

Sylwia ŁAGAN¹, Natalia DUL²

¹Zakład Mechaniki Doświadczalnej i Biomechaniki, Instytut Mechaniki Stosowanej, Wydział Mechaniczny, Politechnika Krakowska, Kraków

²Studenckie Koło Naukowe Inżynierii Biomedycznej CANCRICAT przy Zakładzie Mechaniki Doświadczalnej i Biomechaniki, Instytut Mechaniki Stosowanej, Wydział Mechaniczny, Politechnika Krakowska, Kraków

OCENA ZMIAN WYBRANYCH WŁAŚCIWOŚCI PROTEZ GŁOSU PRZECHOWYWANYCH W ROZTWORZE SOLI FIZJOLOGICZNEJ NA PODSTAWIE BADAŃ KĄTA ZWILŻANIA

Streszczenie: Obiektem badań jest proteza głosowa stała, zakładana przez lekarza, wykonana z dimetylpolysiloksanu, materiału biokompatybilnego, stosowana jako połączenie między tchawicą a przełykiem po całkowitej laryngektomii. Ocenie laboratoryjnej poddano parametry kąta zwilżania warstwy wierzchniej protezy oraz swobodnej energii powierzchniowej metodą Owens'a-Wendt'a po 10-ciu i 17-stu tygodniach przechowywania w roztworze soli fizjologicznej (0,9% NaCl), w temperaturze 40°C.

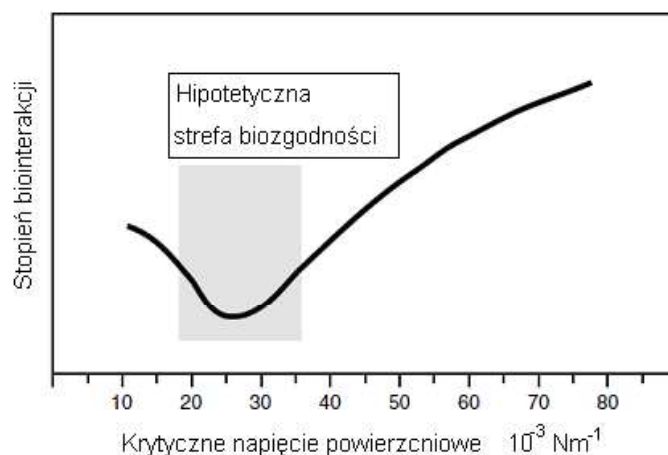
Słowa kluczowe: proteza głosowa, zwilżalność, swobodna energia powierzchniowa (SEP), metoda Owens'a-Wendt'a, bioreaktywność, wykres Zismana

1. WSTĘP

Wykorzystanie wielu materiałów polimerowych na wyroby medyczne, a szczególnie implanty, determinowane jest poprzez właściwości warstwy wierzchniej materiału, z którego są one wykonane. Warstwa wierzchnia, charakteryzująca się często odmienną strukturą od rdzenia materiału poddawana jest działaniu różnych czynników w zależności od przeznaczenia wyrobu. Przez kontakt z warstwą wierzchnią organizm żywy reaguje na biomateriał. W dobie rozwoju inżynierii biomateriałów, w tym inżynierii powierzchni, koniecznym staje się ocena bioreaktywności materiału w kontakcie z żywym organizmem. Agresywne środowisko biologiczne działające długoterminowo na materiał implantu może powodować destabilizację układu biologiczno-chemicznego i biomechanicznego a efekty zmian dla organizmu stać się mogą niebezpieczne [5]. Do najważniejszych parametrów materiału implantacyjnego, które mogą korelować z bioreaktywnością należą takie parametry jak: hydrofilowość/hydrofobowość, obecność grup funkcyjnych, chropowatość [1,2]. Definicja bioreaktywności wg Ratnera określa zdolność materiału do wywołania określonej odpowiedzi tkanki/komórki [8]. Do podstawowych reakcji na zaimplantowany materiał zalicza się: adsorpcję białek, adhezję bakterii, fagocytozę, hemolizę, aktywację płytek, adhezję płytek, biodegradację [3,4,5]. Oddziaływania pomiędzy powierzchnią materiału

implantacyjnego a środowiskiem biologicznym *in vitro* lub *in vivo* ściśle związane są z właściwościami warstwy wierzchniej materiału takimi jak: topografia, skład chemiczny, zwilżalność i energia powierzchniowa [6,7,10]. Swobodna energia powierzchniowa SEP (z ang. *SFE Surface Free Energy*) wykorzystywana jest do oceny stopnia oddziaływania pomiędzy warstwą wierzchnią materiału a organizmem żywym. Wysokie wartości energii powierzchniowej sprzyjają adsorpcji białek i będącej jej następstwem adhezji komórek, odwrotne zjawisko występuje dla materiałów z niską wartością energii powierzchniowej. Według zaproponowanej przez Roberta Baier'a hipotezy [1], powierzchnia materiału z tzw. krytyczną energią powierzchniową (γ_C) na poziomie 20÷30 [10^{-3} N/m] charakteryzuje się atrombogennością i została określona jako hipotetyczna strefa biokompatybilności, rozumianej jako strefa minimalnej adhezji komórek (rys. 1). Natomiast materiały charakteryzujące się krytyczną energią powierzchniową powyżej 40 [10^{-3} N/m] sprzyjają adhezji komórek.

Należy jednak pamiętać, iż w badaniach laboratoryjnych *in vitro* symuluje się warunki środowiska naturalnego, zatem obarczone one są pewnym błędem. Jednakże koszt oraz względy etyczne badań klinicznych *in vivo*, szczególnie na wczesnym etapie, kieruje uwagę badaczy ku badaniom laboratoryjnym. Dlatego w niniejszej pracy podjęto próbę oceny możliwości wyznaczenia poziomu bioreaktywności materiału silikonowego przeznaczonego na implanty długoterminowe na przykładzie protezy głosu w warunkach symulowanego środowiska biologicznego. W oparciu o uzyskane wyniki przeprowadzono analizę aspektu bezpiecznego przebywania w organizmie protezy, z uwagi na możliwość zmiany parametrów fizycznych i ryzyko osadzania bakterii wywołujących stany zapalne, przez które istnieje konieczność częstego czyszczenia protezy, a nawet jej wymiany.



Rys. 1. Relacja między biokompatybilnością i krytycznym napięciem powierzchniowym ciała stałego [1,8]

2. MATERIAŁ I METODY

Obiektem badań była proteza głosowa Provox2, wykonana z dimetylpolysiloksanu, która jest jedną z najczęściej stosowanych w Polsce. Zaleca się ją po całkowitej laryngektomii krtani. Wszczepialna proteza głosowa Provox2 ma na celu polepszenie komfortu pacjenta i szybszą naukę mowy. Celem pracy była ocena zmian zwilżalności warstwy wierzchniej oraz oznaczenie swobodnej energii powierzchniowej dwóch protez głosowych Provox2 różniących się rozmiarem (wg oznaczeń producenta: 6 i 12.5). Protezy przechowywano w warunkach symulowanego środowiska biologicznego, w roztworze soli fizjologicznej (0,9% NaCl), w temperaturze 40°C, przez okres 122 dni (jest to średni zalecany czas przebywania w ciele pacjenta protezy).

Pomiar kąta zwilżania cieczą naniesioną na warstwę wierzchnią protezy został wykonany na stanowisku badawczym złożonym z aparatu Advex Instruments wyposażonego w kamerę do wykonywania zdjęć kropelek cieczy nanoszonych na powierzchnię materiału i programu See System do analizy zarejestrowanych obrazów. Krople cieczy pomiarowych o objętości 0,5 [μl] były nanoszone na powierzchnię badanych próbek przy użyciu mikropipety Vitrum. Dla każdej cieczy wykonano pomiar 10-ciu kropelek. W badaniach wykorzystano metodę oznaczania swobodnej energii powierzchniowej materiału protezy głosowej na podstawie modelu obliczeniowego Owens'a-Wendt'a, wymagającego zastosowania dwóch cieczy, na potrzeby tej pracy: wody destylowanej i diiodometanu. Do oceny wartości krytycznej energii powierzchniowej wykorzystano wykres Zismana. W trakcie badań wykonywano również pomiar zmiany masy jako wyznacznik destabilizacji parametrów fizycznych na skutek obecności środowiska mokrego (wchłaniania cieczy inkubacyjnej oraz adhezję składników organicznych). Przeprowadzono również wywiad z dwoma pacjentami z zaimplantowanymi protezami głosowymi.

2.1. Model Owensa-Wendta

Zastosowany w analizach model Owens'a-Wendt'a wymaga stosowania dwóch cieczy, jednej polarnej, drugiej dyspersyjnej oraz wykorzystania następujących wzorów analitycznych (1) i (2):

$$\gamma_S = \gamma_S^d + \gamma_S^p \quad (1)$$

γ_S^d - składowa dyspersyjna (Lifshitz-Van der Walls'a {LW})

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

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

W równaniu (2) występują dwie niewiadome (γ_S^d oraz γ_S^p), zatem nie wystarcza ono do wyznaczenia wartości swobodnej energii powierzchniowej. Dlatego w pomiarach kąta zwilżania wykorzystuje się dwie ciecze, co prowadzi do uzyskania układu równań liniowych ze współczynnikami o stałych wartościach. Pomiarzy kąta zwilżania wykorzystano do określenia wartości krytycznej energii powierzchniowej metodą Zismana. Przyjęte do obliczeń wartości swobodnych energii powierzchniowych (SEP) oraz ich składowe: polarną i dyspersyjną dla wykorzystanych metod podano w tabeli 1.

Tabela 1. Wartości SEP i poszczególnych ich składowych dla wykorzystanych cieczy pomiarowych [1]

Ciecz pomiarowa	γ_L	γ_L^p	γ_L^d
	[mJ/m ²]		
woda destylowana	72,8	21,8	51,0
dijodometan	50,8	50,8	0

2.2. Metoda Zismana

W pomiarach metodą Zismana wykorzystuje się kilka cieczy z danego szeregu homologicznego, a na podstawie wyników doświadczalnych generuje się wykres w układzie współrzędnych, w którym oś odciętych stanowi wartość γ_L wykorzystanych cieczy, natomiast na osi rzędnych definiuje się funkcję *cosinus* kątów zwilżania θ_i . Metoda ta polega na ekstrapolacji wyników pomiarów kąta zwilżania warstwy wierzchniej materiału cieczami

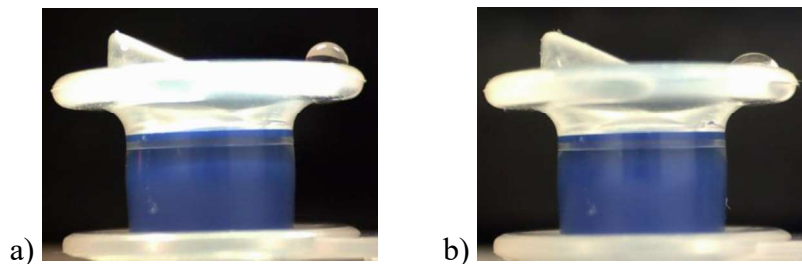
z szeregu homologicznego do punktu $\cos\theta = 1$ wyznacza się γ_C wyznaczając tzw. krytyczną swobodną energię powierzchniową γ_C . Dokonując odpowiednich przekształceń można opisać zależność między swobodną energią powierzchniową γ_S a krytyczną swobodną energią powierzchniową γ_C zależnością (3):

$$\gamma_S = \frac{(b \cdot \gamma_C + 1)^2}{4b} \quad (3)$$

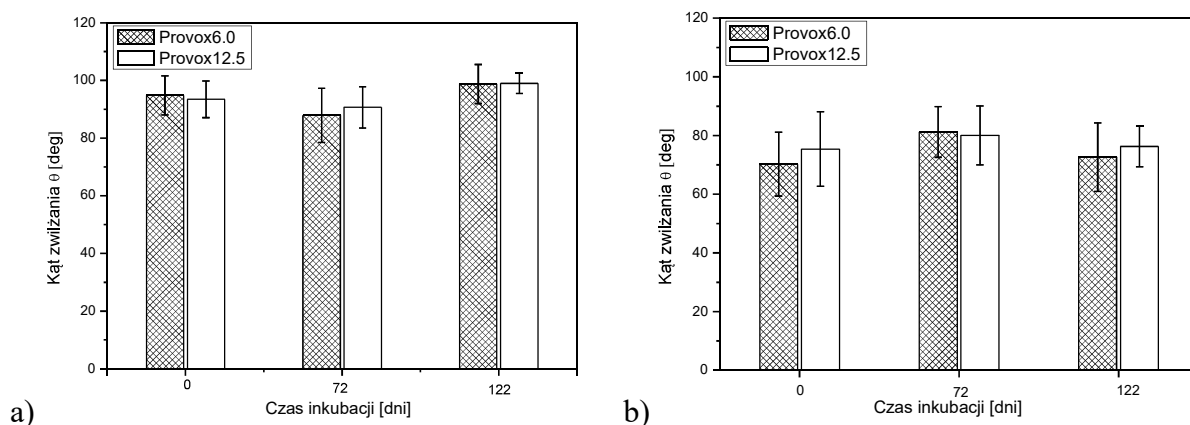
gdzie: γ_S - swobodna energia powierzchniowa ciała stałego, [mJ/m²],
 γ_C - krytyczna swobodna energia powierzchniowa, [mJ/m²],
 $b = \operatorname{tg} \alpha$ α - kąt nachylenia prostej aproksymującej wyniki pomiarów [rad].

3. WYNIKI

Efektom zrealizowanych badań było otrzymanie wartości kąta zwilżania powierzchni protez głośowych Provox2. Przykładowe zdjęcia kropli wody destylowanej oraz diiodometanu naniesionych na powierzchnię implantu przedstawiono na rysunku 2. Wykonano pomiary po wyjęciu protezy z opakowania (pomiar referencyjny - 0 dni) oraz po 10-ciu i 17-stu tygodniach (72 dni i 122 dni) przechowywania w roztworze soli fizjologicznej o temperaturze 40 °C. Wyniki zmian wartości kątów zwilżania warstwy wierzchniej protezy przedstawia rysunek 3.



Rys. 2 Zdjęcie kropli na powierzchni protezy: a) wody destylowanej, b) diiodometanu

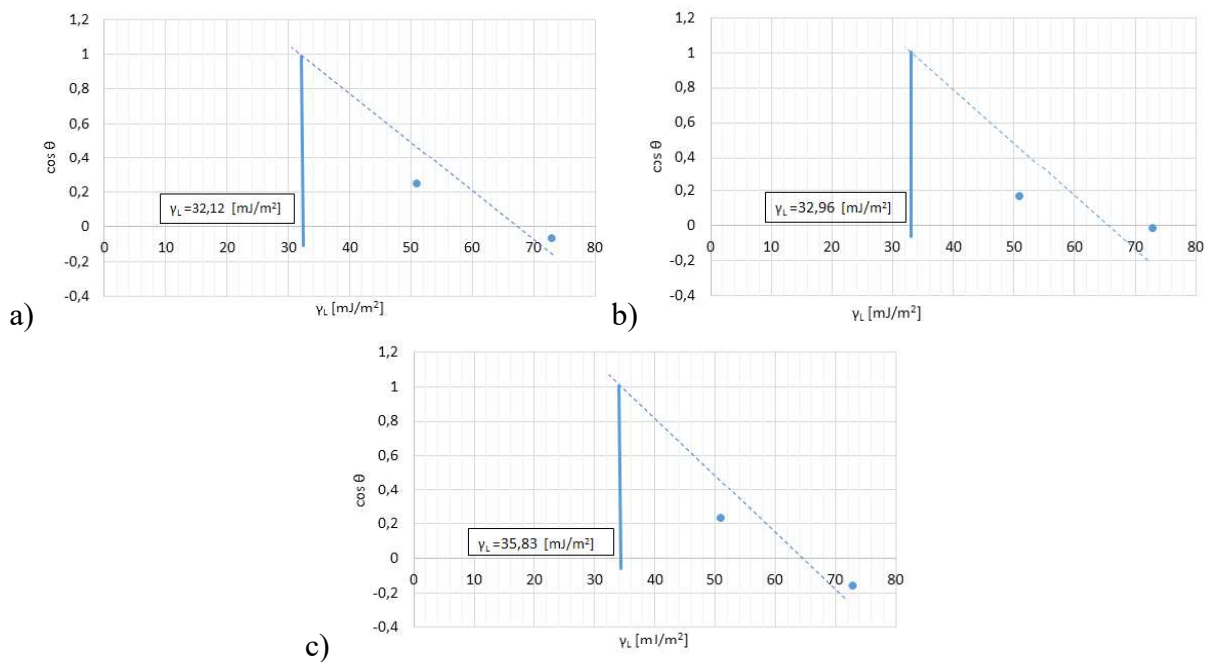


Rys. 3 Zmiana kąta zwilżania protezy głośowej cieczami pomiarowymi:
a) woda destylowana, b) diiodometan

Z otrzymanych wartości z pomiarów kąta zwilżania wyliczono wartości swobodnej energii powierzchniowej na podstawie modelu obliczeniowego Owens'a-Wendt'a (tabela 2), a także wyznaczono wartości krytycznej swobodnej energii powierzchniowej w oparciu o wykres Zisman'a, które posłużyły do oceny bioreaktywności protez (rys.4).

Tabela 2. Swobodna energia powierzchniowa obliczona na podstawie pomiarów kąta zwilżania przed i po inkubacji

Proteza	γ_s [mJ/m ²]		
	Czas przechowywania [dni]		
	0	72	122
Provox2 6.0	25,2±7,6	23,6±8,9	23,1±8,0
Provox2 12.5	23,4±8,7	22,8±8,4	21,4±9,1



Rys. 4. Zmiana wartości krytycznej energii powierzchniowej w oparciu o wykres Zismana dla protezy głosowej Provox 2 12.5: a) przed inkubacją, b) po 72 dniach inkubacji, c) po 122 dniach inkubacji

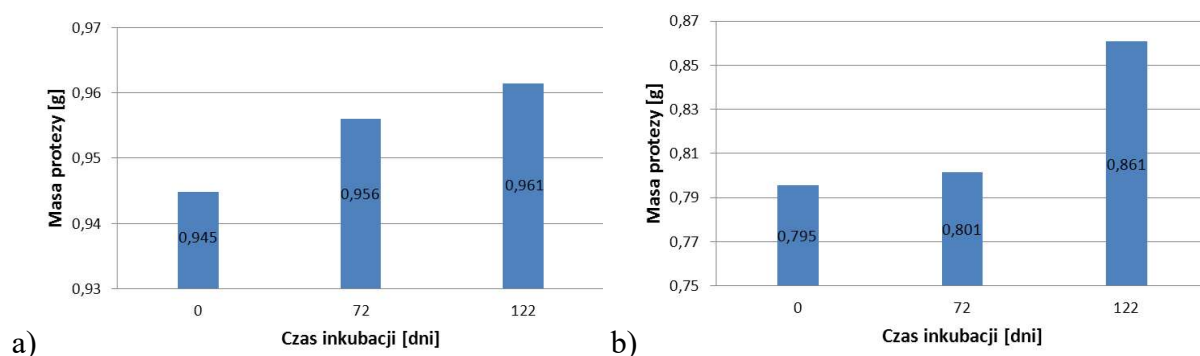
Widoczna jest niewielka zmiana wartości krytycznej energii powierzchniowej, pozostająca jednak w zakresie hipotetycznej biogodności materiału, co świadczy o stabilizacji bioreaktywności, jednak tendencja wzrostowa sugerować może przekroczenie sugerowanej granicy 40 [10^{-3} N/m] co będzie sprzyjać adhezji komórek, dlatego koniecznym jest przedłużenie badań aby określić bezpieczny czas użytkowania protezy.

Analiza wyników została odniesiona do informacji uzyskanych z przeprowadzonego wywiadu z dwoma pacjentami (M1, 62 lata, okres posiadania protezy: 2 miesiące oraz M2, 59 lat, okres posiadania protezy: 5 miesięcy) po całkowitej laryngektomii krtani, spowodowanej nowotworem krtani, z wszczepionymi protezami Provox2. Ogólnie mężczyźni byli zadowoleni z noszenia protezy i jej funkcji, jednak wskazywali na pewne dolegliwości związane z protezą, które wpływają na jakość życia tj.: konieczność częstego czyszczenia z powodu zapychania się protezy przez ślinę, konieczność rozdrabniania potraw w celu ograniczenia bólu podczas przelatywania, pojawianie się ropienia. Pacjent 2 był przygotowywany do wymiany protezy, ponieważ na obecnej tworzył się stan zapalny.



Rys. 5. Wygląd protez głosowych po przechowywaniu przez 122 dni: a) Provox2 12.5, b) Provox2 6.0

Na rysunku 5 przedstawiono protezę głosową Provox2 po 122 dniach inkubacji, widoczne jest odkształcenie się paska zabezpieczającego przed wypadnięciem, które może skutkować obluzowaniem się w ciele pacjenta lub wypadnięciem protezy. W wyniku przeprowadzonych analiz, badań i obserwacji można wnioskować na temat wpływu symulowanego środowiska biologicznego na zmianę parametrów protezy. Przechowywanie protezy w podwyższonej temperaturze w środowisku soli fizjologicznej spowodowało przyrost masy o 8% dla protezy Provox2 12.5 i 2% dla protezy Provox2 6.0 po 17-tu tygodniach przechowywania (rys. 6). Świadczy to o możliwości reakcji materiału w formie chłonności.



Rys. 6. Rozkład zmiany masy protezy głosu: a) Provox2 12.5, b) Provox2 6.0

4. WNIOSKI

Powierzchnie protez Provox2 wykazują charakter silnie hydrofobowy, co wpływa na ograniczenie adhezji komórek. Zaobserwowane zmiany wartości kąta zwilżania oraz swobodnej energii powierzchniowej mogą służyć do oceny wpływu środowiska wodnego na zmiany właściwości warstwy wierzchniej protezy oraz oceny postępu procesu degradacji.

Protezy głosowe Provox2 wykonane z dimetylopolisiloksanu, polimeru silikonowego, który charakteryzuje się wysoką odpornością na temperatury, zużycie chemiczne i utlenianie są przezroczyste, zgodne biologicznie, obojętne i nietoksyczne. Jednak niezależnie od tych cech, w praktyce klinicznej obserwuje się, że kilka miesięcy po założeniu protezy głosowe wykazują wyraźne oznaki pogorszenia właściwości. Stają się szorstkie i nieprzezroczyste, kształt ich ulega deformacji, zwiększają swoją objętość. Destabilizacja parametrów związana jest ze zmiennymi warunkami środowiska pracy protezy i powoduje, że protezy głosowe Provox2 wymagają okresowej wymiany, ze względu na pogarszające się parametry fizyczne

utrudniające prawidłowe utrzymanie funkcji mowy pacjenta jak również ewentualnego wycieku płynu z tchawicy do przełyku przez przetokę, w efekcie zmniejszonego przylegania protezy.

Procedury związane z utrzymaniem czystości protezy narażają silikon na zużycie mechaniczne (czyszczenie specjalną szczoteczką). Erozja silikonu wynika również z adhezji drobnoustrojów, które są w stanie przeniknąć przez strukturę materiału. W związku z tym, silikon, w kontakcie z biofilmem, przechodzi proces degeneracji strukturalnej i traci właściwości takie jak elastyczność i jednorodność struktury.

Zmiany kształtu i utrata przezroczystości zostały zaobserwowane w protezach Provox2 również w pracy [5], ponadto stały kontakt z bakteriami żywności oraz powszechnie występującymi zarówno w układzie pokarmowym jak i dróg oddechowych, powodował wzrost biofilmu, który jest antagonizowany przez układ immunologiczny, powodując wytwarzanie rodników beztlenowych, w szczególności uwalnianych przez monocyty i neutrofile, zdolnych do wywołania chemicznej reakcji łańcuchowej w procesie utleniania. Istnieją możliwości hamowania wzrostu biofilmu bakteryjnego przez wprowadzenie substancji przeciwbakteryjnych na powierzchni lub w samej matrycy silikonowej za pomocą techniki powlekania metali (np. srebra, złota, tytanu). Ponadto rozwój biofilmu może być hamowany za pomocą zabiegów profilaktycznych, takich jak stosowanie probiotyków [3,4,9].

W celu oznaczenia odległych wyników należy wydłużyć czas przechowywania oraz wykorzystać różnorodne media o pH zbliżonym do organizmu ludzkiego. Zaobserwowany wzrost wartości krytycznej energii powierzchniowej sugeruje możliwość aktywacji adhezji mikroorganizmów, proliferację komórek na powierzchni materiału i wzrost bioreaktywności.

LITERATURA

- [1] Baier R.E.: The role of surface energy in thrombogenesis. *Bull. N.Y. Acad. Med.*, vol. 48(2), 1972, p. 257–272.
- [2] Barshilia H.C., Mohan D.K., Selvakumar N., Rajam K.S.: Effect of substrate roughness on the apparent surface free energy of sputter deposited superhydrophobic polytetrafluoroethylene thin films, *Applied Physics Letters*, vol. 95, 033116, 2009.
- [3] Bertl, K., Zatorska, B., Leonhard, M., Matejka, M., Schneider-Stickler, B.: Anaerobic and microaerophilic pathogens in the biofilm formation on voice prostheses: A pilot study, *The Laryngoscope*, vol. 122, 2012, p. 1035–1039.
- [4] Bertl, K., Zijngel, V., Zatorska, B., Leonhard, M., Schneider–Stickler B., Harmsen, H. J. M.: Oral cavity anaerobic pathogens in biofilm formation on voice prostheses, *Head Neck*, vol. 37, 2015, p. 524–529.
- [5] Fusconi M., Taddei A.R., Gallo A., Conte M., Virgilio A., Greco A, Lo Vasco V.R., Macr G.F., Roma R., Volpini F., Benincasa A.T., Vincentiis M.: Degradation of Silicone Rubber Causes Provox2 Voice Prosthesis Malfunctioning, *Journal of Voice*, vol. 28(2), 2014, p. 250–254.
- [6] Kajzer A., Kajzer W., Dzielicki J., Matejczyk D.: The study of physicochemical properties of stabilizing plates removed from the body after treatment of pectus excavatum, *Acta of Bioengineering and Biomechanics*, vol. 17, no. 2, 2015, DOI: 10.5277/ABB-00140-2014-02 35-44.
- [7] Liber-Kneć A., Łagan S.: Zastosowanie pomiarów kąta zwilżania i swobodnej energii powierzchniowej do charakterystyki powierzchni polimerów wykorzystywanych w medycynie, *Polimery w Medycynie*, nr 44, vol. 1, 2014, s. 29–37.
- [8] Ratner B.D., (et al.): *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Elsevier 2004, New York.

- [9] Tan Y., Leonhard M., Moser D., Ma S. Schneider-Stickler B.: Long-term antibiofilm activity of carboxymethyl chitosan on mixed biofilm on silicone, *The Laryngoscope*, 2016, doi:10.1002/lary.26096.
- [10] Żenkiewicz M.: Methods for the calculation of surface free energy of solids, *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering*, vol. 24, issue 1, 2007, p. 137–145.

ASSESSMENT OF CHANGE SELECTED PROPERTIES OF THE VOICE PROSTHESIS STORAGE IN A SOLUTION PHYSIOLOGICAL SALINE OF THE BASIS OF THE CONTACT ANGLE MEASUREMENTS

Abstract: The object of the research is the voice prosthesis fixed, assumed by a doctor, made of dimethylpolysiloksanu, biocompatible material, used as a connection between the trachea and the esophagus after total laryngectomy. Laboratory parameters were assessed contact angle of the surface layer of the prosthesis and the surface free energy by Owens-Wendt equation after 10 and 17 weeks of storage hundred saline solution (0.9% NaCl) at 40 °C.