego struktury.

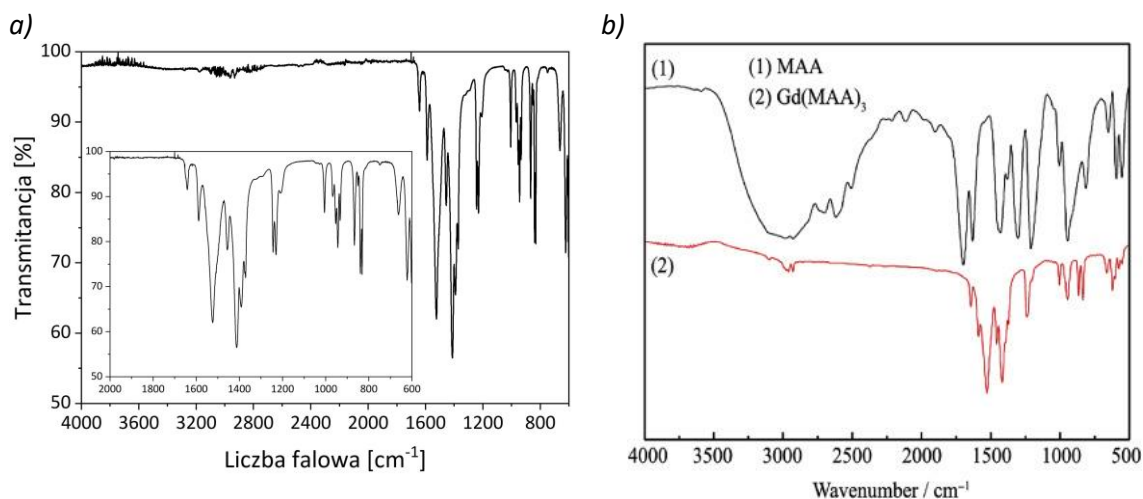


Rys. 23. Schemat reakcji syntezy $Gd(MAA)_3$.

Charakterystykę strukturalną otrzymanego związku, tj. metakrylowej pochodnej gadolinu ($Gd(MAA)_3$), przeprowadzono metodą spektroskopii NMR oraz spektroskopii IR. Widma NMR, przedstawione na rysunku 24, umożliwiły identyfikację sygnałów pochodzących od poszczególnych protonów w cząsteczce. Jednak ze względu na ferromagnetyczne właściwości gadolinu, analiza ilościowa metodą integracji sygnałów okazała się niemożliwa. Pomimo tego, widma pozwoliły na potwierdzenie obecności oczekiwanych grup funkcyjnych. Sygnały dla protonów występujących w grupie metylowej ($-CH_3$) kwasu metakrylowego oznaczone na widmie jako (1) wykryto przy $\delta = 1,3\text{ ppm}$; $\delta = 1,6\text{ ppm}$ i $\delta = 2,0\text{ ppm}$, a dla protonów występujących przy wiązaniu $C=CH_2$ oznaczonych na widmie jako (2) i (3) przy $\delta = 5,6\text{ ppm}$ i $\delta = 6,3\text{ ppm}$. Dodatkowe potwierdzenie budowy związku uzyskano dzięki analizie widm IR (rysunek 25). Dostarczyły one informacji na temat charakterystycznych drgań wiązań chemicznych, umożliwiając identyfikację kluczowych grup funkcyjnych obecnych w strukturze syntezowanego związku.



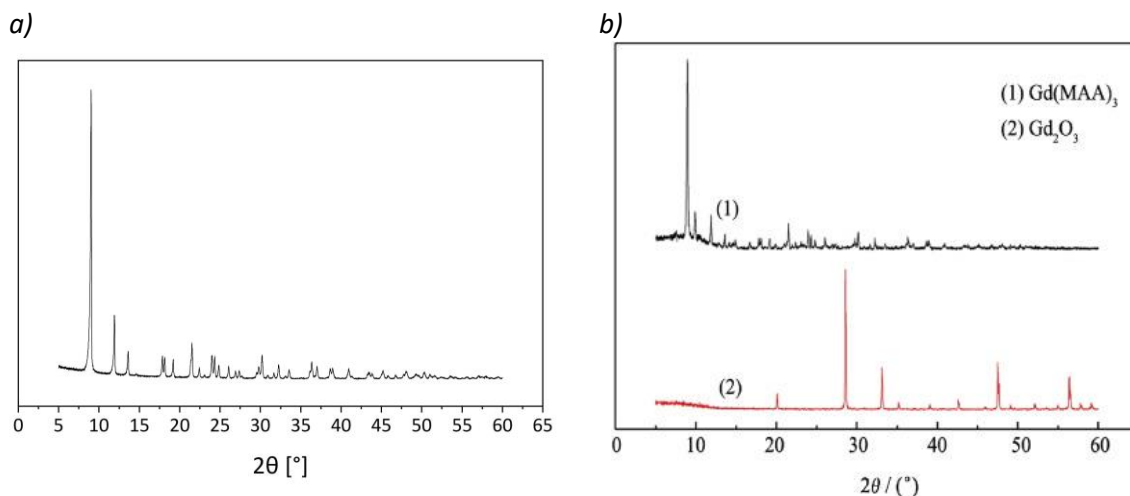
Rys. 24. Widmo ^1H NMR dla $\text{Gd}(\text{MAA})_3$ zmierzone w deuterowanym DMF w temperaturze 295K.



Rys. 25. Widma ATR-FTIR dla $\text{Gd}(\text{MAA})_3$: a) synteza własna b) Wang C. i inni, *Journal of Rare Earths* (2018) 36(3) 298-303 [287].

Analiza widma ATR-FTIR pozwoliła zidentyfikować występowanie charakterystycznych grup funkcyjnych $\text{Gd}(\text{MAA})_3$ na podstawie obecności na widmie IR kilku kluczowych pasm absorpcyjnych. Pasma absorpcyjne występujące na widmie metakrylanu metylu w zakresie liczb falowych 1600–1750 cm^{-1} , które można przypisać drganiom rozciągającym grup karbonylowych ($\text{C}=\text{O}$) zanikają na widmie syntezowanego związku $\text{Gd}(\text{MMA})_3$. Pojawiają się na nim zaś nowe pasma absorpcyjne w zakresach liczb falowych 1520 – 1580 cm^{-1} i 1395 – 1430 cm^{-1} , które można przypisać drganiom rozciągającym jonu karboksylanowego. Oznacza to, że jon gadolinu związku $\text{Gd}(\text{OH})_3$ i grupy karboksylowe kwasu metakrylowego reagują ze sobą i wzajemnie się koordynują. W przedziale liczb falowych 1400–1600 cm^{-1} na widmie widoczne są pasma odpowiadające drganiom deformacyjnym grup metylowych ($-\text{CH}_3$). Natomiast pasma absorpcyjne zlokalizowane poniżej liczb falowych 1000 cm^{-1} można przypisać drganiom wiązań metal–tlen ($\text{M}-\text{O}$), co również sugeruje skuteczną koordynację gadolinu w strukturze kompleksu. Otrzymane wyniki

potwierdzają oczekiwaną budowę związku i wskazują na jego zgodność ze strukturą metakrylowej pochodnej gadolinu. Analogiczny wynik uzyskali autorzy wcześniej wspomnianej pracy [273], co pokazano na rysunku 25b.



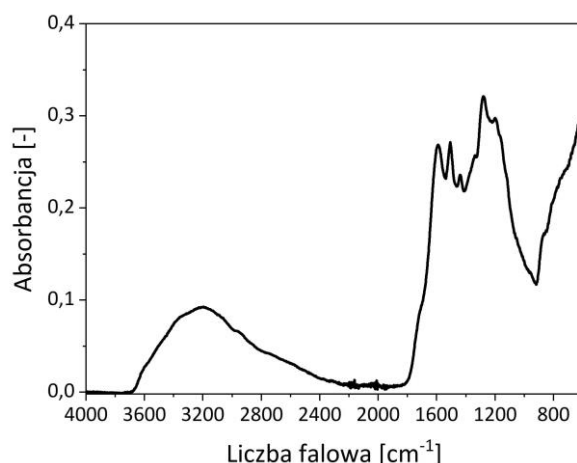
Rys. 26. Widma XRD dla $Gd(MAA)_3$: a) synteza własna b) Wang C. i inni, *Journal of Rare Earths* (2018) 36(3) 298-303 [287].

Analiza wyników badań przeprowadzonych wyżej wymienionymi dwoma technikami, tj. spektroskopią NMR i IR, pozwoliła na ocenę struktury otrzymanego związku. Aby w pełni potwierdzić otrzymanie zaprojektowanej struktury syntezowanego związku wykonano również pomiar metodą dyfrakcji rentgenowskiej (XRD). Otrzymane widmo pokazano na rysunku 26a. Intensywność pików dyfrakcyjnych przy kącie $8,9^\circ$ w $Gd(MAA)_3$ wskazuje, że produkt jest wysoce krystaliczny. Dla porównania na rysunku 26b pokazano dyfraktogram uzyskany przez autorów publikacji [287].

2.1.2. Synteza polidopaminy

Polidopamina (PDA) jest polimerem, który można otrzymać przez utlenianie dopaminy. Polimer ten składa się z jednostek indolu i dopaminy na różnych stopniach utlenienia oraz w mniejszym stopniu z piroli. Jest mieszaniną oligomerów różniących się długością łańcucha oraz składem różnych jednostek monomeru. Struktura polidopaminy silnie zależy od sposobu przygotowania, jak również od tego czy tworzy powłokę na powierzchni czy cząstki/agregaty w zawiesinach. Dlatego należy zachować ostrożność porównując wyniki analityczne polidopaminy uzyskane z różnych próbek [288].

Następnie otrzymany produkt reakcji, polidopaminę, poddano analizie metodą spektroskopii ATR-FTIR, a otrzymane widmo przedstawiono na rysunku 27.



Rys. 27. Widmo ATR-FTIR polidopaminy.

Analizując otrzymane widmo ATR-FTIR można wyróżnić kilka kluczowych pasm absorpcji odpowiadających określonym ugrupowaniom chemicznym obecnym w PDA. W zakresie liczb falowych $3000\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ obserwuje się szerokie pasmo o znacznej absorpcji, co wskazuje na obecność ugrupowań hydroksylowych ($-\text{OH}$) oraz aminowych ($-\text{NH}$) [289,290]. Z kolei, intensywne pasmo absorpcji występujące przy liczbie falowej $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ można przypisać drganiom rozciągającym wiązań nienasyconych $\text{C}=\text{C}$ pierścieni aromatycznych pochodzących z reszt katecholowych oraz ugrupowań indolowych w utlenionej strukturze PDA [289,290]. Ponadto, przy liczbie falowej $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ można zaobserwować pasmo związane z drganiami grupy amidowej $-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{H})-$ ($\text{C}=\text{O}$, $\text{N}-\text{H}$), która jest charakterystyczna dla PDA powstającego w wyniku utleniania dopaminy i jej dalszej polimeryzacji. Pasma absorpcyjne obecne w zakresie liczb falowych $1300\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ wskazują na drgania rozciągające wiązań $\text{C}-\text{N}$ oraz deformacyjne $\text{C}-\text{H}$ w pierścieniach aromatycznych. Obecność tych pasm potwierdza występowanie w strukturze polimeru ugrupowań aminowych i amidowych. Co więcej, w obszarze liczb falowych $1000\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$ pojawia się kilka pasm absorpcyjnych, które są związane z drganiami rozciągającymi wiązania $\text{C}-\text{O}$ w ugrupowaniach fenolowych oraz eterowych, co wskazuje na obecność reszt katecholowych w strukturze PDA. Obecność tych ugrupowań w strukturze PDA jest kluczowa dla zdolności adhezyjnych oraz oddziaływań polidopaminy z innymi materiałami.

Analiza widma ATR-FTIR wykazała, że otrzymana w ramach pracy polidopamina zawiera charakterystyczne dla tego związku wiązania i grupy funkcyjne. Obecność grup hydroksylowych, aminowych, amidowych oraz aromatycznych potwierdza prawidłowy przebieg syntezy PDA. Uzyskane wyniki są zgodne z poprzednimi badaniami i potwierdzają skuteczność metody otrzymywania polidopaminy stosowanej w niniejszej pracy.

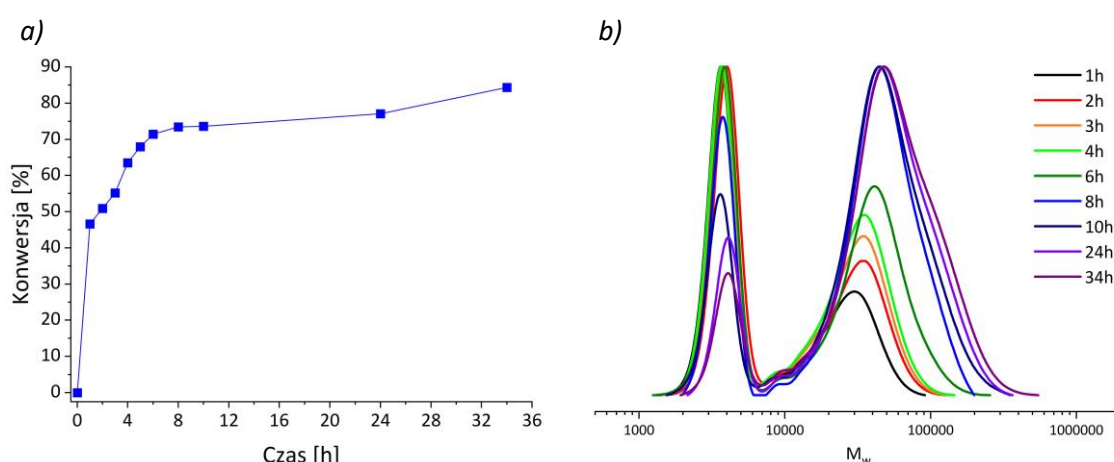
2.1.3. Synteza polimerów gwiazdzistych

Polimery gwiazdziste to wysoko rozgałęzione makrocząsteczki o zwiększonej funkcjonalności powierzchniowej, co otwiera możliwość ich zastosowania w biomateriałach.

Dzięki unikalnej architekturze znajdują one zastosowanie jako nośniki leków [220], składniki cementów kostnych [30] czy hydrożele [220]. Ich struktura pozwala na precyzyjne dostosowanie właściwości mechanicznych i biologicznych, takich jak biogodność, kinetyka uwalniania substancji czynnych oraz oddziaływania z otaczającymi tkankami. W niniejszym rozdziale omówiono syntezę polimerów gwiaździstych na bazie PEG₄₅MEM oraz PMMA metodą ATRP (tradycyjną oraz ARGET) oraz ich potencjalne zastosowania w inżynierii biomateriałów.

- Synteza podstawowego polimeru gwiaździstego (STR)

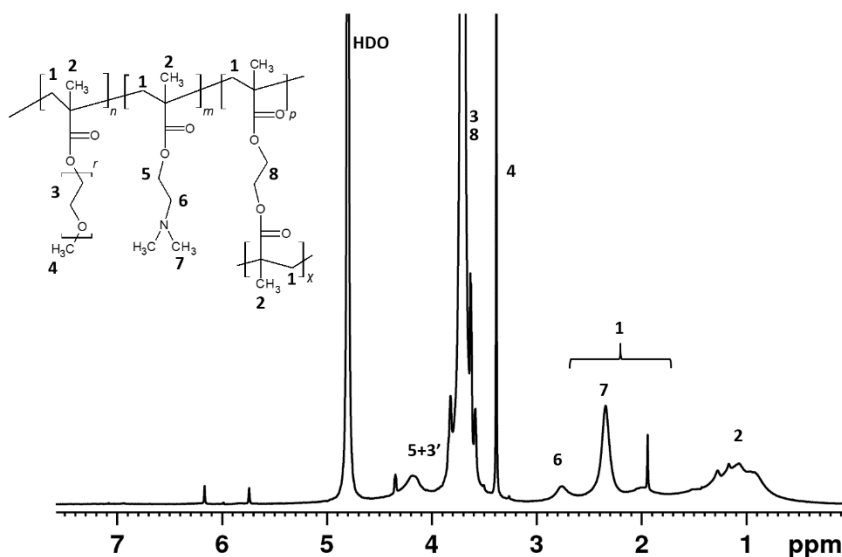
Podstawowy polimer gwiaździsty STR syntetyzowano metodą *arm-first* z PEG₄₅MEM jako ramieniem, EGDM jako środkiem sieciującym i DMAEMA jako monomerem funkcyjnym. Postęp reakcji monitorowano metodą spektroskopii ¹H NMR i chromatografii żelowej GPC. ¹H NMR zastosowano do pomiaru konwersji wiązań podwójnych metakrylanów, podczas gdy metodą GPC śledzono wzrost masy cząsteczkowej polimeru w czasie prowadzenia syntezy. Największy wzrost konwersji monomerów obserwowano w ciągu pierwszej godziny polimeryzacji. W ciągu następnych ośmiu godzin obserwowano dalszy znaczący wzrost stopnia przereagowania, a po tym czasie nastąpiło spowolnienie reakcji, z niewielkim przyrostem konwersji. Masa cząsteczkowa polimerów gwiaździstych systematycznie wzrastała w ciągu pierwszych 12 godzin prowadzenia reakcji polimeryzacji, osiągając przy tym konwersję na poziomie 84%, natomiast wydajność produktu rosta aż do 34. godziny syntezy (rysunek 28a). Obecność struktur gwiaździstych potwierdzono już we wczesnych etapach reakcji, o czym świadczy wyraźne przesunięcie piku elucji w chromatografii GPC w kierunku wyższych mas cząsteczkowych, obserwowane na wykresie obrazującym kinetykę reakcji syntezy (rysunek 28b). Zmiana ta jednoznacznie wskazuje na postępujący wzrost struktury gwiaździstej od początku procesu polimeryzacji.



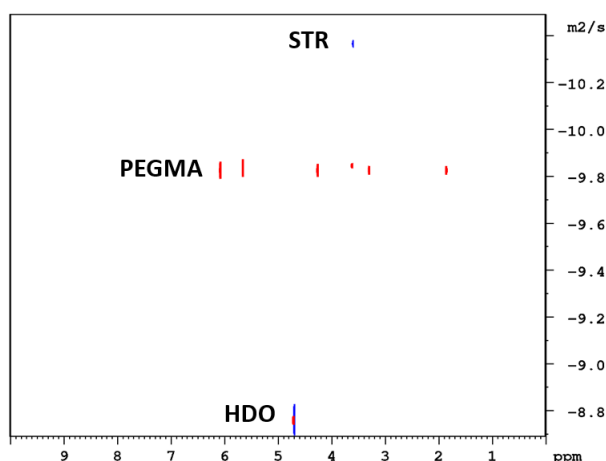
Rys. 28. Kinetyka polimeryzacji polimeru gwiaździstego STR przedstawiona jako zależność a) stopnia konwersji wiązań podwójnych C=C wyznaczonego metodą ¹H NMR oraz b) masy cząsteczkowej oznaczonej metodą GPC od czasu prowadzenia reakcji polimeryzacji.

W wyniku przeprowadzonej syntezy otrzymano polimer gwiaździsty STR o liczbowo średniej masie cząsteczkowej $M_{n,app} = 38\ 200$ i niskiej dyspersyjności $\bar{D} = 1,24$. Dodatkowo metodą ^1H NMR, prowadząc badanie z zastosowaniem D_2O ($T = 22\ ^\circ\text{C}$), potwierdzono strukturę otrzymanej STR. Widmo ^1H NMR polimeru gwiaździstego (rysunek 29) wykazuje obecność sygnałów charakterystycznych dla protonów należących do jednostek powtarzalnych monomerów DMAEMA i EGDM. W przypadku łańcucha bocznego jednostek DMAEMA wykryto sygnały dla protonów metylenowych $-\text{CH}_2-\text{OC}(\text{O})-$ przy $\delta = 4,2\ \text{ppm}$ (5) oraz $-\text{NCH}_2-$ przy $\delta = 2,8\ \text{ppm}$ (6) i metylowych $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ przy $\delta = 2,35\ \text{ppm}$ (7). Protony metylenowe powtarzających się jednostek EGDM zaobserwowano przy $\delta = 3,7\ \text{ppm}$ (3), podczas gdy sygnał singletowy przypisany $\text{CH}_3-\text{O}-$ pojawił się przy $\delta = 3,39\ \text{ppm}$ (4). Sygnał obserwowany przy $\delta = 0,4 - 1,7\ \text{ppm}$ (2) przypisywany jest protonom metylowym szkieletu polimeru gwiaździstego, a sygnał rezonansowy przy $\delta = 1,7 - 2,4\ \text{ppm}$ (1) częściowo pokrywający się z sygnałem (7), przypisywany jest protonom metylenowym szkieletu. Ponadto istnieją grupy metylenowe (8) z EGDM, których sygnały na widmie pokrywają się z sygnałami protonów EGDM (3), a także sygnał (3') ugrupowania $-\text{CH}_2-\text{OC}(\text{O})-$ EGDM pokrywający się z sygnałem (5) przy $\delta = 4,2\ \text{ppm}$.

Dodatkowo w celu potwierdzenia otrzymania polimeru o architekturze gwiazdy, zarejestrowano widma DOSY NMR czystego $\text{PEG}_{45}\text{MEM}$ i wodnych roztworów STR (rysunek 30). Wyraźnie zauważalne jest zmniejszenie wartości współczynnika dyfuzji sygnału (3) w $\text{PEG}_{45}\text{MEM}$ z $D = 1,36 \cdot 10^{-10}\ \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ do $D = 4,05 \cdot 10^{-11}\ \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ w produkcie reakcji, które wzrasta wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej, co potwierdza skuteczność procesu syntezy polimeru gwiaździstego.



Rys. 29. Widmo ^1H NMR dla STR zmierzone w D_2O w temperaturze 295K.



Rys. 30. Widma ^1H DOSY NMR STR (niebieski) i $\text{PEG}_{45}\text{MEM}$ (czerwony) zmierzone w D_2O w temperaturze 295K.

Otrzymany polimer gwiaździsty STR zastosowano w dalszych badaniach jako środek kompleksujący eugenol, nanocząstki srebra czy antybiotyki, tj. ampicylinę oraz ryfampicynę. Ponadto, poddano ją modyfikacji otrzymanymi w ramach pracy monomerami EU-MAA oraz $\text{Gd}(\text{MAA})_3$, które wbudowują się kowalencyjnie w jej strukturę, co przedstawiono w dalszej części pracy.

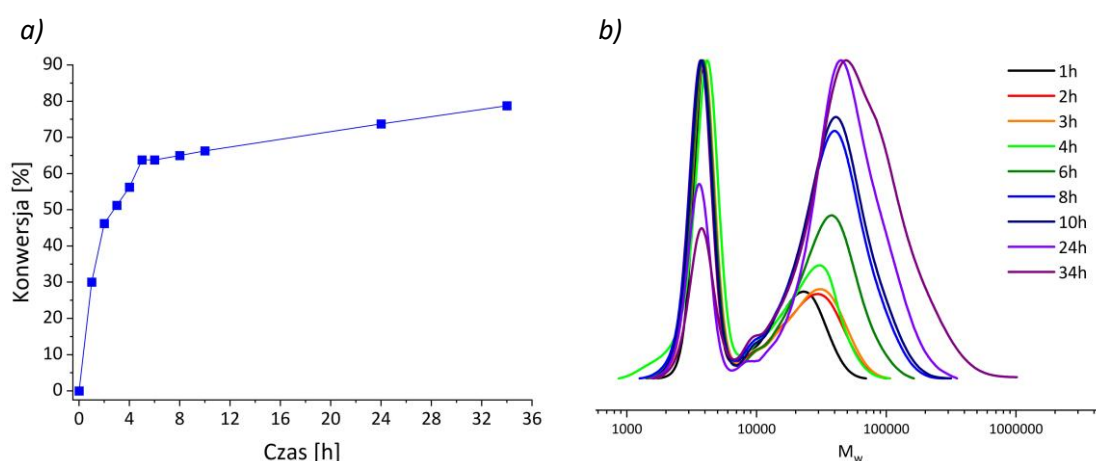
- Synteza modyfikowanych polimerów gwiaździstych
 - Polimery gwiaździste modyfikowane EU-MAA (STR-D-EU-MAA i STR-EU-MAA)

Jak przedstawiono w części literaturowej, eugenol negatywnie wpływa na reakcję polimeryzacji powodując jej opóźnienie, co związane jest z jego strukturą. Jest on pochodną fenolu, a związki o takiej budowie działają jak inhibitory lub retardery polimeryzacji rodnikowej. Aby ograniczyć ten negatywny wpływ naturalnego środka leczniczego na proces polimeryzacji podczas utwardzania cementu kostnego postanowiono związać eugenol kowalencyjnie w strukturze polimeru gwiaździstego. Stąd zaprojektowano pochodne eugenolu zawierające grupy funkcyjne reaktywne w procesie polimeryzacji, opisane w poprzednich rozdziałach. Motywacją do podjęcia niniejszych badań był brak doniesień literaturowych na temat wbudowania eugenolu w polimer gwiaździsty i zbadania jego właściwości antybakteryjnych.

Stosując pochodną eugenolu otrzymaną w reakcji estryfikacji Steglicha, według metodyki przedstawionej w rozdziale 2.1.1. *Synteza modyfikowanych monomerów*, w podpunkcie *Pochodne eugenolu*, zaplanowano kowalencyjne związanie eugenolu w strukturze polimeru gwiaździstego. Zastosowano dwa podejścia do syntezy modyfikowanego polimeru gwiaździstego. W pierwszym przypadku monomer EU-MAA wprowadzono jako dodatkowy składnik kompozycji stosowanej do syntezy polimeru otrzymując polimer gwiaździsty STR-D-EU-MAA. W drugim natomiast monomer EU-MAA zastąpił monomer DMAEMA w składzie mieszaniny reakcyjnej, co pozwoliło

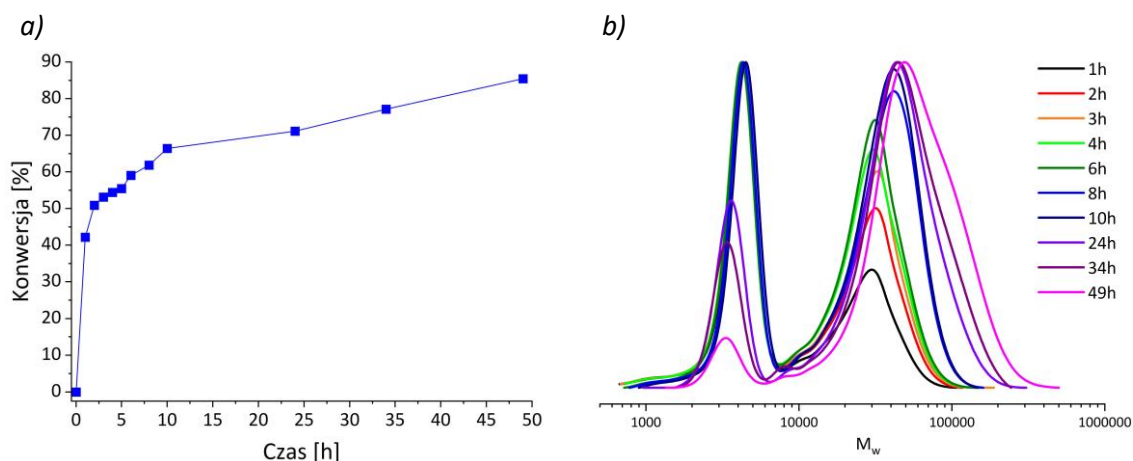
otrzymać polimer gwiaździsty STR–EU-MAA. Polimer gwiaździsty z EU-MAA przygotowano zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 1.3.1.3. „Synteza polimerów gwiaździstych”.

Dodanie EU-MAA do kompozycji reakcyjnej wpłynęło na spowolnienie reakcji polimeryzacji zmniejszając szybkość konwersji wiązań podwójnych C=C (rysunek 31a). Jak wykazały badania przeprowadzone metodą ^1H NMR, konwersja wiązań podwójnych C=C dla STR–D–EU-MAA wyniosła 79%, ale konwersja monomeru EU-MAA analizowana na GC wynosiła tylko 72%, podczas gdy konwersja EGDM i DMAEMA wynosiła odpowiednio 96% i 78%. Niska wydajność z jaką otrzymano modyfikowany polimer gwiaździsty wymagała wprowadzenia zmian w procesie syntezy. Zastosowano strategię dodawania środka sieciującego porcjami. Takie podejście do syntezy polimeru gwiaździstego metodą ATRP opisał Gao z współpracownikami [267]. Aby zwiększyć wydajność reakcji dodatkowe porcje [EGDM]/[EBiB] wprowadzono po 10 i 24 godzinach prowadzenia syntezy, co wpłynęło na znaczny wzrost konwersji PEG₄₅MEM i wzrost stężenia polimerów gwiaździstych (rysunek 31a i rysunek 31b). Niniejsze badania wskazują, że makromonomer PEG₄₅MEM może reagować zarówno z rdzeniem, jak i z dodanym EGDM i EBiB, tworząc pierwotny makroinicjator.



Rys. 31. Kinetyka polimeryzacji polimeru gwiaździstego STR–D–EU-MAA przedstawiona jako zależność a) stopnia konwersji wiązań podwójnych C=C wyznaczonego metodą ^1H NMR oraz b) masy cząsteczkowej oznaczonej metodą GPC od czasu prowadzenia reakcji polimeryzacji.

Tą samą procedurę zastosowano do syntezy drugiego modyfikowanego polimeru gwiaździstego STR–EU-MAA, stosując trzy dodatkowe porcje [EGDM]/[EBiB] dodane odpowiednio po 10, 24 i 34 godzinach. W trakcie prowadzenia syntezy zdecydowano się dodać jeszcze jedną dawkę po 34 godzinach, ponieważ nie zaobserwowano tworzenia się nowej grupy polimerów gwiaździstych o wyższych masach cząsteczkowych. Konwersja wiązań podwójnych C=C dla STR–EU-MAA wyniosła 86% (rysunek 32a), przy czym konwersja monomeru EU-MAA analizowana metodą GC wyniosła 76%, podczas gdy konwersja EGDM wynosiła 96%.



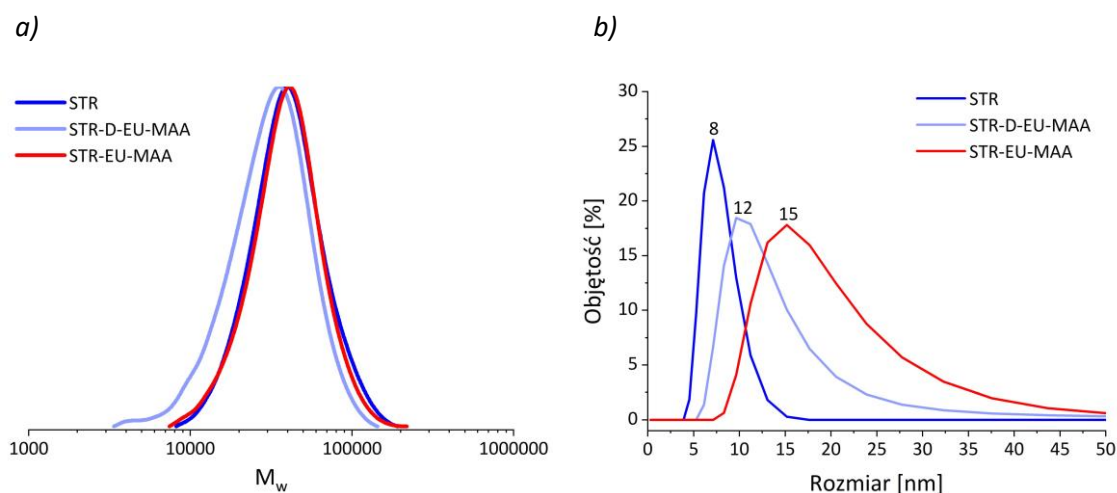
Rys. 32. Kinetyka polimeryzacji polimeru gwiazdzistego STR-EU-MAA przedstawiona jako zależność a) stopnia konwersji wiązań podwójnych C=C wyznaczonego metodą ^1H NMR oraz b) masy cząsteczkowej oznaczonej metodą GPC od czasu prowadzenia reakcji polimeryzacji.

Pomimo różnic w szybkości polimeryzacji otrzymano polimery gwiazdziste o podobnych masach cząsteczkowych (rysunek 33a, tabela 4), tj. $M_{n,app} = 26\,700$ dla STR-D-EU-MAA i $M_{n,app} = 39\,100$ dla STR-EU-MAA oraz niskiej dyspersyjności, tj. odpowiednio $\mathcal{D} = 1,27$ i $\mathcal{D} = 1,28$.

Tab. 4. Stopień konwersji monomeru, masa cząsteczkowa (względna liczbowo średnia masa cząsteczkowa - $M_{n,app}$, absolutna masa cząsteczkowa - $M_{n,abs}$), dyspersyjność - $\mathcal{D}$, liczba ramion i rozmiar otrzymanych polimerów gwiazdzistych (podstawowego i modyfikowanych monomerem EU-MAA).

nazwa	konwersja (%) ^a	$M_{n,app}$ ^a	$M_{n,abs}$ ^c	$\mathcal{D}$ ^b	liczba ramion ^d	rozmiar (d.nm) ^e
STR	84	38 200	120 000	1,24	58	8
STR-D-EU-MAA	79	26 700	287 000	1,27	138	12
STR-EU-MAA	86	39 100	152 000	1,28	73	15

^aokreślono metodą spektroskopii ^1H NMR. ^bokreślono metodą analizy GPC (THF jako eluent) skalibrowanej do wzorców PMMA. ^cokreślono metodą GPC (THF jako eluent) wyposażonego w detektor wielokątowego rozpraszania światła. ^dLiczbę ramion obliczono zgodnie z metodyką przedstawioną przez Cho i innych [291]. ^eokreślono za pomocą dynamicznego rozpraszania światła (DLS).

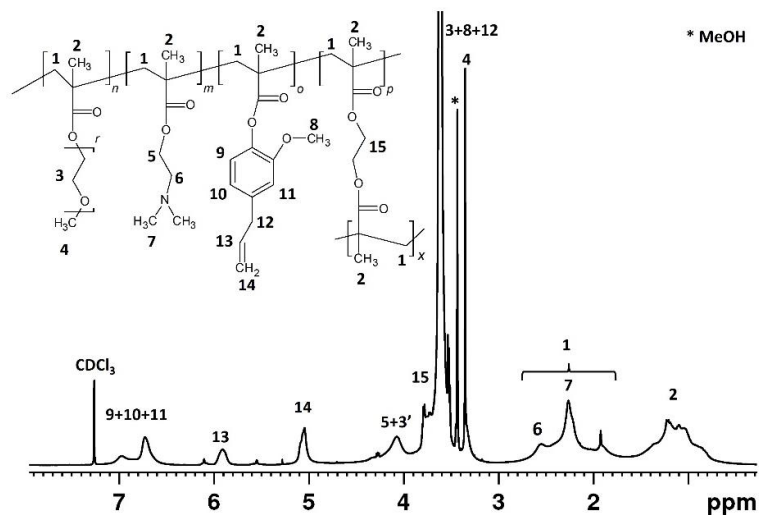


Rys. 33. Charakterystyka otrzymanych polimerów gwiazdzistych: a) masa cząsteczkowa oznaczona metodą GPC i b) średnica cząsteczek polimerów gwiazdzistych oznaczona metodą DLS.

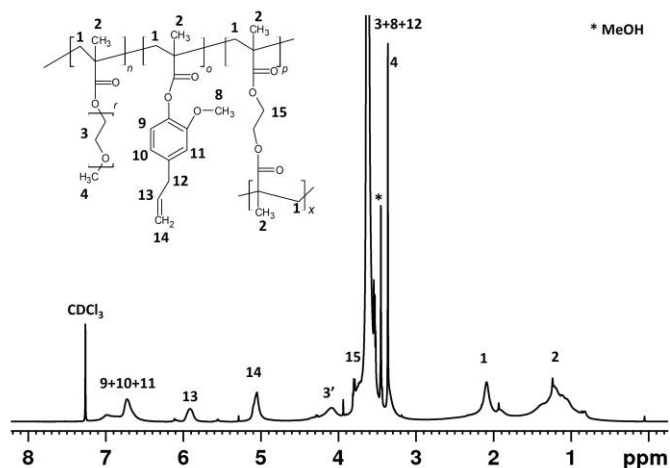
Otrzymany polimer gwiazdzisty STR–D–EU-MAA charakteryzował się mniejszą masą cząsteczkową niż niemodyfikowany polimer gwiazdzisty STR, natomiast rozmiar jego cząsteczek był większy niż cząsteczek polimeru gwiazdzistego STR. Włączenie monomeru EU-MAA w strukturę polimeru gwiazdzistego zmieniło rozmiar jego cząsteczek, co prawdopodobnie jest związane ze zwiększoną ilością monofunkcyjnego monomeru wydłużającego ramiona i zwiększającego hydrofobowość rdzenia polimeru gwiazdzistego, powodując zmiany jego wielkości w wodzie. Inną możliwością jest częściowe usieciowanie EU-MAA w cząsteczce polimeru gwiazdzistego ze względu na obecność wiązania allilowego w strukturze eugenolu. Aktywność tego wiązania w procesie polimeryzacji podczas utwardzania klejów na bazie metakrylanu eugenolu (EgMA) wykazali Rojo i współpracownicy [281]. Przeprowadzone badania wskazują, że podczas wolnorodnikowej polimeryzacji monomeru eugenolu, początkowo reagują akrylowe wiązania podwójne, jednak w miarę przebiegu reakcji polimeryzacji, również allilowe wiązania podwójne występujące w strukturze eugenolu zaczynają reagować, przyczyniając się do tworzenia struktur rozgałęzionych i do sieciowania.

Na podstawie badań przeprowadzonych metodą spektroskopii ^1H NMR potwierdzono struktury otrzymanych polimerów gwiazdzistych. Uzyskane widma wraz ze strukturami i przyporządkowaniem sygnałów pochodzących od odpowiednich grup protonów przedstawiono na rysunku 34 i rysunku 35. Na widmach polimerów gwiazdzistych modyfikowanych eugenolem zarejestrowanych w roztworze deuterowanej wody (D_2O) sygnały jednostek monomeru eugenolu, jak również rdzenia polimeru gwiazdzistego, nie są widoczne. Wynika to z zwiększenia hydrofobowości rdzenia polimeru gwiazdzistego ze względu na wprowadzenie do jego struktury hydrofobowych jednostek EU-MAA. Obserwowane są tylko sygnały od hydrofilowych ramion $\text{PEG}_{45}\text{MEM}$. Obserwacja szerszych sygnałów lub ich zanik związany jest z faktem, że protony rdzenia polimeru gwiazdzistego mają ograniczoną ruchliwość w wodzie i uciekają przed detekcją w NMR w stanie ciekłym. Podobny efekt obserwuje się w wodnych roztworach nanocząstek typu rdzeń-powłoka, a także w przypadku termoczułych polimerów [292]. Z tego względu analizę chemiczną uzyskanych polimerów gwiazdzistych prowadzono w chloroformie CDCl_3 . Widma ^1H NMR STR–D–EU-MAA oraz STR–EU-MAA zmierzone w chloroformie CDCl_3 wykazują charakterystyczne sygnały dla protonów należących do jednostek powtarzalnych eugenolu, monomeru EGDM i ramienia $\text{PEG}_{45}\text{MEM}$. Sygnały dla aromatycznych łańcuchów bocznych (9, 10, 1) eugenolu występują przy $\delta = 7,15 - 6,35$ ppm. Natomiast protony grupy winylowej (13, 14) eugenolu dają sygnały odpowiednio przy $\delta = 5,9$ ppm i $\delta = 5,1$ ppm. Protony metylenowe powtarzających się jednostek $\text{PEG}_{45}\text{MEM}$ zaobserwowano przy $\delta = 3,7$ ppm (3), podczas gdy sygnał singletowy przypisany $\text{CH}_3\text{-O-}$ pojawił się przy $\delta = 3,39$ ppm (4). Rezonans (3') od $-\text{CH}_2\text{-OC(O)-}$ EGDM pojawia się przy $\delta = 4,2$ ppm. Sygnał obserwowany przy $\delta = 0,4 - 1,7$ ppm (2) przypisuje się protonom metylowym szkieletu polimeru gwiazdzistego, a sygnał rezonansowy przy $\delta = 1,7 - 2,4$ ppm (1) przypisuje się protonom metylenowym szkieletu. Ponadto na widmie występują sygnały od grupy metoksylovej (8) i metylenowej (12) eugenolu wraz z grupami

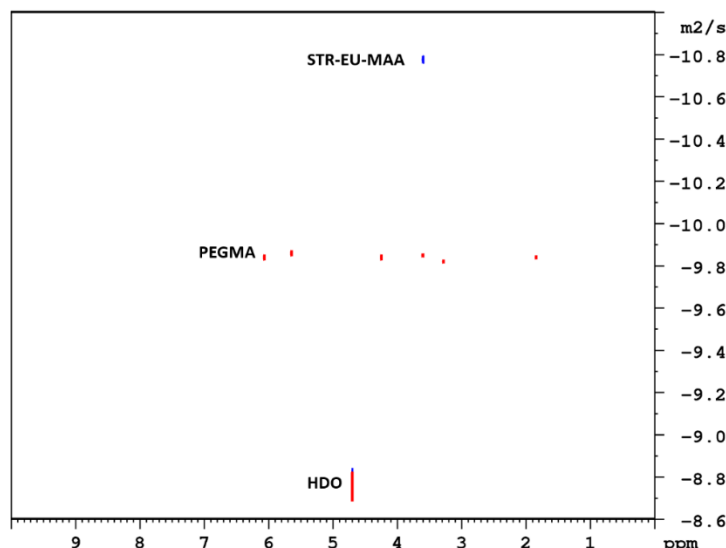
metylenowymi (15) z pików EGDM, które pokrywają się z protonami PEG₄₅MEM (3). Ponadto, na widmie zarejestrowanym dla STR-D-EU-MAA obserwowane są sygnały od jednostek DMAEMA (5, 6, 7). W celu potwierdzenia sukcesu syntezy polimeru gwiazdzistego zarejestrowano dodatkowo widma DOSY czystych wodnych roztworów PEG₄₅MEM i STR-EU-MAA (rysunek 36).



Rys. 34. Widmo ^1H NMR dla STR-D-EU-MAA zmierzone w CDCl_3 w temperaturze 295K.



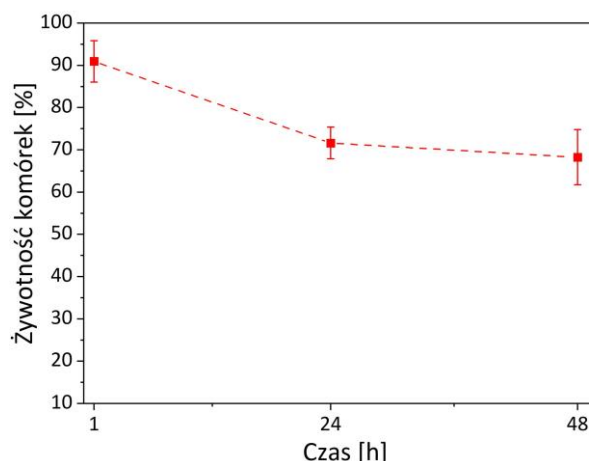
Rys. 35. Widmo ^1H NMR dla STR-EU-MAA zmierzone w CDCl_3 w temperaturze 295K.



Rys. 36. Widma ^1H DOSY NMR STR–EU-MAA (niebieski) i PEG₄₅MEM (czerwony) zmierzone w D₂O w temperaturze 295K.

Na podstawie widm DOSY NMR uzyskanych dla polimeru gwiaździstego STR–EU-MAA (rysunek 36) stwierdzono wyraźne obniżenie wartości współczynnika dyfuzji sygnału 3 pochodzącego od segmentu PEG₄₅MEM – z $D = 1,36 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ do $D = 1,50 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, — co jednoznacznie potwierdza skuteczne przeprowadzenie procesu syntezy polimeru gwiaździstego. Dodatkowo, wartość współczynnika dyfuzji określona dla STR–EU-MAA jest niższa niż w przypadku podstawowego polimeru gwiaździstego STR, co wskazuje na większy rozmiar cząsteczek, a w konsekwencji wyższą masę cząsteczkową (M_n) modyfikowanej struktury w porównaniu do niemodyfikowanego polimeru gwiaździstego.

Po potwierdzeniu sukcesu przeprowadzonej syntezy polimeru gwiaździstego modyfikowanego monomerem na bazie eugenolu STR–EU-MAA przeprowadzono badania jego właściwości antybakteryjnych. Na rysunku 37 pokazano wykres zależności żywotności komórek kultur bakteryjnych *Escherichia coli* (*E. coli*) w roztworze zawierającym polimer gwiaździsty STR–EU-MAA od czasu. Badanie prowadzono przez okres 48 godzin.



Rys. 37. Wpływ polimeru gwiaździstego STR-EU-MAA na żywotność komórek bakteryjnych *E. coli* ($n = 3$).

STR-EU-MAA wykazuje aktywność przeciwbakteryjną, jednak nie jest ona silna, a żywotność komórek po 48h wynosi $68,3 \pm 6,5\%$. Można to wytłumaczyć modyfikacją grupy -OH, której przypisuje się antybakteryjne właściwości eugenolu [272]. Ograniczone właściwości antybakteryjne w pierwszych 48h mogą wynikać również ze słabej hydrolizy wiązania estrowego, jednakże obserwuje się ciągły spadek żywotności komórek *E. coli* w czasie, co może świadczyć o wolniejszym, lecz przedłużonym działaniu antybakteryjnym. W literaturze można znaleźć wzmianki na temat przygotowania antybakteryjnych polimerów opartych na pochodnej eugenolu. Xu i współpracownicy [293] zsyntetyzowali cząstki polimerowe na bazie metakryloamidu dopaminy i metakrylanu eugenylu, które wykazywały skuteczność przeciwbakteryjną od 60% do 90% wobec *Eugenia coli*. Ponadto Rojo i inni [281] wykazali dobrą cytocompatybilność z ludzkimi fibroblastami polimerów opartych na metakrylanie eugenylu i metakrylanie etoksyeugenylu. Polimery gwiaździste również są wykorzystywane do wytwarzania antybakteryjnych biomateriałów. Vigliotta i współpracownicy [262] zsyntetyzowali heteroamfilowe polimery gwiaździste z DMAEMA jako antybakteryjnymi jednostkami funkcjonalnymi, uzyskując materiały antybakteryjne bez potrzeby dyfuzji środka przeciwdrobnoustrojowego. Z drugiej strony Siedenbiedel i współpracownicy [263] opracowali powłoki antybakteryjne oparte na amfilowych kopolimerach blokowych w kształcie gwiazdy, które wykazywały długotrwałą aktywność przeciwbakteryjną.

Badania przeprowadzone metodami NMR, GPC i DLS potwierdziły otrzymanie polimerów gwiaździstych modyfikowanych EU-MAA, które charakteryzują się teoretycznie zaprojektowaną masą cząsteczkową i niską jej dyspersyjnością, a także wykazują działanie antybakteryjne. Z tego względu w kolejnym etapie badań zastosowano je jako modyfikatory właściwości akrylowych cementów kostnych.

○ Polimery gwiaździste modyfikowane AMP (STR-AMP-PMMA)

W rozdziale 2.1.1. *Synteza modyfikowanych monomerów*, w podpunkcie *Pochodne ampicyliny* przytoczono doniesienia literaturowe na temat skuteczności stosowania estrów ampicyliny jako promotorów leków [283,284] i efektywności uwalniania ampicyliny wbudowanej w nanocząstki polimerowe [286]. W oparciu o te obserwacje podjęto próbę syntezy polimerów gwiaździstych, które w swojej strukturze posiadać będą kowalencyjnie wbudowaną ampicylinę. W jednym z poprzednich rozdziałów (2.1.1. *Synteza modyfikowanych monomerów*, podpunkt *Pochodne ampicyliny*) opisano przygotowanie trzech pochodnych AMP, które będą pełnić funkcję makroinicjatora w syntezie polimerów gwiaździstych na bazie PMMA.

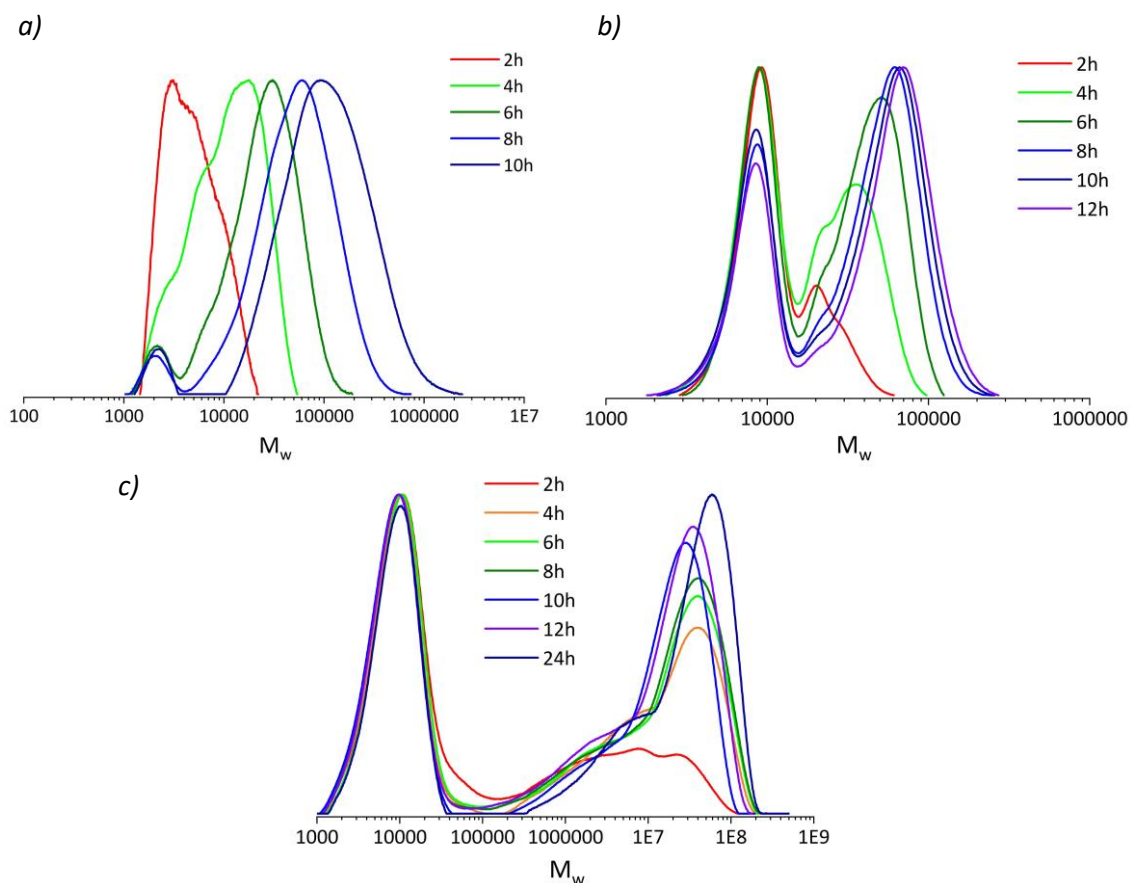
Syntezę polimerów gwiaździstych prowadzono metodą ARGET ATRP. Jako monomer funkcjonalny zastosowano DMAEMA, a jako środek sieciujący EGDM. We wszystkich trzech przypadkach stężenia makroinicjatora (MI) oraz EGDM były identyczne. Reakcja prowadzona była przez 10 godzin w przypadku STR-AMP-PEG₄-PMMA₂₀₀₀, 12 godzin dla STR-AMP-PEG₄-PMMA₇₀₀₀ oraz 24 godziny dla STR-AMP-PEG₄-PMMA, a uzyskane stopnie konwersji przedstawiono w tabeli 5.

Tab. 5. Stopień konwersji monomeru, masa cząsteczkowa (względna liczbowo średnia masa cząsteczkowa - $M_{n,app}$, absolutna masa cząsteczkowa - $M_{n,abs}$), dyspersyjność - $\mathcal{D}$, liczba ramion i rozmiar otrzymanych polimerów gwiaździstych modyfikowanych ampicyliną.

nazwa	konwersja (%) ^a	$M_{n,app}$ ^a	$M_{n,abs}$ ^c	$\mathcal{D}$ ^b	liczba ramion ^d	rozmiar (d.nm) ^e
STR-AMP-PEG ₄ -PMMA ₂₀₀₀	82	68 800	107 000	1,51	34	12
STR-AMP-PEG ₄ -PMMA ₇₀₀₀	87	62 200	95 100	1,29	12	11
STR-AMP-PEG ₄ -PMMA	91	389 000	611 000	1,57	56	14

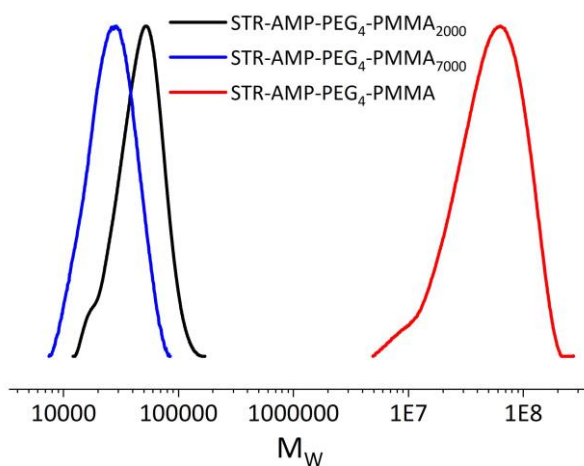
^aokreślono metodą spektroskopii ¹H NMR. ^bokreślono metodą analizy GPC (THF jako eluent) skalibrowanej do wzorców PMMA. ^cokreślono metodą GPC (THF jako eluent) wyposażonego w detektor wielokątowego rozpraszania światła. ^dLiczbę ramion obliczono zgodnie z metodyką przedstawioną przez Cho i innych [291]. ^eokreślono za pomocą dynamicznego rozpraszania światła (DLS).

W trakcie syntezy STR-AMP-PEG₄-PMMA₂₀₀₀ zaobserwowano szybki wzrost frakcji wysokocząsteczkowej przy jednoczesnym gwałtownym zaniku MI (rysunek 38a). Natomiast w pozostałych przypadkach proces ten przebiegał w sposób bardziej kontrolowany i charakteryzował się wolniejszym tempem wzrostu polimerów gwiaździstych (rysunek 38b i rysunek 38c). W przypadku syntezy polimeru gwiaździstego STR-AMP-PEG₄-PMMA obserwuje się wzrost polimeru przy bardzo wysokich wartościach M_w przy jednoczesnym kontrolowanym przebiegu syntezy (rysunek 38c). Prowadzi to do uzyskania polimerów gwiaździstych o bardzo dużych masach cząsteczkowych i stosunkowo niskiej dyspersyjności.



Rys. 38. Kinetyka polimeryzacji polimerów gwiazdzystych: a) STR-AMP-PEG₄-PMMA₂₀₀₀; b) STR-AMP-PEG₄-PMMA₇₀₀₀ i c) STR-AMP-PEG₄-PMMA, przedstawiona jako zależność masy cząsteczkowej oznaczonej metodą GPC od czasu prowadzenia reakcji polimeryzacji.

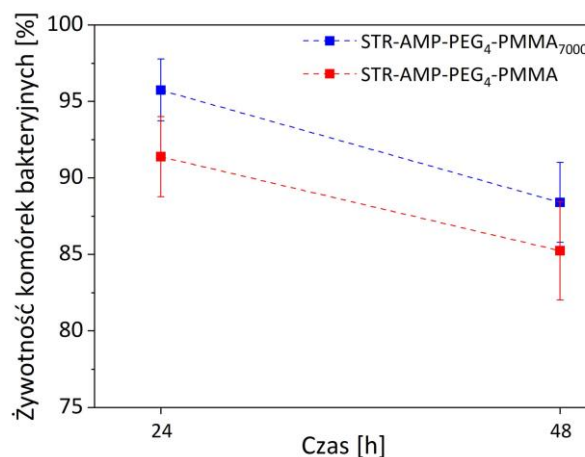
Dzięki przeprowadzonym syntezom z powodzeniem otrzymano dobrze zdefiniowane polimery gwiazdzyste modyfikowane antybiotykiem, co potwierdzono metodą GPC (rysunek 39). Wielkości charakterystyczne uzyskanych polimerów gwiazdzystych przedstawiono w tabeli 5.



Rys. 39. Masy cząsteczkowe polimerów gwiazdzystych z AMP oznaczona metodą GPC.

Oceniono aktywność przeciwbakteryjną zsyntetyzowanych polimerów gwiazdzystych w celu określenia ich zdolności do hamowania wzrostu bakterii. Wyniki wykazały umiarkowane

działanie przeciwbakteryjne, przy czym żywotność komórek bakteryjnych szczepu *E. coli* w okresie 48 godzin utrzymywała się na poziomie około 90%, co sugeruje ograniczoną skuteczność przeciwdrobnoustrojową w badanych warunkach (rysunek 40). Niemniej jednak, żywotność komórek zmniejszyła się w okresie 48 godzin, co sugeruje uwalnianie ampicyliny z małą szybkością z otrzymanych polimerów gwiaździstych.



Rys. 40. Wpływ STR-AMP-PEG₄-PMMA₇₀₀₀ i STR-AMP-PEG₄-PMMA na żywotność komórek bakteryjnych *E. coli* ($n = 3$).

Modyfikacja antybiotyków w celu włączenia ich w materiały polimerowe jest tematem często opisywanym w literaturze. Patel i inni [294] w swoich badaniach związali ampicylinę z grupami funkcyjnymi matrycy kopolimeru poli(styren-co-bezwodnik maleinowy). Uzyskane wyniki wskazują na wysoką zawartość ampicyliny w matrycy, która uwalnia się ze skutecznością od 50 do 80% w okresie od 6 do 8 dni. Oledzka i inni [285] uzyskali koniugaty sprzęgające antybiotyk β -laktamowy (ampicylinę) z rozgałęzionymi matrycami polimerowymi opartymi na naturalnym oligopeptydzie, które uwalniały od 14% do 60% ampicyliny po 21 dniach inkubacji. W innych badaniach, Yang i współpracownicy [254] sprzęgli penicylinę V z polimerem gwiaździstym poprzez wiązania amidowe i estrowe. Badania antybakteryjne wobec *S. aureus* potwierdziły biodostępność zmodyfikowanej penicyliny po rozszczepieniu wiązania estrowego.

W niniejszym rozdziale przedstawiono syntezę polimerów gwiaździstych zawierających kowalencyjnie wbudowaną ampicylinę, przeprowadzoną metodą ARGET ATRP. Zastosowanie trzech różnych prekursorów zawierających pochodne ampicyliny umożliwiło kontrolowaną syntezę polimerów gwiaździstych o zróżnicowanych masach cząsteczkowych, liczbie ramion i dyspersyjności. Analiza kinetyki polimeryzacji wykazała, że w przypadku STR-AMP-PEG₄-PMMA₂₀₀₀ proces przebiegał z gwałtowną konwersją monomerów i szybkim wzrostem frakcji wysokocząsteczkowej, podczas gdy dla STR-AMP-PEG₄-PMMA₇₀₀₀ i STR-AMP-PEG₄-PMMA reakcja miała bardziej kontrolowany charakter. Otrzymane polimery gwiaździste charakteryzowały się dużymi masami cząsteczkowymi oraz relatywnie niską dyspersyjnością, co potwierdzono badaniami metodą GPC.

Na podstawie przeglądu literatury wykazano, że modyfikacja antybiotyków poprzez ich immobilizację w matrycach polimerowych stanowi skuteczną strategię przedłużonego uwalniania substancji czynnych. Badania nad różnymi systemami nośnikowymi wskazują, że uwalnianie ampicyliny może przebiegać w szerokim zakresie czasowym w zależności od zastosowanej matrycy polimerowej i rodzaju wiązania chemicznego koniugatów. W kontekście niniejszej pracy, uzyskane wyniki stanowią podstawę do dalszych badań nad potencjalnym zastosowaniem funkcjonalizowanych polimerów gwiaździstych jako nośników antybiotyków w biomateriałach do zastosowań medycznych.

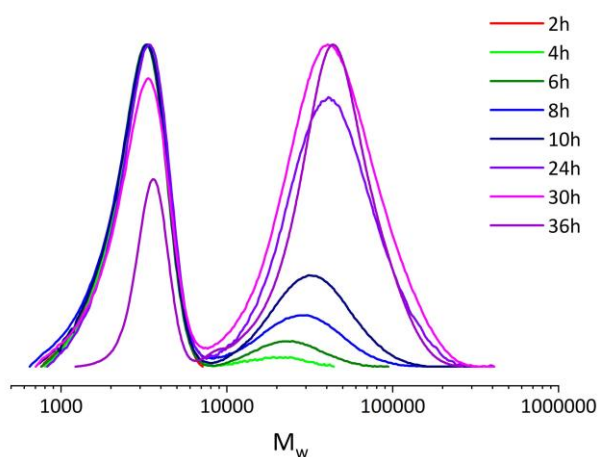
- Polimery gwiaździste modyfikowane $\text{Gd}(\text{MAA})_3$ (STR- $\text{Gd}(\text{MAA})_3$)

Synteza metakrylowej pochodnej gadolinu otwiera nowe możliwości w projektowaniu polimerów gwiaździstych o właściwościach kontrastujących. Struktury tego typu wykazują szczególny potencjał w zastosowaniach związanych z modyfikacją cementów kostnych, w których mogą pełnić zarówno funkcję środka kontrastującego, jak i systemu kontrolowanego dostarczania leków po wcześniejszym załadowaniu substancją aktywną. Tradycyjne środki kontrastujące, takie jak BaSO_4 czy ZrO_2 , wykazują negatywny wpływ na właściwości mechaniczne cementów [76,77] i pozwalają wyłącznie na diagnostykę postoperacyjną za pomocą obrazowania rentgenowskiego. Polimery gwiaździste zawierające gadolin stwarzają perspektywę opracowania cementów kostnych zdolnych do indukowania sygnału w obrazowaniu metodą rezonansu magnetycznego (MRI), co może znaleźć zastosowanie w procedurach chirurgicznych prowadzonych pod kontrolą MRI [295]. Takie materiały są szczególnie korzystne w przypadku interwencji w obrębie nowotworów kręgosłupa oraz w zabiegach w obszarze układu mięśniowo-szkieletowego, gdzie konieczne jest precyzyjne planowanie i prowadzenie operacji. Zdolność MRI do wykrywania tkanek miękkich oraz delikatnych struktur, takich jak nerwy, naczynia krwionośne czy rdzeń kręgowy, istotnie zwiększa bezpieczeństwo zabiegów, a zastosowanie szybkich sekwencji interwencyjnych umożliwia obrazowanie w czasie rzeczywistym podczas operacji [295]. Dodatkowo, funkcjonalizowane polimery mogą znacząco poprawić profil uwalniania substancji aktywnych, co nie jest możliwe przy zastosowaniu klasycznych środków kontrastujących. W niniejszym rozdziale omówiono proces syntezy polimerów gwiaździstych z wykorzystaniem metakrylowej pochodnej gadolinu oraz ich potencjalne zastosowanie w biomateriałach o zwiększonej funkcjonalności.

W pierwszym etapie badań dobrano rozpuszczalnik do syntezy modyfikowanego gadolinem polimeru gwiaździstego ze względu na ograniczoną rozpuszczalność (DMF, DMSO) syntezowanego w ramach pracy monomeru $\text{Gd}(\text{MAA})_3$. Wybrano DMF, który zastosowano w mieszaninie z toluenem w stosunku objętościowym 5,75:1. Monomer $\text{Gd}(\text{MAA})_3$ jest monomerem posiadającym trzy grupy metakrylowe w cząsteczce, a zatem jest monomerem sześćiofunkcyjnym, prowadzącym do utworzenia polimeru o silnie usieciowanej strukturze.

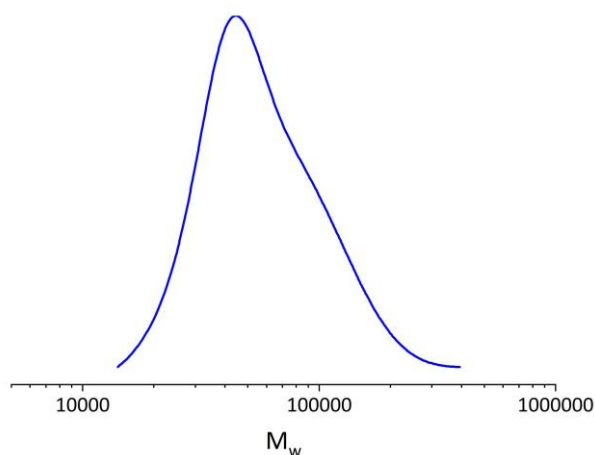
Jego zastosowanie w syntezie polimeru gwiaździstego wpływa zatem znacząco na przebieg procesu i tworzenie polimeru o pożądanej strukturze. Zastąpienie monomeru sieciującego EGDM monomerem $\text{Gd}(\text{MAA})_3$ w równomolowej ilości w przeliczeniu na grupy funkcyjne spowodowało całkowite usieciowanie mieszaniny reakcyjnej. Dlatego zastosowano mieszaninę monomerów sieciujących EGDM i $\text{Gd}(\text{MAA})_3$ przy różnych stosunkach molowych reagentów, tj. 1:0,3; 0,6:0,4 i 0,85:0,1, przy czym w syntezie polimeru gwiaździstego o kontrolowanej masie cząsteczkowej sprawdziła się mieszanina monomerów EGDM: $\text{Gd}(\text{MAA})_3$ zastosowana w stosunku molowym 0,85:0,1. Ostateczny skład mieszaniny reakcyjnej zastosowanej do syntezy polimeru gwiaździstego modyfikowanego gadolinem był zatem następujący: $[\text{PEG}_{45}\text{MEM}]_0/[\text{Gd}(\text{MAA})_3]_0/[\text{EGDM}]_0/[\text{EBiB}]_0/[\text{CuBr}_2]_0/[\text{TPMA}]_0$ w stosunku molowym reagentów 1/0,1/0,85/0,2/0,00022/0,00066/0,0022.

W przypadku syntezy tego polimeru gwiaździstego również zastosowano strategię wprowadzania $[\text{EGDM}]/[\text{EBiB}]$ porcjami, jak sugerowali Gao i inni [267]. Aby zwiększyć wydajność, dodatkowe porcje $[\text{EGDM}]/[\text{EBiB}]$ wprowadzono po 10 i 24 godzinach prowadzenia reakcji, co spowodowało znaczny wzrost stopnia konwersji $\text{PEG}_{45}\text{MEM}$ i wzrost polimeru gwiaździstego (rysunek 41).



Rys. 41. Kinetyka polimeryzacji polimeru gwiaździstego $\text{STR-Gd}(\text{MAA})_3$ przedstawiona jako zależność masy cząsteczkowej oznaczonej metodą GPC od czasu prowadzenia reakcji polimeryzacji.

Na wykresie obserwuje się stopniowy wzrost masy cząsteczkowej polimeru gwiaździstego w czasie prowadzenia procesu polimeryzacji, jednakże dopiero dodatek środka sieciującego w 10. i 24. godzinie reakcji spowodował znaczny wzrost jego masy cząsteczkowej. W wyniku zastosowanej strategii syntezy otrzymano dobrze zdefiniowany polimer gwiaździsty, co potwierdzono badaniami przeprowadzonymi dla oczyszczonego polimeru metodą GPC (rysunek 42).



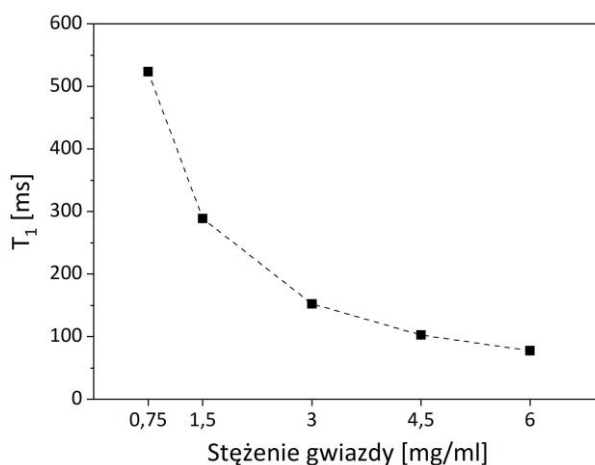
Rys. 42. Masa cząsteczkowa polimeru gwiazdowego z $Gd(MAA)_3$ oznaczona metodą GPC.

Tab. 6. Stopień konwersji monomeru, masa cząsteczkowa (względna liczbowo średnia masa cząsteczkowa - $M_{n,app}$, absolutna masa cząsteczkowa - $M_{n,abs}$), dyspersyjność - $\mathcal{D}$, liczba ramion i rozmiar otrzymanego polimeru gwiazdowego modyfikowanego $Gd(MAA)_3$.

nazwa	konwersja (%) ^a	$M_{n,app}$ ^a	$M_{n,abs}$ ^c	$\mathcal{D}$ ^b	liczba ramion ^d	rozmiar (d.nm) ^e
STR- $Gd(MAA)_3$	63	53 060	69 990	1,32	25	9

^aokreślono metodą spektroskopii 1H NMR. ^bokreślono metodą analizy GPC (THF jako eluent) skalibrowanej do wzorców PMMA. ^cokreślono metodą GPC (THF jako eluent) wyposażonego w detektor wielokątowego rozpraszania światła. ^dLiczbę ramion obliczono zgodnie z metodyką przedstawioną przez Cho i innych [291]. ^eokreślono za pomocą dynamicznego rozpraszania światła (DLS).

W celu określenia kontrastujących właściwości STR- $Gd(MAA)_3$ zmierzono czas relaksacji (T_1). Eksperymenty przeprowadzono w temperaturze pokojowej, przy częstotliwości 16,5 MHz. Czas T_1 ulegał skróceniu wraz ze wzrostem stężenia STR- $Gd(MAA)_3$ z 523,8 ms dla roztworu 0,75 mg/ml do 77,3 ms dla roztworu 6 mg/ml (rysunek 43).



Rys. 43. Czas T_1 dla roztworów STR- $Gd(MAA)_3$ o stężeniu od 0,75 mg/ml do 6 mg/ml, w temperaturze pokojowej, przy częstotliwościach 16,5 MHz.

Czynniki kontrastujące na bazie nanocząstek metali w nośnikach polimerowych są szeroko badane, jednakże nie są one kowalencyjnie wiązane z nośnikiem. Iranpour i inni [296] uzyskali

nanocząstki złota z otoczką z gumy arabskiej, które wykazywały dobrą stabilność w mediach fizjologicznych oraz silniejsze właściwości kontrastujące niż komercyjny środek kontrastujący Visipaque. W innej pracy, Kim i współpracownicy [297] zsyntetyzowali nieorganiczne nanocząstki o wielkości rdzenia poniżej 5 nm zawierające złoto, tantal i cer zamknięte w nanocząstkach polimerowych, tworząc nanocząstki polimetaliczne (PMNP). PMNP generowały wyższy i bardziej stabilny kontrast, niż środki kontrastujące wykonane z jednego metalu. W innych badaniach [298], nanocząstki złota zamknięte w nanocząstkach poliestrowych wykazywały znikomą toksyczność wobec fibroblastów 3T3 i komórek glejaka U-87 MG, a także doskonałe właściwości obrazowania komórkowego. Środki kontrastujące na bazie nanocząstek tlenku gadolinu(III) funkcjonalizowanych powierzchniowo pochodną bisfosfonianu (BP) były badane przez Mastrogiamo i innych [299]. Wykazywały one silne powinowactwo do fosforanu wapnia oraz biokompatybilność przy zachowaniu dobrych właściwości kontrastujących. Li i współpracownicy [300] badali środki kontrastujące MRI oparte na Gd^{3+} w funkcjonalizowanym akrylanie poli(eteru metylowego glikolu oligoetylenowego) o architekturze polimeru gwiazdzystego. Wykazały one znacznie wyższą relaksację niż istniejące komercyjne środki kontrastujące o niskiej masie cząsteczkowej. Harth i współpracownicy [301] opracowali serię akrylanowych polimerów gwiazdzystych z Gd^{3+} i Eu^{3+} jako środków fluorescencyjnych i kontrastujących MRI do obrazowania multimodalnego. Badania *in vitro* i *in vivo* wykazały, że te multimodalne środki obrazujące zachowały niebieską/czerwoną fluorescencję i niezwykle właściwości magnetyczne, z wysoką relaksacją i wysokim kontrastem.

Podsumowując, zastosowanie $Gd(MAA)_3$ pozwoliło na otrzymanie stabilnych, dobrze zdefiniowanych polimerów gwiazdzystych o właściwościach kontrastujących w obrazowaniu metodą rezonansu magnetycznego (MRI). Wyniki relaksometrii T_1 potwierdziły skuteczne wbudowanie gadolinu, czego efektem było znaczące skrócenie czasu relaksacji wraz ze wzrostem stężenia. Otrzymane polimery stwarzają możliwość zastosowania w obrazowaniu śródoperacyjnym, szczególnie w procedurach w obrębie kręgosłupa i układu mięśniowo-szkieletowego, gdzie MRI zapewnia wysoką precyzję i bezpieczeństwo. Daje to podstawę do rozwoju nowoczesnych, wielofunkcyjnych cementów kostnych o rozszerzonych możliwościach diagnostyczno-terapeutycznych.

2.1.4. Otrzymywanie kompleksów

- Kompleksy z polimerami gwiazdzystymi

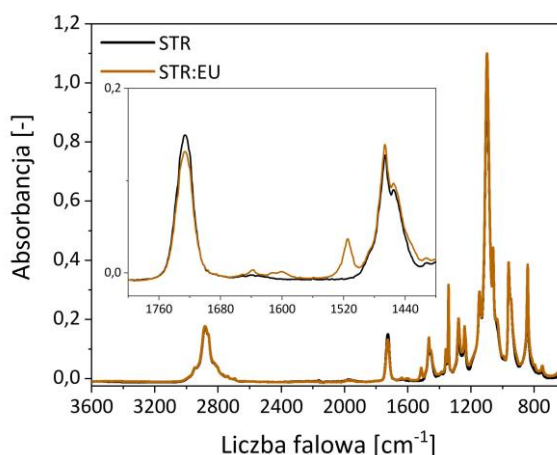
Współczesne badania nad biomateriałami koncentrują się na opracowywaniu systemów dostarczania leków o kontrolowanym uwalnianiu, które pozwalają na zwiększenie skuteczności terapeutycznej oraz zmniejszenie skutków ubocznych terapii antybiotykowej. W tym kontekście, polimery gwiazdzyste stanowią obiecujący nośnik do kompleksowania i dostarczania substancji czynnych, takich jak antybiotyki czy naturalne środki antybakteryjne. Ich unikalna struktura,

obejmująca rdzeń centralny oraz liczne rozgałęzienia, umożliwia efektywne wiązanie i transportowanie leków, co podkreśla ich potencjał aplikacyjny w obszarze inżynierii biomateriałów.

○ Kompleks STR:EU

Obecność monomeru funkcyjnego DMAEMA w strukturze polimeru gwiaździstego nadaje mu charakter kationowy w środowisku wodnym dzięki protonacji grup aminowych. Dodatkowo naładowane centra funkcyjne mogą oddziaływać elektrostatycznie z anionowymi lub polarnymi grupami obecnymi w wielu cząsteczkach bioaktywnych, w tym w substancjach o działaniu antybakteryjnym, takich jak antybiotyki czy związki fenolowe. Dodatkowo grupy aminowe DMAEMA mogą uczestniczyć w wiązaniach wodorowych oraz oddziaływaniach van der Waalsa, co zwiększa zdolność kompleksowania zarówno związków małocząsteczkowych, jak i nanostruktur, takich jak nanocząstki srebra [302,303]. Taka funkcjonalizacja nie tylko ułatwia efektywne wiązanie i stabilizację związków aktywnych, ale także może modulować ich kontrolowane uwalnianie z matrycy polimerowej, co ma istotne znaczenie w projektowaniu nowoczesnych materiałów o właściwościach antybakteryjnych. Wykorzystując tę zdolność, otrzymano kompleks STR:EU w stosunku molowym 1:20. Charakterystykę uzyskanego kompleksu przeprowadzono metodą spektroskopii ATR-FTIR. Dodatkowo, w celu potwierdzenia oddziaływań występujących między STR a EU, kompleks poddano analizie metodą spektroskopii ^1H NMR oraz techniką spektroskopii NMR, tj. spektroskopii 2D jądrowego efektu Overhausera (NOESY).

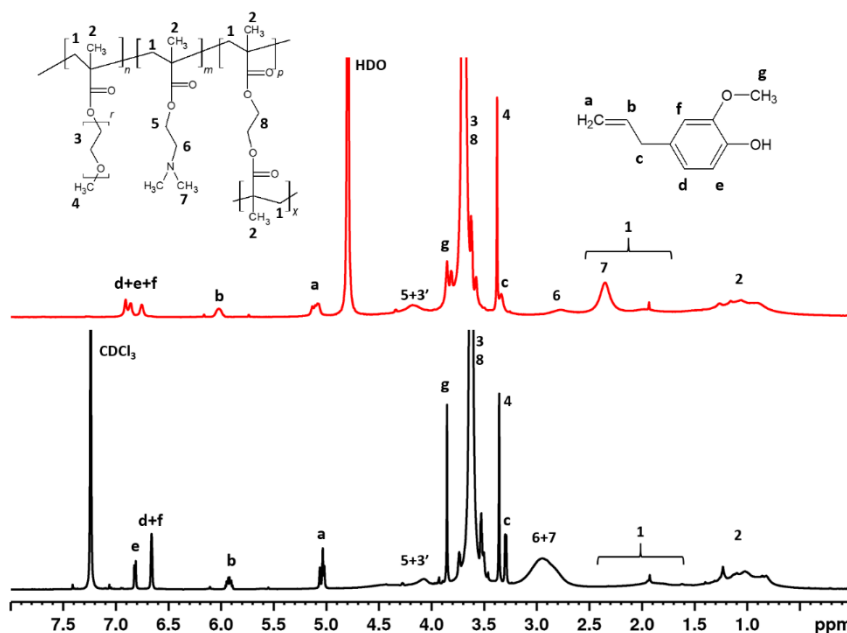
Kompleks polimeru gwiaździstego z eugenolem, jak wspomniano wyżej, analizowano metodą spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera. Widmo ATR-FTIR wykonane dla kompleksu STR:EU pokazane na rysunku 44 wykazuje pojawienie się dodatkowego pasma absorpcji charakterystycznego dla eugenolu w zakresie liczb falowych $1500 - 1680\text{ cm}^{-1}$, odpowiadającego drganiom rozciągającym C=C wiązania podwójnego i pierścienia aromatycznego eugenolu.



Rys. 44. Widma ATR-FTIR polimeru gwiaździstego STR i kompleksu STR:EU (stosunek molowy 1:20).

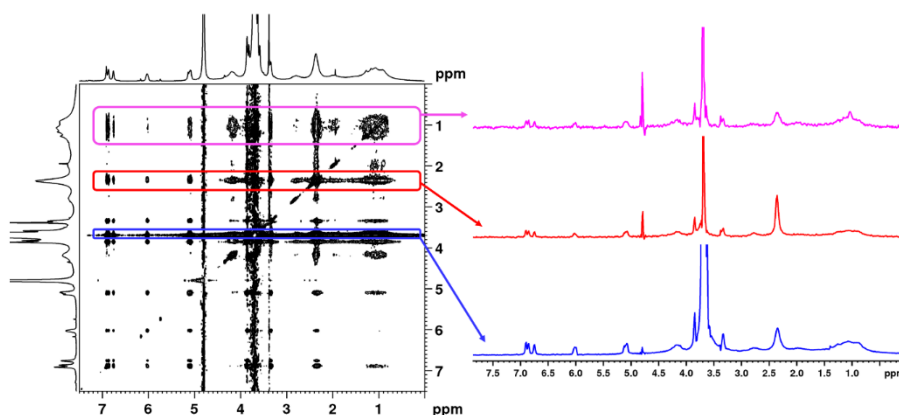
Dalsza analiza widm ATR-FTIR potwierdza udane kompleksowanie EU przez STR. Pasma absorpcji odpowiadające aromatycznym drganiom rozciągającym C=C w próbkach STR:EU potwierdza integrację dodatkowych grup funkcyjnych wprowadzonych przez EU. Ta analiza spektralna wyraźnie wskazuje na kompleksowanie EU.

W celu scharakteryzowania możliwych oddziaływań między polimerem gwiaździstym STR a eugenolem w kompleksie STR:EU przeprowadzono dodatkowo badania metodą spektroskopii ^1H NMR, których wyniki pokazano na rysunku 45. Dodatkowo na rysunku podano struktury polimeru gwiaździstego i eugenolu wraz z przypisanymi sygnałami. Eugenol jest bardzo słabo rozpuszczalny w wodzie (1,15 mg/ml), zatem aby udowodnić jego obecność w kompleksie, w pierwszym etapie zmierzono widmo ^1H NMR w chloroformie (rysunek 45 – czarna linia). Zaobserwowano dwa rodzaje sygnałów: pierwszy rodzaj to szerokie piki związane ze strukturą polimeru gwiaździstego (oznaczone na widmie cyframi), drugi rodzaj to ostre sygnały skorelowane z eugenolem (oznaczone na widmie literami). W drugim etapie próbkę STR:EU rozpuszczono w deuterowanej wodzie (rysunek 45 – czerwona linia) i niespodziewanie uzyskano również sygnały pochodzące od eugenolu. Można przypuszczać, że ramiona $\text{PEG}_{45}\text{MEM}$ polimeru gwiaździstego ułatwiają rozpuszczalność cząsteczek eugenolu w wodzie poprzez oddziaływania międzycząsteczkowe. W porównaniu do widma uzyskanego w CDCl_3 , sygnały eugenolu charakteryzują się jednak mniejszą intensywnością. Jest to efekt mniejszej ruchliwości cząsteczek eugenolu w roztworze wodnym. Dodatkowo obserwuje się niewielkie zmiany przesunięcia chemicznego sygnałów eugenolu, co jest prawdopodobnie spowodowane oddziaływaniami z cząsteczkami polimeru [304].



Rys. 45. Widma ^1H NMR STR:EU zmierzone w CDCl_3 (czarny) i D_2O (czerwony) w temperaturze 295K.

W celu potwierdzenia oddziaływań międzycząsteczkowych występujących pomiędzy cząsteczkami polimeru gwiazdowego i eugenolu oraz uzyskania informacji o bliskości przestrzennej pomiędzy grupami protonowymi obu cząsteczek, zastosowano technikę NOESY spektroskopii NMR. Technika ta pozwala uzyskać informacje o przestrzennych oddziaływaniach różnych spinów jądrowych w odległościach do maksymalnie 0,5 nm [305]. Na rysunku 46 przedstawiono widmo ^1H NMR 2D NOESY próbki STR:EU w roztworze D_2O . Zaobserwowano dwa rodzaje pików krzyżowych: pierwszy, który pojawia się pomiędzy sygnałami przypisanymi do eugenolu i samego polimeru gwiazdowego oraz drugi wykryty pomiędzy pikami eugenolu i polimeru gwiazdowego. Drugi typ pików krzyżowych jest związany z oddziaływaniami międzycząsteczkowymi eugenolu i polimeru gwiazdowego. Obecność wszystkich tych pików krzyżowych sugeruje, że odległości między odpowiednimi protonami są mniejsze niż 0,5 nm. Aby podkreślić oddziaływania występujące między eugenolem i polimerem gwiazdowym, z widma NOESY NMR wyodrębniono sygnały rdzenia polimeru gwiazdowego, tj. sygnał „2” i „7”, a także sygnał ramion PEG₄₅MEM, tj. sygnał „3”. Dowodzi to, że cząsteczki eugenolu oddziałują nie tylko z ramionami polimeru gwiazdowego, ale także niektóre z nich znajdują się w bliskiej odległości rdzenia STR.

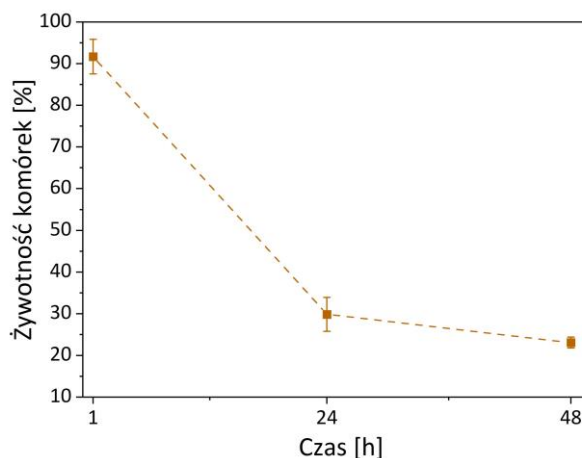


Rys. 46. Widmo ^1H NMR 2D NOESY próbki STR:EU w roztworze D_2O zmierzone w temperaturze 295K przy czasie mieszania 600 ms. Po prawej stronie znajdują się widma wycinków 1D wyodrębnione z sygnałów polimeru gwiazdowego „2” (różowy), „7” (czerwony) i „3” (niebieski) widma NOESY.

Prowadzone badania z zastosowaniem eugenolu do modyfikacji polimerów pokazują, że eugenol wykazuje właściwości antybakteryjne [171], niestety jednocześnie negatywnie wpływając na reakcję polimeryzacji [306]. Kompleksowanie eugenolu w gwieździe polimerowej powinno utrzymywać jego działanie antybakteryjne, a jednocześnie ograniczyć negatywny wpływ na proces polimeryzacji, czyniąc go bardziej odpowiednim do stosowania w cementach kostnych.

Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy badania antybakteryjne kompleksu STR:EU wykazały znaczny spadek żywotności komórek bakteryjnych *E. coli* po 24 godzinach do $29,8 \pm 4,1\%$ (rysunek 47). Następnie obserwuje się spowolnienie aktywności antybakteryjnej w kolejnych godzinach i osiągnięcie poziomu $23,0 \pm 1,3\%$ żywotności komórek po 48 godzinach. Taki wynik

sugeruje silną początkową aktywność przeciwbakteryjną kompleksu STR:EU, która stabilizuje się w czasie.



Rys. 47. Wpływ kompleksu STR:EU na żywotność komórek bakteryjnych *E. coli* ($n = 3$).

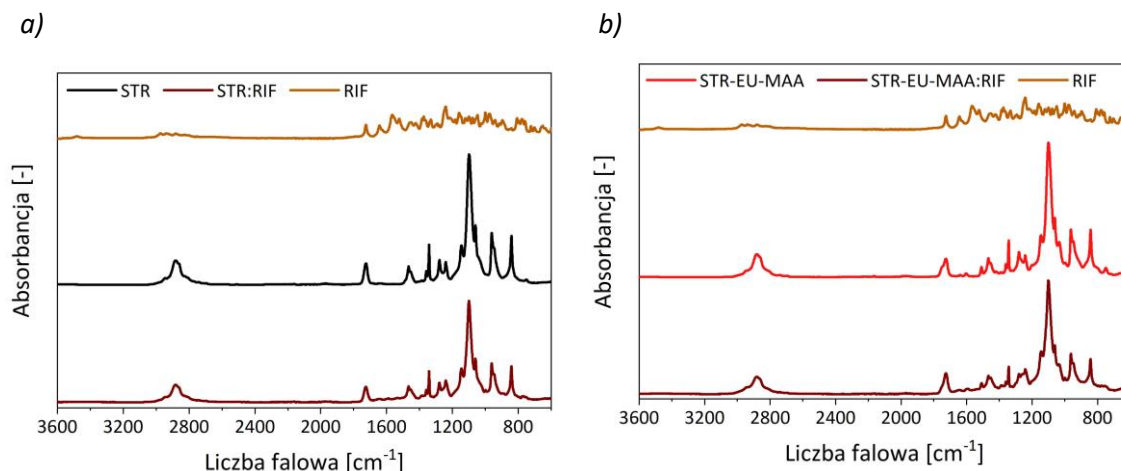
Podsumowując, otrzymany kompleks STR:EU charakteryzuje się silnymi oddziaływaniami pomiędzy substancją aktywną (EU) a nośnikiem (STR) oraz wykazuje dobre właściwości antybakteryjne, co czyni go obiecującym modyfikatorem właściwości cementów kostnych. Stwarza to możliwość prowadzenia dalszych badań nad wpływem kompleksu na właściwości fizykochemiczne, mechaniczne i biologiczne cementów kostnych.

W kolejnym etapie prac podjęto próbę otrzymania kompleksów polimerów gwiaździstych z antybiotykami, tj. ryfampicyną (RIF) i ampicyliną (AMP). Do przygotowania kompleksów wybrano podstawowy polimer gwiaździsty STR oraz polimer gwiaździsty modyfikowany EU-MAA, tj. STR–EU-MAA. Motywacją do podjęcia tych badań była próba związania antybiotyku na nośniku polimerowym, jakim jest polimer gwiaździsty, aby uzyskać materiał o przedłużonym uwalnianiu. Taki kompleks powinien zapobiec efektowi wyrzutu antybiotyku po zaaplikowaniu cementu kostnego w organizmie pacjenta. Kluczowym aspektem prowadzonych badań było określenie oddziaływań między polimerem a antybiotykiem, które mogą wpływać na stabilność kompleksów oraz ich właściwości antybakteryjne.

○ Kompleks STR:RIF

Kompleksowanie RIF miało na celu nie tylko poprawę uwalniania antybiotyku, ale również ograniczenie jej niekorzystnego wpływu na proces utwardzania cementów kostnych. Oddziaływania międzycząsteczkowe między polimerem gwiaździstym (STR) jak i polimerem gwiaździstym modyfikowanym EU-MAA (STR–EU-MAA) a ryfampicyną (RIF) badano metodą spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera. Analiza ta miała na celu identyfikację przesunięć położenia pasm absorpcji charakterystycznych grup funkcyjnych, co wskazywałoby na tworzenie kompleksów STR:RIF i STR–EU-MAA:RIF. Oddziaływania międzycząsteczkowe mogą

wpływać zarówno na ich stabilność jak i właściwości uwalniania leku. Widma ATR-FTIR polimeru gwiaździstego STR i kompleksu STR:RIF oraz polimeru gwiaździstego STR-EU-MAA i kompleksu STR-EU-MAA:RIF przedstawiono odpowiednio na rysunku 48.



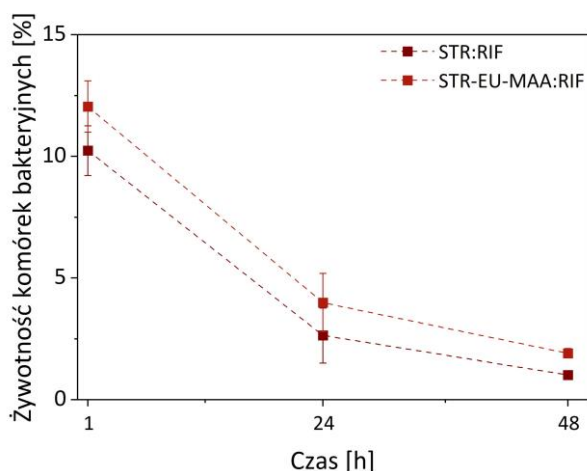
Rys. 48. Widma ATR-FTIR kompleksu: a) STR:RIF i b) STR-EU-MAA:RIF (stosunek molowy 1:5).

Na widmach ATR-FTIR polimerów gwiaździstych STR (rysunek 48a) i STR-EU-MAA (rysunek 48b) obserwuje się obecność charakterystycznych pasm absorpcyjnych odpowiadających strukturze polimetakrylanu. Pasma absorpcyjne z maksimum występującym przy liczbie falowej $\sim 1730 \text{ cm}^{-1}$ jest związane z drganiami rozciągającymi grup karbonylowych C=O występujących w wiązaniu estrowym, natomiast pasma absorpcyjne występujące w zakresie liczb falowych $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ odpowiadają symetrycznym i asymetrycznym drganiom rozciągającym alifatycznego wiązania C-H. Ponadto, pasma absorpcyjne w zakresie liczb falowych $1000 - 1300 \text{ cm}^{-1}$ wskazują na drgania rozciągające wiązania C-O-C, które związane są z obecnością wiązań estrowych w matrycy polimerowej. Dodatkowo, na widmie polimeru gwiaździstego STR-EU-MAA obserwuje się obecność pasm absorpcyjnych w zakresie liczb falowych $1500 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ związanych z drganiami rozciągającymi aromatycznych wiązań nienasyconych C=C struktury eugenolu. W przypadku ryfamicyny, która jest antybiotykiem o szerokim spektrum działania należącym do klasy ryfamycyn, można wyróżnić charakterystyczne grupy funkcyjne jak hydroksylowa, karbonylowa, amidowa, czy pierścień aromatyczny. Ich obecność można przypisać poszczególnym pasmom absorpcyjnym występującym na widmie ATR-FTIR. Pasma absorpcyjne pochodzące od grupy karbonylowej występuje przy liczbie falowej 1725 cm^{-1} , pasmo absorpcyjne asymetrycznych drgań rozciągających wiązania -C=N przy liczbie falowej 1644 cm^{-1} , pasmo absorpcyjne drgań zginających N-H grupy amidowej przy liczbie falowej 1566 cm^{-1} , pasmo absorpcyjne drgań rozciągających wiązania C-N przy liczbie falowej 1375 cm^{-1} , jak również widoczne w zakresie liczb falowych $1500 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ drgania rozciągające aromatycznych wiązań C=C. Po włączeniu antybiotyku RIF do matrycy STR i STR-EU-MAA, zaobserwowano kilka zmian na widmie ATR-FTIR, które wskazują na oddziaływania międzycząsteczkowe występujące między substancją aktywną a polimerem. W układach STR:RIF

i STR–EU-MAA:RIF charakterystyczne karbonylowe drgania rozciągające ryfampicyny wykryto z niewielkim przesunięciem, co wskazuje na potencjalne występowanie wiązania wodorowego lub oddziaływań dipol-dipol między polimerem a RIF. Dodatkowo, pasma odpowiadające grupie amidowej ryfampicyny ($\sim 1644\text{ cm}^{-1}$ i $\sim 1566\text{ cm}^{-1}$) wykazują zmiany intensywności, sugerując oddziaływania międzycząsteczkowe między polimerem gwiazdzystym a RIF, które mogą stabilizować lek w kompleksie. Co więcej, aromatyczne drgania rozciągające C=C ($1500 - 1600\text{ cm}^{-1}$) wykazują niewielkie przesunięcia i zmiany intensywności, które można przypisać oddziaływaniom π - π między pierścieniami aromatycznymi RIF a matrycą polimerową. Obszar drgań rozciągających wiązania C-O-C ($1000 - 1300\text{ cm}^{-1}$) wykazuje subtelne zmiany, co może wskazywać na modyfikacje w lokalnym środowisku elektronowym spowodowane oddziaływaniami lek-polimer.

Podsumowując, można stwierdzić, że zaobserwowane przesunięcia pasm absorpcyjnych lub zmiany ich intensywności na widmach ATR-FTIR sugerują otrzymanie kompleksów STR:RIF oraz STR–EU-MAA:RIF, w których tworzeniu prawdopodobnie uczestniczą wiązania wodorowe, czy oddziaływania elektrostatyczne. Struktura cząsteczkowa RIF wydaje się zachowana, co ma kluczowe znaczenie dla utrzymania jego aktywności przeciwbakteryjnej.

Aktywność przeciwbakteryjną otrzymanych kompleksów polimerów gwiazdzystych z ryfampicyną oceniano wobec szczepu bakterii *E. coli*. Jak można zauważyć z wykresu pokazanego na rysunku 49 żywotność komórek bakteryjnych w obecności STR:RIF i STR–EU-MAA:RIF znacznie spadła w trakcie badania. Po 1 godzinie inkubacji żywotność komórek zmniejszyła się do 10% w obecności kompleksu STR:RIF i 12% w obecności kompleksu STR–EU-MAA:RIF. Dalsza ekspozycja prowadziła do dalszego spadku żywotności, osiągając 2,6% dla STR:RIF i 4% dla STR–EU-MAA:RIF po 24 godzinach oraz odpowiednio 1% i 1,9% po 48 godzinach. Podobne wyniki uzyskali Duran i współpracownicy [307], wykazując, że proces mikrokapsułkowania zapewniał porównywalny poziom hamowania wzrostu *S. aureus* jak wolna postać substancji aktywnej, utrzymujący się po 20 i 24 godzinach inkubacji.

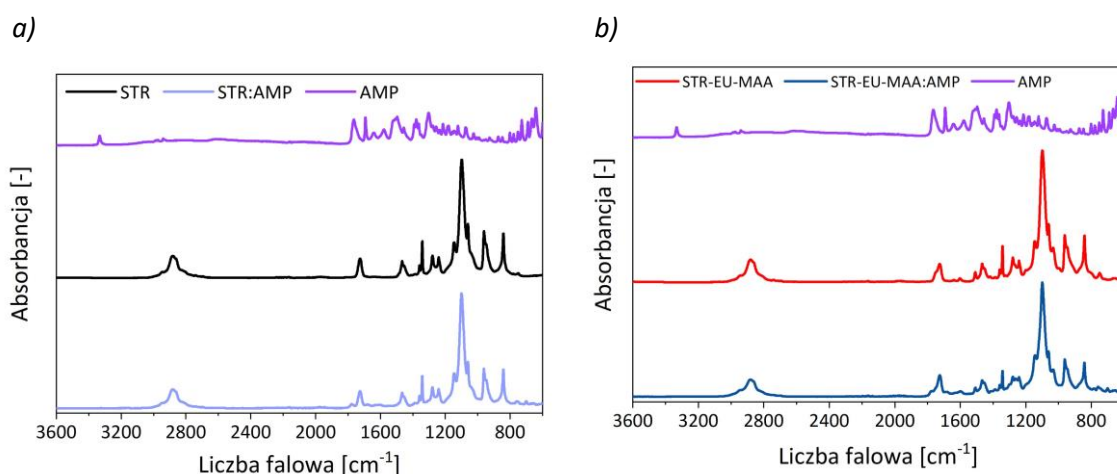


Rys. 49. Wpływ kompleksów STR:RIF i STR–EU-MAA:RIF na żywotność *E. coli* ($n = 3$).

Otrzymane wyniki potwierdzają zatem trwałą aktywność przeciwdrobnoustrojową przygotowanych kompleksów i sugerują skuteczne uwalnianie ryfampicyny z nośników polimerowych w czasie, co wskazuje na możliwość ich wykorzystania w formulacjach cementów kostnych.

○ Kompleks STR:AMP

W kolejnym etapie prac przygotowano również kompleksy polimerów gwiazdzystych z drugim antybiotykiem, tj. ampicyliną. Oddziaływania pomiędzy składnikami kompleksów badano, podobnie jak poprzednio, metodą spektroskopii ATR-FTIR. Widma ATR-FTIR polimeru gwiazdzystego STR i kompleksu STR:AMP oraz STR-EU-MAA i STR-EU-MAA:AMP przedstawiono na rysunku 50.



Rys. 50. Widma ATR-FTIR dla kompleksu: a) STR:AMP i b) STR-EU-MAA:AMP (stosunek molowy 1:7).

Opis charakterystycznych pasm absorpcyjnych występujących w polimerach gwiazdzystych STR i STR-EU-MAA przedstawiono wyżej. Natomiast w przypadku ampicyliny obserwuje się szerokie pasmo pochodzące od wody, a także charakterystyczne pasma w zakresie liczb falowych $1780 - 1850 \text{ cm}^{-1}$ (C=O), $3060 - 3300 \text{ cm}^{-1}$ (rozciągające $-\text{CONH}-$), $1630 - 1680 \text{ cm}^{-1}$ (amid drugorzędowy), 800 cm^{-1} (pierścień aromatyczny).

Na widmach ATR-FTIR przygotowanych kompleksów z ampicyliną zaobserwowano kilka zmian, potwierdzających obecność oddziaływań między antybiotykiem a STR czy STR-EU-MAA. Pasmo absorpcyjne związane z rozciąganiem grupy C=O w wiązaniu amidowym ampicyliny ($\sim 1660 \text{ cm}^{-1}$), wykazuje przesunięcie i zmianę intensywności, co sugeruje tworzenie wiązania wodorowego między antybiotykiem a matrycą polimerową. Ponadto, pasmo rozciągające grupy karbonylowej wiązania estrowego występującego w polimerach gwiazdzystych ($\sim 1725 \text{ cm}^{-1}$) wykazuje niewielkie przesunięcie na widmie kompleksów, co sugeruje potencjalne oddziaływania wodorowe między grupami estrowymi polimeru a grupami funkcyjnymi ampicyliny. Co więcej, poszerzenie, wyraźne obniżenie intensywności i niewielkie przesunięcie w obszarze

drgań rozciągających wiązania N-H ($3200 - 3500\text{ cm}^{-1}$) również sugerują możliwe oddziaływania przez wiązania wodorowe między AMP i polimerami gwiaździstymi. Na występowanie tego typu oddziaływań w koniugatach polimer-antybiotyk, w których wiązanie wodorowe odgrywa kluczową rolę ze względu na kompatybilność lek-polimer, wskazywano w publikacjach [308,309]. Charakterystyczne sygnały dla drgań rozciągających pierścienia β -laktamu w pobliżu liczby falowej 1760 cm^{-1} pozostają obecne w kompleksie STR:AMP i STR-EU-MAA:AMP. Jednakże przesunięcie sygnału z 1763 cm^{-1} do 1780 cm^{-1} wskazuje na występowanie oddziaływań pomiędzy ampicyliną a polimerem, przy jednoczesnym zachowaniu integralności strukturalnej antybiotyku po jego inkorporacji [308]. Zachowanie to ma kluczowe znaczenie dla utrzymania skuteczności przeciwbakteryjnej AMP. Drgania rozciągające aromatycznych wiązań nienasyconych C=C ($1500 - 1600\text{ cm}^{-1}$) wykazują niewielkie przesunięcia i zmiany intensywności na widmie ATR-FTIR kompleksu STR-EU-MAA:AMP, co sugeruje możliwe oddziaływania π - π między pierścieniami aromatycznymi ampicyliny i polimeru gwiaździstego. Zmiany w regionie $1400 - 1500\text{ cm}^{-1}$, odpowiadające symetrycznym i asymetrycznym drganiom rozciągającym karboksylanu, mogą wskazywać na interakcje jonowe między grupami karboksylowymi AMP i grupami funkcyjnymi w STR i STR-EU-MAA.

Podsumowując, obserwowane na widmach ATR-FTIR przesunięcia jak i zmiany intensywności pasm absorpcyjnych charakterystycznych grup funkcyjnych potwierdzają tworzenie kompleksów STR:AMP i STR-EU-MAA:AMP, w których prawdopodobnie uczestniczą wiązania wodorowe i oddziaływania elektrostatyczne. Uzyskane wyniki wskazują, że ampicylina została skutecznie włączona do matrycy polimerowej bez zmian struktury. Podobne oddziaływania zaobserwowano w innych układach polimer-antybiotyk, a ich obecność sprzyjała zwiększeniu stabilności leku oraz poprawie kontrolowanego profilu jego uwalniania [310].

○ Kompleks STR-AgNPs

Do syntezy polimeru gwiaździstego zastosowano monomer funkcyjny DMAEMA, aby dzięki jego obecności przeprowadzić redukcję jonów srebra i otrzymać kompleksy polimeru gwiaździstego z nanocząstkami srebra (STR-AgNPs). Proces formowania AgNPs przeprowadzono dla polimerów gwiaździstych różniących się długością ramion jak i zawartością monomeru funkcyjnego DMAEMA. Jako ramiona polimeru gwiaździstego zastosowano dwa monomery różniące się masą cząsteczkową (liczbą jednostek oksyetylenowych w cząsteczce), tj. PEG₄₅MEM o masie 2000 oraz PEG₉MEM o masie 500. Natomiast w przypadku DMAEMA zastosowano do syntezy 2 lub 4 mole tego monomeru w stosunku do 1 mola ramion (PEG₄₅MEM lub PEG₉MEM). Otrzymano cztery polimery gwiaździste zawierające odpowiednio: PEG₄₅MEM i 2 mole DMAEMA (STR), PEG₄₅MEM i 4 mole DMAEMA (STR_1), PEG₉MEM i 2 mole DMAEMA (STR_2) oraz PEG₉MEM i 4 mole DMAEMA (STR_3). Otrzymane polimery gwiaździste scharakteryzowano metodą ^1H NMR oraz metodą GPC, a główne parametry przedstawiono w tabeli 7. Na podstawie przedstawionych

wyników można stwierdzić, że skład kompozycji wywiera istotny wpływ na masę cząsteczkową oraz dyspersyjność ($\mathcal{D}$) otrzymanych polimerów gwiazdzystych. Wprowadzenie ramion o mniejszej długości (PEG₉MEM) skutkowało obniżeniem masy cząsteczkowej zarówno średniej liczbowej ($M_{n,app}$), jak i absolutnej ($M_{n,abs}$), przy jednoczesnym wzroście wartości $\mathcal{D}$, co wskazuje na pogorszenie kontroli nad procesem polimeryzacji. Co więcej, zwiększenie ilości DMAEMA spowodowało wzrost rozmiaru uzyskanych polimerów gwiazdzystych. Efekt ten jest szczególnie widoczny w próbce STR_3, w której uzyskano najniższe wartości M_n oraz najwyższą dyspersyjność i rozmiar spośród analizowanych próbek.

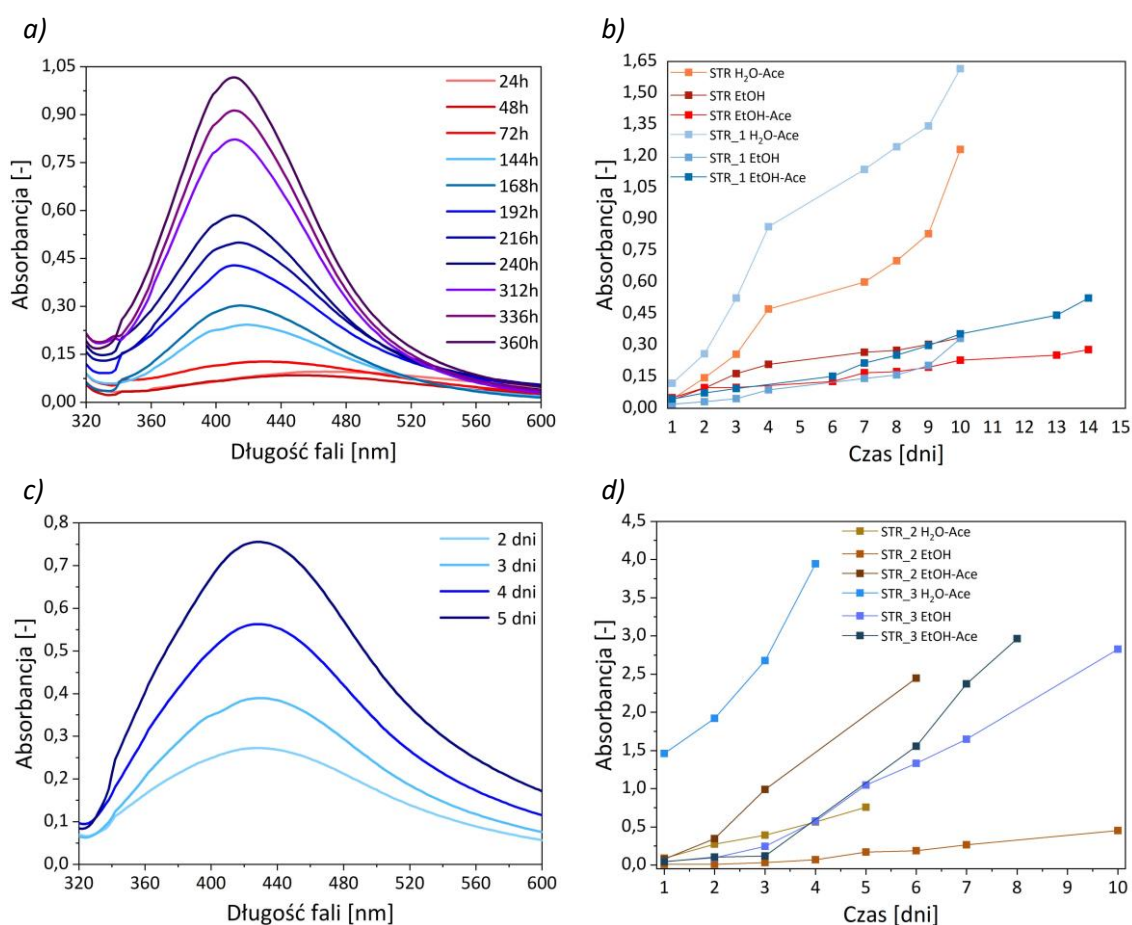
Tab. 7. Stopień konwersji monomeru, masa cząsteczkowa (względna liczbowo średnia masa cząsteczkowa - $M_{n,app}$, absolutna masa cząsteczkowa - $M_{n,abs}$), dyspersyjność - $\mathcal{D}$ oraz ilość ramion i rozmiar otrzymanych polimerów gwiazdzystych.

nazwa	konwersja (%) ^a	$M_{n,app}$ ^a	$M_{n,abs}$ ^c	$\mathcal{D}$ ^b	ilość ramion ^d	rozmiar (d.nm) ^e
STR	84	38 200	120 000	1,24	58	8
STR_1	88	31 700	144 000	1,34	64	9
STR_2	86	16 100	101 500	1,42	47	8
STR_3	90	15 200	58 300	1,57	56	15

^aokreślono metodą spektroskopii ¹H NMR. ^bokreślono metodą analizy GPC (THF jako eluent) skalibrowanej do wzorców PMMA. ^cokreślono metodą GPC (THF jako eluent) wyposażonego w detektor wielokątowego rozpraszania światła. ^dLiczbę ramion obliczono zgodnie z metodyką przedstawioną przez Cho i innych [291]. ^eokreślono za pomocą dynamicznego rozpraszania światła (DLS).

Kolejny etap badań polegał na doborze odpowiedniego rozpuszczalnika (roztworu) do przeprowadzenia procesu strącania jonów srebra (Ag⁺) na syntezowanych polimerach gwiazdzystych. Rodzaj rozpuszczalnika może mieć wpływ nie tylko na proces redukcji jonów srebra, kompleksowanie przez polimer gwiazdzysty, ale również na metodykę oddzielania otrzymanych nanocząstek srebra od rozpuszczalnika, celem uzyskania materiału do dalszych badań. Stosowany rozpuszczalnik powinien rozpuszczać zarówno polimer gwiazdzysty, jak i stosowaną sól srebra AgNO₃. Dlatego wybrano wodę, która jest obojętna dla organizmu, i jej pozostałości w przygotowanym produkcie do modyfikacji cementu kostnego nie będą miały wpływu na organizm pacjenta. Woda jednak jest trudna do usunięcia i wymaga zastosowania techniki liofilizacji. Zastosowano również dodatek acetonu do wody, ponieważ wpływa on na tworzenie miceli, co powinno przyspieszyć proces redukcji jonów srebra ze względu na lepszą dostępność atomów azotu monomeru funkcyjnego DMAEMA. W celu ułatwienia procesu usuwania rozpuszczalnika po procesie redukcji jonów srebra zastosowano zamiast wody etanol, oraz roztwór etanolu z acetonem. W tym przypadku rozpuszczalnik można łatwo usunąć w procesie odparowania próżniowego. Do badania zastosowano wszystkie otrzymane polimery gwiazdzyste, tj. STR, STR_1, STR_2 i STR_3, a redukcję prowadzono w trzech różnych mediach, tj. EtOH, H₂O-Ace i EtOH-Ace, bez dodatkowego czynnika redukującego i monitorowano ją metodą spektroskopii UV-Vis. Proces prowadzono do momentu, gdy absorpcja pasma

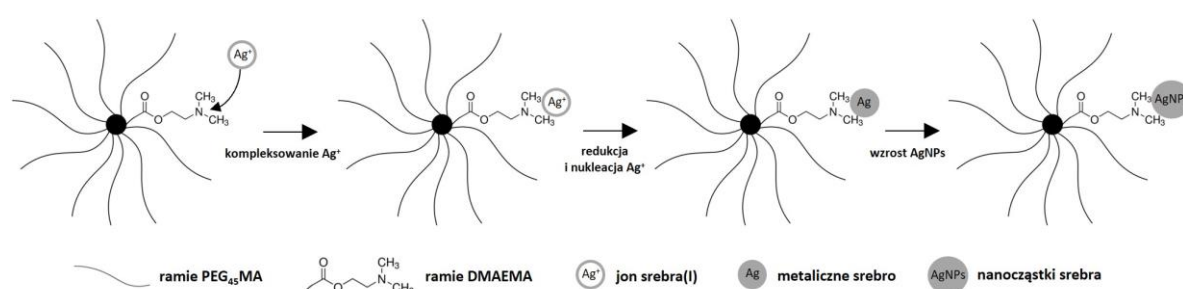
charakterystycznego dla AgNPs przestała wzrastać. Aby uniknąć wpływu pH lub stężenia soli AgNO_3 na tworzenie AgNPs, reakcje prowadzono w roztworach obojętnych o stałym stężeniu AgNO_3 . Wszystkie roztwory podczas procesu strącania zmieniały kolor z bezbarwnego poprzez złotożółty do brązowego. Na widmach wykonanych metodą UV-Vis obserwowano pasmo absorpcyjne przy długości fali ~ 430 nm. Przykładowe widma uzyskane podczas procesu redukcji jonów srebra dla jednego z badanych roztworów ($\text{H}_2\text{O}:\text{Ace}$) na gwiazdce polimerowej STR_1 i STR_2 pokazano na rysunku odpowiednio 51a i 51c. Zarejestrowane pasmo absorpcyjne odpowiada pikom absorpcji rezonansu plazmonów powierzchniowych prawie sferycznych lub sferycznych nanocząstek srebra, co wskazuje na tworzenie się AgNPs [302,311].



Rys. 51. Widma UV-Vis otrzymane podczas procesu redukcji jonów srebra w roztworze $\text{H}_2\text{O}:\text{Ace}$ na a) STR_1 i c) STR_2 oraz zależność maksymalnej absorbancji pików charakterystycznych dla nanocząstek srebra od czasu dla różnych roztworów: b) STR i STR_1 oraz d) STR_2 i STR_3 [312].

Strącanie jonów Ag^+ na polimerach gwiazdzystych jest możliwe dzięki obecności DMAEMA w ich strukturze. Wolna para elektronów na atomie azotu w trzeciorzędowej grupie aminowej DMAEMA posiada zdolności koordynacyjne i redukcyjne. Dzięki temu DMAEMA może działać zarówno jako środek kompleksujący, jak i redukujący jony srebra. Początkowo jony srebra (Ag^+) są wychwytywane przez DMAEMA i tworzą kompleks z atomami azotu (Ag^+)-DMAEMA. Następnie jony Ag^+ są redukowane *in situ*, tworząc atomy srebra podczas etapu zarodkowania.

Proces nukleacji jest kontynuowany wraz ze wzrostem kryształów srebra, co ostatecznie prowadzi do powstania nanocząstek srebra (AgNPs) [302,303]. Schemat formowania AgNPs na STR przedstawiono na rysunku 52. Można również znaleźć doniesienia literaturowe, na temat powolnej redukcji jonów Ag^+ do AgNPs bez dodatkowego reduktora przez hydrofilowy blok poli(tlenku etylenu) – PEO [313,314]. Badania te pokazują, że utworzone AgNPs są w większości osadzone na powierzchni polimeru, a tylko niewielka ich część jest obecna w postaci wolnych nanocząstek. W niniejszej pracy do redukcji jonów Ag^+ zastosowano polimery gwiaździste posiadające w strukturze zarówno monomer DMAEMA jak i monomery zawierające jednostki oksyetylenowe w cząsteczce. Zatem połączenie tych dwóch składników może prowadzić do większej wydajności w uzyskiwaniu AgNPs, a także zwiększonej stabilności otrzymanych kompleksów.

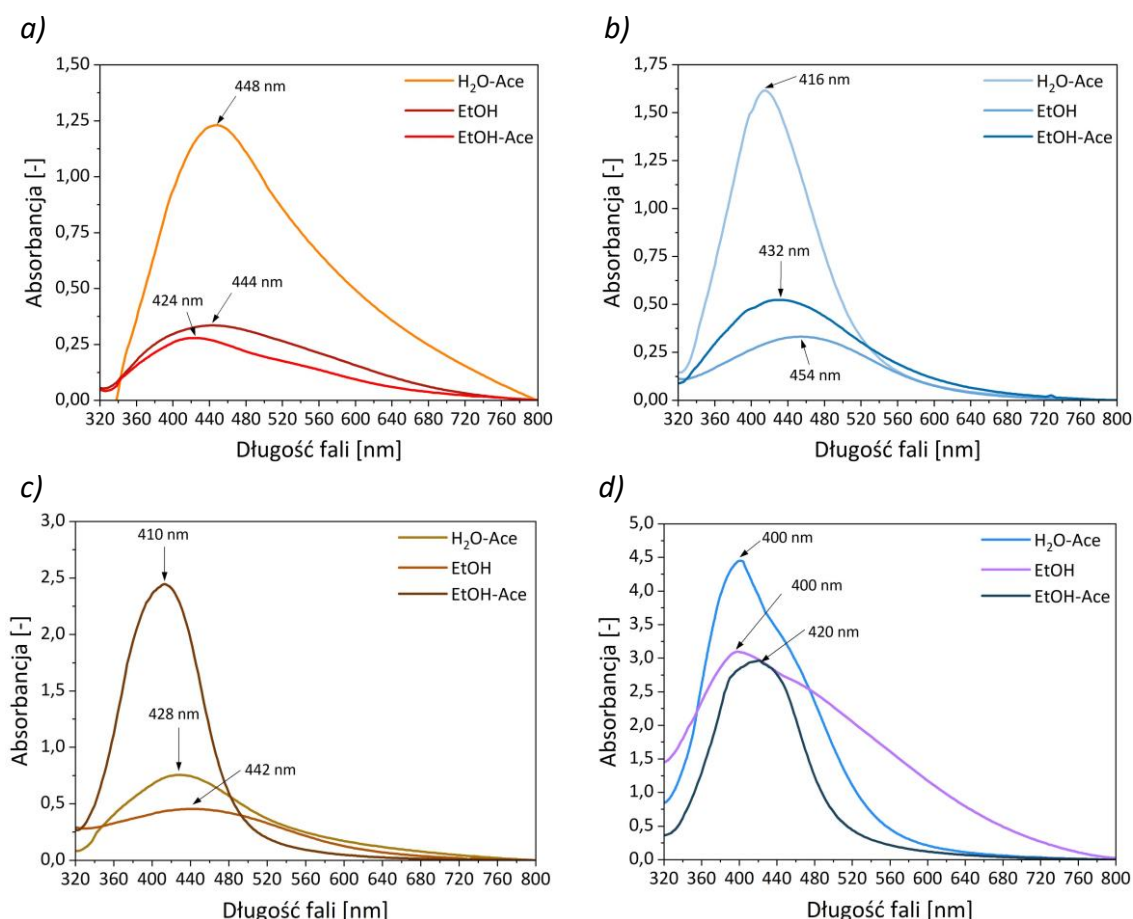


Rys. 52. Schemat procesu tworzenia nanocząstek srebra poprzez redukcję jonów srebra Ag^+ na monomerze DMAEMA wbudowanym w strukturę polimeru gwiaździstego [312].

Formowanie AgNPs przebiega szybciej i z większą wydajnością w roztworach zawierających polimery gwiaździste o większej zawartości DMAEMA w strukturze (STR_1 i STR_3), co można zaobserwować na wykresie zależności maksimum absorbancji pasma charakterystycznego dla nanocząstek Ag od czasu prowadzenia procesu dla badanych roztworów (rysunek 51b i rysunek 51d). Wartości absorbancji pasma charakterystycznego dla AgNPs są wyższe w każdym z badanych roztworów dla wspomnianych polimerów gwiaździstych, co jest bardziej widoczne dla roztworów woda:aceton (H_2O -Ace) i etanol (EtOH). Dla roztworu etanol:aceton (EtOH-Ace) wartość absorbancji jest tylko nieznacznie wyższa. Obserwacja ta potwierdza badania przeprowadzone przez Huang i współpracowników [302], które wykazują wyższą absorbancję dla miceli o wyższej zawartości DMAEMA.

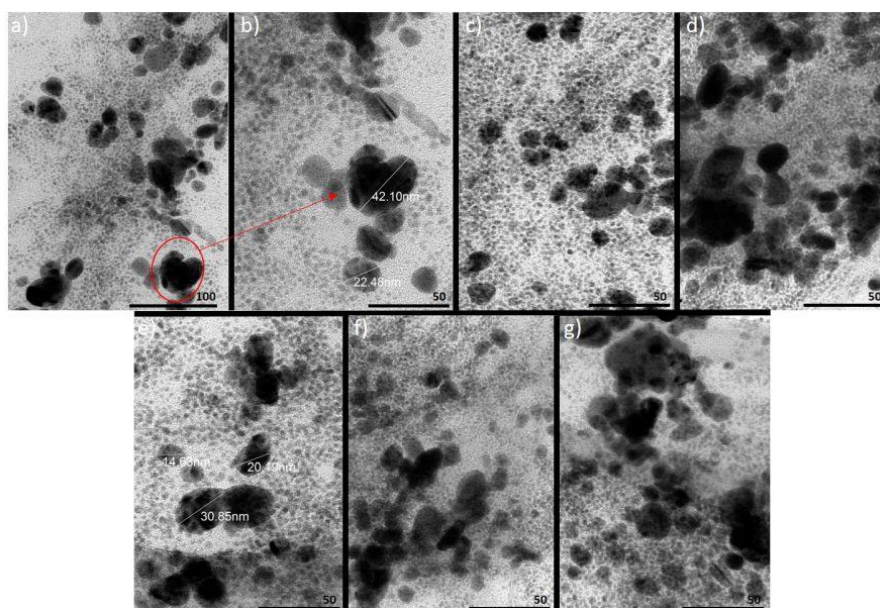
Na podstawie krzywych strącania jonów Ag^+ (rysunek 51) można wyciągnąć wniosek, że znaczący wpływ na tworzenie AgNPs ma medium, w którym prowadzony jest proces. Wpływa ono nie tylko na czas trwania procesu i jego skuteczność, ale także na rozmiar tworzących się nanocząstek Ag. Na podstawie doniesień literaturowych [315,316], w których powiązano wielkość tworzących się nanocząstek Ag z długością fali, przy której występuje maksimum pików na widmie UV-Vis, w ramach pracy przypisano wielkość powstających AgNPs w zastosowanych do badań mediach (różnych roztworów polimerów gwiaździstych). W etanolu tworzenie AgNPs na polimerach gwiaździstych o krótszych ramionach (STR_2 i STR_3) było najwolniejsze

i trwało 10 dni. Powstałe nanocząstki Ag charakteryzowały się dużymi rozmiarami, co potwierdza wartość $\lambda_{\max} \sim 442$ nm dla STR_2 w EtOH, odpowiadająca średnicy $d_{\text{AgNPs}} \sim 70$ nm. W przypadku STR_3 wartość $\lambda_{\max} \sim 400$ nm wskazuje na uzyskanie nanocząstek Ag o średnicy $d_{\text{AgNPs}} \sim 35$ nm. Dla polimerów gwiaździstych o dłuższych ramionach (STR i STR_1) proces strącania jonów Ag^+ prowadzony w etanolu doprowadził do utworzenia nanocząstek Ag o średnicy $d_{\text{AgNPs}} \sim 70$ nm ($\lambda_{\max} \sim 444$ nm) dla STR_1 oraz $d_{\text{AgNPs}} \sim 60$ nm $\lambda_{\max} \sim 432$ nm dla STR. Znacznie szybciej proces strącania jonów srebra zachodził w roztworze H_2O -Ace (w którym tworzą się micelle) i trwał 5 dni dla polimerów gwiaździstych o krótszych ramionach, co doprowadziło do powstania AgNPs o mniejszych rozmiarach: dla STR_2 $d_{\text{AgNPs}} \sim 55$ nm ($\lambda_{\max} \sim 428$ nm) oraz $d_{\text{AgNPs}} \sim 35$ nm ($\lambda_{\max} \sim 400$ nm) dla STR_3. Z kolei, proces otrzymywania AgNPs na STR i STR_1 trwał 10 dni, a uzyskane nanocząstki Ag miały średnicę $d_{\text{AgNPs}} \sim 75$ nm ($\lambda_{\max} \sim 448$ nm) dla STR i $d_{\text{AgNPs}} \sim 40$ nm ($\lambda_{\max} \sim 416$ nm) dla STR_1. Reakcja przeprowadzona na STR_2 i STR_3 w roztworze EtOH-Ace trwała 7 dni, niemniej jednak długość fali, przy której występuje maksimum absorpcji przesunęła się do niższych wartości ($\lambda_{\max} \sim 410$ nm) dla STR_2 i wyższych wartości ($\lambda_{\max} \sim 420$ nm) dla STR_3, wskazując na tworzenie mniejszych nanocząstek w przypadku STR_2 ($d_{\text{AgNPs}} \sim 40$ nm) i większych w przypadku STR_3 ($d_{\text{AgNPs}} \sim 45$ nm). Podobne przesunięcie położenia maksimum absorpcji charakterystycznego pików zaobserwowano dla STR ($\lambda_{\max} \sim 424$ nm), co sugeruje powstanie cząstek o rozmiarze $d_{\text{AgNPs}} \sim 40$ nm. Odwrotnie było dla polimeru gwiaździstego STR_1, dla którego uzyskane AgNPs miały rozmiar $d_{\text{AgNPs}} \sim 80$ nm ($\lambda_{\max} \sim 454$ nm). Rozmiar nanocząstek Ag oszacowano na podstawie długości fali zgodnie z wcześniejszymi badaniami [315,316]. Najbardziej efektywny proces zachodził w roztworze H_2O -Ace dla polimerów gwiaździstych o wyższej zawartości DMAEMA. Jednak dla STR_3 zaobserwowano bardzo wydajne tworzenie AgNPs w każdym roztworze (rysunek 53d). W przypadku STR_2 najbardziej wydajne tworzenie AgNPs odnotowano w roztworze EtOH-Ace i było ono ponad 3 razy bardziej efektywne niż w roztworze H_2O -Ace i 5 razy bardziej efektywne niż w EtOH (rysunek 53c).



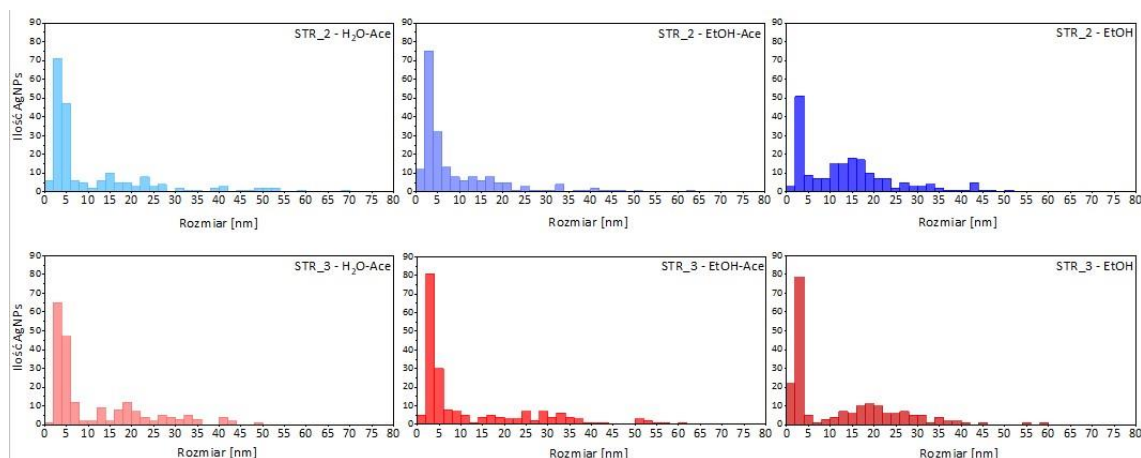
Rys. 53. Widma UV-Vis roztworów polimerów gwiazdzystych po procesie redukcji jonów Ag^+ : a) STR; b) STR_1; c) STR_2 i d) STR_3 w różnych rozpuszczalnikach [312].

Nanocząstki Ag otrzymane w roztworze etanolowym polimeru gwiazdzystego STR_3 charakteryzują się największym rozkładem wielkości cząstek (PSD), co na widmie UV-Vis widoczne jest w postaci bardzo szerokiego pasma absorpcyjnego charakteryzującego się występowaniem maksimum absorbancji przy długości fali $\lambda_{\text{max}} \sim 400$ nm oraz mniej intensywnego sygnału w postaci ramienia (shoulder) w okolicy długości fali $\lambda_{\text{max}} \sim 440$ nm. Sugeruje to tworzenie dwóch rodzajów agregatów AgNPs o rozmiarach cząstek odpowiednio $d_{\text{AgNPs}} \sim 35$ nm i $d_{\text{AgNPs}} \sim 70$ nm. Na widmie roztworu otrzymanego po redukcji jonów Ag^+ w roztworze H₂O-Ace polimeru gwiazdzystego STR_3 zaobserwowano nieznaczne poszerzenie piku absorpcyjnego w okolicy $\lambda_{\text{max}} \sim 420$ nm, co może sugerować obecność dwóch rodzajów agregatów AgNPs, co potwierdzono badaniami przeprowadzonymi metodą TEM (rysunek 54). Nanocząstki Ag otrzymane w roztworze polimeru gwiazdzystego STR również wykazują szeroki rozkład wielkości w każdym rozpuszczalniku, a maksima pików absorpcyjnych w roztworach H₂O-Ace oraz EtOH przy długości fali $\lambda_{\text{max}} \sim 444$ nm sugerują podobny przebieg procesu strącania jonów Ag^+ . Natomiast nanocząstki Ag otrzymane w roztworach polimeru gwiazdzystego STR_1 wykazują wąski rozkład wielkości cząstek niezależnie od typu zastosowanego rozpuszczalnika, jednakże obserwuje się znaczne różnice w wielkości cząstek między poszczególnymi rozpuszczalnikami.



Rys. 54. Obrazy TEM cząstek AgNPs zredukowane na STR_3 w: H₂O-Ace (a, b), EtOH-Ace (c) i EtOH (d), a także STR_2 w: H₂O-Ace (e), EtOH-Ace (f) i EtOH (g) [312].

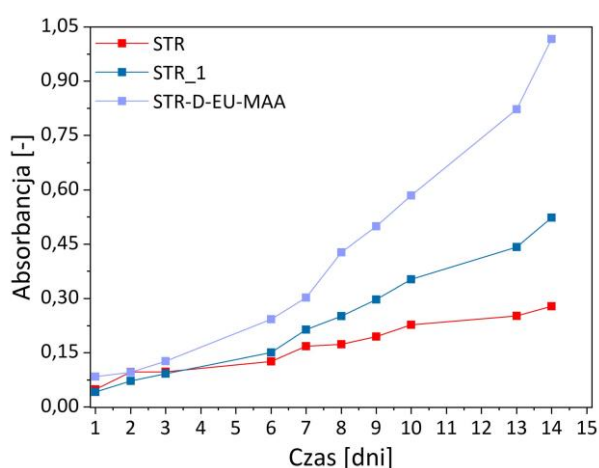
Badania TEM pokazują różne typy agregatów AgNPs generowanych na STR_3 w środowisku H₂O-Ace. Cząstki różnią się rozmiarami, od bardzo małych $d_{\text{AgNPs}} \sim 2$ nm do większych agregatów $d_{\text{AgNPs}} \sim 40$ nm (rysunek 55). Co więcej, cząstki te wykazują kształt kulisty, co potwierdza wyniki uzyskane metodą spektroskopii UV-Vis.



Rys. 55. Rozkład wielkości cząstek obliczony na podstawie obrazów TEM cząstek AgNPs rozproszonych w różnych roztworach STR_2 i STR_3: H₂O-Ace, EtOH-Ace i EtOH [312].

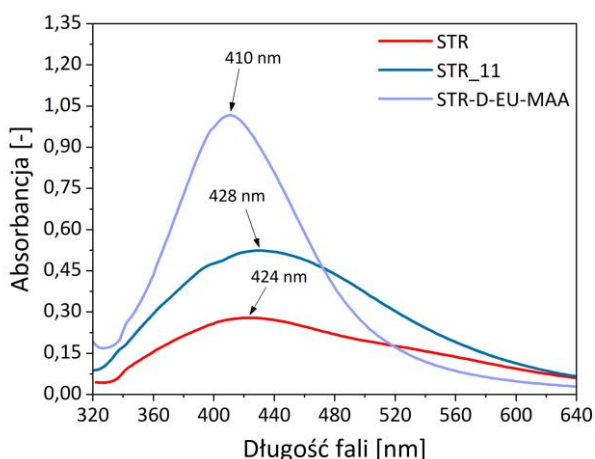
W kolejnym etapie badań redukcję jonów Ag⁺ przeprowadzono dodatkowo na gwieździe polimerowej modyfikowanej eugenolem (STR-D-EU-MAA), który wykazuje właściwości antybakteryjne. Wybrano rozpuszczalnik EtOH-Ace, w którym tworzyły się nanocząstki o małym rozkładzie wielkości, jednocześnie pozwalając na łatwe i szybkie usunięcie rozpuszczalnika po zakończonym procesie redukcji.

Proces ten porównano z tworzeniem AgNPs na polimerach gwiaździstych STR i STR_1, gdyż charakteryzują się one najbardziej zbliżoną budową. Z wykresu zależności maksimum absorpcji charakterystycznego dla AgNPs piku absorpcji na widmie UV-Vis (rysunek 56) widoczne jest, że proces tworzenia AgNPs zachodzi z największą szybkością (i do największych zawartości) w roztworze zawierającym polimer gwiaździsty modyfikowany eugenolem. Jak wspomniano wcześniej większa zawartość DMAEMA w budowie polimeru gwiaździstego przyczynia się do zwiększenia szybkości redukcji jonów srebra, co widoczne jest dla krzywych uzyskanych dla polimerów STR i STR_1. Dzięki temu więcej AgNPs powstaje w roztworze polimeru gwiaździstego STR_1.



Rys. 56. Zależność maksymalnej absorpcji piku charakterystycznego dla nanocząstek srebra od czasu prowadzenia procesu redukcji dla polimerów gwiaździstych STR, STR_1 i STR-D-EU-MAA w rozpuszczalniku EtOH-Ace.

Budowa polimerów gwiaździstych (STR, STR_1, STR-D-EU-MAA) wpływa na szybkość redukcji jonów srebra (rysunek 56), ale ma również wpływ na wielkość tworzących się cząstek AgNPs (rysunek 57). Obecność monomeru EU-MAA prowadzi do utworzenia nanocząstek AgNPs o mniejszych rozmiarach. Może to być spowodowane innym rozkładem segmentów DMAEMA w gwieździe polimerowej, co zwiększa ich dostępność dla jonów srebra i tworzących się cząstek Ag i zapobiega ich agregacji.



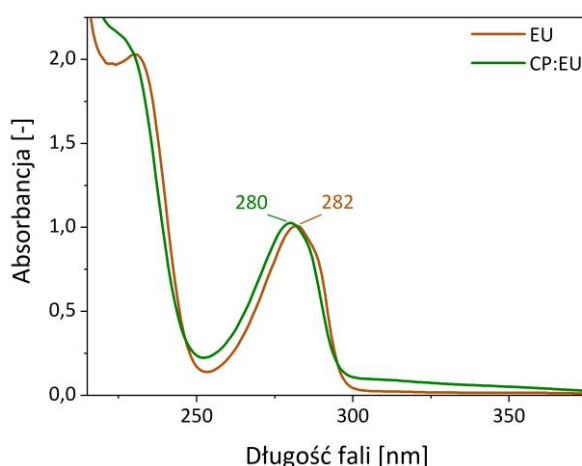
Rys. 57. Widma UV-Vis roztworów polimerów gwiaździstych (STR, STR_11, STR-D-EU-MAA) w EtOH-Ace po procesie redukcji jonów srebra.

Wyższe wartości absorpcji uzyskane dla roztworu zawierającego polimer STR-D-EU-MAA w porównaniu do roztworu zawierającego polimer STR wskazują, że monomer EU-MAA sprzyja redukcji jonów Ag^+ . W strukturze eugenolu występuje allilowe wiązanie $\text{C}=\text{C}$, pierścień aromatyczny i wiązanie estrowe, co skutkuje wysoką gęstością elektronową, która może sprzyjać przyciąganiu jonów srebra. Jak pokazują Yu i współpracownicy [317] kopolimer poli(alkohol winylowy-co-kwas γ -glutaminowy) poli(VA-co-GA) może pełnić rolę środka redukcyjnego dzięki obecności jonu karboksylanowego pochodzącego od kwasu γ -glutaminowego PGA-COO^- .

Otrzymane wyniki wskazują, że obecność monomeru funkcyjnego DMAEMA w strukturze polimeru gwiaździstego umożliwia redukcję jonów srebra i formowanie nanocząstek srebra. Efektywność procesu zależy zarówno od rodzaju medium reakcyjnego, gdzie najszybsze i najbardziej wydajne procesy prowadzono w roztworze EtOH-Ace, a także budowy polimeru, przy czym większa zawartość DMAEMA sprzyja skuteczniejszej redukcji Ag^+ . Co więcej, istotny wpływ na szybkość i wydajność procesu ma długość ramion polimeru gwiaździstego. Krótsze ramiona sprzyjają redukcji jonów Ag^+ , co może być związane z lepszym dostępem jonów srebra do rdzenia polimeru gwiaździstego, przy którym znajdują się jednostki DMAEMA, a tym samym łatwiejszym ich kompleksowaniem. W przypadku polimerów gwiaździstych o dłuższych ramionach, najszybszy i najbardziej wydajny proces redukcji zaobserwowano dla polimeru STR-D-EU-MAA modyfikowanego eugenolem, co sugeruje dodatkowy wpływ struktury eugenolu na proces redukcji jonów Ag^+ . Badania przeprowadzone metodą spektroskopii UV-Vis oraz analiza prowadzona metodą TEM potwierdziły powstawanie nanocząstek o różnej wielkości, zależnie od warunków reakcji. W kolejnych etapach badań uzyskane kompleksy nanocząstek srebra na polimerach gwiaździstych wprowadzono do cementów kostnych w celu nadania tym materiałom właściwości antybakteryjnych, a także poprawy uwalniania leku z matrycy polimerowej.

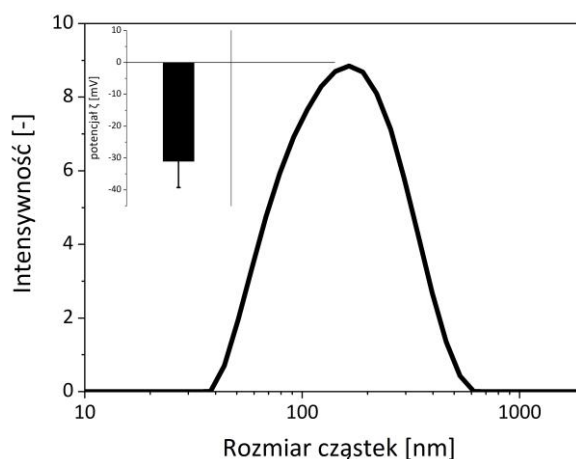
- Komplex z Captisol®

Następny zaprojektowany w ramach proces kompleks oparty był na Captisol® i eugenolu, tj. kompleks CP:EU w stosunku molowym 1:1. Jego otrzymanie potwierdzono metodą spektroskopii UV-Vis. Eugenol jest dobrze rozpuszczalny w etanolu i słabo rozpuszczalny w wodzie, dlatego widmo tego związku metodą UV-Vis wykonano w etanolu. Natomiast kompleks jest rozpuszczalny w wodzie. Po otrzymaniu kompleksu maksimum piku absorpcji eugenolu przesunęło się z wartości 282 nm dla wolnego eugenolu w etanolu do 280 nm dla kompleksu w wodzie (rysunek 58).



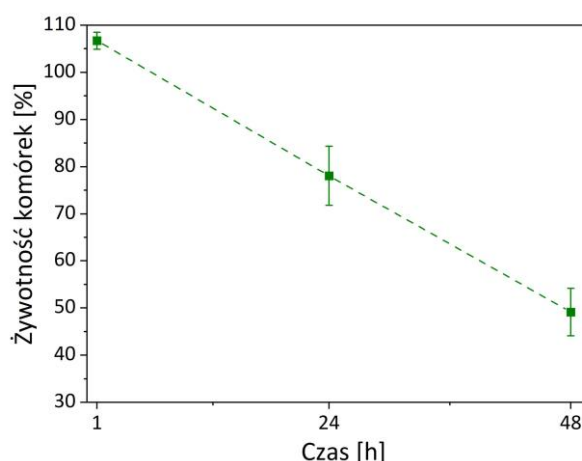
Rys. 58. Widma UV-Vis wolnego EU w etanolu i kompleksu CP:EU 1:1 1 mg/ml w ultraczystej wodzie. $[EU] = 468,4 \mu M$.

Ponadto, kompleks scharakteryzowano metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS). Z krzywej rozkładu wielkości cząstek (rysunek 59) uzyskanej dla kompleksu CP:EU wynika, że średni rozmiar nanoagregatów wynosi 174 nm. Dalsze badania pokazują, że nanokompleks CP:EU wykazuje średnicę hydrodynamiczną (D_H) $\cong 150$ nm, potencjał $\zeta \cong -31$ mV i wskaźnik polidispersyjności (PDI) $\cong 0,05$, co jest zgodne z wcześniejszymi danymi dotyczącymi nanoagregatów opartych na Captisol® [318].



Rys. 59. Rozmiar (lub D_H) i ζ -potencjał (w rogu) kompleksu CP:EU 1:1 w ultraczystej wodzie o stężeniu 1 mg/ml.

Potwierdzenie otrzymania kompleksu CP:EU, jak również jego stabilności pozwoliło na zbadanie jego właściwości antybakteryjnych. Badanie żywotności komórek bakteryjnych w obecności otrzymanego kompleksu przeprowadzono wobec *E. coli*, a uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 60.



Rys. 60. Wpływ kompleksu CP:EU na żywotność komórek bakteryjnych *E. coli* ($n = 3$).

Kompleks CP:EU nie wykazuje aktywności antybakteryjnej przeciwko *E. coli* po 1 godzinie prowadzenia badania, ale w kolejnych godzinach obserwuje się wzrost aktywności przeciwbakteryjnej. Po 24 godzinach żywotność komórek w porównaniu z próbką kontrolną wynosiła $78,1 \pm 6,3\%$, a po 48 godzinach $49,1 \pm 5,0\%$. Potwierdza to przedłużone uwalnianie substancji aktywnej z kompleksów na bazie cyklodekstryn [83,319,320]. Dodatkowo, eugenol charakteryzuje się niską biodostępnością, która może być zwiększona przez kompleksowanie. Kompleksowanie eugenolu z α - i β -cyklodekstryną badał Joardar i współpracownicy [321]. Ich badania wykazały, że β -cyklodekstryna (β -CD) ma wyższe powinowactwo wiązania, jednak oba kompleksy zwiększyły biodostępność eugenolu. Zwiększona biodostępność może skutkować lepszymi właściwościami przeciwbakteryjnymi, co wykazały inne badania przeprowadzone

przez Wanga i współpracowników [322], w których kompleks β -CD:EU ma wyraźny efekt hamujący wobec *E. coli*.

Otrzymany w niniejszej pracy kompleks CP:EU charakteryzuje się właściwościami analogicznymi do podanych w literaturze, co potwierdza jego stabilność oraz prawidłowość przeprowadzonego kompleksowania. Stabilny charakter kompleksu sugeruje jego potencjalną przydatność jako dodatku do cementów kostnych. Dzięki temu możliwe jest dalsze badanie jego wpływu na właściwości fizykochemiczne, mechaniczne oraz biologiczne cementów kostnych, co może przyczynić się do opracowania materiałów o ulepszonych cechach, takich jak zwiększona biokompatybilność, polepszone właściwości antybakteryjne lub kontrolowane uwalnianie eugenolu w środowisku biologicznym.

2.2. Dobór składu cementu

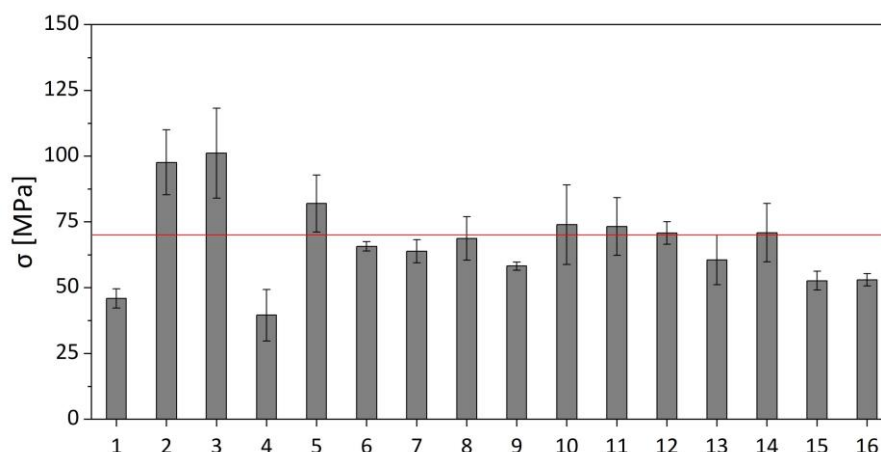
2.2.1. Dobór monomerów

Skład fazy proszkowej cementu kostnego (Eudragit L100 + Eudragit L100-55) został opracowany na podstawie wcześniejszych badań prowadzonych w Zakładzie Polimerów PP [183], które pozwoliły na uzyskanie stabilnej bazy do dalszych modyfikacji. Zastosowane kopolimery metakrylowe zawierają w swojej strukturze kwas metakrylowy. Wybrano je ze względu na możliwość tworzenia wiązań wodorowych. Takie fizyczne sieciowanie, obok chemicznego, w strukturze cementu kostnego może pozwolić na uzyskanie materiału spełniającego wymagania normy ISO 5833:2002 pod względem odporności mechanicznej. Z tego względu w fazie ciekłej zastosowano monomer HEMA, który charakteryzuje się obecnością grupy hydroksylowej w cząsteczce. W niniejszej pracy głównym celem było zoptymalizowanie składu fazy ciekłej (tabela 8), aby uzyskać cement o jak najlepszych właściwościach mechanicznych, przy jednoczesnym zachowaniu odpowiednich parametrów użytkowych. Układ inicjujący zawierał 0,3 %mas. inicjatora BPO i 0,5 %mas. reduktora DMA.

Tab. 8. Skład badanych kompozycji cementu kostnego.

Lp.	POLIMER		MONOMERY							
	K1	K2	EGDM	TEGDM	TtEGDM	HEMA	MMA	BM	IBM	PEG ₆ MEM
1	0,8	0,2	0,15	-	-	0,7	0,15	-	-	-
2	0,8	0,2	-	0,15	-	0,7	0,15	-	-	-
3	0,8	0,2	-	-	0,15	0,7	0,15	-	-	-
4	0,8	0,2	0,15	-	-	0,5	0,15	0,2	-	-
5	0,8	0,2	-	0,15	-	0,5	0,15	0,2	-	-
6	0,8	0,2	-	-	0,15	0,5	0,15	0,2	-	-
7	0,8	0,2	-	0,15	-	0,6	0,05	0,2	-	-
8	0,8	0,2	-	0,15	-	0,5	0,05	0,3	-	-
9	0,8	0,2	-	0,15	-	0,5	0,15	-	0,2	-
10	0,8	0,2	-	0,15	-	0,5	0,15	0,1	0,1	-
11	0,8	0,2	-	0,15	-	0,5	0,15	-	-	0,2
12	0,8	0,2	-	0,15	-	0,3	0,15	-	-	0,4
13	0,8	0,2	-	0,15	-	0,45	-	-	-	0,4
14	0,8	0,2	-	0,15	-	0,5	0,15	0,1	-	0,1
15	0,8	0,2	-	0,15	-	0,4	0,15	-	0,1	0,1
16	0,8	0,2	-	0,15	-	0,4	0,15	0,1	0,1	0,1

Początkowo w fazie ciekłej zastosowano mieszaninę metakrylanu 2-hydroksyetylu (HEMA), metakrylanu metylu (MMA) oraz dimetakrylanu, którym w kolejnych wariantach był dimetakrylan glikolu etylenowego (EGDM), dimetakrylan trietylenoglikolu (TEGDM) lub dimetakrylan tetraetylenoglikolu (TtEGDM). Udział wagowy monomerów ustalono w stosunku masowym 70:15:15 (HEMA:MMA:dimetakrylan). Już na tym etapie zauważono istotne różnice w wytrzymałości na ściskanie otrzymanych cementów kostnych — kompozycja z EGDM osiągnęła najniższą wartość ($45 \pm 3,7$ MPa), natomiast cementy z TEGDM i TtEGDM charakteryzowały się bardzo zbliżonymi, wyższymi wartościami tego parametru, tj. odpowiednio $97,6 \pm 12,4$ MPa oraz $101,1 \pm 17,0$ MPa (rysunek 61). Może być to związane z większą odległością węzłów w sieci w przypadku monomerów TEGDM i TtEGDM niż ma to miejsce w przypadku monomeru EGDM. Dodatkowo, zastosowanie tego samego stosunku masowego monomerów, powoduje, że w przypadku EGDM w mieszaninie występuje większe stężenie wiązań podwójnych, co może skutkować otrzymaniem sieci polimerowej o większej gęstości.



Rys. 61. Wytrzymałość na ściskanie (σ) cementów kostnych o różnym składzie kompozycji utwardzalnej przedstawionym w tabeli 8 ($n = 5$).

W kolejnym etapie, w celu poprawy parametrów mechanicznych cementu, wprowadzono do składu 20 %mas. metakrylanu butylu (BM), równocześnie zmniejszając udział HEMA do 50 %mas. Monomer ten wprowadzono w celu zwiększenia elastyczności cementu kostnego, który podczas próby badania wytrzymałości mechanicznej okazał się być materiałem wytrzymałym, ale kruchym. W przypadku cementu kostnego taka kruchość może być niewskazana ze względu na możliwość odłamywania się jego fragmentów podczas pracy stawów, które są obciążane dużymi siłami. Lepszym rozwiązaniem jest materiał, który ulega zgnieceniu podczas próby ściskania. Metakrylan butylu posiada dłuższy łańcuch alkilowy w podstawniku estrowym, co powinno wpłynąć na zwiększenie elastyczności cementu kostnego, dzięki wywieranemu efektowi plastyfikacji przez grupę butylową. Modyfikacja ta, wbrew oczekiwaniom, spowodowała pogorszenie wytrzymałości wszystkich badanych kompozycji cementu kostnego. Najmniejszy spadek odnotowano dla cementu zawierającego TEGDM, którego wytrzymałość wyniosła 82 MPa, podczas gdy dla cementów z EGDM i TtEGDM wartości te były odpowiednio niższe (40 MPa oraz 66 MPa). Z uwagi na uzyskane wyniki, do dalszych badań wybrano kompozycję zawierającą TEGDM jako monomer sieciujący. Następnie zmodyfikowano proporcje monomerów, zmniejszając zawartość MMA do 5 %mas. i zwiększając udział HEMA do 60 %mas., co przełożyło się na wytrzymałość próbek na ściskanie równą $63,8 \pm 4,4$ MPa. W kolejnym etapie zwiększono ilość BM do 30 %mas., uzyskując nieco lepszy, ale niezadowalający wynik – $68,6 \pm 8,3$ MPa.

Zastąpienie monomeru BM metakrylanem izobutylu (IBM) okazało się mniej korzystne, ponieważ uzyskano próbki o wytrzymałości na ściskanie $58,1 \pm 1,5$ MPa. Z tego powodu przetestowano mieszaninę tych dwóch monomerów, tj. BM i IBM w stosunku masowym 1:1 (20 %mas. całkowitej ilości monomerów), co pozwoliło uzyskać cement kostny o wytrzymałości na ściskanie $73,9 \pm 15,1$ MPa, jednakże próbki wciąż były dość kruche.

W dalszej części badań wprowadzono do składu metakrylan polietylenoglikolu (PEG₆MA) zastępując w składzie kompozycji monomery BM i IBM. Podobnie jak poprzednio, monomer ten zastosowano w celu zwiększenia elastyczności cementu, dzięki obecności podstawnika zawierającego sześć jednostek oksyetylenowych. Dodatkowo, monomer ten ma analogiczną budowę do wybranego monomeru sieciującego TEGDM, oraz grupę hydroksyową, co powinno wpłynąć na poprawę oddziaływań między składnikami kompozycji. W pierwszej próbie zastosowano 20 %mas. PEG₆MA i uzyskano materiał o wytrzymałości $73,2 \pm 11$ MPa. Następnie zwiększono jego zawartość do 40 %mas., redukując ilość HEMA do 30 %mas., jednak wytrzymałość na ściskanie nie uległa poprawie ($70,7 \pm 4,3$ MPa). Kolejna modyfikacja polegała na całkowitym zastąpieniu MMA przez PEG₆MA oraz zmniejszeniu zawartości HEMA do 45 %mas., co doprowadziło do dalszego spadku wytrzymałości na ściskanie do $60,5 \pm 9,5$ MPa. Uzyskane wartości badanego parametru są poniżej lub na granicy wartości przewidzianej przez normę ISO 5833:2002, które są niewystarczające dla tego typu materiału.

Następnie sprawdzono mieszaniny BM:PEG₆MA (1:1) oraz IBM:PEG₆MA (1:1), w których udziały tych par monomerów stanowiły 20 %mas. fazy ciekłej. W obu przypadkach uzyskano materiały o wytrzymałości na ściskanie mniejszej niż w przypadku zastosowania tylko monomeru PEG₆MA, uzyskując odpowiednio wartości $\sigma_{BM:PEG6MA} = 70,9 \pm 11,1$ MPa i $\sigma_{IBM:PEG6MA} = 52,6 \pm 3,6$ MPa. W ostatniej próbie zastosowano mieszaninę trzech monomerów BM, IBM i PEG₆MA w stosunku 1:1:1. Do kompozycji wprowadzono 30 %mas. tych monomerów oraz 40 %mas. HEMA. Uzyskano cement kostny o wytrzymałości na ściskanie analogicznej jak dla mieszaniny IBM:PEG₆MA ($52,9 \pm 2,3$ MPa), a zatem to IBM wpływa na znaczące pogorszenie właściwości materiału.

Podsumowując, wyniki przeprowadzonych testów jednoznacznie wskazują, że optymalnym rozwiązaniem spośród badanych kompozycji okazała się faza ciekła zawierająca 70 %mas. HEMA, 15 %mas. MMA oraz 15 %mas. monomeru sieciującego TEGDM, zapewniająca wysoką wytrzymałość materiału przy zachowaniu jego korzystnych właściwości użytkowych.

Jak wykazano w części literaturowej, w rozdziale 3. *Sposoby modyfikacji akrylowych cementów kostnych*, stosunek fazy proszkowej do fazy ciekłej cementu kostnego istotnie wpływa na właściwości materiałów. Z tego względu, bardzo istotna była optymalizacja stosunku fazy proszkowej do fazy ciekłej (P:L) i analiza wpływu tej proporcji na parametry użytkowe materiału. W badaniach przeprowadzonych w Zakładzie Polimerów PP, opublikowanych częściowo w pracy magisterskiej [323], przygotowano kilka kompozycji cementu kostnego zawierających P:L w stosunku masowym od 1:1 do 1:1,6. Następnie badano ich podstawowe parametry utwardzania, jak czas utwardzania, maksymalna temperatura utwardzania oraz wytrzymałość na ściskanie. Stosunek fazy proszkowej do fazy ciekłej wyraźnie wpłynął na właściwości badanych materiałów. Próbkę BC zawierającą P:L w stosunku 1:1, 1:1,1 i 1:1,2 charakteryzowały się najkrótszym *doughing time* wynoszącym odpowiednio 15, 30 i 30 sekund, który okazał się zbyt

krótkim czasem do przygotowania materiału podczas operacji, dlatego nie były one brane pod uwagę w badaniu wytrzymałości mechanicznej. Z kolei, kompozycje, w których stosunek P:L był powyżej 1:1,4 uzyskiwały t_D przekraczający 5 minut, czyli granicę dla *doughing time* wyznaczoną przez normę ISO 5833:2002, dlatego również nie poddano ich dalszym badaniom. Zaobserwowano, że zwiększenie udziału fazy ciekłej powoduje wydłużenie t_D od 1,6 minuty dla stosunku 1:1,25 do 2,6 minuty dla stosunku 1:1,3. Podobną zależność zaobserwowano dla pomiaru T_{max} , który wzrastał od $47,9 \pm 1,5$ °C dla stosunku 1:1,25 do nawet $79,8 \pm 2,1$ °C dla stosunku 1:1,35. Natomiast w przypadku wytrzymałości na ściskanie uzyskano podobne wartości tego parametru, niezależnie od zastosowanego stosunku P:L, tj. $98,4 \pm 6,2$ MPa dla P:L = 1:1,35, przez $100,3 \pm 7,5$ MPa dla P:L = 1:1,25, do $110,4 \pm 9,7$ MPa dla P:L = 1:1,3.

Przeprowadzone badania wskazują, że optymalny kompromis pomiędzy szybkością wiązania, temperaturą maksymalną utwardzania a odpowiednią wytrzymałością na ściskanie cementu kostnego uzyskano dla stosunku masowego fazy proszkowej do ciekłej wynoszącego 1:1,25.

Podsumowując, w dalszych badaniach stosowano kompozycję cementu kostnego o stosunku masowym P:L równym 1:1,25 oraz następującym składzie: faza proszkowa - 0,8 K1 i 0,2 K2 oraz faza ciekła – 0,7 HEMA, 0,15 MMA i 0,15 TEGDM.

2.2.2. Dobór stężenia składników układu inicjującego

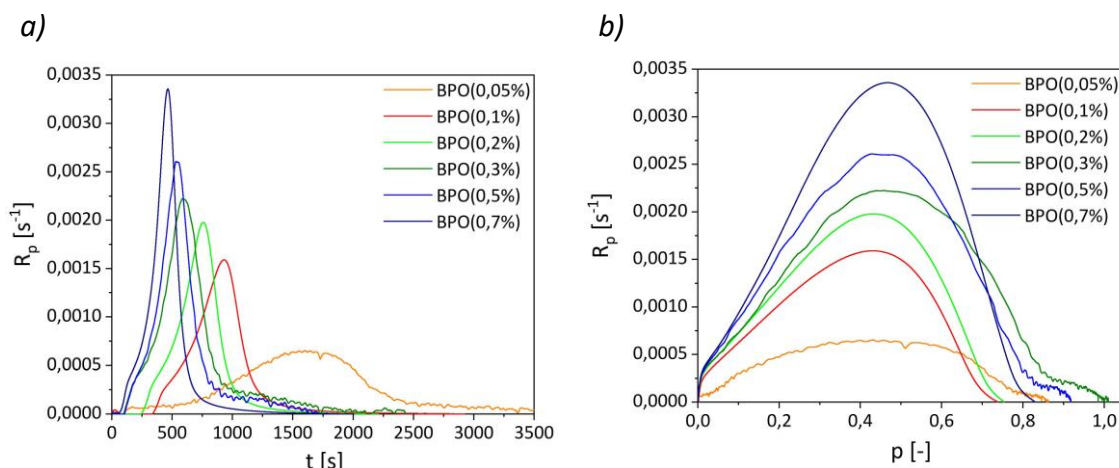
W tej części badań, jako fazę proszkową cementu kostnego zastosowano mieszaninę dwóch różnych kopolimerów metakrylowych oraz mieszaninę monomerów monometakrylowych HEMA+MMA z dimetakrylanem TEGDM jako fazę ciekłą, które zostały dobrane w poprzednim punkcie (2.2.1. „Dobór monomerów”). Na tym etapie postanowiono również sprawdzić wpływ stężenia składników układu inicjującego, tj. BPO i DMA, na przebieg procesu utwardzania i właściwości użytkowe cementu kostnego. Mechanizm rozkładu nadtlenu BPO w obecności trzeciorzędowej aminy DMA z utworzeniem rodników inicjujących przedstawiono w części literaturowej: reakcje R1 – R3. Jest to złożona sekwencja reakcji i nie można jej opisać żadnym prawem Arrheniusa. System inicjowania redoks jest stosowany do inicjowania reakcji polimeryzacji podczas procesu utwardzania cementu kostnego, ze względu na efektywne tworzenie rodników w temperaturze pokojowej. Ilość systemu inicjującego wpływa na szybkość polimeryzacji i konwersję reaktywnych grup monomerów, a tym samym na wzrost temperatury mieszaniny reakcyjnej podczas procesu utwardzania. Temperatura reakcji polimeryzacji (która jest reakcją egzotermiczną) ma kluczowe znaczenie, gdy cement jest utwardzany w ciele pacjenta. Jak już wspomniano wcześniej (część literaturowa, rozdział 2.3.2. *Właściwości użytkowe*), temperatura ta nie powinna przekraczać 90 °C [58], ponieważ może to spowodować martwicę tkanek. Co więcej, czas ekspozycji na wysoką temperaturę powinien być jak najkrótszy. Jednocześnie uzyskany cement kostny powinien być wystarczająco wytrzymały mechanicznie,

aby spełnić swoje zadanie. W związku z tym zbadano wpływ stężenia nadtlenu benzoilu oraz czynnika redukującego DMA na kinetykę polimeryzacji utwardzania cementu kostnego, a także na wytrzymałość na ściskanie otrzymanego materiału. Podczas testów zastosowano niższe stężenie DMA niż BPO, aby uniknąć sytuacji, w której nieprzereagowana amina pozostałaby w cemencie po polimeryzacji, ponieważ może być toksyczna dla organizmu ludzkiego. Aminy aromatyczne wykazują szeroki zakres efektów toksycznych, ale toksyczność ta jest odwracalna. Komórki nie umierają, ale spowalniają swój cykl replikacji, co nie wpływa na proces naprawy tkanki kostnej [324]. Ponadto, jak wynika z reakcji R1 nadtlenek BPO i środek redukujący DMA reagują w stosunku równomolowym [325], co prowadzi do wytworzenia jednego rodnika inicjującego polimeryzację i cząsteczki soli. W niniejszych badaniach proporcje BPO:DMA dobrano w taki sposób, aby zapewnić jak największą konwersję zarówno BPO, jak i DMA.

Jak pisano w części literaturowej, reakcja polimeryzacji przebiega zgodnie z trzema etapami: inicjowania, propagacji i terminacji. Każdy z tych etapów wpływa na cały proces polimeryzacji. Stężenie układu inicjującego (inicjator i ko-inicjator, utleniacz-reduktor) w polimeryzacji redoks wpływa na szybkość reakcji inicjowania (równanie (2)), wpływając tym samym na proces polimeryzacji (równanie (3)) – część literaturowa, rozdział 4.1. *Polimeryzacja wolnorodnikowa*) [187]. Stosowany w badaniach DMA może inicjować reakcję polimeryzacji bez udziału w BPO, tworząc z MMA kompleks przeniesienia ładunku.

W celu zbadania, czy w układzie reakcyjnym stosowanym w niniejszej pracy dochodzi do tworzenia kompleksu przeniesienia ładunku DMA – monomer wykonano pomiary metodą spektroskopii UV-Vis mieszanin metakrylanu metylu oraz monomerów metakrylowych z DMA. Dla porównania wykonano również widmo UV-Vis aminy DMA w etanolu. Na widmie wykonanym dla DMA w etanolu maksimum pik absorpcyjnego zaobserwowano przy długości fali 300 nm i nie zaobserwowano jego przesunięcia na widmach wykonanych dla mieszanin DMA z monomerami. Zatem w badanych układach nie dochodzi do tworzenia się kompleksu przeniesienia ładunku. Co więcej, wstępne pomiary przebiegu polimeryzacji kompozycji cementu kostnego (proszek z fazą ciekłą) z dodatkiem DMA bez inicjatora BPO wykazują na brak wydzielania ciepła. Zatem w badanej mieszaninie nie dochodzi do zainicjowania polimeryzacji przez sam DMA. Tak więc w badanych układach szybkość polimeryzacji jest opisana równaniem (3).

W pierwszym etapie pracy analizowano wpływ ilości nadtlenu benzoilu na kinetykę polimeryzacji przy stałym stężeniu aminy (DMA). W drugim etapie zbadano wpływ ilości czynnika redukującego DMA na proces polimeryzacji. Na rysunku 62 przedstawiono krzywe kinetyczne uzyskane dla kompozycji zawierających różne stężenie nadtlenu BPO w zakresie od 0,05 %mas. do 0,7 %mas. i stałe stężenie reduktora DMA (0,5 %mas.).



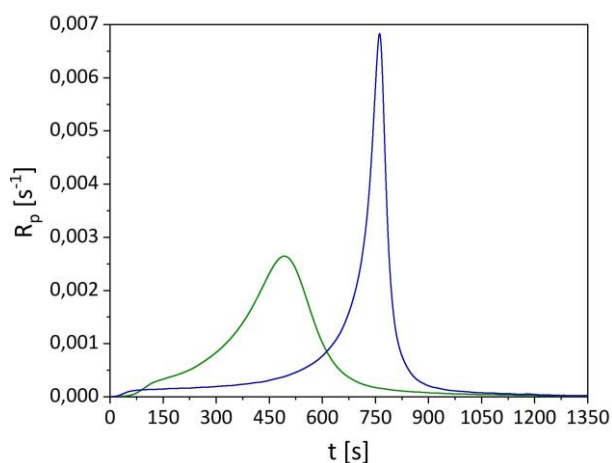
Rys. 62. Krzywe kinetyczne polimeryzacji kompozycji cementu kostnego zawierających różne ilości nadtlenu BPO i 0,5 %mas. reduktora DMA w funkcji a) szybkości polimeryzacji (R_p) od czasu reakcji (t) i (b) R_p od stopnia przereagowania wiązania podwójnego (p).

Wraz ze wzrostem stężenia BPO w kompozycji badanej szybkość polimeryzacji rośnie, a czas potrzebny do osiągnięcia maksymalnej szybkości polimeryzacji (t^{Rm}) jak i czas potrzebny do zakończenia reakcji uległy skróceniu (rysunek 62a). Maksymalną szybkość reakcji polimeryzacji (R_p^{max}) uzyskano w najkrótszym czasie t^{Rm} dla kompozycji zawierającej 0,7 %mas. BPO ($R_p^{max} = 0,00336 \text{ 1/s}$), a czas do osiągnięcia maksymalnej szybkości reakcji wynosił $t^{Rm} = 462$ sekund (ok. 8 minut). Najniższą wartość R_p^{max} wynoszącą $0,000546 \text{ 1/s}$ uzyskano dla kompozycji zawierającej 0,025 %mas. BPO. Ta szybkość polimeryzacji została osiągnięta w czasie t^{Rm} równym 2028 sekund (ok. 34 minut). Bardzo ważnym parametrem w kontekście aplikacji cementów kostnych jest stopień przereagowania, który rośnie wraz ze wzrostem ilości BPO i osiąga najwyższą wartość dla 0,3 %mas. BPO. Dalsze zwiększenie ilości inicjatora skutkuje obniżeniem stopnia przereagowania, co może być spowodowane zbyt dużym stężeniem rodników i ich udziałem w innych reakcjach, takich jak rekombinacja czy terminacja pierwotna.

Wszystkie otrzymane krzywe kinetyczne charakteryzują się występowaniem okresu inhibicji, w którym reakcja nie zachodzi. Może to być spowodowane inhibicją reakcji polimeryzacji wywieraną zarówno przez tlen, jak i inhibitory zawarte w monomerach. Tlen może zostać wprowadzony do próbek m.in. podczas mieszania fazy proszkowej z fazą ciekłą, natomiast inhibitor jest wprowadzany do monomerów przez producentów, aby zapobiec ich przedwczesnej polimeryzacji podczas przechowywania i transportu. W pracy stosowano monomery bez usuwania inhibitora. Zostały one użyte w takiej postaci, w jakiej zostały dostarczone (zakupione). Zatem inhibitor użyty do stabilizacji monomerów może być przyczyną wystąpienia okresu inhibicji. Czas inhibicji pozwolił jednak na wykonanie pomiarów w stabilnych, powtarzalnych warunkach. Okres ten maleje wraz ze wzrostem stężenia nadtlenu benzoilu, którego rodniki są zużywane w reakcji z inhibitorem. Dodatkowo krzywe kinetyczne charakteryzują się obecnością stanu stacjonarnego (ustalonego), który jest najdłuższy dla kompozycji zawierającej najmniejszą ilość

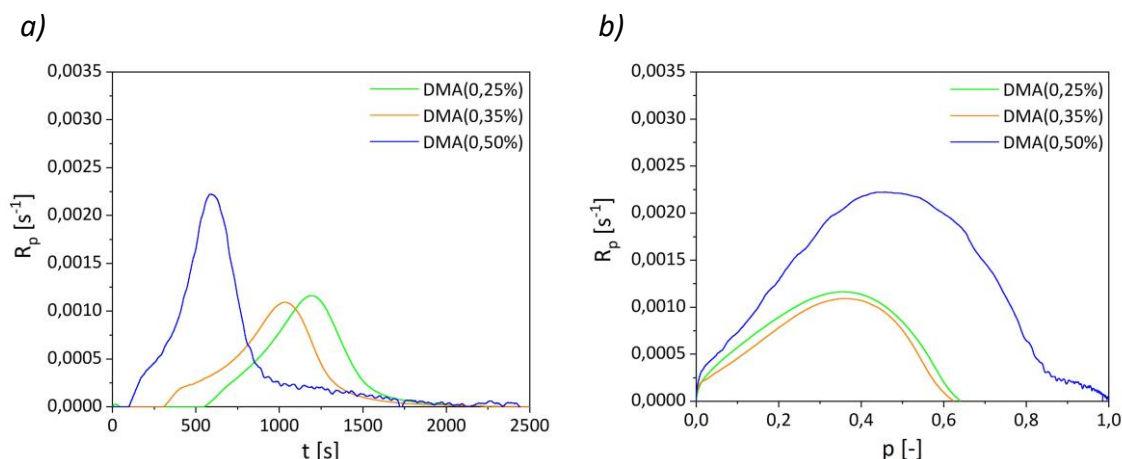
BPO (0,05 %mas.), a dla pozostałych badanych próbek (kompozycje zawierające $\geq 0,1$ %mas. nadtlenu BPO) jest widoczny jako przegięcie na krzywych kinetycznych.

Duża lepkość kompozycji (zawiera ona duże ilości wielkocząsteczkowych kopolimerów), a także tworzenie się sieci polimerowej podczas reakcji (ze względu na obecność dwufunkcyjnego dimetakrylanu glikolu trietylenowego w kompozycji) powodują ograniczenie dyfuzji rodników, a zatem efekt żelu podczas polimeryzacji rozpoczyna się niemal od początku reakcji. Podczas polimeryzacji mieszaniny monomerów, bez dodatku kopolimerów, efekt żelu wystąpił po dłuższym czasie reakcji. Jest to spowodowane mniejszą lepkością polimeryzowanej mieszaniny niż w przypadku mieszaniny monomerów i kopolimerów (rysunek 63). Co więcej, maksymalna szybkość reakcji (R_p^{max}) osiąga niższe wartości podczas polimeryzacji kompozycji zawierających kopolimery, co wskazuje, że wydzielanie ciepła (wzrost temperatury) podczas procesu utwardzania jest mniej gwałtowne, a to może zmniejszyć prawdopodobieństwo martwicy otaczających tkanek. Po osiągnięciu stanu stacjonarnego obserwuje się szybki wzrost szybkości polimeryzacji, tym większy, im wyższe jest stężenie BPO w kompozycji. Wskazuje to, że temperatura cementu podczas utwardzania może wzrosnąć do wyższych wartości dla kompozycji zawierających większe stężenia inicjatora. Przyczynia się to do większego stężenia propagujących rodników, co prowadzi do uzyskania łańcuchów o mniejszej długości i wyższego stężenia tworzonych mikrożeli, co z kolei może wpływać na heterogeniczność struktury cementu. To natomiast może mieć wpływ na odporność mechaniczną uzyskanych materiałów.



Rys. 63. Krzywe kinetyczne polimeryzacji kompozycji cementu kostnego (linia zielona) i mieszaniny monomerów (linia granatowa) zawierającej 0,5 %mas. koinicjatora DMA i 0,1 %mas. inicjatora BPO w funkcji szybkości polimeryzacji (R_p) od (a) czasu reakcji (t).

W drugim etapie badań zastosowano stałe stężenie nadtlenu benzoilu (0,3 %mas.) i różne stężenia koinicjatora *N,N*-dimetyloaniliny w celu znalezienia najlepszego stosunku molowego reduktor:utleniacz dla procesu polimeryzacji badanej kompozycji cementu kostnego (rysunek 64).



Rys. 64. Krzywe kinetyczne polimeryzacji kompozycji cementu kostnego zawierających różne ilości koinicjatora DMA i 0,3 %mas. inicjatora BPO w funkcji a) szybkości polimeryzacji (R_p) od czasu reakcji (t) i (b) R_p od stopnia przereagowania wiązań podwójnych (p).

Stężenie BPO ustalono na poziomie 0,3 %mas. (dla tego stężenia uzyskano największy stopień przereagowania wiązań podwójnych, jak i wystarczająco dużą szybkość reakcji), a DMA na 0,25 %mas., 0,35 %mas. i 0,5 %mas. monomerów.

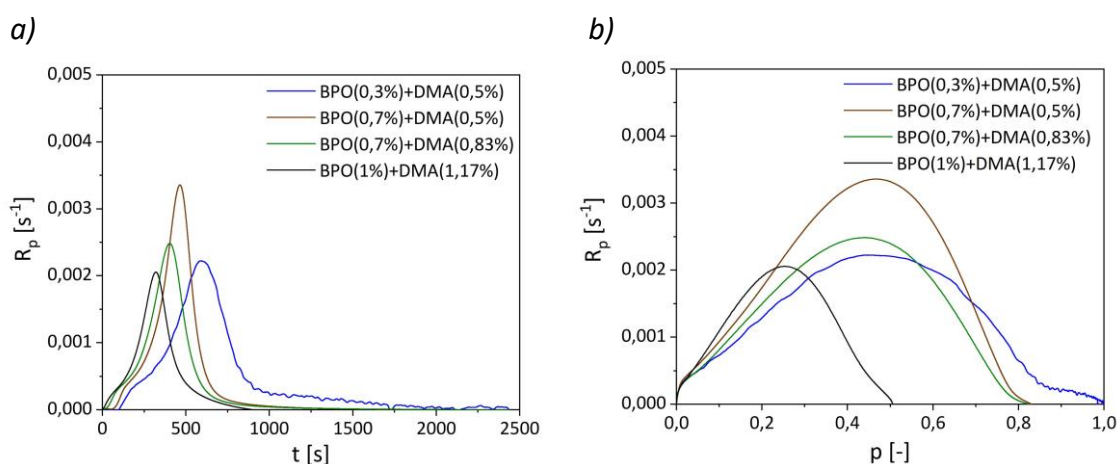
Szybkość polimeryzacji rośnie, a czas reakcji ulega skróceniu wraz ze wzrostem stężenia DMA w kompozycji, co pokazano na krzywych kinetycznych polimeryzacji przedstawionych na rysunku 64. Zależności są więc podobne do tych uzyskanych dla różnych stężeń inicjatora BPO w układzie. Im wyższe stężenie inicjatora lub koinicjatora w kompozycji, tym większa szybkość polimeryzacji i krótszy czas procesu. Maksymalną szybkość reakcji polimeryzacji (R_p^{max}) uzyskano w najkrótszym czasie dla kompozycji zawierającej 0,5 %mas. DMA ($R_p^{max} = 0,00198$ 1/s), a czas maksymalnej szybkości reakcji (t^{Rm}) wynosił 580 sekund (9 minut 40 sekund). Pozostałe dwie kompozycje charakteryzują się podobnymi wartościami maksymalnej szybkości polimeryzacji, ale czas potrzebny do jej osiągnięcia jest dłuższy dla kompozycji zawierającej 0,25 %mas. DMA o około 3 minuty ($t^{Rm} = 1173$ sekund).

Okres inhibicji wydłuża się, gdy w kompozycji polimeryzującej stosuje się mniejsze stężenie DMA, podobnie jak miało to miejsce w przypadku inicjatora BPO. Mniejsze stężenie DMA w kompozycji wpływa na mniejszą szybkość inicjowania (równanie(2)), zmniejszając tym samym szybkość wytwarzania rodników, które są zużywane w okresie inhibicji, powodując wydłużenie czasu tego etapu reakcji. Na przebieg polimeryzacji wpływa również skład kompozycji cementu kostnego. Yang i współpracownicy [103] badali wpływ metakrylanu 2-hydroksyetylu (HEMA) i dimetakrylanu glikolu etylenowego (EGDM) na proces polimeryzacji komercyjnego cementu kostnego Simplex P w warunkach izotermicznych. Wprowadzenie do kompozycji monomeru HEMA spowodowało wydłużenie czasu indukcji, tym większe im większe stężenie HEMA zastosowano. Dodatkowo wystąpił gwałtowny wzrost ilości wydzielonego ciepła reakcji. Pomimo dłuższego czasu polimeryzacji, konwersję monomeru uzyskano na tym samym poziomie. Drugi etap badań polegał na wprowadzeniu monomeru sieciującego EGDM w ilości 0,3%

do komercyjnego cementu kostnego zmodyfikowanego dodatkiem HEMA (15%). Badania kinetyki polimeryzacji tych układów wykazały, że wzrost ilości EGDM skraca początkowy czas polimeryzacji, jednocześnie zwiększając ciepło polimeryzacji.

Najwyższy końcowy stopień przereagowania (p^f) uzyskano w przypadku kompozycji zawierającej 0,5 %mas. DMA. Mniejsze stężenie reduktora powoduje spadek tego parametru o prawie 40%. Stężenie DMA ma zatem większy wpływ na stopień konwersji wiązań podwójnych badanej kompozycji niż stężenie inicjatora BPO.

Na podstawie przeprowadzonych badań kinetyki polimeryzacji dla wybranej kompozycji kopolimerów i monomerów można zatem stwierdzić, że najlepsze warunki reakcji zapewnia zastosowanie układu inicjującego zawierającego 0,3 %mas. inicjatora BPO i 0,5 %mas. koinicjatora DMA. Jednak cementy kostne muszą charakteryzować się odpowiednimi parametrami, jak *doughing time*, czyli czas tworzenia materiału o konsystencji nadającej się do zaaplikowania w miejscu przeznaczenia (organizm pacjenta) i wytrzymałość mechaniczna, pozwalająca zapewnić odpowiednie mocowanie kości lub implantu kostnego. W związku z tym zbadano jeszcze trzy kompozycje, zawierające większe stężenie systemu inicjującego: 0,7 %mas. BPO i 0,5 %mas. DMA; 0,7 %mas. BPO i 0,83 %mas. DMA oraz 1 %mas. BPO i 1,17 %mas. DMA (rysunek 65).



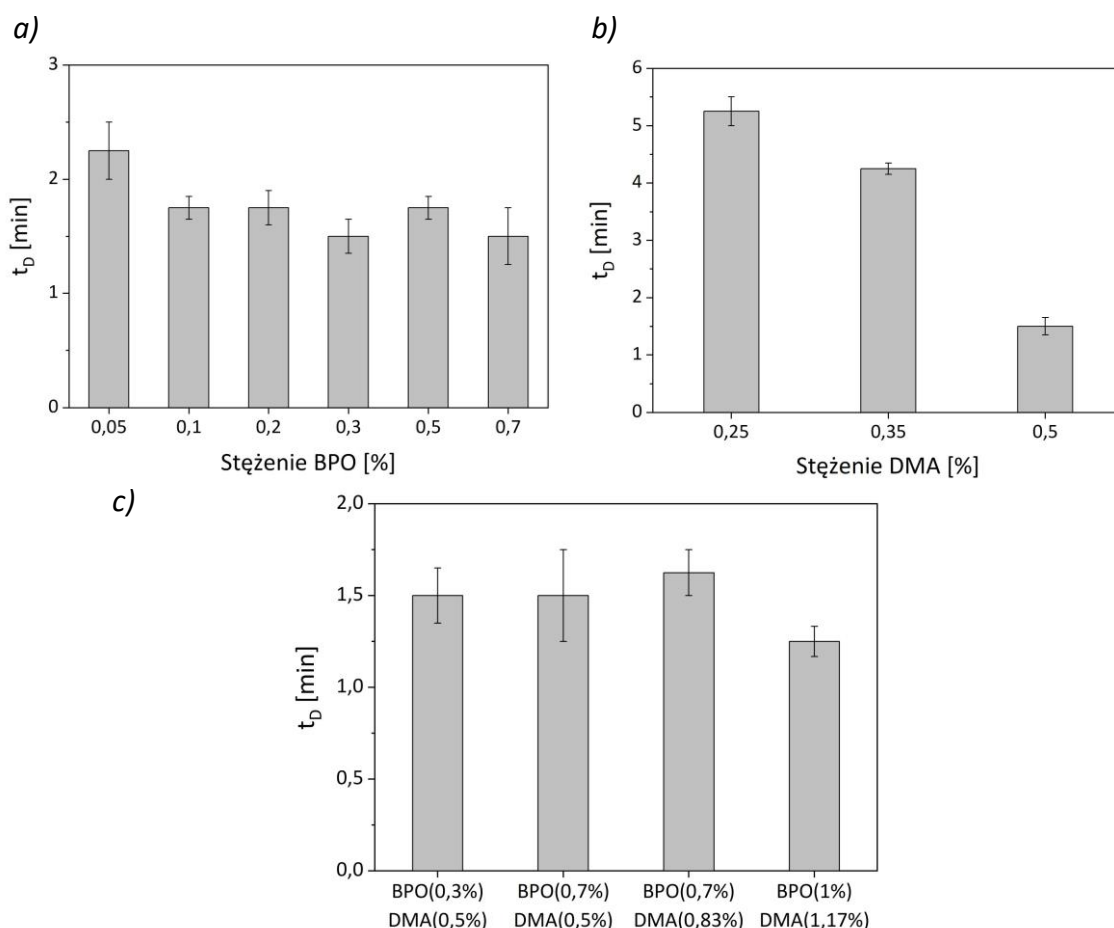
Rys. 65. Krzywe kinetyczne polimeryzacji kompozycji cementu kostnego zawierających różne stężenia składników systemu inicjującego w funkcji a) szybkości polimeryzacji (R_p) od czasu reakcji (t) i b) R_p od stopnia przereagowania wiązań podwójnych (p).

Wraz ze wzrostem stężenia składników układu inicjującego czas potrzebny do zakończenia reakcji ulega skróceniu, podobnie jak czas potrzebny do osiągnięcia maksymalnej szybkości polimeryzacji (t^{Rm}) (rysunek 65a), która dla badanych kompozycji niewiele się zmienia (za wyjątkiem układu BPO(0,7%)+DMA(0,5%)). Maksymalną szybkość reakcji polimeryzacji (R_p^{max}) uzyskano w najkrótszym czasie t^{Rm} dla kompozycji z 1 %mas. BPO i 1,17 %mas. DMA ($R_p^{max} = 0,00206$ 1/s), a czas maksymalnej szybkości reakcji wynosił $t^{Rm} = 323$ sekund (5,4 minuty). Jest to jednocześnie najniższa osiągnięta dla badanych kompozycji wartość R_p^{max} . W tym przypadku również obserwuje się okres inhibicji, którego długość maleje wraz ze wzrostem stężenia układu inicjującego.

Najwyższy końcowy stopień przereagowania (p^f) osiągnęła kompozycja zawierająca najmniejszą ilość systemu inicjującego ($p^f = 96\%$). Co ciekawe, układ z największą zawartością systemu inicjującego charakteryzowała się najmniejszym stopniem przereagowania wiązań podwójnych ($p^f = 51\%$). Jednakże po 24 godzinach stopień przereagowania jest porównywalny z pozostałymi cementami, co zostanie pokazane w rozdziale 2.3.2.3. *Pochodne eugenolu*. Pomiary metodą DSC trwały ok. 20 minut, a jak pokazują badania Migliaresi i inni [47], stopień przereagowania cementów kostnych Sulfix lub Zimmer po 3 i 90 minutach (od wymieszania w 23 °C) wynoszą około 46% i 94%. Świadczy to o tym, że cement kostny osiąga *doughing time* przy ok. 40% przereagowania wiązań podwójnych.

Badania kinetyczne pozwoliły ocenić przebieg procesu polimeryzacji cementów kostnych jak i wpływ stężenia układu inicjującego na jego przebieg. Jest to niezwykle ważny aspekt pracy, gdyż wpływa bezpośrednio na właściwości użytkowe cementów kostnych, decydujące o ich potencjale aplikacyjnym. Poniżej przedstawiono wyniki badań parametru *doughing time*, temperatury utwardzania i właściwości mechanicznych badanych kompozycji.

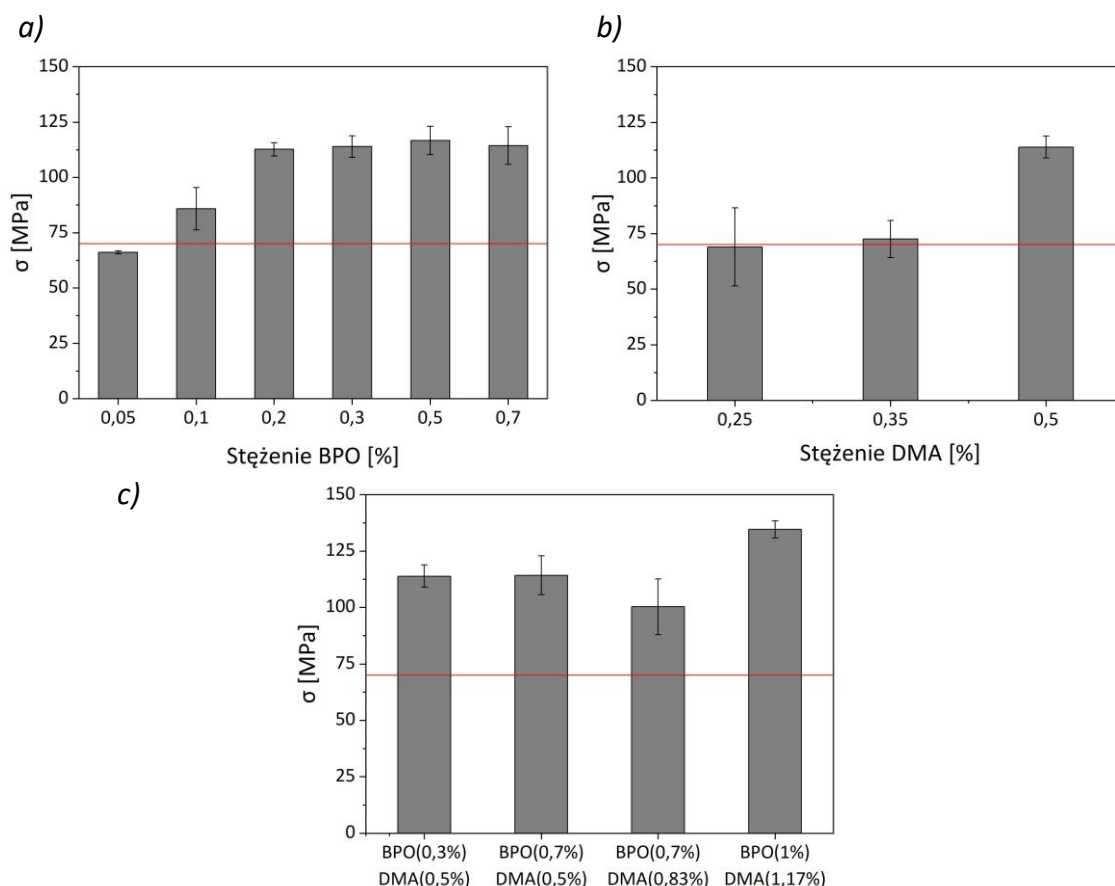
Doughing time (t_D) stanowi kluczowy parametr w procesie przygotowania cementu kostnego przed jego aplikacją. Na rysunku 66a przedstawiono wykres obrazujący wartości parametru *doughing time* (t_D) uzyskane dla kompozycji zawierających różne ilości inicjatora BPO (w zakresie 0,05 – 0,7 %mas.) i stałą ilość reduktora DMA (0,5 %mas.), na rysunku 66b dla kompozycji zawierających różne stężenia DMA (w zakresie 0,25 - 0,5 %mas.) przy stałej zawartości inicjatora BPO (0,3 %mas.) oraz na rysunku 66c dla kompozycji cementu zawierających większe stężenie składników systemu inicjującego.



Rys. 66. Doughing time (t_D) cementów kostnych zawierających (a) 0,5 %mas. DMA i różne ilości inicjatora BPO; (b) 0,3 %mas. BPO i różne stężenia koinicjatora DMA oraz (c) różne ilości systemu inicjującego ($n = 4$).

Doughing time dla każdego stężenia BPO mieścił się w zakresie od 1,5 do 2,5 minuty, przy czym występuje niewielki spadek tego parametru wraz ze wzrostem stężenia BPO dla kompozycji zawierających 0,05 – 0,2 %mas., a następnie dla wyższych stężeń BPO nie obserwuje się zależności t_D od stężenia. Zakres ten jest porównywalny z dostępnymi na rynku cementami kostnymi (m.in. Palacos R, Simplex P, Palamed, Refobacin Plus czy Copal G+C) o t_D od 1,3 do 3,5 minuty. Wyniki te są zgodne z pomiarami przebiegu reakcji polimeryzacji przeprowadzonymi metodą DSC, gdzie wraz ze wzrostem stężenia BPO w kompozycji zaobserwowano skrócenie czasu potrzebnego do uzyskania maksymalnej szybkości polimeryzacji. Dla układów zawierających zmienne stężenie DMA (0,25 – 0,5 %mas.) przy stałej ilości BPO (0,3 %mas.) obserwuje się znaczne skrócenie czasu t_D z 5,5 minuty dla 0,25 %mas. DMA do 1,5 minuty dla kompozycji z 0,5 %mas. DMA. Tak więc, jeśli potrzebny jest dłuższy czas do otrzymania materiału o konsystencji pozwalającej na aplikację, można zastosować mniejsze stężenie koinicjatora DMA. Wpłynie to jednak znacząco na kinetykę polimeryzacji, co przedstawiono w poprzedniej sekcji niniejszej pracy. Zwiększenie ilości układu inicjującego praktycznie nie wpływa na t_D . Obserwuje się nieznaczne skrócenie t_D dla układu z największą ilością systemu inicjującego (do 1,3 minuty), jednakże nie jest to istotna różnica z aplikacyjnego punktu widzenia.

W kolejnym etapie badań testowano właściwości mechaniczne (wytrzymałość na ściskanie) przygotowanych cementów kostnych o różnym stężeniu systemu inicjującego. Maksymalną wartość wytrzymałości na ściskanie (σ) w funkcji stężenia inicjatora BPO (przy stałym stężeniu DMA – 0,5 %mas.) przedstawiono na rysunku 67a, w funkcji stężenia koinicjatora DMA (przy stałym stężeniu BPO – 0,3 %mas.) na rysunku 67b, natomiast z różną zawartością systemu inicjującego na rysunku 67c.



Rys. 67. Wytrzymałość na ściskanie (σ) cementów kostnych zawierających (a) 0,5 %mas. DMA i różne ilości inicjatora BPO; (b) 0,3 %mas. BPO i różne stężenia reduktora DMA oraz (c) różne ilości składników systemu inicjującego ($n = 5$). Minimalna wartość wytrzymałości na ściskanie określona przez normę ISO 5833:2002 (70 MPa) została oznaczona na wykresach jako czerwona linia.

Początkowy wzrost zawartości BPO w badanym układzie, w zakresie od 0,05 do 0,2 %mas., powoduje wzrost wytrzymałości mechanicznej (maksymalnej wytrzymałości na ściskanie) cementu kostnego z wartości $66,1 \pm 0,7$ MPa do ok. $112,7 \pm 3,0$ MPa. Natomiast dalszy wzrost stężenia inicjatora (do 0,7 %mas. BPO) właściwie nie wpływa na dalszy wzrost wartości omawianego parametru. W przypadku badania wpływu stężenia aminy (DMA) na wytrzymałość na ściskanie cementów kostnych, materiał o najlepszych właściwościach uzyskano przy zawartości reduktora 0,5 %mas. Zatem również w przypadku właściwości mechanicznych cement o najlepszych właściwościach uzyskano, gdy zastosowano układ inicjujący o następującym stężeniu: 0,3 %mas. BPO i 0,5 %mas. DMA. W tym przypadku *doughing time* oraz czas potrzebny do osiągnięcia maksymalnej szybkości polimeryzacji są optymalne, stopień konwersji wiązań

podwójnych jest bliski 1, a wytrzymałość na ściskanie mieści się w zakresie określonym normą ISO 5833:2002. Nieznaczny spadek wytrzymałości na ściskanie zaobserwowano dla układu zawierającego 0,83 %mas. DMA, jednakże dalszy wzrost stężenia układu inicjującego poprawił właściwości mechaniczne. Uzyskane wyniki są obiecujące w kontekście projektowania właściwości użytkowych cementów kostnych, jednak konieczne są dalsze badania właściwości otrzymanych materiałów.

W powyższym rozdziale pracy badano wpływ stężenia inicjatora i stosunku składników układu inicjującego inicjator – reduktor na polimeryzację metakrylowych cementów kostnych metodą DSC w warunkach izotermicznych. Zwiększenie ilości BPO przy stałej ilości DMA (0,5 %mas.) spowodowało znaczny wzrost szybkości polimeryzacji i ilości wydzielanego ciepła. W przypadku konwersji wiązań podwójnych wartość tego parametru zależy od stosunku masowego BPO:DMA, a najwyższy stopień konwersji uzyskano dla układu o stosunku masowym BPO:DMA wynoszącym 0,3:0,5. Stopień konwersji wiązań podwójnych powinien być jak najwyższy (najlepiej 100%) ze względu na możliwe toksyczne działanie monomerów uwalnianych z cementu w organizmie pacjenta, jednakże jest to trudne do uzyskania w polimeryzacji metakrylanów, szczególnie z zastosowaniem monomerów wielofunkcyjnych [102]. Uzyskane cementy kostne charakteryzują się stopniem przereagowania zbliżonym do komercyjnych cementów kostnych [24,25].

Zmiana stosunku składników układu inicjującego BPO i DMA w kompozycji nie ma istotnego wpływu na *doughing time* cementów kostnych. Cement z największą ilością systemu inicjującego w składzie, tj. 1 %mas. BPO i 1,17 %mas. DMA, charakteryzuje się najkrótszym *doughing time*. Jednak czasy t_D badanych cementów kostnych są podobne i mieszają się w granicach 1,3 – 2,3 min, co jest porównywalne z komercyjnymi cementami kostnymi. Podobnie, w przypadku DMA, zaobserwowano wydłużenie *doughing time* wraz ze zmniejszającą się ilością DMA. Zmniejszenie ilości reduktora DMA w systemie inicjującym redoks może zmniejszyć ilość rodników generowanych podczas procesu polimeryzacji i spowolnić reakcję polimeryzacji, co również może przełożyć się na właściwości mechaniczne. Wytrzymałość na ściskanie rośnie wraz ze wzrostem stężenia systemu inicjującego do pewnego poziomu, lecz od 0,3 %mas. BPO i 0,5 %mas. DMA różnice w tym parametrze nie są istotne. Manipulacja ilością systemu inicjującego może mieć jednak kluczowe znaczenie przy wprowadzaniu do cementów kostnych dodatków wpływających na ich proces utwardzania, dlatego znając wpływ stężenia systemu inicjującego na właściwości cementów kostnych, możemy odpowiednio dobrać jego stężenie tak, aby uzyskać produkt o pożądanych właściwościach.

2.3. Modyfikacje cementów kostnych

Podstawowy skład cementów kostnych obejmuje głównie kopolimery metakrylanu metylu, co oznacza, że materiały te nie wykazują właściwości antybakteryjnych

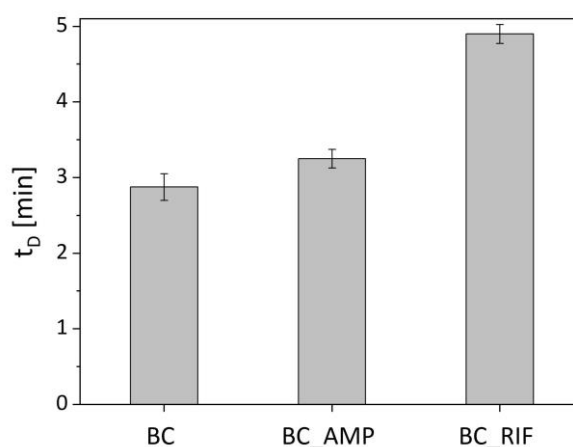
czy kontrastujących. Aby zwiększyć ich funkcjonalność i dostosować do specyficznych zastosowań klinicznych, konieczna jest ich modyfikacja poprzez wprowadzenie do kompozycji odpowiednich substancji. Modyfikacje te mają na celu poprawę właściwości biologicznych, mechanicznych i funkcjonalnych cementów kostnych, a także zwiększenie ich skuteczności w zapobieganiu infekcjom. W niniejszym rozdziale omówiono różne strategie modyfikacji cementów kostnych, ze szczególnym uwzględnieniem substancji antybakteryjnych, systemów dostarczania leków oraz środków kontrastujących.

2.3.1. Modyfikacje antybiotykami

2.3.1.1. Antybiotyki

Dodatek antybiotyków do cementów kostnych jest jedną z najczęściej stosowanych strategii zapobiegania infekcjom pooperacyjnym. Wśród najpopularniejszych antybiotyków wykorzystywanych w tym celu znajdują się gentamycyna i wankomycyna. Jednak ich szerokie zastosowanie doprowadziło do pojawienia się szczepów bakterii opornych na te substancje, co ogranicza skuteczność standardowych preparatów w walce z infekcjami. W związku z tym poszukuje się alternatywnych antybiotyków, które mogą skutecznie przeciwdziałać zakażeniom, a jednocześnie nie wykazują wysokiego stopnia oporności wśród drobnoustrojów. W niniejszym rozdziale omówiono zastosowanie ryfampicyny (RIF) i ampicyliny (AMP) jako potencjalnych dodatków do cementów kostnych. Oba antybiotyki, zostały wprowadzone do składnika proszkowego cementu kostnego w ilości 1 %mas., co pozwala na ocenę ich wpływu na właściwości użytkowe, mechaniczne i biologiczne materiału.

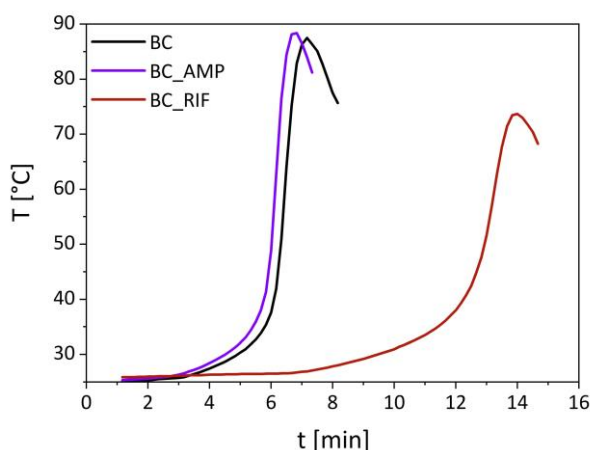
Po przeprowadzonych badaniach, stwierdzono iż dodatek wybranych do testów antybiotyków wpływa na parametry użytkowe cementów kostnych (BC). Wprowadzenie AMP i RIF spowodowało wydłużenie *doughing time* z 2,9 minuty dla niemodyfikowanego cementu kostnego do 3,3 minuty dla BC_AMP i 4,9 minuty dla BC_RIF (rysunek 68).



Rys. 68. *Doughing time* (t_D) badanych cementów kostnych: niemodyfikowanego (BC) oraz modyfikowanych dodatkiem ampicyliny (BC_AMP) lub ryfampicyny BC_RIF ($n = 4$).

W obu przypadkach dodatek antybiotyku wpłynął na wydłużenie czasu utwardzania cementu kostnego (t_D). Jednakże AMP nie zawiera w swojej strukturze chemicznej grup funkcyjnych wpływających na proces polimeryzacji, co sugeruje, że jej wpływ na utwardzanie cementów kostnych jest minimalny. Odmierna sytuacja zachodzi w przypadku ryfampicyny, która zawiera grupy hydrochinonu i piperazyny mogące wyłapywać rodniki, działając jako inhibitor lub retarder polimeryzacji, wydłużając czas sieciowania matrycy cementu kostnego [326]. Efekt ten jest bardzo podobny do zaobserwowanego działania eugenolu, który ze względu na obecność grup fenolowych skutecznie opóźnia proces utwardzania cementów na bazie metakrylanów. McPherson w swojej pracy [327] wskazał na wydłużenie t_D do 5 minut po dodaniu RIF. Natomiast Funk i współpracownicy [326] zanotowali wydłużenie t_D cementu kostnego po dodaniu RIF do 4,5 minut (t_D niemodyfikowanego cementu wynosiło 3,5 minuty), co potwierdza uzyskane w niniejszej pracy wyniki. Zmiany t_D po dodaniu antybiotyków nie są znaczące, a uzyskane wartości tego parametru spełniają wymagania normy ISO 5833:2002.

Badanie procesu utwardzania cementów kostnych potwierdziło przypuszczenia wpływu RIF na przebieg ich polimeryzacji. Krzywa temperaturowa wskazuje na znaczne wydłużenie procesu utwardzania przy jednoczesnym obniżeniu T_{max} (rysunek 69), co potwierdza działanie RIF jako retardera polimeryzacji metakrylanów. Jednocześnie nie zaobserwowano wpływu AMP na proces utwardzania cementów kostnych. Profil utwardzania jest analogiczny i wszystkie parametry są niemal identyczne z uzyskanymi dla niemodyfikowanego cementu kostnego.



Rys. 69. Krzywe temperatury polimeryzacji kompozycji cementu kostnego niemodyfikowanego (BC) oraz modyfikowanych dodatkiem ampicyliny (BC_AMP) lub ryfampicyny BC_RIF w funkcji czasu ($n = 3$).

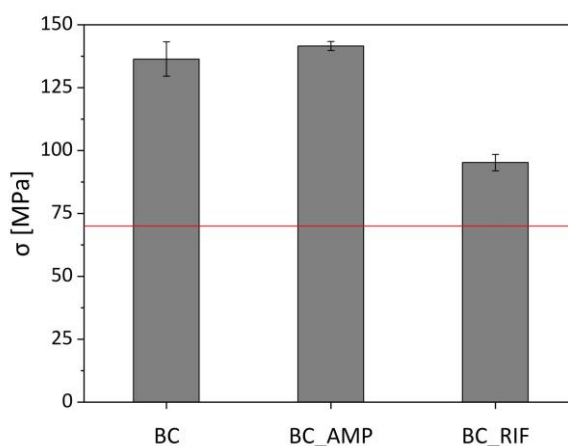
Cement niemodyfikowany BC oraz modyfikowany ampicyliną BC_AMP charakteryzują się wysoką T_{max} oraz krótkim t_{set} (tabela 9). Wartości te są bliskie wartości granicznej dopuszczalnej przez normę ($T_{max} = 90$ °C) [38] i wynoszą odpowiednio 87,5 °C i 6,3 minuty dla BC oraz 88,4 °C i 6,1 minuty dla BC_AMP. Modyfikacja cementu kostnego dodatkiem RIF spowodowała obniżenie T_{max} do 74,7 °C i wydłużenie t_{set} do 12,9 minuty.

Tab. 9. Charakterystyczne parametry utwardzania cementów kostnych – doughing time t_D , maksymalna temperatura T_{max} , temperatura T_{set} oraz czas t_{set} utwardzania, wytrzymałość na ściskanie σ .

Próbka	t_D [min]	T_{max} [°C]	T_{set} [°C]	t_{set} [min]	σ [MPa]
BC	$2,9 \pm 0,2$	$87,5 \pm 0,9$	$56,4 \pm 0,5$	$6,3 \pm 0,5$	$136,4 \pm 6,9$
BC_AMP	$3,3 \pm 0,1$	$88,4 \pm 1,5$	$57,5 \pm 2,3$	$6,1 \pm 0,3$	$141,6 \pm 1,7$
BC_RIF	$4,9 \pm 0,2$	$74,7 \pm 2,9$	$49,2 \pm 0,1$	$12,9 \pm 0,1$	$95,2 \pm 3,3$

Analiza literatury wskazuje na ograniczone doniesienia na temat wpływu dodatku antybiotyków na proces utwardzania cementów kostnych. Jak pokazują badania Carli i innych [129], temperatury maksymalne we wnętrzu cementów kostnych PMMA stosowanych do kości udowej i piszczelowej firm Simplex lub Palacos mieszczą się w wartościach od 77,7 °C dla cementu kości udowej Palacos do nawet 105,2 °C dla cementu kości piszczelowej Simplex. Co więcej, w cemencie kości piszczelowej, temperatury powyżej 60 °C utrzymywały się przez średnio 13 minut, natomiast powyżej 85 °C i 100 °C przez odpowiednio 7 i 3 minuty. Jest to zakres temperatur niebezpieczny dla tkanek ludzkich, jednakże nie powoduje zmiany aktywności biologicznej antybiotyków stabilnych termicznie, tj. wankomycyna, a także antybiotyków wrażliwych na działanie podwyższonej temperatury, tj. ceftazydym. Badania nad dodatkiem antybiotyku RIF do cementów kostnych przeprowadzili McPherson i Portugal [327]. Wskazali oni na częściowe utwardzenie cementu po dodaniu RIF w ilości 600 mg/40 g cementu. Posiadał on półtwardą powierzchnię z gąbczastym wnętrzem po 30 minutach i twardą, gumową konsystencję po 5 dniach. Niestety nie doszło do całkowitego utwardzenia cementu nawet po długim czasie. Z kolei, Funk i współpracownicy [326] zanotowali T_{max} na poziomie 42,5 °C po 45 minutach utwardzania, a czas utwardzania t_{set} wynosił 33 minuty.

Dodatek antybiotyków w postaci proszkowej do cementów kostnych powoduje pogorszenie ich właściwości mechanicznych, jednakże zasięg tego wpływu zależy od ilości i rodzaju zastosowanego antybiotyku [78–80,82,83]. Badania prowadzone w ramach niniejszej pracy wskazują, że wprowadzenie ampicyliny powoduje nieznaczny wzrost wytrzymałości na ściskanie cementów kostnych, z kolei ryfampicyny znaczne pogorszenie tego parametru (rysunek 70).



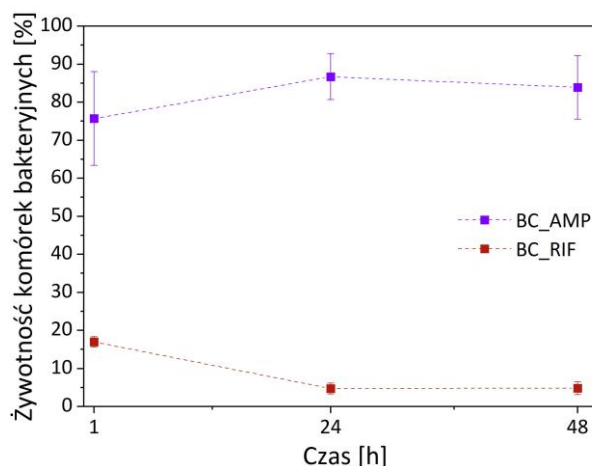
Rys. 70. Wytrzymałość na ściskanie (σ) cementów kostnych: niemodyfikowanego BC i modyfikowanych ampicyliną BC_AMP lub ryfampicyną BC_RIF ($n = 5$).

Cement kostny modyfikowany dodatkiem AMP charakteryzuje się wytrzymałością na ściskanie równą $\sigma_{BC_AMP} = 141,6 \pm 1,7$ MPa podczas gdy niemodyfikowany cement kostny posiada wytrzymałość na ściskanie $\sigma_{BC} = 136,4 \pm 6,9$ MPa. Natomiast modyfikacja RIF spowodowała spadek wartości tego parametru do wartości $\sigma_{BC_RIF} = 95,2 \pm 3,3$ MPa. Mimo znacznego pogorszenia wytrzymałości na ściskanie cementy kostne modyfikowane RIF spełniają wymagania normy. Jak pokazują badania dodatek antybiotyków w różnym stopniu wpływa na właściwości mechaniczne cementów kostnych. W swoich badaniach, Gálvez-López i inni [82] zbadali wpływ 11 różnych antybiotyków na wytrzymałość mechaniczną cementu kostnego CMW. Ich wyniki wskazują na wzrost σ po dodaniu takich antybiotyków jak wankomycyna (VAN), gentamycyna, moksyflokscyna, cefepim, meropenem i ertapenem oraz spadek po dodaniu daptomycyny, ryfampicyny i cefotaksymu. Dodatek RIF spowodował spadek wartości σ do 42,9 MPa, czyli znacząco poniżej dolnej granicy określonej przez normę. Z kolei, Chang i inni [33] wskazują na spadek wytrzymałości na ściskanie cementów kostnych z dodatkiem wankomycyny, tobramycyny oraz imipenemu o odpowiednio 8% (79 MPa), 5% (82 MPa) i 22% (67 MPa), natomiast antybiotyki takie jak: gentamycyna, ceftazydim, piperacylina czy teikoplanina nie powodują zmiany w tym parametrze. Badania przeprowadzone przez Cyphert i innych [83] również pokazują nieznaczny spadek σ po dodaniu tobramycyny ($\sigma = 77,0 \pm 1,2$ MPa) przy $\sigma = 79,6 \pm 1,0$ MPa dla niemodyfikowanego cementu kostnego oraz drastyczny spadek wartości po dodaniu RIF ($\sigma = 1,9 \pm 0,2$ MPa). Negatywny wpływ RIF na wytrzymałość cementów kostnych jest szeroko omawiany. Laperche i inni [328] wskazali na brak istotnego wpływu dodatku RIF w ilości 30 mg i 50 mg do 40 g cementu kostnego na właściwości mechaniczne materiału. Z kolei, dodatek 100 mg spowodował istotny spadek tego parametru, jednakże mieścił się on w granicach normy. Podobne wyniki uzyskali Sanz-Ruiz i inni [329], którzy wprowadzili 500 mg RIF do 40 g cementu kostnego. Wytrzymałość materiałów na ściskanie wynosiła 74 MPa (30% redukcja w porównaniu do niemodyfikowanego cementu). W innych badaniach, Funk i inni [326] wprowadzili 1 g RIF do 40 g cementu, co spowodowało

spadek wytrzymałości tego materiału na ściskanie do 40 MPa. Takie pogorszenie właściwości potwierdzili Gálvez-López i inni w swoich badaniach [82]. Dodatek RIF do cementu kostnego spowodował spadek σ do 43 MPa.

Wpływ modyfikacji cementów kostnych antybiotykami na ich właściwości mechaniczne jest istotny i zależy od rodzaju zastosowanego związku. W przeprowadzonych badaniach w ramach niniejszej pracy cementy modyfikowane ampicyliną wykazały porównywalną wytrzymałość na ściskanie do cementu niemodyfikowanego, co sugeruje, że AMP nie wpływa negatywnie na strukturę cementu. Natomiast modyfikacja ryfampicyną spowodowała znaczne pogorszenie wytrzymałości mechanicznej, przy czym wartości σ nadal mieściły się w granicach normy. Pomimo negatywnego wpływu RIF na wytrzymałość cementów kostnych, niektóre badania sugerują, że stosowanie mniejszych ilości RIF pozwala na utrzymanie właściwości mechanicznych cementu na poziomie spełniającym wymagania normy. Optymalizacja ilości dodawanego antybiotyku RIF może zatem stanowić kluczowy element w projektowaniu cementów kostnych o jednoczesnej skuteczności antybakteryjnej i odpowiednich parametrach wytrzymałości mechanicznej.

Otrzymane cementy kostne modyfikowane antybiotykami AMP i RIF spełniają wymagania normy ISO 5833, dlatego w kolejnym etapie badań przeprowadzono badania właściwości antybakteryjnych. Wyniki badania żywotności komórek bakteryjnych *E. coli* jednoznacznie wskazują na silne działanie antybakteryjne cementów kostnych modyfikowanych ryfampicyną (rysunek 71). Niestety BC_AMP wykazuje jedynie słabe działanie antybakteryjne, które utrzymuje się przez 48 godzin.



Rys. 71. Wpływ cementu kostnego modyfikowanego AMP lub RIF na żywotność *E. coli* ($n = 3$).

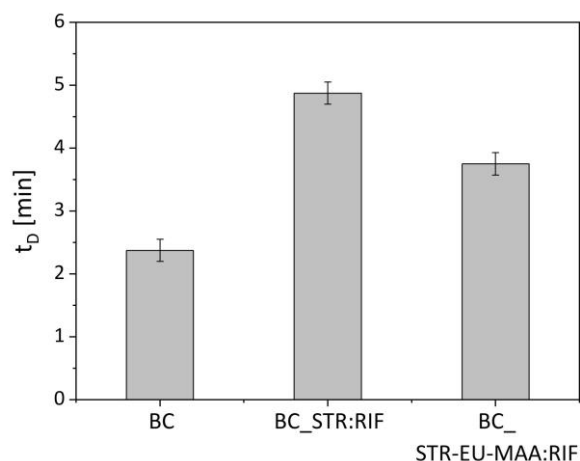
Słaba aktywność antybakteryjna BC_AMP może wynikać z uwalniania antybiotyku z cementu kostnego w niewielkiej ilości, co jest zgodne z doniesieniami Gálvez-López i innych [82] którzy odnotowali bardzo niskie stężenia AMP po 4 dniach uwalniania, poniżej MIC dla wrażliwych bakterii. Podobne obserwacje przedstawili Picknell i inni [330] wskazując na krótkotrwałe działanie

AMP, ograniczone do pierwszych 3 godzin testu. W przeciwieństwie do cementów kostnych modyfikowanych AMP, cementy modyfikowane RIF wykazały silne działanie antybakteryjne już od pierwszej godziny, które utrzymywało się przez 48 godzin. Podobne zależności można odnaleźć w dostępnej literaturze – Laperche i inni [328] potwierdzili działanie antybakteryjne cementów kostnych modyfikowanych dodatkiem 100 mg RIF po 12 i 24 godzinach, a Beeching i inni [331] zaobserwowali efekt hamujący wzrost bakterii przez okres do tygodnia. Otrzymane wyniki jednoznacznie wskazują, że modyfikacja cementów kostnych ryfampicyną zapewnia skuteczne, długotrwałe działanie antybakteryjne, co może mieć istotne znaczenie w zapobieganiu infekcjom w zastosowaniach klinicznych. Jednakże niezbędne jest wyeliminowanie negatywnego wpływu tego antybiotyku na proces utwardzania cementów kostnych.

2.3.1.2. Kompleks polimer gwiaździsty:ryfampicyna

Ryfampicyna dodana do cementów kostnych wpływa negatywnie na proces ich utwardzania i właściwości mechaniczne, co wykazano w badaniach prowadzonych w ramach niniejszej pracy, jak również w literaturze [82,83]. Otrzymane cementy kostne z ryfampicyną nie są twarde, lecz przypominają materiały elastomerowe, co można przypisać efektowi plastyfikującemu antybiotyku. Sugeruje się, że grupy karbonylowe RIF zwiększają wolną objętość między łańcuchami PMMA, w efekcie blokując oddziaływania pomiędzy sąsiednimi łańcuchami PMMA, promując ich względną mobilność i zmniejszając wytrzymałość mechaniczną polimeru [332]. Kompleksowanie RIF odpowiednim związkiem może zablokować grupy plastyfikujące, co zapobiegnie ich oddziaływaniu z łańcuchami polimeru PMMA, hamując w ten sposób efekt plastyfikujący [83]. Polimery gwiaździste ze względu na swoją budowę, wykazują zdolność do kompleksowania kilku moli substancji aktywnej na jeden mol polimeru, co umożliwia efektywne wiązanie również związków nierozpuszczalnych w wodzie. Z tego względu zaplanowano w ramach pracy przygotowanie kompleksu STR:RIF, co zostało z powodzeniem uzyskane, jak pokazano w rozdziale 2.1.4. *Otrzymywanie kompleksów*, w podpunkcie *Kompleksy z polimerami gwiaździstymi*. Następnie otrzymany kompleks zastosowano jako modyfikator cementów kostnych. W niniejszym rozdziale przedstawiono wpływ modyfikacji na właściwości użytkowe cementów kostnych, a także przeanalizowano profil uwalniania leku oraz właściwości antybakteryjne przygotowanych materiałów.

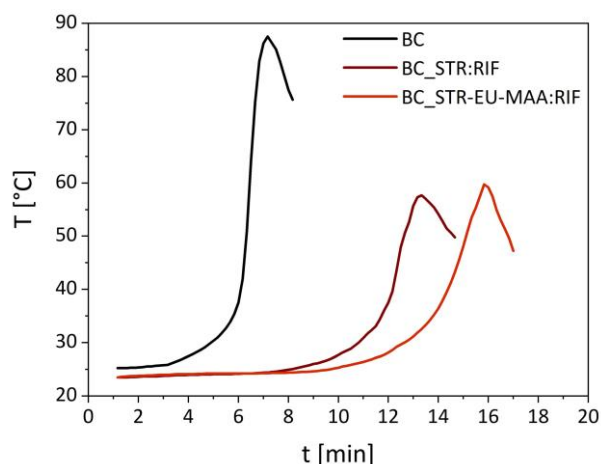
W pierwszej kolejności zbadano wpływ dodatku kompleksu na *doughing time* cementu kostnego. Jak pokazano w poprzednim punkcie, antybiotyk RIF powoduje znaczące wydłużenie t_D (rysunek 68), co również zaobserwowano w przypadku wprowadzenia kompleksu STR:RIF. Dla niemodyfikowanego cementu kostnego (BC) t_D wynosi 2,4 minuty, podczas gdy dla BC_STR:RIF wyniósł on około 5 minut, i dla BC_STR-EU-MAA:RIF 3,75 minuty (rysunek 72).



Rys. 72. Doughing time (t_D) badanych cementów kostnych: niemodyfikowanego BC i modyfikowanych kompleksem STR:RIF i STR-EU-MAA:RIF ($n = 4$).

Wydłużenie czasu t_D zaobserwowane po dodaniu kompleksów do cementu kostnego może świadczyć o niepełnym zablokowaniu negatywnego wpływu RIF na jego utwardzanie. Dodatkowo, obecność samego polimeru gwiaździstego może również wpłynąć na t_D . Niemniej, uzyskane czasy t_D mieszczą się w zakresie wymaganym przez normę ISO 5833:2002 [38].

Zmiany wartości parametru t_D mogą sugerować wpływ dodatków na proces polimeryzacji cementów kostnych, a co za tym idzie na zmianę parametrów ich utwardzania oraz wytrzymałość mechaniczną, dlatego w dalszej kolejności zbadano temperatury charakterystyczne dla cementów kostnych. Krzywe temperatury polimeryzacji dla kompozycji cementu kostnego z STR:RIF i STR-EU-MAA:RIF wyraźnie wskazują na wpływ dodatków na przebieg polimeryzacji (rysunek 73).



Rys. 73. Krzywe temperatury polimeryzacji dla kompozycji cementu kostnego przed modyfikacją oraz modyfikowanego dodatkiem kompleksu STR:RIF i STR-EU-MAA:RIF w funkcji czasu ($n = 3$).

Proces utwardzania cementów kostnych z dodatkiem kompleksów charakteryzuje się dłuższym czasem t_{set} oraz niższą temperaturą T_{max} , które wyniosły odpowiednio 12,3 minuty oraz 52,8 °C dla BC_STR:RIF i 14,3 minuty oraz 57,0 °C dla BC_STR-EU-MAA:RIF, podczas gdy dla niemodyfikowanego cementu kostnego BC wynoszą 6,3 minut oraz 87,5 ± 1,0 °C (tabela 10).

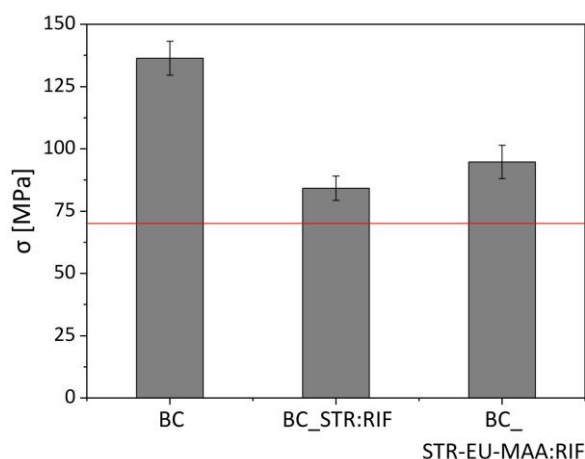
T_{max} oraz t_{set} cementu modyfikowanego RIF wynosiły odpowiednio $74,7 \pm 2,9$ °C i $12,9 \pm 0,1$ minuty, co oznacza, że kompleksowanie RIF w polimerze gwiaździstym pozwoliło na obniżenie T_{max} , przy nieznacznym wydłużeniu t_{set} .

Tab. 10. Charakterystyczne parametry utwardzania cementów kostnych – doughing time t_D , maksymalna temperatura T_{max} , temperatura T_{set} oraz czas t_{set} utwardzania, wytrzymałość na ściskanie σ .

Próbka	t_D [min]	T_{max} [°C]	T_{set} [°C]	t_{set} [min]	σ [MPa]
BC	$2,9 \pm 0,2$	$87,5 \pm 0,9$	$56,4 \pm 0,5$	$6,3 \pm 0,5$	$136,4 \pm 6,9$
BC_STR:RIF	$4,9 \pm 0,2$	$57,7 \pm 2,4$	$39,6 \pm 0,1$	$12,3 \pm 0,2$	$84,2 \pm 4,9$
STR-EU-MAA:RIF	$3,8 \pm 0,2$	$59,7 \pm 4,1$	$41,6 \pm 0,2$	$14,3 \pm 1,2$	$94,8 \pm 6,7$

Uzyskane dane świadczą o wpływie RIF na proces utwardzania cementów kostnych. Obniżenie T_{max} i T_{set} jest pożądane w kontekście aplikacji cementu kostnego, gdyż niemodyfikowany cement wykazuje T_{max} na granicy dopuszczalnej przez normę ($T_{max} = 90$ °C) [38]. Jest to niewątpliwa zaleta dodatku kompleksu. Ponadto, obserwuje się wydłużenie czasów t_{set} , które jednakże mieszczą się w zakresie wymaganym przez normę.

Dodatek kompleksów spowodował duży spadek wytrzymałości na ściskanie cementu kostnego (rysunek 74) do $\sigma_{BC_STR:RIF} = 84,2 \pm 4,9$ MPa i $\sigma_{BC_STR-EU-MAA:RIF} = 94,8 \pm 6,7$ MPa. Jednakże badane materiały nadal charakteryzują się wytrzymałością na ściskanie w granicach normy i porównywalną do osiągniętej wytrzymałości przez cementy komercyjne. Wpływ kompleksów zawierających ryfampicynę na wytrzymałość mechaniczną cementu kostnego jest podobny jak wpływ samego antybiotyku (rysunek 70), co może być wynikiem zarówno negatywnego wpływu antybiotyku, jak i struktury polimeru gwiaździstego.

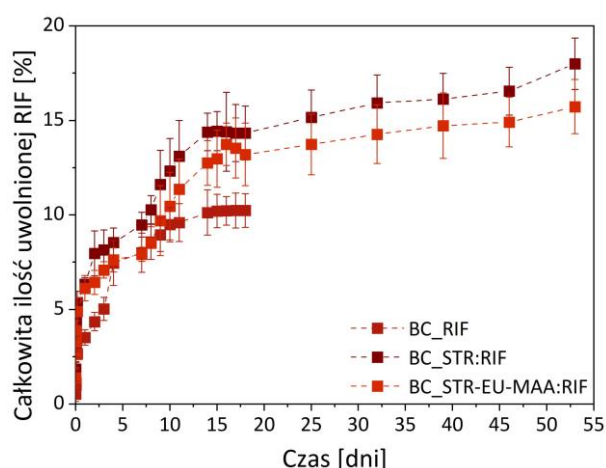


Rys. 74. Wytrzymałość na ściskanie cementu kostnego niemodyfikowanego BC i modyfikowanego kompleksami STR:RIF i STR-EU-MAA:RIF ($n = 5$).

Wpływ ten nie jest tak wyraźny, jak przedstawiony w pracach Gálvez-López i współpracowników [82], czy Cyphert i współpracowników [83],

w których wytrzymałość na ściskanie po dodaniu RIF spadała odpowiednio do 42,9 MPa oraz 1,9 MPa. Dodatek STR–EU-MAA:RIF spowodował podobny spadek wytrzymałości do tego otrzymanego po dodaniu RIF do cementów kostnych – $95,2 \pm 3,3$ (rozdział 2.3.1.1. *Antybiotyki*), natomiast dla STR:RIF spadek ten był większy. Badania przeprowadzone przez Cyphert i współpracowników [83] wykazały, że dodatek 5 %mas. lub 10 %mas. kompleksu ryfampicyny z β -cyklodekstryną (β -CD:RIF) pozwala na uzyskanie wytrzymałości na ściskanie porównywalnej do cementu kostnego zawierającego wolną tobramycynę (5 %mas.: $76,2 \pm 2,3$ MPa; 10 %mas.: $75,8 \pm 1,6$ MPa). Jednakże wartości te jedynie nieznacznie przewyższają minimalne wymagania określone w normie. Z kolei, w badaniach Sanz-Ruiz i współpracowników [329] cementy kostne modyfikowane mikrokapsułkami kopolimeru poli(hydroksymaślanu-co-hydroksywalerianu) PHBV oraz alginianu z RIF wykazywały o 14% niższą wytrzymałość na ściskanie (odpowiednio 91,3 MPa i 91,4 MPa) niż cement niemodyfikowany (106,2 MPa). Jak pokazują badania, kompleksowanie RIF pozwala na obniżenie temperatury polimeryzacji przy nieznacznym wpływie na czas utwardzania cementów kostnych, dzięki czemu dodatek kompleksów ryfampicyny w nośniku leku, jakim jest polimer gwiaździsty, do cementów kostnych pozwala na uzyskanie materiałów o dobrych właściwościach mechanicznych, podobnych do BC_RIF, mimo ich pogorszenia w porównaniu do cementów niemodyfikowanych.

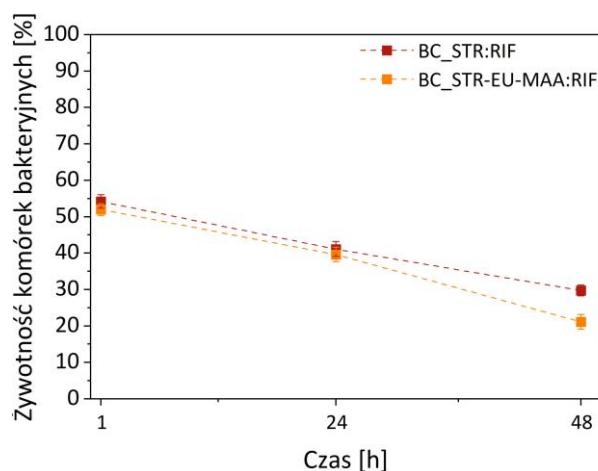
W kolejnym etapie badań przeprowadzono próbę uwalniania antybiotyku z modyfikowanych cementów kostnych, zarówno wolnym antybiotykiem jak i w kompleksie z polimerami gwiaździstymi. Uzyskane profile uwalniania pokazano na rysunku 75. Uwalnianie RIF z BC_RIF trwa przez około 15 dni i charakteryzuje się szybkim wzrostem uwalniania w ciągu pierwszych 4 dni (7,5%), po którym następuje zmniejszenie szybkości uwalniania, które stabilizuje się po 15 dniach na poziomie 10,2%. W celu poprawy uwalniania ryfampicyny (RIF) z cementów kostnych zastosowano jej kompleksowanie w polimerach gwiaździstych. Takie podejście miało na celu zwiększenie efektywności uwalniania antybiotyku w środowisku biologicznym. Uzyskanie cementów kostnych o dobrych właściwościach mechanicznych stworzyło możliwość szczegółowego zbadania kinetyki uwalniania RIF, co stanowi kluczowy etap oceny ich potencjalnej skuteczności terapeutycznej. W początkowym okresie badania obserwuje się szybkie uwalnianie ryfampicyny, osiągające około 10% w ciągu pierwszych 10 dni. Po tej fazie następuje stopniowe spowolnienie tempa uwalniania, co jest charakterystyczne dla systemów opartych na nośnikach polimerowych. Po około 30 dniach krzywe uwalniania obu układów stabilizują się, osiągając wartości na poziomie 15,7% dla BC_STR–EU-MAA:RIF i 18% dla BC_STR:RIF całkowitej ilości RIF. Profil uwalniania jest bardzo podobny do uwalniania antybiotyku z BC_RIF, jednakże okres jej trwania jest znacznie dłuższy.



Rys. 75. Profile uwalniania ryfampicyny z cementów kostnych modyfikowanych antybiotykiem RIF oraz kompleksami STR:RIF i STR-EU-MAA:RIF ($n=3$).

Uwalnianie RIF z BC_RIF charakteryzuje się przebiegiem porównywalnym z doniesieniami literaturowymi. W badaniach Gálvez-López i współpracowników [82] RIF wykazuje stałą kinetykę uwalniania przez 23 dni trwania eksperymentu, po której następuje gwałtowny spadek ilości uwalnianego antybiotyku. Dłuższy czas uwalniania może być związany z użytą przez badaczy większą zawartością RIF w cemencie kostnym, a także jego inną budową morfologiczną, która może wynikać z innego składu fazy proszkowej oraz ciekłej kompozycji. Porównanie układów z kompleksami wskazuje, że cementy zawierające STR:RIF wykazują nieznacznie wyższy poziom uwalniania ryfampicyny w całym okresie badania w porównaniu do układu BC_STR-EU-MAA:RIF. Może to sugerować, że dodatkowa modyfikacja polimeru gwiaździstego zwiększa oddziaływanie między nośnikiem a antybiotykiem, co może przekładać się na trudniejsze, a zatem dłuższe uwalnianie leku. Różnice między systemami pozostają jednak stosunkowo niewielkie, a kinetyka uwalniania jest taka sama, co wskazuje, że oba systemy mogą być skuteczne w kontrolowanym dostarczaniu ryfampicyny, jednocześnie zapewniając zachowanie odpowiednich właściwości mechanicznych cementu kostnego. W badaniach Sanz-Ruiz i współpracowników [329] cementy kostne modyfikowane mikrokapsułkami alginianowymi z RIF uwalniały więcej ryfampicyny niż próbki z mikrokapsułkami PHBV, jednakże uwalnianie charakteryzowało się wysoką skutecznością w pierwszych 24h, kiedy uwolnione zostało 48,89% ryfampicyny zawartej w cemencie kostnym. Z kolei, w badaniach uwalniania *in vivo* ryfampicyny z cementu modyfikowanego mikrokapsułkami z ryfampicyną najwyższe stężenie zarejestrowano 6 godzin po operacji, a krzywa uwalniania charakteryzowała się szybkim uwalnianiem w początkowej fazie, po której nastąpiła wolniejsza faza *plateau* [333]. Uzyskane wyniki wskazują, że przedłużone uwalnianie ryfampicyny z cementów kostnych modyfikowanych kompleksami STR może przyczynić się do utrzymania długotrwałej aktywności antybakteryjnej. Stopniowe i przedłużone uwalnianie antybiotyku w czasie sprzyja skutecznej eliminacji patogenów, co jest kluczowe w zapobieganiu infekcjom okołointplantacyjnym.

Właściwości antybakteryjne modyfikowanych cementów kostnych badano poprzez ocenę żywotności bakterii *E. coli* w okresie 48 godzin (rysunek 76).



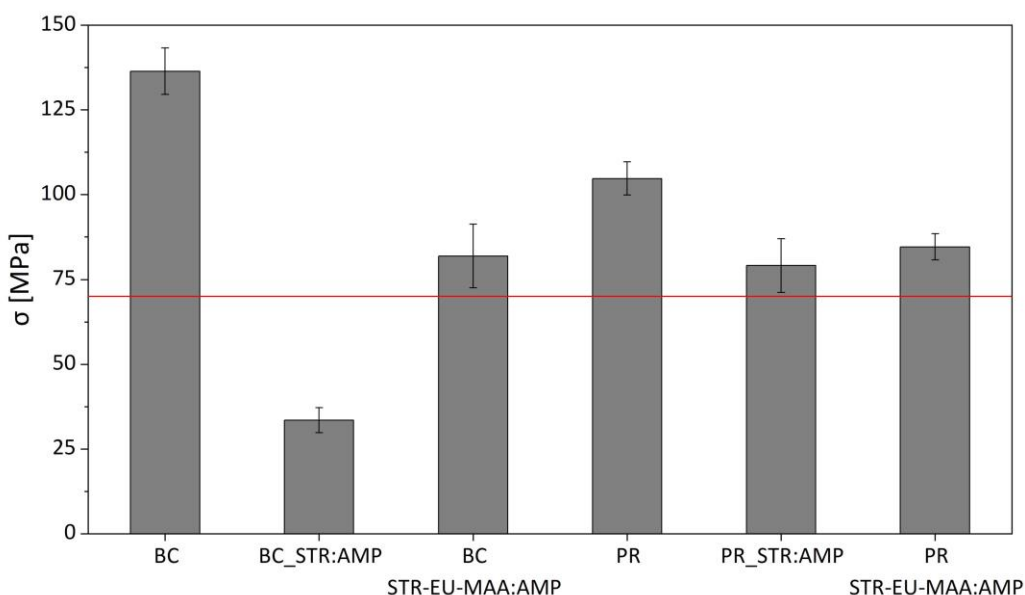
Rys. 76. Wpływ cementu kostnego zmodyfikowanego STR:RIF i STR-EU-MAA:RIF na żywotność *E. coli* ($n = 3$).

Wszystkie testowane próbki wykazywały zależne od czasu zmniejszenie żywotności komórek bakteryjnych, potwierdzając ich skuteczność przeciwdrobnoustrojową. Spośród badanych preparatów, BC_STR:RIF i BC_STR-EU-MAA:RIF wykazały zmniejszoną aktywność przeciwbakteryjną w porównaniu do BC_RIF (rysunek 71). Po upływie 1 godziny wszystkie systemy zmniejszyły żywotność komórek do około 50% wartości kontrolnej. Jednak bardziej wyraźny efekt zaobserwowano z czasem w układach zawierających kompleksy ryfampicyny. Po 24 godzinach żywotność komórek w obecności BC_STR:RIF i BC_STR-EU-MAA:RIF spadła odpowiednio do 41% i 40%. Różnica stała się bardziej widoczna po 48 godzinach, gdzie BC_STR:RIF i BC_STR-EU-MAA:RIF dalej zmniejszały żywotność do odpowiednio 30% i 21%. Możliwe, że eugenol zawarty w strukturze polimeru gwiaździstego zaczyna również wywierać wpływ na komórki bakteryjne. Co ciekawe, Laparche i współpracownicy [328] wykazali brak zahamowania wzrostu bakterii z próbek elucyjnych, jednocześnie wskazując na wyraźne hamowanie bezpośredniego wzrostu biofilmu na powierzchni. Z kolei Beeching i inni [331] wykazali silną aktywność przeciwdrobnoustrojową cementów kostnych z ryfampicyną przeciwko *S. aureus* i słabą przeciwko *E. coli*. Co więcej, badanie *in vivo* przeprowadzone przez López-Torres i współpracowników [333] wykazało znacznie niższy wzrost *S. aureus* w grupie leczonej cementem zawierającym mikrokapsułki ryfampicyny dla próbek uzyskanych z tkanek miękkich i kości niż w przypadku leczenia komercyjną przekładką. Wyniki te sugerują, że kompleksowanie ryfampicyny w polimerach gwiaździstych zwiększa trwałą aktywność przeciwbakteryjną cementów kostnych, prawdopodobnie ze względu na bardziej kontrolowane i przedłużone uwalnianie antybiotyku.

2.3.1.3. Kompleks polimer gwiaździsty:ampicylina

Dodatek ampicyliny do cementów kostnych nie wpłynął na proces utwardzania materiałów ani ich wytrzymałość na ściskanie, jednakże nie uzyskano materiału, który charakteryzowałby się pożądanymi właściwościami antybakteryjnymi. Sposobem na zwiększenie aktywności antybakteryjnej cementów kostnych jest wprowadzenie systemu dostarczania leków, który może wpłynąć na uwalnianie danej substancji aktywnej. Z tego względu postanowiono dodać kompleksy polimerów gwiaździstych z ampicyliną do cementów kostnych i zbadać wpływ czynnika leczniczego na właściwości mechaniczne oraz antybakteryjne materiałów.

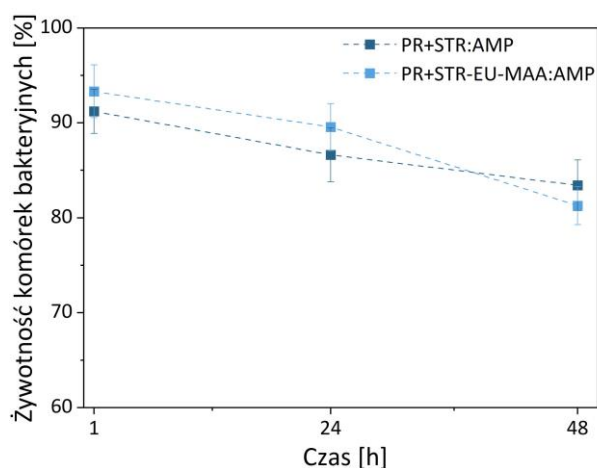
Wprowadzenie STR:AMP i STR-EU-MAA:AMP do kompozycji cementów kostnych spowodowało drastyczne obniżenie wytrzymałości na ściskanie. W przypadku STR:AMP parametr ten spadł poniżej minimalnej wartości wymaganej przez normę ISO 5833:2002 ($\sigma_{BC_STR:AMP} = 33,5 \pm 3,7$ MPa). Z kolei, w przypadku STR-EU-MAA:AMP, mimo pogorszenia wytrzymałości na ściskanie, modyfikowany cement kostny spełnia wymagania normy ($\sigma_{BC_STR-EU-MAA:AMP} = 81,9 \pm 9,4$ MPa). Tak duże zmiany tego parametru doprowadziły do zbadania wpływu kompleksów na niemodyfikowany, komercyjny cement kostny Palacos R (PR). Wprowadzenie STR:AMP również spowodowało obniżenie σ , jednakże uzyskany materiał spełniał wymagania normy ($\sigma_{PR_STR:AMP} = 79,1 \pm 7,9$ MPa). Podobnie jak dla cementu BC mniejszy wpływ dodatku zaobserwowano w przypadku STR-EU-MAA:AMP, a uzyskane cementy charakteryzowały się wytrzymałością na ściskanie na poziomie $\sigma_{PR_STR-EU-MAA:AMP} = 84,6 \pm 3,9$ MPa. Uzyskane wyniki σ przedstawiono na rysunku 77.



Rys. 77. Wytrzymałość na ściskanie (σ) cementów kostnych niemodyfikowanych (BC i Palacos R - PR) i modyfikowanych kompleksami STR:AMP i STR-EU-MAA:AMP.

Pogorszenie wytrzymałości cementów kostnych na ściskanie może być związane z dodatkiem dużej ilości polimeru gwiaździstego do kompozycji cementu kostnego i przez to zmianą jego struktury. Jak wykazano w pracy, dodatek STR wpływa na właściwości mechaniczne cementów kostnych, obniżając ich wytrzymałość. Również doniesienia literaturowe wskazują na pogorszenie właściwości mechanicznych po modyfikacjach cementów kostnych systemami dostarczania leków. Słane i współpracownicy [40] wskazali na pogorszenie właściwości mechanicznych komercyjnego cementu kostnego (Palacos R+G) po dodaniu mezoporowatej krzemionki. Podobnie, mikrosfery żelatynowe [108,109], liposmy [179], czy sfery fosforanu wapnia domieszkowane strontem [91] powodują obniżenie wytrzymałości na ściskanie cementów kostnych.

W dalszej części badań przeprowadzono testy aktywności przeciwbakteryjnej cementu Palacos R modyfikowanego dodatkiem przygotowanych kompleksów. Wyniki przedstawiono na rysunku 78.



Rys. 78. Wpływ cementu kostnego PR zmodyfikowanego kompleksami STR:AMP i STR-EU-MAA:AMP na żywotność *E. coli* ($n = 3$).

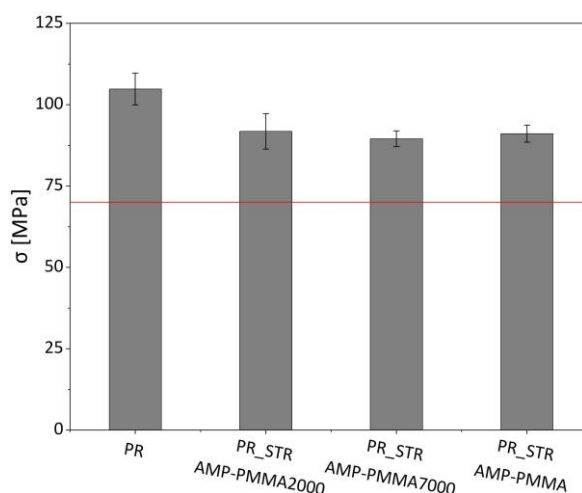
Cementy kostne zawierające kompleksy STR:AMP oraz STR-EU-MAA:AMP wykazują działanie antybakteryjne, prowadząc do obniżenia żywotności komórek bakteryjnych w czasie. Kompleksowanie AMP zwiększyło uwalnianie AMP z cementów kostnych, co pozwala na uzyskanie lepszej oraz przedłużonej aktywności antybakteryjnej w stosunku do BC_AMP (rysunek 71). Gálvez-López i współpracownicy [82] odnotowali bardzo niskie stężenia AMP w roztworze po 4 dniach prowadzenia procesu uwalniania. Podobne obserwacje przedstawili Picknell i współpracownicy [330] wskazując na krótkotrwałe działanie AMP, ograniczone do pierwszych 3 godzin testu. Niemniej, w obu przypadkach obserwowano stopniowy spadek żywotności bakterii w ciągu 48 godzin, co świadczy o utrzymującym się działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Kompleks STR-EU-MAA:AMP wykazuje nieco silniejsze działanie antybakteryjne niż STR:AMP, szczególnie po 48 godzinach inkubacji, co sugeruje, że dodatkowe modyfikacje strukturalne (EU-MAA) polimeru gwiaździstego mogą wzmacniać efekt

antybakteryjny. Różnice te mogą wynikać z bardziej efektywnego uwalniania ampicyliny, wywierania antybakteryjnego wpływu przez eugenol, czy lepszego oddziaływania kompleksu z błoną bakteryjną.

2.3.1.4. Polimer gwiaździsty modyfikowany ampicyliną

Wprowadzenie ampicyliny w postaci kompleksu z polimerem gwiaździstym poprawiło działanie antybakteryjne cementu kostnego, jednak nie spełnił on oczekiwań. Dlatego podjęto kolejne działania mające na celu wprowadzenie zmian w strukturze tego antybiotyku i jego wbudowaniu kowalencyjnym w strukturę polimeru gwiaździstego (rozdział 2.1.3. *Synteza polimerów gwiaździstych*, podpunkt *Polimery gwiaździste modyfikowane AMP*). Modyfikowane polimery gwiaździste zastosowano jako dodatek do komercyjnego cementu kostnego Palacos R. Uzyskane materiały poddano badaniu wytrzymałości na ściskanie oraz badaniu aktywności antybakteryjnej wobec *E. coli*.

Wprowadzenie modyfikowanych polimerów gwiaździstych spowodowało spadek wytrzymałości na ściskanie cementów kostnych. Dodatkowo, otrzymane wartości mieściły się w granicach normy ISO 5833:2002 (rysunek 79). Przy czym uzyskano wyższe wartości tego parametru niż dla cementu modyfikowanego kompleksem STR:AMP.

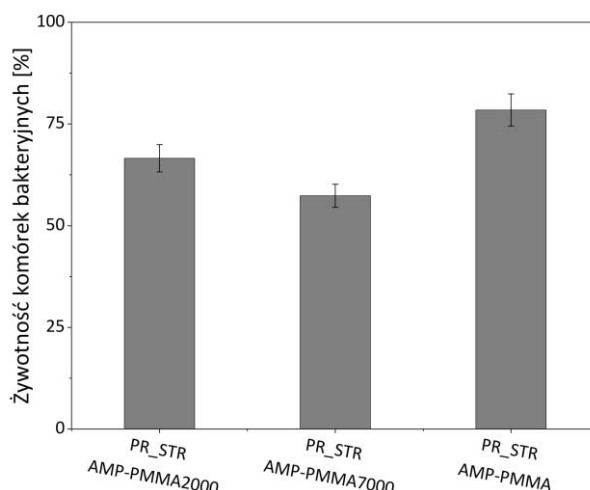


Rys. 79. Wytrzymałość na ściskanie (σ) cementu kostnego Palacos R (PR) niemodyfikowanego i modyfikowanego polimerami gwiaździstymi STR-AMP-PEG₄-PMMA₂₀₀₀, STR-AMP-PEG₄-PMMA₇₀₀₀ i STR-AMP-PEG₄-PMMA.

Spadek wytrzymałości na ściskanie cementu kostnego po modyfikacji polimerami gwiaździstymi STR-AMP-PEG₄-PMMA₂₀₀₀, STR-AMP-PEG₄-PMMA₇₀₀₀ i STR-AMP-PEG₄-PMMA był porównywalny we wszystkich badanych wariantach i wynosił ok. 14,5%. Jak wykazano wcześniej, obecność rozgałęzionych struktur polimerowych może negatywnie wpływać na właściwości mechaniczne cementów. Przykładowo, badania Tham i współpracowników [30] wykazały 4% spadek wytrzymałości cementu kostnego na zginanie po zastąpieniu liniowego PMMA ($M_w = 12\ 000$) czteroramienną gwiazdą PMMA ($M_w = 45\ 000$). W niniejszej pracy zastosowano

polimery gwiaździste o wyższej masie cząsteczkowej i większej liczbie ramion, co może dodatkowo intensyfikować ten efekt.

Modyfikowane cementy kostne poddano badaniu aktywności antybakteryjnej wobec *E. coli*. Badanie prowadzono przez 24 godziny, a uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 80.



Rys. 80. Wpływ cementu kostnego modyfikowanego polimerami gwiaździstymi STR–AMP-PEG₄-PMMA₂₀₀₀, STR–AMP-PEG₄-PMMA₇₀₀₀ i STR–AMP-PEG₄-PMMA na żywotność *E. coli* po 24h inkubacji ($n = 3$).

Na podstawie przeprowadzonych badań aktywności antybakteryjnej wobec *Escherichia coli* po 24 godzinach inkubacji, stwierdzono, że cementy kostne zawierające polimery gwiaździste z kowalencyjnie związanym antybiotykiem wykazują istotnie obniżoną żywotność komórek bakteryjnych. Jak przedstawiono na rysunku 80, najwyższą skuteczność przeciwdrobnoustrojową zaobserwowano w przypadku modyfikowanego cementu kostnego zawierającego STR–AMP-PEG₄-PMMA₇₀₀₀, w obecności którego żywotność bakterii spadła do około 57%. Nieco mniejszy efekt wykazano dla cementu kostnego modyfikowanego STR–AMP-PEG₄-PMMA₂₀₀₀, natomiast najmniejszą aktywność obserwowano w przypadku cementu kostnego zawierającego STR–AMP-PEG₄-PMMA o największej masie cząsteczkowej. Może to wynikać z mniej efektywnej dyfuzji leku lub ograniczonego kontaktu z drobnoustrojami. Wyniki te wskazują, że architektura zastosowanego nośnika ma istotny wpływ na skuteczność działania antybiotyku, a struktury gwiaździste zawierające związany kowalencyjnie antybiotyk zapewniają bardziej korzystny profil uwalniania substancji czynnej i wyższą skuteczność biologiczną niż zastosowanie kompleksu polimer gwiaździsty:antybiotyk.

2.3.2. Modyfikacje eugenolem

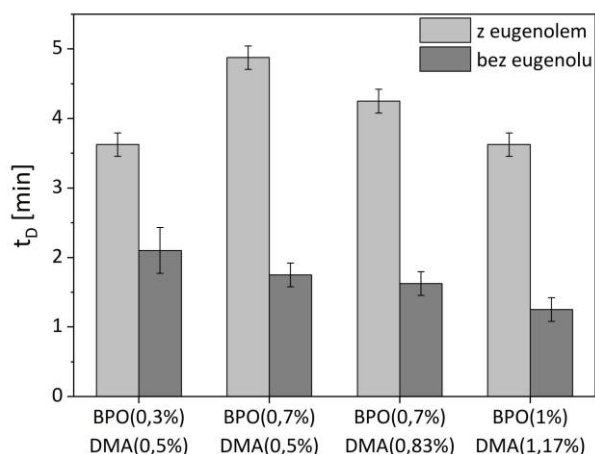
Antybiotykooporność stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego na całym świecie i wymaga poszukiwania innowacyjnych metod zwalczania infekcji bakteryjnych. W tym kontekście olejki eteryczne, które charakteryzują się właściwościami antybakteryjnymi są postrzegane jako substancje aktywne, które mogą stać się alternatywą do stosowania

antybiotyków [334–336]. Szczególnie, istotne jest to w kontekście odmiennego mechanizmu działania olejków eterycznych od mechanizmów typowych dla konwencjonalnych antybiotyków. Można tu wymienić zakłócanie integralności błon komórkowych bakterii, hamowanie działania pomp wypływowych, czy zwiększanie przepuszczalności błon [337,338]. Dodatkową zaletą wielu naturalnych związków jest ich niska toksyczność oraz biodegradowalność, co czyni je atrakcyjnymi także z punktu widzenia ochrony środowiska [339–341].

2.3.2.1. Eugenol

Zastosowanie olejków eterycznych jako środków przeciwbakteryjnych w farmacji i medycynie było inspiracją do modyfikacji cementów kostnych eugenolem (EU), który zastosowano w ilości 0,5 %mas. W pierwszej kolejności, zbadano jego wpływ na właściwości fizyczne otrzymanych materiałów. Zmodyfikowane cementy kostne scharakteryzowano poprzez oznaczenie takich parametrów, jak *doughing time*, maksymalna temperatura i czas wiązania oraz właściwości mechaniczne. Było to kluczowe ze względu na budowę chemiczną EU, która ma wpływ na przebieg polimeryzacji, powodując zmniejszenie szybkości reakcji, a co za tym idzie mniejszy wzrost temperatury utwardzanego materiału. Jednakże, jak pokazują badania, nie ma negatywnego wpływu na stopień konwersji monomerów metakrylowych [271]. Zmiana przebiegu polimeryzacji może wpływać na właściwości uzyskanych materiałów. Dodatkowo zbadano również proces uwalniania EU z przygotowanych materiałów jak i ich właściwości antybakteryjne.

Istotnym parametrem użytkowym cementów kostnych jest *doughing time*, który jest kluczowy dla procesu aplikacji cementu kostnego podczas operacji. *Doughing time* dla badanych cementów kostnych zarówno modyfikowanych, jak i niemodyfikowanych eugenolem przedstawiono na rysunku 81. Modyfikacja cementu kostnego eugenolem spowodowała wydłużenie parametru *doughing time*, co może być spowodowane negatywnym wpływem EU na przebieg polimeryzacji, który wykazano w literaturze [271]. Dla niemodyfikowanego cementu kostnego *doughing time* wynosił od 1,25 do 2,1 minuty, natomiast dla zmodyfikowanych cementów kostnych wyniósł między 3,6 a 4,9 minuty. Zwiększenie ilości systemu inicjującego wpływa na skrócenie *doughing time*, jak pokazano w rozdziale 2.2.2. oraz publikacji „*Influence of Initiator Concentration on the Polymerization Course of Methacrylate Bone Cement*” [57]. W przypadku cementów kostnych modyfikowanych eugenolem najkrótszym *doughing time* (3,6 minuty) charakteryzowały się cementy kostne zawierające 1 %mas. BPO i 1,17 %mas. DMA oraz 0,3 %mas. BPO i 0,5 %mas. DMA, a najdłuższym *doughing time* (4,9 minuty) cement kostny z 0,7 %mas. BPO i 0,5 %mas. DMA.



Rys. 81. *Doughing time* (t_D) badanych cementów kostnych niemodyfikowanych i modyfikowanych eugenolem zawierających różne stężenie systemu inicjującego ($n = 4$).

Dodatek EU spowodował znaczne wydłużenie *doughing time* badanego cementu kostnego, co może być związane z wpływem EU na kinetykę polimeryzacji [270]. Zgodnie z obowiązującą normą ISO 5833:2002, maksymalna dopuszczalna wartość tego parametru wynosi 5 minut, co oznacza, że wszystkie testowane modyfikowane eugenolem cementy kostne spełniają wymagane kryterium [38].

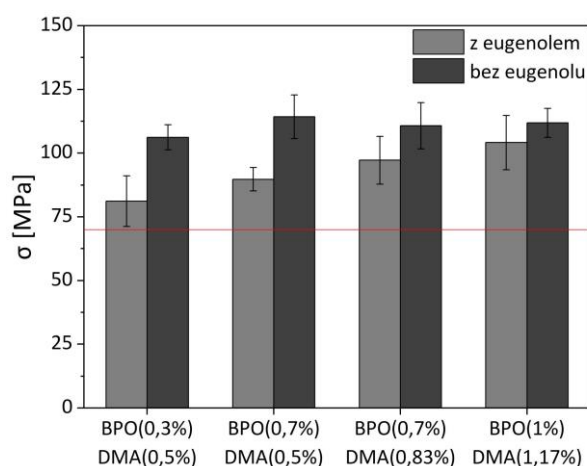
Wprowadzenie EU do cementu kostnego spowodowało również zmniejszenie maksymalnej temperatury utwardzania oraz wydłużenie czasu wiązania – podobnie jak zaobserwowano wcześniej w przypadku parametru *doughing time*. Maksymalna temperatura utwardzania badanych niemodyfikowanych cementów kostnych mieści się w zakresie od $47,9 \pm 3,4$ °C do $87,5 \pm 0,6$ °C (tabela 11), podczas gdy dla modyfikowanych cementów kostnych w zakresie od $21,2 \pm 0,1$ °C do $23,5 \pm 0,1$ °C (tabela 11). Najmniejszą wartość T_{max} zarejestrowano dla modyfikowanego cementu kostnego zawierającego następujące stężenie składników układu inicjującego: 0,3 %mas. BPO i 0,5 %mas. DMA. Zwiększenie ilości składników systemu inicjującego doprowadziło do wzrostu T_{max} i skrócenia t_{set} . Obniżenie maksymalnej temperatury utwardzania cementu kostnego jest wyjątkowym osiągnięciem, ponieważ niemodyfikowane cementy kostne osiągają temperatury w zakresie 45 – 105 °C podczas utwardzania, a tak wysoka temperatura może powodować martwicę otaczających tkanek [34,342]. Zatem, cement kostny modyfikowany eugenolem charakteryzuje się dodatkową zaletą polegającą na braku indukcji martwicy w otaczających tkankach.

Tab. 11. Charakterystyczne parametry utwardzania badanych cementów kostnych niemodyfikowanych i modyfikowanych eugenolem: maksymalna temperatura utwardzania T_{max} , temperatura wiązania T_{set} i czas wiązania t_{set} ($n=4$).

Kompozycja cementu kostnego	T_{max} [°C]		T_{set} [°C]		t_{set} [min]	
	EU	bez EU	EU	bez EU	EU	bez EU
BPO(0,3%)+DMA(0,5%)	21,2 ± 0,8	47,9 ± 1,2	21,0 ± 0,5	33,2 ± 0,8	15,0 ± 0,5	10,5 ± 0,7
BPO(0,7%)+DMA(0,5%)	22,9 ± 0,4	67,6 ± 0,9	22,0 ± 0,2	44,9 ± 0,4	14,7 ± 0,8	9,5 ± 0,5
BPO(0,7%)+DMA(0,83%)	23,1 ± 0,9	87,5 ± 0,6	22,3 ± 0,6	52,0 ± 0,3	14,2 ± 0,4	8,1 ± 0,8
BPO(1%)+DMA(1,17%)	23,5 ± 0,6	78,7 ± 1,0	22,6 ± 0,3	50,8 ± 0,5	7,8 ± 1,0	5,9 ± 0,6

Czas wiązania cementu kostnego, t_{set} , zgodnie z normą ISO 5833:2002 dla cementów kostnych mieszanych ręcznie powinien mieścić się w zakresie od 3 do 15 minut [38]. Trzy kompozycje o najniższym stężeniu układu inicjującego osiągają wartości t_{set} mieszczące się w górnej granicy tego zakresu, jednak spełniają ten wymóg [38]. Jak pokazują badania [306,343], eugenol hamuje polimeryzację metakrylanu metylu, ponieważ wychwytuje wolne rodniki generowane przez BPO [344]. Fujisawa i Kadoma w swoich badaniach [270] wykazali, że szybkość polimeryzacji znacznie spada wraz ze wzrostem stężenia eugenolu, i dla stężenia powyżej 0,5 %mol. eugenolu polimeryzacja nie zachodziła. Zjawisko to może wynikać z inhibicji reakcji polimeryzacji spowodowanej przez niektóre reaktywne produkty oddziaływania między wolnymi rodnikami powstałymi z dysocjacji BPO i eugenolem. Wyniki pokazują zatem, że eugenol działa jako retarder polimeryzacji metakrylanów. Nadmiar eugenolu oddziałuje z BPO i związkami pokrewnymi. Wydłużenie czasu utwardzania może być przyczyną spadku T_{max} . Badania prowadzone w ramach niniejszej pracy wykazały, że zwiększenie ilości systemu inicjującego wpłynęło na skrócenie t_{set} badanych cementów kostnych; nie miało to jednak odzwierciedlenia we wzroście maksymalnej temperatury utwardzania osiągananej przez cementy modyfikowane eugenolem.

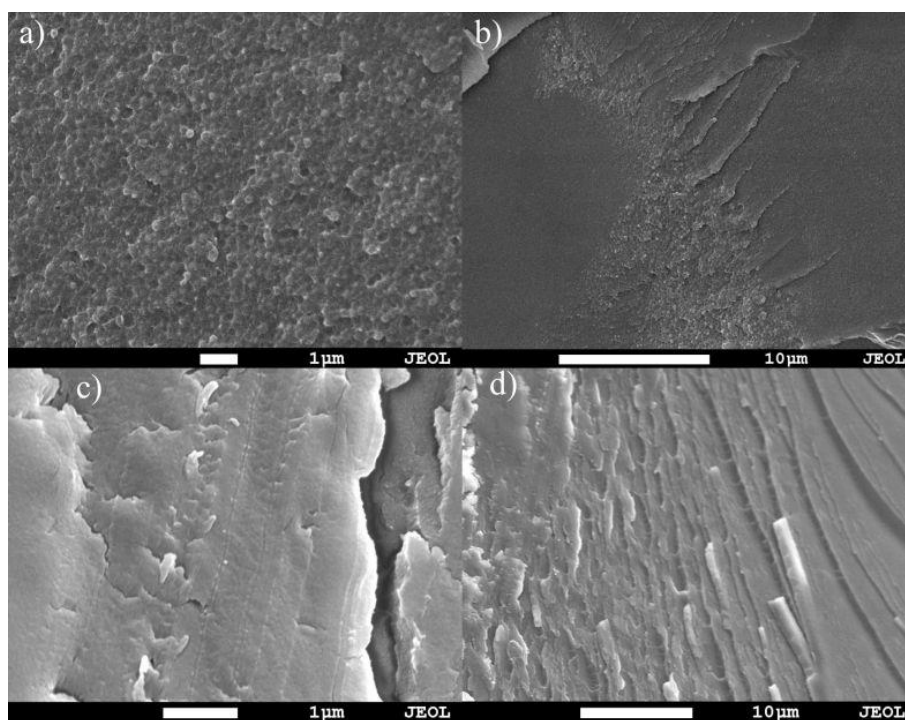
Zbadano także właściwości mechaniczne, tj. wytrzymałość na ściskanie (σ), cementów kostnych modyfikowanych stałą ilością eugenolu różniących się stężeniem składników systemu inicjującego. Modyfikacja cementów kostnych dodatkiem eugenolu, jak pokazano na rysunku 82, skutkowała uzyskaniem materiałów o dobrej wytrzymałości na ściskanie, i wszystkie testowane materiały spełniają wymagania normy ISO 5833:2002 w zakresie minimalnej wytrzymałości na ściskanie (70 MPa).



Rys. 82. Wytrzymałość na ściskanie cementów kostnych niemodyfikowanych i modyfikowanych eugenolem różniących się stężeniem systemu inicjującego ($n = 5$).

Najniższą wytrzymałość na ściskanie, $\sigma = 81,2 \pm 9,9$ MPa, wykazywał modyfikowany cement kostny zawierający 0,3 %mas. BPO i 0,5 %mas. DMA., natomiast najwyższą wartość, $\sigma = 104,1 \pm 10,6$ MPa, cement kostny zawierający 1 %mas. BPO i 1,17 %mas. DMA. Pomimo wydłużonego czasu utwardzania i niższej maksymalnej temperatury utwardzania, wytrzymałość na ściskanie cementów kostnych z eugenolem jest wysoka. Modyfikacje cementów kostnych w kierunku nadania im właściwości antybakteryjnych przed dodatek antybiotyków w postaci wolnej czy w systemach dostarczania leków wpływają na ich parametry użytkowe, jak opisano w poprzednich rozdziałach. Można jednak dodać jeszcze, że czynnikiem wpływającym na wytrzymałość mechaniczną cementów kostnych jest również postać środka przeciwbakteryjnego. Badania pokazują, że dodatek antybiotyków w postaci płynnej może obniżyć wytrzymałość na ściskanie nawet o 55% (35 – 50 MPa) [84]. Może to być związane ze zwiększoną porowatością i zmianami w strukturze utwardzonego materiału. Włączanie ciekłych olejków eterycznych do cementów kostnych nie jest szeroko badane. Kilka doniesień literaturowych wskazuje na dodatek wypełniaczy impregnowanych olejkami eterycznymi. Robu i współpracownicy [31] testowali cementy kostne modyfikowane hydroksyapatytem impregnowanym olejkami eterycznymi z mięty pieprzowej. Wyniki ich badań wskazują na 12% spadek wytrzymałości na ściskanie modyfikowanych cementów kostnych. Z kolei badania wykonane w ramach niniejszej pracy wykazały spadek wytrzymałości na ściskanie o 7 – 23%. Spadek ten może być związany z wydłużeniem czasu polimeryzacji i obniżeniem parametru T_{max} , a co za tym idzie zmianami w strukturze otrzymanego cementu kostnego.

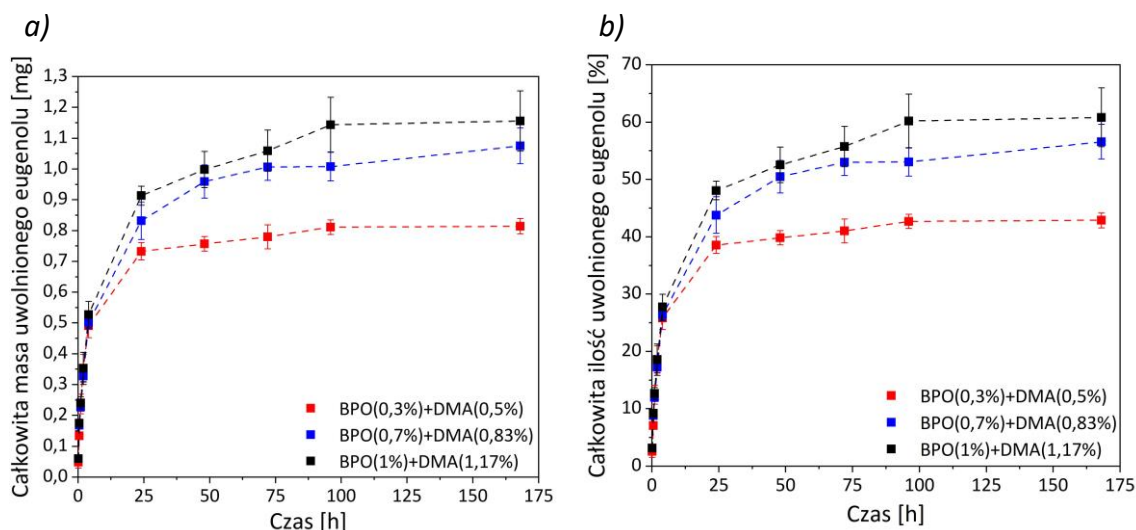
W celu zbadania struktury cementów kostnych modyfikowanych eugenolem wykonano zdjęcia metodą SEM, zarówno cementu kostnego modyfikowanego jak i niemodyfikowanego EU, które pokazano na rysunku 83.



Rys. 83. Zdjęcia SEM wybranych cementów kostnych (BPO 0,3 %mas. i DMA 0,5 %mas.) modyfikowanych eugenolem (a,b) i niemodyfikowanych (c,d), wykonane przy różnych powiększeniach [345].

Powierzchnia otrzymanych cementów kostnych charakteryzuje się dużą chropowatością i porowatością. W cemencie kostnym modyfikowanym eugenolem na powierzchni można wyróżnić cząstki polimeru. Zmiana struktury polimeru może pozytywnie wpływać na uwalnianie eugenolu i właściwości antybakteryjne. W badaniach nad uwalnianiem płynnych antybiotyków z cementów kostnych [84] naukowcy spekulują, że porowatość cementów kostnych wzrasta po włączeniu antybiotyków. Według badań przeprowadzonych przez Millstein i innych [306] eugenol może powodować zmiany powierzchni utwardzonego cementu kostnego. Badacze przypuszczają, że może to być spowodowane reakcją chemiczną między matrycą kompozytu a eugenolem, której jednak nie potwierdzono badaniami. Z kolei, badania nad uwalnianiem antybiotyków z matrycy cementu kostnego pokazują [111], że bardziej porowata struktura materiału poprawia uwalnianie substancji czynnej.

Uwalnianie eugenolu z cementów kostnych różni się w zależności od zastosowanej ilości układu inicjującego (rysunek 84). Parametr ten jest ściśle związany ze strukturą matrycy polimerowej, chropowatością powierzchni i porowatością, a właściwości te związane są z szybkością procesu polimeryzacji, który zależy również od ilości systemu inicjującego.

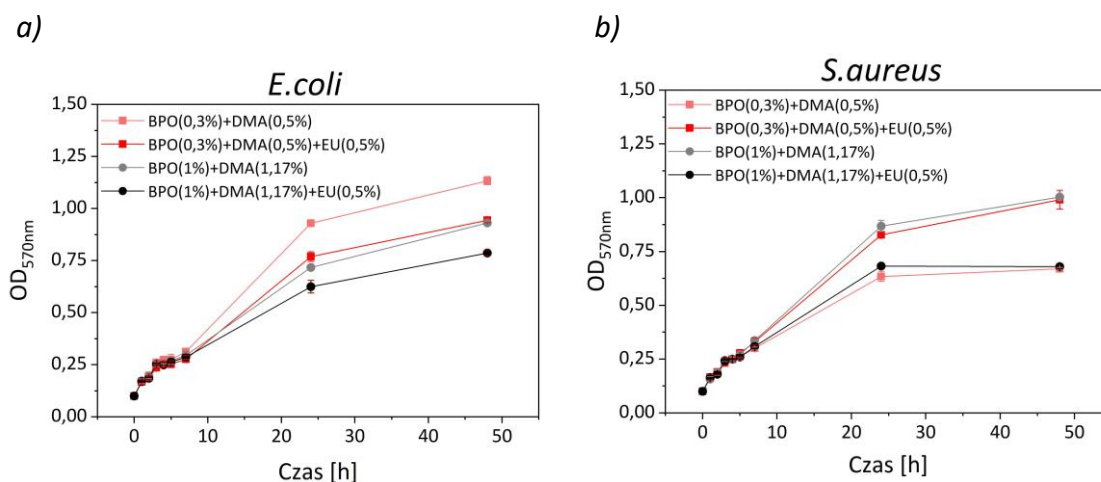


Rys. 84. Profile uwalniania eugenolu z cementów kostnych zawierających w składzie różne ilości systemu inicjującego wyrażone jako: a) całkowita masa uwolnionego EU, b) całkowita ilość uwolnionego EU ($n = 3$).

Najmniejszą ilość uwolnionego EU po 168 godzinach prowadzenia procesu, tj. $42,9 \pm 1,3\%$ całkowitej ilości eugenolu w próbce, zaobserwowano dla cementu kostnego zawierającego w składzie 0,3 %mas. BPO i 0,5 %mas. DMA. Natomiast największa ilość eugenolu, tj. $61,9 \pm 2,6\%$, została uwolniona z cementu kostnego zawierającego 1 %mas. BPO i 1,17 %mas. DMA. Uzyskany wynik można wiązać z wpływem stężenia składników układu inicjującego na przebieg polimeryzacji. Zwiększenie stężenia układu inicjującego może wpływać na strukturę polimeru, tj. różną gęstość usieciowania otrzymanych cementów kostnych i porowatość materiałów, co z kolei może prowadzić do zwiększonego uwalniania eugenolu. Kinetyka uwalniania eugenolu z cementów kostnych charakteryzuje się wysokim uwalnianiem w ciągu pierwszych 24 godzin (ang. *burst effect*), po którym następuje równomierne uwalnianie. Ten sposób uwalniania powoduje wystąpienie najwyższego stężenia eugenolu tylko w ciągu pierwszych kilku godzin, a przedłużone uwalnianie może zapewnić dłuższą aktywność przeciwbakteryjną. Warto podkreślić, że kinetyka uwalniania eugenolu z cementów kostnych nie jest znana. Jednak wśród doniesień literaturowych można znaleźć informację na temat uwalniania EU *in vivo* z tabletek mukoadhezyjnych [346]. Ilość uwolnionego EU z tego materiału jest mniejsza niż w przypadku badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy. Dodatkowo doniesienia literaturowe wskazują na wzrost uwalniania antybiotyków w postaci płynnej w porównaniu do postaci proszkowej [84], jednakże badania te przeprowadzono dla antybiotyków rozpuszczalnych w wodzie, a nie olejków eterycznych.

Aktywność antybakteryjna cementów kostnych modyfikowanych eugenolem zbadano wobec bakterii *E. coli* i *S. aureus* (rysunek 85). Przeprowadzono pomiary gęstości optycznej przy 570 nm (OD_{570nm}) dla hodowli bakteryjnej. Wyniki przedstawione na rysunku 85a wskazują, że szybkość wzrostu *E. coli* zmniejsza się w obecności cementów modyfikowanych eugenolem

zarówno dla próbek zawierających 0,3 %mas. BPO i 0,5 %mas. DMA, jak i zawierających 1 %mas. BPO i 1,17 %mas. DMA.



Rys. 85. Wpływ cementów kostnych modyfikowanych i niemodyfikowanych eugenolem zawierających różne stężenie systemu inicjującego na wzrost bakterii: a) dla szczepu *E. coli*; b) dla szczepu *S. aureus* ($n = 3$).

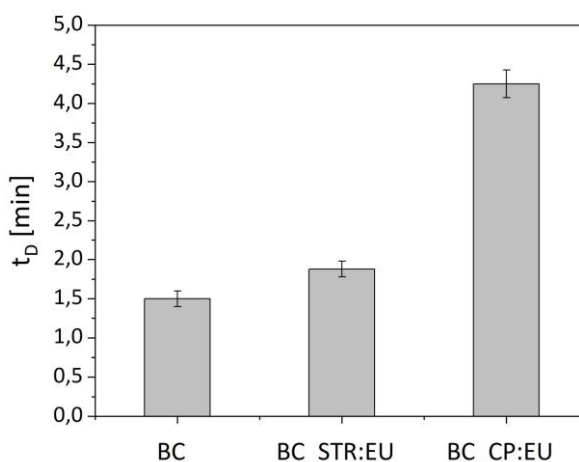
Dla *S. aureus* zaobserwowano zmniejszony wzrost bakterii w obecności cementów kostnych modyfikowanych eugenolem i pozostał on na tym samym poziomie dla niemodyfikowanych cementów kostnych (rysunek 85b). W przypadku obu szczepów bakterii można zaobserwować większy wpływ cementu kostnego zawierającego 1 %mas. BPO i 1,17 %mas. DMA w porównaniu do 0,3 %mas. BPO i 0,5 %mas. DMA na opóźnienie wzrostu bakterii. Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że cementy kostne modyfikowane dodatkiem eugenolu w ilości 0,5 %mas. wykazują działanie bakteriostatyczne wobec *S. aureus* i *E. coli*.

Podsumowując, można stwierdzić, że cementy kostne modyfikowane eugenolem (0,5% mas.) spełniają wymagania normy ISO 5833:2002 w zakresie wszystkich parametrów i charakteryzują się dobrą wytrzymałością na ściskanie w zakresie 90 – 105 MPa, wysokim uwalnianiem eugenolu (40 – 63%) oraz wykazują właściwości bakteriostatyczne. Modyfikacja cementów kostnych doprowadziła do uzyskania materiałów o wytrzymałości mechanicznej porównywalnej z cementami komercyjnymi. Zatem dodanie eugenolu do cementu kostnego pozwala na uzyskanie materiałów o pożądanych właściwościach. Jednak dodatek eugenolu wpływa na kinetykę polimeryzacji i znacznie wydłuża czas reakcji, dlatego nadal istnieje potrzeba zmniejszenia lub wyeliminowania wpływu eugenolu na proces utwardzania cementu kostnego. Obiecującym krokiem w tym kierunku jest wprowadzanie eugenolu do cementów kostnych w postaci kompleksów lub wbudowanego kowalencyjnie w nośniku, co przedstawiono w dalszej części pracy.

2.3.2.2. Kompleksy CP:EU i STR:EU

W celu zmniejszenia negatywnego wpływu eugenolu na proces polimeryzacji cementu kostnego w ramach niniejszej pracy przygotowano kompleksy eugenolu z polimerem gwiaździstym (STR:EU) oraz z cyklodekstryną Captisol® (CP:EU). Dzięki temu do kompozycji cementów kostnych wprowadzano modyfikator w postaci stałej, a nie ciekłej, co powinno mieć dodatkowy wpływ na właściwości otrzymanych materiałów. Przeprowadzono badania wpływu modyfikatorów na właściwości cementów kostnych, a także na uwalnianie eugenolu ze zmodyfikowanych materiałów. Do badań wybrano cement kostny zawierający w składzie 1 %mas. BPO i 1,17 %mas. DMA, gdyż uwalnianie eugenolu z cementu kostnego o takiej zawartości układu inicjującego było najwyższe i charakteryzował się on najlepszymi parametrami. Cementy kostne zbadano w celu określenia parametrów takich jak *doughing time*, maksymalna temperatura utwardzania, czas wiązania oraz wytrzymałość na ściskanie. Ponadto określono właściwości antybakteryjne uzyskanych materiałów.

Pierwszym badanym parametrem był *doughing time*. Jak pokazano w poprzednim punkcie, eugenol znacząco wydłużył czas t_D , nawet do 4,9 minuty. W przypadku modyfikacji cementu kostnego dodatkiem kompleksu STR:EU t_D wyniósł około 2 minuty, podczas gdy dla BC_CP:EU uzyskano czas t_D podobny jak dla cementu modyfikowanego dodatkiem wolnego EU, tj. równy 4,3 minuty (rysunek 86).



Rys. 86. *Doughing time* (min) dla badanych cementów kostnych niemodyfikowanego i modyfikowanych kompleksem STR:EU lub CP:EU ($n = 4$).

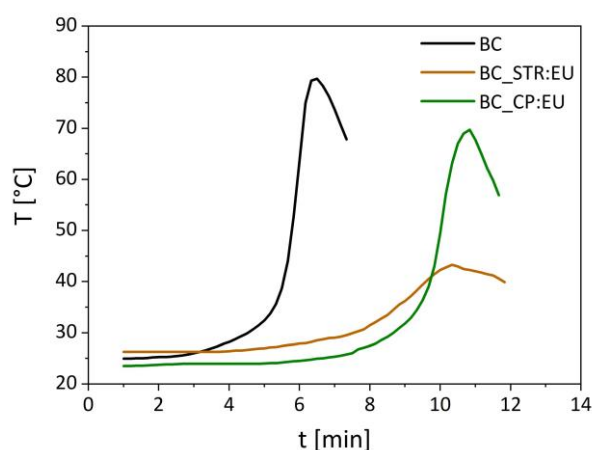
Eugenol wywiera negatywny wpływ na proces utwardzania cementów kostnych, co wykazano we wcześniejszych badaniach przedstawionych w poprzednich rozdziałach. Utworzenie kompleksu eugenolu z polimerem gwiaździstym złagodziło jego negatywny wpływ na utwardzanie cementu kostnego, natomiast otrzymanie kompleksu eugenolu z cyklodekstryną Captisol® spowodowało znaczne wydłużenie t_D w porównaniu do niemodyfikowanego BC i tylko nieznaczne skrócenie t_D w porównaniu do BC z eugenolem. Badania przeprowadzone

przez Lu i współpracowników [347] pokazują, że dodanie 10% niemodyfikowanych mikrocząstek β -CD powoduje skrócenie parametru *doughing time*. Jednak skład cementu kostnego i rodzaj zastosowanej β -CD były inne niż zastosowane w niniejszej pracy, stąd możliwe jest zaobserwowanie odwrotnego efektu.

Jak pokazano we wcześniejszych częściach niniejszej pracy, eugenol zmniejszył wartość parametru T_{max} i znacznie wydłużył czas t_{set} , wpływając jednocześnie na przebieg polimeryzacji cementów kostnych i ich właściwości mechaniczne. Kompleksowanie eugenolu, a następnie jego włączenie do cementu kostnego może zmniejszyć negatywny wpływ na proces utwardzania, powodując skrócenie t_{set} (w porównaniu do cementu modyfikowanego wolnym EU), przy jednoczesnym obniżeniu temperatury maksymalnej polimeryzacji. Uzyskane wyniki pokazują znaczny spadek parametru T_{max} i wydłużenie czasu t_{set} dla cementu kostnego modyfikowanego kompleksem STR:EU, przy nieznacznej zmianie parametru T_{max} po wprowadzeniu kompleksu CP:EU i porównywalnym czasie t_{set} do BC_STR:EU (tabela 12, rysunek 87).

Tab. 12. Charakterystyczne parametry utwardzania cementów kostnych – *doughing time* t_D , maksymalna temperatura T_{max} , temperatura T_{set} oraz czas t_{set} utwardzania, wytrzymałość na ściskanie σ .

Próbka	t_D [min]	T_{max} [°C]	T_{set} [°C]	t_{set} [min]	σ [MPa]
BC	1,5 ± 0,1	79,7 ± 3,1	52,3 ± 2,1	5,8 ± 0,5	107,5 ± 7,8
BC_STR:EU	1,9 ± 0,1	43,3 ± 2,4	34,3 ± 1,9	8,5 ± 0,8	70,8 ± 8,3
BC_CP:EU	4,3 ± 0,2	69,8 ± 1,9	46,6 ± 1,7	9,8 ± 0,5	98,3 ± 6,7

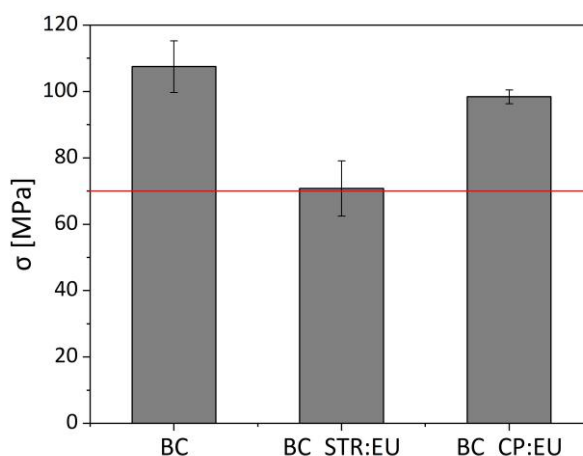


Rys. 87. Zależność temperatury polimeryzacji od czasu dla kompozycji cementu kostnego niemodyfikowanego i modyfikowanego dodatkiem kompleksu STR:EU lub CP:EU ($n = 3$).

Badania przeprowadzone przez Lu i współpracowników [347] pokazują, że czas wiązania cementu kostnego po dodaniu 10% niemodyfikowanych mikrocząstek β -CD był podobny do czasu wiązania niemodyfikowanego cementu, przy czym parametr T_{max} uległ nieznacznej obniżeniu. Jednakże, niekwalencyjne wiązanie eugenolu w kompleksach STR:EU i CP:EU mogło doprowadzić do częściowego wycieku eugenolu podczas przygotowania cementów kostnych, wpływając na ich

polimeryzację, a tym samym na parametry T_{max} i t_{set} , jak zaobserwowano we wcześniejszych badaniach [306,343]. Jednak ilość zastosowanego eugenolu jest poniżej stężenia krytycznego, dla którego polimeryzacja nie zachodzi (0,5 %mol.) [270]. Mimo zaobserwowanych zmian, otrzymane modyfikowane kompleksami STR:EU i CP:EU cementy kostne, spełniły kryteria określone w normie ISO 5833:2002.

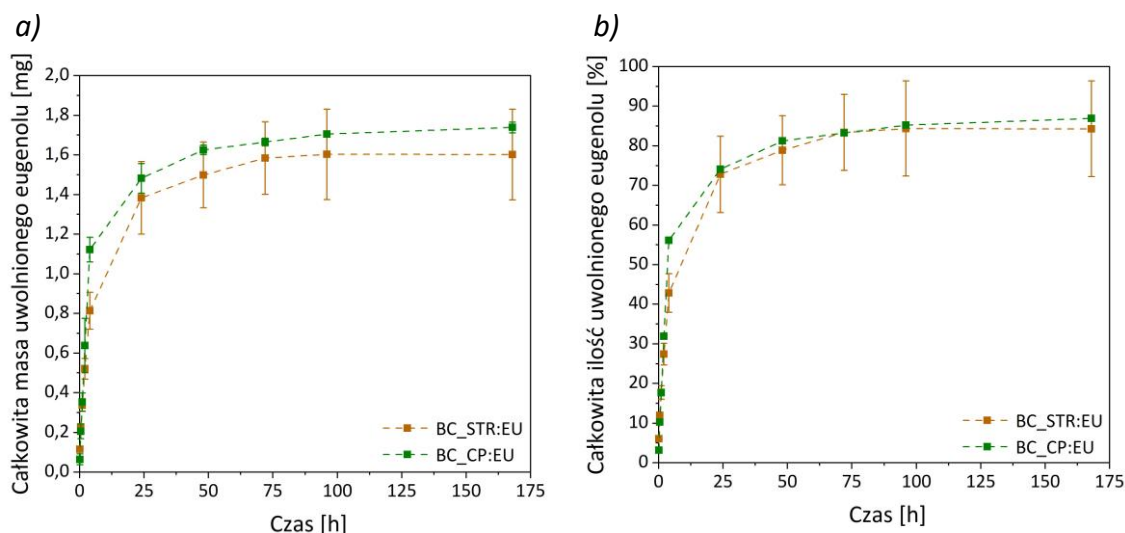
Ze względu na istotne znaczenie właściwości mechanicznych w zastosowaniach cementów kostnych, przeprowadzono również badania wytrzymałości na ściskanie (σ). Modyfikacja spowodowała spadek wytrzymałości mechanicznej z $\sigma_{BC} = 107,5 \pm 7,8$ MPa do $\sigma_{BC_CP:EU} = 98,3 \pm 6,7$ MPa oraz $\sigma_{BC_STR:EU} = 70,8 \pm 8,3$ MPa (tabela 12 i rysunek 88), co mieści się w zakresie dopuszczonym przez normę ISO, jednak blisko jej dolnej granicy (70 MPa) [38]. Jednakże wartości te są niższe niż uzyskane dla cementu modyfikowanego samym eugenolem BC_EU, który charakteryzuje się wytrzymałością na ściskanie równą $104,1 \pm 10,6$ MPa, co wskazuje na dodatkowy wpływ nośników leku, tj. polimeru gwiaździstego i cykloodekstryny, na właściwości cementu kostnego.



Rys. 88. Wytrzymałość na ściskanie cementu kostnego niemodyfikowanego i modyfikowanego kompleksem STR:EU lub CP:EU ($n = 5$).

Pogorszenie parametrów wytrzymałościowych uzyskali Robu i współpracownicy [31], dla cementów w których impregnacja olejku z mięty pieprzowej na hydroksypatycie spowodowała 12% spadek wytrzymałości cementu kostnego na ściskanie. Z kolei, Cyphert i współpracownicy [83] wykazali, że dodanie mikrocząstek β -CD do cementów kostnych w ilości 5% i 10% spowodowało spadek wytrzymałości na ściskanie odpowiednio o 12% i 15%. Wartości te są podobne do tych uzyskanych po dodaniu wolnej tobramycyny [31], lecz wprowadzenie leku w postaci kompleksu może poprawić jego uwalnianie i działanie antybakteryjne w porównaniu do postaci wolnej.

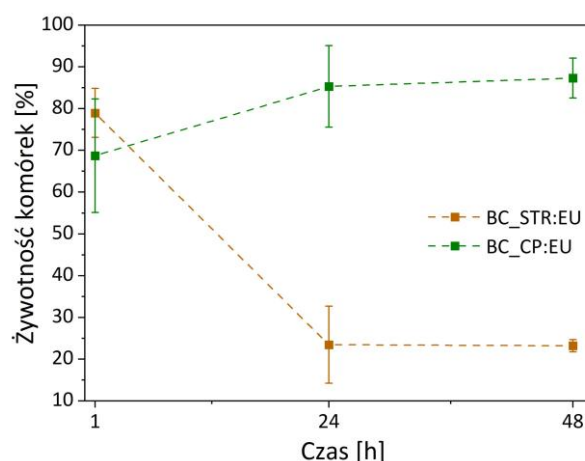
Uwalnianie eugenolu z cementów kostnych modyfikowanych kompleksem STR:EU lub CP:EU pokazano na rysunku 89. Profile uwalniania EU charakteryzują się szybkim uwalnianiem EU w pierwszych 24h (powyżej 70%), po których następuje faza wolnego, stabilnego uwalniania.



Rys. 89. Profile uwalniania eugenolu z cementów kostnych zawierających w składzie kompleksy STR:EU lub CP:EU wyrażone jako: a) całkowita masa uwolnionego EU, b) całkowita ilość uwolnionego EU ($n = 3$).

Zaobserwowano, że po 168 godzinach prowadzenia procesu uwalniania z próbki BC_CP:EU uwolniło się $86,9 \pm 1,4\%$ całkowitej ilości eugenolu, a z próbki BC_STR:EU $84,3 \pm 12,1\%$. Uwalnianie substancji aktywnej z cementów kostnych, jak wspomniano wcześniej, jest ściśle związane ze strukturą matrycy polimerowej, jej chropowatością i porowatością. Włączenie eugenolu do cementów kostnych w postaci stałej, jako kompleksów, może wpływać na strukturę polimeru i porowatość. Modyfikacja ta może skutkować inną gęstością sieci polimerowej w uzyskanej matrycy w porównaniu do cementu kostnego z płynnym eugenolem. Uwalnianie wolnego eugenolu z cementów kostnych mieściło się w zakresie 42,9 – 61,9%, a uwalnianie eugenolu włączonego do kompleksu z CP lub STR było wyższe. Jak wspomniano wyżej, uwalnianie eugenolu z cementów kostnych zachodzi z dużą szybkością w ciągu pierwszych 24 godzin, po czym proces się stabilizuje. Taki profil uwalniania powoduje wystąpienie najwyższego stężenia eugenolu tylko w ciągu pierwszych kilku godzin, jednakże zwiększone uwalnianie może zapewnić większą aktywność antybakteryjną, co potwierdzono badaniami omówionymi w kolejnym akapicie. Badania pokazują, że włączenie antybiotyków do mikrocząstek β -CD nie zmienia kinetyki i czasu uwalniania antybiotyku, jednak poprawia jego skumulowane uwalnianie [83].

Badania antybakteryjne cementu kostnego modyfikowanego kompleksem STR:EU wykazały znaczny spadek żywotności komórek bakteryjnych po 24 godzinach do około 25%, a następnie stabilizację na tym poziomie do 48 godzin (rysunek 90), co sugeruje silną początkową aktywność przeciwbakteryjną, która stabilizuje się.



Rys. 90. Wpływ cementu kostnego modyfikowanego dodatkiem kompleksu STR:EU lub CP:EU na żywotność *E. coli* ($n = 3$).

Eugenol charakteryzuje się niską biodostępnością, która może być zwiększona przez kompleksowanie. Kompleksowanie eugenolu z α - i β -cyklodekstryną badali Joardar i współpracownicy [321]. Ich badania wykazały, że β -cyklodekstryna (β -CD) ma wyższe powinowactwo wiązania, jednak oba kompleksy zwiększyły biodostępność eugenolu. Zwiększona biodostępność może skutkować lepszymi właściwościami przeciwbakteryjnymi, co wykazały inne badania przeprowadzone przez Wanga i współpracowników [322], w których kompleks β -CD:EU ma wyraźny efekt hamujący wobec *E. coli*. Według Seo i współpracowników [348] liofilizowany kompleks CP:EU wykazuje znaczące uwalnianie eugenolu w ciągu pierwszych 8 godzin, które następnie zachodzi z bardzo małą szybkością. Jednak, jak pokazują wyniki, działanie przeciwbakteryjne jest podobne przez pierwsze 24 godziny, i przez kolejne 24 godziny (do 48 godzin) prowadzonych testów. Zmodyfikowane cementy kostne (BC_CP:EU) wykazują wyższą aktywność przeciwbakteryjną niż sam kompleks CP:EU w pierwszej godzinie; jednak zmniejsza się ona w czasie i po 48 godzinach próbki wykazują aktywność bakteriostatyczną. Można to wyjaśnić wynikami przedstawionymi w poprzedniej sekcji. Najwyższe uwalnianie występuje w ciągu pierwszych 24 godzin, gdzie aktywność przeciwbakteryjna jest najsilniejsza. Cement kostny modyfikowany dodatkiem kompleksu EU z polimerem gwiaździstym wykazuje wyższą i utrzymującą się przez dłuższy czas aktywność antybakteryjną w porównaniu do cementu kostnego modyfikowanego dodatkiem kompleksu eugenolu z β -CD, co potencjalnie czyni go bardziej odpowiednim do długoterminowych zastosowań w cementach kostnych.

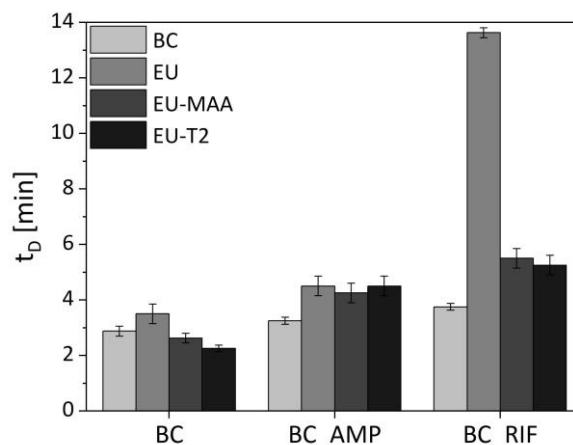
Podsumowując, cementy kostne modyfikowane kompleksem CP:EU lub STR:EU spełniają wymagania normy ISO 5833:2002 w zakresie wszystkich parametrów. Cementy modyfikowane CP:EU charakteryzują się dobrą wytrzymałością mechaniczną - wytrzymałość na ściskanie mieści się w zakresie 98 – 106 MPa, natomiast dodatek kompleksu STR:EU spowodował spadek tego parametru do 71 MPa. Oba cementy kostne wykazują wysokie uwalnianie eugenolu:

CP:EU – $86,9 \pm 1,4\%$ oraz STR:EU – $84,3 \pm 12,1\%$. Ponadto, wykazują właściwości antybakteryjne. Cementy kostne zawierające kompleks STR:EU wykazują silną początkową aktywność przeciwbakteryjną przeciwko *E. coli*, z wyraźnym zmniejszeniem żywotności komórek w ciągu pierwszych 24 godzin, natomiast materiały z CP:EU wykazują umiarkowany spadek żywotności komórek. Zatem dodanie kompleksów CP:EU oraz STR:EU do cementu kostnego pozwala na uzyskanie materiałów o pożądanych właściwościach. Co więcej, kompleksowanie eugenolu w Captisol® eliminuje jego negatywny wpływ na proces utwardzania cementów kostnych i poprawia parametry otrzymanych materiałów, podczas gdy kompleksowanie EU z STR jedynie ogranicza jego wpływ.

2.3.2.3. Pochodne eugenolu (EU-DT)

Kompleksowanie eugenolu w nośnikach takich jak Captisol® czy polimery gwiaździste jest skutecznym sposobem na ograniczenie negatywnego wpływu EU na polimeryzację cementów kostnych oraz zwiększenie właściwości antybakteryjnych, jednakże zakłada wprowadzenie dodatku niezwiązanego kowalencyjnie z siecią polimerową. Problem ten może zostać rozwiązany poprzez włączenie do kompozycji cementu kostnego pochodnych eugenolu (EU-MAA, EU-T2) zdolnych do polimeryzacji, których syntezę opisano w rozdziale 2.1.1. *Synteza modyfikowanych monomerów*, w podpunkcie *Pochodne eugenolu*. Otrzymane pochodne EU wprowadzono do kompozycji cementów kostnych, i zbadano wpływ ich dodatku na proces utwardzania, właściwości mechaniczne i właściwości antybakteryjne przygotowanych cementów kostnych.

Pierwszym wyznaczonym parametrem był *doughing time*. Wartość tego parametru dla cementów modyfikowanych pochodnymi eugenolu różniła się od wartości uzyskanej dla cementu kostnego niemodyfikowanego, jak również modyfikowanego eugenolem (rysunek 91). Zgodnie z wynikami wcześniejszych badań (rozdział 2.3.2.1. *Eugenol*), dodanie EU znacznie wydłużyło czas t_D w porównaniu do niemodyfikowanych cementów kostnych. Modyfikacja EU przez wbudowanie w jego strukturę grup reaktywnych w polimeryzacji skutecznie wyeliminowała negatywny wpływ EU na ten parametr. EU-DT posiadają reaktywne grupy funkcyjne zdolne do polimeryzacji, co umożliwia ich kowalencyjne wbudowanie w matrycę polimerową i ograniczenie wpływu opóźniającego na reakcję polimeryzacji. Spowodowało to skrócenie czasu t_D do wartości porównywalnej z wartością parametru t_D osiągniętą dla niemodyfikowanego cementu kostnego. Podobną zależność uzyskali również Rojo i współpracownicy, którzy badali receptury samopolimeryzujące na bazie poli(metakrylanu etylu) (PEMA) i pochodnych eugenolu (metakrylan eugenolu (EgMA) lub metakrylan etoksyeugenolu (EEgMA) do zastosowań stomatologicznych i ortopedycznych [349].



Rys. 91. Doughing time (t_D) dla badanych cementów kostnych niemodyfikowanego i modyfikowanego: EU (BC+EU) oraz pochodnymi eugenolu (BC+EU-MAA i BC+EU-T2).

Znaczne skrócenie czasu t_D po dodaniu EU-MAA do kompozycji cementu kostnego w stosunku do cementu modyfikowanego eugenolem zaobserwowano dla obu stężeń układu inicjującego. Dla cementu kostnego zawierającego 0,7 %mas. BPO i 0,83 %mas. DMA zanotowano czas t_D $2,1 \pm 0,2$ minuty, a dla próbki zawierającej 1 %mas. BPO i 1,17 %mas. DMA $t_D = 1,4 \pm 0,2$ minuty, podczas gdy cementy kostne modyfikowane eugenolem charakteryzowały się odpowiednio $t_D = 4,3 \pm 0,2$ minuty i $t_D = 3,6 \pm 0,2$ minuty. Modyfikacja cementów kostnych dodatkiem EU-T2 również skutkowała skróceniem czasu t_D w stosunku do wartości otrzymanych dla cementów modyfikowanych eugenolem. Dla cementu kostnego zawierającego 0,7 %mas. BPO i 0,83 %mas. DMA t_D wynosił $1,6 \pm 0,2$ minuty, a dla próbki zawierającej 1 %mas. BPO i 1,17 %mas. DMA t_D wynosił $1,4 \pm 0,2$ minuty. Skrócenie t_D do wartości porównywalnych z cementami niemodyfikowanymi świadczy o wyeliminowaniu negatywnego wpływu eugenolu na proces utwardzania cementów kostnych, co dodatkowo potwierdzono badaniami kinetyki polimeryzacji.

Jak pokazano wcześniej (tabela 11), dodatek eugenolu do cementu kostnego spowodował również znaczne wydłużenie czasu t_{set} oraz obniżenie maksymalnej temperatury utwardzania cementu kostnego. Spadek T_{max} jest pożądany w przypadku cementów metakrylowych, ponieważ ciepło reakcji polimeryzacji powoduje znaczny wzrost temperatury cementu podczas jego utwardzania, co może prowadzić do martwicy otaczających tkanek. Dodatek EU-DT również spowodował obniżenie maksymalnej temperatury utwardzania i wydłużenie czasu wiązania cementu kostnego, lecz zmiany te nie były tak znaczące, jak w przypadku dodatku EU. Wartości charakterystycznych parametrów utwardzania cementów kostnych modyfikowanych EU-MAA i EU-T2, tj. T_{max} , T_{set} i t_{set} , przedstawiono w tabeli 13.

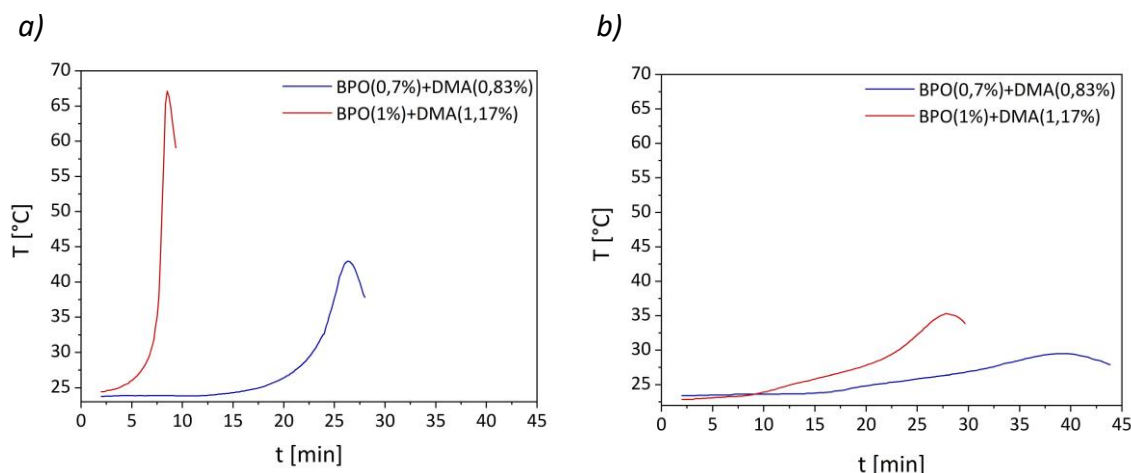
Tab. 13. Charakterystyczne parametry utwardzania badanych cementów kostnych niemodyfikowanych i modyfikowanych eugenolem: maksymalna temperatura utwardzania T_{max} , temperatura wiązania T_{set} i czas wiązania t_{set} ($n = 4$).

Skład	T_{max} [°C]	T_{set} [°C]	t_{set} [min]
EU-MAA BPO(0,7%)+DMA(0,83%)	$43,0 \pm 4,4$	$33,2 \pm 1,5$	$23,9 \pm 0,8$
EU-MAA BPO(1%)+DMA(1,17%)	$67,1 \pm 0,3$	$45,5 \pm 0,2$	$8,6 \pm 0,3$
EU-T2 BPO(0,7%)+DMA(0,83%)	$28,4 \pm 1,5$	$24,9 \pm 0,4$	$21,5 \pm 0,3$
EU-T2 BPO(1%)+DMA(1,17%)	$35,3 \pm 1,9$	$28,2 \pm 0,1$	$21,1 \pm 0,2$

Dodatek EU-MAA do kompozycji cementu kostnego spowodował mniejszy spadek T_{max} niż dodatek EU-T2, a czas potrzebny do osiągnięcia T_{max} i t_{set} był krótszy. Dla kompozycji zawierającej 1 %mas. BPO i 1,17 %mas. DMA, maksymalna temperatura utwardzania cementu kostnego modyfikowanego EU-MAA wynosiła $67,1 \pm 0,3$ °C, a czas t_{set} 8,6 minuty, a cementu modyfikowanego EU-T2 odpowiednio $35,3 \pm 1,9$ °C i 21,1 minuty. Natomiast dla niemodyfikowanego cementu kostnego i cementu kostnego modyfikowanego EU było to odpowiednio $T_{max} = 87,5$ °C i $t_{set} = 5,9$ minuty oraz $T_{max} = 23,5$ °C i $t_{set} = 7,8$ minuty. Zatem, lepsze parametry utwardzania uzyskano przy zastosowaniu wolnego EU do modyfikacji cementu kostnego.

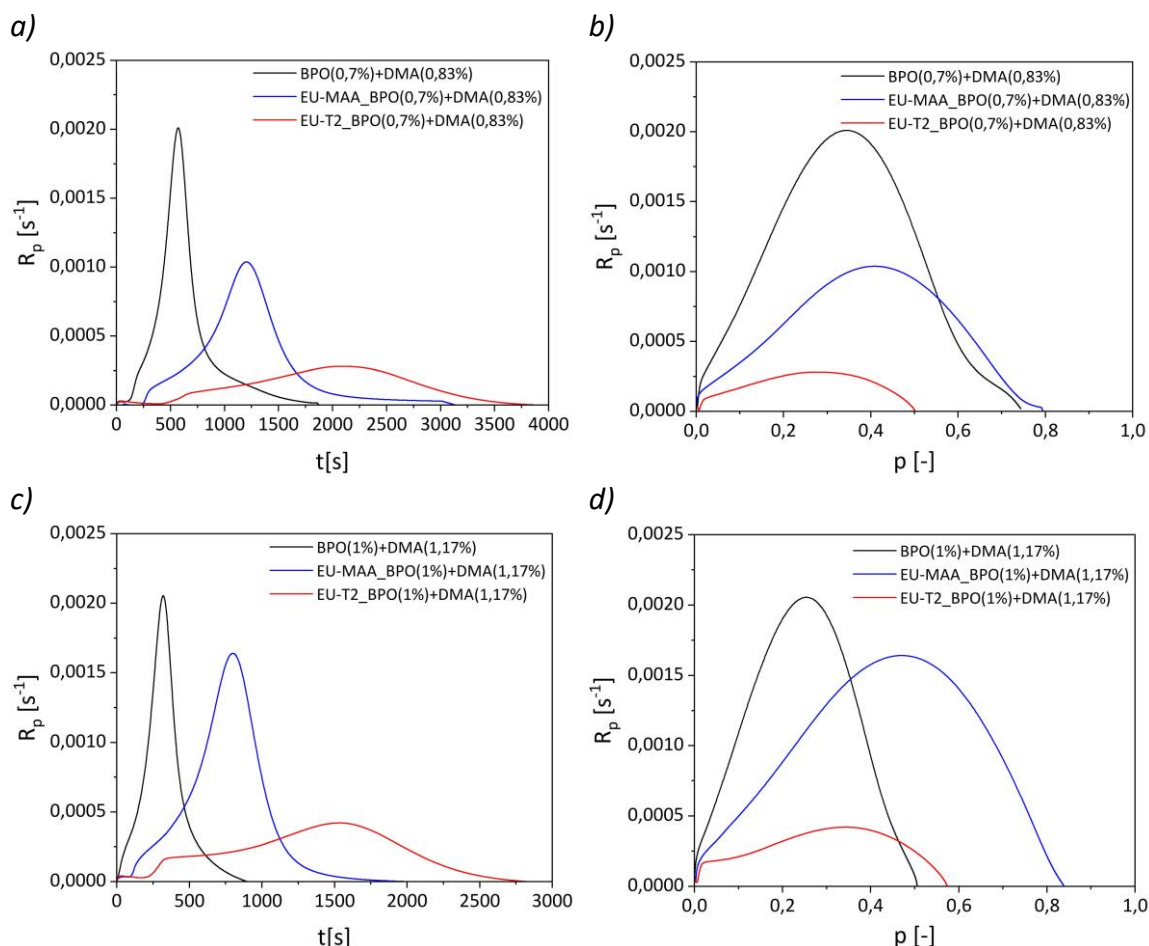
Krzywa kinetyczna procesu utwardzania wyznaczona na podstawie zmiany temperatury utwardzanego cementu, tj. zależność temperatury procesu polimeryzacji od czasu, dla cementu kostnego modyfikowanego EU-MAA (1 %mas. BPO i 1,17 %mas. DMA) charakteryzuje się krótkim okresem inhibicji, w którym nie zachodzi reakcja polimeryzacji oraz bardzo szybkim wzrostem temperatury do osiągnięcia wartości maksymalnej tego parametru (rysunek 92a). Okres inhibicji, jak wspomniano wyżej, może być spowodowany obecnością inhibitora w monomerach, jak również tlenem uwieczonym w masie kompozycji podczas przygotowywania cementu kostnego, i jest niezbędny dla odpowiednio długiej stabilności mieszaniny monomerów i opóźnienia rozpoczęcia reakcji polimeryzacji podczas operacji, np. implantacji stawu biodrowego, aby chirurg-ortopeda miał odpowiednio dużo czasu na jego przygotowanie i wprowadzenie w miejsce przeznaczenia. Krzywa kinetyczna utwardzania cementu kostnego modyfikowanego EU-T2 (1 %mas. BPO i 1,17 %mas. DMA) charakteryzuje się dłuższym okresem inhibicji w stosunku do BC modyfikowanego EU-MAA, po którym następuje powolny wzrost temperatury (rysunek 92b), co może wynikać z opóźniającego działania monomeru EU-T2, który może działać jak retarder polimeryzacji rodnikowej, gdyż posiada grupę OH jako podstawnik w pierścieniu aromatycznym eugenolu. Możliwe, że modyfikacja eugenolu tiolem nie wpłynęła znacząco na jego właściwości hamujące polimeryzację. Zmniejszenie ilości układu inicjującego spowodowało obniżenie maksymalnej temperatury utwardzania badanych cementów kostnych,

ale jednocześnie wydłużyło czas wiązania. Krzywe kinetyczne charakteryzują się również długim okresem inhibicji, po którym następuje wolniejszy wzrost temperatury, co potwierdza wcześniejsze przypuszczenia.



Rys. 92. Krzywe kinetyczne procesu utwardzania cementów kostnych zawierających różne stężenie systemu inicjującego modyfikowanych dodatkiem a) EU-MAA; b) EU-T2.

Dodatkowo, zbadano kinetykę polimeryzacji niemodyfikowanych i modyfikowanych cementów kostnych metodą DSC (rysunek 93). Zależność szybkości polimeryzacji od czasu trwania procesu jest analogiczna do tej uzyskanej podczas pomiaru temperatury utwardzania termoparą. Jednak ze względu na znacznie mniejszą objętość próbki użytej w metodzie DSC (ok. 23 mg), ilość ciepła uwalnianego podczas reakcji była znacznie mniejsza. A co za tym idzie, mniejszy wzrost temperatury nie powoduje tak znacznego przyspieszenia polimeryzacji, jak ma to miejsce w przypadku pomiaru temperatury utwardzania za pomocą termopary (masa próbki ok. 1 g).



Rys. 93. Zależność szybkości polimeryzacji R_p od czasu (a, c) lub od stopnia konwersji wiązań podwójnych (b, d) dla niemodyfikowanego cementu kostnego i cementu modyfikowanego EU-MAA lub EU-T2, zawierającego 0,7% BPO (a, b) lub 1% BPO (c, d).

Dodatek modyfikowanych monomerów wpływa nie tylko na przebieg polimeryzacji, ale również na stopień przereagowania wiązań podwójnych C=C. W przypadku cementów kostnych zawierających 0,7 %mas. BPO i 0,83 %mas. DMA monomer EU-MAA powoduje nieznaczny wzrost stopnia przereagowania ($p^f = 80\%$), natomiast monomer EU-T2 powoduje spadek tego parametru o ok. 24% ($p^f = 50\%$), w porównaniu do cementu niemodyfikowanego ($p^f = 74\%$). Ze względu na stosunkowo niski stopień przereagowania wiązań podwójnych C=C cementów kostnych uzyskany w trakcie badania metodą DSC (tj. po 30 lub 90 minutach) przeprowadzono dodatkowe analizy techniką ATR-FTIR zarówno po 30 lub 90 minutach, jak i po 24 godzinach. Wyniki przedstawiono w tabeli 14.

Tab. 14. Stopień przereagowania wiązań podwójnych C=C wyznaczony metodą ATR-FTIR ($p_{ATR-FTIR}$) po czasie utwardzania próbki 30/90 min i 24 godzinach.

Czas utwardzania	$p_{ATR-FTIR}, \%$					
	BC	BC_EU-MAA	BC_EU-T2	BC	BC_EU-MAA	BC_EU-T2
	0,7 %mas. BPO			1 %mas. BPO		
30 min / 90 min	93,4	88,0	64,6	58,3	94,9	72,4
24 h	97,1	97,1	88,2	96,2	99,0	87,3

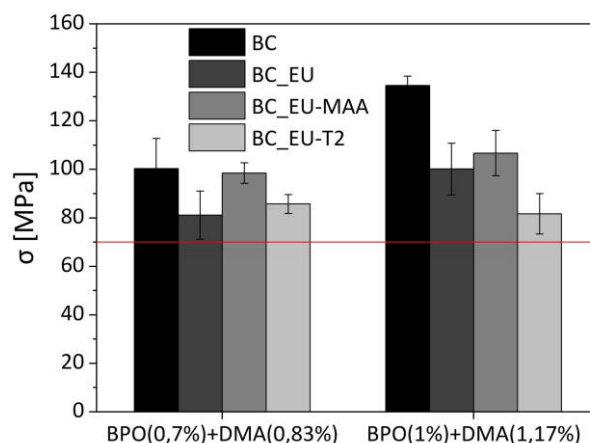
Wyznaczone metodą ATR-FTIR stopnie przereagowania wiązań podwójnych C=C są nieco wyższe niż w przypadku wyznaczonych metodą DSC, co może być związane z wielkością badanej próbki. Co ważne, po 24 godzinach utwardzania stopnie przereagowania wzrastają. Ograniczenie w osiągnięciu 100% przereagowania wiązań podwójnych C=C może być związane z brakiem reaktywności wiązań wiszących (bocznych) monomeru TEGDM po jego wbudowaniu w strukturę polimeru jednym wiązaniem podwójnym. Ponadto, ograniczenia dyfuzyjne wynikające z wysokiej lepkości i tworzącej się sieci polimerowej mogą utrudniać monomerowi lub rosnącemu łańcuchowi polimerowemu dotarcie do tych wiązań. Natomiast w przypadku cementu modyfikowanego EU-T2 występują dodatkowe efekty związane z inhibicją reakcji, które mogą wynikać z hamującego działania wywieranego przez modyfikowany eugenol. Wyniki przebiegu polimeryzacji wykonane termoparą wskazują również, że zastosowana ilość składników systemu inicjującego może być zbyt mała, dlatego przebadano również cementy kostne zawierające 1 %mas. BPO i 1,17 %mas. DMA. Cementy te osiągnęły wyższe stopnie przereagowania, co widać na wykresie przedstawionym na rysunku 93d, podczas gdy dla cementu niemodyfikowanego zaobserwowano spadek tego parametru o około 20%. Uzyskane wyniki potwierdzają również badania przeprowadzone metodą ATR-FTIR. W przypadku niemodyfikowanego cementu kostnego, jak również cementu modyfikowanego EU-T2, uzyskano podobny stopień przereagowania wiązań podwójnych C=C po 24 godzinach utwardzania, niezależnie od stężenia systemu inicjującego. Jednak w przypadku cementu modyfikowanego EU-MAA zaobserwowano znaczny wzrost przereagowania dla próbki zawierającej 1 %mas. BPO i 1,17 %mas. DMA. Może to być związane ze znacznie wyższą temperaturą utwardzania, która może zwiększać mobilność polimeryzującego układu, a tym samym wpływać na wzrost stopnia przereagowania.

Dodatkowo, określono również stężenie nieprzereagowanych monomerów w niemodyfikowanym cemencie kostnym (1 %mas. BPO i 1,17 %mas. DMA) po 24 godzinach utwardzania stosując nieizotermiczną metodę DSC. Wyznaczony parametr wynosi ok. 2%, co potwierdza wynik uzyskany metodą ATR-FTIR.

Podsumowując, estryfikacja grupy hydroksylowej eugenolu grupą karboksylową monomeru MAA wyeliminowała wpływ eugenolu na kinetykę polimeryzacji, a proces utwardzania cementów kostnych był podobny do uzyskanego dla niemodyfikowanych cementów kostnych [57]. Reakcja hydrotiolowania podwójnego wiązania grupy allilowej eugenolu z grupą tiolową monomeru T2 również spowodowała ograniczenie wpływu eugenolu na proces utwardzania cementów kostnych. Polimeryzacja cementów kostnych modyfikowanych monomerami EU-DT charakteryzuje się wyższymi temperaturami maksymalnymi i dłuższym czasem wiązania w porównaniu do cementów kostnych modyfikowanych eugenolem. Różnice w przebiegu polimeryzacji cementów kostnych modyfikowanych poszczególnymi EU-DT wynikają z ich różnej struktury molekularnej i obecności różnych grup funkcyjnych. Eugenol, ze względu na swoją

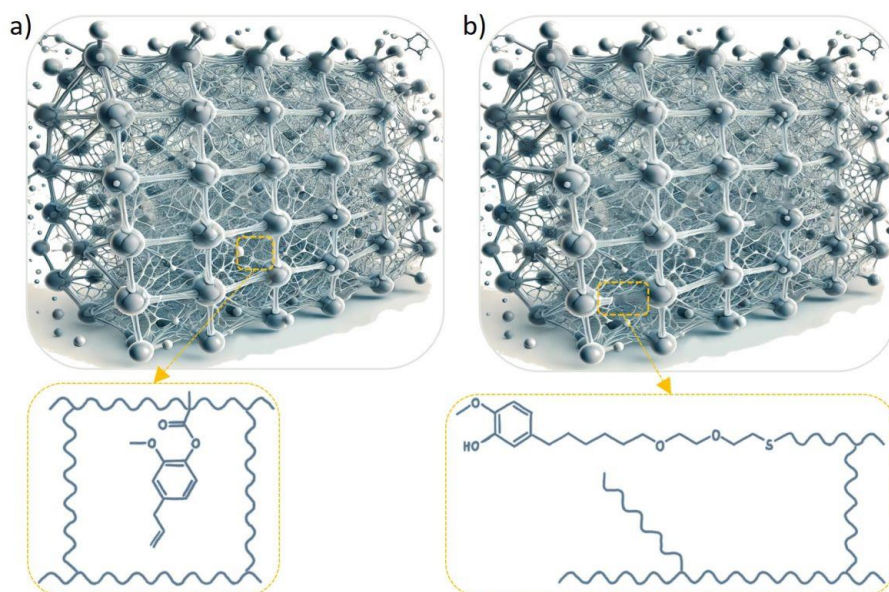
strukturę i obecność grupy hydroksylowej OH (jest pochodną fenolu - a fenole są znanymi retarderami polimeryzacji rodnikowej), działa jako retarder, który wydłuża czas polimeryzacji i zmienia kinetykę procesu [306,350]. Estryfikacja grupy OH eugenolu kwasem metakrylowym w monomerze EU-MAA silnie ograniczyła wpływ struktury chemicznej EU na proces polimeryzacji cementów kostnych, jednak jak pokazują badania prowadzone w ramach niniejszej pracy jak i opisane w publikacjach [349,351] metakrylowe pochodne eugenolu obniżają egzotermę polimeryzacji i maksymalną temperaturę utwardzania. Ta pochodna eugenolu zawiera w swojej strukturze grupę metakrylową, podobnie jak monomery stosowane w fazie ciekłej cementu, a zatem zostaje włączona w strukturę otrzymanego kopolimeru. Pochodną EU-T2 otrzymano w reakcji tiol-en grupy allilowej eugenolu z grupą SH tiolu, co skutkuje zachowaniem struktury eugenolu odpowiedzialnej za opóźnianie reakcji polimeryzacji. Włączenie tiolu w strukturę eugenolu zmniejsza wpływ EU na proces polimeryzacji, jednak go nie eliminuje. Skutkuje natomiast nieznacznym wzrostem temperatury utwardzania cementu kostnego i skróceniem czasu polimeryzacji. Zastosowanie tej pochodnej wpływa również na pojawienie się dodatkowego mechanizmu polimeryzacji, tj. stopniowej polimeryzacji tiol-en, obok łańcuchowej kopolimeryzacji metakrylanów. Wpływa to również na strukturę tworzonego kopolimeru, w którym pojawiają się wiązania tioeterowe. Co ważniejsze, ta pochodna powoduje zakończenie wzrostu łańcucha polimeru, ponieważ zawiera tylko jedną grupę SH w swojej strukturze. Dlatego pochodne eugenolu występują na końcach łańcucha, co powinno zwiększyć ich dostępność jako środka przeciwbakteryjnego.

Zmiany w procesie utwardzania modyfikowanych cementów kostnych sugerują, że dodatek EU-DT może wpływać na wytrzymałość na ściskanie cementów kostnych. Badaniom mechanicznym poddano materiały zawierające stałą ilość EU-DT i różne stężenie układu inicjującego. Cementy kostne modyfikowane EU-MAA (system inicjujący – 0,7 %mas. BPO i 0,83 %mas. DMA) charakteryzują się podobną wartością wytrzymałości na ściskanie jak cement niemodyfikowany, natomiast próbki z 1 %mas. BPO i 1,17 %mas. DMA wykazują znaczny spadek tego parametru (rysunek 94). Z kolei, dodatek EU-T2 powoduje spadek wytrzymałości na ściskanie w przypadku obu zastosowanych stężeń układu inicjującego. Próbki zawierające 0,7 %mas. BPO i 0,83 %mas. DMA charakteryzują się wytrzymałością na ściskanie porównywalną z cementem modyfikowanym EU. Jednak zwiększenie stężenia układu inicjującego do 1 %mas. BPO i 1,17 %mas. DMA w przypadku cementu modyfikowanego EU-T2 nie prowadzi do wzrostu σ , i jej wartość jest zbliżona do wartości uzyskanej dla cementu kostnego zawierającego mniejszą ilość układu inicjującego.



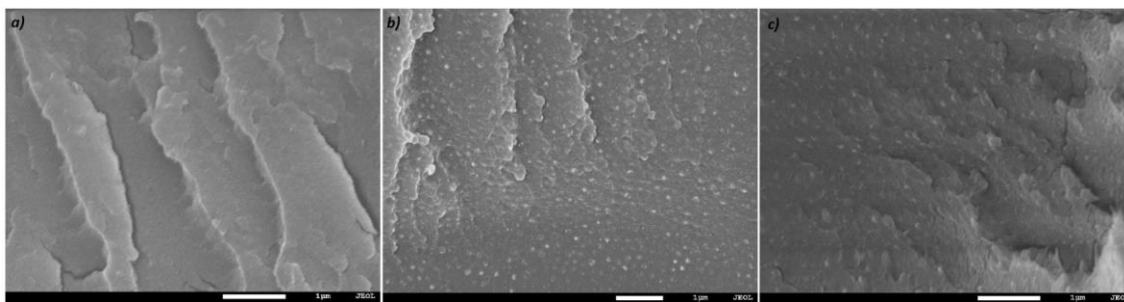
Rys. 94. Wytrzymałość na ściskanie (σ) cementów kostnych: niemodyfikowanego oraz modyfikowanego eugenolem i pochodnymi eugenolu: EU-MAA i EU-T2.

Porównując wytrzymałość na ściskanie cementu modyfikowanego eugenolem i cementów modyfikowanych pochodnymi eugenolu, można zauważyć, że dodatek EU-MAA spowodował wzrost wartości tego parametru w obu przypadkach, podczas gdy dodatek EU-T2 wykazał jego wzrost dla cementu kostnego zawierającego 0,7 %mas. BPO i 0,83 %mas. DMA i spadek wartości dla cementu zawierającego 1 %mas. BPO i 1,17 %mas. DMA. Różnice we wpływie EU-DT na właściwości mechaniczne cementów kostnych wynikają z różnej budowy chemicznej związków zastosowanych do modyfikacji eugenolu (o czym wspomniano powyżej). EU-MAA jest difunkcyjnym monomerem i przez grupę metakrylową pochodzącą od monomeru MAA może wbudować się w łańcuch polimerowy przyczyniając się do jego wydłużenia, a część eugenolowa jest grupą wiszącą (rysunek 95a). Natomiast pochodna eugenolu EU-T2 jest monofunkcyjnym monomerem biorącym udział w reakcji tiol-en i po reakcji addycji grupy SH do grupy metakrylowej monomeru wzrost łańcucha zostaje zakończony, co prowadzi do wytworzenia w sieci polimerowej łańcuchów wiszących zakończonych eugenolem (rysunek 95b).



Rys. 95. Schematyczna struktura sieci polimerowej cementu kostnego z kowalencyjnie wbudowanymi pochodnymi eugenolu: a) EU-MAA; b) EU-T2.

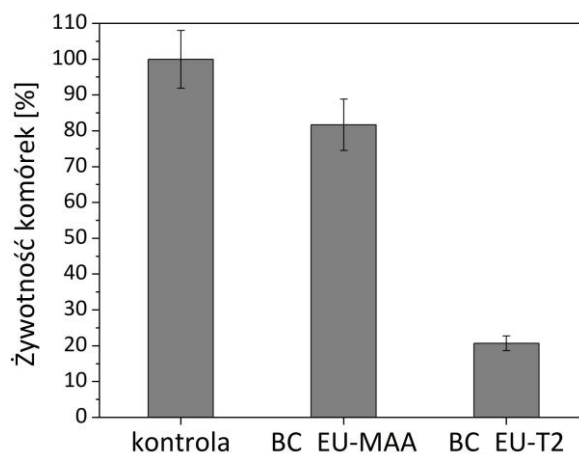
Wbudowanie EU-MAA w sieć polimerową może skutkować jej większą gęstością i wyższą wytrzymałością na ściskanie niż dla próbek modyfikowanych EU-T2. Co więcej, wprowadzenie EU-MAA spowodowało wzrost wytrzymałości na ściskanie w porównaniu do próbek modyfikowanych eugenolem. Podobne wyniki uzyskano w przypadku dodania metakrylanu eugenilu do żywicy dentystycznej, co skutkowało wzrostem wytrzymałości na ściskanie [349,351]. Obecność wolnych końców łańcucha EU-T2 może prowadzić do obniżenia gęstości sieci polimerowej cementu kostnego, co w konsekwencji skutkuje pogorszeniem jego właściwości mechanicznych, ale jednocześnie może zwiększyć dostępność eugenolu, co może przełożyć się na poprawę właściwości antybakteryjnych materiału. Pogorszenie wytrzymałości mechanicznej cementu kostnego modyfikowanego EU-T2 może być również związane z mniejszym przereagowaniem wiązań podwójnych (tabela 14), co prowadzi do powstania sieci polimerowej o mniejszej gęstości oraz efektem plastyfikującym wywieranym przez nieprzereagowane monomery. Ponadto, zmniejszenie wytrzymałości mechanicznej może wynikać ze zmian w morfologii otrzymanych materiałów w porównaniu z niemodyfikowanym cementem kostnym. W celu analizy tych różnic wykonano zdjęcia mikroskopowe SEM modyfikowanych cementów kostnych, które pokazano na rysunku 96.



Rys. 96. Zdjęcia mikroskopowe SEM cementu kostnego: a) niemodyfikowanego, i cementu kostnego modyfikowanego b) EU-MAA i c) EU-T2.

Dodatek EU-DT wpłynął na strukturę otrzymanych cementów kostnych, zwiększając ich porowatość w stosunku do cementu niemodyfikowanego. Może to wynikać z oddziaływań pomiędzy pochodnymi eugenolu a składnikami cementu kostnego. Ponadto, pochodne eugenolu dodawano w ilości 0,5 %mas. przeliczając na zawartość eugenolu, a więc w trakcie badań uległ zmianie również skład fazy ciekłej, co mogło wpłynąć nie tylko na zmianę struktury sieci polimerowej, ale również na pęcznienie kopolimerów metakrylowych (fazy proszkowej kompozycji cementu kostnego). Niższą porowatością charakteryzował się materiał z dodatkiem EU-MAA, co może być związane z obecnością tych samych reaktywnych grup funkcyjnych w monomerach i pochodnej eugenolu. Dzięki temu oddziaływania między składnikami kompozycji nie zmieniły się tak znacząco, lecz ma na nie wpływ obecność eugenolu w strukturze pochodnej. Większa porowatość cementu modyfikowanego EU-T2 może być rezultatem słabszych oddziaływań między składnikami kompozycji. Razem z mniejszą gęstością sieci polimerowej powstającej podczas utwardzania cementu może to prowadzić do pogorszenia właściwości mechanicznych otrzymanego materiału.

Badania przedstawione we wcześniejszej części pracy pokazują, że cementy kostne modyfikowane eugenolem wykazują właściwości bakteriostatyczne dla szczepów *E. coli*. Badania da Silva i współpracowników [272] pokazują, że pochodne eugenolu wykazują silniejsze właściwości przeciwbakteryjne, co powinno skutkować lepszymi właściwościami przeciwbakteryjnymi materiałów wobec szczepów *E. coli*. Po 24 godzinach żywotność komórek w porównaniu do próby kontrolnej wynosiła $81,7 \pm 7,2\%$ dla próbki cementu kostnego modyfikowanego EU-MAA i $20,7 \pm 2,0\%$ dla próbki cementu kostnego modyfikowanego EU-T2 (rysunek 97).



Rys. 97. Żywotność komórek bakteryjnych *E. coli* po 24 godzinach inkubacji w obecności cementów kostnych modyfikowanych pochodnymi EU-MAA lub EU-T2.

Aktywność antybakteryjną eugenolu przypisuje się wolnej grupie hydroksylowej występującej w jego strukturze. Jak wskazują źródła literaturowe [272,280,349] właściwości antybakteryjne wzrastają po modyfikacji eugenolu poprzez grupę hydroksylową, co również potwierdzają wyniki przedstawione powyżej. Ponadto, pochodna eugenolu EU-T2, zawierająca w swojej strukturze wolną grupę OH, wykazuje lepsze właściwości antybakteryjne, co może być związane z mechanizmem działania antybakteryjnego eugenolu. Co więcej, większa dostępność eugenolu występującego na końcu łańcucha może prowadzić do uzyskania lepszych właściwości przeciwbakteryjnych niż w przypadku pochodnej EU-MAA, która jest silnie zintegrowana z matrycą cementu kostnego i może być ekranowana przez strukturę polimeru.

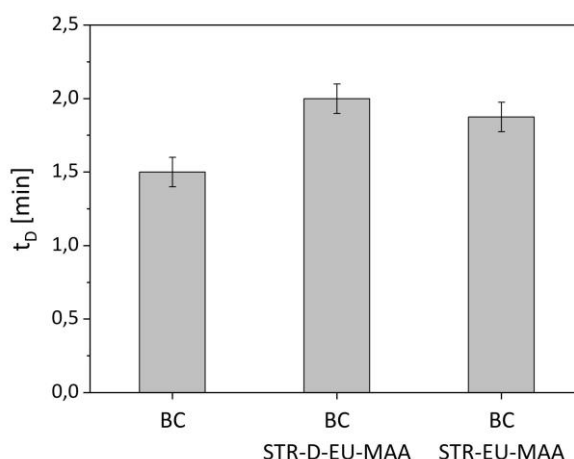
Podsumowując, wprowadzenie pochodnej metakrylowej eugenolu do kompozycji cementu kostnego spowodowało skrócenie czasu t_D oraz czasu t_{set} , a także parametru T_{max} w stosunku do niemodyfikowanych cementów kostnych oraz wzrost wytrzymałości na ściskanie i aktywności przeciwbakteryjnej w porównaniu z cementami kostnymi modyfikowanymi eugenolem. Pochodna tiolowa pozwoliła na obniżenie maksymalnej temperatury utwardzania cementu kostnego jak i na zwiększenie aktywności przeciwbakteryjnej otrzymanego cementu kostnego, jednakże spowodowała zmniejszenie stopnia przereagowania wiązań podwójnych C=C (nieprzereagowany monomer może mieć toksyczny wpływ na otaczające tkanki) i wytrzymałości na ściskanie oraz wydłużenie czasu wiązania cementu. Modyfikacja chemiczna eugenolu grupami reaktywnymi w polimeryzacji i włączenie jego pochodnych do cementów kostnych pozwoliło ograniczyć wpływ eugenolu na proces utwardzania cementów kostnych i uzyskać materiały o pożądanych właściwościach mechanicznych i zwiększonej aktywności przeciwbakteryjnej.

2.3.2.4. Polimery gwiaździste z wbudowanym eugenolem

Kompleksowanie eugenolu polimerem gwiaździstym czy cyklodekstryną pozwoliło uzyskać materiały o pożądanych właściwościach antybakteryjnych. Niestety, spowodowało to również

znaczny spadek wytrzymałości otrzymanych cementów kostnych na ściskanie. Zastosowanie pochodnej eugenolu EU-MAA pozwoliło zaś otrzymać materiały zarówno o dobrych właściwościach mechanicznych, jak i antybakteryjnych. Dlatego, aby zarówno wyeliminować negatywny wpływ eugenolu na właściwości cementu kostnego, jak i wzmocnić jego działanie antybakteryjne, postanowiono otrzymać polimer gwiaździsty modyfikowany pochodną eugenolu EU-MAA. Polimery gwiaździste z wbudowaną w strukturę pochodną EU-MAA, których syntezę opisano w rozdziale 2.1.3. *Synteza polimerów gwiaździstych*, w punkcie *Polimery gwiaździste modyfikowane EU-MAA*, wprowadzono do cementów kostnych i zbadano ich wpływ na parametry otrzymanego materiału oraz jego właściwości antybakteryjne.

Wprowadzenie polimerów gwiaździstych STR-D-EU-MAA i STR-EU-MAA do cementów kostnych spowodowało wydłużenie czasu t_D do około 2 minut (rysunek 98 i tabela 15), co jest wartością zbliżoną do tej uzyskanej dla cementu kostnego zawierającego kompleks eugenolu z polimerem gwiaździstym, tj. BC_STR:EU (rysunek 86, tabela 12).

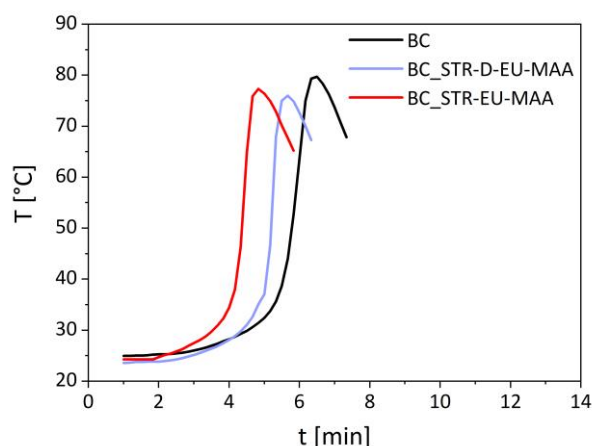


Rys. 98. Doughing time (t_D) niemodyfikowanego cementu kostnego i modyfikowanego dodatkiem polimerów gwiaździstych STR-D-EU-MAA i STR-EU-MAA ($n = 4$).

Mimo nieznacznego wydłużenia czasu t_D , wprowadzenie do cementu kostnego eugenolu związanego wiązaniem kowalencyjnym z STR wyeliminowało negatywny wpływ tego czynnika aktywnego na proces polimeryzacji cementów kostnych. Czas utwardzania cementów kostnych modyfikowanych STR-D-EU-MAA i STR-EU-MAA uległ znacznemu skróceniu w porównaniu do t_{set} cementów modyfikowanych kompleksem STR:EU, a przebieg polimeryzacji był podobny do tego dla niemodyfikowanego cementu (rysunek 99). T_{max} modyfikowanych cementów kostnych również osiągnęły wartości zbliżone do tych dla niemodyfikowanych cementów, mimo że czas wiązania uległ nieznacznemu skróceniu (tabela 15). Zatem wprowadzenie eugenolu w postaci związanej kowalencyjnie w gwiazdce polimerowej, spowodowało ograniczenie wywieranego przez EU pozytywnego działania na proces, przez znaczące obniżenie temperatury maksymalnej cementu kostnego.

Tab. 15. Charakterystyczne parametry utwardzania cementów kostnych – doughing time t_D , maksymalna temperatura T_{max} , temperatura T_{set} oraz czas t_{set} utwardzania, wytrzymałość na ściskanie σ .

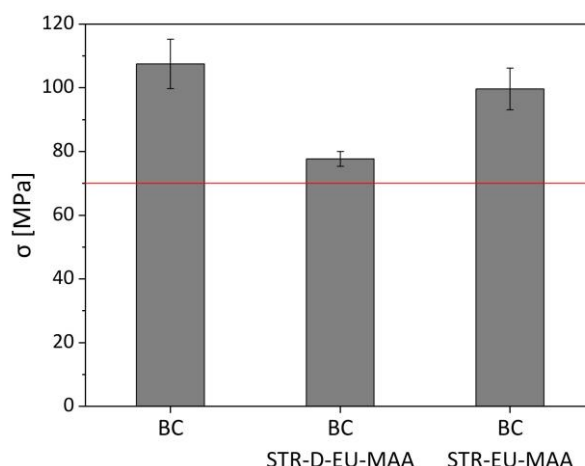
Próbka	t_D [min]	T_{max} [°C]	T_{set} [°C]	t_{set} [min]	σ [MPa]
BC	$1,5 \pm 0,1$	$79,7 \pm 3,1$	$52,3 \pm 2,1$	$5,8 \pm 0,5$	$107,5 \pm 7,8$
BC_STR-D-EU-MAA	$2,0 \pm 0,1$	$76,0 \pm 2,8$	$48,5 \pm 2,6$	$5,2 \pm 0,6$	$77,7 \pm 2,3$
BC_STR-EU-MAA	$1,9 \pm 0,1$	$77,3 \pm 2,3$	$49,9 \pm 2,4$	$4,5 \pm 0,3$	$99,6 \pm 6,6$



Rys. 99. Krzywe temperatury utwardzania, jako zależność temperatury od czasu, kompozycji cementu kostnego niemodyfikowanego oraz modyfikowanego polimerami gwiaździstymi STR-D-EU-MAA i STR-EU-MAA ($n = 3$).

Co ważne, wprowadzenie niemodyfikowanych polimerów gwiaździstych do cementów kostnych wpływa na obniżenie T_{max} , co przedstawiono również w badaniach Tham i współpracowników [30]. Wprowadzili oni czteroramienny polimer gwiaździsty PMMA o średniej masie cząsteczkowej około 45 000 w miejsce liniowego PMMA. Spowodowało to nieznaczny spadek parametru T_{max} z wartości 66,6 °C do wartości 63,9 °C i T_{set} z wartości 46,8 °C do wartości 45,6 °C, jednak czas t_{set} uległ wydłużeniu z 7,2 minuty do 7,8 minuty. Zatem uzyskany spadek T_{max} w niniejszych badaniach może wynikać z wprowadzenia polimeru gwiaździstego, a nie jego modyfikacji eugenolem.

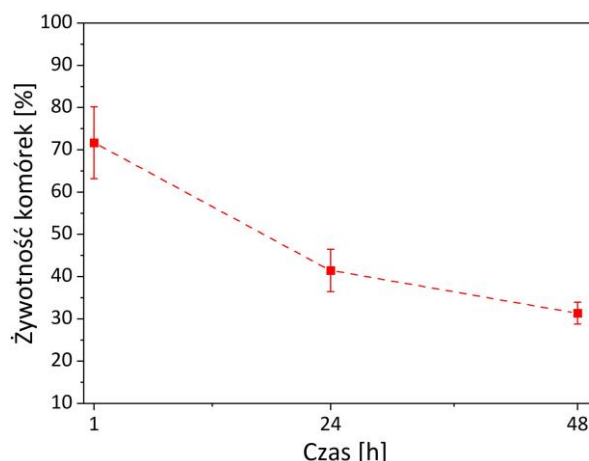
Wytrzymałość na ściskanie cementów kostnych modyfikowanych polimerami gwiaździstymi STR-D-EU-MAA i STR-EU-MAA uległa obniżeniu w stosunku do cementu niemodyfikowanego i wynosiła odpowiednio $\sigma_{BC_STR-D-EU-MAA} = 77,7 \pm 2,3$ MPa i $\sigma_{BC_STR-EU-MAA} = 99,6 \pm 6,6$ MPa, jak pokazano na rysunku 100 i w tabeli 15.



Rys. 100. Wytrzymałość na ściskanie cementu kostnego niemodyfikowanego i modyfikowanego polimerami gwiaździstymi STR-D-EU-MAA i STR-EU-MAA: ($n = 5$).

Podobny spadek wytrzymałości na ściskanie zaobserwowano dla komercyjnego cementu kostnego Palacos R (PR). Parametr ten uległ obniżeniu z $\sigma_{PR} = 104,8 \pm 4,9$ MPa do $\sigma_{PR_STR-EU-MAA} = 84,1 \pm 2,7$ MPa. Jak pokazują badania, wprowadzenie dodatków do cementu kostnego powoduje pogorszenie właściwości mechanicznych. Tham i współpracownicy [30] zaobserwowali, że zastąpienie liniowego PMMA o $M_w = 12\ 000$, czteroramiennym polimerem gwiaździstym PMMA o $M_w = 45\ 000$, powoduje spadek wytrzymałości na zginanie i modułu zginania odpowiednio o 4% i 10%. Wright i współpracownicy [95] wprowadzając funkcjonalne materiały grafenowe do cementów kostnych zaobserwowali spadek wytrzymałości na ściskanie o około 10%. Brak jest doniesień literaturowych na temat modyfikacji cementów kostnych polimerami gwiaździstymi z kowalencyjnie przyłączonym środkiem antybakteryjnym lub analogicznymi materiałami o innej strukturze i ich wpływie na parametry cementów kostnych. W związku z tym badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy mają charakter nowatorski.

Na podstawie otrzymanych wyników badań mechanicznych, do dalszych testów właściwości antybakteryjnych, wybrano cement kostny modyfikowany polimerem gwiaździstym STR-EU-MAA. Na wykresie przedstawionym na rysunku 101 pokazano żywotność komórek kultur bakteryjnych *E. coli* w obecności modyfikowanego cementu kostnego BC_STR-EU-MAA. Wyniki zapewniają wgląd w skuteczność antybakteryjną tych materiałów w okresie 48 godzin.



Rys. 101. Wpływ cementu kostnego modyfikowanego polimerem gwiazdowym STR–EU-MAA na żywotność *E. coli* ($n = 3$).

Jak pokazano we wcześniejszym rozdziale, polimer gwiazdowy STR–EU-MAA wykazuje aktywność przeciwbakteryjną, jednak jest ona znacznie słabsza od aktywności kompleksu STR:EU. Można to wytłumaczyć modyfikacją grupy -OH, której przypisuje się antybakteryjne właściwości eugenolu [272,345]. Jednakże, w przypadku cementu kostnego modyfikowanego polimerem gwiazdowym BC_STR–EU-MAA żywotność komórek spada do około 40% po 24 godzinach, a po 48 godzinach odnotowano dalszy, niewielki spadek tej wartości. Ponadto żywotność komórek bakteryjnych jest niższa niż w przypadku samego polimeru gwiazdowego STR–EU-MAA, co może być spowodowane częściową hydrolizą wiązania estrowego w koniugacie eugenol - polimer gwiazdowy w podwyższonej temperaturze polimeryzacji cementu kostnego i uwolnieniem większej ilości wolnego eugenolu niż ma to miejsce w badaniach samego polimeru gwiazdowego STR–EU-MAA. Jak wspomniano wyżej, brak jest doniesień literaturowych na temat akrylanowych cementów kostnych modyfikowanych antybakteryjnymi polimerami gwiazdowymi lub o innej strukturze, zatem trudno jest porównać otrzymane wyniki z literaturą. Jednakże w jednym z źródeł literaturowych Weng i współpracownicy [240] przedstawili wyniki badań wskazujące na poprawę właściwości antybakteryjnych cementów szkło-jonomerowych (GIC, gład-ionomer) dzięki ich modyfikacji polimerami gwiazdowymi zawierającymi poli(czwartorzędowe sole amoniowe). Pozwoliło to otrzymać materiał GIC wykazujący zmniejszenie żywotności *S. mutans* o 40 – 79% (w przypadku komercyjnego cementu kostnego Fuji II LC) i 40–91% (w przypadku cementu na bazie utwardzalnego światłem polimeru gwiazdowego poli(kwasu akrylowego) przygotowanego przez autorów).

Uwzględniając powyższe wyniki, zsyntetyzowane polimery gwiazdowe zawierające włączony kowalencyjnie eugenol z sukcesem wprowadzono do cementów kostnych, nadając im właściwości antybakteryjne. Modyfikacja ta wpłynęła również na właściwości mechaniczne i kinetykę polimeryzacji otrzymanych cementów kostnych. Wytrzymałość na ściskanie zmodyfikowanych cementów kostnych pogorszyła się w stosunku do cementów niemodyfikowanych, lecz nadal spełniały one minimalne wymagania normy ISO 5833:2002.

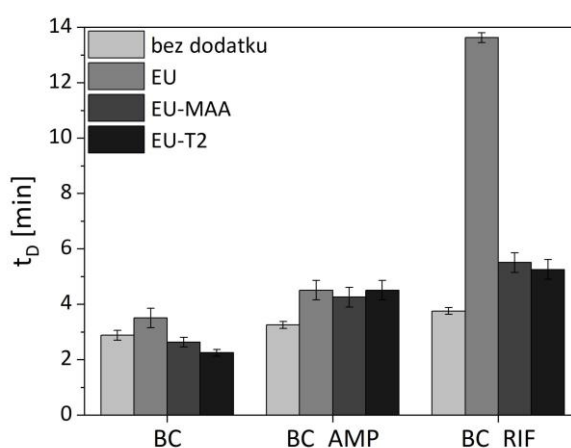
Testy antybakteryjne wykazały, że cementy kostne zawierające STR–EU-MAA wykazały silną początkową aktywność antybakteryjną przeciwko *E. coli*, z wyraźnym zmniejszeniem żywotności komórek w ciągu pierwszych 24 godzin. Wprowadzenie polimerów gwiaździstych z kowalencyjnie wbudowanym eugenolem do cementu kostnego stanowi zatem obiecującą strategię nadania im właściwości antybakteryjnych, przy jednoczesnym utrzymaniu odpowiednich parametrów mechanicznych.

2.3.2.5. Eugenol i pochodne eugenolu wraz z antybiotykami

Cementy kostne modyfikowane antybiotykiem ampicyliną wykazują bardzo dobre właściwości użytkowe i mechaniczne, jednakże ich aktywność antybakteryjna wymaga poprawy. Jedną z metod poprawy właściwości antybakteryjnych jest zwiększenie dawki antybiotyku w cemencie kostnym (ABLC w niskiej dawce – od 0,5 do 2 g antybiotyku na 40 g proszku (5%) oraz ABLC w wysokiej dawce ≥ 5 g antybiotyku na 40 g proszku (12,5%)) [130]. Komercyjne cementy kostne zawierają od 1,5% (Refobacin Plus) do nawet 5% (Copal G+C) antybiotyku, co klasyfikuje je w grupie cementów kostnych z niską dawką antybiotyku. Jednakże, przy uwalnianiu leku na poziomie 1 – 17% [131,133,134], duża część antybiotyku zostaje uwięziona w matrycy polimerowej, co stwarza warunki sprzyjające powstawaniu oporności bakteryjnej [137]. Inną metodą poprawy właściwości antybakteryjnych cementów kostnych, szczególnie w leczeniu infekcji spowodowanych szczepami bakterii opornych na antybiotyki, jest łączenie różnych antybiotyków ze względu na ich możliwy efekt synergistyczny [118,131,141]. Zjawisko wzmocnienia działania antybiotyku dodatkiem innego czynnika można wykorzystać do zmniejszenia ilości stosowanego antybiotyku. Badania wskazują, że olejki eteryczne mogą wzmacniać działanie konwencjonalnych antybiotyków, zwiększając ich skuteczność w walce z szczepami opornymi. Ten synergistyczny efekt może pomóc przywrócić skuteczność antybiotyków [335,337,352]. Oddziaływania między olejkami eterycznymi a antybiotykami mogą się jednak różnić, wykazując działanie antagonistyczne, synergistyczne lub addytywne w zależności od konkretnej kombinacji i proporcji [353]. W badaniach przeprowadzonych przez Hemaiswarya i Doble [354] oraz Moon i współpracowników [355] potwierdzono efekt synergistyczny pomiędzy eugenolem i ampicyliną. W niniejszym rozdziale omówiono wpływ zastosowania eugenolu oraz jego pochodnych z antybiotykami (ampicyliną i ryfampicyną) na właściwości użytkowe, mechaniczne oraz, przede wszystkim, aktywność antybakteryjną cementów kostnych.

Do cementów kostnych z dodatkiem antybiotyku, których badania przedstawiono w rozdziale 2.3.1.1. *Antybiotyki*, wprowadzono EU, EU-MAA oraz EU-T2 w ilości odpowiednio 0,71% i 1,06%, aby EU stanowił 0,5 %mas. Ze względu na wpływ zarówno ryfampicyny, jak i eugenolu oraz jego pochodnych na proces utwardzania cementów kostnych, w pierwszym etapie scharakteryzowano właściwości użytkowe materiałów.

Pierwszym wyznaczonym parametrem był *doughing time* (rysunek 102), który różnił się w zależności od modyfikacji. Wprowadzenie EU do kompozycji cementu kostnego niemodyfikowanego (BC) jak i modyfikowanego antybiotykiem (BC_AMP, BC_RIF) spowodowało wydłużenie czasu t_D , co potwierdzają wyniki badań nad wpływem eugenolu na cementy kostne. W przypadku cementu kostnego zawierającego ampicynę czas t_D wzrósł do 4,5 minuty, a więc mieści się w zakresie normy. Natomiast w przypadku BC_RIF+EU czas t_D wzrósł aż do 13,5 minuty, co znacznie wykracza poza dopuszczalny przez normę ISO 5833:2002 zakres t_D , określony na 5 minut [38]. Dodatek pochodnych EU do cementów kostnych zawierających antybiotyki (AMP lub RIF) również wydłuża czas t_D , szczególnie w stosunku do BC_RIF, lecz wzrost ten nie jest w tym przypadku tak znaczący (jak dla EU), i czas t_D wynosi 5,5 minuty dla BC_RIF+EU-MAA i 5,25 minuty dla BC_RIF+EU-T2. Wartości te tylko nieznacznie przekraczają wartość dopuszczoną przez normę. Dodatek EU-DT do cementu kostnego z AMP również spowodował wydłużenie czasu t_D , który wyniósł 4,25 minuty dla BC_AMP+EU-MAA i 4,5 minuty dla BC_AMP+EU-T2.



Rys. 102. *Doughing time* (t_D) badanych cementów kostnych bez dodatku antybiotyku (BC), z dodatkiem ampicyny (BC_AMP), z dodatkiem ryfampicyny (BC_RIF) modyfikowanych EU, EU-MAA lub EU-T2 ($n = 4$).

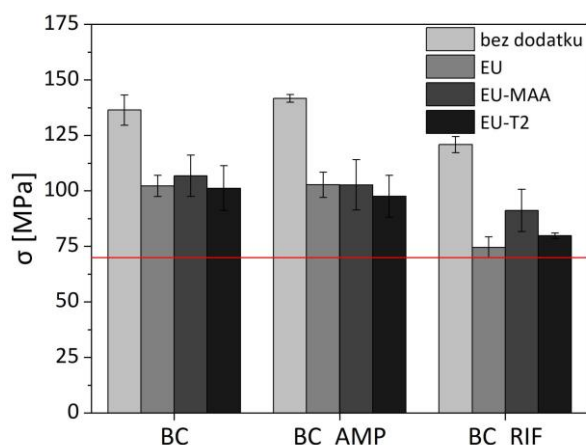
Jak przedstawiono w poprzednich rozdziałach, modyfikacja cementu kostnego antybiotykami, eugenolem, czy jego pochodnymi powoduje wydłużenie czasu t_D . Jest to związane z obecnością grup funkcyjnych w budowie tych związków, które wykazują działanie inhibujące lub opóźniające polimeryzację [306,326,350]. Wydłużenie czasu t_D było szczególnie nasilone dla cementu BC_RIF+EU przy jednoczesnym zastosowaniu RIF i eugenolu, co sugeruje, że ich współdziałanie wywołuje silniejszy efekt niż suma ich indywidualnych wpływów – efekt synergistyczny. Wpływ dodatków na przebieg procesu utwardzania został również określony przez wyznaczenie parametrów charakterystycznych, takich jak T_{max} , T_{set} oraz t_{set} . Wyniki przeprowadzonych pomiarów jednoznacznie wskazują na wydłużenie procesu utwardzania po wprowadzeniu eugenolu i jego pochodnych do cementów kostnych z antybiotykiem (tabela 16).

Tab. 16. Charakterystyczne parametry utwardzania cementów kostnych – doughing time t_D , maksymalna temperatura T_{max} , temperatura T_{set} oraz czas t_{set} utwardzania, wytrzymałość na ściskanie σ .

Próbka	t_D [min]	T_{max} [°C]	T_{set} [°C]	t_{set} [min]	σ [MPa]
BC	$2,9 \pm 0,2$	$87,5 \pm 0,9$	$56,4 \pm 0,5$	$6,5 \pm 0,5$	$136,4 \pm 6,9$
BC_EU	$3,5 \pm 0,4$	$34,7 \pm 1,6$	$28,8 \pm 1,0$	$21,9 \pm 3,7$	$102,2 \pm 4,8$
BC_EU-MAA	$2,6 \pm 0,2$	$67,1 \pm 0,3$	$45,5 \pm 0,2$	$8,6 \pm 0,3$	$106,7 \pm 9,3$
BC_EU-T2	$2,3 \pm 0,1$	$57,1 \pm 4,8$	$40,3 \pm 2,8$	$16,8 \pm 0,7$	$101,2 \pm 10,0$
BC_AMP	$3,3 \pm 0,1$	$88,4 \pm 1,5$	$57,5 \pm 2,3$	$6,2 \pm 0,3$	$141,6 \pm 1,7$
BC_AMP+EU	$4,5 \pm 0,4$	$52,7 \pm 0,5$	$38,1 \pm 0,2$	$15,6 \pm 0,4$	$102,7 \pm 5,7$
BC_AMP+EU-MAA	$4,3 \pm 0,4$	$63,9 \pm 2,1$	$43,6 \pm 1,1$	$12,8 \pm 0,6$	$102,7 \pm 11,4$
BC_AMP+EU-T2	$4,5 \pm 0,4$	$64,8 \pm 0,3$	$43,9 \pm 0,1$	$7,1 \pm 0,1$	$97,6 \pm 9,4$
BC_RIF	$3,8 \pm 0,1$	$74,7 \pm 2,9$	$49,2 \pm 0,1$	$12,9 \pm 0,1$	$95,2 \pm 3,3$
BC_RIF+EU	$13,6 \pm 0,2$	$31,2 \pm 0,2$	$27,2 \pm 0,1$	$19,9 \pm 0,1$	$74,5 \pm 4,7$
BC_RIF+EU-MAA	$5,5 \pm 0,4$	$40,1 \pm 3,9$	$31,6 \pm 2,1$	$17,8 \pm 3,7$	$91,2 \pm 9,5$
BC_RIF+EU-T2	$5,3 \pm 0,4$	$48,3 \pm 1,2$	$36,3 \pm 0,2$	$19,3 \pm 0,1$	$79,7 \pm 1,2$

Modyfikacja składu cementu kostnego bez dodatku antybiotyku pochodną eugenolu EU-MAA spowodowała mniejszy spadek wartości parametru T_{max} niż modyfikacja pochodną EU-T2. W przypadku cementów kostnych z dodatkiem antybiotyków obserwuje się wyższe wartości T_{max} dla kompozycji z EU-T2. Czas wiązania cementu kostnego t_{set} nie wykazuje natomiast jednoznacznej tendencji, gdyż dla cementu bez dodatku antybiotyku i z dodatkiem RIF, czas ten jest krótszy po dodaniu EU-MAA, natomiast dla BC_AMP po dodaniu EU-T2. Dodatek EU do każdego rodzaju cementu powoduje największy spadek wartości T_{max} i największe wydłużenie czasu t_{set} . Niestety, część z uzyskanych kompozycji nie spełnia wymogów normy ISO 5833:2002 dla cementów kostnych przeznaczonych do mieszania ręcznego, która określa zakres t_{set} od 3 do 15 minut [38]. Jednakże jak pokazuje patent US8415406B2 „Setting time indicator for acrylic bone cement” [356], oparty na normie ASTM-F451 „Standard Specification for Acrylic Bone Cement”, t_{set} akrylowych cementów kostnych może przekraczać 15 minut.

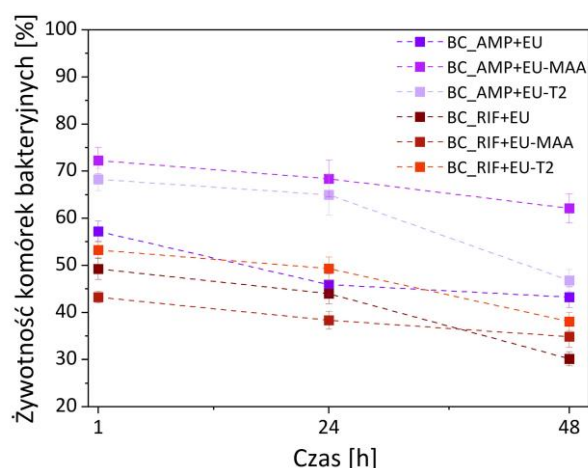
Dodatek eugenolu i jego pochodnych do niemodyfikowanych cementów kostnych spowodował wyraźne obniżenie wytrzymałości na ściskanie, co zostało szerzej opisane we wcześniejszych rozdziałach. Spadek ten wynosił między 20 a 25%. Wprowadzenie zarówno antybiotyku AMP jak i EU lub jego pochodnych EU-DT nie spowodowało różnic w właściwościach mechanicznych w stosunku do cementu bez antybiotyku, jednakże dla cementów z RIF obserwuje się różnice w zależności od zastosowanego modyfikatora (rysunek 103).



Rys. 103. Wytrzymałość na ściskanie cementów kostnych niemodyfikowanego (BC) lub z dodatkiem antybiotyków AMP i RIF modyfikowanych dodatkiem EU, EU-MAA i EU-T2 ($n = 5$).

Wprowadzenie EU do cementów kostnych spowodowało spadek wytrzymałości na ściskanie σ do wartości odpowiednio: $\sigma_{BC_EU} = 102,2 \pm 4,8$ MPa; $\sigma_{BC_AMP+EU} = 102,7 \pm 5,7$ MPa i $\sigma_{BC_RIF+EU} = 74,5 \pm 4,7$ MPa. Największy spadek parametru zaobserwowano dla BC_RIF+EU, co może być związane z obecnością grup funkcyjnych wywierających działanie inhibujące lub opóźniające na proces polimeryzacji [306,326,350], powodując wydłużenie reakcji, a co za tym idzie pogorszenie odporności mechanicznej. Wartość parametru σ jest na granicy minimalnej wytrzymałości na ściskanie cementów kostnych określonej przez normę ISO 5833:2002, jednakże nieznacznie ją przekracza. Najmniejszy spadek wytrzymałości na ściskanie obserwuje się po wprowadzeniu EU-MAA do BC_RIF. Cement ten charakteryzuje się wytrzymałością $\sigma_{BC_RIF+EU-MAA} = 91,2 \pm 9,5$ MPa i przewyższa wartość uzyskaną dla BC_RIF+EU-T2 ($\sigma_{BC_RIF+EU-T2} = 79,7 \pm 1,2$ MPa). Mimo wyraźnego obniżenia wytrzymałości na ściskanie cementów kostnych z antybiotykiem, modyfikowanych dodatkiem EU i EU-DT, materiały te spełniają wymagania normy i wykazują potencjał aplikacyjny.

W celu określenia skuteczności przeciwdrobnoustrojowej cementów kostnych zawierających różne połączenia antybiotyków (AMP, RIF) oraz eugenolu i jego pochodnych (EU, EU-MAA, EU-T2), przeprowadzono badania żywotności komórek bakteryjnych po 1, 24 i 48 godzinach inkubacji (rysunek 104).



Rys. 104. Wpływ cementu kostnego modyfikowanego dodatkiem antybiotyków i eugenolu lub pochodnych eugenolu na żywotność komórek bakteryjnych *E. coli* ($n = 3$).

Wszystkie badane cementy kostne wykazywały aktywność przeciwdrobnoustrojową, prowadząc do istotnego obniżenia żywotności komórek bakteryjnych w czasie. Najwyższą efektywność działania uzyskano w przypadku cementów zawierających ryfampicynę, tj. niezależnie od rodzaju zastosowanego modyfikatora (EU, EU-DT), obserwowano znaczący spadek żywotności bakterii już w ciągu pierwszych 24 godzin, który nasilał się po 48 godzinach inkubacji. Żywotności komórek *E. coli* w obecności tych cementów spadała poniżej 40%, co świadczy o silnym działaniu przeciwdrobnoustrojowym tego antybiotyku.

Natomiast w przypadku cementów zawierających ampicylinę, efektywność działania była wyraźnie zależna od rodzaju zastosowanej pochodnej eugenolu. Najbardziej efektywny okazał się system AMP+EU, w którym zaobserwowano systematyczny spadek żywotności komórek bakteryjnych do wartości zbliżonych do tych uzyskanych dla układów z ryfampicyną. Natomiast układy z AMP+EU-MAA oraz AMP+EU-T2 wykazywały wyższą żywotność bakterii, szczególnie po 1 godzinie, co wskazuje na ich słabsze i bardziej opóźnione działanie. Niemniej jednak, wszystkie badane układy wykazywały silniejszą aktywność antybakteryjną od cementu z AMP. Hemaiswarya i Doble [354] wykazali, że antybiotyki hydrofilowe, takie jak wankomycyna i antybiotyki β -laktamowe, które mają marginalne działanie na bakterie Gram-ujemne, wykazują zwiększoną aktywność przeciwbakteryjną po wstępnym potraktowaniu eugenolem. Podobne wyniki przedstawili Moon i współpracownicy [355], którzy wykazali istotne obniżenie wartości MIC (od 4- do 8-krotnie) w odniesieniu do testowanych drobnoustrojów dla kombinacji ampicylina i eugenol oraz Karumathil i współpracownicy [357], którzy stwierdzili występowanie efektu synergistycznego eugenolu w połączeniu z ampicyliną wobec *A. baumannii*.

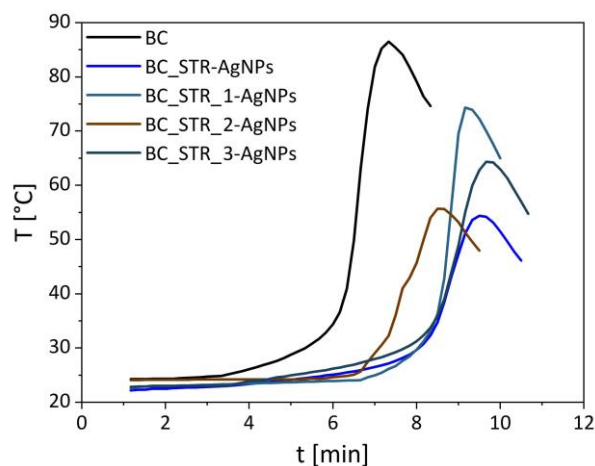
Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowanie odpowiednio dobranych eugenolu i jego pochodnych może wzmacniać działanie antybiotyków w cemencie kostnym, przy czym największą skuteczność uzyskano dla połączenia ryfampicyny z EU-T2 oraz ampicyliny z eugenolem. Obserwowany synergizm działania może wynikać z ułatwionego przenikania

antybiotyku przez błony bakteryjne oraz zwiększonej retencji w matrycy polimerowej, co skutkuje długotrwałym i efektywnym działaniem przeciwdrobnoustrojowym.

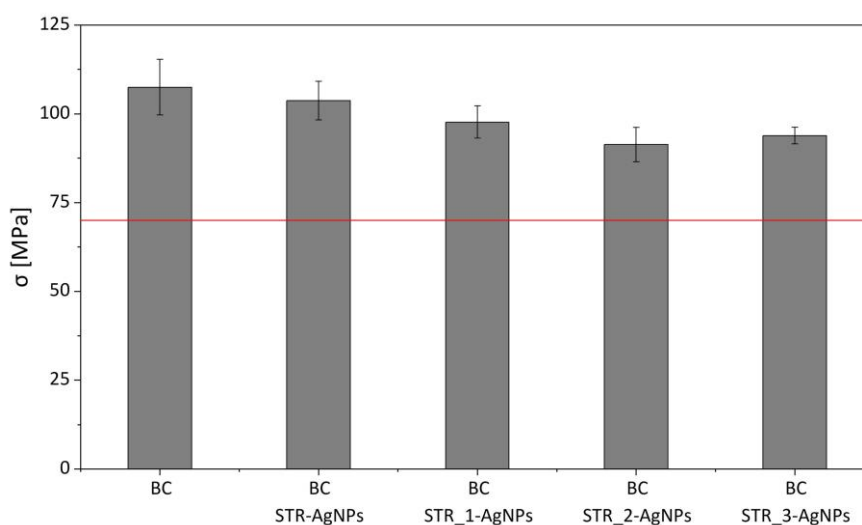
2.3.3. Modyfikacje polimerami gwiaździstymi ze srebrem

Nanocząstki srebra (AgNPs) są szeroko badane jako środki antybakteryjne w cementach kostnych [31,32,107,160], jednakże ich aktywność antybakteryjna zależy od wielkości ich cząstek. Cząstki o małej średnicy nie wykazują aktywności antybakteryjnej, natomiast cementy kostne obciążone nanosrebrem o dużej średnicy cząstek znacznie zredukowały zakażenia gronkowcem złocistym opornym na metycylinę (MRSA) [160]. Uzyskane AgNPs na polimerach gwiaździstych charakteryzują się dużymi rozmiarami i potencjalnie mogą być czynnikiem o działaniu antybakteryjnym w cementach kostnych. Co więcej, dodatek polimerów gwiaździstych z nanocząstkami srebra do cementów kostnych może nie tylko nadać właściwości antybakteryjne tym materiałom, ale także polepszyć uwalnianie antybiotyku z komercyjnego cementu kostnego obciążonego antybiotykiem. Motywacją do podjęcia tego kierunku badania było zaobserwowanie efektu działania synergistycznego antybiotyków i olejku eterycznego. Spodziewano się wystąpienia podobnego efektu z zastosowaniem nanocząstek srebra. W tym rozdziale zostanie przedstawiony wpływ dodatku STR–AgNPs na właściwości cementów kostnych.

Brak doniesień literaturowych na temat wpływu polimerów gwiaździstych modyfikowanych AgNPs na proces utwardzania cementów kostnych, jak również brak doniesień literaturowych na temat dodatku polimerów gwiaździstych na bazie PEG i/lub z nanosrebrem do cementów kostnych i ich wpływu na właściwości mechaniczne był motywacją do podjęcia tych badań. W pierwszym etapie zbadano zatem wpływ STR–AgNPs na temperaturę utwardzania jak i na właściwości mechaniczne cementów kostnych autorskiej kompozycji (BC). Wprowadzenie polimerów gwiaździstych z nanocząstkami srebra do cementów kostnych spowodowało obniżenie maksymalnej temperatury utwardzania T_{max} (rysunek 105, tabela 17) oraz wytrzymałości na ściskanie materiałów σ (rysunek 106, tabela 17). Większy spadek wartości maksymalnej temperatury utwardzania cementu jak i odporności na ściskanie spowodowały polimery gwiaździste z krótszymi ramionami (STR_2 i STR_3) – $\sigma_{BC_STR_2-AgNPs} = 91,4 \pm 4,8$ MPa i $T_{max} = 55,7$ °C oraz $\sigma_{BC_STR_3-AgNPs} = 93,9 \pm 2,4$ MPa i $T_{max} = 64,3$ °C. Najmniejszy spadek parametru σ zaobserwowano dla BC_STR–AgNPs i wynosił on $\sigma_{BC_STR-AgNPs} = 103,7 \pm 5,5$ MPa, natomiast $T_{max} = 54,4$ °C. W przypadku cementu BC_STR_1–AgNPs uzyskano następujące wartości omawianych parametrów: $\sigma_{BC_STR_1-AgNPs} = 97,7 \pm 4,5$ MPa i $T_{max} = 74,3$ °C.



Rys. 105. Krzywe temperatury polimeryzacji dla kompozycji cementu kostnego przed modyfikacją oraz modyfikowanego STR-AgNPs w funkcji czasu ($n = 3$).



Rys. 106. Wytrzymałość na ściskanie (σ) cementu kostnego niemodyfikowanego (BC) i modyfikowanego kompleksami polimerów gwiaździstych (o różnej budowie) z nanocząstkami srebra STR-AgNPs.

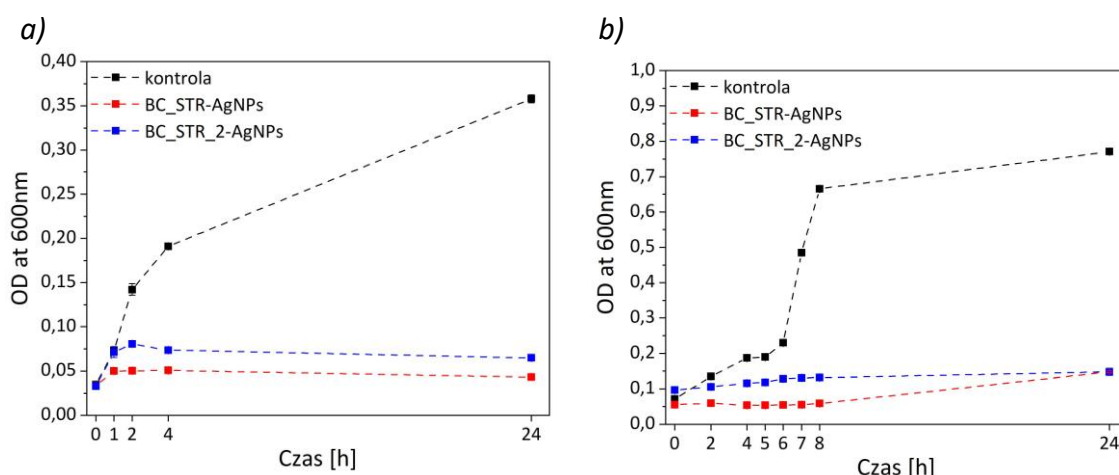
Tab. 17. Charakterystyczne parametry utwardzania cementów kostnych – doughing time t_D , maksymalna temperatura T_{max} , temperatura T_{set} oraz czas t_{set} utwardzania, wytrzymałość na ściskanie σ .

Próbka	T_{max} [°C]	T_{set} [°C]	t_{set} [min]	σ [MPa]
BC	$87,5 \pm 1,0$	$56,4 \pm 0,5$	$6,5 \pm 0,1$	$107,5 \pm 7,8$
BC_STR-AgNPs	$54,4 \pm 2,2$	$37,9 \pm 1,6$	$8,1 \pm 0,2$	$103,7 \pm 5,5$
BC_STR_1-AgNPs	$74,3 \pm 1,2$	$48,4 \pm 0,9$	$8,6 \pm 0,5$	$97,7 \pm 4,5$
BC_STR_2-AgNPs	$55,7 \pm 0,8$	$39,9 \pm 0,7$	$7,7 \pm 0,3$	$91,4 \pm 4,8$
BC_STR_3-AgNPs	$64,4 \pm 1,0$	$43,6 \pm 0,6$	$8,8 \pm 0,4$	$93,9 \pm 2,4$

Dodatek AgNPs do cementów kostnych, szeroko badany w literaturze, powoduje niewielki wzrost temperatury T_{max} i czasu t_{set} [107] oraz nieznaczne zmniejszenie wytrzymałości na ściskanie cementów kostnych [86]. Podobne wyniki uzyskali Wekwejt i współpracownicy [107], w badaniach których dodatek nanosrebra spowodował obniżenie wytrzymałości mechanicznej. Mimo pewnego

pogorszenia wytrzymałości na ściskanie cementy kostne modyfikowane polimerami gwiaździstymi z nanocząstkami srebra badane w ramach niniejszej pracy wykazują bardzo dobre właściwości mechaniczne, jednocześnie obniżając temperaturę maksymalną utwardzania.

Dodatkowo badania antybakteryjne wykazały silne działanie przeciwdrobnoustrojowe cementów kostnych z dodatkiem STR–AgNPs wobec *E. coli* i *S. aureus*. Żywotność komórek bakteryjnych *E. coli* zbadana po 24 godzinach wynosiła odpowiednio $12,1 \pm 0,4\%$ (BC_STR–AgNPs) i $18,1 \pm 0,3\%$ (BC_STR_2–AgNPs) (rysunek 107a), natomiast żywotność komórek bakteryjnych *S. aureus* wynosiła odpowiednio $19,2 \pm 0,2\%$ (BC_STR–AgNPs) i $19,1 \pm 0,3\%$ (BC_STR_2–AgNPs) (rysunek 107b).



Rys. 107. Wpływ cementu kostnego modyfikowanego dodatkiem kompleksów polimerów gwiaździstych (o różnej budowie) z nanocząstkami srebra STR–AgNPs na żywotność komórek bakteryjnych: a) *E. coli* i b) *S. aureus* ($n = 3$).

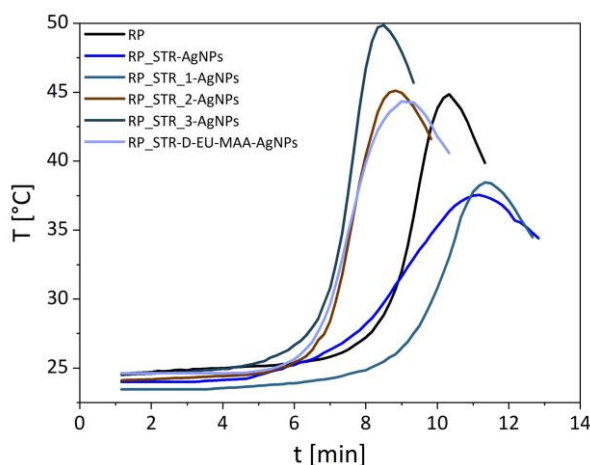
Silne działanie antybakteryjne cementów kostnych modyfikowanych AgNPs wykazali również Wekwejt i współpracownicy [32] oraz Świeczko-Żurek i współpracownicy [163]. Z kolei, badania prowadzone przez Slane i współpracowników [86] nie wykazały aktywności przeciwdrobnoustrojowej cementów kostnych z dodatkiem AgNPs przeciwko bakteriom planktonicznym, natomiast znacznie zmniejszyły tworzenie się biofilmu na powierzchni cementu kostnego. Co więcej, cementy kostne modyfikowane nanocząstkami srebra wbudowanymi w szkło ceramiczne wykazały dobrą biokompatybilność i możliwość proliferacji osteoblastów (test MTT) oraz niski poziom cytotoksyczności (test LDH) [31].

Jak wykazano we wcześniejszych rozdziałach, polimery gwiaździste wpływają na poprawę uwalniania antybiotyków z matrycy cementu kostnego, dlatego postanowiono zbadać wpływ dodatku STR–AgNPs na uwalnianie gentamycyny z komercyjnego cementu kostnego Refobacin Plus (RP) obciążonego tym właśnie antybiotykiem.

Przejdźcie do kolejnego etapu badań poprzedzono zbadaniem wpływu AgNPs i STR–AgNPs na komercyjny cement kostny (PR) ($\sigma_{PR} = 104,8 \pm 4,9$ MPa). Dodatek nanocząstek srebra spowodował nieznaczne pogorszenie wytrzymałości na ściskanie $\sigma_{PR_AgNPs} = 101,4 \pm 0,2$ MPa

modyfikowanego cementu kostnego. Natomiast wprowadzenie polimerów gwiaździstych z nanocząstkami srebra spowodowało wyraźny spadek tego parametru $\sigma_{PR_STR-AgNPs} = 87,4 \pm 4,8$ MPa. Uzyskane zależności są podobne do wyników badań przedstawionych przez Świeczko-Żurek i współpracowników [163], w których nie nastąpiła zmiana wytrzymałości na ściskanie cementów kostnych oraz przez Slane i współpracowników [86], którzy wykazali nieznaczny spadek tego parametru po dodaniu AgNPs. Mimo pogorszenia właściwości mechanicznych, uzyskane materiały spełniają wymagania normy ISO 5833:2002, w związku z tym zdecydowano się na przeprowadzenie kolejnych badań.

Pomimo wielu badań mających na celu poprawę uwalniania antybiotyków z cementów kostnych, brakuje doniesień literaturowych na temat wykorzystania polimerów gwiaździstych jako systemów dostarczania leków, co stało się motywacją do podjęcia takich badań. W pierwszej kolejności zbadano proces utwardzania cementu kostnego Refobacin Plus (RP) zawierającego antybiotyk gentamycynę i wykazano (rysunek 108, tabela 18), że dodatek STR-AgNPs powoduje obniżenie temperatury T_{max} jednocześnie wpływając na czas t_{set} . Wyjątek stanowi polimer gwiaździsty STR_3-AgNPs, dodatek którego spowodował wzrost temperatury T_{max} i znaczne skrócenie czasu t_{set} . Podobny spadek temperatury T_{max} zaobserwowano dla STR-AgNPs i STR_1-AgNPs, jednakże dla STR-AgNPs zanotowano nieznaczne skrócenie czasu t_{set} , a dla STR_1-AgNPs jego wydłużenie. W przypadku STR-D-EU-MAA-AgNPs i STR_2-AgNPs spadek temperatury T_{max} był nieistotnie mały przy znacznym skróceniu czasu t_{set} .



Rys. 108. Zależność temperatury utwardzania cementu kostnego Refobacin Plus niemodyfikowanego i modyfikowanego polimerami gwiaździstymi STR-AgNPs o różnej budowie od czasu prowadzenia procesu ($n = 3$).

Tab. 18. Charakterystyczne parametry utwardzania cementów kostnych – doughing time t_D , maksymalna temperatura T_{max} , temperatura T_{set} oraz czas t_{set} utwardzania, wytrzymałość na ściskanie σ .

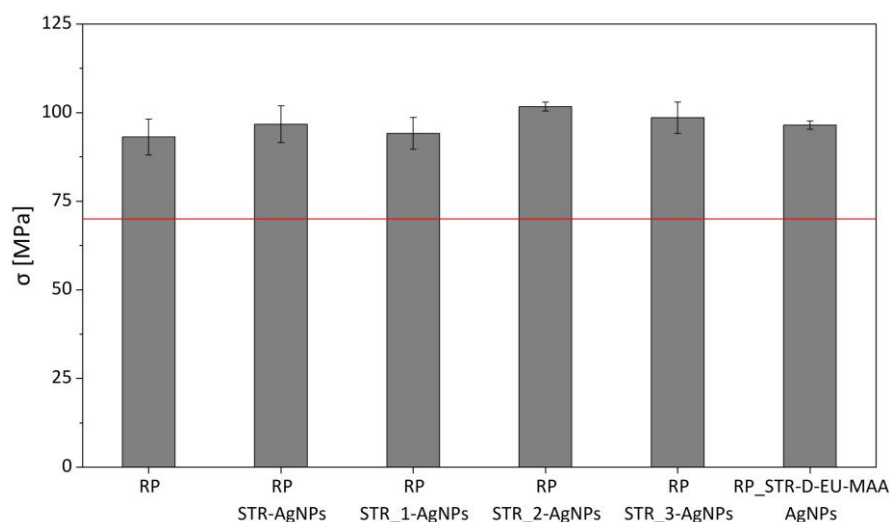
Próbka	T_{max} [°C]	T_{set} [°C]	t_{set} [min]	σ [MPa]
RP	$44,9 \pm 1,5$	$33,9 \pm 0,8$	$9,3 \pm 0,1$	$93,1 \pm 5,1$
RP_STR-AgNPs	$37,5 \pm 3,7$	$30,7 \pm 1,8$	$8,7 \pm 1,2$	$96,2 \pm 5,2$
RP_STR_1-AgNPs	$38,5 \pm 1,8$	$30,4 \pm 1,2$	$9,9 \pm 0,2$	$94,1 \pm 4,5$
RP_STR_2-AgNPs	$45,4 \pm 1,0$	$33,1 \pm 0,4$	$7,7 \pm 0,3$	$101,7 \pm 1,3$
RP_STR_3-AgNPs	$49,9 \pm 2,7$	$34,1 \pm 1,4$	$7,3 \pm 0,1$	$98,6 \pm 4,4$
RP_STR-D-EU-MAA-AgNPs	$44,4 \pm 3,4$	$32,3 \pm 1,4$	$7,5 \pm 1,2$	$96,5 \pm 1,2$

Wprowadzenie niereaktywnych w procesie polimeryzacji dodatków do kompozycji cementów kostnych, w tym środków przeciwbakteryjnych lub nośników leków i dodatków poprawiających uwalnianie leków, wpływa zarówno na temperaturę utwardzania jak i czas reakcji. Wekwejt i współpracownicy [107] wykazali, że dodatek AgNPs ma znikomy wpływ na proces utwardzania komercyjnego cementu Cemex, natomiast w innych badaniach dodanie AgNPs spowodowało niewielki wzrost czasu t_{set} i temperatury T_{max} , podczas gdy dodanie AgNPs naniesionych na bioaktywne szkło spowodowało wzrost czasu t_{set} i niewielki spadek temperatury T_{max} [119].

Włączenie naturalnych substancji, takich jak chitozan, celuloza lub hydroksyapatyt w celu poprawy procesu uwalniania leku, również może wpływać na parametry wiązania cementu kostnego. Zapata i współpracownicy [152] wykazali, że dodanie chitozanu do kompozycji cementu kostnego powoduje obniżenie temperatury T_{max} i wydłużenie czasu t_{set} . W innych badaniach nad wpływem modyfikacji cementu kostnego celulozą, chitozanem, polidioksanonem i fosforanem trójwapniowym (TCP) zaobserwowano niewielki spadek temperatury T_{max} (2 – 7%) i wydłużenie czasu t_{set} (z wyjątkiem TCP - spadek o 9%) [89]. Dodatek modyfikatorów polimerowych również wpływa na utwardzanie cementów kostnych. Nien i współpracownicy [111] zmodyfikowali cement kostny ketoprofenem poprzez wprowadzenie do matrycy polimerowej usieciowanej soli sodowej poli(metylometakrylanu kwasu akrylowego). Spowodowało to nieznaczne wydłużenie czasu utwardzania i obniżenie temperatury utwardzania odpowiednio o 16% i 2%.

Jak wspomniano wcześniej, zmiany w przebiegu procesu utwardzania mogą wpłynąć na właściwości mechaniczne cementów kostnych. Jednakże, badania wytrzymałości na ściskanie cementów modyfikowanych STR-AgNPs nie wykazały wyraźnego wpływu na ten parametr. Dodatek 2,5% mas. STR-AgNPs do cementu kostnego Refobacin Plus spowodował nieznaczne polepszenie wytrzymałości na ściskanie σ dla cementów kostnych modyfikowanych polimerami gwiazdzistymi o dłuższych ramionach osiągając wartość $\sigma_{RP_STR_AgNPs} = 96,2 \pm 5,2$ MPa, $\sigma_{RP_STR_1_AgNPs} = 94,1 \pm 4,5$ MPa i $\sigma_{RP_STR_D_EU_MAA_AgNPs} = 96,5 \pm 1,2$ MPa. W przypadku dodania polimerów gwiazdzistych o krótszych ramionach obserwuje się wyraźny wzrost tego parametru:

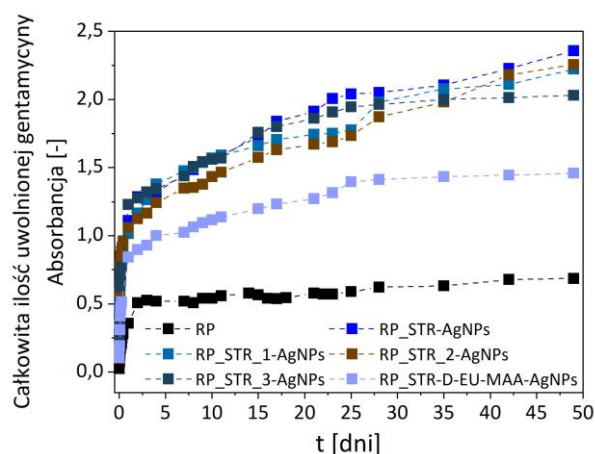
$\sigma_{RP_STR_2-AgNPs} = 101,7 \pm 1,3$ MPa, $\sigma_{RP_STR_3-AgNPs} = 98,6 \pm 4,4$ MPa. Wytrzymałość na ściskanie niemodyfikowanego cementu kostnego wynosiła $\sigma_{RP} = 93,1 \pm 5$ MPa (rysunek 109).



Rys. 109. Wytrzymałość na ściskanie (σ) cementu kostnego Refobacin Plus niemodyfikowanego i modyfikowanego polimerami gwiaździstymi STR-AgNPs o różnej budowie.

Brak wyraźnego wpływu dodatku kompleksów polimerów gwiaździstych z nanocząstkami srebra na wytrzymałość cementów kostnych może być związany z zmianą budowy morfologicznej polimerów gwiaździstych ze względu na obecność AgNPs przy rdzeniu i częściowo na ramionach STR. Jak pokazują badania, polimery gwiaździste mogą wpływać na właściwości mechaniczne cementu kostnego. Huynh i współpracownicy [264] skoncentrowali swoje badania na zastąpieniu liniowego PMMA czteroramiennym gwiaździstym PMMA, co spowodowało zmniejszenie wytrzymałości na ściskanie o 4%. Pogorszenie właściwości mechanicznych cementów kostnych po dodaniu systemów zwiększających uwalnianie substancji czynnej, które wpływają na strukturę cementu kostnego, jest szeroko omawiane. Spadek wytrzymałości mechanicznej zaobserwowano po dodaniu nanorurek węglowych, dodanych w celu poprawy uwalniania gentamycyny z cementu kostnego Cemex [180], a także liposomów o rozmiarze nano [179], czy mikrocząstek β -cyklodekstryny [86].

Polimery gwiaździste badane w ramach niniejszej pracy dodane do cementów kostnych wpływają na morfologię materiałów, ułatwiając dyfuzję antybiotyku z matrycy polimerowej. Wprowadzenie kompleksów polimerów gwiaździstych z nanocząstkami srebra wpłynęło na znaczny wzrost uwalniania gentamycyny z cementu kostnego, co można zaobserwować na profilach uwalniania antybiotyku pokazanych na rysunku 110. Ilość uwalnianej gentamycyny po dodaniu STR-AgNPs wzrosła od 300% dla STR-D-EU-MAA-AgNPs do 500% dla STR-AgNPs, STR_1-AgNPs, STR_2-AgNPs i STR_3-AgNPs. Ponadto, czas uwalniania antybiotyku uległ znacznemu wydłużeniu: dla STR-D-EU-MAA-AgNPs wynosił 26 dni, natomiast dla STR-AgNPs, STR_1-AgNPs, STR_2-AgNPs i STR_3-AgNPs - 50 dni, podczas gdy w przypadku cementu niemodyfikowanego ograniczał się do 3 dni.



Rys. 110. Uwalnianie gentamycyny z cementu kostnego Refobacin Plus niemodyfikowanego i modyfikowanego dodatkiem kompleksów polimerów gwiazdzystych z nanocząstkami srebra: STR-D-EU-MAA-AgNPs, STR-AgNPs i STR_1-AgNPs.

Wiele dostępnych badań wskazuje na istotny wpływ dodatków na uwalnianie antybiotyków z cementów kostnych. Nien i współpracownicy [111] uzyskali 65% wzrost ilości uwalnianego ketoprofenu poprzez wprowadzenie do cementu kostnego usieciowanej soli sodowej poli(metylometakrylanu kwasu akrylowego). W innym badaniu [358] dodanie sfer fosforanu wapnia domieszkowanego strontem spowodowało 40% wzrost uwalniania gentamycyny, jednak proces ten trwał tylko 8 dni. Z kolei Shen i współpracownicy [92] zaobserwowali wzrost uwalniania gentamycyny do 50% po 70 dniach od dodania nanostrukturalnych nanorurek dwutlenku tytanu. Włączenie mezoporowatej krzemionki SBA-15 i modyfikowanej poli(glikolem etylenowym) SBA-15 do cementów kostnych poprawiło uwalnianie gentamycyny z 5% do odpowiednio 18% i 37% po 70 dniach [177].

Wzrost uwalniania gentamycyny z komercyjnego cementu kostnego, jak również silna aktywność antybakteryjna polimerów gwiazdzystych modyfikowanych nanocząstkami srebra STR-AgNPs pozwoli zmniejszyć dawkę antybiotyku w cemencie kostnym, bez obniżenia działania antybakteryjnego, co ograniczy ryzyko wytworzenia oporności szczepów bakteryjnych na antybiotyki.

2.3.4. Modyfikacje gadolinem

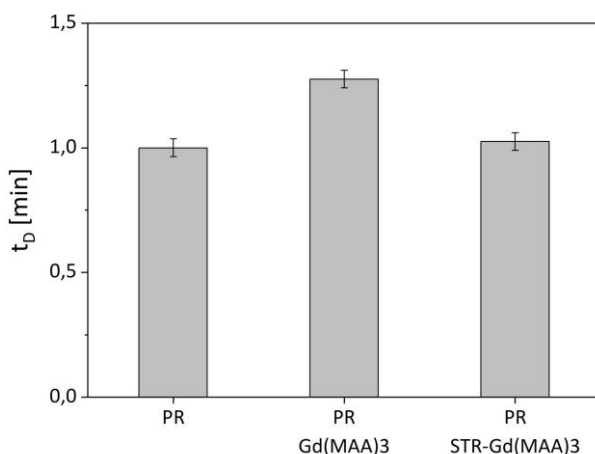
Wprowadzanie do kompozycji cementów kostnych dodatków niebiorących udziału w reakcji utwardzania, m.in. środków kontrastujących, wpływa negatywnie na właściwości materiałów. Substancje kontrastujące, tj. siarczan (VI) baru (BaSO_4) czy tlenek cyrkonu (ZrO_2), są nieodłącznym elementem kompozycji cementów kostnych, jednakże powodują pogorszenie ich parametrów mechanicznych [29,76]. Ciekawą alternatywą dla proszkowych dodatków kontrastujących jest zastosowanie monomeru kontrastującego, który może wbudować się w sieć polimerową cementu kostnego. W tym rozdziale przedstawiono wpływ dodatku metakrylowej pochodnej gadolinu ($\text{Gd}(\text{MAA})_3$), zastosowanej jako monomer sieciujący, na właściwości cementów kostnych.

Ponadto, zbadano modyfikację cementów kostnych polimerem gwiaździstym zawierającym $\text{Gd}(\text{MAA})_3$.

Monomer $\text{Gd}(\text{MAA})_3$ oraz polimer gwiaździsty $\text{STR-Gd}(\text{MAA})_3$ wprowadzono w ilości 2,5 %mas. do komercyjnego cementu kostnego Palacos R (PR). Cementy kostne scharakteryzowano wyznaczając ich parametry takie jak: t_D , $T_{\max}$, T_{set} , t_{set} oraz σ . Ponadto, zbadano właściwości kontrastujące materiałów przy pomocy obrazowania metodą rezonansu magnetycznego (MRI).

Wprowadzenie dodatków zarówno w postaci monomeru $\text{Gd}(\text{MAA})_3$, jak i niereagującego polimeru gwiaździstego wpływa na proces utwardzania cementów kostnych. Monomer $\text{Gd}(\text{MAA})_3$ posiada trzy grupy metakrylowe i jego dodatek będzie powodował wpływ na gęstość sieciowania polimeru. Może to wpłynąć na skrócenie procesu przygotowania cementu kostnego, dlatego w pierwszej kolejności scharakteryzowano czas t_D .

Zastosowanie jako modyfikatorów cementu PR monomeru $\text{Gd}(\text{MAA})_3$ jak i polimeru gwiaździstego $\text{STR-Gd}(\text{MAA})_3$ spowodowało nieznaczne wydłużenie czasu t_D (rysunek 111).

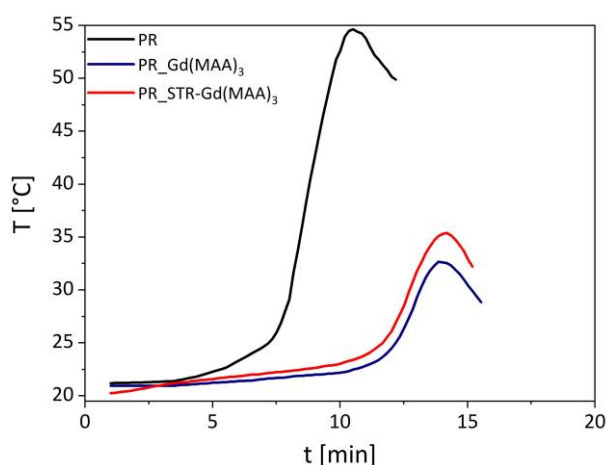


Rys. 111. Doughing time (min) dla badanych cementów kostnych modyfikowanych $\text{Gd}(\text{MAA})_3$ i $\text{STR-Gd}(\text{MAA})_3$ ($n = 4$).

Jak można zaobserwować na wykresie, dodatek monomeru $\text{Gd}(\text{MAA})_3$ spowodował wydłużenie t_D z 1 minuty dla cementu niemodyfikowanego do 1,3 minuty dla $\text{PR-Gd}(\text{MAA})_3$. Z kolei, nie zaobserwowano zmian w t_D dla $\text{PR-STR-Gd}(\text{MAA})_3$. Otrzymane wyniki sugerują, że wprowadzenie syntezowanych w ramach pracy dodatków ma wpływ na proces utwardzania cementu kostnego PR, dlatego kolejnym etapem było zbadanie parametrów $T_{\max}$ oraz t_{set} .

Wprowadzenie monomerów funkcyjnych oraz polimerów gwiaździstych powoduje zmiany w kinetyce utwardzania cementów kostnych. Jak pokazuje Elvira i współpracownicy [102] dodanie monomerów sieciujących EGDM lub TEGDM skraca czas i podnosi temperaturę utwardzania. Wprowadzenie $\text{Gd}(\text{MAA})_3$ do cementów kostnych powoduje znaczne wydłużenie czasu t_{set} i znaczny spadek temperatury $T_{\max}$. Podobnie, dodatek polimeru gwiaździstego $\text{STR-Gd}(\text{MAA})_3$ powoduje wydłużenie czasu t_{set} . Wprowadzenie $\text{Gd}(\text{MAA})_3$ do cementów kostnych powoduje

znaczące wydłużenie t_{set} i znaczny spadek T_{max} . Podobnie, dodatek STR–Gd(MAA)₃ powoduje wydłużenie t_{set} .



Rys. 112. Krzywe temperatury polimeryzacji kompozycji cementów kostnych modyfikowanych Gd(MAA)₃ i STR–Gd(MAA)₃ w funkcji czasu ($n = 3$).

Temperatura utwardzania cementu kostnego PR modyfikowanego Gd(MAA)₃ charakteryzuje się znaczącym spadkiem temperatury T_{max} do wartości od $32,7 \pm 0,6$ °C (tabela 19). Ponadto, zaobserwowano wydłużenie czasu t_{set} . Czas wiązania modyfikowanego cementu PR ($t_{set} = 8,5 \pm 0,4$ minuty) uległ wydłużeniu do 12,5 minuty, jednakże wartość ta spełnia wymagania normy ISO 5833:2002 (tabela 19). Wprowadzenie polimeru gwiazdzistego zawierającego monomer Gd(MAA)₃ do cementu kostnego, również wpłynęło na proces jego utwardzania. Obserwuje się spadek temperatury T_{max} i wydłużenie czasu t_{set} , jednakże zmiany charakterystyki utwardzania cementu PR w wyniku wprowadzenia do kompozycji polimeru gwiazdzistego STR–Gd(MAA)₃ są bardzo podobne do tych obserwowanych po dodaniu monomeru Gd(MAA)₃ ($T_{max} = 35,4 \pm 0,3$ °C i $t_{set} = 12,4$ minuty dla PR_STR–Gd(MAA)₃) – tabela 19.

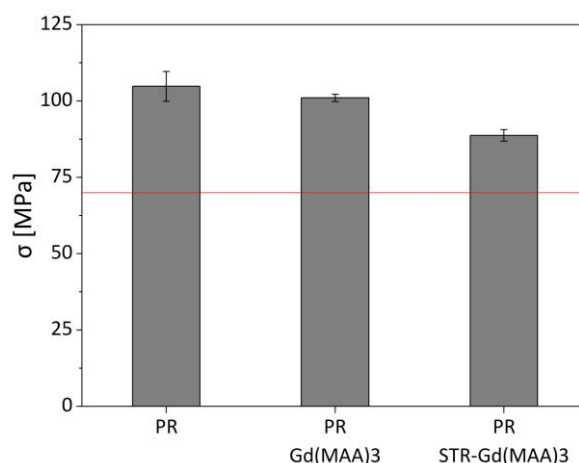
Tab. 19. Charakterystyczne parametry utwardzania cementów kostnych – doughing time t_D , maksymalna temperatura T_{max} , temperatura T_{set} oraz czas t_{set} utwardzania, wytrzymałość na ściskanie σ .

Próbka	T_{max} [°C]	T_{set} [°C]	t_{set} [min]	σ [MPa]
PR	$54,7 \pm 1,2$	$37,5 \pm 0,8$	$8,5 \pm 0,4$	$104,8 \pm 4,9$
PR_Gd(MAA) ₃	$32,7 \pm 0,6$	$26,7 \pm 0,3$	$12,5 \pm 0,2$	$101,0 \pm 1,2$
PR_STR–Gd(MAA) ₃	$35,4 \pm 0,3$	$27,8 \pm 0,2$	$12,4 \pm 0,2$	$88,8 \pm 1,9$

Wprowadzenie środka kontrastującego, do kompozycji cementu kostnego jako monomeru metakrylowego jak i polimeru gwiazdzistego wpływa na proces jego utwardzania. Podobne wyniki uzyskano w pracy [359]. Częsteczki BaSO₄ poddane plazmowej obróbce powierzchniowej wprowadzone do cementu kostnego spowodowały obniżenie T_{max} przy statystycznie nieistotnym wydłużeniu t_{set} [359].

Dodatek środków kontrastujących wpływa również na właściwości mechaniczne cementów kostnych, dlatego w kolejnym etapie scharakteryzowano wytrzymałość na ściskanie

wytworzonych materiałów. Dla modyfikowanych cementów PR zanotowano spadek wartości parametru σ w obu przypadkach, natomiast mniejszy spadek do wartości $101,0 \pm 1,2$ MPa nastąpił po dodaniu monomeru $\text{Gd}(\text{MAA})_3$ przy wartości $\sigma_{\text{PR}} = 104,8 \pm 4,9$ MPa uzyskanej dla cementu niemodyfikowanego. Dodatek polimeru gwiazdzistego $\text{STR-Gd}(\text{MAA})_3$ spowodował spadek omawianego parametru do wartości $88,7 \pm 1,9$ MPa (rysunek 113).



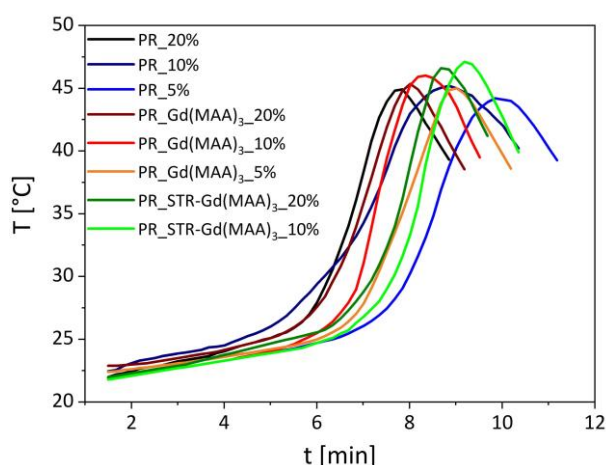
Rys. 113. Wytrzymałość na ściskanie (σ) niemodyfikowanego cementu kostnego PR i modyfikowanego dodatkiem monomeru $\text{Gd}(\text{MAA})_3$ lub polimeru gwiazdzistego $\text{STR-Gd}(\text{MAA})_3$ ($n = 5$).

Przeprowadzone badania właściwości mechanicznych wskazują, że wprowadzenie modyfikowanego środka kontrastującego wpływa na wytrzymałość na ściskanie cementów kostnych. Na wpływ dodatku środka kontrastującego na właściwości mechaniczne cementu kostnego wskazują Bolaina-Lorenzo i współpracownicy [359], którzy uzyskali poprawę właściwości mechanicznych po wprowadzeniu cząsteczek BaSO_4 poddanych plazmowej obróbce powierzchniowej w porównaniu do cementów z dodatkiem niemodyfikowanych cząsteczek BaSO_4 .

Tak przygotowane cementy kostne nie wykazywały sygnału podczas obrazowania magnetycznym rezonansem jądrowym. Jest to spowodowane dużą hydrofobowością PMMA i brakiem penetracji cementu kostnego przez wodę, a tym samym brakiem indukcji sygnału przez obecność gadolinu. Aby uzyskać sygnał podczas obrazowania, do kompozycji cementu kostnego wprowadzono sól fizjologiczną, co w badaniach prowadzonych przez Wichlas i współpracowników [360] pozwoliło na obrazowanie cementu kostnego, ale jednocześnie wpłynęło na drastyczne pogorszenie jego właściwości mechanicznych. W niniejszych badaniach do cementu kostnego wprowadzono roztwór soli fizjologicznej (SF) w ilości 5, 10 oraz 20 %mas. cementu kostnego. Dodatkowo zmodyfikowano ilość wprowadzonych modyfikatorów $\text{Gd}(\text{MAA})_3$ oraz $\text{STR-Gd}(\text{MAA})_3$ do cementu kostnego. Bazując na wcześniejszych badaniach [360] ustalono, że najlepsze stężenie Gd wynosi 0,0024 mmol Gd na 1 ml soli fizjologicznej, co odpowiada 0,89 mg $\text{Gd}(\text{MAA})_3/\text{ml SF}$ i 5,60 mg $\text{STR-Gd}(\text{MMA})_3/\text{ml SF}$.

Cementy kostne z dodatkiem soli fizjologicznej ponownie scharakteryzowano zgodnie z normą ISO 5833:2002. Badania czasu t_D nie wykazały żadnych różnic między cementami zawierającymi $Gd(MAA)_3$ lub $STR-Gd(MMA)_3$ z dodatkiem i bez dodatku SF. Natomiast zaobserwowano zmiany w utwardzaniu cementów kostnych oraz ich wytrzymałości na ściskanie.

Dodatek soli fizjologicznej spowodował spadek temperatury T_{max} do ok. 45 °C, jednakże nie zaobserwowano zależności między zastosowanym stężeniem SF a T_{max} . Z kolei, zaobserwowano skrócenie czasu t_{set} wraz ze wzrostem ilości SF. Co więcej, skrócenie czasu t_{set} zaobserwowano również po dodaniu $Gd(MAA)_3$. Z kolei, dodatek $STR-Gd(MAA)_3$ spowodował wydłużenie czasu t_{set} , a także wzrost temperatury T_{max} . Krzywe temperaturowe oraz wartości parametrów charakterystycznych przedstawiono na rysunku 114 i w tabeli 20.



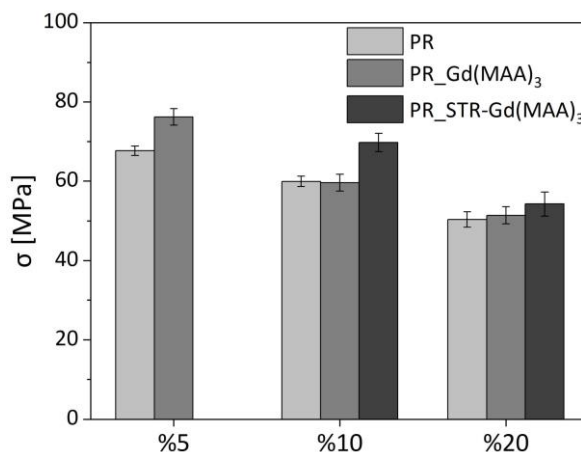
Rys. 114. Zależność temperatury utwardzania cementów kostnych modyfikowanych SF oraz $Gd(MAA)_3$ lub polimerem gwiaździstym $STR-Gd(MAA)_3$ monomerem od czasu ($n = 3$).

Tab. 20. Charakterystyczne parametry utwardzania cementów kostnych – doughing time t_D , maksymalna temperatura T_{max} , temperatura T_{set} oraz czas t_{set} utwardzania.

Próbka	T_{max} [°C]			T_{set} [°C]			t_{set} [min]		
	5%	10%	20%	5%	10%	20%	5%	10%	20%
PR	43,9±0,4	48,6±4,1	46,7±1,1	32,9±0,2	35,5±2,1	34,4±0,5	8,2±0,2	7,3±0,5	6,6±0,1
PR_Gd(MAA) ₃	45,2±1,2	45,8±5,5	45,1±1,8	31,1±0,6	33,9±2,8	33,4±0,7	7,6±0,1	6,8±0,5	6,4±0,5
PR_STR-Gd(MAA) ₃	–	47,1±2,2	46,6±2,0	–	34,8±1,8	36,0±1,2	–	7,8±0,5	7,7±0,4

Wprowadzenie soli fizjologicznej może znacznie pogorszyć właściwości mechaniczne cementów kostnych. Jak wykazali Karpiński i współpracownicy [72,75], 10% soli fizjologicznej może spowodować spadek wytrzymałości na ściskanie o 20–25%. Wprowadzenie kompozycji indukującej sygnał MRI opartej na środku kontrastującym gadolinowym i soli fizjologicznej wpłynęło na właściwości mechaniczne cementów kostnych. Wytrzymałość na ściskanie zmniejszyła się o 27% w przypadku dodania 5% kompozycji soli fizjologicznej- $Gd(MAA)_3$ ($76,2 \pm 2,1$ MPa) do nawet 51% w przypadku 20% ($51,4 \pm 2,2$ MPa) (rysunek 115) w stosunku do cementu niemodyfikowanego. Co ciekawe, dodatek polimeru gwiaździstego $STR-Gd(MMA)_3$ do cementu modyfikowanego solą fizjologiczną spowodował wzrost wytrzymałości na ściskanie

w porównaniu do układów z samą solą fizjologiczną czy solą fizjologiczną i Gd(MMA)_3 , a wartości σ wynosiły odpowiednio $54,3 \pm 3,0$ MPa (PR_STR-Gd(MAA)₃_20%) i $69,8 \pm 2,3$ MPa (PR_STR-Gd(MAA)₃_10%) (rysunek 115). Ze względu na słaby sygnał w badaniu MRI nie badano właściwości mechanicznych materiału z 5% SF, natomiast przeprowadzono badanie dla układu z większym stężeniem STR-Gd(MAA)₃ (11,20 mg/ml) i 10% zawartością soli fizjologicznej. Nie zaobserwowano wpływu zwiększenia ilości polimeru gwiaździstego na właściwości mechaniczne badanego cementu kostnego, a jego wytrzymałość na ściskanie wynosiła $67,5 \pm 1,4$ MPa.

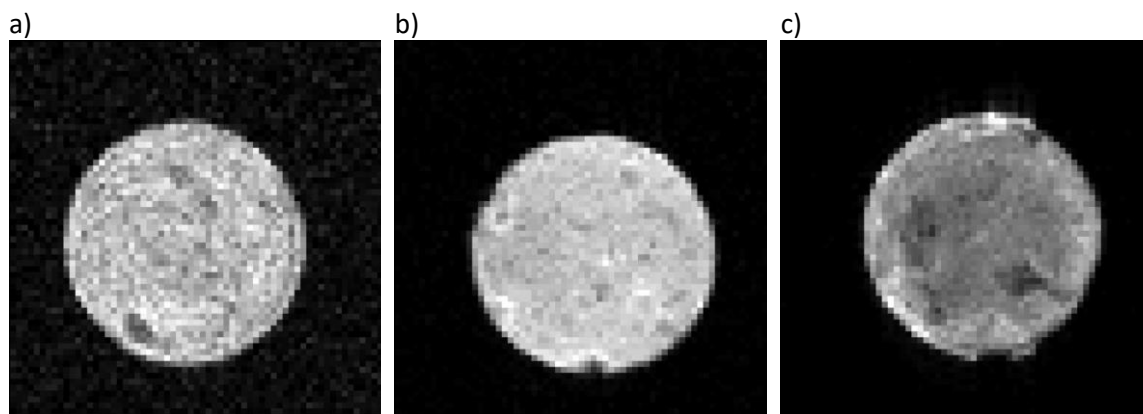


Rys. 115. Wytrzymałość na ściskanie (σ) cementu kostnego modyfikowanego dodatkiem SF oraz monomerem Gd(MAA)_3 lub polimerem gwiaździstym STR-Gd(MAA)₃ ($n = 5$).

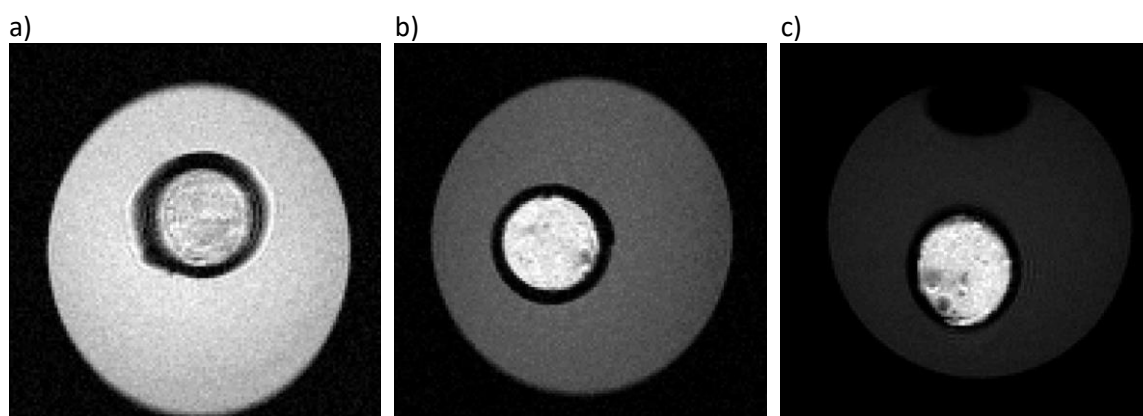
Znaczący spadek wytrzymałości cementów kostnych zaobserwowali Wichlas i współpracownicy [360], po wprowadzeniu kwasu gadoterynowego, który jest środkiem kontrastowym MRI na bazie gadolinu, z roztworem soli fizjologicznej. Uzyskane materiały charakteryzowały się wytrzymałością na ściskanie na granicy wymagań normy ($72,1 \pm 1,9$ MPa) przy najmniejszej zawartości SF (7,8%) lub niższą w zależności od ilości dodanego środka (nawet $32,6 \pm 3,1$ MPa dla 24,2% SF). Z kolei, wprowadzenie kwasu gadoterynowego, z roztworem soli fizjologicznej lub hydroksyapatytowym substytutem kości powoduje drastyczne obniżenie właściwości mechanicznych, poniżej wymagań normy ISO 5833:2002 ($47,3 \pm 0,5$ MPa dla 13,8% HA i $60,6 \pm 1,3$ MPa dla 13,8% SF oraz $29,8 \pm 1,3$ MPa dla 24,2% HA i $34,3 \pm 0,7$ MPa dla 24,2% SF) [361]. Wprowadzenie środków kontrastujących w obrazowaniu MRI powoduje spadek wytrzymałości na ściskanie cementów kostnych. Mimo to, uzyskane materiały charakteryzują się dobrą wytrzymałością na ściskanie, a także właściwościami temperaturowymi, dlatego w kolejnym etapie zbadano ich właściwości kontrastujące.

Cementy kostne modyfikowane czynnikiem indukującym sygnał składającym się z roztworu soli fizjologicznej oraz Gd(MAA)_3 lub STR-Gd(MAA)₃ poddano badaniu obrazowania rezonansem magnetycznym. Stężenie Gd(MAA)_3 wynosiło 0,89 mg/ml, a STR-Gd(MMA)₃ 5,60 mg/ml. Intensywność sygnału zależała od zawartości SF i największa była dla stężenia 20%,

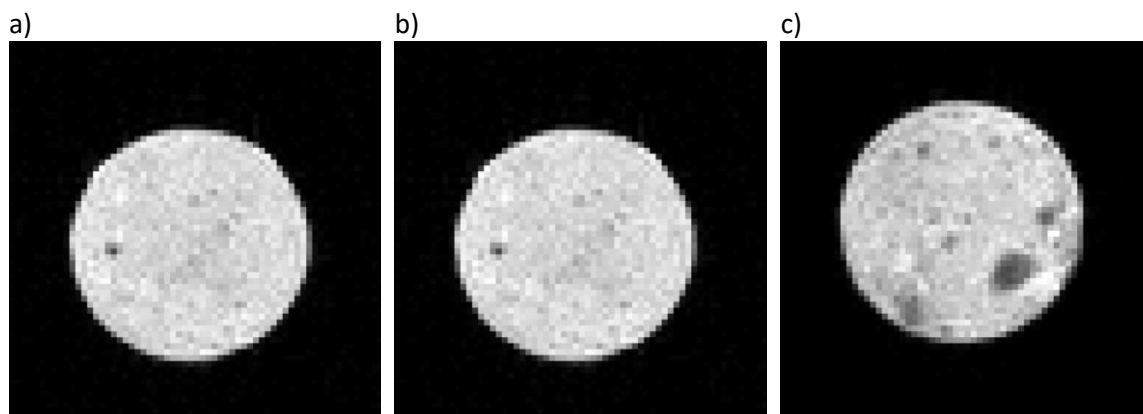
natomiast najmniejsza dla 5% (rysunek 116 i 118). Potwierdza to stosunek sygnału do szumu, który jest najmniejszy dla próbek z 20% zawartością SF. Co więcej, lepszym sygnałem charakteryzowały się cementy kostne zawierające $Gd(MAA)_3$ niż $STR-Gd(MAA)_3$, co można potwierdzić większą intensywnością sygnału próbek badanych w otoczeniu wodnym (rysunek 117 i 119). Ponadto, zwiększenie ilości polimeru gwiaździstego $STR-Gd(MAA)_3$ przy zachowaniu stałej ilości SF nie zwiększyło intensywności sygnału (rysunek 118 i 119).



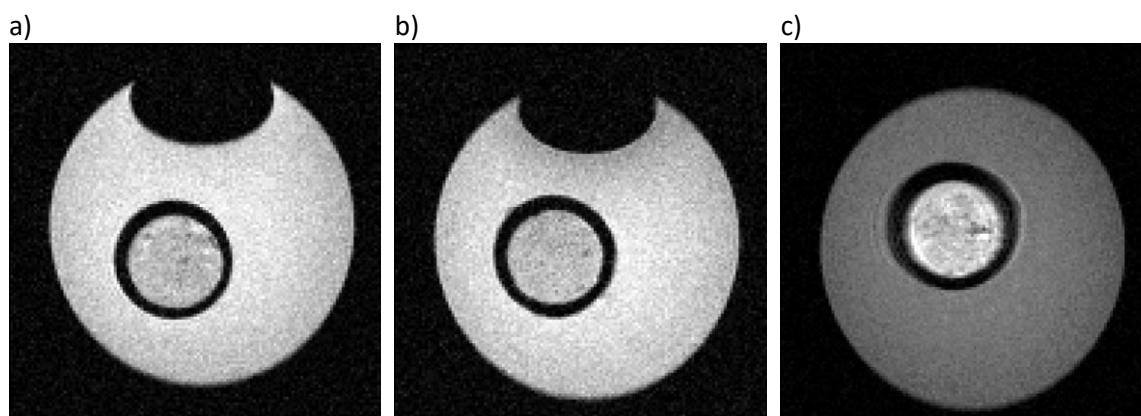
Rys. 116. Obrazy MRI cementów kostnych modyfikowanych $Gd(MAA)_3$ z różną zawartością soli fizjologicznej: a) 5%, b) 10%, c) 20%.



Rys. 117. Obrazy MRI cementów kostnych modyfikowanych $Gd(MAA)_3$ z różną zawartością soli fizjologicznej: a) 5%, b) 10%, c) 20%, w otoczeniu wodnym



Rys. 118. Obrazy MRI cementów kostnych modyfikowanych $STR-Gd(MAA)_3$ z różną zawartością soli fizjologicznej: a) 10%, b) 10% (stężenie polimeru gwiaździstego - 11,20 mg/ml), c) 20%.



Rys. 119. Obrazy MRI cementów kostnych modyfikowanych STR–Gd(MAA)₃ z różną zawartością soli fizjologicznej: a) 10%, b) 10% (stężenie polimeru gwiaździstego - 11,20 mg/ml), c) 20, w otoczeniu wodnym.

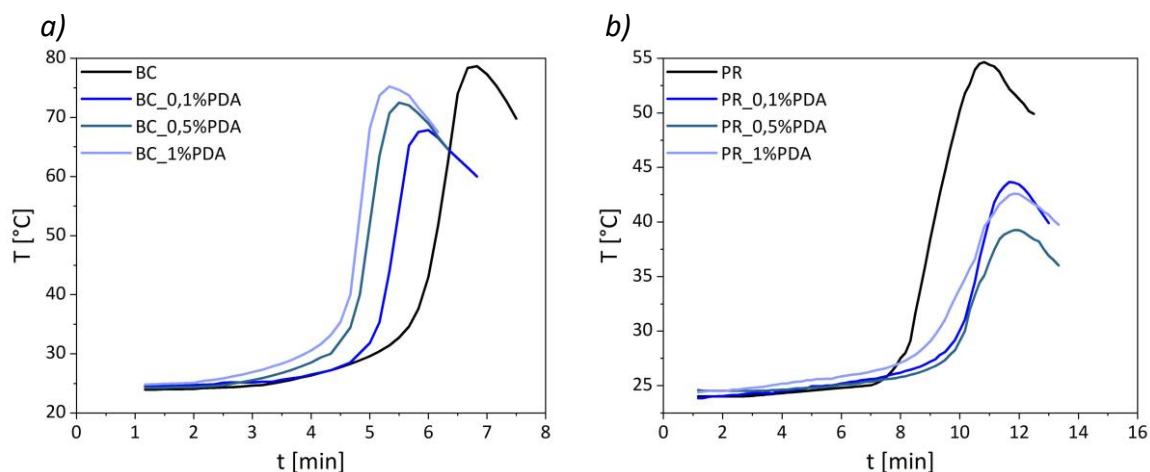
Niższa intensywność sygnału może być spowodowana mniejszą mobilnością polimerów gwiaździstych, a tym samym gorszym kompleksowaniem cząsteczek wody, co wpływa na relaksację jąder atomów wody. Niemniej jednak, wyniki uzyskane dla obu rodzajów cementów są obiecujące i mogą znaleźć zastosowanie w zabiegach chirurgicznych wymagających kontroli metodą MRI.

2.3.5. Modyfikacje polidopaminą

Przedstawione w pracy rozwiązania wpływają na poprawę uwalniania leków z cementów kostnych, a także na zwiększenie ich aktywności antybakteryjnej, przy zachowaniu biokompatybilności materiału. Wprowadzenie polidopaminy (PDA) do cementów kostnych nie tylko poprawi uwalnianie antybiotyku, nie wpływając wyraźnie na właściwości mechaniczne, ale także poprawi właściwości antybakteryjne, nie wykazując działania toksycznego na komórki wątroby. Brak doniesień literaturowych na temat wpływu polidopaminy na właściwości funkcjonalne cementów kostnych stało się motywacją do podjęcia niniejszych badań.

Charakterystykę cementów kostnych modyfikowanych polidopaminą rozpoczęto od zbadania wpływ dodatku PDA na właściwości cementów kostnych nieobciążonych antybiotykiem. PDA w ilości 0,1; 0,5 i 1 %mas. wprowadzono do cementów kostnych BC oraz PR i zbadano jej wpływ na proces utwardzania oraz wytrzymałość na ściskanie cementów kostnych.

W obu przypadkach zaobserwowano wpływ dodatku PDA na proces utwardzania, jednakże różnił się on w zależności od rodzaju badanego cementu kostnego. Cementy kostne BC modyfikowane PDA wykazywały skrócenie czasu utwardzania oraz obniżenie temperatury maksymalnej. Najniższą temperaturę T_{max} zanotowano dla BC_0,1%PDA, natomiast najwyższą dla BC_1%PDA (rysunek 120a i tabela 21). Z kolei, cementy kostne PR modyfikowane PDA charakteryzowały się wydłużonym czasem utwardzania oraz obniżoną temperaturą maksymalną. Najniższą temperaturę T_{max} zanotowano dla PR_0,5%PDA, natomiast najwyższą dla PR_0,1%PDA (rysunek 120b i tabela 21).



Rys. 120. Zależność temperatury utwardzania od czasu dla kompozycji cementów kostnych: a) BC i b) PR modyfikowanych dodatkiem PDA ($n = 3$).

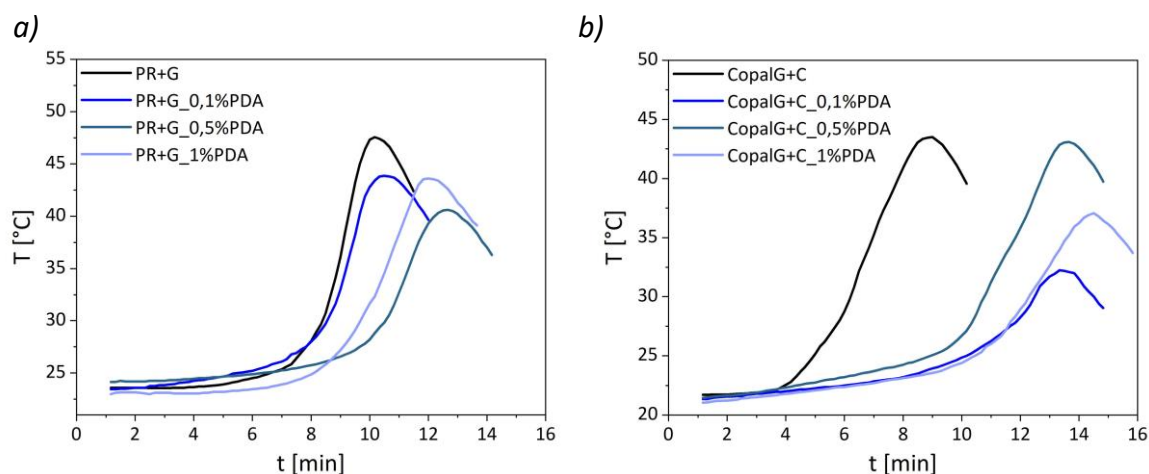
Różnice w temperaturach i czasach utwardzania mogą wynikać z różnych składów cementów kostnych i innych oddziaływań między składnikami kompozycji a dodatkiem. Obecność monomeru HEMA z grupami hydroksylowymi w cemencie BC oraz grup funkcyjnych występujących w PDA (-OH, -NH) może prowadzić do oddziaływań międzycząsteczkowych np. przez tworzenie wiązań wodorowych i przyspieszenia polimeryzacji. Utworzenie takich agregatów przez tworzenie wiązań wodorowych może pozornie zwiększyć funkcyjność monomerów przez sieciowanie fizyczne, a tym samym spowodować wzrost szybkości polimeryzacji.

Tab. 21. Charakterystyczne parametry utwardzania cementów kostnych – *doughing time* t_D , maksymalna temperatura T_{max} , temperatura T_{set} oraz czas t_{set} utwardzania, wytrzymałość na ściskanie σ .

Próbka	T_{max} [°C]	T_{set} [°C]	t_{set} [min]	σ [MPa]
BC	$78,7 \pm 1,3$	$51,2 \pm 0,7$	$6,2 \pm 0,4$	$107,5 \pm 7,8$
BC_0,1%PDA	$67,9 \pm 2,1$	$45,9 \pm 1,2$	$5,2 \pm 0,6$	$105,8 \pm 6,9$
BC_0,5%PDA	$72,5 \pm 1,6$	$48,2 \pm 0,9$	$4,8 \pm 0,5$	$106,9 \pm 6,5$
BC_1%PDA	$75,2 \pm 1,9$	$49,2 \pm 1,0$	$4,7 \pm 0,7$	$102,4 \pm 7,2$
PR	$54,7 \pm 1,2$	$37,5 \pm 0,8$	$9,0 \pm 0,4$	$104,8 \pm 4,9$
PR_0,1%PDA	$43,7 \pm 0,6$	$33,3 \pm 0,4$	$10,3 \pm 0,8$	$101,6 \pm 1,8$
PR_0,5%PDA	$39,3 \pm 1,1$	$31,3 \pm 0,7$	$10,2 \pm 0,5$	$96,2 \pm 4,5$
PR_1%PDA	$42,6 \pm 1,4$	$32,9 \pm 0,6$	$9,8 \pm 0,8$	$96,6 \pm 3,9$

Wprowadzenie PDA do cementów obciążonych antybiotykiem nie wpłynęło na *doughing time*, jednak zaobserwowano wpływ na maksymalną temperaturę i czas wiązania. Cementy kostne modyfikowane PDA charakteryzowały się niższą temperaturą T_{max} i dłuższym czasem t_{set} . Najniższą temperaturę T_{max} zanotowano dla cementu Copal G+C_0,1%PDA ($32,3 \pm 2,1$ °C), natomiast dla cementu Copal G+C najwyższą temperaturę T_{max} zaobserwowano po wprowadzeniu

0,5 %mas. PDA ($43,1 \pm 1,1$ °C) (rysunek 121b i tabela 22). Z kolei, cementy kostne PR modyfikowane PDA wykazywały nieznaczne wydłużenie czasu utwardzania oraz niewielkie obniżenie temperatury maksymalnej. Najniższą temperaturę T_{max} zanotowano dla PR+G_0,5%PDA ($40,6 \pm 0,5$ °C), natomiast najwyższą dla PR+G_0,1%PDA ($43,9 \pm 1,6$ °C) (rysunek 121a i tabela 22).



Rys. 121. Zależność temperatury od czasu dla kompozycji cementów kostnych: a) PR+G i b) Copal G+C modyfikowanych dodatkiem PDA ($n = 3$).

Podobnie, jak w przypadku komercyjnego cementu kostnego Palacos R, dodatek PDA do cementów obciążonych antybiotykiem wpłynął na proces utwardzania. Temperatury charakterystyczne przedstawiono w tabeli 22.

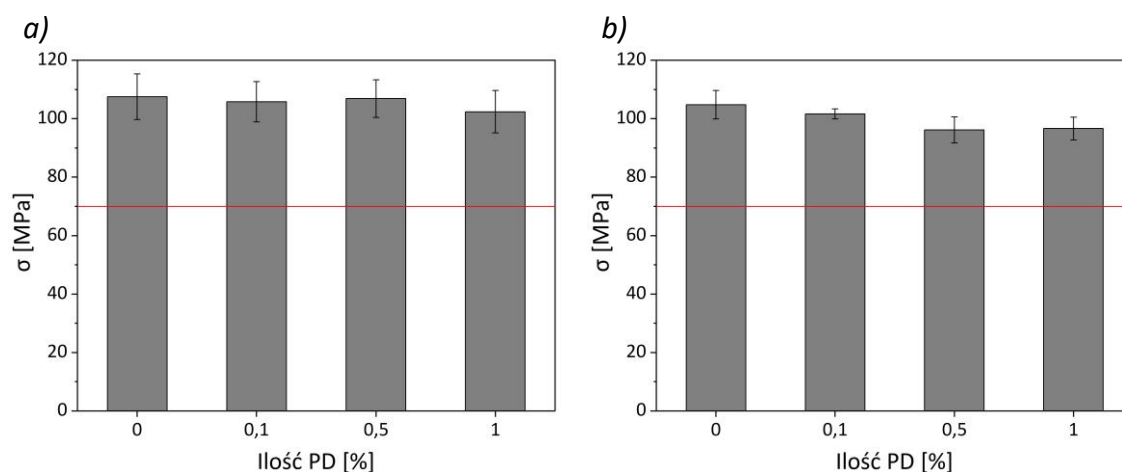
Tab. 22. Charakterystyczne parametry utwardzania cementów kostnych – doughing time t_D , maksymalna temperatura T_{max} , temperatura T_{set} oraz czas t_{set} utwardzania, wytrzymałość na ściskanie σ .

Próbka	T_{max} [°C]	T_{set} [°C]	t_{set} [min]	σ [MPa]
PR+G	$47,6 \pm 1,3$	$35,6 \pm 0,8$	$8,8 \pm 0,5$	$104,3 \pm 5,1$
PR+G_0,1%PDA	$43,9 \pm 1,6$	$33,7 \pm 1,0$	$9,1 \pm 0,7$	$101,9 \pm 1,4$
PR+G_0,5%PDA	$40,6 \pm 0,5$	$32,4 \pm 0,3$	$11,0 \pm 0,5$	$98,8 \pm 2,8$
PR+G_1%PDA	$43,6 \pm 0,6$	$33,3 \pm 0,6$	$10,3 \pm 0,4$	$97,3 \pm 5,5$
Copal G+C	$43,5 \pm 4,2$	$33,3 \pm 2,1$	$6,7 \pm 0,1$	$85,5 \pm 8,9$
Copal G+C_0,1%PDA	$32,3 \pm 2,1$	$25,7 \pm 1,3$	$10,8 \pm 0,4$	$86,6 \pm 2,3$
Copal G+C_0,5%PDA	$43,1 \pm 1,1$	$31,1 \pm 0,9$	$11,0 \pm 0,6$	$83,8 \pm 6,0$
Copal G+C_1%PDA	$37,1 \pm 0,4$	$29,0 \pm 0,3$	$12,0 \pm 0,6$	$87,1 \pm 4,9$

Wysiłki, mające na celu zwiększenie biointegralności cementów kostnych PMMA, doprowadziły do stosowania różnych dodatków, które znacząco wpływają na właściwości materiału, w szczególności na temperaturę i czas utwardzania. Miola i współpracownicy [362] wykazali, że dodanie cząstek ceramiki szklanej powoduje skrócenie czasu do osiągnięcia maksymalnej temperatury z 7,8 minuty do 5 minuty, który ulega skróceniu wraz z ilością dodanego

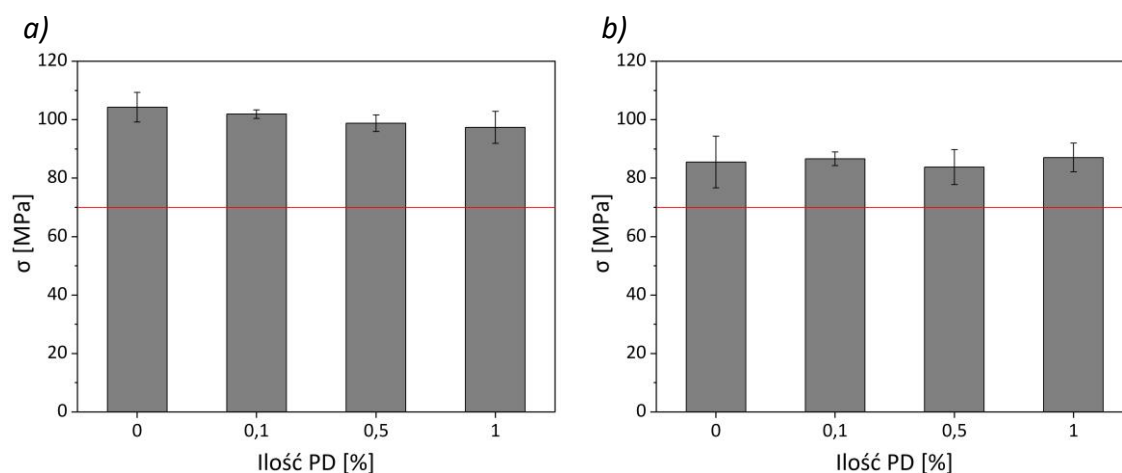
wypełniacza. Jednocześnie temperatura T_{max} obniżała się z 84 °C dla niemodyfikowanego cementu do 76 °C dla cementu kostnego z napełniaczem. W innych badaniach Cui i współpracownicy [363] włączyli do kompozycji cementu kostnego bioaktywne szkło boranowe zawierające stront jako fazę wzmacniającą i bioaktywny wypełniacz. Modyfikacja ta spowodowała obniżenie maksymalnej temperatury polimeryzacji z 89 °C dla zwykłego cementu kostnego do 66 °C dla zawierającego najwyższą ilość wypełniacza. Ponadto zaobserwowano znaczny wzrost czasu t_{set} . Wartości sięgnęły 11 minut dla próbki z najwyższą zawartością napełniacza. Innym napełniaczem ceramicznym stosowanym w badaniach cementu kostnego jest bioceramika krzemianowa wprowadzona do komercyjnego cementu PMMA (Acrylic bone cement III) przez Chen i współpracowników [364]. Ich wyniki wskazują na spadek temperatury T_{max} z 89 °C dla niemodyfikowanego cementu do 72 °C dla cementu z 50% zawartością napełniacza, przy jednoczesnym wydłużeniu czasu t_{set} z 12 do 14 minut. Z drugiej strony, Zhu i współpracownicy [365] wykazali prawie taki sam czas mieszania i aplikacji po wprowadzeniu zmineralizowanego kolagenu do komercyjnego cementu Mendec Spine Cement. W innej pracy Paz i współpracownicy [94] odnotowali zmniejszenie ciepła polimeryzacji o 12% i skrócenie czasu t_{set} o 38% po dodaniu 1% mas. proszku grafenu, podczas gdy wprowadzenie tlenku grafenu spowodowało wydłużenie czasu t_{set} o 11%, i zmniejszenie ciepła reakcji o 15%. Liu i współpracownicy [358] wprowadzili do cementu kostnego PMMA cząstki polifosforanu wapnia z domieszką strontu pokryte dopaminą, co spowodowało obniżenie temperatury T_{max} do 75,5 °C i wydłużenie czasu t_{set} do 9,7 minuty dla 15% dodatku. Badania przeprowadzone dla cementów kostnych z dodatkami nieorganicznymi jednoznacznie wskazują na spadek temperatury T_{max} i wzrost czasu t_{set} po modyfikacji. Doniesienia literaturowe pokrywają się z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy.

Wprowadzenie PDA do cementów kostnych nieobciążonych antybiotykiem nie wpłynęło znacząco na ich właściwości mechaniczne. W przypadku cementu kostnego BC różnice wytrzymałości na ściskanie z 0,1 i 0,5 %mas. PDA są statystycznie nieistotne. Nieznaczny spadek parametru σ zaobserwowano dopiero po dodaniu 1 %mas. PDA uzyskując wartości $102,4 \pm 7,2$ MPa. Z kolei, dodatek już 0,1 %mas. PDA do cementu PR powoduje nieznaczny spadek wartości parametru σ , który zwiększa się przy wprowadzeniu 0,5 %mas. PDA ($\sigma_{PR_0,5\%PDA} = 96,2 \pm 4,5$ MPa). Wprowadzenie 1 %mas. PDA nie powoduje dalszego spadku wartości omawianego parametru.



Rys. 122. Wytrzymałość na ściskanie (σ) cementu kostnego: a) BC oraz b) PR niemodyfikowanego i modyfikowanego dodatkiem PDA ($n = 5$).

Modyfikacja cementów kostnych obciążonych antybiotykiem z PDA nie miała wpływu na ich właściwości mechaniczne. Wytrzymałość na ściskanie cementu Copal G+C mieściła się w zakresie od $83,8 \pm 6,0$ MPa dla 0,5 %mas. PDA do $87,1 \pm 4,9$ MPa dla 1 %mas. PDA, podczas gdy wytrzymałość na ściskanie niemodyfikowanego cementu kostnego wynosiła $85,5 \pm 8,9$ MPa. Natomiast, cementy kostne PR+G charakteryzowały się wytrzymałością na ściskanie w zakresie $97,3 \pm 5,5$ MPa – $101,9 \pm 1,5$ MPa ($\sigma_{PR+G} = 104,3 \pm 5,1$ MPa).



Rys. 123. Wytrzymałość na ściskanie (σ) cementu kostnego: a) PR+G oraz b) Copal G+C niemodyfikowanego i modyfikowanego dodatkiem PDA ($n = 5$).

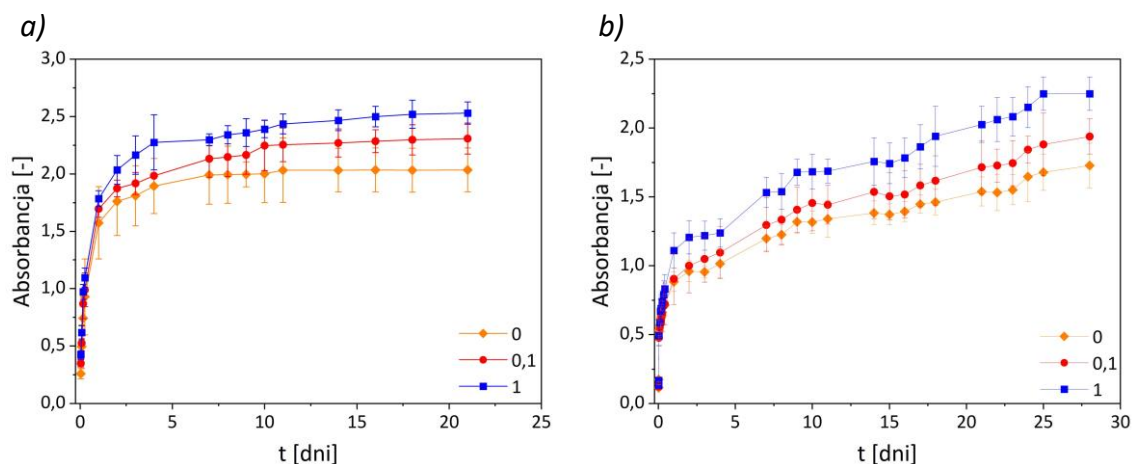
Jak pokazują badania, wprowadzenie dodatków funkcjonalnych do cementów kostnych prowadzi do pogorszenia ich wytrzymałości mechanicznej. Miola i współpracownicy [362] wykazali, że obecność cząstek szklano-ceramicznych powoduje kruchość cementu ze zmniejszeniem ostatecznego naprężenia zginającego. Stężenie dodatku wynoszące 20 %mas. spowodowało spadek właściwości mechanicznych poniżej dolnej granicy określonej przez normę ISO 5833:2002. W innych badaniach Zhu i współpracownicy [365] wprowadzili zmineralizowany kolagen do komercyjnego cementu Mendec Spine Cement. Wyniki wskazują na znaczne obniżenie

wytrzymałości na ściskanie z 112 MPa dla zwykłego cementu do 79 MPa po modyfikacji. Z kolei, włączenie bioaktywnego szkła boranowego zawierającego stront do cementu kostnego PMMA nie zmniejszyło znacząco wytrzymałości na ściskanie [363]. Co więcej, w badaniach przeprowadzonych przez Chena i współpracowników [364] dodanie bioceramiki krzemianowej do komercyjnego cementu PMMA spowodowało nieznaczłą poprawę wytrzymałości na ściskanie z 97 MPa dla zwykłego cementu kostnego do 101 MPa dla zmodyfikowanego materiału. Pahlevanzadeh i współpracownicy [366] zmodyfikowali cement kostny monticellitem (Mon) i nanorurkami węglowymi. Ich badania wykazały znacznie lepsze właściwości mechaniczne, tj. moduł rozciągania, wytrzymałość na rozciąganie dla PMMA-Mon-CNT niż dla cementów kostnych PMMA i PMMA-Mon. Ormsby i współpracownicy [70] wykazali znaczną poprawę właściwości zmęczeniowych cementu kostnego z dodatkiem wielościennych nanorurek węglowych w zakresie od 0,1 %mas. do 1,0 %mas. Interesujące wyniki wykazali Paz i współpracownicy w swoich badaniach [94]. Dodatek grafenu na poziomie 0,1 – 1 %mas. spowodował spadek wytrzymałości cementu kostnego z 107 MPa do 96 MPa, podczas gdy wprowadzenie tlenku grafenu spowodowało poprawę wytrzymałości cementu kostnego na ściskanie nawet do 121 MPa. Naukowcy postulowali, że na pogorszenie właściwości może mieć wpływ tworzenie się agregatów grafenu.

Niewiele doniesień literaturowych omawia wpływ polidopaminy na właściwości cementów kostnych. Liu i współpracownicy [358] wprowadzili pokryte dopaminą cząstki polifosforanu wapnia z domieszką strontu do cementu kostnego PMMA. Ich badania wykazały spadek wytrzymałości na ściskanie po modyfikacji, jednak powlekanie spowodowało zmniejszenie negatywnego efektu w porównaniu z niepowlekanymi cząstkami. W innych badaniach Kang i współpracownicy [367] wprowadzili bioaktywne nanocząstki hydroksyapatytu dekorowane polidopaminą do cementu na bazie PMMA. Wyniki wskazują na znaczny spadek wytrzymałości na ściskanie, wytrzymałości na zginanie i modułu sprężystości, co może być spowodowane tworzeniem się agregatów nanocząstek. Powyższe badania wskazują, że właściwości mechaniczne cementów kostnych ulegają pogorszeniu po dodaniu środków bioaktywnych. W przypadku tych badań nie zaobserwowano spadku wytrzymałości na ściskanie. Brak badań nad wpływem nanocząstek polidopaminy na właściwości funkcjonalne cementów kostnych stwarza przestrzeń do prowadzenia dalszych badań w tym obszarze.

Wprowadzenie polidopaminy do cementów kostnych obciążonych antybiotykami (Palacos R+G oraz Copal G+C) niesie ze sobą korzyść w postaci poprawy uwalniania antybiotyków bez wpływu na właściwości mechaniczne cementów. Uwalnianie antybiotyku gentamycyny prowadzono metodą spektroskopii UV-Vis na podstawie absorbancji piku absorpcyjnego z maksimum przy długości fali 206 nm. Wprowadzenie PDA spowodowało wzrost ilości uwalnianego antybiotyku z cementów Palacos R+G oraz Copal G+C, który był większy dla dodatku 1 %mas. PDA. Jednakże, nie wpłynęło na czas uwalniania antybiotyku z cementu Copal G+C,

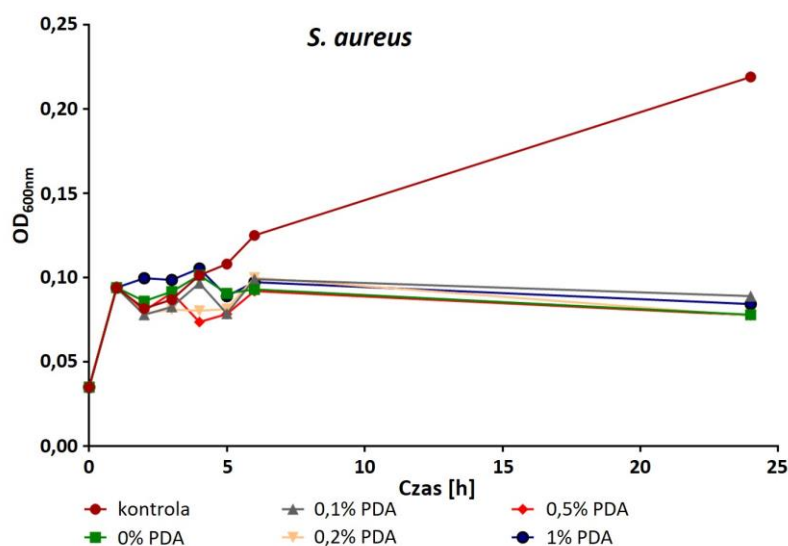
który wynosi 28 dni. Natomiast, zaobserwowano nieznaczne wydłużenie czasu uwalniania gentamycyny z 11 dni dla cementu niemodyfikowanego do 20 dni dla cementu Palacos R+G z dodatkiem PDA. Ilość antybiotyku uwolnionego po dodaniu PDA wzrosła o 13,3% dla 0,1 %mas. PDA i 24,3% dla 1 %mas. PDA (Palacos R+G) oraz o 12,3% dla 0,1 %mas. PDA i 30,2% dla 1 %mas. PDA (Copal G+C). Profile uwalniania przedstawiono na rysunku 124b.



Rys. 124. Uwalnianie gentamycyny z cementu kostnego: a) PR+G oraz b) Copal G+C niemodyfikowanego i modyfikowanego PDA.

Uwalnianie substancji czynnej z cementu kostnego jest związane z porowatością i chropowatością powierzchni materiału. Jak pokazują badania, dodanie bioaktywnych wypełniaczy zmienia te parametry, co w konsekwencji może wpływać na uwalnianie antybiotyku. W prowadzonych badaniach Paz i współpracownicy [94] zbadali wpływ dodatku grafenu i tlenku grafenu na porowatość cementów kostnych. Ich badanie wyraźnie pokazuje, że wraz ze wzrostem ilości dodatku od 0,1 %mas. do 1 %mas. porowatość materiałów wzrasta. Postulowali, że może to być związane z tworzeniem się aglomeratów przy wyższych zawartościach dodatków. Dodanie cząstek polifosforanu wapnia domieszkowanego strontem pokrytych dopaminą również spowodowało aglomerację cząstek, jednak autorzy nie badali porowatości i uwalniania antybiotyków [358]. Badania przeprowadzone przez Kaig i współpracowników [367] również wykazało tworzenie się agregatów nanocząstek hydroksyapatytu dekorowanych polidopaminą w matrycy cementu kostnego. W innej pracy Goncalves i współpracownicy [368] badali cementy kostne zawierające nanonapełniacze węglowe, takie jak nanorurki węglowe lub tlenek grafenu. Wyniki pokazują, że zmodyfikowane cementy kostne wykazują nieco zwiększoną chropowatość.

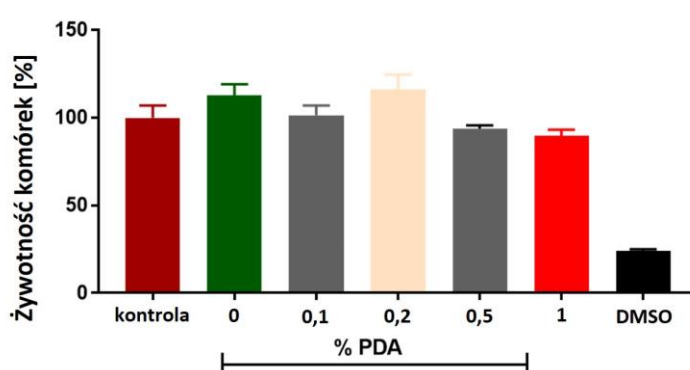
Polepszone uwalnianie antybiotyku z cementów kostnych modyfikowanych PDA, może przełożyć się na wyższą antybakteryjność. Jak pokazano na rysunku 125, wzrost bakterii zmniejszył się w próbkach z cementem kostnym i cementem kostnym modyfikowanym PDA (0,1; 0,2; 0,5 i 1 %mas. PDA) w porównaniu z próbką kontrolną zawierającą tylko *S. aureus*. Jednakże, nie zaobserwowano różnic w hamowaniu wzrostu pomiędzy próbkami z zwiększającą się ilością PDA.



Rys. 125. Wpływ cementu kostnego Copal G+C i cementu kostnego modyfikowanego 0,1 %mas. – 1 %mas. PDA na wzrost *S. aureus*.

Niestety, zwiększony poziom uwalnianej gentamycyny nie skutkował zwiększoną aktywnością przeciwbakteryjną. Może to być związane z faktem, że w ciągu pierwszych 24 godzin, kiedy badano właściwości antybakteryjne, ilość gentamycyny uwalnianej ze wszystkich próbek była na tym samym poziomie. Jednak dopiero w późniejszej części badania (po 2 – 3 dniach) zaobserwowano znacznie większe uwalnianie gentamycyny w zmodyfikowanych cementach kostnych. Niemniej jednak, materiały wykazują silną aktywność przeciwbakteryjną.

Ponadto, zbadano żywotność komórek Hep2G za pomocą kolorymetrycznego testu WST-1 w trakcie 24-godzinnej ekspozycji na cement kostny i cement kostny zmodyfikowany 0,1 %mas. – 1 %mas. PDA. W badaniu nie zaobserwowano żadnego negatywnego efektu w porównaniu z komórkami kontrolnymi (rysunek 126).



Rys. 126. Żywotność komórek Hep2G po działaniu cementu kostnego Copal G+C i Copal G+C modyfikowanego 0,1 %mas., 0,2 %mas., 0,5 %mas. i 1 %mas. PDA.

Nanocząstki wprowadzone do organizmu gromadzą się i mogą prowadzić do uszkodzenia komórek wątroby. Wyniki badań Sharma i współpracowników [369] wskazują, że nanocząstki ZnO gromadzą się w wątrobie i powodują stres oksydacyjny prowadzący do uszkodzenia DNA

i apoptozy. Podobnie Shukla i współpracownicy [370] wykazali, że nanocząstki TiO_2 indukują oksydacyjne uszkodzenia DNA i apoptozę w komórkach Hep2G za pośrednictwem mitochondriów. Knudsen i współpracownicy [371] zaobserwowali wzrost ekspresji cytokin prozapalnych CCL2 i IL6, a także odpowiedzi genu HMOX1 na stres oksydacyjny i enzymu naprawy DNA OGG1 w wątrobie po ekspozycji na micelle i liposomy. Wzrost ten był statystycznie istotny dla grup narażonych na działanie miceli. Ten sam trend pojawił się w grupach narażonych na liposomy, ale efekt był znaczący tylko dla CCL2 i IL6. Z kolei, z danych WST-1 uzyskanych przez Kermanizadeh i współpracowników [372] wynika, że cytotoksyczność związana z ekspozycją na liposomy była bardzo niska, nawet przy stężeniach do $39 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Dane wykazały, że komórki poddane działaniu etanolu były bardziej podatne na cytotoksyczność w wyniku jednoczesnej ekspozycji na liposomy.

Włączenie polidopaminy do cementów kostnych wykazało obiecujący wpływ na właściwości materiału, uwalnianie leku i bioaktywność. Cementy kostne modyfikowane PDA wykazywały wydłużony czas wiązania i obniżenie maksymalnej temperatury polimeryzacji, zgodnie z trendami obserwowanymi dla innych bioaktywnych wypełniaczy. Modyfikacja ta nie wpłynęła negatywnie na wytrzymałość cementu kostnego na ściskanie, w przeciwieństwie do wielu innych bioaktywnych dodatków, które zazwyczaj zmniejszają wytrzymałość mechaniczną modyfikowanych materiałów.

Podsumowując, uwalnianie gentamycyny z cementów kostnych Palacos R+G oraz Copal G+C modyfikowanych PDA było znacznie większe niż z cementu niemodyfikowanego ze wzrostem do odpowiednio 124% i 130% dla cementu modyfikowanego dodatkiem 1 %mas. PDA. Jednak to zwiększone uwalnianie nie odzwierciedlało lepszej skuteczności przeciwbakteryjnej cementu Copal G+C w początkowym 24-godzinym okresie prowadzenia badania. Prawdopodobnie, spowodowane było to podobnym uwalnianiem antybiotyku ze wszystkich cementów przez ten okres. Niemniej jednak, materiały wykazywały ogólnie silne właściwości antybakteryjne. Ocena cytotoksyczności przy użyciu komórek Hep2G potwierdziła, że cementy kostne modyfikowane PDA nie wywierają toksycznego wpływu na komórki wątrobowe. Wyniki te kontrastują z badaniami prowadzonymi z zastosowaniem innych rodzajów nanocząstek, takich jak ZnO i TiO_2 , które wykazały działanie hepatotoksyczne poprzez stres oksydacyjny i indukcję apoptozy.

Mimo obiecujących wyników, wpływ PDA na właściwości funkcjonalne cementów kostnych pozostaje słabo poznany. Dalsze badania są niezbędne do pełnego zrozumienia długoterminowych oddziaływań biologicznych cementów modyfikowanych PDA, optymalizacji kinetyki uwalniania antybiotyków oraz oceny ich skuteczności *in vivo*. Niniejsze badanie stanowi fundament dla przyszłych prac nad wykorzystaniem PDA jako funkcjonalnego dodatku do biomateriałów ortopedycznych.

IV. Wnioski i podsumowanie prowadzonych badań

Wyniki badań przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej obejmują modyfikację związków o działaniu antybakteryjnym (jak antybiotyki, eugenol, nanocząsteczki srebra), syntezę i charakterystykę polimerów gwiaździstych z wbudowanymi substancjami aktywnymi jak i środkiem kontrastującym (gadolin) i pożądanymi grupami funkcyjnymi oraz ich zastosowanie do modyfikacji cementów kostnych. Opracowana tematyka ma charakter innowacyjny, ponieważ w literaturze brakuje doniesień dotyczących wykorzystania zarówno pochodnych eugenolu i gadolinu jako monomerów w kompozycjach cementów kostnych, jak również polimerów gwiaździstych o właściwościach antybakteryjnych lub kontrastujących jako składników tych materiałów.

Głównym celem badań było opracowanie strategii syntezy monomerów funkcyjnych i polimerów gwiaździstych, a następnie ich wykorzystanie do modyfikacji cementów kostnych w celu nadania im nowych cech użytkowych – aktywności antybakteryjnej, zdolności do kontrolowanego uwalniania substancji aktywnych oraz właściwości kontrastujących umożliwiających obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (MRI). Realizacja tego celu obejmowała syntezę pochodnych eugenolu i ampicyliny, otrzymywanie polimerów gwiaździstych metodą ATRP oraz wbudowanie do ich struktury monomerów o funkcji antybakteryjnej lub kontrastującej. Badano również zdolność polimerów gwiaździstych do kompleksowania związków aktywnych, takich jak eugenol, ampicylina, ryfampicina czy nanocząstki srebra, a następnie analizowano wpływ dodatku uzyskanych polimerów gwiaździstych na właściwości mechaniczne i antybakteryjne cementów kostnych oraz proces utwardzania oraz kinetykę uwalniania substancji aktywnych z matrycy polimerowej.

Najważniejsze wnioski z przeprowadzonych badań można ująć następująco:

Modyfikacje związków funkcyjnych

Zaprojektowane i opracowane strategie modyfikacji związków bioaktywnych, takich jak eugenol czy ampicylina, umożliwiły uzyskanie monomerów i inicjatorów zdolnych do wbudowania się w strukturę polimeru.

W przypadku eugenolu zastosowano estryfikację Steglicha (modyfikacja przez grupę hydroksylową) oraz reakcję tiol-en (modyfikacja przez grupę allilową), co pozwoliło na otrzymanie monomerów o potencjalnym działaniu antybakteryjnym i reaktywnych w procesie polimeryzacji, co z sukcesem wykorzystano w syntezie polimerów gwiaździstych i otrzymywaniu cementów kostnych.

Ampicylinę zmodyfikowano metodą estryfikacji Steglicha, otrzymując inicjator polimeryzacji ATRP. Następnie przeprowadzono syntezę zarówno liniowych polimerów PMMA,

jak i polimerów gwiazdzistych z kowalencyjnie przyłączonym antybiotykiem, przy zachowaniu jego aktywności biologicznej.

Funkcjonalizacja gadolinu pozwoliła na otrzymanie metakrylowej pochodnej $Gd(MAA)_3$, pełniącej jednocześnie rolę środka kontrastującego i monomeru sieciującego. Otrzymany monomer z sukcesem wbudowano w strukturę polimerów gwiazdzistych oraz matryc cementów kostnych, nadając im właściwości kontrastujące, umożliwiające obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego.

Synteza polimerów gwiazdzistych i otrzymywanie kompleksów

Polimery gwiazdziste z powodzeniem zsyntezowano metodą ATRP, co pozwoliło na uzyskanie materiałów o dobrze zdefiniowanej architekturze, wysokiej masie cząsteczkowej i stosunkowo niskiej dyspersyjności. Otrzymane struktury stanowiły uniwersalną platformę do dalszych modyfikacji, umożliwiając zarówno kowalencyjne wbudowywanie substancji aktywnych, jak i tworzenie kompleksów.

Zsyntetyzowane polimery gwiazdziste z kowalencyjnie wbudowaną metakrylową pochodną eugenolu wykazywały właściwości antybakteryjne, a polimery z wbudowaną ampicyliną zachowały aktywność biologiczną, potwierdzając skuteczność zastosowanych metod modyfikacji chemicznej i syntezy polimerowej.

Polimery gwiazdziste zawierające metakrylan gadolinu wykazywały jednorodność pod względem rozmiaru i charakteryzowały się dobrze zdefiniowaną strukturą, a ich właściwości kontrastujące w MRI wskazują na potencjał zastosowania w obrazowaniu medycznym, zwłaszcza w procedurach śródoperacyjnych.

Odpowiednio zaprojektowane polimery gwiazdziste tworzyły kompleksy zarówno z substancjami hydrofilowymi (ampicylina), jak i hydrofobowymi (eugenol, ryfampicina), zwiększając ich biodostępność i efektywność biologiczną. Struktura polimeru gwiazdzistego umożliwiła kompleksowanie substancji w niestandardowych stosunkach molowych (STR:EU – 1:20; STR:AMP – 1:7; STR:RIF – 1:5), przewyższając zdolności innych nośników, jak na przykład Captisol®, który pozwala na kompleksowanie równomolowych ilości eugenolu.

Wbudowanie monomeru DMAEMA w strukturę polimerów gwiazdzistych umożliwiło redukcję jonów Ag^+ i otrzymanie nanocząstek srebra (AgNPs) bez konieczności stosowania dodatkowych czynników redukujących. Proces ten był najbardziej wydajny w układzie wodno-acetonowym, prowadząc do powstania stabilnych, kulistych nanocząstek o rozmiarach 2 – 40 nm. Obecność grup aminowych DMAEMA sprzyjała zarówno kompleksowaniu jonów srebra, jak i ich redukcji *in situ*, zwiększając efektywność i stabilność powstających nanostruktur.

Kompozycja cementów kostnych

Analiza wpływu stężenia składników systemu inicjującego (BPO i DMA) wskazuje na ich znaczący wpływ na przebieg procesu polimeryzacji cementu kostnego i pozwala na projektowanie jego właściwości. Najwyższy stopień konwersji (>95%) przy ograniczonym wzroście temperatury utwardzania cementu niemodyfikowanego uzyskano dla stosunku masowego BPO:DMA = 0,3:0,5. Modyfikacje cementu kostnego, poprzez wprowadzenie różnych dodatków antybakteryjnych, wymagały zmiany stężenia składników systemu inicjującego, np. 1 %mas. BPO i 1,17 %mas. DMA. Konieczne było zatem znalezienie odpowiednich stężeń inicjatora i koinicjatora (reduktora), dla konkretnego składu kompozycji, które pozwoliły na otrzymanie materiału o pożądanych właściwościach.

Eugenol

Cementy zawierające 0,5 %mas. eugenolu spełniały wszystkie wymagania normy ISO 5833:2002 i wykazywały aktywność bakteriostatyczną, mimo dużego stężenia uwalnianego środka antybakteryjnego. Jednakże eugenol wpływał na proces utwardzania cementów kostnych, znacząco wydłużając czas wiązania i obniżając maksymalną temperaturę polimeryzacji. Konsekwencją tego było również pogorszenie wytrzymałości na ściskanie materiałów, która była najlepsza dla cementu z najwyższą zawartością systemu inicjującego 1 %mas. BPO i 1,17 %mas. DMA. Negatywny wpływ eugenolu na proces utwardzania cementu kostnego powinien zostać ograniczony, co uzyskano poprzez włączenie EU w nośniki substancji aktywnych.

Kompleksowanie eugenolu na nośnikach leków, jak Captisol® i polimer gwiazdasty wzmocniło działanie antybakteryjne przy zachowaniu odpowiedniej wytrzymałości mechanicznej materiałów. Cementy z dodatkiem CP-EU wykazywały bardzo dobrą wytrzymałość mechaniczną oraz wysokie uwalnianie eugenolu i skuteczne działanie antybakteryjne przez ponad 48 godzin. Z kolei, kompleks STR:EU pozwalał na długotrwałe uwalnianie eugenolu i wysoką aktywność antybakteryjną w pierwszych godzinach badania, choć powodował pogorszenie wytrzymałości cementu na ściskanie.

Modyfikacja eugenolu pozwoliła na otrzymanie dwóch reaktywnych pochodnych: metakrylowej (EU-MAA) i tiolowej (EU-T2), które skutecznie włączono do struktury cementów kostnych. Wykazywały one jednak zróżnicowany wpływ na proces utwardzania i właściwości cementu kostnego: monomer EU-MAA poprawił wytrzymałość na ściskanie i skrócił czas wiązania, natomiast monomer EU-T2 silnie obniżał temperaturę utwardzania, lecz towarzyszył temu spadek stopnia konwersji oraz pogorszenie właściwości mechanicznych. Cementy kostne modyfikowane EU-MAA wykazywały zwiększoną aktywność antybakteryjną względem BC_EU, z kolei, BC_EU-T2 wykazywał bardzo silne właściwości antybakteryjne w pierwszych 24 godzinach badania.

Cementy kostne modyfikowane STR–EU-MAA spełniały wymagania normy ISO 5833:2002 i charakteryzowały się dobrą wytrzymałością na ściskanie, a także wysoką aktywnością

antybakteryjną wobec *E. coli*. Związanie eugenolu w polimerze gwiaździstym skutkuje silniejszymi właściwościami antybakteryjnymi cementu kostnego, niż wprowadzenie eugenolu w postaci kompleksu z polimerem gwiaździstym.

Podsumowując, z pośród przeprowadzonych modyfikacji eugenolu, najlepszymi właściwościami antybakteryjnymi, przy zachowaniu dobrych właściwości mechanicznych i parametrów utwardzania cementów kostnych, charakteryzował się polimer gwiaździsty z wbudowanym kowalencyjnie monomerem EU-MAA.

Polimery gwiaździste ze srebrem

Modyfikacja metakrylowych cementów kostnych polimerami gwiaździstymi zawierającymi AgNPs (STR-AgNPs) przyczyniła się do poprawy ich wytrzymałości na ściskanie. Co więcej, badania biologiczne potwierdziły silną aktywność antybakteryjną wobec *E. coli*. Dodatkowo, antybiotykowe cementy kostne modyfikowane STR-AgNPs charakteryzowały się znacznym wzrostem i wydłużeniem czasu uwalniania gentamycyny, a także polepszeniem właściwości antybakteryjnych.

Antybiotyki

Wprowadzenie antybiotyków (ampicylina i ryfampicyna) do cementów kostnych wpłynęło na ich właściwości, jednakże nadal spełniały one wymagania określone normą ISO 5833:2002. Dodatek ampicyliny do cementów skutkowało poprawą wytrzymałości mechanicznej oraz zwiększeniem temperatury maksymalnej polimeryzacji, przy uzyskaniu słabej aktywności antybakteryjnej. Z kolei, ryfampicyna znacząco wpływała na proces utwardzania cementu kostnego, obniżając temperaturę T_{max} i wydłużając czas polimeryzacji oraz pogarszając właściwości mechaniczne, jednak jednocześnie zapewniając silne właściwości antybakteryjne, istotne z punktu widzenia jego potencjalnych zastosowań. Negatywny wpływ ryfampicyny na proces utwardzania cementu kostnego wymaga ograniczenia, co uzyskano poprzez kompleksowanie RIF z polimerem gwiaździstym.

Kompleksowanie RIF umożliwiło zmniejszenie negatywnego wpływu tego antybiotyku na właściwości cementów kostnych, przy zachowaniu wysokiej wytrzymałości mechanicznej oraz korzystnego, przedłużonego profilu uwalniania leku. Z kolei, kompleksowanie AMP pozwoliło na efektywne wiązanie antybiotyku, zachowując jego strukturę i skuteczność terapeutyczną, przy jednoczesnej poprawie właściwości antybakteryjnych modyfikowanych cementów kostnych, jednakże wpływając negatywnie na właściwości mechaniczne.

Cementy modyfikowane STR-AMP-PEG₄-PMMA wykazywały bardzo dobre właściwości mechaniczne oraz zwiększoną, w stosunku do BC_AMP oraz BC_STR:AMP, aktywność antybakteryjną.

Polimery gwiaździste z gadolinem

Dodatek STR–Gd(MAA)₃ do cementów kostnych spowodował pogorszenie ich właściwości mechanicznych. Jednakże wprowadzenie zarówno Gd(MAA)₃, jak i STR–Gd(MAA)₃ pozwoliło uzyskać materiał o właściwościach kontrastujących. Otrzymane materiały stanowią potencjalne narzędzie do monitorowania implantu w trakcie terapii za pomocą rezonansu magnetycznego.

Polidopamina

Polidopamina została skutecznie zsyntezowana i wprowadzona do cementu jako składnik bioaktywny. Efektem zastosowania polidopaminy było obniżenie temperatury utwardzania, a także wydłużenie czasu wiązania bez negatywnego wpływu na wytrzymałość mechaniczną modyfikowanego cementu. Co istotne, PDA znacząco poprawiła uwalnianie gentamycyny, osiągając nawet 150% wzrost względem cementu niemodyfikowanego. Materiały te wykazywały wysoką biokompatybilność w badaniach *in vitro* z komórkami Hep2G, co wskazuje, że mogą być z powodzeniem stosowane jako bezpieczne i bioaktywne wypełniacze implantacyjne.

Podsumowując, przeprowadzone badania potwierdziły możliwość opracowania funkcjonalnych cementów kostnych o polepszonych właściwościach biologicznych i fizykochemicznych dzięki zastosowaniu nowatorskich, wielofunkcyjnych polimerów gwiaździstych oraz ich kompleksów z związkami o właściwościach antybakteryjnych i kontrastujących. Modyfikacje obejmujące wprowadzenie antybiotyków, eugenolu i jego pochodnych, polidopaminy, oraz nanocząstek srebra pozwoliły na zwiększenie skuteczności antybakteryjnej oraz kontrolowane uwalnianie substancji aktywnych, przy jednoczesnym zachowaniu wytrzymałości mechanicznej i parametrów utwardzania cementów kostnych zgodnych z normą ISO 5833:2002. Modyfikacja metakrylanem gadolinu pozwoliła dodatkowo uzyskać materiały o właściwościach kontrastujących metodą MRI. Przedstawione rozwiązania mogą znaleźć zastosowanie w nowoczesnych cementach kostnych do leczenia ubytków kostnych i stabilizacji implantów, spełniając jednocześnie wymagania terapii regeneracyjnych, diagnostyki obrazowej oraz długotrwałej profilaktyki zakażeń.

Przegląd dostępnej literatury wskazuje na brak doniesień dotyczących zastosowania polimerów modyfikowanych środkami antybakteryjnymi w kontekście ich wpływu na właściwości cementów kostnych. Obszar ten pozostaje niedostatecznie zbadany, co uniemożliwia pełną ocenę potencjału aplikacyjnego takich układów w medycynie regeneracyjnej. Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy stanowią zatem próbę wypełnienia tej luki poznawczej i mogą przyczynić się do rozwoju nowoczesnych, funkcjonalnych materiałów kompozytowych o działaniu przeciwdrobnoustrojowym.

V. Bibliografia

- [1] C. Cooper, Z.A. Cole, C.R. Holroyd, S.C. Earl, N.C. Harvey, E.M. Dennison, L.J. Melton, S.R. Cummings, J.A. Kanis, Secular trends in the incidence of hip and other osteoporotic fractures, *Osteoporosis International* 22 (2011). <https://doi.org/10.1007/s00198-011-1601-6>.
- [2] K.M. Sanders, G.C. Nicholson, A.M. Ugoni, E. Seeman, J.A. Pasco, M.A. Kotowicz, Fracture rates lower in rural than urban communities: The Geelong osteoporosis study, *J Epidemiol Community Health* (1978) 56 (2002). <https://doi.org/10.1136/jech.56.6.466>.
- [3] M. Stańczyk, B. Van Rietbergen, Thermal analysis of bone cement polymerisation at the cement–bone interface, *J Biomech* 37 (2004) 1803–1810. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOMECH.2004.03.002>.
- [4] K.O. Böker, K. Richter, K. Jäckle, S. Taheri, I. Grunwald, K. Borchering, J. von Byern, A. Hartwig, B. Wildemann, A.F. Schilling, W. Lehmann, Current state of bone adhesives-Necessities and hurdles, *Materials* 12 (2019). <https://doi.org/10.3390/ma12233975>.
- [5] A. Balin, *Cementy w chirurgii kostnej*, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice, 2016.
- [6] S.M. Barinov, V.S. Komlev, Calcium phosphate bone cements, *Inorganic Materials* 47 (2011). <https://doi.org/10.1134/S0020168511130024>.
- [7] M. Komath, H.K. Varma, Development of a fully injectable calcium phosphate cement for orthopedic and dental applications, *Bulletin of Materials Science* 26 (2003). <https://doi.org/10.1007/BF02711186>.
- [8] L.L. Hench, J.M. Polak, Third-generation biomedical materials, *Science* (1979) 295 (2002). <https://doi.org/10.1126/science.1067404>.
- [9] C.C. Lin, A.T. Metters, Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling, *Adv Drug Deliv Rev* 58 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.004>.
- [10] C.C. Lin, K.S. Anseth, PEG hydrogels for the controlled release of biomolecules in regenerative medicine, *Pharm Res* 26 (2009). <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9801-2>.
- [11] M. Schamel, J. Groll, U. Gbureck, Simultaneous formation and mineralization of star-P(EO-stat-PO) hydrogels, *Materials Science and Engineering C* 75 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.088>.
- [12] K. Gkioni, S.C.G. Leeuwenburgh, T.E.L. Douglas, A.G. Mikos, J.A. Jansen, Mineralization of hydrogels for bone regeneration, *Tissue Eng Part B Rev* 16 (2010). <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2010.0462>.
- [13] P. Jin, M. Xia, M. Hasany, P. Feng, J. Bai, J. Gao, W. Zhang, M. Mehrli, R. Wang, A tough injectable self-setting cement-based hydrogel for noninvasive bone augmentation, *Interdisciplinary Materials* 2 (2023) 771–788. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/idm2.12119>.
- [14] M.J. Sánchez-Fernández, H. Hammoudeh, R.P. Félix Lanao, M. van Erk, J.C.M. van Hest, S.C.G. Leeuwenburgh, Bone-Adhesive Materials: Clinical Requirements, Mechanisms of Action, and Future Perspective, *Adv Mater Interfaces* 6 (2019). <https://doi.org/10.1002/admi.201802021>.
- [15] H. Zhang, L. Bré, T. Zhao, B. Newland, M. Da Costa, W. Wang, A biomimetic hyperbranched poly(amino ester)-based nanocomposite as a tunable bone adhesive for sternal closure, *J Mater Chem B* 2 (2014). <https://doi.org/10.1039/c4tb00155a>.
- [16] Z. Cai, Y. Wan, M.L. Becker, Y.Z. Long, D. Dean, Poly(propylene fumarate)-based materials: Synthesis, functionalization, properties, device fabrication and biomedical applications, *Biomaterials* 208 (2019) 45–71. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2019.03.038>.
- [17] B. Magnan, M. Bondi, T. Maluta, E. Samaila, L. Schirru, C. Dall’Oca, Acrylic bone cement: Current concept review, *Musculoskelet Surg* 97 (2013). <https://doi.org/10.1007/s12306-013-0293-9>.
- [18] S. Hosseini, A Review of Bone Cements as Injectable Materials for Treatment of Bone-Related Diseases: Current Status and Future Developments, *Journal of Research in Orthopedic Science* 9 (2022) 1–14.
- [19] A.M. Yousefi, A review of calcium phosphate cements and acrylic bone cements as injectable materials for bone repair and implant fixation, *J Appl Biomater Funct Mater* 17 (2019). <https://doi.org/10.1177/2280800019872594>.
- [20] M.J. Larsen, A. Thorsen, A comparison of some effects of fluoride on apatite formation in vitro and in vivo, *Calcif Tissue Int* 36 (1984). <https://doi.org/10.1007/BF02405391>.

- [21] C.A. Baud, J.M. Very, B. Courvoisier, Biophysical study of bone mineral in biopsies of osteoporotic patients before and after long-term treatment with fluoride, *Bone* 9 (1988). [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(88\)90117-2](https://doi.org/10.1016/8756-3282(88)90117-2).
- [22] R. Vaishya, M. Chauhan, A. Vaish, Bone cement, *J Clin Orthop Trauma* 4 (2013) 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.jcot.2013.11.005>.
- [23] B. Magnan, M. Bondi, T. Maluta, E. Samaila, L. Schirru, C. Dall’Oca, Acrylic bone cement: Current concept review, *Musculoskelet Surg* 97 (2013) 93–100. <https://doi.org/10.1007/s12306-013-0293-9>.
- [24] N. Dunne, A. Tzagiollari, M. Sahebalzamani, T.J. Dunne, Acrylic cements for bone fixation in joint replacement, in: *Joint Replacement Technology*, 2021. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821082-6.00021-2>.
- [25] K.D. Kuehn, W. Ege, U. Gopp, Acrylic bone cements: Composition and properties, in: *Orthopedic Clinics of North America*, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ocl.2004.06.010>.
- [26] J. JUDET, R. JUDET, The use of an artificial femoral head for arthroplasty of the hip joint., *J Bone Joint Surg Br* 32 B (1950). <https://doi.org/10.1302/0301-620x.32b2.166>.
- [27] S. Deb, G. Koller, Acrylic bone cement: Genesis and evolution, in: *Orthopaedic Bone Cements*, 2008. <https://doi.org/10.1533/9781845695170.2.167>.
- [28] H.W. Buchholz, R.A. Elson, E. Engelbrecht, H. Lodenkämper, J. Röttger, A. Siegel, Management of deep infection of total hip replacement, *Journal of Bone and Joint Surgery - Series B* 63 (1981). <https://doi.org/10.1302/0301-620x.63b3.7021561>.
- [29] K.J. Saleh, M.M. El Othmani, T.H. Tzeng, W.M. Mihalko, M.C. Chambers, T.M. Grupp, Acrylic bone cement in total joint arthroplasty: A review, *Journal of Orthopaedic Research* 34 (2016) 737–744. <https://doi.org/10.1002/jor.23184>.
- [30] D.Q. Tham, M.D. Huynh, N.T.K. Dung, D. Van Cong, L.T. Huyen, N.T.D. Linh, N.T. Thai, N.A. Son, Synthesis of star PMMA via ARGET ATRP towards application in acrylic bone cements, *Vietnam Journal of Chemistry* 59 (2021). <https://doi.org/10.1002/vjch.202000035>.
- [31] A. Robu, A. Antoniac, R. Ciocoiu, E. Grosu, J. V. Rau, M. Fosca, I.I. Krasnyuk, G.G. Pircalabioru, V. Manescu, I. Antoniac, S. Gradinaru, Effect of the Antimicrobial Agents Peppermint Essential Oil and Silver Nanoparticles on Bone Cement Properties, *Biomimetics* 7 (2022). <https://doi.org/10.3390/biomimetics7030137>.
- [32] M. Wekwejt, A. Michno, K. Truchan, A. Pałubicka, B. Świeczko-żurek, A.M. Osyczka, A. Zieliński, Antibacterial activity and cytocompatibility of bone cement enriched with antibiotic, nanosilver, and nanocopper for bone regeneration, *Nanomaterials* 9 (2019). <https://doi.org/10.3390/nano9081114>.
- [33] Y. Chang, C.-L. Tai, P.-H. Hsieh, S.W.N. Ueng, Gentamicin in bone cement: A potentially more effective prophylactic measure of infection in joint arthroplasty., *Bone Joint Res* 2 (2013). <https://doi.org/10.1302/2046-3758.210.2000188>.
- [34] P.L. Lai, L.H. Chen, W.J. Chen, I.M. Chu, Chemical and physical properties of bone cement for vertebroplasty, *Biomed J* 36 (2013). <https://doi.org/10.4103/2319-4170.112750>.
- [35] W.F. Mousa, M. Kobayashi, S. Shinzato, M. Kamimura, M. Neo, S. Yoshihara, T. Nakamura, Biological and mechanical properties of PMMA-based bioactive bone cements, *Biomaterials* 21 (2000). [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00097-1](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00097-1).
- [36] R. Fada, N. Farhadi Babadi, R. Azimi, M. Karimian, M. Shahgholi, Mechanical properties improvement and bone regeneration of calcium phosphate bone cement, Polymethyl methacrylate and glass ionomer, *J. Nanoanalysis* 8 (2021).
- [37] G. Lewis, Alternative acrylic bone cement formulations for cemented arthroplasties: Present status, key issues, and future prospects, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 84 (2008). <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30873>.
- [38] Kühn Klaus-Diter, *Bone Cements - Up-to-Date Comparison of Physical and Chemical Properties of Commercial Materials*, Springer Berlin, Heidelberg, Berlin, 2000. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-642-59762-6>.

- [39] B. Pascual, M. Gurruchaga, M.P. Ginebra, F.J. Gil, J.A. Planell, I. Goní, Influence of the modification of P/L ratio on a new formulation of acrylic bone cement, *Biomaterials* 20 (1999). [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00192-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00192-6).
- [40] J. Slane, J. Vivanco, J. Meyer, H.L. Ploeg, M. Squire, Modification of acrylic bone cement with mesoporous silica nanoparticles: Effects on mechanical, fatigue and absorption properties, *J Mech Behav Biomed Mater* 29 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2013.10.008>.
- [41] J. Girard, Is it Time for Cementless Hip Resurfacing?, *HSS Journal* 8 (2012). <https://doi.org/10.1007/s11420-012-9295-7>.
- [42] C.S. Ranawat, M. Meftah, E.N. Windsor, A.S. Ranawat, Cementless fixation in total knee arthroplasty: Down the boulevard of broken dreams - Affirms, *Journal of Bone and Joint Surgery - Series B* 94 B (2012). <https://doi.org/10.1302/0301-620X.94B11.30826>.
- [43] P. Boileau, C. Avidor, S.G. Krishnan, G. Walch, J.F. Kempf, D. Molé, Cemented polyethylene versus uncemented metal-backed glenoid components in total shoulder arthroplasty: A prospective, double-blind, randomized study, *J Shoulder Elbow Surg* 11 (2002). <https://doi.org/10.1067/mse.2002.125807>.
- [44] N.P. Hailer, G. Garellick, J. Kärrholm, Uncemented and cemented primary total hip arthroplasty in the Swedish Hip Arthroplasty Register: Evaluation of 170,413 operations, *Acta Orthop* 81 (2010). <https://doi.org/10.3109/17453671003685400>.
- [45] Z. He, Q. Zhai, M. Hu, C. Cao, J. Wang, H. Yang, B. Li, Bone cements for percutaneous vertebroplasty and balloon kyphoplasty: Current status and future developments, *J Orthop Translat* 3 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.jot.2014.11.002>.
- [46] Z. Wang, L.P. Nogueira, H.J. Haugen, I.C. Van Der Geest, P.C. de Almeida Rodrigues, D. Janssen, T. Bitter, J.J.J.P. van den Beucken, S.C. Leeuwenburgh, Dual-functional porous and cisplatin-loaded polymethylmethacrylate cement for reconstruction of load-bearing bone defect kills bone tumor cells, *Bioact Mater* 15 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.12.023>.
- [47] C. Migliaresi, L. Fambri, J. Kolarik, Polymerization kinetics, glass transition temperature and creep of acrylic bone cements, *Biomaterials* 15 (1994). [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(94\)90110-4](https://doi.org/10.1016/0142-9612(94)90110-4).
- [48] F.W. Reckling, W.L. Dillon, The bone cement interface temperature during total joint replacement, *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A* 59 (1977). <https://doi.org/10.2106/00004623-197759010-00014>.
- [49] M. Santin, A. Motta, A. Borzachiello, L. Nicolais, L. Ambrosio, Effect of PMMA cement radical polymerisation on the inflammatory response, *J Mater Sci Mater Med* 15 (2004). <https://doi.org/10.1007/s10856-004-5668-x>.
- [50] J.A. Inzana, E.M. Schwarz, S.L. Kates, H.A. Awad, Biomaterials approaches to treating implant-associated osteomyelitis, *Biomaterials* 81 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.12.012>.
- [51] C. Robo, G. Hulsart-Billström, M. Nilsson, C. Persson, In vivo response to a low-modulus PMMA bone cement in an ovine model, *Acta Biomater* 72 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.03.014>.
- [52] A. Hoess, A. López, H. Engqvist, M.K. Ott, C. Persson, Comparison of a quasi-dynamic and a static extraction method for the cytotoxic evaluation of acrylic bone cements, *Materials Science and Engineering C* 62 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.01.048>.
- [53] A.J. Smith, P. Dieppe, K. Vernon, M. Porter, A.W. Blom, Failure rates of stemmed metal-on-metal hip replacements: Analysis of data from the National Joint Registry of England and Wales, *The Lancet* 379 (2012). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60353-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60353-5).
- [54] E. Cenni, D. Granchi, M. Vancini, A. Pizzoferrato, Platelet release of transforming growth factor- β and β -thromboglobulin after in vitro contact with acrylic bone cements, *Biomaterials* 23 (2002). [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00273-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00273-3).
- [55] J.S. Everhart, E. Altneu, J.H. Calhoun, Medical comorbidities are independent preoperative risk factors for surgical infection after total joint arthroplasty, in: *Clin Orthop Relat Res*, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11999-013-2923-9>.

- [56] S.C. Shen, W.K. Ng, Y.C. Dong, J. Ng, R.B.H. Tan, Nanostructured material formulated acrylic bone cements with enhanced drug release, *Materials Science and Engineering C* 58 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.011>.
- [57] G. Przysławski, K. Szcześniak, P. Gajewski, A. Marcinkowska, Influence of Initiator Concentration on the Polymerization Course of Methacrylate Bone Cement, *Polymers (Basel)* 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/polym14225005>.
- [58] V. Wall, T.-H. Nguyen, N. Nguyen, P.A. Tran, *biomedicines* Controlling Antibiotic Release from Polymethylmethacrylate Bone Cement, (2021). <https://doi.org/10.3390/biomedicines>.
- [59] L.D.T. Topoleski, R. Rodriguez-Pinto, Bone cement, in: *Comprehensive Biomaterials*, Elsevier, 2011: pp. 11–28. <https://doi.org/10.22271/ortho.2017.v3.i4b.12>.
- [60] J.P. Davies, W.H. Harris, Comparison of diametral shrinkage of centrifuged and uncentrifuged simplex P bone cement, *Journal of Applied Biomaterials* 6 (1995). <https://doi.org/10.1002/jab.770060311>.
- [61] J.S. Wang, H. Franzén, L. Lidgren, Interface gap after implantation of a cemented femoral stem in pigs, *Acta Orthop Scand* 70 (1999). <https://doi.org/10.3109/17453679908997799>.
- [62] A. López, G. Mestres, M. Karlsson Ott, H. Engqvist, S.J. Ferguson, C. Persson, B. Helgason, Compressive mechanical properties and cytocompatibility of bone-compliant, linoleic acid-modified bone cement in a bovine model, *J Mech Behav Biomed Mater* 32 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2014.01.002>.
- [63] J. Rudigier, H. Scheuermann, B. Kotterbach, G. Ritter, Restmonomerabnahme und -Freisetzung aus Knochenzementen, *Unfallchirurgie* 7 (1981). <https://doi.org/10.1007/bf02589727>.
- [64] K. Wendal, H. Scheuermann, E. Weitzel, J. Rudigier, Pharmacokinetics of methylmethacrylate monomer during total hip replacement in man, *Archives of Orthopaedic and Traumatic Surgery* 107 (1988). <https://doi.org/10.1007/BF00451513>.
- [65] D. Granchi, S. Stea, G. Ciapetti, L. Savarino, D. Cavedagna, A. Pizzoferrato, In vitro effects of bone cements on the cell cycle of osteoblast-like cells, *Biomaterials* 16 (1995). [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(95\)93585-2](https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)93585-2).
- [66] S. Saha, S. Pal, Mechanical properties of bone cement: A review, *J Biomed Mater Res* 18 (1984). <https://doi.org/10.1002/jbm.820180411>.
- [67] K. Wu, Y.C. Chen, Y.M. Hsu, C.H. Chang, Enhancing drug release from antibiotic-loaded bone cement using porogens, *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 24 (2016). <https://doi.org/10.5435/JAAOS-D-15-00469>.
- [68] D.J.F. Moojen, B. Hentenaar, H. Charles Vogely, A.J. Verbout, R.M. Castelein, W.J.A. Dhert, In Vitro Release of Antibiotics from Commercial PMMA Beads and Articulating Hip Spacers, *Journal of Arthroplasty* 23 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.arth.2007.08.020>.
- [69] E. Bertazzoni Minelli, A. Benini, B. Magnan, P. Bartolozzi, Release of gentamicin and vancomycin from temporary human hip spacers in two-stage revision of infected arthroplasty, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53 (2004). <https://doi.org/10.1093/jac/dkh032>.
- [70] R. Ormsby, T. McNally, P. O'Hare, G. Burke, C. Mitchell, N. Dunne, Fatigue and biocompatibility properties of a poly(methyl methacrylate) bone cement with multi-walled carbon nanotubes, *Acta Biomater* 8 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.10.010>.
- [71] H. Tan, S. Guo, S. Yang, X. Xu, T. Tang, Physical characterization and osteogenic activity of the quaternized chitosan-loaded PMMA bone cement, *Acta Biomater* 8 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.03.013>.
- [72] R. Karpiński, J. Szabelski, P. Krakowski, M. Jojczuk, J. Jonak, A. Nogalski, Evaluation of the Effect of Selected Physiological Fluid Contaminants on the Mechanical Properties of Selected Medium-Viscosity PMMA Bone Cements, *Materials* 15 (2022). <https://doi.org/10.3390/ma15062197>.
- [73] I.-C. Chen, C.-Y. Su, W.-H. Nien, T.-T. Huang, C.-H. Huang, Y.-C. Lu, Y.-J. Chen, G.-C. Huang, H.-W. Fang, A. Sorrentino, Influence of Antibiotic-Loaded Acrylic Bone Cement Composition on Drug Release Behavior and Mechanism, (2021). <https://doi.org/10.3390/polym>.
- [74] S.M. Belkoff, J.C. Sanders, L.E. Jasper, The effect of the monomer-to-powder ratio on the material properties of acrylic bone cement, in: *J Biomed Mater Res*, 2002. <https://doi.org/10.1002/jbm.10258>.

- [75] R. Karpiński, J. Szabelski, J. Maksymiuk, Effect of Physiological Fluids Contamination on Selected Mechanical Properties of Acrylate Bone Cement, *Materials* 12 (2019). <https://doi.org/10.3390/ma12233963>.
- [76] M. Arora, E.K.S. Chan, S. Gupta, A.D. Diwan, Polymethylmethacrylate bone cements and additives: A review of the literature, *World J Orthop* 4 (2013). <https://doi.org/10.5312/wjo.v4.i2.67>.
- [77] M. Makita, K. Yamakado, A. Nakatsuka, H. Takaki, T. Inaba, F. Oshima, H. Katayama, K. Takeda, Effects of barium concentration on the radiopacity and biomechanics of bone cement: Experimental study, *Radiation Medicine - Medical Imaging and Radiation Oncology* 26 (2008). <https://doi.org/10.1007/s11604-008-0269-0>.
- [78] S.P. Boelch, K. Rueckl, C. Fuchs, M. Jordan, M. Knauer, A. Steinert, M. Rudert, M. Luedemann, Comparison of elution characteristics and compressive strength of biantibiotic-loaded PMMA bone cement for spacers: CopalD Spacem with Gentamicin and Vancomycin versus PalacosD R+G with Vancomycin, *Biomed Res Int* 2018 (2018). <https://doi.org/10.1155/2018/4323518>.
- [79] Y. He, J.P. Trotignon, B. Loty, A. Tcharkhtchi, J. Verdu, Effect of antibiotics on the properties of poly(methylmethacrylate)-based bone cement, *J Biomed Mater Res* 63 (2002). <https://doi.org/10.1002/jbm.10405>.
- [80] E.P. Lautenschlager, J.J. Jacobs, G.W. Marshall, P.R. Meyer, Mechanical properties of bone cements containing large doses of antibiotic powders, *J Biomed Mater Res* 10 (1976). <https://doi.org/10.1002/jbm.820100610>.
- [81] A. Lilikakis, M.P.F. Sutcliffe, The effect of vancomycin addition to the compression strength of antibiotic-loaded bone cements, *Int Orthop* 33 (2009). <https://doi.org/10.1007/s00264-008-0521-3>.
- [82] R. Gálvez-López, A. Peña-Monje, R. Antelo-Lorenzo, J. Guardia-Olmedo, J. Moliz, J. Hernández-Quero, J. Parra-Ruiz, Elution kinetics, antimicrobial activity, and mechanical properties of 11 different antibiotic loaded acrylic bone cement, *Diagn Microbiol Infect Dis* 78 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.09.014>.
- [83] E.L. Cyphert, G.D. Learn, S.K. Hurley, C. yi Lu, H.A. von Recum, An Additive to PMMA Bone Cement Enables Postimplantation Drug Refilling, Broadens Range of Compatible Antibiotics, and Prolongs Antimicrobial Therapy, *Adv Healthc Mater* 7 (2018). <https://doi.org/10.1002/adhm.201800812>.
- [84] Y.H. Chang, C.L. Tai, H.Y. Hsu, P.H. Hsieh, M.S. Lee, S.W.N. Ueng, Liquid antibiotics in bone cement: An effective way to improve the efficiency of antibiotic release in antibiotic loaded bone cement, *Bone Joint Res* 3 (2014). <https://doi.org/10.1302/2046-3758.38.2000305>.
- [85] P.H. Hsieh, C.L. Tai, P.C. Lee, Y.H. Chang, Liquid Gentamicin and Vancomycin in Bone Cement. A Potentially More Cost-Effective Regimen, *Journal of Arthroplasty* 24 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.arth.2008.01.131>.
- [86] J. Slane, J. Vivanco, W. Rose, H.L. Ploeg, M. Squire, Mechanical, material, and antimicrobial properties of acrylic bone cement impregnated with silver nanoparticles, *Materials Science and Engineering C* 48 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.11.068>.
- [87] T. Russo, A. Gloria, R. De Santis, U. D'Amora, G. Balato, A. Vollaro, O. Oliviero, G. Improta, M. Triassi, L. Ambrosio, Preliminary focus on the mechanical and antibacterial activity of a PMMA-based bone cement loaded with gold nanoparticles, *Bioact Mater* 2 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.002>.
- [88] C.I. Vallo, P.E. Montemartini, M.A. Fanovich, J.M. Porto López, T.R. Cuadrado, Polymethylmethacrylate-based bone cement modified with hydroxyapatite, *J Biomed Mater Res* 48 (1999). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(1999\)48:2<150::AID-JBM9>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(1999)48:2<150::AID-JBM9>3.0.CO;2-D).
- [89] M. Wekwejt, M. Michalska-Sionkowska, M. Bartmański, M. Nadolska, K. Łukowicz, A. Pałubicka, A.M. Osyczka, A. Zieliński, Influence of several biodegradable components added to pure and nanosilver-doped PMMA bone cements on its biological and mechanical properties, *Materials Science and Engineering C* 117 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111286>.
- [90] M.E.V. Zapata, J.H.M. Hernandez, C.D.G. Tovar, Acrylic bone cement incorporated with low chitosan loadings, *Polymers (Basel)* 12 (2020). <https://doi.org/10.3390/polym12071617>.

- [91] T. Qin, A. López, C. Öhman, H. Engqvist, C. Persson, W. Xia, Enhanced drug delivery of antibiotic-loaded acrylic bone cements using calcium phosphate spheres, *J Appl Biomater Funct Mater* 13 (2015). <https://doi.org/10.5301/jabfm.5000222>.
- [92] S.C. Shen, K. Letchmanan, P.S. Chow, R.B.H. Tan, Antibiotic elution and mechanical property of TiO₂ nanotubes functionalized PMMA-based bone cements, *J Mech Behav Biomed Mater* 91 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.11.020>.
- [93] M. Jasty, W.J. Maloney, C.R. Bragdon, D.O. O'Connor, T. Haire, W.H. Harris, The initiation of failure in cemented femoral components of hip arthroplasties, *Journal of Bone and Joint Surgery - Series B* 73 (1991). <https://doi.org/10.1302/0301-620x.73b4.2071634>.
- [94] E. Paz, F. Forriol, J.C. del Real, N. Dunne, Graphene oxide versus graphene for optimisation of PMMA bone cement for orthopaedic applications, *Materials Science and Engineering C* 77 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.269>.
- [95] Z.M. Wright, A.M. Pandit, M.M. Karpinsky, B.D. Holt, E.P. Zovinka, S.A. Sydlík, Bioactive, Ion-Releasing PMMA Bone Cement Filled with Functional Graphenic Materials, *Adv Healthc Mater* 10 (2021). <https://doi.org/10.1002/adhm.202001189>.
- [96] F. Pahlevanzadeh, H.R. Bakhsheshi-Rad, M. Kharaziha, M. Kasiri-Asgarani, M. Omid, M. Razzaghi, A.F. Ismail, S. Sharif, S. RamaKrishna, F. Berto, CNT and rGO reinforced PMMA based bone cement for fixation of load bearing implants: Mechanical property and biological response, *J Mech Behav Biomed Mater* 116 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2021.104320>.
- [97] S.K. Al-Janabi, M.H. Al-Maamori, A.J. Braihi, Experimental and Numerical Investigation of PMMA Based Composites used for Bone Cement Application, *IOP Conf Ser Mater Sci Eng* 1090 (2021). <https://doi.org/10.1088/1757-899x/1090/1/012082>.
- [98] D.A. Nussbaum, P. Gailloud, K. Murphy, The Chemistry of Acrylic Bone Cements and Implications for Clinical Use in Image-guided Therapy, *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 15 (2004). <https://doi.org/10.1097/01.RVI.0000109394.74740.56>.
- [99] B. Pascual, B. Vázquez, M. Gurruchaga, I. Goñi, M.P. Ginebra, F.J. Gil, J.A. Planell, B. Levenfeld, J. San Román, New aspects of the effect of size and size distribution on the setting parameters and mechanical properties of acrylic bone cements, *Biomaterials* 17 (1996). [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)82725-6](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)82725-6).
- [100] G. Lewis, M. Carroll, Rheological properties of acrylic bone cement during curing and the role of the size of the powder particles, *J Biomed Mater Res* 63 (2002). <https://doi.org/10.1002/jbm.10127>.
- [101] L. Chen, Y. Tang, K. Zhao, J. Liu, M. Jiao, H. Bai, Z. Wu, HEMA-Modified Expandable P(MMA-AA) Bone Cement with Dual Water Absorption Networks, *Macromol Mater Eng* 305 (2020). <https://doi.org/10.1002/mame.201900752>.
- [102] C. Elvira, B. Vazquez, J. San Román, B. Levenfeld, P. Ginebra, X. Gil, J.A. Planell, Acrylic bone cements incorporating polymeric active components derived from salicylic acid: Curing parameters and properties, *J Mater Sci Mater Med* 9 (1998). <https://doi.org/10.1023/A:1008974112525>.
- [103] J.M. Yang, Study of polymerization of acrylic bone cement: Effect of HEMA and EGDMA, *J Biomed Mater Res* 43 (1998). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199821\)43:1<54::AID-JBM6>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199821)43:1<54::AID-JBM6>3.0.CO;2-L).
- [104] F. Pahlevanzadeh, H.R. Bakhsheshi-Rad, M. Kasiri-Asgarani, R. Emadi, M. Omid, A.F. Ismail, M. Afrand, F. Berto, Mechanical property, antibacterial activity and cytocompatibility of a PMMA-based bone cement loaded with clindamycin for orthopaedic surgeries, *Materials Technology* 36 (2021). <https://doi.org/10.1080/10667857.2020.1780812>.
- [105] M. Wekwejt, N. Moritz, B. Świeczko-Żurek, A. Pałubicka, Biomechanical testing of bioactive bone cements – a comparison of the impact of modifiers: antibiotics and nanometals, *Polym Test* 70 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2018.07.014>.
- [106] M. Wekwejt, D. Etmańska, A. Halman, A. Pałubicka, B. Świeczko-Żurek, G. Gajowiec, Implant system for treatment of the orbital floor defects of blowout fractures in the maxillofacial region using polypropylene yarn and bioactive bone cement, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 108 (2020). <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34603>.

- [107] M. Wekwejt, S. Chen, B. Kaczmarek-Szczepańska, M. Nadolska, K. Łukowicz, A. Pałubicka, A. Michno, A.M. Osyczka, M. Michálek, A. Zieliński, Nanosilver-loaded PMMA bone cement doped with different bioactive glasses-evaluation of cytocompatibility, antibacterial activity, and mechanical properties, *Biomater Sci* 9 (2021). <https://doi.org/10.1039/d1bm00079a>.
- [108] L. Chen, Y. Tang, K. Zhao, X. Zha, J. Liu, H. Bai, Z. Wu, Fabrication of the antibiotic-releasing gelatin/PMMA bone cement, *Colloids Surf B Biointerfaces* 183 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110448>.
- [109] L. Chen, Y. Tang, K. Zhao, X. Zha, M. Wei, Q. Tan, Z. Wu, Sequential release of double drug (graded distribution) loaded gelatin microspheres/PMMA bone cement, *J Mater Chem B* 9 (2021). <https://doi.org/10.1039/d0tb01452d>.
- [110] A. Canul-Chuil, R. Vargas-Coronado, J. V. Cauich-Rodríguez, A. Martinez-Richa, E. Fernandez, S.N. Nazhat, Comparative study of bone cements prepared with either HA or α -TCP and functionalized methacrylates, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 64 (2003). <https://doi.org/10.1002/jbm.b.10486>.
- [111] Y.H. Nien, S.W. Lin, Y.N. Hsu, Preparation and characterization of acrylic bone cement with high drug release, *Materials Science and Engineering C* 33 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.11.032>.
- [112] E. Paz, Y. Ballesteros, J. Abenojar, N. Dunne, J.C. Del Real, Advanced g-mps-pmma bone cements: Influence of graphene silanisation on fatigue performance, thermal properties and biocompatibility, *Nanomaterials* 11 (2021). <https://doi.org/10.3390/nano11010139>.
- [113] G. Goncalves, S.M.A. Cruz, A. Ramalho, J. Grácio, P.A.A.P. Marques, Graphene oxide versus functionalized carbon nanotubes as a reinforcing agent in a PMMA/HA bone cement, *Nanoscale* 4 (2012). <https://doi.org/10.1039/c2nr30303e>.
- [114] E. Paz, Y. Ballesteros, F. Forriol, N.J. Dunne, J.C. del Real, Graphene and graphene oxide functionalisation with silanes for advanced dispersion and reinforcement of PMMA-based bone cements, *Materials Science and Engineering C* 104 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109946>.
- [115] Y.-H. Nien, The Application of Carbon Nanotube to Bone Cement, in: *Carbon Nanotubes - Polymer Nanocomposites*, 2011. <https://doi.org/10.5772/17259>.
- [116] H. Wang, T. Maeda, T. Miyazaki, Preparation of bioactive and antibacterial PMMA-based bone cement by modification with quaternary ammonium and alkoxysilane, *J Biomater Appl* 36 (2021). <https://doi.org/10.1177/08853282211004413>.
- [117] C. Robo, D. Wenner, S.J.K.A. Ubhayasekera, J. Hilborn, C. Öhman-Mägi, C. Persson, Functional properties of low-modulus pmma bone cements containing linoleic acid, *J Funct Biomater* 12 (2021). <https://doi.org/10.3390/jfb12010005>.
- [118] J. Martínez-Moreno, V. Merino, A. Nácher, J.L. Rodrigo, M. Climente, M. Merino-Sanjuán, Antibiotic-loaded Bone Cement as Prophylaxis in Total Joint Replacement, *Orthop Surg* 9 (2017). <https://doi.org/10.1111/os.12351>.
- [119] A. Robu, A. Antoniac, E. Grosu, E. Vasile, A.D. Raiciu, F. Iordache, V.I. Antoniac, J. V. Rau, V.G. Yankova, L.M. Ditu, V. Saceleanu, Additives imparting antimicrobial properties to acrylic bone cements, *Materials* 14 (2021). <https://doi.org/10.3390/ma14227031>.
- [120] L.M. Alonso, I.F. Torres, Á.M.Z. Tamayo, O.E.L. Lozano, I.D. Ramos, J.Á.D. García-Menocal, N. Rios-Donato, E. Mendizábal, Antibacterial effect of acrylic bone cements loaded with drugs of different action's mechanism, *J Infect Dev Ctries* 13 (2019). <https://doi.org/10.3855/jidc.10716>.
- [121] A.A. Althubayani, S. Canto, H. Pham, D.J. Holger, J. Rey, Antibiotic-induced neuropsychiatric toxicity: epidemiology, mechanisms and management strategies - a narrative literature review, *Drugs Context* 13 (2024). <https://doi.org/10.7573/dic.2024-3-3>.
- [122] D. Regis, A. Sandri, E. Samaila, A. Benini, M. Bondi, B. Magnan, Release of gentamicin and vancomycin from preformed spacers in infected total hip arthroplasties: Measurement of concentrations and inhibitory activity in patients' drainage fluids and serum, *The Scientific World Journal* 2013 (2013). <https://doi.org/10.1155/2013/752184>.
- [123] C.R. Arciola, D. Campoccia, L. Montanaro, Effects on antibiotic resistance of *Staphylococcus epidermidis* following adhesion to polymethylmethacrylate and to silicone surfaces, *Biomaterials* 23 (2002). [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00275-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00275-7).

- [124] T.N. Joseph, A.L. Chen, P.E. Di Cesare, Use of antibiotic-impregnated cement in total joint arthroplasty., *J Am Acad Orthop Surg* 11 (2003). <https://doi.org/10.5435/00124635-200301000-00006>.
- [125] B. Thornes, P. Murray, D. Bouchier-Hayes, Development of resistant strains of *Staphylococcus epidermidis* on gentamicin-loaded bone cement in vivo, *Journal of Bone and Joint Surgery - Series B* 84 (2002). <https://doi.org/10.1302/0301-620X.84B5.11907>.
- [126] J.M. Blondeau, New concepts in antimicrobial susceptibility testing: The mutant prevention concentration and mutant selection window approach, *Vet Dermatol* 20 (2009). <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00856.x>.
- [127] S. Li, E.S. Starkey, What do i need to know about glycopeptide antibiotics?, *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 101 (2016). <https://doi.org/10.1136/archdischild-2015-309270>.
- [128] J.G.E. Hendriks, J.R. Van Horn, H.C. Van Der Mei, H.J. Busscher, Backgrounds of antibiotic-loaded bone cement and prosthesis-related infection, *Biomaterials* 25 (2004). [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00554-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00554-4).
- [129] A. V. Carli, A.S. Sethuraman, S.J. Bhimani, F.P. Ross, M.P.G. Bostrom, Selected Heat-Sensitive Antibiotics Are Not Inactivated During Polymethylmethacrylate Curing and Can Be Used in Cement Spacers for Periprosthetic Joint Infection, *Journal of Arthroplasty* 33 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.arth.2018.01.034>.
- [130] E.M. Schwarz, A.C. McLaren, T.P. Sculco, B. Brause, M. Bostrom, S.L. Kates, J. Parvizi, V. Alt, W. V. Arnold, A. Carli, A.F. Chen, H. Choe, D.C. Coraça-Huber, M. Cross, M. Ghert, N. Hickok, J.A. Jennings, M. Joshi, W.J. Metsemakers, M. Ninomiya, K. Nishitani, I. Oh, D. Padgett, B. Ricciardi, K. Saeed, P. Sendi, B. Springer, P. Stoodley, J.C. Wenke, Adjuvant antibiotic-loaded bone cement: Concerns with current use and research to make it work, *Journal of Orthopaedic Research* 39 (2021) 227–239. <https://doi.org/10.1002/jor.24616>.
- [131] A. Bistolfi, G. Massazza, E. Verné, A. Massè, D. Deledda, S. Ferraris, M. Miola, F. Galetto, M. Crova, Antibiotic-Loaded Cement in Orthopedic Surgery: A Review, *ISRN Orthop* 2011 (2011). <https://doi.org/10.5402/2011/290851>.
- [132] S. Torrado, P. Frutos, G. Frutos, Gentamicin bone cements: Characterisation and release (in vitro and in vivo assays), *Int J Pharm* 217 (2001). [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00587-7](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00587-7).
- [133] H. Van De Belt, D. Neut, D.R.A. Uges, W. Schenk, J.R. Van Horn, H.C. Van Der Mei, H.J. Busscher, Surface roughness, porosity and wettability of gentamicin-loaded bone cements and their antibiotic release, *Biomaterials* 21 (2000). [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00082-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00082-X).
- [134] H. Van de Belt, D. Neut, W. Schenk, J.R. Van Horn, H.C. Van der Mei, H.J. Busscher, Gentamicin release from polymethylmethacrylate bone cements and *Staphylococcus aureus* biofilm formation, *Acta Orthop Scand* 71 (2000). <https://doi.org/10.1080/000164700317362280>.
- [135] R.W. Kendall, C.P. Duncan, J.A. Smith, J.H. Ngui-Yen, Persistence of bacteria on antibiotic loaded acrylic depots: A reason for caution, *Clin Orthop Relat Res* 329 (1996). <https://doi.org/10.1097/00003086-199608000-00034>.
- [136] C.P. Scott, P.A. Higham, Antibiotic Bone Cement for the Treatment of *Pseudomonas Aeruginosa* in Joint Arthroplasty: Comparison of Tobramycin and Gentamicin-Loaded Cements, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 64 (2003). <https://doi.org/10.1002/jbm.b.10515>.
- [137] H. Van de Belt, D. Neut, W. Schenk, J.R. Van Horn, H.C. Van der Mei, H.J. Busscher, Infection of orthopedic implants and the use of antibiotic-loaded bone cements, *Acta Orthop Scand* 72 (2001). <https://doi.org/10.1080/000164701317268978>.
- [138] M. Chohfi, F. Langlais, J. Fourastier, J. Minet, H. Thomazeau, M. Cormier, Pharmacokinetics, uses, and limitations of vancomycin-loaded bone cement, *Int Orthop* 22 (1998). <https://doi.org/10.1007/s002640050235>.
- [139] E. Bertazzoni Minelli, C. Caveiari, A. Benini, Release of antibiotics from polymethylmethacrylate cement, *Journal of Chemotherapy* 14 (2002). <https://doi.org/10.1179/joc.2002.14.5.492>.
- [140] C.R. Rathbone, J.D. Cross, K. V. Brown, C.K. Murray, J.C. Wenke, Effect of various concentrations of antibiotics on osteogenic cell viability and activity, *Journal of Orthopaedic Research* 29 (2011). <https://doi.org/10.1002/jor.21343>.

- [141] B.A. Masri, C.P. Duncan, C.P. Beauchamp, Long-term elution of antibiotics from bone-cement: An in vivo study using the prosthesis of antibiotic-loaded acrylic cement (PROSTALAC) system, *Journal of Arthroplasty* 13 (1998). [https://doi.org/10.1016/S0883-5403\(98\)90179-6](https://doi.org/10.1016/S0883-5403(98)90179-6).
- [142] C.P. Scott, P.A. Higham, J.H. Dumbleton, Effectiveness of bone cement containing tobramycin in an vitro susceptibility study of 99 organisms found in infected joint arthroplasty, *J Bone Joint Surg [Br]* 81 (1999).
- [143] A. González Della Valle, M. Bostrom, B. Brause, C. Harney, E.A. Salvati, Effective bactericidal activity of tobramycin and vancomycin eluted from acrylic bone cement, *Acta Orthop Scand* 72 (2001). <https://doi.org/10.1080/00016470152846547>.
- [144] P.M.S. Simpson, G.F. Dall, S.J. Breusch, C. Heisel, [In vitro elution and mechanical properties of antibiotic-loaded SmartSet HV and Palacos R acrylic bone cements]., *Orthopade* 34 (2005).
- [145] G. Lewis, S. Janna, Estimation of the optimum loading of an antibiotic powder in an acrylic bone cement: Gentamicin sulfate in SmartSet HV, *Acta Orthop* 77 (2006). <https://doi.org/10.1080/17453670610012700>.
- [146] G.T. Ensing, J.R. Van Horn, H.C. Van Der Mei, H.J. Busscher, D. Neut, Copal bone cement is more effective in preventing biofilm formation than Palacos R-G, *Clin Orthop Relat Res* 466 (2008). <https://doi.org/10.1007/s11999-008-0203-x>.
- [147] A. Cara, M. Ballet, C. Hemery, T. Ferry, F. Laurent, J. Josse, Antibiotics in Bone Cements Used for Prosthesis Fixation: An Efficient Way to Prevent *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Prosthetic Joint Infection, *Front Med (Lausanne)* 7 (2021). <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.576231>.
- [148] V. Alt, T. Bechert, P. Steinrücke, M. Wagener, P. Seidel, E. Dingeldein, E. Domann, R. Schnettler, An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement, *Biomaterials* 25 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.078>.
- [149] A. Kumar, S. Kargozar, F. Baino, S.S. Han, Additive Manufacturing Methods for Producing Hydroxyapatite and Hydroxyapatite-Based Composite Scaffolds: A Review, *Front Mater* 6 (2019). <https://doi.org/10.3389/fmats.2019.00313>.
- [150] A.H. Phakatkar, M.R. Shirdar, M. Li Qi, M.M. Taheri, S. Narayanan, T. Foroozan, S. Sharifi-Asl, Z. Huang, M. Agrawal, Y. peng Lu, R. Shahbazian-Yassar, T. Shokuhfar, Novel PMMA bone cement nanocomposites containing magnesium phosphate nanosheets and hydroxyapatite nanofibers, *Materials Science and Engineering C* 109 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110497>.
- [151] T. Russo, R. de Santis, A. Gloria, K. Barbaro, A. Altigeri, I. V. Fadeeva, J. V. Rau, Modification of PMMA cements for cranioplasty with bioactive glass and copper doped tricalcium phosphate particles, *Polymers (Basel)* 12 (2020). <https://doi.org/10.3390/polym12010037>.
- [152] M.E.V. Zapata, C.D.G. Tovar, J.H.M. Hernandez, The role of chitosan and graphene oxide in bioactive and antibacterial properties of acrylic bone cements, *Biomolecules* 10 (2020). <https://doi.org/10.3390/biom10121616>.
- [153] M.E.V. Zapata, J.H.M. Hernandez, C.D.G. Tovar, C.H.V. Llano, J.A.D. Escobar, B. Vázquez-Lasa, J.S. Román, L. Rojo, Novel bioactive and antibacterial acrylic bone cement nanocomposites modified with graphene oxide and chitosan, *Int J Mol Sci* 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20122938>.
- [154] M.E.V. Zapata, L.M.R. Rojas, J.H.M. Hernández, J. Delgado-Ospina, C.D.G. Tovar, Acrylic bone cements modified with graphene oxide: Mechanical, physical, and antibacterial properties, *Polymers (Basel)* 12 (2020). <https://doi.org/10.3390/polym12081773>.
- [155] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, Biological effects of essential oils - A review, *Food and Chemical Toxicology* 46 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>.
- [156] A. El Asbahani, K. Miladi, W. Badri, M. Sala, E.H.A. Addi, H. Casabianca, A. El Mousadik, D. Hartmann, A. Jilale, F.N.R. Renaud, A. Elaissari, Essential oils: From extraction to encapsulation, *Int J Pharm* 483 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>.
- [157] W. Zhu, F. Liu, B. Yu, J. He, Preparation of antibacterial acrylic bone cement with methacrylate derived from benzothiazole, *J Mech Behav Biomed Mater* 117 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2021.104403>.

- [158] S. Deb, R. Doiron, L. DiSilvio, S. Punyani, H. Singh, PMMA bone cement containing a quaternary amine comonomer with potential antibacterial properties, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 85 (2008). <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30925>.
- [159] J.D. Oei, W.W. Zhao, L. Chu, M.N. Desilva, A. Ghimire, H.R. Rawls, K. Whang, Antimicrobial acrylic materials with in situ generated silver nanoparticles, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 100 B (2012). <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31963>.
- [160] P. Prokopovich, M. Köbrick, E. Brousseau, S. Perni, Potent antimicrobial activity of bone cement encapsulating silver nanoparticles capped with oleic acid, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 103 (2015). <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33196>.
- [161] F. Liu, X. Cheng, L. Xiao, Q. Wang, K. Yan, Z. Su, L. Wang, C. Ma, Y. Wang, Inside-outside Ag nanoparticles-loaded polylactic acid electrospun fiber for long-term antibacterial and bone regeneration, *Int J Biol Macromol* 167 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.088>.
- [162] H. Elsherif, S. Saniour, I. Motawea, H. Essawy, M. Abd El-Gany, D. Zaki, Preparation, Characterization and Evaluation of a Poly Methyl Methacrylate Bone Cement Modified by Montmorillonite Loaded with Silver Nano Particles, *Al-Azhar Dental Journal for Girls* 9 (2022). <https://doi.org/10.21608/adjg.2022.76299.1391>.
- [163] B. Świeczko-Żurek, A. Zieliński, D. Bociąga, K. Rosińska, G. Gajowiec, Influence of Different Nanometals Implemented in PMMA Bone Cement on Biological and Mechanical Properties, *Nanomaterials* 12 (2022). <https://doi.org/10.3390/nano12050732>.
- [164] S. Bauer, P. Schmuki, K. von der Mark, J. Park, Engineering biocompatible implant surfaces: Part I: Materials and surfaces, *Prog Mater Sci* 58 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2012.09.001>.
- [165] L. Pauksch, S. Hartmann, G. Szalay, V. Alt, K.S. Lips, In vitro assessment of nanosilver-functionalized PMMA bone cement on primary human mesenchymal stem cells and osteoblasts, *PLoS One* 9 (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114740>.
- [166] X. Zhou, L. Zhao, J. Luo, H. Tang, M. Xu, Y. Wang, X. Yang, H. Chen, Y. Li, G. Ye, F. Shi, C. Lv, B. Jing, The toxic effects and mechanisms of Nano-Cu on the spleen of rats, *Int J Mol Sci* 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20061469>.
- [167] Z. Chen, H. Meng, G. Xing, C. Chen, Y. Zhao, G. Jia, T. Wang, H. Yuan, C. Ye, F. Zhao, Z. Chai, C. Zhu, X. Fang, B. Ma, L. Wan, Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo, *Toxicol Lett* 163 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.10.003>.
- [168] B.M. Hidalgo-Robatto, M. López-Álvarez, A.S. Azevedo, J. Dorado, J. Serra, N.F. Azevedo, P. González, Pulsed laser deposition of copper and zinc doped hydroxyapatite coatings for biomedical applications, *Surf Coat Technol* 333 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2017.11.006>.
- [169] L.R. Jaidev, S. Kumar, K. Chatterjee, Multi-biofunctional polymer graphene composite for bone tissue regeneration that elutes copper ions to impart angiogenic, osteogenic and bactericidal properties, *Colloids Surf B Biointerfaces* 159 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.07.083>.
- [170] N. Kasiri, M. Fathi, Entrapment of peppermint oil using cellulose nanocrystals, *Cellulose* 25 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1574-5>.
- [171] S.M. Ali, A.A. Khan, I. Ahmed, M. Musaddiq, K.S. Ahmed, H. Polasa, L.V. Rao, C.M. Habibullah, L.A. Sechi, N. Ahmed, Antimicrobial activities of Eugenol and Cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*, *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 4 (2005). <https://doi.org/10.1186/1476-0711-4-20>.
- [172] I. Al-Sharif, A. Remmal, A. Aboussekhra, Eugenol triggers apoptosis in breast cancer cells through E2F1/survivin down-regulation, *BMC Cancer* 13 (2013). <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-600>.
- [173] D.K. Kuechle, G.C. Landon, D.M. Musher, P.C. Noble, Elution of vancomycin, daptomycin, and amikacin from acrylic bone cement, *Clin Orthop Relat Res* 264 (1991). <https://doi.org/10.1097/00003086-199103000-00038>.
- [174] A.S. Baker, L.W. Greenham, Release of gentamicin from acrylic bone cement. Elution and diffusion studies, *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A* 70 (1988). <https://doi.org/10.2106/00004623-198870100-00015>.

- [175] S. Downes, Methods for improving drug release from poly(ethyl)methacrylate bone cement, *Clin Mater* 7 (1991). [https://doi.org/10.1016/0267-6605\(91\)90063-L](https://doi.org/10.1016/0267-6605(91)90063-L).
- [176] M.R. Virto, P. Frutos, S. Torrado, G. Frutos, Gentamicin release from modified acrylic bone cements with lactose and hydroxypropylmethylcellulose, *Biomaterials* 24 (2003). [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00254-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00254-5).
- [177] L. Bao, X. Li, Y. Qi, Z. Wang, J. Li, PEG/SBA-15-containing acrylic bone cement with enhanced drug release, *Chem Eng Sci* 215 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ces.2019.115379>.
- [178] W. Wei, E. Abdullayev, A. Hollister, D. Mills, Y.M. Lvov, Clay nanotube/poly(methyl methacrylate) bone cement composites with sustained antibiotic release, *Macromol Mater Eng* 297 (2012). <https://doi.org/10.1002/mame.201100309>.
- [179] W.N. Ayre, J.C. Birchall, S.L. Evans, S.P. Denyer, A novel liposomal drug delivery system for PMMA bone cements, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 104 (2016). <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33488>.
- [180] Y. Al Thaher, R. Khalil, S. Abdelghany, M.S. Salem, Antimicrobial PMMA Bone Cement Containing Long Releasing Multi-Walled Carbon Nanotubes, *Nanomaterials* 12 (2022). <https://doi.org/10.3390/NANO12081381>.
- [181] K. Matyjaszewski, S.G. Gaynor, Free Radical Polymerization, n.d.
- [182] Przesławski Grzegorz, Wpływ (met)akrylanów na przebieg polimeryzacji tiol-en w rozpuszczalniku, n.d.
- [183] Nowak Aleksandra, Kleje kostne na bazie (met)akrylanów, Politechnika Poznańska, 2021.
- [184] M. Uygun, M.A. Tasdelen, Y. Yagci, Influence of type of initiation on thiol-ene “click” Chemistry, *Macromol Chem Phys* 211 (2010). <https://doi.org/10.1002/macp.200900442>.
- [185] H.R. Seyyed Hosseinzadeh, M. Emami, F. Lahiji, A. Sina, A. Masoudi, S. Emami, The Acrylic Bone Cement in Arthroplasty, in: *Arthroplasty - Update*, 2013. <https://doi.org/10.5772/53252>.
- [186] G. Moad, Radical Polymerization, in: *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, Elsevier, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.01346-1>.
- [187] G. Odian, Principles of Polymerization, 2004. <https://doi.org/10.1002/047147875x>.
- [188] K. Tsuda, S. Kondo, K. Yamashita, K. Ito, Initiation mechanism of free-radical polymerization of methyl methacrylate by p-substituted N,N-dimethylanilines, *Macromol Chem Phys* 185 (1984) 81–89. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:97929751>.
- [189] T. Ishida, S. Kondo, K. Tsuda, Free-radical polymerization of methyl methacrylate initiated by N,N-dimethylaniline, *Macromol Chem Phys* 178 (1977) 3221–3228.
- [190] L.G. Lovell, J.W. Stansbury, D.C. Sympes, C.N. Bowman, Effects of composition and reactivity on the reaction kinetics of dimethacrylate/dimethacrylate copolymerizations, *Macromolecules* 32 (1999). <https://doi.org/10.1021/ma990258d>.
- [191] K.S. Anseth, C.M. Wang, C.N. Bowman, Kinetic Evidence of Reaction Diffusion during the Polymerization of Multi(meth)acrylate Monomers, *Macromolecules* 27 (1994). <https://doi.org/10.1021/ma00081a004>.
- [192] I. Ydens, P. Degée, D.M. Haddleton, P. Dubois, Reactivity ratios in conventional and nickel-mediated radical copolymerization of methyl methacrylate and functionalized methacrylate monomers, *Eur Polym J* 41 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2005.04.012>.
- [193] M. Buback, C.H. Kurz, Free-radical propagation rate coefficients for cyclohexyl methacrylate, glycidyl methacrylate and 2-hydroxyethyl methacrylate homopolymerizations, *Macromol Chem Phys* 199 (1998). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3935\(19981001\)199:10<2301::AID-MACP2301>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3935(19981001)199:10<2301::AID-MACP2301>3.0.CO;2-V).
- [194] A. Borzacchiello, L. Ambrosio, L. Nicolais, E.J. Harper, K.E. Tanner, W. Bonfield, Comparison between the polymerization behavior of a new bone cement and a commercial one: Modeling and in vitro analysis, *J Mater Sci Mater Med* 9 (1998). <https://doi.org/10.1023/A:1008996112042>.
- [195] A.B. Scranton, C.N. Bowman, J. Klier, N.A. Peppas, Polymerization reaction dynamics of ethylene glycol methacrylates and dimethacrylates by calorimetry, *Polymer (Guildf)* 33 (1992). [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(92\)91067-C](https://doi.org/10.1016/0032-3861(92)91067-C).

- [196] C.N. Bowman, N.A. Peppas, Coupling of Kinetics and Volume Relaxation during Polymerizations of Multiacrylates and Multimethacrylates, *Macromolecules* 24 (1991). <https://doi.org/10.1021/ma00008a032>.
- [197] W.D. Cook, Thermal aspects of the kinetics of dimethacrylate photopolymerization, *Polymer (Guildf)* 33 (1992). [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(92\)90882-W](https://doi.org/10.1016/0032-3861(92)90882-W).
- [198] O. Okay, H.J. Naghash, I. Capek, Free-radical crosslinking copolymerization: Effect of cyclization on diffusion-controlled termination at low conversion, *Polymer (Guildf)* 36 (1995). [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(95\)97342-D](https://doi.org/10.1016/0032-3861(95)97342-D).
- [199] M.A. Puska, T.O. Närhi, A.J. Aho, A. Yli-Urpo, P.K. Vallittu, Flexural properties of crosslinked and oligomer-modified glass-fibre reinforced acrylic bone cement, *J Mater Sci Mater Med* 15 (2004). <https://doi.org/10.1023/B:JMSM.0000042690.93328.e5>.
- [200] C. Hepburn, Interpenetrating polymer networks. Edited by D. Klemperer, L. H. Sperling and L. A. Utracki. ACS advances in chemistry series 239. American Chemical Society, Washington, 1993. pp. xvi + 638, price US\$139.95. ISBN 0-8412-2528-1, *Polym Int* 37 (1995). <https://doi.org/10.1002/pi.1995.210370412>.
- [201] N. Zoratto, P. Matricardi, Semi-IPNs and IPN-based hydrogels, in: *Polymeric Gels*, 2018. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102179-8.00004-1>.
- [202] Y.S. Lipatov, T.T. Alekseeva, Phase-separated interpenetrating polymer networks, *Advances in Polymer Science* 208 (2007). https://doi.org/10.1007/12_2007_116.
- [203] Aji.P. Mathew, Interpenetrating Polymer Networks: Processing, Properties and Applications, in: 2013. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20925-3_10.
- [204] P. Matricardi, C. Di Meo, T. Coviello, W.E. Hennink, F. Alhaique, Interpenetrating polymer networks polysaccharide hydrogels for drug delivery and tissue engineering, *Adv Drug Deliv Rev* 65 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.04.002>.
- [205] Szcześniak Katarzyna, Polimery gwiazdowe jako modelowe nanotransportery leków i kwasów nukleinowych: synteza, struktura i dynamika kationowych polimerów gwiazdowych na bazie poli(glikolu etylenowego), 2015. <http://hdl.handle.net/10593/12737> (accessed February 9, 2024).
- [206] Handbook of radical polymerization, *Choice Reviews Online* 40 (2003). <https://doi.org/10.5860/choice.40-3410>.
- [207] P. Kryś, K. Matyjaszewski, Kinetics of Atom Transfer Radical Polymerization, *Eur Polym J* 89 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.02.034>.
- [208] W.A. Braunecker, K. Matyjaszewski, Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives, *Progress in Polymer Science (Oxford)* 32 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.11.002>.
- [209] V. Coessens, T. Pintauer, K. Matyjaszewski, Functional polymers by atom transfer radical polymerization, *Progress in Polymer Science (Oxford)* 26 (2001). [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(01\)00003-X](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00003-X).
- [210] A. Goto, T. Fukuda, Kinetics of living radical polymerization, *Progress in Polymer Science (Oxford)* 29 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2004.01.002>.
- [211] K. Matyjaszewski, J. Xia, Atom transfer radical polymerization, *Chem Rev* 101 (2001). <https://doi.org/10.1021/cr940534g>.
- [212] A.K. Nanda, S.C. Hong, K. Matyjaszewski, Concurrent initiation by air in the atom transfer radical polymerization of methyl methacrylate, *Macromol Chem Phys* 204 (2003). <https://doi.org/10.1002/macp.200390088>.
- [213] J. Xia, K. Matyjaszewski, Controlled/"living" radical polymerization. Homogeneous reverse atom transfer radical polymerization using AIBN as the initiator, *Macromolecules* 30 (1997). <https://doi.org/10.1021/ma9710085>.
- [214] J. Xia, K. Matyjaszewski, HOmogeneous Reverse Atom Transfer Radical Polymerization of Styrene Initiated by Peroxides, *Macromolecules* 32 (1999). <https://doi.org/10.1021/ma990036f>.

- [215] K. Matyjaszewski, K. Davis, T.E. Patten, M. Wei, Observation and analysis of a slow termination process in the atom transfer radical polymerization of styrene, *Tetrahedron* 53 (1997). [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(97\)00965-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(97)00965-4).
- [216] J.F. Lutz, K. Matyjaszewski, Kinetic modeling of the chain-end functionality in atom transfer radical polymerization, *Macromol Chem Phys* 203 (2002). [https://doi.org/10.1002/1521-3935\(200207\)203:10/11<1385::AID-MACP1385>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1521-3935(200207)203:10/11<1385::AID-MACP1385>3.0.CO;2-X).
- [217] Y. Koda, T. Terashima, M. Sawamoto, Fluorous microgel star polymers: Selective recognition and separation of polyfluorinated surfactants and compounds in water, *J Am Chem Soc* 136 (2014). <https://doi.org/10.1021/ja508818j>.
- [218] D. Kuckling, A. Wycisk, Stimuli-responsive star polymers, *J Polym Sci A Polym Chem* 51 (2013). <https://doi.org/10.1002/pola.26696>.
- [219] G. Lapienis, Star-shaped polymers having PEO arms, *Progress in Polymer Science (Oxford)* 34 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.04.006>.
- [220] W. Wu, W. Wang, J. Li, Star polymers: Advances in biomedical applications, *Prog Polym Sci* 46 (2015) 55–85. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.02.002>.
- [221] J. Roovers, Concentration Dependence of the Relative Viscosity of Star Polymers, *Macromolecules* 27 (1994). <https://doi.org/10.1021/ma00097a015>.
- [222] D.S. Pearson, E. Helfand, Viscoelastic Properties of Star-Shaped Polymers, *Macromolecules* 17 (1984). <https://doi.org/10.1021/ma00134a060>.
- [223] X. Yang, H. Shang, C. Ding, J. Li, Recent developments and applications of bioinspired dendritic polymers, *Polym Chem* 6 (2015). <https://doi.org/10.1039/c4py01537a>.
- [224] K. Inoue, Functional dendrimers, hyperbranched and star polymers, *Progress in Polymer Science (Oxford)* 25 (2000). [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(00\)00011-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(00)00011-3).
- [225] A. Hirao, M. Hayashi, S. Loykulnant, K. Sugiyama, S.W. Ryu, N. Haraguchi, A. Matsuo, T. Higashihara, Precise syntheses of chain-multi-functionalized polymers, star-branched polymers, star-linear block polymers, densely branched polymers, and dendritic branched polymers based on iterative approach using functionalized 1,1-diphenylethylene derivatives, *Progress in Polymer Science (Oxford)* 30 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2004.12.002>.
- [226] L. Mei, Y. Jiang, S.S. Feng, Star-shaped block polymers as a molecular biomaterial for nanomedicine development, *Nanomedicine* 9 (2014). <https://doi.org/10.2217/nnm.13.180>.
- [227] T. Higashihara, M. Hayashi, A. Hirao, Synthesis of well-defined star-branched polymers by stepwise iterative methodology using living anionic polymerization, *Progress in Polymer Science (Oxford)* 36 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.08.001>.
- [228] K. Khanna, S. Varshney, A. Kakkar, Miktoarm star polymers: Advances in synthesis, self-assembly, and applications, *Polym Chem* 1 (2010). <https://doi.org/10.1039/c0py00082e>.
- [229] H. Gao, K. Min, K. Matyjaszewski, Synthesis of 3-arm star block copolymers by combination of “core-first” and “coupling-onto” methods using ATRP and click reactions, in: *Macromol Chem Phys*, 2007. <https://doi.org/10.1002/macp.200600616>.
- [230] H. Gao, K. Matyjaszewski, High-yield synthesis of uniform star polymers - Is controlled radical polymerization always needed?, *Chemistry - A European Journal* 15 (2009). <https://doi.org/10.1002/chem.200900680>.
- [231] P. Liu, E. Landry, Z. Ye, H. Joly, W.J. Wang, B.G. Li, “Arm-first” synthesis of core-cross-linked multiarm star polyethylenes by coupling palladium-catalyzed ethylene “living” polymerization with atom-transfer radical polymerization, *Macromolecules* 44 (2011). <https://doi.org/10.1021/ma2003954>.
- [232] K. Matyjaszewski, N. V. Tsarevsky, Nanostructured functional materials prepared by atom transfer radical polymerization, *Nat Chem* 1 (2009). <https://doi.org/10.1038/nchem.257>.
- [233] W. Cao, L. Zhu, Synthesis and unimolecular micelles of amphiphilic dendrimer-like star polymer with various functional surface groups, *Macromolecules* 44 (2011). <https://doi.org/10.1021/ma1021242>.

- [234] J.T. Wiltshire, G.G. Qiao, Synthesis of core cross-linked star polymers with adjustable coronal properties, *Macromolecules* 41 (2008). <https://doi.org/10.1021/ma071651j>.
- [235] K. Takamizu, K. Nomura, Synthesis of oligo(thiophene)-coated star-shaped ROMP polymers: Unique emission properties by the precise integration of functionality, *J Am Chem Soc* 134 (2012). <https://doi.org/10.1021/ja301526v>.
- [236] H.Y. Cho, H. Gao, A. Srinivasan, J. Hong, S.A. Bencherif, D.J. Siegwart, H.J. Paik, J.O. Hollinger, K. Matyjaszewski, Rapid cellular internalization of multifunctional star polymers prepared by atom transfer radical polymerization, *Biomacromolecules* 11 (2010). <https://doi.org/10.1021/bm1006272>.
- [237] S.A. Bencherif, H. Gao, A. Srinivasan, D.J. Siegwart, J.O. Hollinger, N.R. Washburn, K. Matyjaszewski, Cell-adhesive star polymers prepared by ATRP, *Biomacromolecules* 10 (2009). <https://doi.org/10.1021/bm900213u>.
- [238] J. Heuts, J. Salber, A.M. Goldyn, R. Janser, M. Möller, D. Klee, Bio-functionalized star PEG-coated PVDF surfaces for cytocompatibility- improved implant components, *J Biomed Mater Res A* 92 (2010). <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32478>.
- [239] Y. Weng, L. Howard, V.J. Chong, J. Sun, R.L. Gregory, D. Xie, A novel furanone-modified antibacterial dental glass ionomer cement, *Acta Biomater* 8 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.04.038>.
- [240] Y. Weng, X. Guo, J. Zhao, R.L. Gregory, D. Xie, A PQAS-containing glass-ionomer cement for improved antibacterial function, *J Biomed Sci Eng* 03 (2010). <https://doi.org/10.4236/jbise.2010.310126>.
- [241] Y. Weng, X. Guo, R. Gregory, D. Xie, A novel antibacterial dental glass-ionomer cement, *Eur J Oral Sci* 118 (2010). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2010.00770.x>.
- [242] L. Wang, Y.W. Yang, M. Zhu, G. Qiu, G. Wu, H. Gao, β -Cyclodextrin-conjugated amino poly(glycerol methacrylate)s for efficient insulin delivery, *RSC Adv* 4 (2014). <https://doi.org/10.1039/c3ra47150k>.
- [243] W. Gu, Y. Ma, C. Zhu, B. Chen, J. Ma, H. Gao, Synthesis of cross-linked carboxyl poly(glycerol methacrylate) and its application for the controlled release of doxorubicin, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 47 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.07.009>.
- [244] Y. Pu, L. Zhang, H. Zheng, B. He, Z. Gu, Synthesis and drug release of star-shaped poly(benzyl L-aspartate)-block- poly(ethylene glycol) copolymers with POSS cores, *Macromol Biosci* 14 (2014). <https://doi.org/10.1002/mabi.201300270>.
- [245] H.J. Lim, H. Lee, K.H. Kim, J. Huh, C.H. Ahn, J.W. Kim, Effect of molecular architecture on micellization, drug loading and releasing of multi-armed poly(ethylene glycol)-b-poly(ϵ -caprolactone) star polymers, *Colloid Polym Sci* 291 (2013). <https://doi.org/10.1007/s00396-013-2916-y>.
- [246] J. Li, S. Xu, J. Zheng, Y. Pan, J. Wang, L. Zhang, X. He, D. Liu, Polypeptide-based star-block quadripolymers as unimolecular nanocarriers for the simultaneous encapsulation of hydrophobic and hydrophilic guests, *Eur Polym J* 48 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.07.009>.
- [247] V.Y. Lee, K. Havenstrite, M. Tjio, M. McNeil, H.M. Blau, R.D. Miller, J. Sly, Nanogel star polymer architectures: A nanoparticle platform for modular programmable macromolecular self-assembly, intercellular transport, and dual-mode cargo delivery, *Advanced Materials* 23 (2011). <https://doi.org/10.1002/adma.201102371>.
- [248] H. Wei, X. Zhang, C. Cheng, S.X. Cheng, R.X. Zhuo, Self-assembled, thermosensitive micelles of a star block copolymer based on PMMA and PNIPAAm for controlled drug delivery, *Biomaterials* 28 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.08.030>.
- [249] H. Wei, X.Z. Zhang, W.Q. Chen, S.X. Cheng, R.X. Zhuo, Self-assembled thermosensitive micelles based on poly(L-lactide-star block-N-isopropylacrylamide) for drug delivery, *J Biomed Mater Res A* 83 (2007). <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31295>.
- [250] H. Chen, G. Li, H. Chi, D. Wang, C. Tu, L. Pan, L. Zhu, F. Qiu, F. Guo, X. Zhu, Alendronate-conjugated amphiphilic hyperbranched polymer based on boltorn H40 and poly(ethylene glycol) for bone-targeted drug delivery, *Bioconjug Chem* 23 (2012). <https://doi.org/10.1021/bc3003088>.
- [251] T. Etrych, L. Kovář, J. Strohalm, P. Chytil, B. Říhová, K. Ulbrich, Biodegradable star HPMA polymer-drug conjugates: Biodegradability, distribution and anti-tumor efficacy, *Journal of Controlled Release* 154 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.06.015>.

- [252] T. Etrych, J. Strohalm, P. Chytil, B. Řhov, K. Ulbrich, Novel star HPMa-based polymer conjugates for passive targeting to solid tumors, *J Drug Target* 19 (2011). <https://doi.org/10.3109/1061186X.2011.622402>.
- [253] T. Etrych, J. Strohalm, P. Chytil, P. Černoch, L. Starovoytova, M. Pechar, K. Ulbrich, Biodegradable star HPMa polymer conjugates of doxorubicin for passive tumor targeting, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 42 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.03.001>.
- [254] H. Yang, S.T. Lopina, Penicillin V-conjugated PEG-PAMAM star polymers, *J Biomater Sci Polym Ed* 14 (2003). <https://doi.org/10.1163/156856203769231556>.
- [255] R. Adhikari, P.A. Gunatillake, I. Griffiths, L. Tatai, M. Wickramaratna, S. Houshyar, T. Moore, R.T.M. Mayadunne, J. Field, M. McGee, T. Carbone, Biodegradable injectable polyurethanes: Synthesis and evaluation for orthopaedic applications, *Biomaterials* 29 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.06.021>.
- [256] B.M. Bailey, R. Fei, D. Munoz-Pinto, M.S. Hahn, M.A. Grunlan, PDMSstar-PEG hydrogels prepared via solvent-induced phase separation (SIPS) and their potential utility as tissue engineering scaffolds, *Acta Biomater* 8 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.07.034>.
- [257] D. Puppi, D. Dinucci, C. Bartoli, C. Mota, C. Migone, F. Dini, G. Barsotti, F. Carlucci, F. Chiellini, Development of 3D wet-spun polymeric scaffolds loaded with antimicrobial agents for bone engineering, *J Bioact Compat Polym* 26 (2011). <https://doi.org/10.1177/0883911511415918>.
- [258] W. Wu, Z. Lin, Y. Liu, X. Xu, C. Ding, J. Li, Thermoresponsive hydrogels based on a phosphorylated star-shaped copolymer: mimicking the extracellular matrix for in situ bone repair, *J Mater Chem B* 5 (2017). <https://doi.org/10.1039/c6tb02657e>.
- [259] S. Bennett, K. Connolly, D.R. Lee, Y. Jiang, D. Buck, J.O. Hollinger, E.A. Gruskin, Initial biocompatibility studies of a novel degradable polymeric bone substitute that hardens in situ, in: *Bone*, 1996. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(96\)00130-5](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(96)00130-5).
- [260] P. Timashev, D. Kuznetsova, A. Koroleva, N. Prodanets, A. Deiwick, Y. Piskun, K. Bardakova, N. Dzhoynashvili, S. Kostjuk, E. Zagaynova, Y. Rochev, B. Chichkov, V. Bagratashvili, Novel biodegradable star-shaped polylactide scaffolds for bone regeneration fabricated by two-photon polymerization, *Nanomedicine* 11 (2016). <https://doi.org/10.2217/nnm-2015-0022>.
- [261] J.J. Chung, Y. Fujita, S. Li, M.M. Stevens, T. Kasuga, T.K. Georgiou, J.R. Jones, Biodegradable inorganic-organic hybrids of methacrylate star polymers for bone regeneration, *Acta Biomater* 54 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.03.008>.
- [262] G. Vigliotta, M. Mella, D. Rega, L. Izzo, Modulating antimicrobial activity by synthesis: Dendritic copolymers based on nonquaternized 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate by Cu-mediated ATRP, *Biomacromolecules* 13 (2012). <https://doi.org/10.1021/bm2017349>.
- [263] F. Siedenbiedel, A. Fuchs, T. Moll, M. Weide, R. Breves, J.C. Tiller, Star-shaped poly(styrene)-block-Poly(4-vinyl-N-methylpyridiniumiodide) for semipermanent antimicrobial coatings, *Macromol Biosci* 13 (2013). <https://doi.org/10.1002/mabi.201300219>.
- [264] M.D. Huynh, N.T.D. Linh, K.D. Huy, I. Chung, D.Q. Tham, Synthesis and characterization of star-shaped PMMA using low-ppm ARGET ATRP approach and changing to rigid powder for bone cement, *Vietnam Journal of Chemistry* 59 (2021). <https://doi.org/10.1002/vjch.202000150>.
- [265] A. Szanka, G. Szarka, B. Iván, Multi-methacrylated star-shaped, photocurable poly(methyl methacrylate) macromonomers via quasiliving ATRP with suppressed curing shrinkage, *Polymer (Guildf)* 54 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2013.09.025>.
- [266] Z. Zulfiqar, R.R.M. Khan, M. Summer, Z. Saeed, M. Pervaiz, S. Rasheed, B. Shehzad, F. Kabir, S. Ishaq, Plant-mediated green synthesis of silver nanoparticles: Synthesis, characterization, biological applications, and toxicological considerations: A review, *Biocatal Agric Biotechnol* 57 (2024) 103121. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2024.103121>.
- [267] H. Gao, S. Ohno, K. Matyjaszewski, Low polydispersity star polymers via cross-linking macromonomers by ATRP, *J Am Chem Soc* 128 (2006). <https://doi.org/10.1021/ja066964t>.
- [268] A. Libánská, T. Špringer, L. Peřtová, K. Kotalík, R. Konefař, A. Šimonová, T. Křížek, J. Homola, E. Randárová, T. Etrych, Using surface plasmon resonance, capillary electrophoresis and diffusion-ordered NMR

- spectroscopy to study drug release kinetics, *Commun Chem* 6 (2023). <https://doi.org/10.1038/s42004-023-00992-5>.
- [269] B.H. Northrop, R.N. Coffey, Thiol-ene click chemistry: Computational and kinetic analysis of the influence of alkene functionality, *J Am Chem Soc* 134 (2012). <https://doi.org/10.1021/ja305441d>.
- [270] S. Fujisawa, Y. Kadoma, Action of eugenol as a retarder against polymerization of methyl methacrylate by benzoyl peroxide, *Biomaterials* 18 (1997). [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(96\)00196-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(96)00196-2).
- [271] R. Alkattan, S. Banerji, S. Deb, A multi-functional dentine bonding system combining a phosphate monomer with eugenyl methacrylate, *Dental Materials* 38 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.dental.2022.04.005>.
- [272] F.F.M. da Silva, F.J.Q. Monte, T.L.G. de Lemos, P.G.G. do Nascimento, A.K. de Medeiros Costa, L.M.M. de Paiva, Eugenol derivatives: synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial and antioxidant activities, *Chem Cent J* 12 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0407-4>.
- [273] P. Jia, M.E. Lamm, Y. Sha, Y. Ma, L. Buzoglu Kurnaz, Y. Zhou, Thiol-ene eugenol polymer networks with chemical Degradation, thermal degradation and biodegradability, *Chemical Engineering Journal* 454 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.140051>.
- [274] E.J. Lenardão, R.G. Jacob, K.D. Mesquita, R.G. Lara, R. Webber, D.M. Martinez, L. Savegnago, S.R. Mendes, D. Alves, G. Perin, Glycerol as a promoting and recyclable medium for catalyst-free synthesis of linear thioethers: New antioxidants from eugenol, *Green Chem Lett Rev* 6 (2013). <https://doi.org/10.1080/17518253.2013.811298>.
- [275] K. Hu, D. Zhao, G. Wu, J. Ma, Polyesters derived from bio-based eugenol and 10-undecenoic acid: Synthesis, characterization, and structure-property relationships, *RSC Adv* 5 (2015). <https://doi.org/10.1039/c5ra17457k>.
- [276] D. Guzmán, X. Ramis, X. Fernández-Francos, S. De la Flor, A. Serra, New bio-based materials obtained by thiol-ene/thiol-epoxy dual curing click procedures from eugenol derivatives, *Eur Polym J* 93 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.06.026>.
- [277] C. Cheng, X. Zhang, X. Chen, J. Li, Q. Huang, Z. Hu, Y. Tu, Self-healing polymers based on eugenol via combination of thiol-ene and thiol oxidation reactions, *Journal of Polymer Research* 23 (2016). <https://doi.org/10.1007/s10965-016-1001-x>.
- [278] M. Neda, K. Okinaga, M. Shibata, High-performance bio-based thermosetting resins based on bismaleimide and allyl-etherified eugenol derivatives, *Mater Chem Phys* 148 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2014.07.050>.
- [279] T. Yoshimura, T. Shimasaki, N. Teramoto, M. Shibata, Bio-based polymer networks by thiol-ene photopolymerizations of allyl-etherified eugenol derivatives, *Eur Polym J* 67 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.11.013>.
- [280] L. Rojo, B. Vazquez, J. Parra, A.L. Bravo, S. Deb, J. San Roman, From natural products to polymeric derivatives of "Eugenol": A new approach for preparation of dental composites and orthopedic bone cements, *Biomacromolecules* 7 (2006). <https://doi.org/10.1021/bm0603241>.
- [281] L. Rojo, A. Borzacchiello, J. Parra, S. Deb, B. Vázquez, J. San Román, The preparation of high conversion polymeric systems containing eugenol residues and their rheological characterization, in: *J Mater Sci Mater Med*, 2008. <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3317-x>.
- [282] S. Molina-Gutiérrez, A. Manseri, V. Ladmiral, R. Bongiovanni, S. Caillol, P. Lacroix-Desmazes, Eugenol: A Promising Building Block for Synthesis of Radically Polymerizable Monomers, *Macromol Chem Phys* 220 (2019). <https://doi.org/10.1002/macp.201900179>.
- [283] W. Daehne, E. Frederiksen, E. Gundersen, F. Lund, P. Mørch, H.J. Petersen, K. Roholt, L. Tybring, W.O. Godtfredsen, Acyloxymethyl esters of ampicillin., *J Med Chem* 13 (1970). <https://doi.org/10.1021/jm00298a005>.
- [284] F. Sakamoto, S. Ikeda, G. Tsukamoto, Studies on Prodrugs. I. Preparation and Characterization of Acyloxyallylester of Ampicillin, *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 31 (1983). <https://doi.org/10.1248/cpb.31.2698>.

- [285] E. Oledzka, M. Sobczak, G. Nalecz-Jawecki, A. Skrzypczak, W. Kolodziejski, Ampicillin-ester bonded branched polymers: Characterization, cyto-, genotoxicity and controlled drug-release behaviour, *Molecules* 19 (2014). <https://doi.org/10.3390/molecules19067543>.
- [286] A.F. Hasan, M.M. Kareem, M.N. Al-Baiati, Synthesis a novel nano co-polymer and using as carrier drug system, *International Journal of Pharmaceutical Research* 12 (2020). <https://doi.org/10.31838/ijpr/2020.12.04.120>.
- [287] C. Wang, S. Wang, Y. Zhang, Z. Wang, J. Liu, M. Zhang, Self-polymerization and co-polymerization kinetics of gadolinium methacrylate, *Journal of Rare Earths* 36 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.jre.2017.09.015>.
- [288] J. Liebscher, Chemistry of Polydopamine – Scope, Variation, and Limitation, *European J Org Chem* 2019 (2019). <https://doi.org/10.1002/ejoc.201900445>.
- [289] D.R. Dreyer, D.J. Miller, B.D. Freeman, D.R. Paul, C.W. Bielawski, Elucidating the structure of poly(dopamine), *Langmuir* 28 (2012). <https://doi.org/10.1021/la204831b>.
- [290] C.C. Ho, S.J. Ding, The pH-controlled nanoparticles size of polydopamine for anti-cancer drug delivery, *J Mater Sci Mater Med* 24 (2013). <https://doi.org/10.1007/s10856-013-4994-2>.
- [291] H.Y. Cho, S.E. Averick, E. Paredes, K. Wegner, A. Averick, S. Jurga, S.R. Das, K. Matyjaszewski, Star polymers with a cationic core prepared by ATRP for cellular nucleic acids delivery, *Biomacromolecules* 14 (2013). <https://doi.org/10.1021/bm4003199>.
- [292] J. Spěvák, R. Konefať, J. Dybal, E. Čadová, J. Kovářová, Thermoresponsive behavior of block copolymers of PEO and PNIPAm with different architecture in aqueous solutions: A study by NMR, FTIR, DSC and quantum-chemical calculations, *Eur Polym J* 94 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.07.034>.
- [293] H. Xu, D. Zhang, J. Li, Antibacterial Nanoparticles with Universal Adhesion Function Based on Dopamine and Eugenol, *Journal of Bioresources and Bioproducts* 4 (2019). <https://doi.org/10.12162/jbb.v4i3.006>.
- [294] J.S. Patel, S. V. Patel, N.P. Talpada, H.A. Patel, Bioactive polymers: Synthesis, release study and antimicrobial properties of polymer bound Ampicillin, *Angewandte Makromolekulare Chemie* 271 (1999). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-9505\(19991101\)271:1<24::AID-APMC24>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-9505(19991101)271:1<24::AID-APMC24>3.0.CO;2-L).
- [295] F. Wichlas, C.J. Seebauer, R. Schilling, J. Rump, S.S. Chopra, T. Walter, U.K.M. Teichgräber, H.J. Bail, A signal-inducing bone cement for magnetic resonance imaging-guided spinal surgery based on hydroxyapatite and polymethylmethacrylate, *Cardiovasc Intervent Radiol* 35 (2012). <https://doi.org/10.1007/s00270-011-0192-0>.
- [296] P. Iranpour, M. Ajamian, A. Safavi, N. Iranpoor, A. Abbaspour, S. Javanmardi, Synthesis of highly stable and biocompatible gold nanoparticles for use as a new X-ray contrast agent, *J Mater Sci Mater Med* 29 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6053-5>.
- [297] J. Kim, A.B. Silva, J.C. Hsu, P.S.N. Maidment, N. Shapira, P.B. Noël, D.P. Cormode, Radioprotective Garment-Inspired Biodegradable Polymetal Nanoparticles for Enhanced CT Contrast Production, *Chemistry of Materials* 32 (2020). <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.9b03931>.
- [298] M.F. Attia, M. Ranasinghe, R. Akasov, J.N. Anker, D.C. Whitehead, F. Alexis, In situ preparation of gold-polyester nanoparticles for biomedical imaging, *Biomater Sci* 8 (2020). <https://doi.org/10.1039/d0bm00175a>.
- [299] S. Mastrogiacomo, A.E. Kownacka, W. Dou, B.P. Burke, R.T.M. de Rosales, A. Heerschap, J.A. Jansen, S.J. Archibald, X.F. Walboomers, Bisphosphonate Functionalized Gadolinium Oxide Nanoparticles Allow Long-Term MRI/CT Multimodal Imaging of Calcium Phosphate Bone Cement, *Adv Healthc Mater* 7 (2018). <https://doi.org/10.1002/adhm.201800202>.
- [300] Y. Li, M. Beija, S. Laurent, L. Vander Elst, R.N. Muller, H.T.T. Duong, A.B. Lowe, T.P. Davis, C. Boyer, Macromolecular ligands for gadolinium MRI contrast agents, *Macromolecules* 45 (2012). <https://doi.org/10.1021/ma300521c>.
- [301] C.T. Adkins, J.N. Dobish, C.S. Brown, B. Mayrhoon, S.K. Hamilton, F. Udoji, K. Radford, T.E. Yankeelov, J.C. Gore, E. Harth, High relaxivity MRI imaging reagents from bimodal star polymers, *Polym Chem* 3 (2012). <https://doi.org/10.1039/c1py00474c>.

- [302] X. Huang, Y. Xiao, W. Zhang, M. Lang, In-situ formation of silver nanoparticles stabilized by amphiphilic star-shaped copolymer and their catalytic application, *Appl Surf Sci* 258 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2011.10.113>.
- [303] W. Lin, K. Huang, Y. Li, Y. Qin, D. Xiong, J. Ling, G. Yi, Z. Tang, J. Lin, Y. Huang, C. Yang, J. Wang, Facile In Situ Preparation and In Vitro Antibacterial Activity of PDMAEMA-Based Silver-Bearing Copolymer Micelles, *Nanoscale Res Lett* 14 (2019). <https://doi.org/10.1186/s11671-019-3074-z>.
- [304] C.G. Floare, A. Pirnau, M. Bogdan, ¹H NMR spectroscopic characterization of inclusion complexes of tolfenamic and flufenamic acids with β -cyclodextrin, in: *J Mol Struct*, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2012.11.021>.
- [305] R. Konefał, J. Spěváček, G. Mužíková, R. Laga, Thermoresponsive behavior of poly(DEGMA)-based copolymers. NMR and dynamic light scattering study of aqueous solutions, *Eur Polym J* 124 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109488>.
- [306] P.L. Millstein, D. Nathanson, Effect of eugenol and eugenol cements on cured composite resin, *J Prosthet Dent* 50 (1983). [https://doi.org/10.1016/0022-3913\(83\)90016-1](https://doi.org/10.1016/0022-3913(83)90016-1).
- [307] N. Durán, M.A. Alvarenga, E.C. Da Silva, P.S. Melo, P.D. Marcato, Microencapsulation of antibiotic rifampicin in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), *Arch Pharm Res* 31 (2008). <https://doi.org/10.1007/s12272-001-2137-7>.
- [308] C. Bisson-Boutelliez, S. Fontanay, C. Finance, F. Kedzierewicz, Preparation and physicochemical characterization of amoxicillin β -cyclodextrin complexes, *AAPS PharmSciTech* 11 (2010). <https://doi.org/10.1208/s12249-010-9412-1>.
- [309] A. Kahraman, D. Sakar, M. Altikatoglu Yapaoz, Maleic Anhydride-Derived Copolymers Conjugated with Beta-Lactam Antibiotics: Synthesis, Characterization, In Vitro Activity/Stability Tests with Antibacterial Studies, *Applied Sciences (Switzerland)* 14 (2024). <https://doi.org/10.3390/app14146112>.
- [310] V.N. Nguyen, S.L. Wang, T.H. Nguyen, V.B. Nguyen, M.D. Doan, A.D. Nguyen, Preparation and Characterization of Chitosan/Starch Nanocomposites Loaded with Ampicillin to Enhance Antibacterial Activity against *Escherichia coli*, *Polymers (Basel)* 16 (2024). <https://doi.org/10.3390/polym16182647>.
- [311] M.N. Haque, S. Kwon, D. Cho, Formation and stability study of silver nano-particles in aqueous and organic medium, *Korean Journal of Chemical Engineering* 34 (2017). <https://doi.org/10.1007/s11814-017-0096-z>.
- [312] K. Szcześniak, G. Przesławski, J. Kotecki, W. Andrzejewska, K. Fiedorowicz, M. Woźniak-Budych, M. Jarzębski, P. Gajewski, A. Marcinkowska, Star Polymers as a Reducing Agent of Silver Salt and a Carrier for Silver Nanoparticles, *Materials* 18 (2025). <https://doi.org/10.3390/ma18133009>.
- [313] D. Ma, X. Xie, L.M. Zhang, A novel route to in-situ incorporation of silver nanoparticles into supramolecular hydrogel networks, *J Polym Sci B Polym Phys* 47 (2009). <https://doi.org/10.1002/polb.21677>.
- [314] D. Zhang, L. Qi, J. Ma, H. Cheng, Formation of silver nanowires in aqueous solutions of a double-hydrophilic block copolymer, *Chemistry of Materials* 13 (2001). <https://doi.org/10.1021/cm0105007>.
- [315] D. Paramelle, A. Sadovoy, S. Gorelik, P. Free, J. Hobley, D.G. Fernig, A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra, *Analyst* 139 (2014). <https://doi.org/10.1039/c4an00978a>.
- [316] M. Alim-Al-Razy, G.M.A. Bayazid, R.U. Rahman, R. Bosu, S.S. Shamma, Silver nanoparticle synthesis, UV-Vis spectroscopy to find particle size and measure resistance of colloidal solution, in: *J Phys Conf Ser*, 2020. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1706/1/012020>.
- [317] D.G. Yu, W.C. Lin, C.H. Lin, L.M. Chang, M.C. Yang, An in situ reduction method for preparing silver/poly(vinyl alcohol) nanocomposite as surface-enhanced Raman scattering (SERS)-active substrates, *Mater Chem Phys* 101 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2006.02.020>.
- [318] D. Franco, R. Zagami, L.M. De Plano, N. Burduja, S.P.P. Guglielmino, L.M. Scolaro, A. Mazzaglia, Antimicrobial and Antibiofilm Photodynamic Action of Photosensitizing Nanoassemblies Based on Sulfobutylether- β -Cyclodextrin, *Molecules* 28 (2023). <https://doi.org/10.3390/molecules28062493>.

- [319] T.R. Thatiparti, H.A. Von Recum, Cyclodextrin complexation for affinity-based antibiotic delivery, *Macromol Biosci* 10 (2010). <https://doi.org/10.1002/mabi.200900204>.
- [320] E.L. Cyphert, J.D. Wallat, J.K. Pokorski, H.A. Von Recum, Erythromycin modification that improves its acidic stability while optimizing it for local drug delivery, *Antibiotics* 6 (2017). <https://doi.org/10.3390/antibiotics6020011>.
- [321] A. Joardar, G. Meher, B.P. Bag, H. Chakraborty, Host-guest complexation of eugenol in cyclodextrins for enhancing bioavailability, *J Mol Liq* 319 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114336>.
- [322] T. Wang, B. Li, H. Si, L. Lin, L. Chen, Release characteristics and antibacterial activity of solid state eugenol/ β -cyclodextrin inclusion complex, *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 71 (2011). <https://doi.org/10.1007/s10847-011-9928-3>.
- [323] Łajdecki Bartłomiej, Cementy kostne na bazie metakrylanów – synteza i charakterystyka, Politechnika Poznańska, 2022.
- [324] S. Stea, D. Granchi, C. Zolezzi, G. Ciapetti, M. Visentin, D. Cavedagna, A. Pizzoferrato, High-performance liquid chromatography assay of N,N-dimethyl-p-toluidine released from bone cements: Evidence for toxicity, *Biomaterials* 18 (1997). [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(96\)00121-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(96)00121-4).
- [325] K.M. Hutchins, N.M. Sekerak, J.S. Moore, Polymerization Initiated by Particle Contact: A Quiescent State Trigger for Materials Synthesis, *J Am Chem Soc* 138 (2016). <https://doi.org/10.1021/jacs.6b07742>.
- [326] G.A. Funk, E.M. Menuet, K.A. Cole, T.P. Schuman, K. V. Kilway, T.E. Mciff, Radical scavenging of poly(methyl methacrylate) bone cement by rifampin and clinically relevant properties of the rifampin-loaded cement, *Bone Joint Res* 8 (2019). <https://doi.org/10.1302/2046-3758.82.BJR-2018-0170.R2>.
- [327] E.J. McPherson, Portugal Denise, Deactivation of Palacos R Bone Cement with the Addition of Rifampin Antibiotic Powder An In-Vivo Experience - Case Report, *Reconstructive Review* (2011) 34–36. <https://pdfs.semanticscholar.org/ca7e/d92b77a7ecc347c85a6e777fb11c40b7a480.pdf> (accessed February 11, 2025).
- [328] J. Laperche, C.C. Barrett, A. Boduch, J. Glasser, D. Clippert, D.R. Garcia, V. Antoci, Mechanically stable rifampin antibiotic cement inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm surface growth, *Journal of Orthopaedic Research* 42 (2024). <https://doi.org/10.1002/jor.25720>.
- [329] P. Sanz-Ruiz, E. Carbó-Laso, J.C. Del Real-Romero, F. Arán-Ais, Y. Ballesteros-Iglesias, E. Paz-Jiménez, M. Sánchez-Navarro, M.Á. Pérez-Limiñana, J. Vaquero-Martín, Microencapsulation of rifampicin: A technique to preserve the mechanical properties of bone cement, *Journal of Orthopaedic Research* 36 (2018). <https://doi.org/10.1002/jor.23614>.
- [330] B. Picknell, L. Mizen, R. Sutherland, Antibacterial activity of antibiotics in acrylic bone cement, *Journal of Bone and Joint Surgery - Series B* 59 (1977). <https://doi.org/10.1302/0301-620x.59b3.408356>.
- [331] N.J. Beeching, M.G. Thomas, S. Roberts, S.D.R. Lang, Comparative in-vitro activity of antibiotics incorporated in acrylic bone cement, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 17 (1986). <https://doi.org/10.1093/jac/17.2.173>.
- [332] *Polymers and Polymeric Composites: A Reference Series*, 2016. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-37179-0>.
- [333] I.I. López-Torres, J. Vaquero-Martín, A.I. Torres-Suárez, F. Navarro-García, A.I. Fraguas-Sánchez, V.E. León-Román, P. Sanz-Ruiz, The tale of microencapsulated rifampicin: is it useful for the treatment of periprosthetic joint infection?, *Int Orthop* 46 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00264-021-05290-0>.
- [334] A. Brandes, M. Dunning, J. Langland, Antimicrobial Activity of Individual Volatile Compounds from Various Essential Oils, *Molecules* 29 (2024). <https://doi.org/10.3390/molecules29081811>.
- [335] Z. Aumeeruddy-Elalfi, A. Gurib-Fakim, M.F. Mahomoodally, Antimicrobial and Antibiotic Potentiating Activity of Essential Oils From Tropical Medicinal Herbs and Spices, in: *Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches*, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803642-6.00013-7>.
- [336] A.I. Visan, I. Negut, Coatings Based on Essential Oils for Combating Antibiotic Resistance, *Antibiotics* 13 (2024). <https://doi.org/10.3390/antibiotics13070625>.

- [337] M.N. Aljaafari, A.O. Alali, L. Baqais, M. Alqubaisy, M. Alali, A. Molouki, J. Ong-Abdullah, A. Abushelaibi, K.S. Lai, S.H.E. Lim, An overview of the potential therapeutic applications of essential oils, *Molecules* 26 (2021). <https://doi.org/10.3390/molecules26030628>.
- [338] H. Chabenat, F. Couic-Marinier, Aromatherapy as a complement to antibiotic therapy, *Actualites Pharmaceutiques* 60 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2021.03.017>.
- [339] Zdenek Ales, Tribological Properties Of Transmission Oils, in: Czech University of Life Sciences Prague; Faculty of Engineering (Ed.), *Trends in Agricultural Engineering 2010 : 4th Internationale Conference TAE 2010 : Conference Proceedings : 7-10 September : Prague, Czech Republic*, 1st ed., Czech University of Life Sciences, Faculty of Engineering, Prague, 2010: pp. 53–58.
- [340] Inamuddin Inamuddin, Altalhi Tariq, Cruz Jorddy Neves, eds., *Essential Oils: Extraction Methods and Applications*, n.d.
- [341] V. Vladut, M. Gabriel Matache, L. Gabriela Popa, *Engineering For Rural Development New Biodegradable Oils Used In Agriculture*, Jelgava, 2011. <https://www.researchgate.net/publication/259739273>.
- [342] G.M. Brauer, D.R. Steinberger, J.W. Stansbury, Dependence of curing time, peak temperature, and mechanical properties on the composition of bone cement, *J Biomed Mater Res* 20 (1986). <https://doi.org/10.1002/jbm.820200614>.
- [343] M.H. Reisbick, J.F. Brodsky, Strength parameters of composite resins, *J Prosthet Dent* 26 (1971). [https://doi.org/10.1016/0022-3913\(71\)90050-3](https://doi.org/10.1016/0022-3913(71)90050-3).
- [344] G.W. Burton, K.U. Ingold, Autoxidation of Biological Molecules. 1. The Antioxidant Activity of Vitamin E and Related Chain-Breaking Phenolic Antioxidants in Vitro, *J Am Chem Soc* 103 (1981). <https://doi.org/10.1021/ja00411a035>.
- [345] G. Przestawski, K. Szczesniak, B. Grzeskowiak, A. Mazzaglia, M. Jarzębski, A. Niewczas, P. Kuczyński, A. Zarębska-Mróz, A. Marcinkowska, Modification of methacrylate bone cement with eugenol – A new material with antibacterial properties, *Reviews on Advanced Materials Science* 63 (2024). <https://doi.org/10.1515/rams-2023-0171>.
- [346] B.K. Jadhav, K.R. Khandelwal, A.R. Ketkar, S.S. Pisal, Formulation and Evaluation of Mucoadhesive Tablets Containing Eugenol for the Treatment of Periodontal Diseases, *Drug Dev Ind Pharm* 30 (2004). <https://doi.org/10.1081/DDC-120028715>.
- [347] C.Y. Lu, D.C. Church, G.D. Learn, J.K. Pokorski, H.A. von Recum, Modified Cyclodextrin Microparticles to Improve PMMA Drug Delivery Without Mechanical Loss, *Macromol Biosci* 21 (2021). <https://doi.org/10.1002/mabi.202000328>.
- [348] E.J. Seo, S.G. Min, M.J. Choi, Release characteristics of freeze-dried eugenol encapsulated with β -cyclodextrin by molecular inclusion method, *J Microencapsul* 27 (2010). <https://doi.org/10.3109/02652041003681398>.
- [349] L. Rojo, B. Vázquez, S. Deb, J.S. Román, Eugenol derivatives immobilized in auto-polymerizing formulations as an approach to avoid inhibition interferences and improve biofunctionality in dental and orthopedic cements, *Acta Biomater* 5 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.01.029>.
- [350] S. Fujisawa, T. Atsumi, Y. Kadoma, H. Sakagami, Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity, *Toxicology* 177 (2002). [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00194-4](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00194-4).
- [351] A. Almaroof, L. Rojo, F. Mannocci, S. Deb, A resin composite material containing an eugenol derivative for intracanal post cementation and core build-up restoration, *Dental Materials* 32 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.11.030>.
- [352] K.V. Kon, M.K. Rai, Combining Essential Oils with Antibiotics and other Antimicrobial Agents to Overcome Multidrug-Resistant Bacteria, in: *Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components*, 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398539-2.00010-0>.
- [353] S.F. Van Vuuren, S. Suliman, A.M. Viljoen, The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials, *Lett Appl Microbiol* 48 (2009). <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02548.x>.

- [354] S. Hemaiswarya, M. Doble, Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria, *Phytomedicine* 16 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.04.006>.
- [355] S.E. Moon, H.Y. Kim, J.D. Cha, Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria, *Arch Oral Biol* 56 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.02.005>.
- [356] He Shulin, Poggie P. Matthew, Setting time indicator for acrylic bone cement, US8415406B2, 2013. <https://patents.google.com/patent/US8415406B2/en> (accessed March 11, 2025).
- [357] D.P. Karumathil, M.S. Nair, J. Gaffney, A. Kollanoor-Johny, K. Venkitanarayanan, Trans-Cinnamaldehyde and eugenol increase *Acinetobacter baumannii* sensitivity to beta-lactam antibiotics, *Front Microbiol* 9 (2018). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01011>.
- [358] X. Liu, C. Cheng, X. Peng, H. Xiao, C. Guo, X. Wang, L. Li, X. Yu, A promising material for bone repair: PMMA bone cement modified by dopamine-coated strontium-doped calcium polyphosphate particles, *R Soc Open Sci* 6 (2019). <https://doi.org/10.1098/rsos.191028>.
- [359] E.D. Bolaina-Lorenzo, J.M. Cervantes-Uc, J.V. Cauich-Rodriguez, A. Avila-Ortega, J.A. Juarez-Moreno, Effect of barium sulfate surface treatments on the mechanical properties of acrylic bone cements, *Polymer Bulletin* 78 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03407-w>.
- [360] F. Wichlas, J. Hermann Bail, C.J. Seebauer, R. Schilling, R. Pflugmacher, J. Pinkernelle, J. Rump, F. Streitparth, K.M. Ulf Teichgräber, Development of a signal-inducing bone cement for magnetic resonance imaging, *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 31 (2010). <https://doi.org/10.1002/jmri.22074>.
- [361] H.J. Bail, C. Sattig, S. Tsitsilonis, I. Papanikolaou, U.K.M. Teichgräber, F. Wichlas, Signal-inducing bone cements for MRI-guided spinal cementoplasty: Evaluation of contrast-agent-based polymethylmethacrylate cements, *Skeletal Radiol* 41 (2012). <https://doi.org/10.1007/s00256-011-1264-6>.
- [362] M. Miola, F. Barberis, A. Lagazzo, E. Vernè, PMMA composite bone cement containing bioactive and ferrimagnetic glass-ceramic particles: Effect of temperature and of the additional phase on some physical and mechanical properties, *Ceram Int* 49 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2023.05.017>.
- [363] X. Cui, C. Huang, M. Zhang, C. Ruan, S. Peng, L. Li, W. Liu, T. Wang, B. Li, W. Huang, M.N. Rahaman, W.W. Lu, H. Pan, Enhanced osteointegration of poly(methylmethacrylate) bone cements by incorporating strontium-containing borate bioactive glass, *J R Soc Interface* 14 (2017). <https://doi.org/10.1098/rsif.2016.1057>.
- [364] L. Chen, D. Zhai, Z. Huan, N. Ma, H. Zhu, C. Wu, J. Chang, Silicate bioceramic/PMMA composite bone cement with distinctive physicochemical and bioactive properties, *RSC Adv* 5 (2015). <https://doi.org/10.1039/c5ra04646g>.
- [365] J. Zhu, S. Yang, K. Cai, S. Wang, Z. Qiu, J. Huang, G. Jiang, X. Wang, X. Fang, Bioactive poly (methyl methacrylate) bone cement for the treatment of osteoporotic vertebral compression fractures, *Theranostics* 10 (2020). <https://doi.org/10.7150/thno.44428>.
- [366] F. Pahlevanzadeh, H.R. Bakhsheshi-Rad, A.F. Ismail, M. Aziz, X.B. Chen, Development of PMMA-Mon-CNT bone cement with superior mechanical properties and favorable biological properties for use in bone-defect treatment, *Mater Lett* 240 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.12.049>.
- [367] T. Kang, X. Hua, P. Liang, M. Rao, Q. Wang, C. Quan, C. Zhang, Q. Jiang, Synergistic reinforcement of polydopamine-coated hydroxyapatite and BMP2 biomimetic peptide on the bioactivity of PMMA-based cement, *Compos Sci Technol* 123 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2016.01.002>.
- [368] G. Gonçalves, M.T. Portolés, C. Ramírez-Santillán, M. Vallet-Regí, A.P. Serro, J. Grácio, P.A.A.P. Marques, Evaluation of the in vitro biocompatibility of PMMA/high-load HA/carbon nanostructures bone cement formulations, *J Mater Sci Mater Med* 24 (2013). <https://doi.org/10.1007/s10856-013-5030-2>.
- [369] V. Sharma, P. Singh, A.K. Pandey, A. Dhawan, Induction of oxidative stress, DNA damage and apoptosis in mouse liver after sub-acute oral exposure to zinc oxide nanoparticles, *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 745 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.12.009>.
- [370] R.K. Shukla, A. Kumar, D. Gurbani, A.K. Pandey, S. Singh, A. Dhawan, TiO₂ nanoparticles induce oxidative DNA damage and apoptosis in human liver cells, *Nanotoxicology* 7 (2013). <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.629747>.

- [371] K.B. Knudsen, H. Northeved, E.K. Pramod Kumar, A. Permin, T. Gjetting, T.L. Andresen, S. Larsen, K.M. Wegener, J. Lykkesfeldt, K. Jantzen, S. Loft, P. Møller, M. Roursgaard, In vivo toxicity of cationic micelles and liposomes, *Nanomedicine* 11 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.08.004>.
- [372] A. Kermanizadeh, N.R. Jacobsen, M. Roursgaard, S. Loft, P. Møller, Hepatic toxicity assessment of cationic liposome exposure in healthy and chronic alcohol fed mice, *Heliyon* 3 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00458>.

Spis rysunków

Rys. 1. Krzywa kinetyczna polimeryzacji metakrylanu benzylu w funkcji szybkości polimeryzacji (R_p) od czasu reakcji (t) [badania własne].	55
Rys. 2. Przepływ ciepła w czasie dla reakcji polimeryzacji HEMA z dodatkiem dimetakrylanu: a) 2 %mol EGDM; b) 1 %mol EGDM; c) 0 %mol EGDM. Inicjator: 0,5 %mas. AIBN [195].	57
Rys. 3. Przepływ ciepła w czasie dla reakcji dimetakrylanów ilustrujący wpływ długości mostka glikolu etylenowego. Profile uzyskane dla reakcji masowych z 0,5 %mas. AIBN: (a) EGDM; (b) TEGDM [195].	57
Rys. 4. Schemat ATRP katalizowanej metalem przejściowym.	59
Rys. 5. Miejsca reaktywne w eugenolu.	95
Rys. 6. Reakcje syntezy metakrylanu 4-allilo-2-metoksyfenylu (EU-MAA) z monomerów EU i MAA w obecności DCC i DMAP.	97
Rys. 7. Widmo ^1H NMR dla EU-MAA zmierzone w CDCl_3 w temperaturze 298K.	97
Rys. 8. Widmo ^{13}C NMR dla EU-MAA zmierzone w CDCl_3 w temperaturze 298K.	98
Rys. 9. Dane NMR EU-MAA: kluczowe korelacje obserwowane w widmach ^1H - ^1H COSY (pogrubione linie) i ^1H - ^{13}C HMBC (przerywane strzałki).	98
Rys. 10. Reakcje syntezy 4-(3((2-(2-merkaptioetoksy)etoksy)etylo)tio)propylo)-2-metoksyfenolu (EU-T2) z monomerów EU i T2 w obecności DMPA.	99
Rys. 11. Widma ATR-FTIR zarejestrowane podczas syntezy pochodnej EU-T2 w zakresie liczb falowych odpowiadających drganiom a) wiązania C=C eugenolu, b) grupy -SH tiolu T2.	100
Rys. 12. Widmo ^1H NMR dla EU-T2 zmierzone w CDCl_3 w temperaturze 298K.	100
Rys. 13. Widmo ^{13}C NMR dla EU-T2 zmierzone w CDCl_3 w temperaturze 298K.	101
Rys. 14. Dane NMR EU-T2: kluczowe korelacje obserwowane w widmach ^1H - ^1H COSY (pogrubione linie) i ^1H - ^{13}C HMBC (przerywane strzałki).	101
Rys. 15. Rozkład mas cząsteczkowych polimerów $\text{PEG}_4\text{-PMMA}$ wyznaczony metodą GPC.	103
Rys. 16. Schemat reakcji syntezy AMP- $\text{PEG}_4\text{-PMMA}$.	103
Rys. 17. Widmo ^1H NMR dla AMP- $\text{PEG}_4\text{-PMMA}_{2000}$ zmierzone w CDCl_3 w temperaturze 295K.	104
Rys. 18. Widmo ^1H NMR dla AMP- $\text{PEG}_4\text{-PMMA}_{7000}$ zmierzone w CDCl_3 w temperaturze 295K.	104
Rys. 19. Widmo ^1H NMR dla $\text{PEG}_4\text{-PMMA}_{7000}$ zmierzone w CDCl_3 w temperaturze 295K wraz z integracją sygnałów pochodzących od AMP i PMMA.	105
Rys. 20. Schemat reakcji syntezy inicjatora polimeryzacji ATRP: AMP- PEG_4Br .	106
Rys. 21. Schemat reakcji syntezy AMP- $\text{PEG}_4\text{-PMMA}$.	106
Rys. 22. Widmo ^1H NMR dla AMP- $\text{PEG}_4\text{-PMMA}$ zmierzone w CDCl_3 w temperaturze 295K wraz z integracją sygnałów pochodzących od AMP i PMMA.	107

Rys. 23. Schemat reakcji syntezy $Gd(MAA)_3$.	108
Rys. 24. Widmo 1H NMR dla $Gd(MAA)_3$ zmierzone w deuterowanym DMF w temperaturze 295K.	109
Rys. 25. Widma ATR-FTIR dla $Gd(MAA)_3$: a) synteza własna b) Wang C. i inni, Journal of Rare Earths (2018) 36(3) 298-303 [287].	109
Rys. 26. Widma XRD dla $Gd(MAA)_3$: a) synteza własna b) Wang C. i inni, Journal of Rare Earths (2018) 36(3) 298-303 [287].	110
Rys. 27. Widmo ATR-FTIR polidopaminy.	111
Rys. 28. Kinetyka polimeryzacji polimeru gwiaździstego STR przedstawiona jako zależność a) stopnia konwersji wiązań podwójnych $C=C$ wyznaczonego metodą 1H NMR oraz b) masy cząsteczkowej oznaczonej metodą GPC od czasu prowadzenia reakcji polimeryzacji.	112
Rys. 29. Widmo 1H NMR dla STR zmierzone w D_2O w temperaturze 295K.	113
Rys. 30. Widma 1H DOSY NMR STR (niebieski) i $PEG_{45}MEM$ (czerwony) zmierzone w D_2O w temperaturze 295K.	114
Rys. 31. Kinetyka polimeryzacji polimeru gwiaździstego STR-D-EU-MAA przedstawiona jako zależność a) stopnia konwersji wiązań podwójnych $C=C$ wyznaczonego metodą 1H NMR oraz b) masy cząsteczkowej oznaczonej metodą GPC od czasu prowadzenia reakcji polimeryzacji.	115
Rys. 32. Kinetyka polimeryzacji polimeru gwiaździstego STR-EU-MAA przedstawiona jako zależność a) stopnia konwersji wiązań podwójnych $C=C$ wyznaczonego metodą 1H NMR oraz b) masy cząsteczkowej oznaczonej metodą GPC od czasu prowadzenia reakcji polimeryzacji.	116
Rys. 33. Charakterystyka otrzymanych polimerów gwiaździstych: a) masa cząsteczkowa oznaczona metodą GPC i b) średnica cząsteczek polimerów gwiaździstych oznaczona metodą DLS.	116
Rys. 34. Widmo 1H NMR dla STR-D-EU-MAA zmierzone w $CDCl_3$ w temperaturze 295K.	118
Rys. 35. Widmo 1H NMR dla STR-EU-MAA zmierzone w $CDCl_3$ w temperaturze 295K.	118
Rys. 36. Widma 1H DOSY NMR STR-EU-MAA (niebieski) i $PEG_{45}MEM$ (czerwony) zmierzone w D_2O w temperaturze 295K.	119
Rys. 37. Wpływ polimeru gwiaździstego STR-EU-MAA na żywotność komórek bakteryjnych E. coli ($n = 3$).	120
Rys. 38. Kinetyka polimeryzacji polimerów gwiaździstych: a) STR-AMP- PEG_4 -PMMA ₂₀₀₀ ; b) STR-AMP- PEG_4 -PMMA ₇₀₀₀ i c) STR-AMP- PEG_4 -PMMA, przedstawiona jako zależność masy cząsteczkowej oznaczonej metodą GPC od czasu prowadzenia reakcji polimeryzacji.	122
Rys. 39. Masy cząsteczkowe polimerów gwiaździstych z AMP oznaczona metodą GPC.	122
Rys. 40. Wpływ STR-AMP- PEG_4 -PMMA ₇₀₀₀ i STR-AMP- PEG_4 -PMMA na żywotność komórek bakteryjnych E. coli ($n = 3$).	123
Rys. 41. Kinetyka polimeryzacji polimeru gwiaździstego STR- $Gd(MAA)_3$ przedstawiona jako zależność masy cząsteczkowej oznaczonej metodą GPC od czasu prowadzenia reakcji polimeryzacji.	125
Rys. 42. Masa cząsteczkowa polimeru gwiaździstego z $Gd(MAA)_3$ oznaczona metodą GPC.	126
Rys. 43. Czas T_1 dla roztworów STR- $Gd(MAA)_3$ o stężeniu od 0,75 mg/ml do 6 mg/ml, w temperaturze pokojowej, przy częstotliwościach 16,5 MHz.	126
Rys. 44. Widma ATR-FTIR polimeru gwiaździstego STR i kompleksu STR:EU (stosunek molowy 1:20).	128
Rys. 45. Widma 1H NMR STR:EU zmierzone w $CDCl_3$ (czarny) i D_2O (czerwony) w temperaturze 295K.	129

Rys. 46. Widmo ^1H NMR 2D NOESY próbki STR:EU w roztworze D_2O zmierzone w temperaturze 295K przy czasie mieszania 600 ms. Po prawej stronie znajdują się widma wycinków 1D wyodrębnione z sygnałów polimeru gwiaździstego „2” (różowy), „7” (czerwony) i „3” (niebieski) widma NOESY.	130
Rys. 47. Wpływ kompleksu STR:EU na żywotność komórek bakteryjnych <i>E. coli</i> ($n = 3$).	131
Rys. 48. Widma ATR-FTIR kompleksu: a) STR:RIF i b) STR–EU-MAA:RIF (stosunek molowy 1:5).	132
Rys. 49. Wpływ kompleksów STR:RIF i STR–EU-MAA:RIF na żywotność <i>E. coli</i> ($n = 3$).	133
Rys. 50. Widma ATR-FTIR dla kompleksu: a) STR:AMP i b) STR–EU-MAA:AMP (stosunek molowy 1:7).	134
Rys. 51. Widma UV-Vis otrzymane podczas procesu redukcji jonów srebra w roztworze H_2O -Ace na a) STR_1 i c) STR_2 oraz zależność maksymalnej absorbancji pików charakterystycznych dla nanocząstek srebra od czasu dla różnych roztworów: b) STR i STR_1 oraz d) STR_2 i STR_3 [312].	137
Rys. 52. Schemat procesu tworzenia nanocząstek srebra poprzez redukcję jonów srebra Ag^+ na monomerze DMAEMA wbudowanym w strukturę polimeru gwiaździstego [312].	138
Rys. 53. Widma UV-Vis roztworów polimerów gwiaździstych po procesie redukcji jonów Ag^+ : a) STR; b) STR_1; c) STR_2 i d) STR_3 w różnych rozpuszczalnikach [312].	140
Rys. 54. Obrazy TEM cząstek AgNPs zredukowane na STR_3 w: H_2O -Ace (a, b), EtOH-Ace (c) i EtOH (d), a także STR_2 w: H_2O -Ace (e), EtOH-Ace (f) i EtOH (g) [312].	141
Rys. 55. Rozkład wielkości cząstek obliczony na podstawie obrazów TEM cząstek AgNPs rozproszonych w różnych roztworach STR_2 i STR_3: H_2O -Ace, EtOH-Ace i EtOH [312].	141
Rys. 56. Zależność maksymalnej absorbancji pików charakterystycznych dla nanocząstek srebra od czasu prowadzenia procesu redukcji dla polimerów gwiaździstych STR, STR_1 i STR–D–EU-MAA w rozpuszczalniku EtOH-Ace.	142
Rys. 57. Widma UV-Vis roztworów polimerów gwiaździstych (STR, STR_1, STR–D–EU-MAA) w EtOH-Ace po procesie redukcji jonów srebra.	143
Rys. 58. Widma UV-Vis wolnego EU w etanolu i kompleksu CP:EU 1:1 1 mg/ml w ultraczystej wodzie. $[\text{EU}] = 468,4 \mu\text{M}$	144
Rys. 59. Rozmiar (lub D_H) i ζ -potencjał (w rogu) kompleksu CP:EU 1:1 w ultraczystej wodzie o stężeniu 1 mg/ml.	145
Rys. 60. Wpływ kompleksu CP:EU na żywotność komórek bakteryjnych <i>E. coli</i> ($n = 3$).	145
Rys. 61. Wytrzymałość na ściskanie (σ) cementów kostnych o różnym składzie kompozycji utwardzalnej przedstawionym w tabeli 8 ($n = 5$).	148
Rys. 62. Krzywe kinetyczne polimeryzacji kompozycji cementu kostnego zawierających różne ilości nadtlenu BPO i 0,5 %mas. reduktora DMA w funkcji a) szybkości polimeryzacji (R_p) od czasu reakcji (t) i (b) R_p od stopnia przereagowania wiązań podwójnych (p).	152
Rys. 63. Krzywe kinetyczne polimeryzacji kompozycji cementu kostnego (linia zielona) i mieszaniny monomerów (linia granatowa) zawierającej 0,5 %mas. koinicjatora DMA i 0,1 %mas. inicjatora BPO w funkcji szybkości polimeryzacji (R_p) od (a) czasu reakcji (t).	153
Rys. 64. Krzywe kinetyczne polimeryzacji kompozycji cementu kostnego zawierających różne ilości koinicjatora DMA i 0,3 %mas. inicjatora BPO w funkcji a) szybkości polimeryzacji (R_p) od czasu reakcji (t) i (b) R_p od stopnia przereagowania wiązań podwójnych (p).	154
Rys. 65. Krzywe kinetyczne polimeryzacji kompozycji cementu kostnego zawierających różne stężenia składników systemu inicjującego w funkcji a) szybkości polimeryzacji (R_p) od czasu reakcji (t) i (b) R_p od stopnia przereagowania wiązań podwójnych (p).	155

Rys. 66. Doughing time (t_D) cementów kostnych zawierających (a) 0,5 %mas. DMA i różne ilości inicjatora BPO; (b) 0,3 %mas. BPO i różne stężenia koinicjatora DMA oraz (c) różne ilości systemu inicjującego (n = 4).	157
Rys. 67. Wytrzymałość na ściskanie (σ) cementów kostnych zawierających (a) 0,5 %mas. DMA i różne ilości inicjatora BPO; (b) 0,3 %mas. BPO i różne stężenia reduktora DMA oraz (c) różne ilości składników systemu inicjującego (n = 5). Minimalna wartość wytrzymałości na ściskanie określona przez normę ISO 5833:2002 (70 MPa) została oznaczona na wykresach jako czerwona linia.	158
Rys. 68. Doughing time (t_D) badanych cementów kostnych: niemodyfikowanego (BC) oraz modyfikowanych dodatkiem ampicyliny (BC_AMP) lub ryfampicyny BC_RIF (n = 4).	160
Rys. 69. Krzywe temperatury polimeryzacji kompozycji cementu kostnego niemodyfikowanego (BC) oraz modyfikowanych dodatkiem ampicyliny (BC_AMP) lub ryfampicyny BC_RIF w funkcji czasu (n = 3).	161
Rys. 70. Wytrzymałość na ściskanie (σ) cementów kostnych: niemodyfikowanego BC i modyfikowanych ampicyliną BC_AMP lub ryfampicyną BC_RIF (n = 5).	163
Rys. 71. Wpływ cementu kostnego modyfikowanego AMP lub RIF na żywotność E. coli (n = 3).	164
Rys. 72. Doughing time (t_D) badanych cementów kostnych: niemodyfikowanego BC i modyfikowanych kompleksem STR:RIF i STR-EU-MAA:RIF (n = 4).	166
Rys. 73. Krzywe temperatury polimeryzacji dla kompozycji cementu kostnego przed modyfikacją oraz modyfikowanego dodatkiem kompleksu STR:RIF i STR-EU-MAA:RIF w funkcji czasu (n = 3).	166
Rys. 74. Wytrzymałość na ściskanie cementu kostnego niemodyfikowanego BC i modyfikowanego kompleksami STR:RIF i STR-EU-MAA:RIF (n = 5).	167
Rys. 75. Profile uwalniania ryfampicyny z cementów kostnych modyfikowanych antybiotykiem RIF oraz kompleksami STR:RIF i STR-EU-MAA:RIF (n=3).	169
Rys. 76. Wpływ cementu kostnego zmodyfikowanego STR:RIF i STR-EU-MAA:RIF na żywotność E. coli (n = 3).	170
Rys. 77. Wytrzymałość na ściskanie (σ) cementów kostnych niemodyfikowanych (BC i Palacos R - PR) i modyfikowanych kompleksami STR:AMP i STR-EU-MAA:AMP.	171
Rys. 78. Wpływ cementu kostnego PR zmodyfikowanego kompleksami STR:AMP i STR-EU-MAA:AMP na żywotność E. coli (n = 3).	172
Rys. 79. Wytrzymałość na ściskanie (σ) cementu kostnego Palacos R (PR) niemodyfikowanego i modyfikowanego polimerami gwiazdzistymi STR-AMP-PEG ₄ -PMMA ₂₀₀₀ , STR-AMP-PEG ₄ -PMMA ₇₀₀₀ i STR-AMP-PEG ₄ -PMMA.	173
Rys. 80. Wpływ cementu kostnego modyfikowanego polimerami gwiazdzistymi STR-AMP-PEG ₄ -PMMA ₂₀₀₀ , STR-AMP-PEG ₄ -PMMA ₇₀₀₀ i STR-AMP-PEG ₄ -PMMA na żywotność E. coli po 24h inkubacji (n = 3).	174
Rys. 81. Doughing time (t_D) badanych cementów kostnych niemodyfikowanych i modyfikowanych eugenolem zawierających różne stężenie systemu inicjującego (n = 4).	176
Rys. 82. Wytrzymałość na ściskanie cementów kostnych niemodyfikowanych i modyfikowanych eugenolem różniących się stężeniem systemu inicjującego (n = 5).	178
Rys. 83. Zdjęcia SEM wybranych cementów kostnych (BPO 0,3 %mas. i DMA 0,5 %mas.) modyfikowanych eugenolem (a,b) i niemodyfikowanych (c,d), wykonane przy różnych powiększeniach [345].	179
Rys. 84. Profile uwalniania eugenolu z cementów kostnych zawierających w składzie różne ilości systemu inicjującego wyrażone jako: a) całkowita masa uwolnionego EU, b) całkowita ilość uwolnionego EU (n = 3).	180

Rys. 85. Wpływ cementów kostnych modyfikowanych i niemodyfikowanych eugenolem zawierających różne stężenie systemu inicjującego na wzrost bakterii: a) dla szczepu <i>E. coli</i> ; b) dla szczepu <i>S. aureus</i> (n = 3).	181
Rys. 86. Doughing time (min) dla badanych cementów kostnych niemodyfikowanego i modyfikowanego kompleksem STR:EU lub CP:EU (n = 4).	182
Rys. 87. Zależność temperatury polimeryzacji od czasu dla kompozycji cementu kostnego niemodyfikowanego i modyfikowanego dodatkiem kompleksu STR:EU lub CP:EU (n = 3).	183
Rys. 88. Wytrzymałość na ściskanie cementu kostnego niemodyfikowanego i modyfikowanego kompleksem STR:EU lub CP:EU (n = 5).	184
Rys. 89. Profile uwalniania eugenolu z cementów kostnych zawierających w składzie kompleksy STR:EU lub CP:EU wyrażone jako: a) całkowita masa uwolnionego EU, b) całkowita ilość uwolnionego EU (n = 3).	185
Rys. 90. Wpływ cementu kostnego modyfikowanego dodatkiem kompleksu STR:EU lub CP:EU na żywotność <i>E. coli</i> (n = 3).	186
Rys. 91. Doughing time (t_D) dla badanych cementów kostnych niemodyfikowanego i modyfikowanego: EU (BC+EU) oraz pochodnymi eugenolu (BC+EU-MAA i BC+EU-T2).	188
Rys. 92. Krzywe kinetyczne procesu utwardzania cementów kostnych zawierających różne stężenie systemu inicjującego modyfikowanych dodatkiem a) EU-MAA; b) EU-T2.	190
Rys. 93. Zależność szybkości polimeryzacji R_p od czasu (a, c) lub od stopnia konwersji wiązań podwójnych (b, d) dla niemodyfikowanego cementu kostnego i cementu modyfikowanego EU-MAA lub EU-T2, zawierającego 0,7% BPO (a, b) lub 1% BPO (c, d).	191
Rys. 94. Wytrzymałość na ściskanie (σ) cementów kostnych: niemodyfikowanego oraz modyfikowanych eugenolem i pochodnymi eugenolu: EU-MAA i EU-T2.	194
Rys. 95. Schematyczna struktura sieci polimerowej cementu kostnego z kowalencyjnie wbudowanymi pochodnymi eugenolu: a) EU-MAA; b) EU-T2.	195
Rys. 96. Zdjęcia mikroskopowe SEM cementu kostnego: a) niemodyfikowanego, i cementu kostnego modyfikowanego b) EU-MAA i c) EU-T2.	196
Rys. 97. Żywotność komórek bakteryjnych <i>E. coli</i> po 24 godzinach inkubacji w obecności cementów kostnych modyfikowanych pochodnymi EU-MAA lub EU-T2.	197
Rys. 98. Doughing time (t_D) niemodyfikowanego cementu kostnego i modyfikowanego dodatkiem polimerów gwiaździstych STR-D-EU-MAA i STR-EU-MAA (n = 4).	198
Rys. 99. Krzywe temperatury utwardzania, jako zależność temperatury od czasu, kompozycji cementu kostnego niemodyfikowanego oraz modyfikowanego polimerami gwiaździstymi STR-D-EU-MAA i STR-EU-MAA (n = 3).	199
Rys. 100. Wytrzymałość na ściskanie cementu kostnego niemodyfikowanego i modyfikowanego polimerami gwiaździstymi STR-D-EU-MAA i STR-EU-MAA: (n = 5).	200
Rys. 101. Wpływ cementu kostnego modyfikowanego polimerem gwiaździstym STR-EU-MAA na żywotność <i>E. coli</i> (n = 3).	201
Rys. 102. Doughing time (t_D) badanych cementów kostnych bez dodatku antybiotyku (BC), z dodatkiem ampicyliny (BC_AMP), z dodatkiem ryfampicyny (BC_RIF) modyfikowanych EU, EU-MAA lub EU-T2 (n = 4).	203
Rys. 103. Wytrzymałość na ściskanie cementów kostnych niemodyfikowanego (BC) lub z dodatkiem antybiotyków AMP i RIF modyfikowanych dodatkiem EU, EU-MAA i EU-T2 (n = 5).	205

Rys. 104. Wpływ cementu kostnego modyfikowanego dodatkiem antybiotyków i eugenolu lub pochodnych eugenolu na żywotność komórek bakteryjnych <i>E. coli</i> (n = 3).	206
Rys. 105. Krzywe temperatury polimeryzacji dla kompozycji cementu kostnego przed modyfikacją oraz modyfikowanego STR–AgNPs w funkcji czasu (n = 3).	208
Rys. 106. Wytrzymałość na ściskanie (σ) cementu kostnego niemodyfikowanego (BC) i modyfikowanego kompleksami polimerów gwiaździstych (o różnej budowie) z nanocząstkami srebra STR–AgNPs.	208
Rys. 107. Wpływ cementu kostnego modyfikowanego dodatkiem kompleksów polimerów gwiaździstych (o różnej budowie) z nanocząstkami srebra STR–AgNPs na żywotność komórek bakteryjnych: a) <i>E. coli</i> i b) <i>S. aureus</i> (n = 3).	209
Rys. 108. Zależność temperatury utwardzania cementu kostnego Refobacin Plus niemodyfikowanego i modyfikowanego polimerami gwiaździstymi STR–AgNPs o różnej budowie od czasu prowadzenia procesu (n = 3).	210
Rys. 109. Wytrzymałość na ściskanie (σ) cementu kostnego Refobacin Plus niemodyfikowanego i modyfikowanego polimerami gwiaździstymi STR–AgNPs o różnej budowie.	212
Rys. 110. Uwalnianie gentamycyny z cementu kostnego Refobacin Plus niemodyfikowanego i modyfikowanego dodatkiem kompleksów polimerów gwiaździstych z nanocząstkami srebra: STR–D–EU–MAA–AgNPs, STR–AgNPs i STR_1–AgNPs.	213
Rys. 111. Doughing time (min) dla badanych cementów kostnych modyfikowanych $Gd(MAA)_3$ i STR– $Gd(MAA)_3$ (n = 4).	214
Rys. 112. Krzywe temperatury polimeryzacji kompozycji cementów kostnych modyfikowanych $Gd(MAA)_3$ i STR– $Gd(MAA)_3$ w funkcji czasu (n = 3).	215
Rys. 113. Wytrzymałość na ściskanie (σ) niemodyfikowanego cementu kostnego PR i modyfikowanego dodatkiem monomeru $Gd(MAA)_3$ lub polimeru gwiaździstego STR– $Gd(MAA)_3$ (n = 5).	216
Rys. 114. Zależność temperatury utwardzania cementów kostnych modyfikowanych SF oraz $Gd(MAA)_3$ lub polimerem gwiaździstym STR– $Gd(MAA)_3$ monomerem od czasu (n = 3).	217
Rys. 115. Wytrzymałość na ściskanie (σ) cementu kostnego modyfikowanego dodatkiem SF oraz monomerem $Gd(MAA)_3$ lub polimerem gwiaździstym STR– $Gd(MAA)_3$ (n = 5).	218
Rys. 116. Obrazy MRI cementów kostnych modyfikowanych $Gd(MAA)_3$ z różną zawartością soli fizjologicznej: a) 5%, b) 10%, c) 20%.	219
Rys. 117. Obrazy MRI cementów kostnych modyfikowanych $Gd(MAA)_3$ z różną zawartością soli fizjologicznej: a) 5%, b) 10%, c) 20%, w otoczeniu wodnym	219
Rys. 118. Obrazy MRI cementów kostnych modyfikowanych STR– $Gd(MAA)_3$ z różną zawartością soli fizjologicznej: a) 10%, b) 10% (stężenie polimeru gwiaździstego - 11,20 mg/ml), c) 20%.	219
Rys. 119. Obrazy MRI cementów kostnych modyfikowanych STR– $Gd(MAA)_3$ z różną zawartością soli fizjologicznej: a) 10%, b) 10% (stężenie polimeru gwiaździstego - 11,20 mg/ml), c) 20, w otoczeniu wodnym.	220
Rys. 120. Zależność temperatury utwardzania od czasu dla kompozycji cementów kostnych: a) BC i b) PR modyfikowanych dodatkiem PDA (n = 3).	221
Rys. 121. Zależność temperatury od czasu dla kompozycji cementów kostnych: a) PR+G i b) Copal G+C modyfikowanych dodatkiem PDA (n = 3).	222
Rys. 122. Wytrzymałość na ściskanie (σ) cementu kostnego: a) BC oraz b) PR niemodyfikowanego i modyfikowanego dodatkiem PDA (n = 5).	224

Rys. 123. Wytrzymałość na ściskanie (σ) cementu kostnego: a) PR+G oraz b) Copal G+C niemodyfikowanego i modyfikowanego dodatkiem PDA ($n = 5$).	224
Rys. 124. Uwalnianie gentamycyny z cementu kostnego: a) PR+G oraz b) Copal G+C niemodyfikowanego i modyfikowanego PDA.	226
Rys. 125. Wpływ cementu kostnego Copal G+C i cementu kostnego modyfikowanego 0,1 %mas. – 1 %mas. PDA na wzrost <i>S. aureus</i>	227
Rys. 126. Żywotność komórek Hep2G po działaniu cementu kostnego Copal G+C i Copal G+C modyfikowanego 0,1 %mas., 0,2 %mas., 0,5 %mas. i 1 %mas. PDA.	227

Spis tabel

Tab. 1. Dane ^1H i ^{13}C NMR uzyskane dla EU-MAA, w tym kluczowe korelacje wyznaczone z widm ^1H - ^{13}C HSQC i ^1H - ^{13}C HMBC.	98
Tab. 2. Dane ^1H i ^{13}C NMR uzyskane dla EU-T2, w tym kluczowe korelacje wyznaczone z widm ^1H - ^{13}C HSQC i ^1H - ^{13}C HMBC.	101
Tab. 3. Stopień konwersji monomeru, masa cząsteczkowa (względna liczbowo średnia masa cząsteczkowa - $M_{n,app}$, absolutna masa cząsteczkowa - $M_{n,abs}$) oraz dyspersyjność $\bar{D}$ otrzymanych polimerów liniowych PMMA.	103
Tab. 4. Stopień konwersji monomeru, masa cząsteczkowa (względna liczbowo średnia masa cząsteczkowa - $M_{n,app}$, absolutna masa cząsteczkowa - $M_{n,abs}$), dyspersyjność - $\bar{D}$, liczba ramion i rozmiar otrzymanych polimerów gwiazdzystych (podstawowego i modyfikowanych monomerem EU-MAA).	116
Tab. 5. Stopień konwersji monomeru, masa cząsteczkowa (względna liczbowo średnia masa cząsteczkowa - $M_{n,app}$, absolutna masa cząsteczkowa - $M_{n,abs}$), dyspersyjność - $\bar{D}$, liczba ramion i rozmiar otrzymanych polimerów gwiazdzystych modyfikowanych ampiciliną.	121
Tab. 6. Stopień konwersji monomeru, masa cząsteczkowa (względna liczbowo średnia masa cząsteczkowa - $M_{n,app}$, absolutna masa cząsteczkowa - $M_{n,abs}$), dyspersyjność - $\bar{D}$, liczba ramion i rozmiar otrzymanego polimeru gwiazdzystego modyfikowanego $\text{Gd}(\text{MAA})_3$	126
Tab. 7. Stopień konwersji monomeru, masa cząsteczkowa (względna liczbowo średnia masa cząsteczkowa - $M_{n,app}$, absolutna masa cząsteczkowa - $M_{n,abs}$), dyspersyjność - $\bar{D}$ oraz ilość ramion i rozmiar otrzymanych polimerów gwiazdzystych.	136
Tab. 8. Skład badanych kompozycji cementu kostnego.	147
Tab. 9. Charakterystyczne parametry utwardzania cementów kostnych – doughing time t_D , maksymalna temperatura T_{max} , temperatura T_{set} oraz czas t_{set} utwardzania, wytrzymałość na ściskanie σ	162
Tab. 10. Charakterystyczne parametry utwardzania cementów kostnych – doughing time t_D , maksymalna temperatura T_{max} , temperatura T_{set} oraz czas t_{set} utwardzania, wytrzymałość na ściskanie σ	167
Tab. 11. Charakterystyczne parametry utwardzania badanych cementów kostnych niemodyfikowanych i modyfikowanych eugenolem: maksymalna temperatura utwardzania T_{max} , temperatura wiązania T_{set} i czas wiązania t_{set} ($n=4$).	177
Tab. 12. Charakterystyczne parametry utwardzania cementów kostnych – doughing time t_D , maksymalna temperatura T_{max} , temperatura T_{set} oraz czas t_{set} utwardzania, wytrzymałość na ściskanie σ	183
Tab. 13. Charakterystyczne parametry utwardzania badanych cementów kostnych niemodyfikowanych i modyfikowanych eugenolem: maksymalna temperatura utwardzania T_{max} , temperatura wiązania T_{set} i czas wiązania t_{set} ($n = 4$).	189

Tab. 14. Stopień przereagowania wiązań podwójnych C=C wyznaczony metodą ATR-FTIR ($p_{\text{ATR-FTIR}}$) po czasie utwardzania próbki 30/90 min i 24 godzinach.	191
Tab. 15. Charakterystyczne parametry utwardzania cementów kostnych – doughing time t_D , maksymalna temperatura T_{max} , temperatura T_{set} oraz czas t_{set} utwardzania, wytrzymałość na ściskanie σ	199
Tab. 16. Charakterystyczne parametry utwardzania cementów kostnych – doughing time t_D , maksymalna temperatura T_{max} , temperatura T_{set} oraz czas t_{set} utwardzania, wytrzymałość na ściskanie σ	204
Tab. 17. Charakterystyczne parametry utwardzania cementów kostnych – doughing time t_D , maksymalna temperatura T_{max} , temperatura T_{set} oraz czas t_{set} utwardzania, wytrzymałość na ściskanie σ	208
Tab. 18. Charakterystyczne parametry utwardzania cementów kostnych – doughing time t_D , maksymalna temperatura T_{max} , temperatura T_{set} oraz czas t_{set} utwardzania, wytrzymałość na ściskanie σ	211
Tab. 19. Charakterystyczne parametry utwardzania cementów kostnych – doughing time t_D , maksymalna temperatura T_{max} , temperatura T_{set} oraz czas t_{set} utwardzania, wytrzymałość na ściskanie σ	215
Tab. 20. Charakterystyczne parametry utwardzania cementów kostnych – doughing time t_D , maksymalna temperatura T_{max} , temperatura T_{set} oraz czas t_{set} utwardzania.	217
Tab. 21. Charakterystyczne parametry utwardzania cementów kostnych – doughing time t_D , maksymalna temperatura T_{max} , temperatura T_{set} oraz czas t_{set} utwardzania, wytrzymałość na ściskanie σ	221
Tab. 22. Charakterystyczne parametry utwardzania cementów kostnych – doughing time t_D , maksymalna temperatura T_{max} , temperatura T_{set} oraz czas t_{set} utwardzania, wytrzymałość na ściskanie σ	222

Dorobek naukowy

Przebieg kształcenia

Studia inżynierskie	2016 – 2020
Politechnika Poznańska, Wydział Technologii chemicznej	
Kierunek studiów: <i>Technologia chemiczna</i>	
Studia magisterskie	2020 – 2021
Politechnika Poznańska, Wydział Technologii chemicznej	
Kierunek studiów: <i>Technologia chemiczna</i>	
Specjalizacja: <i>Technologia polimerów</i>	

Publikacje naukowe

- G. Przestawski**, K. Szcześniak, B. Grześkowiak, A. Mazzaglia, M. Jarzębski, A. Niewczas, P. Kuczyński, A. Zarębska-Mróż, A. Marcinkowska, Modification of methacrylate bone cement with eugenol – A new material with antibacterial properties, *REVIEWS ON ADVANCED MATERIALS SCIENCE*, 2024, vol. 63, no. 1, pp. 20230171. IF = 3,6; MNiSW = 100
- G. Przestawski**, K. Szcześniak, P. Gajewski, A. Marcinkowska, Influence of Initiator Concentration on the Polymerization Course of Methacrylate Bone Cement, *Polymers*, 2022, vol. 14, iss. 22, s. 5005-1 - 5005-13. IF = 4,9; MNiSW = 100
- K. Szcześniak, **G. Przestawski**, J. Kotecki, W. Andrzejewska, K. Fiedorowicz, M. Woźniak-Budych M. Jarzębski, P. Gajewski, A. Marcinkowska Star Polymers as a Reducing Agent of Silver Salt and a Carrier for Silver Nanoparticles, *Materials*, 2025, 18(13), 3009. IF = 3,2; MNiSW = 140

J. Szymańska, D. Tomczak, **G. Przestawski**, S. Borysiak, Management of waste fly ash as an epoxy resin filler, *Polimery*, 2025, 70(1), 40–49. IF = 0,8; MNiSW = 70

G. Przestawski, K. Szczśniak, A. Mazzaglia, N. Burduja, W. Smutek, P. Gajewski, A. Marcinkowska, A β -cyclodextrin-eugenol complex as a modifier of methacrylate bone cement, *Journal of Biomedical Materials Research: Part B - Applied Biomaterials*. IF = 3,4; MNiSW = 140 – *after review*

G. Przestawski, K. Szczśniak, Ł. Popenda, P. Gajewski, W. Smutek, A. Marcinkowska, Can the Addition of Antibacterial Eugenol Derivatives Lower the Setting Temperature of Bone Cement?, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. IF = 3,1; MNiSW = 100 – *under review*

M.A. Weerasinghe, N. Sachini, L. Trachsel, **G. Przestawski**, J. Sobieski, P. McBeth, M. Mancini, R. Lama, T. Nwoko, M. Paeth, K. Matyjaszewski, D. Konkolewicz, Redefining the Limits: Atom transfer radical polymerization of vinyl ketone monomers under light, *Journal of the American Chemical Society*. IF = 15,6; MNiSW = 200 – *under review*

Rozdziały w monografii naukowej

G. Przestawski, A. Mazzaglia, K. Szczśniak, A. Marcinkowska, *Uwalnianie Eugenolu z metakrylowych cementów kostnych*, BioOrg 2022 - IV Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów: materiały konferencyjne, 2022, 504 - 507

G. Przestawski, K. Szczśniak, A. Marcinkowska, *Wpływ metakryloksy-POSS i długości łańcucha metakrylanu glikolu polietylenowego na właściwości akrylowego cementu kostnego*, Najnowsze doniesienia z inżynierii materiałowej, 2022, 58 – 73

G. Przestawski, K. Szczśniak, A. Marcinkowska, *Charakterystyka metakrylowych cementów kostnych modyfikowanych poliedrycznymi oligomerycznymi silseskwiksanami (POSS)*, Młodzi naukowcy 2.0. T. 2, red. Jarosław Korpysa, Paulina Niedźwiecka-Rystwej, Artur Łabuza, Patrycja Bełtowska - Szczecin, Polska: Fundacja Centrum Badań Socjologicznych, 2022 - s. 64-67

Konferencje naukowe o zasięgu krajowym i międzynarodowym

G. Przestawski, K. Szczśniak, R. Konefał, K. Matyjaszewski, A. Marcinkowska, *A star polymer-eugenol complex as a potential modifier of methacrylate bone cement*, Zjazd Zimowy Sekcji Młodych Polskiego Towarzystwa Chemicznego 2024: książka abstraktów, red. Daria Jaworska-Krych, Agnieszka Siwiak - Lublin, Polska : Uniwersytet im. Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, 2024 - s. 114 – **poster**

G. Przestawski, A. Bloch, J. Kotecki, K. Szczśniak, A. Marcinkowska, *Gwiazdy polimerowe jako nośniki nanocząstek srebra w cementach kostnych*, 66. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego. Materiały zjazdowe, streszczenia, 2024 - s. 557 – **poster**

G. Przestawski, D. Tomczak, J. Szymańska, K. Szczśniak, A. Marcinkowska, *Impact of industrial incinerator ash on the polymerization kinetics of epoxy resins*, 5th International Conference Strategies toward Green Deal Implementation: Water, Raw Materials & Energy in Green Transition, 27-29 November 2024 : abstract book, red. Marzena Smol - Kraków, Polska: Publishing House Mineral and Energy Economy Research Institute Polish Academy of Sciences, 2024 - s. 167 – **poster**

G. Przesławski, K. Szczesniak, A. Marcinkowska, *Influence of addition of hydroxyapatite on the properties of methacrylic bone cements*, V Pomorskie Studenckie Sympozjum Chemiczne: książka abstraktów, 2023 - s. 67 – **poster**

G. Przesławski, K. Szczesniak, A. Marcinkowska, *Pochodna eugenolu jako modyfikator cementów kostnych*, 65. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 18-22.09.2023, Toruń: książka abstraktów - Toruń, Polska: Polskie Towarzystwo Chemiczne, 2023 - s. 422 – **poster**

G. Przesławski, K. Szczesniak, A. Marcinkowska, *Wpływ dodatku hydroksyapatytu na właściwości metakrylowych cementów kostnych*, 65. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 18-22.09.2023, Toruń : książka abstraktów - Toruń, Polska: Polskie Towarzystwo Chemiczne, 2023 - s. 421 – **poster**

G. Przesławski, K. Szczesniak, A. Marcinkowska, *Charakterystyka metakrylowych cementów kostnych modyfikowanych poliedrycznymi oligomerycznymi silseskwioksanami (POSS)*, II Międzynarodowa Multidyscyplinarna Konferencja Doktorantów Uniwersytetu Szczecińskiego MKDUS 2.0: księga abstraktów. Tom 1 - Panel zielony - dyscypliny: matematyka, nauki biologiczne, nauki chemiczne, nauki fizyczne, nauki medyczne, nauki o Ziemi i środowisku, nauki o kulturze fizycznej, nauki socjologiczne. Szczecin, 22-24 czerwca 2022, red. Paulina Niedźwiecka-Rystwej, Hubert Kocur - Szczecin, Polska: Uniwersytet Szczeciński, 2022 - s. 33 – **wykład sekcynyjny**

G. Przesławski, K. Szczesniak, A. Marcinkowska, *Wpływ długości łańcucha dimetakrylanu glikolu polietylenowego na właściwości mechaniczne klejów kostnych*, IV Pomorskie Studenckie Sympozjum Chemiczne: księga abstraktów. Ogólnopolska konferencja online, 23-24.04.2022r. - Gdańsk, Polska , 2022 - s. 38 – **wykład sekcynyjny**

G. Przesławski, K. Szczesniak, A. Marcinkowska, *Wpływ długości łańcucha metakrylanu glikolu polietylenowego na właściwości mechaniczne klejów kostnych*, V Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Biopolimery – źródło nowych materiałów”. Abstrakty, red. Monika Maciąg, Alicja Danielewska - Lublin, Polska: Fundacja na rzecz promocji nauki i rozwoju TYGIEL, 2022 - s. 31-32 – **wykład sekcynyjny**

K. Szczesniak, **G. Przesławski**, W. Andrzejewska, J. Kotecki, K. Fiedorowicz, P. Gajewski, A. Marcinkowska, *In situ synthesis of silver nanoparticles on star polymers for biomedical surface applications*, The 38th European Conference on Surface Science, książka abstraktów, Organizing Committee of ECOS-38 and Authors, Braga, Portugalia, 2025, s. 423 – **poster**

K. Szczesniak, **G. Przesławski**, A. Marcinkowska, *Methacrylic bone cements modified with CAPTISOL-Eugenol complex*, NanoTech Poland 2023, 14th-16th June 2023, Poznań, Poland. Book of abstracts., 2023 - s. 177 – **poster**

K. Szczesniak, **G. Przesławski**, A. Marcinkowska, *Influence of poly(ethylene glycol) dimethacrylate chain length on properties of bone adhesives*, 19th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies : live - 5-8 July Thessaloniki, Greece; virtual - via video conferencing system: book of abstracts, 2022 - s. 159 – **poster**

D. Tomczak, J. Szymańska, **G. Przesławski**, D. Zielińska, *Charakterystyka właściwości mechanicznych kompozytów z żywicy chemoutwardzalnej i popiołów ze spalarni*, XI Kongres Technologii Chemicznej. Materiały konferencyjne, red. Robert Frankowski (WTCH) - Poznań, Polska: Politechnika Poznańska. Wydział Technologii Chemicznej, 2024 - s. 166 – **poster**

J. Szymańska, D. Tomczak, **G. Przesławski**, *Epoxy resin composites with waste ash fillers*, 5th International Conference Strategies toward Green Deal Implementation: Water, Raw Materials & Energy in Green Transition, 27-29 November 2024: abstract book, red. Marzena Smol - Kraków, Polska: Publishing House Mineral and Energy Economy Research Institute Polish Academy of Sciences, 2024 - s. 216 – **poster**

D. Tomczak, J. Szymańska, **G. Przesławski**, *Polymer composites as a way to manage ash from waste incineration*, 5th International Conference Strategies toward Green Deal Implementation: Water, Raw Materials & Energy in Green Transition, 27-29 November 2024: abstract book, red. Marzena Smol - Kraków, Polska: Publishing House Mineral and Energy Economy Research Institute Polish Academy of Sciences, 2024 - s. 214 – **poster**

J. Szymańska, D. Tomczak, D. Zielińska, **G. Przesławski**, *Odpadowe popioły lotne jako wypełniacze kompozytów polimerowych*, XI Kongres Technologii Chemicznej, Materiały konferencyjne, red. Robert Frankowski - Poznań, Polska: Politechnika Poznańska. Wydział Technologii Chemicznej, 2024 - s. 162 – **poster**

K. Szcześniak, J. Piasecka, A. Fijałkowska, M. Długosz, **G. Przesławski**, J. Litowczenko-Cybulska, P. Gajewski, M. Robakowska, A. Marcinkowska, *Synthesis and characterization of conductive cell-carrying scaffolds for applications in regenerative medicine*, NanoTech Poland 2022. Book of abstracts, 1st-3rd June 2022, Poznań, Poland, 2022 - s. 183 – **poster**

Stáže naukowe

Carnegie Mellon University (CMU), 4.03.2024 – 4.06.2024
Mellon Institute, Department of Chemistry,
Center for Macromolecular Engineering, Matyjaszewski Polymer Group
Mentor: Krzysztof Matyjaszewski, Ph.D., professor in the Department of Chemistry
Staž naukowy w ramach projektu STER

Czech Academy of Sciences 1.10.2023 – 30.11.2023
Institute of Macromolecular Chemistry
Mentor: Ing. Jiri Brus Ph.D.
Staž naukowy w ramach projektu Erasmus+

CNR-Istituto per lo Studio dei Materiali Nanostrutturati (CNR-ISMN) 15.09.2022 – 14.11.2022
Dip. ChiBioFarAm at University of Messina
Mentor: Antonino Mazzaglia Ph.D.
Staž naukowy w ramach projektu Erasmus+

Nagrody

Nagroda Marszałka Województwa Wielkopolskiego w konkursie „Wielkopolska dla Planety 2030” w kategorii „Nauka” za pracę pt. „Naturalny środek antybakteryjny jako alternatywa dla antybiotyków w cementach kostnych”

Nagroda Komitetu Naukowego Zjazdu Zimowego Sekcji Młodych Polskiego Towarzystwa Chemicznego za najlepsze postery z badań własnych za pracę pt. „A Star Polymer-Eugenol Complex as a Potential Modifier of Methacrylate Bone Cement”

2. miejsce Akademickich Mistrzostw Polski w Futsalu w kategorii uczelni technicznych