

Rozprawa Doktorska

Materiały kompozytowe na bazie poli(sebacynianu gliceryny) do potencjalnego wykorzystania w inżynierii tkankowej kości

Paweł Jakub Piszko



Politechnika
Wrocławska

Promotor: **dr hab. inż. Konrad Szustakiewicz, prof. PWr**

Promotor pomocnicza: **dr Karolina Rudnicka** z Katedry
Immunologii i Biologii Infekcyjnej Uniwersytetu Łódzkiego

Praca zrealizowana w Katedrze Inżynierii i Technologii Polimerów
Politechniki Wrocławskiej

Wrocław, 2023

Teza oraz hipotezy badawcze

Teza: Możliwe jest wykorzystanie materiałów na bazie elastomeru w inżynierii tkankowej kości.

Hipoteza 1: Materiały kompozytowe na bazie poli(sebacynianu gliceryny) zawierające ceramikę apatytową mogą pozytywnie wpłynąć na proces osteogenezy.

Hipoteza 2: Właściwości fizykochemiczne oraz mechaniczne biomateriałów z poli(sebacynianu gliceryny) pozwalają na dalszą ich weryfikację pod kątem zastosowania w inżynierii tkankowej.

Streszczenie w języku polskim

Według Światowej Organizacji Zdrowia choroby degeneracyjne oraz uszkodzenia mechaniczne tkanki kostnej pojawiają się ze zwiększoną częstością u ludzi po 50-tym roku życia. Uszkodzenia mechaniczne tkanki kostnej spowodowane są m.in. wypadkami komunikacyjnymi, uprawianiem sportów ekstremalnych, są także tragicznym skutkiem działań wojennych (np. wojna w Ukrainie). W związku z tym, oprócz działań związanych z odpowiednią profilaktyką zdrowotną, medycyna potrzebuje efektywnych rozwiązań z zakresu inżynierii tkankowej, które wspomagają lokalną regenerację komórek.

Prezentowana rozprawa doktorska ma na celu przedstawienie potencjału wykorzystania porowatych kompozytów na bazie elastomeru - poli(sebacynianu gliceryny) (PGS) oraz ceramiki apatytowej (HAp) w inżynierii tkanki kostnej z naciskiem na charakterystykę fizykochemiczną, mechaniczną i biologiczną wytworzonych materiałów. Obszar badawczy pracy obejmuje przedstawienie dwóch alternatywnych ścieżek syntetycznych wytwarzania prepolimeru PGS: polikondensację temperaturową oraz syntezę enzymatyczną katalizowaną lipazą B, izolowaną z drożdży *Candida antarctica*. W procesie analizy struktury i właściwości pPGS, materiał wytworzony techniką temperaturową został wykorzystany do dalszych badań. Synteza hydroksyapatytu została wykonana metodą strąceniową z wykorzystaniem soli Na_2HPO_4 oraz $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$.

W badaniach uzyskano zarówno lite materiały na bazie usieciowanego termicznie PGSu, jak również materiały porowate z dodatkiem ceramiki apatytowej. W trakcie sieciowania temperaturowego kąt zwilżania materiału ulega zwiększeniu. Porowate

scaffoldy zostały wykonane techniką TIPS-TCL-SL, która jest połączeniem indukowanej termicznie separacji fazowej z sieciowaniem termicznym i następnym wyemywaniem poroforu. Uzyskane materiały odznaczały się porowatością w przedziale 70-83% z ilością porów zamkniętych poniżej 0.02%. Badania stabilności termicznej (TGA) oraz rentgenowska spektroskopia energodispersyjna (EDS) pozwoliły potwierdzić ilościowo i jakościowo obecność HAp w matrycy pianek kompozytowych. Dynamiczne badania mechaniczne oraz ściskanie statyczne pozwoliły wskazać kompozycję pianki PGS/HAp zawierającą 20% napełniacza jako materiał z najwyższą wytrzymałością spośród badanych próbek. Dodatkowo, podczas 14-dniowej inkubacji w płynach fizjologicznych (PBS, SBF, płyn Ringera, sztuczna ślina oraz woda destylowana) pianki ulegały częściowej degradacji, co jest istotne we współczesnej medycynie regeneracyjnej.

Praca porusza również aspekt bezpieczeństwa biologicznego wytworzonych biomateriałów oraz ich potencjalnego wykorzystania w inżynierii tkanki kostnej. Opracowane materiały wykazały cytozgodność wobec normatywnych fibroblastów linii L929. Ponadto wytworzone *scaffoldy* zbadano w zakresie ich potencjału osteokondukcyjnego względem ludzkich preosteoblastów linii hFOB 1.19. Wykazano, że porowate pianki kompozytowe zawierające napełniacz apatytowy istotnie nasilają wydzielanie mediatorów regeneracji tkanki kostnej takich jak osteokalcyna i osteopontyna, fosfatazy alkalicznej (ALP) oraz cytokin i czynników zapalnych tj. interleukiny IL-1 β , IL-6, IL-10 oraz TNF- α . Przedstawione w pracy wyniki dają podwaliny pod kwalifikację porowatych *scaffoldów* PGS/HAp do badań *in vivo*, a w dalszej perspektywie badań klinicznych w zakresie inżynierii tkanki kostnej.

Streszczenie w języku angielskim

According to the World Health Organization, osteodegenerative diseases as well as mechanical injuries of bone tissue occur more frequently in human population after 50 years of age. Therefore, beside promoting the appropriate prophylaxis, medicine must research more effective solutions in the scope of tissue engineering, which support the local cellular regeneration. The presented doctoral dissertation aims to showcase the potential of applying porous composites based on poly(glycerol sebacate) (PGS) and apatite ceramics (HAp) in bone tissue engineering along with thorough physicochemical, mechanical and biological evaluation of the materials. The research area includes performing two alternative synthetic routes of the prepolymer: thermal polycondensation and enzymatic synthesis catalyzed with Lipase B derived from *Candida antarctica* yeast (CALB). During analysis of structure and properties of pPGS, the material synthesised with thermal method was selected for further analysis. Hydroxyapatite was synthesised with wet precipitation technique from Na_2HPO_4 and $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ salts.

In the course of the experiments both bulk and porous materials were obtained. Thermal cross-linking of the material resulted in the increased water contact angle value. Porous scaffolds have been manufactured with TIPS-TCL-SL technique: a combination of thermally induced phase separation coupled with thermal cross-linking and salt leaching. Obtained materials possessed high porosity with less than 0.02% of closed pores. Thermal stability and energy dispersive spectroscopy allowed to confirm qualitatively and quantitatively the presence of HAp in the composite scaffolds matrix. Dynamic mechanical testing and static compression indicated foam with 20% of apatite filler as the sample with superior mechanical resistance among all tested specimens.

In addition, the thesis tackles the biological cytosafety of the manufactured biomaterials and their potential application in bone tissue engineering. During a 14-day incubation in various physiological liquids, foams showed a potential for degradation which is essential in contemporary regenerative medicine. Evaluated PGS-based materials did not exhibit cytotoxicity against L929 fibroblasts under ISO normative study. Most importantly, scaffolds were subjected for osteoconductive potential assessment against hFOB 1.19 human preosteoblast cell's cultures. A statistically

significant increase in mediators important in bone tissue regeneration was observed for porous composite scaffolds containing apatite filler. Those include osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase (ALP) and selected immunomodulatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α). Presentation of porous PGS/HAp scaffolds forms a solid background for introducing these biomaterials for *in vivo* evaluation.

Dedykacja i podziękowania

Niniejszą pracę dedykuję czterem osobom, bez których nie trafiłbym do miejsca, w którym jestem dzisiaj. Mojej żonie Aleksandrze, której miłość jest oparciem w chwilach zwątpienia. Mojej mamie Liliannie za ciężką pracę włożoną w moje wychowanie oraz mojemu ojczymowi Krzysztofowi, na którym zawsze mogę polegać i który zawsze służy cennymi radami. Na koniec pracę dedykuję mojemu dziadkowi Tadeuszowi, który naprowadzał mnie na właściwe tory i kształtował kręgosłup moralny.

Chciałbym podziękować również wszystkim osobom, z którymi współpracowałem podczas wykonywania badań i analizy wyników zawartych w niniejszej pracy:

- Pracownikom Katedry Inżynierii i Technologii Polimerów Politechniki Wrocławskiej, a w szczególności dr hab. inż. Konradowi Szustakiewiczowi, prof. PWr, dr inż. Bartłomiejowi Kryszakowi, dr inż. Małgorzacie Gazińskiej, dr inż. Sonii Zielińskiej, dr inż. Aleksandrze Korbut oraz dr inż. Michałowi Grzymajło
- Pracownikom Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej Uniwersytetu Łódzkiego, w szczególności: dr Karolinie Rudnickiej, dr Marcinowi Włodarczykowi oraz dr Aleksandrze Szwed-Georgiou
- Pani prof. dr hab. inż. Agnieszce Sobczak-Kupiec oraz mgr inż. Dagmarze Słocie z Katedry Inżynierii Materiałowej Politechniki Krakowskiej
- Pani dr inż. Magdalenie Kobielarz z Katedry Mechaniki, Inżynierii Materiałowej i Biomedycznej
- Prof. dr Jörgowi Kreßlerowi oraz dr Razan Alaneed z Wydziału Chemii Uniwersytetu w Halle (Niemcy)
- mgr inż. Maciejowi Kalka z Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie za pomoc w pracy ze środowiskiem L^AT_EX

Finansowanie

Badania przedstawione w pracy były realizowane w ramach projektu TEAM-NET Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (FNP) pt. "Wielofunkcyjne kompozyty aktywne biologicznie do zastosowań w medycynie regeneracyjnej układu kostnego" finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego, w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014-2020 (PO IR), Oś IV: Zwiększenie potencjału naukowo- badawczego, Działanie 4.4.: Zwiększanie potencjału kadrowego sektora B+R (nr. POIR.04.04.00-00-16D7/18-00). Pobyty stażowe związane z realizacją badań były finansowane z ww. projektu TEAM-NET, jak również z programu STER Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej w ramach realizowanego w Politechnice Wrocławskiej projektu InterDocSchool umiędzynarodowienia Szkół Doktorskich.



Spis treści

1	Przegląd literatury tematyki badawczej	10
1.1	Synteza oraz struktura PGS	11
1.2	Właściwości PGS	14
1.3	Techniki formowania materiałów na bazie PGS	17
1.3.1	Odlewanie rozpuszczalnikowe oraz termicznie indukowana separacja faz (TIPS)	17
1.3.2	Elektroprzędzenie	19
1.3.3	Druk 3D	19
1.4	Wykorzystanie hydroksyapatytu w inżynierii tkanki kostnej	20
1.5	Wykorzystanie układów zawierających PGS	21
1.5.1	Systemy dostarczania leków	21
1.5.2	Wykorzystanie PGS w inżynierii tkankowej	23
2	Metodologia badawcza	30
2.1	Synteza hydroksyapatytu	30
2.2	Synteza pPGS	31
2.2.1	Synteza PGS metodą bezrozpuszczalnikowej polikondensacji temperaturowej	31
2.2.2	Synteza PGS katalizowana enzymatycznie	31
2.3	Przetwarzanie oraz formowanie prepolimeru	32
2.3.1	Formowanie porowatych <i>scaffoldów</i> PGS i PGS/HAp	32
2.3.2	Formowanie materiałów litych	34
2.4	Wykorzystane techniki badawcze	34
2.4.1	Pomiar kąta zwilżania	34

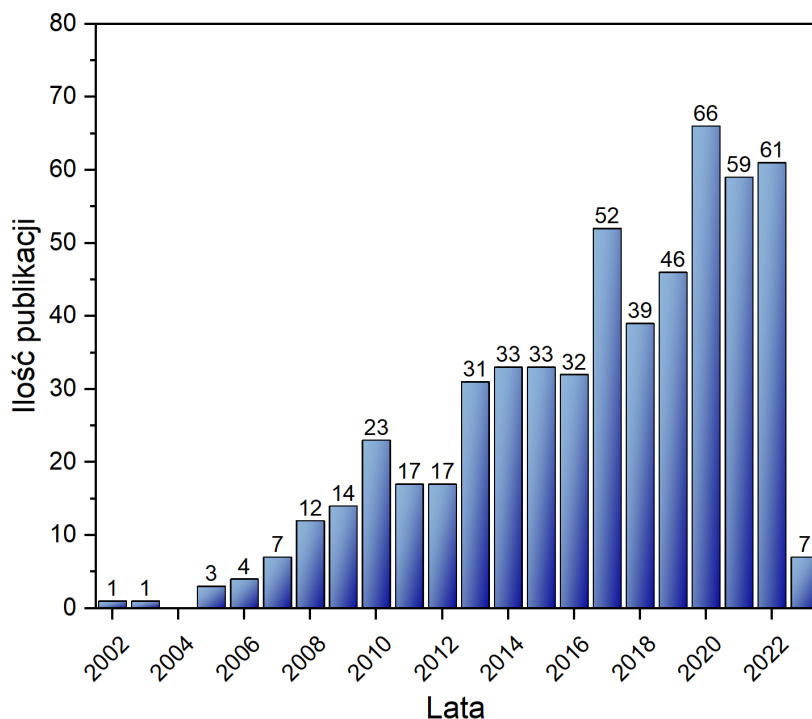
2.4.2	Pomiar gęstości względnej i porowatości <i>scaffoldów</i>	35
2.4.3	Stopień usieciowania	35
2.4.4	Charakterystyka spektroskopowa	36
2.4.5	Analiza termiczna	36
2.4.6	Obrazowanie wytworzonych materiałów	37
2.4.7	Analiza właściwości mechanicznych	38
2.5	Inkubacja <i>scaffoldów</i> w buforach fizjologicznych <i>in vitro</i>	40
2.5.1	Przygotowanie roztworów oraz inkubacja	40
2.5.2	Pomiar pH oraz przewodnictwa roztworów inkubacyjnych . . .	42
2.5.3	Pęcznienie równowagowe	42
2.6	Badania biologiczne na modelach komórkowych <i>in vitro</i>	43
2.6.1	Sterylizacja radiacyjna biomateriałów	43
2.6.2	Ocena cytozgodności biomateriałów	43
2.6.3	Badania potencjału osteokondukcyjnego <i>scaffoldów</i>	45
3	Dyskusja uzyskanych wyników	50
3.1	Charakterystyka fizykochemiczna pPGS oraz <i>scaffoldów</i> i materiałów litych	51
3.1.1	Charakterystyka strukturalna	52
3.1.2	Analiza termiczna	65
3.1.3	Stabilność termiczna wytworzonych materiałów	70
3.1.4	Kąt zwilżania oraz stopień usieciowania	73
3.2	Obrazowanie oraz rekonstrukcje 3D	75
3.3	Analiza statycznych i dynamicznych właściwości mechanicznych <i>scaf-</i> <i>foldów</i> oraz materiałów litych z PGS i jego kompozytów	84
3.3.1	Wytrzymałość na zrywanie	84
3.3.2	Wytrzymałość na ściskanie	85
3.3.3	DMTA	89
3.4	Inkubacja <i>scaffoldów</i> w buforach fizjologicznych	94
3.4.1	Pomiary pH oraz przewodnictwa	95
3.4.2	Pęcznienie równowagowe	98
3.4.3	Morfologia <i>scaffoldów</i> po inkubacji	101
3.5	Cytozgodność i wpływ na komórki kostne	103

3.5.1	Cytokompatybilność	103
3.5.2	Właściwości osteokondukcyjne	106
4	Podsumowanie i wnioski	115
5	Bibliografia	119
6	Appendix	135
6.1	Podsumowanie działalności naukowej	135
6.2	Spis rysunków	140
6.3	Spis tabel	148
6.4	Glosariusz skrótów wykorzystanych w pracy	150

Rozdział 1

Przegląd literatury tematyki badawczej

Niniejsza rozprawa doktorska, ze względu na swój interdyscyplinarny charakter, porusza zagadnienia związane z wieloma gałęziami nauki, wśród których należy wymienić chemię polimerów, inżynierię materiałową oraz biologię. Omawiane w pracy układy zostały wytworzone na bazie poli(sebacynianu gliceryny) (PGS) w postaci zarówno litej, jak i porowatej. PGS jest biodegradowalnym polimerem z rodziny poliestrów [1, 2], który w przeciągu ostatnich lat systematycznie zdobywał coraz większe zainteresowanie badaczy z całego świata. Na Rysunku 1 przedstawiono liczbę publikacji naukowych, które ukazywały się w ostatnich latach z wykorzystaniem słowa kluczowego *poly(glycerol sebacate)* (z ang. poli(sebacynian gliceryny)). Ze względu na swoje właściwości PGS wskazywany jest jako polimer do zastosowań biomedycznych [3]. Wśród najważniejszych obszarów wykorzystania PGS możemy wymienić inżynierię tkankową oraz systemy selektywnego dostarczania leku, które będą szerzej opisywane w dalszej części przeglądu literaturowego. Celem wstępu jest wprowadzenie czytelnika w tematykę pracy oraz zaznajomienie z właściwościami, strukturą i możliwościami biomedycznego wykorzystania materiałów opierających się na PGS.



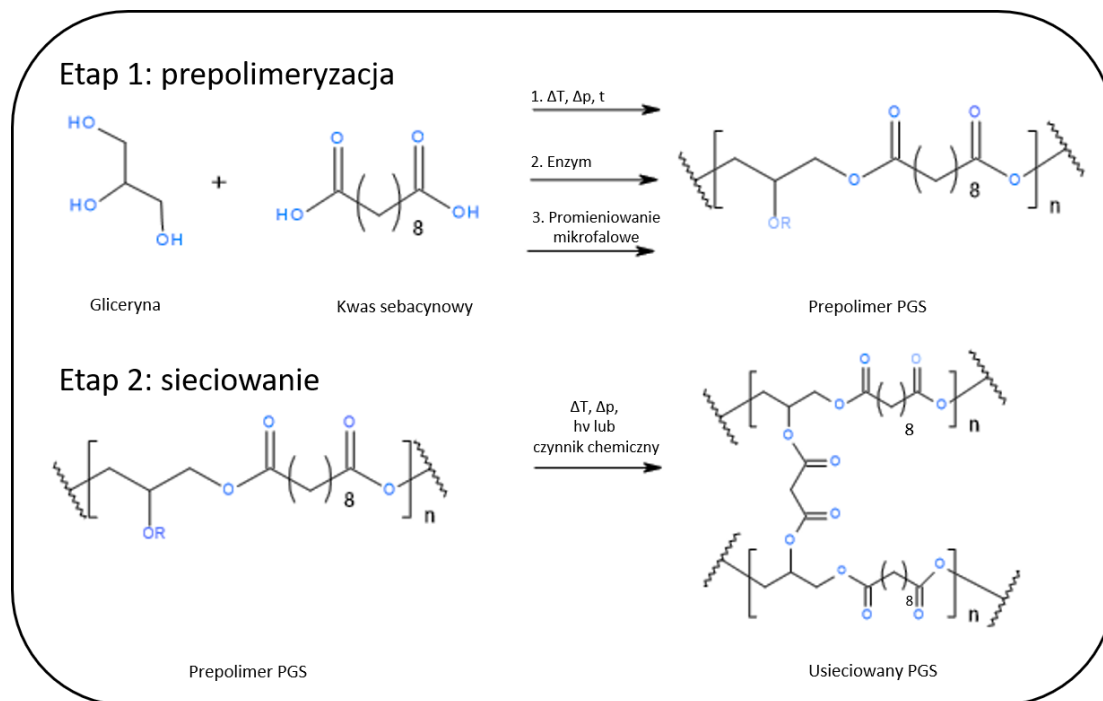
Rysunek 1: Liczba publikacji naukowych dotyczących poli(sebacynianu gliceryny), które ukazały się w latach 2002-2023. Źródło: baza danych Web of Science (dostęp 20.03.2023), wyszukiwanie pod hasłem: poly(glycerol sebacate).

1.1 Synteza oraz struktura PGS

Pierwsza wzmianka o PGS w kontekście zastosowania biomedycznego pojawiła się w roku 2002 w publikacji Wang et al. [1]. Jednakże PGS był już syntezowany i badany wcześniej, w pracy dotyczącej syntezy kopolimerów alifatycznych w roku 1999 [4]. Najbardziej popularną ścieżką uzyskania PGS jest polikondensacja, wychodząca z kwasu sebacynowego (SA) oraz gliceryny (GLY) jako monomerów. Reakcja przebiega dwuetapowo – w pierwszej kolejności otrzymuje się prepolimer poli(sebacynianu gliceryny) (pPGS), który następnie może być poddany sieciowaniu. Na potrzeby wprowadzenia systematyki, powyższe etapy możemy uznać za rozdzielne, jednak wzrost łańcuchów oraz sieciowanie zachodzą równolegle wraz z postępem reakcji z uwzględnieniem kinetyki oraz upakowania makromolekuł w przestrzeni reakcyjnej.

Reakcja polikondensacji może być indukowana różnymi czynnikami, wśród których możemy wyróżnić, polikondensację temperaturową [4, 5], przeprowadzaną zarówno pod wpływem czynnika temperaturowego jak i pod zmniejszonym ciśnie-

niem [6–12], syntezę enzymatyczną [13, 14] oraz wzbudzaną promieniowaniem mikrofalowym [15, 16]. Najprostszym czynnikiem sieciującym jest temperatura. Po odpowiedniej modyfikacji łańcuchów bocznych grupami funkcyjnymi, możliwe jest również sieciowanie chemiczne bądź fotochemiczne. Schemat otrzymywania oraz sieciowania PGS ww. czynnikami został przedstawiony na Rysunku 2.



Rysunek 2: Schemat uzyskiwania prepolimeru oraz sieciowania poli(sebacynianu gliceryny).

Synteza PGS w podwyższonej temperaturze lub z wykorzystaniem obniżonego ciśnienia jest klasyczną reakcją polikondensacji, gdzie czynnikiem pozwalającym na przekroczenie energii aktywacji reakcji jest temperatura [1]. Z kolei najbardziej popularnym enzymem wykorzystywanym w syntezie pPGS jest Lipaza B pozyskiwana z drożdży szczepu *Candida antarctica* [13, 14]. Perin et al. zaproponowali mechanizm syntezy enzymatycznej katalizowanej CALB opierający się na migracji grupy acylowej i powodujący rozgałęzianie się prepolimeru [13]. Dzięki wykorzystaniu odpowiedniego rozpuszczalnika oraz temperatury z zakresu 40-60°C, można uzyskać prepolimer o pożądanym parametrach struktury.

Mikrofalowa synteza PGS jest stosunkowo mało przebadanym procesem. Pozwala ona na znaczące skrócenie czasu prepolimeryzacji z 48h przy syntezie próżniowej lub 24h przy polikondensacji temperaturowej do nawet 3 minut [15]. Najbardziej po-

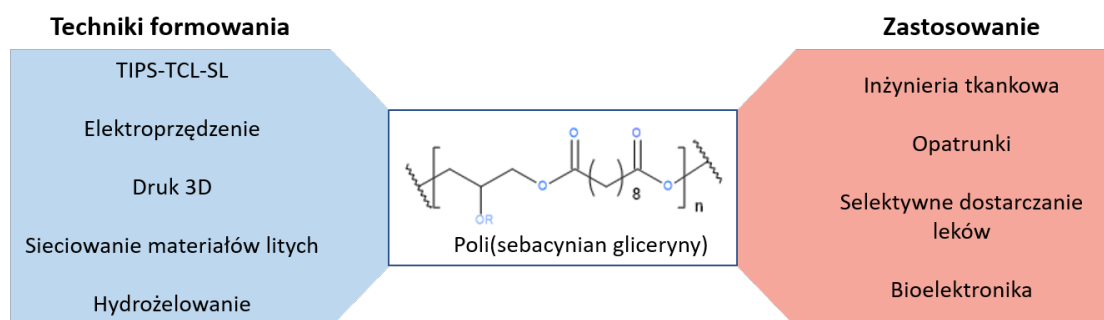
wszechną metodologią wykonania tego rodzaju syntezy jest wykorzystanie reaktora o mocy 650W oraz wstrzymanie reakcji co 10s celem uwolnienia par kondensatu z wnętrza reaktora [16]. Co więcej, działanie promieniowania mikrofalowego pozwala na uzyskanie równomiernego zdyspergowania podczas wytwarzania kompozytów na bazie PGS [17]. Struktura otrzymanego prepolimeru zależy zarówno od wykorzystanej techniki syntetycznej jak również późniejszego *post-processingu*, co przedstawiono na Rysunku 2.

W literaturze znaleźć można szereg opisów modyfikacji strukturalnych pPGS, dzięki którym możliwe jest przeprowadzenie sieciowania chemiczne. Jedną z takich modyfikacji jest wykorzystanie trietyloaminy celem akrylowania łańcuchów bocznych pPGS [18]. Po takiej modyfikacji można przeprowadzić sieciowanie za pomocą promieniowania UV z wykorzystaniem fotoinicjatora (np. 2-dimetoksy-2-fenylacetofenonu, DMPA) [19]. Znane są również metody sieciowania chemicznego po uprzedniej modyfikacji łańcucha bocznego pPGS np. diizocyjanianem heksametylenu (HDI), który sieciuje makromolekuły wiązaniami uretanowymi [20–22] lub diizocyjanianem difenylometanu (MDI) o podobnej zasadzie działania [5, 23]. W krajowych zgłoszeniach patentowych (P.443750, P.443751, P.443752, P.443753 oraz P.443754) współautorstwa autora niniejszej pracy opisane są techniki sieciowania pPGS czynnikami chemicznymi takimi jak izocyjanian 3-(trietoksy-sililo)propylu (ICPTES) oraz ester etylowy diizocyjanianu L-lizyny. Oprócz chemicznej modyfikacji prepolimeru, znane są również metody kopolimeryzacji PGS z polimerami, takimi jak polikaprolakton (PCL) [24] lub glikol polietylenowy (PEG) [25–28] oraz jego akrylowana forma (PEGMEMMA) [29].

PGS jest związkiem, który można otrzymać na drodze syntez indukowanych czynnikami takimi jak obecność katalizatora, temperatura bądź promieniowanie mikrofalowe, a do syntezy wykorzystać można monomery sebacynowe takie jak SA lub sebacynian dimetylu (DMS). Dodatkowo proces sieciowania PGS może być indukowany termicznie, mikrofalowo lub fotochemicznie. Należy pamiętać, że wybór odpowiedniej metody syntezy, monomerów oraz techniki sieciowania zależy od pożądanej struktury oraz planowanego zastosowania końcowego produktu.

1.2 Właściwości PGS

W zależności od metody syntezy, sieciowania oraz techniki formowania, materiał na bazie PGS posiada odmienne właściwości fizykochemiczne, mechaniczne, oraz biologiczne. PGS jest polimerem biodegradowalnym oraz bioresorbowalnym, który pod wpływem hydrolizy wiązań estrowych traci wytrzymałość mechaniczną proporcjonalnie do ubytku masy [1, 6, 30, 31]. W pracy autorstwa Pomerantseva et al. przedstawiono właściwości litych krążków z sieciowanego PGS podczas degradacji *in vivo* [6]. Autorzy publikacji zbadali czas degradacji PGS i powiązali go z gęstością usieciowania tego polimeru. Inną ciekawą właściwością fizykochemiczną hydrożeli na bazie PGS jest ich tiksotropia [29]. Kolejną istotną cechą PGS jest jego biokompatybilność. Jest ona zależna od warunków syntezy i sieciowania, jednak w wielu przykładach literaturowych jest opisywano jako odznaczający się biokompatybilnością [32, 33]. Niektórzy badacze przypisują tę właściwość endogennemu pochodzeniu SA oraz GLY, które są najpopularniejszymi monomerami wykorzystywanymi do syntezy PGS [4, 8, 34]. Warto nadmienić, że PGS jest polimerem o charakterze semikrystalicznym. Jego właściwości są więc zależne od temperatury przejścia szklonego fazy amorficznej oraz topnienia fazy krystalicznej [2]. W wielu badaniach DSC poli(sebacynian gliceryny) wykazuje kilka pików pochodzących od topnienia powyżej 0°C [1, 30, 35, 36]. Przejście szkliste znajduje się w przedziale temperatur pomiędzy -40, a -20°C.



Rysunek 3: Schemat przedstawiający głównie techniki formowania PGS oraz główne obszary jego wykorzystania.

Z punktu widzenia inżynierii tkankowej, niezwykle istotne są dynamiczne właściwości mechaniczne materiału, które pozwalają na zobrazowanie zachowania ma-

teriału w konkretnych warunkach fizjologicznych [37–39]. Materiał zaimplantowany *in vivo* poddawany jest naprężeniom oraz drganiom. Są to na przykład obciążenia zewnętrzne wynikające z pracy układu mięśniowo-szkieletowego ciała oraz wibracje fizjologiczne. Stąd wynika potrzeba wytworzenia materiału, który będzie wykazywał stabilność właściwości mechanicznych pod obciążeniem oraz drganiami niezależnie od długości ich trwania.

W literaturze opisano szereg materiałów na bazie PGS, które zostały poddane badaniu dynamicznej mechanicznej analizy termicznej (DMTA/DMA). Są to między innymi cienkie filmy [40], modyfikowane plazmowo porowate membrany [41], nanokompozyty PGS-co-PCL [24] oraz kompozyty PGS/Bioszkło [42]. W literaturze nie znaleziono doniesień na temat badań DMTA przeprowadzanych na porowatych kompozytach PGS/ceramika apatytowa, które są przedmiotem niniejszej rozprawy. Stały implant kostny nie ulega degradacji w przeciwieństwie do biodegradowalnego materiału wykorzystywanego w inżynierii tkankowej, który musi przenosić obciążenia tkanki kostnej oraz odgrywać rolę tymczasowego wypełnienia kostnego. Co więcej, możliwe jest stymulowanie proliferacji komórek na drodze mechanicznej dzięki efektowi mechanotransdukcji, którego obecność była badana na materiale bazującym na PGS [43]. Dynamiczne badania mechaniczne pozwalają na zbadanie właściwości materiału pod dynamicznie zmieniającymi się parametrami. Warto wobec tego zaznaczyć, że niektórzy naukowcy wskazują lepkosprężystość, a nie elastyczność jako kluczową właściwość matrycy do zastosowania w inżynierii tkankowej [44–46].

W zastosowaniu w inżynierii tkankowej istotna jest również charakterystyka mechaniczna biomateriałów, zarówno w badaniach statycznych, jak i dynamicznych. Własności mechaniczne PGS są zależne zarówno od metody syntezy, jak również parametrów sieciowania takich jak temperatura i czas [2]. Istotny wpływ na parametry wytrzymałościowe mają również stopień polimeryzacji, a także rozgałęzienia łańcucha oraz rozrzut masy cząsteczkowej, jak również szereg innych czynników takich jak np. obecność napełniacza, jego zawartość procentowa, czy forma przestrzenna materiału. Literatura sugeruje korelacje stopnia estryfikacji pPGS z wartością jego modułu Younga oraz charakterystyką biodegradacji [5]. Własności mechaniczne PGS i jego układów kompozytowych są wielokrotnie porównywane do właściwości tkanek występujących w ludzkim organizmie. Dla przykładu, moduł sprężystości tkanki

mózgowej nie przekracza 1 kPa, mięśniowej pomiędzy 8, a 17 kPa [3], a opisywana w literaturze wartość modułu Younga dla filmów wykonanych z PGS wynosi od 0,01 do 1,5 MPa. Z kolei wytrzymałość na rozciąganie PGS jest równa nawet 3-krotności wymiarów próbki [3]. Podobnie własności mechaniczne biomateriałów zawierających poli(sebacynian gliceryny) są zbliżone do właściwości siatkówki, tkanki nerwowej oraz chrzęstnej [2, 47, 48]. Taki zestaw właściwości pozwala na dopasowanie biomateriału na bazie PGS pod konkretne wykorzystanie w inżynierii tkankowej. W każdej z cytowanych prac, materiały preparowane były w inny sposób (różny sposób syntezy, parametry sieciowania oraz skład), stąd za każdym razem uzyskiwano inne parametry wytrzymałościowe. W literaturze wielokrotnie podkreślany jest nieliniowy przebieg zależności naprężenia od odkształcenia dla PGS podczas statycznego rozciągania. Jest to właściwość charakterystyczna dla miękkich materiałów elastomerowych [1, 2, 49]. Również wytrzymałość na rozciąganie materiałów na bazie PGS była przedstawiana w literaturze [1, 50]. Ponownie warto nadmienić, że jest ona ściśle zależna od formy materiału (np. lity/porowaty) oraz jego wymiarów i składu.

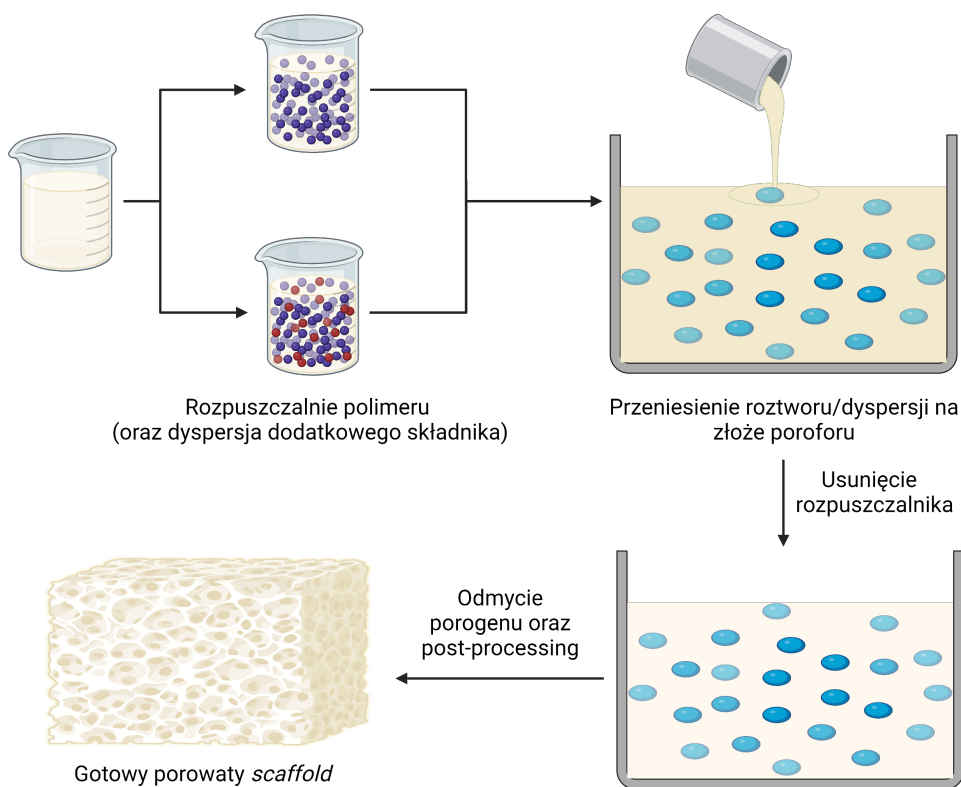
Badania aktywności biologicznej materiałów o potencjalnym zastosowaniu biomedycznym stały się standardem we współczesnej nauce o materiałach. Na właściwości biologiczne materiału mają wpływ dodatki takie jak np. ceramika, jak również sama technika formowania. Wpływają one nie tylko na właściwości chemiczne czy fizyczne, ale również biologiczne wytworzonego materiału. Podstawą analizą w zestawie badań bezpieczeństwa biologicznego jest zbadanie cytotoksyczności potencjalnego biomateriału względem konkretnej linii komórkowej np. mysich fibroblastów linii L929 czy ludzkich preosteoblastów hFOB 1.19. Literatura opisuje wiele układów na bazie PGS, które nie wykazują cytotoksyczności [1, 51, 52]. Porównywać pod kątem biologicznym można jedynie materiały, które były ewaluowane w tych samych warunkach hodowlanych oraz z wykorzystaniem takiej samej linii komórkowej. Alternatywnie, możemy porównywać materiały wytworzone tą samą techniką lub w tych samych warunkach.

1.3 Techniki formowania materiałów na bazie PGS

Aby wykorzystać układy na bazie PGS w konkretnej aplikacji, muszą one posiadać odpowiedni kształt, strukturę oraz wymiary. Dzięki topliwości, potencjałowi sieciowania oraz rozpuszczalności m.in. w 1,4-dioksanie [35], tetrahydrofuranie [5, 7, 8], dimetyloformamidzie (DMF) [53–55] oraz etanolu [56], pPGS może być formowany szeregiem technik [57], włączając w to techniki rozpuszczalnikowe, druk 3D lub elektroprzędzenie. Forma materiału ściśle warunkuje jego potencjalne zastosowanie oraz właściwości mechaniczne, fizykochemiczne i biologiczne. Najbardziej popularnymi formami materiałów na bazie PGS są materiały lite, porowate membrany lub trójwymiarowe *scaffolds*.

1.3.1 Odlewanie rozpuszczalnikowe oraz termicznie indukowana separacja faz (TIPS)

Odlewanie rozpuszczalnikowe służy do wytwarzania materiałów porowatych bądź litych filmów. Do przeprowadzenia tej metody formowania konieczne jest zastosowanie suszarki w przypadku występowania lotnych rozpuszczalników. Metoda ta składa się z trzech głównych etapów: rozpuszczenia polimeru, przeniesienia roztworu do formy oraz odparowania rozpuszczalnika (i ewentualnego sieciowania materiału polimerowego) [47]. Schematycznie proces ten przedstawiono na Rysunku 4. Morfologię porowatości materiału możemy kontrolować doбором rodzaju porogenu oraz średnicy jego ziaren. Wykorzystane porofory mogą posiadać rozmiary od niewielkich (25-32 μm) [32] aż po znacznie większe (400-500 μm) [35]. W technice odlewania rozpuszczalnikowego możliwa jest również inkorporacja napełniacza w matrycę polimerową. W literaturze opisywany jest na przykład 1 wt.% dodatek nanorurek węglowych do roztworu PGS w THF. Tak uzyskany materiał odznaczał się lepszą wytrzymałością mechaniczną w stosunku do PGS bez napełniacza [7].



Rysunek 4: Schemat przedstawiający formowanie materiału polimerowego z wykorzystaniem technik rozpuszczalnikowych oraz porogenu. Schemat utworzony za pomocą BioRender.com

Jedną z najważniejszych technik wytwarzania porowatych *scaffoldów* jest TIPS (ang. *thermally induced phase separation*). Proces ten, opatentowany w roku 1981 przez A. Castro [58], początkowo służył do wytwarzania porowatych membran [59]. Jednakże został on z sukcesem zaadoptowany do wytwarzania trójwymiarowych *scaffoldów* o dużej porowatości [60]. Zasada działania TIPS opiera się na separacji fazowej odbywającej się podczas mrożenia roztworu polimeru oraz następnej liofilizacji celem usunięcia rozpuszczalnika. Materiały na bazie PGS można uzyskać za pomocą TIPS łącząc tę metodę zarówno z sieciowaniem termicznym [35, 61], jak i z sieciowaniem chemicznym, wykorzystując HDI jako czynnik sieciujący [21, 62]. Techniki rozpuszczalnikowe z wykorzystaniem soli jako poroforu są jedynymi z najpopularniejszych metod otrzymywania porowatej struktury materiału bazującego na PGS. Opisywanym technikom formowania można poddać PGS syntezowany wymienionymi wcześniej metodami jak również modyfikowany chemicznie prepolimer [20, 26, 61, 63–67]. Dodatkowo, formowanie opisywanymi technikami dopuszcza techniki sieciowania opisywane w podrozdziale 1.1.

1.3.2 Elektroprzędzenie

Elektroprzędzenie (ang. *electrospinning*) jest techniką wytwarzania dwuwymiarowych, porowatych struktur złożonych z licznych włókien. Wykorzystuje ona napięcie elektryczne do rozpylania ciągłego włókna z roztworu lub stopionego polimeru przez wąską szczelinę lub igłę [68]. Geometrię otrzymanego materiału można modyfikować zmieniając lepkość roztworu (stężenie polimeru), rodzaj kolektora (płaski, bębnowy) oraz wilgotność i temperaturę w komorze [69]. PGS formuje się techniką elektroprzędzenia w połączeniu z innymi polimerami stanowiącymi nośnik [70]. Jest to związane z małym ciężarem cząsteczkowym pPGSu, a w konsekwencji małą lepkością roztworu. Ponadto, przedzenie usieciowanego PGSu nie jest możliwe, ponieważ jest on nierozpuszczalny. Wśród elektroprzędzonych układów zawierających PGS możemy wyróżnić takie, które zawierały jako polimer nośnikowy PCL [64, 71–73], PVA [74, 75], PLGA [76] oraz PVP [77]. Badania pokazują również, że dobór odpowiednich rozpuszczalników do mieszaniny polimerowej ma wpływ na morfologię włókien - np. na ich grubość [78].

Większość z wymienionych mat zawierających PGS wskazywano do zastosowania w inżynierii tkanek miękkich. W literaturze są jednak znane również elektroprzędzone układy na bazie PGS funkcjonalizowane fosforanami wapnia w tym β -TCP lub hydroksyapatytem (HAp) do zastosowania w inżynierii tkanki kostnej [79, 80]. Cząstki TCP bądź HAp były dyspergowane w roztworze, który był następnie wykorzystywany w procesie elektroprzędzenia.

1.3.3 Druk 3D

Druku 3D jest techniką szeroko stosowaną w wytwarzaniu biomateriałów oraz medycynie regeneracyjnej. Ze względu na rosnące zainteresowanie PGS (Rysunek 1), naukowcy są zachęcani do adaptowania nowych technik jego przetwórstwa i formowania. Konieczność sieciowania PGSu stanowi poważną przeszkodę w jego przetwarzaniu technikami addytywnymi [18]. W związku z tym PGS może być adaptowany do druku 3D po uprzednich modyfikacjach chemicznych lub zmieszaniu z innym materiałem polimerowym [57]. Jednym z przykładów takiej adaptacji jest praca Singh i współautorów, którzy zmodyfikowali chemicznie materiał na bazie PGS i poddali go

drukowaniu 3D z zastosowaniem stereolitografii. Wytworzyli oni syntetyczne połączenia nerwowe, wykorzystując potencjał materiału do sieciowania promieniowaniem UV [55].

Adaptacja PGS do druku 3D w technice ekstruzyjnej FDM (ang. *fused deposition modelling*) jest możliwa na skutek połączenia polimeru z napełniaczem, bądź wytworzeniu z niego mieszaniny z innym polimerem o wysokiej podatności na wytłaczanie. Przykładem takiej mieszaniny jest PGS/PCL oraz wykorzystanie NaCl jako środka zagęszczającego filament do druku 3D [64]. Wydrukowane i usieciowane *scaffoldy* PGS/PCL indukowały angiogenezę w badaniach *in vivo* i były wskazywane do potencjalnego wykorzystania w inżynierii tkanki mięśnia sercowego. W literaturze opisano również sprzężenie dwóch technik formowania PGS, gdzie wydrukowano techniką FDM *scaffoldy* PGS/PCL zawierające cząstki bioszklą, które następnie pokrywano elektroprzędzoną matą wykonaną również z mieszaniny PGS/PCL [81]. Tak wytworzone materiały odznaczały się modułem Younga w zakresie 240-310 MPa.

1.4 Wykorzystanie hydroksyapatytu w inżynierii tkanki kostnej

HAp jest naturalnym mineralnym materiałem budulcowym kości złożonym z odmiennych od siebie form krystalograficznych apatyty wapnia o wzorze $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ [82]. HAp jest odpowiednim kandydatem do wykorzystania w inżynierii tkankowej kości, ponieważ posiada potencjał do lokalnego zwiększenia stężenia jonów Ca^{2+} , które mogą stymulować osteoblasty do wzrostu, jak również pobudzać różnicowanie się komórek pluripotencjalnych [83]. HAp wiąże się aktywnie z tkanką kostną i wykazuje potencjał osteokondukcyjny [84]. Kolejną cechą HAp, która przyczynia się do jego popularności w inżynierii tkanki kostnej, jest biokompatybilność oraz brak immunogenności [85–87].

Jest wiele metod syntezy HAp [88–90], włączając w to metodę strąceniową, hydrolytyczną oraz syntezę hydrotermalną. Możliwe jest również pozyskiwanie apatyty poprzez ekstrakcję ze składników naturalnych takich jak muszle skorupiaków [91], jajka [92] lub kości bydłce [93]. Najbardziej powszechnie stosowaną techniką pozyskiwania apatyty jest tzw. metoda strąceniowa, w której wykorzystywane są prekursorzy wapniowo-fosforowe. Właściwości HAp zależą w dużej mierze od stosunku

Ca/P, jak również od temperatury reakcji i jej pH [85].

Celem modulacji właściwości HAp, można domieszkować go innymi jonami zastępującymi kationy wapniowe oraz aniony fosforanowe i hydroksylowe [94, 95]. Kationy wapniowe mogą być substytuowane np. Sr^{2+} , Zn^{2+} lub Mg^{2+} , a aniony PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , bądź SiO_4^{4-} [95]. Tego rodzaju modyfikacje wpływają na strukturę krystaliczną materiału, jak również na jego właściwości mechaniczne, a co najważniejsze w kontekście inżynierii tkanek twardych, modyfikują właściwości biologiczne materiału [96–99].

W literaturze opisane są kompozyty polimerowo-ceramiczne zawierające HAp wskazywane są do zastosowania w medycynie regeneracyjnej układu kostnego. Są to kompozyty, które posiadają jako biodegradowalną matrycę polimerową między innymi polilaktyd (PLA) [100–103], bądź poli(laktyd-ko-glikolid) (PLGA) [104–106]. W literaturze naukowej są także doniesienia dotyczące modyfikacji PGSu za pomocą apatytu. Był on jednak wykorzystany nie jako jedyny składnik matrycy, a jako suplement do polikaprolaktonu (PCL) [107, 108].

Podsumowując, HAp jest wszechstronnym biomateriałem wykorzystywanym w inżynierii tkankowej kości. Jego właściwości takie jak biokompatybilność, bioaktywność oraz podobieństwo do naturalnej tkanki kostnej czynią go idealnym materiałem do tworzenia *scaffoldów*, nośników czynników wzrostu lub powłok dla implantów. Badania nad HAp w inżynierii tkankowej mają istotne znaczenie dla rozwoju skutecznych terapii regeneracyjnych oraz poprawy jakości życia pacjentów z uszkodzeniami kości i tkanek.

1.5 Wykorzystanie układów zawierających PGS

1.5.1 Systemy dostarczania leków

Systemy kontrolowanego dostarczania i uwalniania leków w odgórnie określonych dawkach są bardzo ważnym aspektem współczesnej medycyny, która zmierza w kierunku personalizacji względem potrzeb konkretnego pacjenta. Istotnym kierunkiem w rozwoju omawianych rozwiązań są inteligentne systemy, celowane selektywnie w ogniska patofizjologiczne bez naruszenia integralności zdrowych komórek [109]. Funkcja dostarczania leków może być również sprzężona w postaci funkcjonalnych

opatrunków przyspieszających regenerację tkanki, bądź podczas enkapsulacji aktywnego biologicznie składnika oraz leku w matrycy. Chcąc osiągnąć efektywne dostarczenie leku w organizmie, nośnik lub matryca powinna być stabilna w środowisku fizjologicznym. Dodatkowo, zwiększając rozpuszczalność substancji aktywnej w wodzie możemy zmniejszać jej toksyczność i kontrolować jej uwalnianie [57].

Istnieje wiele rodzajów układów do enkapsulacji i selektywnego dostarczenia leku na bazie PGS. Jednym z nich jest enkapsulacja w matrycy PGS antyseptycznej chlorheksydyny oraz berberyny, która jest terapeutycznym alkaloidem [110]. Autorzy cytowanego artykułu wykorzystali zjawisko pęcznienia PGS w etanolu, umieszczając kształtki PGS w nasyconym etanolowym roztworze aktywnych składników. Po odpowiednim nasączeniu i przemyciu wodą, materiał wykazywał działanie odpowiednie w zwalczaniu chorób przyzębia, a jego właściwości mechaniczne nie uległy znaczącej zmianie. Lity PGS był również przedstawiany w kontekście kontrolowanego uwalniania chemoterapeutyku, 5-Fluoracilu, wykorzystywanego w terapii przeciwnowotworowej [111]. W ciągu 7 dni od implantacji lek uwolnił się całkowicie, a tkanka nowotworowa reagowała na lek. Dodatkowo biomateriał nie indukował lokalnego stanu zapalnego i wykazywał dobrą biokompatybilność względem szczurów Wistar (uniwersalny szczep przeznaczony do badań *in vivo*). Inną gałęzią medycyny, w której systemy selektywnego uwalniania leków na bazie PGS mogą znaleźć zastosowanie jest urologia, a konkretniej schorzenie jakim jest zapalenie prostaty. Jako kolejny system selektywnego dostarczenia leku przedstawiono cylindryczną matrycę PGS, której rdzeń stanowił antybiotyk - cyprofloksacyna [112]. Rdzeń materiału był wykonany ze składnika aktywnego, a jego uwalnianie odbywało się na drodze osmozy oraz dyfuzji.

Wszystkie wymienione badania świadczą o możliwości wykorzystania PGS w systemach dostarczenia leków. Warto nadmienić, że enkapsulacja związków biologicznie czynnych może być dodatkowym atutem w zastosowaniach biomateriałów w medycynie regeneracyjno-implantacyjnej. Związki chemiczne aktywne biologicznie mogą np. działać bakteriobójczo, obniżyć lokalnie stan zapalny lub stymulować proliferację lub różnicowanie konkretnego rodzaju komórek. Podsumowując, poli(sebacynian gliceryny) jest obiecującym polimerem w obszarze zastosowania w systemach dostarczenia leków. Jego biokompatybilność, zdolność do kontrolowanego uwalniania

substancji oraz możliwość funkcjonalizacji czynią go atrakcyjnym materiałem do zastosowania w celu poprawy skuteczności terapii oraz zwiększenia wygody pacjenta.

1.5.2 Wykorzystanie PGS w inżynierii tkankowej

Inżynieria tkankowa (ang. *tissue engineering*, TE) jest interdyscyplinarnym obszarem nauki znajdującym się na pograniczu medycyny, biotechnologii i inżynierii materiałowej. Jej celem jest wytworzenie, odtworzenie lub przyspieszenie regeneracji konkretnej tkanki lub organu pacjenta [113, 114]. Każdy biomateriał wskazywany do zastosowań w TE musi nie tylko wspomagać proliferację oraz odgrywać rolę macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *extracellular matrix*, ECM), ale także posiadać szereg innych właściwości biologicznych w zależności od zastosowania. Regeneracja tkanek jest procesem złożonym i dynamicznym. W związku z tym wykorzystany biomateriał musi adaptować się do zmieniającej się niszy komórkowej [115–117]. Współczesna medycyna regeneracyjna wymaga również od biomateriałów dużej wytrzymałości mechanicznej celem przenoszenia naprężeń fizjologicznych oraz biodegradowalności. Materiały na bazie PGS są szeroko opisywane w literaturze jako odpowiednie do wykorzystania w inżynierii tkankowej [2, 47, 118].

PGS znajduje też swoje zastosowanie w kardiologii jako łąta sercowo-naczyniowa. Jedno z pierwszych zaproponowanych rozwiązań włączających w kompozycję PGS, dotyczyło matrycy, która w efektywny sposób dostarcza kardiomiocyty podczas interwencji zabiegowej przy niewydolności mięśnia sercowego [119]. Ciekawym rozwiązaniem w stymulowaniu szczurzych sercowych komórek progenitorowych jest inkorporacja wewnątrz włókniin na bazie PGS czynnika wzrostu VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*), który jest białkiem sygnałowym indukującym lokalne unaczynienie [120]. Wyniki badań biologicznych nad opisywanym materiałem wskazują na nasilanie angiogenezy, która jest istotnym procesem w przebiegu regeneracji w licznych chorobach m.in. kardiologicznych. Znane jest również zgłoszenie patentowe, które opisuje wykorzystanie materiału na bazie PGS jako sztucznego naczynia krwionośnego działającego jako macierz zewnątrzkomórkowa domieszkowana czynnikami wzrostu m.in. czynnikiem wzrostu guza TGF- α i TGF- β (ang. *tumor growth factor*) lub VEGF w zależności od zastosowania [121].

Charakterystyka ludzkiej tkanki chrzęstnej sprawia, że cechuje ją wytrzymałość na ogromną liczbę cykli obciążenia bez wyraźnego zmęczenia [122]. Stawia to nie małe wyzwanie przed badaczami, którzy prowadzą badania w zakresie medycyny regeneracyjnej. Warto zaznaczyć, że umiejscowienie tkanki chrzęstnej ma znaczenie w kontekście jej regeneracji. Na przykład tkanka chrzęstna w stawach nie jest unaczyniona i w związku z tym nie ma wysokiego potencjału do naturalnej regeneracji [123, 124].

Literatura opisuje szereg biomateriałów zawierających PGS do zastosowania jako implant bądź stymulujących chrząstkę do regeneracji. Xuan et al. w swojej pracy opisali trójskładnikowy porowaty kompozyt, którego matryca wykonana była z PGS oraz z poli(sebacynianu 1,3-propylenu) domieszkowanego kartogeniną [12]. Pianki odznaczały się pamięcią kształtu oraz biokompatybilnością w warunkach *in vitro*. Co jest najbardziej istotne w przytoczonym badaniu, kartogenina powodowała różnicowanie chondrogeniczne podczas implantacji *in vitro* powodując zwiększoną regenerację tkanki chrzęstnej na modelu szczurzym. Innym przykładem wykorzystania *scaffoldów* zawierających PGS jako jeden ze składników matrycy polimerowej jest badanie przedstawione przez Liu w 2019 roku [125]. Mieszanina polimerowa PGS/PCL wykazywała cytokompatybilność względem multipotencjalnych komórek macierzystych szpiku (BMSC, ang. *bone marrow mesenchymal stromal cells*) kostnego oraz indukowała różnicowanie się komórek BMSC w chondrocyty z wykorzystaniem odpowiedniego medium hodowlanego. Autorzy artykułu zwracają uwagę na ograniczone zastosowanie w inżynierii tkanki chrzęstnej materiałów o szybkim potencjale do degradacji. Wobec powyższego, wykorzystanie mieszaniny PGS z PCL jako matrycy poskutkowało wydłużonym czasem dekompozycji materiału.

Ciekawym wykorzystaniem PGS w inżynierii tkankowej są kleje tkankowe. Akrylowana pochodna PGS została zaprezentowana jako materiał do śródoperacyjnego scalania naczyń krwionośnych podczas zabiegów dotyczących wrodzonych wad serca. Wśród właściwości takiego materiału można wyróżnić adhezję do mokrych tkanek oraz wytrzymałość mechaniczną na ciśnienie generowane przez krew podczas przepływu przez naczynia. Innymi alternatywnymi aplikacjami biomateriałów na bazie PGS są również biodegradowalne nici chirurgiczne [126] oraz zastosowanie w medycynie opatrunkowej [127, 128].

Inżynieria tkankowa kości

Dane Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) wskazują na rosnącą częstość uszkodzeń oraz chorób kostnych wśród ludzi. Jako potencjalne przyczyny wskazywane są m.in. starzejące się społeczeństwo, nekroza kości, osteoporoza oraz choroby nowotworowe. W związku z powyższym, poszukiwane są nowe terapie związane z regeneracją tkanki kostnej, które będą alternatywą dla przeszczepów kostnych [129]. Idealny materiał dedykowany do inżynierii tkanki twardej powinien posiadać porowatą strukturę oraz odpowiednie właściwości mechaniczne, wystarczające do przeniesienia naprężeń fizjologicznych [130, 131]. Przykładowy schemat regeneracji tkanki kostnej polimerowym *scaffoldem* przedstawiono na rysunku 5. Oprócz tego dedykowany biomateriał powinien być nie tylko biokompatybilny, ale również posiadać potencjał osteoregeneracyjny [132] i przenosić obciążenia mechaniczne [133]. Wiele materiałów było badanych w kontekście medycyny regeneracyjnej układu kostnego. Najbardziej atrakcyjne materiały wykazują potencjał osteokonduktywny czyli, zdolność do stymulowania procesu kościotworzenia oraz pełnienia roli macierzy zewnątrzkomórkowej podczas implantacji *in vivo* [134, 135]. Warto również zaznaczyć, że tkanka kostna pełni istotną rolę w utrzymywaniu homeostazy organizmu oraz w regulowaniu pH krwi [136].

Istnieje wiele rodzajów substancji, które można inkorporować w biomateriał dedykowany do regeneracji tkanki kostnej. Wśród nich możemy wyróżnić czynniki wzrostu. Są to czynniki, które odgrywają ważną rolę w procesie rozwoju komórek i regeneracji tkanek. W inżynierii tkanki kostnej mogą wzbudzać bądź przyspieszać proces osteogenezy oraz chondrogeny (np. w fazie przejściowej pomiędzy tkanką chrzęstną i tkanką kostną). Wśród najczęściej wykorzystywanych mediatorów możemy wyróżnić białka morfogenetyczne kości BMP-2 oraz BMP-7 (ang. *bone morphogenetic protein*) jak również TGF- β 1. BMP-2 jest jednym z najsilniejszych czynników wzrostu, który stymuluje proliferację i różnicowanie komórek pluripotencjalnych w osteoblasty oraz wpływa na syntezę kolagenu typu I [137]. Z kolei BMP-7 jest wykorzystywany celem pobudzenia procesu tworzenia się nowej kości, a TGF- β 1 stymuluje różnicowanie się komórek prekursorowych w osteoblasty i wpływa na mineralizację kości [138].

Poza powyższymi czynnikami, które mają zastosowanie w inżynierii tkanki kostnej zastosowanie znajdują również aminokwasy i peptydy [138]. Aminokwasy są podstawowymi jednostkami tworzącymi krótkie cząsteczki peptydowe oraz długie i złożone strukturalnie białka. W szczególności atrakcyjne w inżynierii tkanki kostnej są aminokwasy zawierające ugrupowania hydroksylowe takie jak lizyna, hydroksylizyna oraz hydroksyprolina z uwagi na potencjał do modyfikacji strukturalnej biomateriału. Odgrywają one również istotną rolę w produkcji kolagenu, który stanowi główny składnik macierzy zewnątrzkomórkowej kości [139]. Negatywnie naładowane aminokwasy takie jak kwas asparaginowy oraz glutaminowy biorą udział w mineralizacji tkanki kostnej, a pozytywnie naładowane takie jak arginina i lizyna powodują nukleację cząstek apatytowych w macierzy zewnątrzkomórkowej [140, 141].

Peptydy, takie jak sekwencja RGD (arginina-glicyna-kwas asparaginowy) poprawiają adhezję wypełniania kostnego lub implantu, co wpływa korzystnie na proces integracji biomateriału z tkanką [142]. Peptyd RGD stymuluje również proliferację osteoblastów oraz ekspresję m.in fosfatazy alkalicznej (ALP, ang. *alkaline phosphatase*), osteokalcyny (OC) a także osteopontyny (OPN) [143–145]. Innym przykładem peptydu wykorzystywanego w regeneracji tkanki kostnej jest DGEA, który wspomaga różnicowanie osteogeniczne [146, 147] oraz SVVYGLR, który jako część sekwencji OPN stymuluje przyleganie i proliferację komórek pluripotencjalnych [148, 149].

Przykładami białek, które istotnie wpływają na procesy regeneracyjne tkanki kostnej są OC i OPN. OC jest białkiem składającym się z sekwencji 46 aminokwasów, które posiada właściwości regulacyjne w procesie kościotworzenia [150, 151]. Jest ono produkowane tylko przez dojrzałe osteoblasty. Badania wykazały, że OC wpływa również na proliferację osteoblastów, mineralizację macierzy kostnej oraz regulację poziomu glukozy we krwi [150]. OPN z kolei jest białkiem biorącym udział w regulacji procesu resorpcji kości oraz procesach zapalnych towarzyszących zakażeniom i urazom mechanicznym [152]. OPN stymuluje również proliferację osteoblastów oraz osteoklastów.

Kolejną klasą substancji aktywnych, które mają zastosowanie w medycynie regeneracyjnej tkanki kostnej są czynniki wzrostu (GF, ang. *growth factors*). Są to polipeptydy stymulujące procesy komórkowe takie jak proliferacja i różnicowanie.

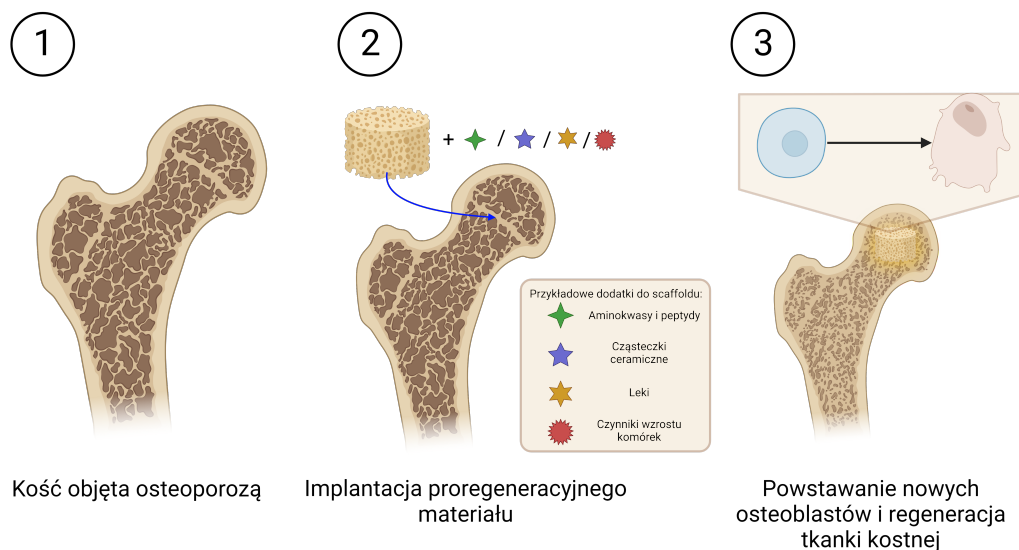
Czynniki wzrostu są uważane za związki istotne w procesach regeneracyjnych [153]. Wśród najważniejszych z nich możemy wyróżnić rodzinę białek BMP [154, 155]. Istnieją również inne rodzaje związków aktywnych biologicznie istotnych w procesach regeneracyjnych tkanki kostnej. Są to m.in. flawonoidy [156] oraz sterole roślinne [157].

Głównymi polimerami wykorzystywanymi jako matryca w inżynierii tkanki kostnej są: PLA, PCL oraz chitozan [158]. Dzięki elastomerycznemu charakterowi, PGS znajduje również zastosowanie w inżynierii tkanki kostnej jako macierz zewnątrzkomórkowa.

Poli(sebacynian gliceryny) jako matryca w inżynierii tkanki kostnej posiada szereg zalet wyróżniających go w porównaniu do konkurencyjnych materiałów polimerowych. Możemy wśród nich wyróżnić elastomeryczny charakter, którego kontrolowanie pozwala na dostosowanie właściwości materiału do potrzeb, jak również kontrolowaną kinetykę degradacji [6].

Literatura opisuje dwufazowe materiały na bazie PGS oraz β -TCP [159]. W toku sieciowania, faza ceramiczna przemieszczała się w dół materiału tworząc materiał gradientowy. Biomateriał posiadał aktywną porowatą część ceramiczną oraz nieprzepuszczalną fazę polimerową. Tak wytworzony materiał posiadał moduł Younga na poziomie $1,95 \pm 0,4$ MPa oraz wydłużenie przy zerwaniu wynoszące 24 ± 2 %. Dodatek dwóch czynników wzrostu (BMP-2 oraz TGF- β 1) do matrycy przyczynił się do tworzenia się wydajniejszej macierzy zewnątrzkomórkowej oraz do bardziej regularnej morfologii komórek osteoblastycznych. Kolejnym układem na bazie PGS do zastosowania w inżynierii tkanki kostnej są porowate kompozyty PGS/nanometryczny hydroksyapatyt wytworzone techniką rozpuszczalnikową z wymywaniem porogenu [160]. Prepolimer był uprzednio modyfikowany chemicznie bezwodnikiem maleinowym, celem zwiększenia właściwości bakteriobójczych polimeru. *Scaffolds* posiadały porowatość nie mniejszą niż 84% z przeważającym charakterem otwartym. Dodatek fazy apatytowej znacząco poprawił wytrzymałość mechaniczną materiału oraz spowodował zwiększoną ekspresję OC i innych istotnych markerów kościotworzenia. Innym przykładem systemu do wykorzystania w inżynierii tkankowej jest elektroprzędzona mata PCL/PGS z dodatkiem β -TCP, która ma pełnić rolę interfejsu pomiędzy chrząstką a kością, działać proregeneracyjnie i efektyw-

nie przenosić obciążenia [79]. PGS jako matryca jest niewystarczająco wytrzymała mechanicznie, aby przenosić fizjologiczne obciążenia. Po dodatku napełniacza apatytowego zyskuje on dodatkową wytrzymałość oraz właściwości osteoregeneracyjne. Udział składników aktywnych w regeneracji tkanki kostnej został schematycznie przedstawiony na Rysunku 5.



Rysunek 5: Schemat przedstawiający regenerację tkanki kostnej zajętej osteoporozą z wykorzystaniem modyfikowanego *scaffoldu* polimerowego. Rysunek utworzony za pomocą BioRender.com

Istnieją również wynalazki zarejestrowane w bazach patentowych, które dotyczą wykorzystania PGS w inżynierii tkanki kostnej. Znana jest receptura na wypełnienie kostne o modyfikowalnej gęstości na bazie PGS oraz bioszklą [161]. Materiał promuje osteointegrację oraz posiada moduł sprężystości w przedziale 0,05-1,5 MPa. Kolejne osteokonduktywne wypełnienie kostne to formułacja na bazie PGS lub jego pochodnych oraz fosforanów wapnia [162]. W opisie zgłoszenia patentowego porowata matryca z PGS była sieciowana w przedziale czasowym od 24 do 96 godzin oraz wykazywała cytozgodność względem wybranych linii komórkowych. Innym ciekawym rozwiązaniem będącym na pograniczu inżynierii tkanki chrzęstnej i kostnej jest wynalazek znany ze zgłoszenia patentowego o numerze US2021401580A1 [163]. Wynalazek ten opisuje zastosowanie PGS w implantacji stawów krzyżowo-biodrowych. W zgłoszeniu opisano również dodatek białek BMP oraz antybiotyków do matrycy celem poprawienia regeneracji stawu i obniżenia ryzyka zakażeń bakteryjnych.

Jak przedstawiono w niniejszym rozdziale, badania nad wykorzystaniem PGS w inżynierii tkankowej są realizowane przez ośrodki badawcze na całym świecie. Zarówno wyniki badań *in vitro*, jak i *in vivo* wykazały, że PGS wspomaga adhezję i proliferację komórek wspomagając tworzenie funkcjonalnych struktur kostnych. Dzięki biodegradowalności, PGS z czasem ulega rozkładowi, jednocześnie dając przestrzeń dla nowo powstałej tkanki. Poli(sebacynian gliceryny) jest również obiecującym materiałem w inżynierii tkanki kostnej. Dzięki możliwości formowania go w porowate struktury oraz funkcjonalizacji jest on atrakcyjnym wyborem jako modyfikowany *scaffold* stymulujący regenerację oraz naprawę defektów kostnych. Kontynuacja badań dotyczących zastosowania PGS w medycynie regeneracyjnej układu kostnego może przynieść dalsze postępy w tej dziedzinie i przyczynić się do rozwoju skuteczniejszych terapii regeneracyjnych dla pacjentów z uszkodzeniami tkanki kostnej.

Rozdział 2

Metodologia badawcza

2.1 Synteza hydroksyapatytu

Synteza HAp była wykonana techniką strącaniową we współpracy z mgr inż. Dągmarą Słotą oraz prof. dr hab. inż. Agnieszką Sobczak-Kupiec z Katedry Inżynierii Materiałowej Politechniki Krakowskiej. Syntezę wykonano wg. poniżej procedury.

Odważono 3,63 g soli Na_2HPO_4 , która została następnie rozpuszczona w 80 mL wody destylowanej. Roztwór został przeniesiony do trójściennej kolby okrągłodennej z podłączoną chłodnicą oraz termoparą. R-r został następnie rozcieńczony 520 mL wody destylowanej. Do mieszaniny reakcyjnej dodano kilka kropel 25% wody amoniakalnej do uzyskania zasadowego pH ok. 11. Po doprowadzeniu mieszaniny do wrzenia kroplami dodawano wodny roztwór $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (przygotowany przez rozpuszczenie 4,51 g jednokrotnego hydratu octanu wapnia w 200 mL wody) w tempie ok. 1 kropli na sekundę. Po wkropleniu, mieszaninę reakcyjną schłodzono do temperatury pokojowej i przelana do zlewki na 24h celem sedymentacji osadu. Osad był następnie przemywany wodą do uzyskania obojętnego pH. Po odwirowaniu, supernatant został zdekantowany, a otrzymany HAp poddany liofilizacji po uprzednim zamrożeniu.

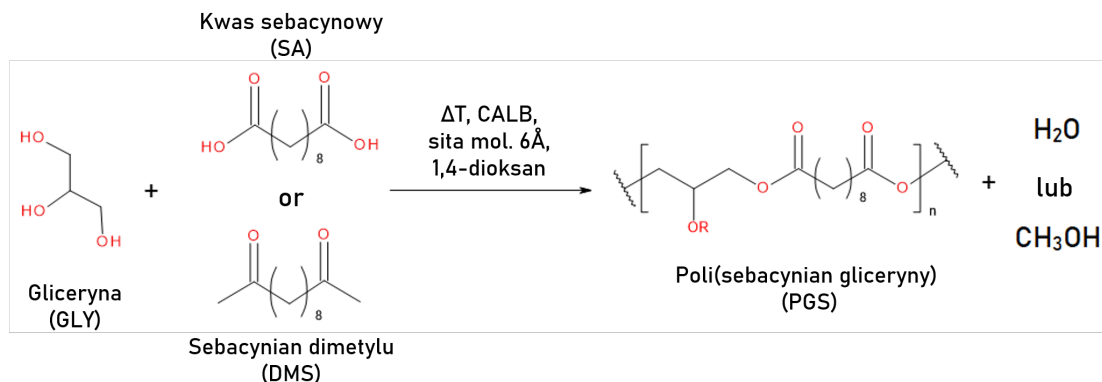
2.2 Synteza pPGS

2.2.1 Synteza PGS metodą bezrozpuszczalnikowej polikondensacji temperaturowej

Synteza była przeprowadzana na reaktorze EasyMax 102 (Mettler Toledo, Columbus, USA) w reaktorze o pojemności 100 mL z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego. Do naczynia reakcyjnego wprowadzono w stosunku równomolowym SA (21,95 g) oraz GLY (10 g). Mieszanina reakcyjna była podgrzana do 130°C przy jednoczesnym mieszaniu, aż do rozpuszczenia się substratu. Po 24h w 130°C temperatura reakcji była obniżana do 25°C, a prepolimer zachowany do charakterystyki oraz dalszych procesów formowania. Drugi wariant syntezy obejmował trzykrotne zwiększenie ilości substratów z zachowaniem tych samych warunków reakcji. Warunki reakcji dobrano eksperymentalnie biorąc pod uwagę jak najniższe rozgałęzienie prepolimeru przy dystrybucji masy cząsteczkowej przesuniętej w kierunku jak najwyższych wartości.

2.2.2 Synteza PGS katalizowana enzymatycznie

Enzymatyczna synteza PGS została wykonana podczas stażu na Martin Luther University of Halle-Wittenberg (Halle, Niemcy) we współpracy z dr Razan Alaneed oraz pod opieką prof. dr Joerga Kresslera. Synteza pPGS była przeprowadzana z wykorzystaniem Lipazy B izolowanej ze szczepu drożdży CALB (ang. *Candida Antarctica Lipase B*). Procedura została zaadoptowana z publikacji Perin et al. [13] z wprowadzonymi zmianami w protokole eksperymentalnym. Zmiany obejmowały przeprowadzenie reakcji w 40, 50 oraz 60°C w 1,4-dioksanie oraz wygaszenie aktywności enzymu dodatkiem metanolu (MeOH). Mieszaniny monomerów biorących udział w reakcji obejmowały SA oraz GLY w stosunku 1:1 oraz SA i sebacynian dimetylu (DMS) również w stosunku 1:1. Schemat reakcji został przedstawiony na Rysunku 6. Próbkę z reakcji były pobierane w interwałach czasowych w zakresie 2-24h, odparowywane pod strumieniem azotu i przeznaczone do dalszej analizy.



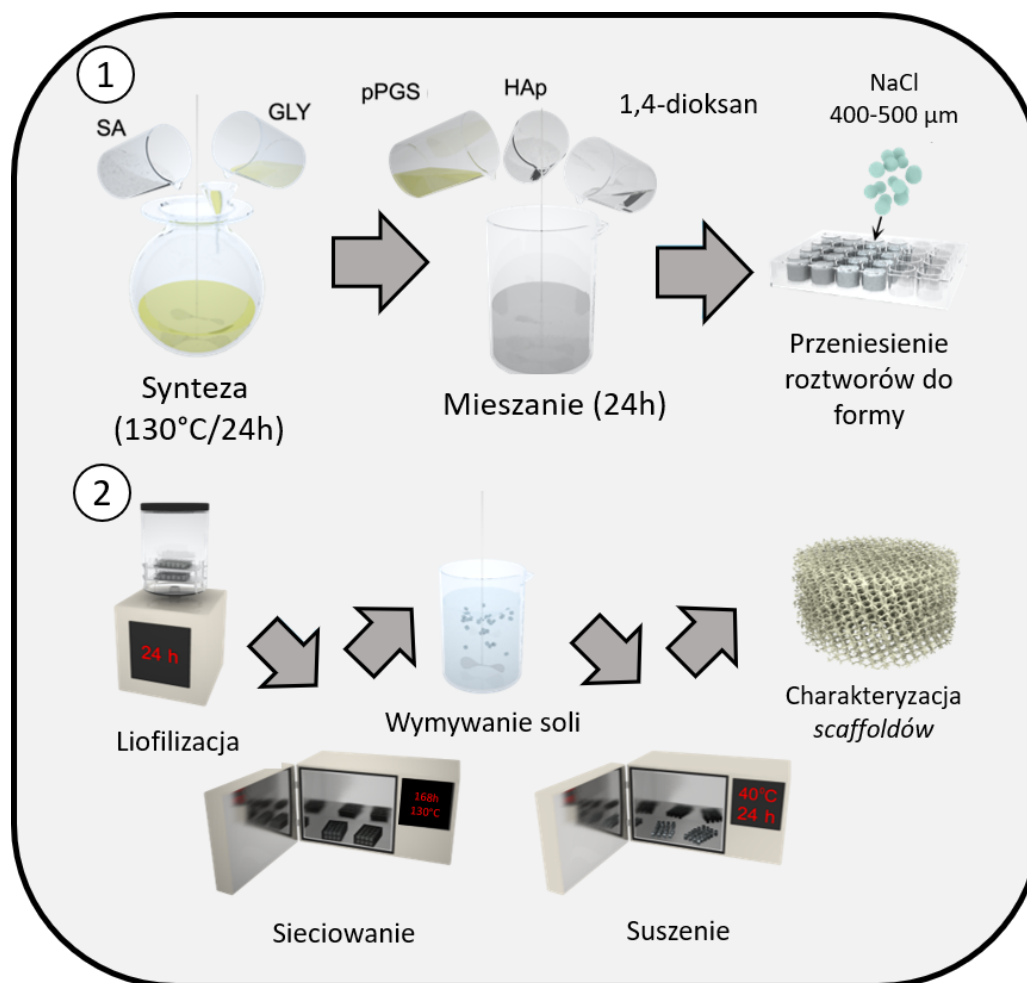
Rysunek 6: Schemat enzymatycznej syntezy pPGS, katalizowanej CALB, z dwóch monomerów sebacynowych (SA i DMS).

Po upływie 24h prepolimery otrzymane na drodze syntezy enzymatycznej zostały poddane procesowi dializy z wykorzystaniem membrany Spectra/Por 7 o odcięciu frakcji poniżej 1 kDa (1 kDa MWCO). Produkty reakcji były rozpuszczane w 1,4-dioksanie w stężeniu 5%, a następnie umieszczone wewnątrz membrany dializacyjnej i szczelnie zamknięte klamrami dociskowymi. Następnie membrana była umieszczana w 1,4-dioksanie na 48h z wymianą rozpuszczalnika po upływie doby. Po wykonaniu dializy, prepolimery były mrożone i poddawane procesowi liofilizacji przed dalszymi badaniami.

2.3 Przetwarzanie oraz formowanie prepolimeru

2.3.1 Formowanie porowatych *scaffoldów* PGS i PGS/HAp

Porowate *scaffolds* na bazie PGS oraz kompozytowe PGS/HAp były wytwarzane techniką TIPS z sieciowaniem termicznym (ang. *thermal cross-linking*, TCL) oraz wymywaniem soli (ang. *salt-leaching*, SL). Skrót wyżej opisywanej techniki został przyjęty jako TIPS-TCL-SL.



Rysunek 7: Schemat formowania porowatych *scaffoldów* PGS/HAp techniką TIPS-TCL-SL.

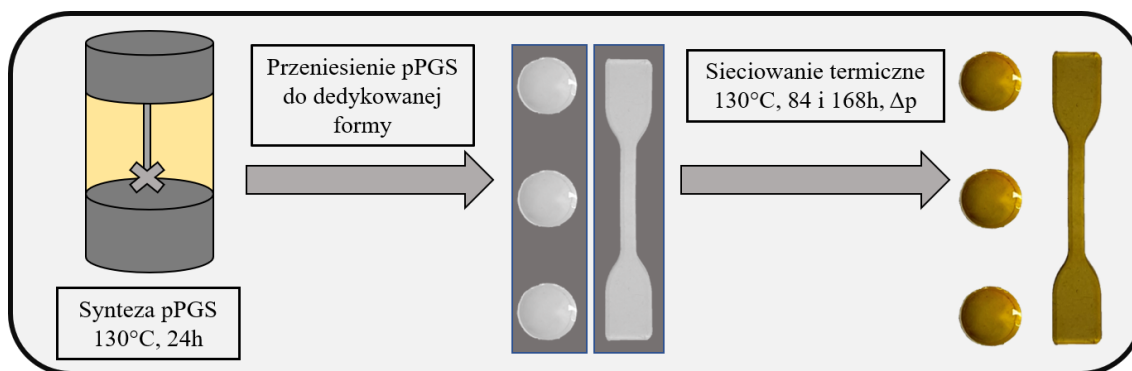
Prepolimer pPGS rozpuszczono w roztworze 1,4-dioksanu w stężeniu 20%. W przypadku kompozytów zawierających HAp, faza apatytowa była wprowadzana do ww. roztworu tak aby stosunek masowy HAp do sumy HAp i rozpuszczonego pPGS wynosił odpowiednią wartość np. 10/20/30%. Następnie do silikonowej formy wielodółkowej odważono 1,5 g poroforu NaCl o uziarnieniu 400-500 µm. Na złożę porogenu przeniesiono 0,75 mL odpowiedniego roztworu PGS lub PGS/HAp w 1,4-dioksanie. Płytkę była mrożona przez 24h przed następującą liofilizacją, która również trwała 24h. Następnie, zliofilizowane materiały usieciovano termicznie w następujących warunkach:

- 185°C przez 2,5h
- 130°C przez 168h w warunkach obniżonego ciśnienia

Po sieciowaniu termicznym, *scaffolds* były usuwane z formy i umieszczane w 10L zlewkach z wodą destylowaną, na mieszadło magnetycznym, celem rozpuszczenia soli. Woda w zlewkach wymieniana była po 30 minutach, 1h, 3h, 5h, oraz 24h. Po odmyciu porogenu, pianki były suszone w 40°C przez 24h. Tak przygotowane materiały poddano dalszym eksperymentom oraz charakterystyce. Poglądowy schemat formowania *scaffoldów* PGS/HAp techniką TIPC-TCL-SL został przedstawiony na Rysunku 7.

2.3.2 Formowanie materiałów litych

Synteżowany w 130°C przez 24h pPGS był podgrzany do temperatury 60°C z wykorzystaniem łaźni wodnej, a następnie 1,5 mL prepolimeru było przenoszone do silikonowej płytki wielodołkowej. Materiał następnie sieciowano w suszarce próżniowej, w temperaturze 130°C, w warunkach obniżonego ciśnienia przez 84 i 168h. Po sieciowaniu lite cylindry z PGS poddano dalszej analizie. Oprócz kształtu cylindrycznego materiał wprowadzano również do formy o kształcie normatywnej kształtki do badań wytrzymałościowych 5A. Poglądowy schemat formowania litych materiałów na bazie PGS został przedstawiony na Rysunku 8 poniżej.



Rysunek 8: Schemat formowania litego PGS.

2.4 Wykorzystane techniki badawcze

2.4.1 Pomiar kąta zwilżania

Pomiar kąta zwilżania odbywał się z wykorzystaniem goniometru PG-X (Testing Machines Inc.) oraz wody destylowanej jako rozpuszczalnika. Dla każdej mierzo-

nej próbki rejestrowano 5 pomiarów, które następnie uśredniano oraz wyznaczano odchylenie standardowe jako średni błąd pomiaru.

2.4.2 Pomiar gęstości względnej i porowatości *scaffoldów*

Porowatość *scaffoldów* ($\Phi_{\%}$) była wyznaczana z wykorzystaniem metody gravimetrycznej [164], przy wykorzystaniu gęstości względnej badanych materiałów zgodnie z równaniem 1 poniżej.

$$\Phi_{\%} = (1 - \rho_s/\rho_b) \cdot 100\% \quad (1)$$

Gęstość względna *scaffoldów* (ρ_s) oraz litego materiału (ρ_b) była wyznaczana przy wykorzystaniu wagi hydrostatycznej Hildebrand H-300S. Lity materiał sieciowano w taki sam sposób jak *scaffoldy* w odniesieniu do jednej serii pomiarowej. Teoretyczna wartość gęstości kompozytów PGS/HAp była obliczana w oparciu literaturową gęstość HAp [165].

2.4.3 Stopień usieciowania

Do zobrazowania stopnia usieciowania PGS wykorzystano technikę rozpuszczalnikową opisaną w literaturze, z zamianą tetrahydrofuranu na etanol [166, 167]. Próbkę usieciowanego PGS (lita lub porowata) zważono (W_1), a następnie umieszczono w fiolce i zalano 20 mL 96% alkoholu etylowego (EtOH) na 24h. Po upływie czasu próbkę usunięto z rozpuszczalnika, następnie osuszono, a następnie umieszczono w suszarce atmosferycznej ustawionej na termostatowanie w 40°C na 24h. Po wysuszeniu próbka była ponownie zważona (W_2), a stopień usieciowania był wyznaczony z poniższego wzoru:

$$S = 100\% - \left(\frac{W_1 - W_2}{W_1} \cdot 100\% \right) \quad (2)$$

2.4.4 Charakterystyka spektroskopowa

Magnetyczny rezonans jądrowy

Badanie oraz analiza wyników dotyczących magnetycznego rezonansu jądrowego zostały przeprowadzone we współpracy z dr inż. Sanią Zielińską w Katedrze Inżynierii i Technologii Polimerów. Widma protonowego (^1H NMR) oraz węglowego (^{13}C NMR) magnetycznego rezonansu jądrowego ang. *Nuclear magnetic resonance*, NMR) były rejestrowane na spektrometrze Avance 400 MHz (Bruker, Billerica, USA) w 20°C , z czasem rejestrowania 3,3 s, szerokością widma 8013 Hz, 32 skanami oraz rozdzielczością 0,3 Hz. Jako rozpuszczalnik wykorzystano deuterowany aceton.

Spektroskopia w podczerwieni (ATR-FTIR)

Widma FT-IR rejestrowane były techniką spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni z transformatą Fouriera (ang. *Attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy*, ATR-FTIR). Widma były rejestrowane na spektrometrze Nicolet iZ10 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) z przystawką ATR. Widma były mierzone w 32 skanach z rozdzielczością 4 cm^{-1} w zakresie $4000\text{-}550\text{ cm}^{-1}$.

2.4.5 Analiza termiczna

Skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC)

Badania oraz analiza wyników DSC zostały przeprowadzone we współpracy z dr inż. Małgorzatą Gazińską w Katedrze Inżynierii i Technologii Polimerów Politechniki Wrocławskiej. Krzywe DSC (ang. *Differential scanning calorimetry*) zostały zarejestrowane z wykorzystaniem systemu DSC1 STARe (Mettler Toledo). Pomiary odbywały się w zakresie temperatur od -70 do 250°C , z prędkością grzania i chłodzenia $10\text{K}/\text{min}$. Pomiar próbek odbywał się w dedykowanych aluminiowych tyglach z przepływem azotu na poziomie $60\text{ mL}/\text{min}$.

Analiza termograwimetryczna (TGA)

Analiza TGA (ang. *Thermogravimetric analysis*) była przeprowadzona z wykorzystaniem urządzenia TGA/DSC1 (Mettler Toledo). Próbki były podgrzewane z prędkością 10 K/min, w zakresie temperatur 25-900°C, w przepływie azotu 60 mL/min.

2.4.6 Obrazowanie wytworzonych materiałów

Obrazowanie oraz badania próbek techniką mikrotomografii zostały przeprowadzone we współpracy z dr inż. Magdaleną Kobielarz w Katedrze Mechaniki, Inżynierii Materiałowej i Biomedycznej Politechniki Wrocławskiej oraz z mgr inż. Dagmarą Słotą w Katedrze Inżynierii Materiałowej Politechniki Krakowskiej.

Preparatyka próbek

Przekroje poprzeczne *scaffoldów* zostały wykonane na kriostacie Hyrax C50 (Zeiss, Jena, Niemcy) w temperaturze -25°C.

Stereoskopowa mikroskopia optyczna

Obrazowanie stereoskopowe wytworzonych materiałów odbywało się z wykorzystaniem systemu mikroskopowego Stereo Discovery V20 (Zeiss) w Katedrze Mechaniki, Inżynierii Materiałowej i Biomedycznej Politechniki Wrocławskiej. Zdjęcia morfologii powierzchni wykonano również na mikroskopie VHX Series Digital Microscope (Keyence, Japonia) w Katedrze Inżynierii Materiałowej Politechniki Krakowskiej. Zdjęcia wykonano z rozdzielczością całkowitą 4000 x 3000 pikseli, w trybie 4k oraz w trybie HDR z wykorzystaniem analizy głębi ostrości. Czujnik CMOS VHZ-7000 (Keyence) pozwolił na wykonanie analizy chropowatości struktury oraz wykonania map 3D powierzchni *scaffoldów*.

Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)

Mikrofotografie SEM (ang. *Scanning electron microscopy*) analizowanych materiałów zostały zarejestrowane z wykorzystaniem mikroskopu Phenom ProX (Thermo

Scientific). Średnice porów na mikrofotografiach były mierzone 10-krotnie w oprogramowaniu ImageJ. Przedstawiona wartość jest średnią arytmetyczną zarejestrowanych wyników. Pomiar EDS (ang. *Energy Dispersive Spectroscopy*) został wykonany na *scaffoldach* za pomocą systemu SEM Jeol 5510LV. Progowy kąt wynosił 30° , a napięcie 100 kV.

Mikrotomografia μ CT

Celem analizy mikrostruktury, *scaffoldy* były skanowane mikrotomografem Sky-Scan 1172 (Bruker, Belgia). Próbki były skanowane bez użycia filtra, z rozdzielczością $9 \mu\text{m}$ i kątem skanowania 180° . Natężenie lampy rentgenowskiej wynosiło $222 \mu\text{A}$, a jej napięcie 44 kV, krok wynosił $0,25^\circ$, a czas ekspozycji 500 ms. Po wykonaniu rekonstrukcji w programie NRecon (Bruker, Belgia), w każdym *scaffoldzie* zostały wytworzone cylindryczne obszary zainteresowania (ang. *volumes of interest*, VOI) o średnicy 100 mm i wysokości 3,5 mm. Analiza parametrów mikrostruktury została przeprowadzona z wykorzystaniem parametrów 3D opisujących morfologię struktury przestrzennej pianek: porowatość całkowita ($\text{Po}(\text{tot})$ [%]), porowatość otwarta ($\text{Po}(\text{op})$ [%]), porowatość zamknięta ($\text{Po}(\text{cl})$ [%]), objętość porów zamkniętych i otwartych ($\text{Po.V}(\text{op})$, $\text{Po.V}(\text{cl})$ [mm^3]), rozmiar poru jako średnica (ESDv [μm]), największa średnica poru (Maj.Dm [μm]) oraz sferyczność (Sph [-]).

2.4.7 Analiza właściwości mechanicznych

Wytrzymałość na ściskanie

Wytrzymałość na ściskanie materiałów litych

Statyczne testy ściskania jednoosiowego litych materiałów odbywały się na maszynie Instron 5966 (Instron, USA) wyposażonej w głowicę 10 kN oraz z prędkością ściskania 1 mm/min. Cylindryczne próbki posiadały średnią wartość średnicy 15 mm i wysokość 8 mm. Pomiar był prowadzony do momentu zniszczenia próbki lub uzyskania 70% odkształcenia. Wyznaczona krzywa naprężenie-odkształcenie pozwoliła na wyznaczenie Modułu Younga (E).

Wytrzymałość na ściskanie porowatych scaffoldów

Statyczne testy ściskania jednoosiowego porowatych *scaffoldów* odbywały się na maszynie Instron 5966 wyposażonej w głowicę 10 kN oraz z prędkością ściskania 10 mm/min. Pomiar odbywał się do uzyskania odkształcenia 70%. Na podstawie otrzymanych wartości siły i przemieszczenia, zostały wykonane wykresy naprężenia od odkształcenia, z których wyznaczono moduł Younga (E) oraz naprężenia przy 40 i 70% odkształcenia. Dodatkowo, badanie zostało przeprowadzone w obciążeniu cyklicznym przy 10-ciu statycznych cyklach, z zachowaniem wszystkich parametrów badania statycznego. Badaniu zostały poddane cylindryczne próbki o średnicy 1,5 cm i wysokości 0,75 cm.

Wytrzymałość na rozciąganie

Statyczne testy rozciągania jednoosiowego były przeprowadzane na maszynie Instron 5966 (Instron, USA) wyposażonej w głowicę 10 kN oraz w mechaniczne szczęki zaciskowe. Test odbywał się z prędkością 10 mm/min z wykorzystaniem normatywnych kształtek 5A o długości 7,5 cm i szerokości 12,5 cm w najszerszym punkcie oraz 4 cm w przebiegu szyjki (zgodnie z normą ISO-527-2:2012). Bazując na wartości modułu E wyznaczonego z prób rozciągania, na podstawie równania znanego z literatury, obliczono gęstość usieciowania (n) [1, 6, 168]:

$$n = \frac{E_0}{3RT} \quad (3)$$

Gdzie:

n – liczba moli

E_0 – moduł Younga [Pa]

R – uniwersalna stała gazowa (8,314 [J/mol · K])

T – temperatura [K]

Analiza DMTA

Badania oraz analiza wyników DMTA zostały przeprowadzone we współpracy z dr inż. Bartłomiejem Kryszakiem w Katedrze Inżynierii i Technologii Polimerów Politechniki Wrocławskiej.

DMTA Materiałów litych

Badanie DMTA (ang. *Dynamic mechanical thermal analysis*) było przeprowadzane na urządzeniu DMA/SDTA861e firmy Mettler Toledo. Dla materiałów litych test był przeprowadzany w trybie ściskania na cylindrycznych próbkach o średnicy 14 mm i wysokości 8 mm. Najpierw zostały przeprowadzone testy przedwstępne celem wyznaczenia *offsetu* siły odpowiedniej do wykonania pomiaru. Jej wartość została wyznaczona na poziomie 1,5 N. Następnie, właściwy pomiar został wykonany w zakresie temperatur od -50 do 250°C z prędkością grzania 3°C/min oraz stałą amplitudą przemieszczenia na poziomie 0,2 μm oraz częstotliwości 1 Hz. Kolejnym przeprowadzonym badaniem było przemiatanie częstotliwością w zakresie 0,1-100 Hz w zakresie liniowych odkształceń lepkosprężystych przy amplitudzie przemieszczenia 0,2 μm (takiej samej dla obydwu próbek) w temperaturze pokojowej.

DMTA porowatych *scaffoldów*

Porowate *scaffoldy* były analizowane z wykorzystaniem tej samej metodologii, jednak z pewnymi zmianami parametrów podczas testów. Test zmiennego naprężenia był przeprowadzany również w zakresie od 1 do 500 μm , z tym, że krok wynosił 5 μm . Drugą zmianą była inna amplituda przemieszczenia podczas testu przy zmiennej częstotliwości, która wynosiła 60 μm . Dla *scaffoldów* nie był przeprowadzany test temperaturowy.

2.5 Inkubacja *scaffoldów* w buforach fizjologicznych *in vitro*

Badania związane inkubacją *scaffoldów* w buforach fizjologicznych zostały wykonane podczas stażu w Katedrze Inżynierii Materiałowej Politechniki Krakowskiej we współpracy z mgr inż. Dagmarą Słotą oraz pod opieką prof. dr hab. inż. Agnieszki Sobczak-Kupiec.

2.5.1 Przygotowanie roztworów oraz inkubacja

Scaffoldy PGS oraz PGS/HAp zostały poddane 2-tygodniowemu badaniu degradacji w pięciu płynach: SBF (ang. *Simulated Body Fluid*), PBS (ang. *Phosphate Buffered Saline*), płynie Ringera, sztucznej ślinie oraz wodzie destylowanej. Dokładne

składy roztworów zostały przedstawione w tabeli 1. Roztwory zostały sporządzone poprzez rozpuszczenie odpowiednich soli w wodzie destylowanej za wyjątkiem roztworu PBS, który został sporządzony poprzez rozpuszczenie gotowego produktu handlowego w formie tabletki (Oxoid, Thermo Scientific) w wodzie destylowanej. Roztwór SBF został sporządzony wg. kolejności zawartej w tabeli 1. w temperaturze 36.5 °C. Na koniec został dodany 1M HCl do osiągnięcia ostatecznego pH w zakresie 7,50-8,00. Reszta roztworów została sporządzona w temperaturze pokojowej. Po 4 sztuki *scaffoldów* każdego rodzaju umieszczono w osobnych, jałowych pojemnikach o pojemności 100 mL, oraz zalano 75 mL każdego z ww. roztworów. Inkubacja była przeprowadzana w cieplarni ST 5 SMART firmy POL-EKO (Polska) w 37°C przez 14 dni.

Roztwór	Składnik	Ilość
PBS	NaCl	8,00 g/L
	KCl	0,20 g/L
	Na ₂ HPO ₄	1,15 g/L
	KH ₂ PO ₄	0,20 g/L
SBF	NaCl	8,04 g/L
	NaHCO ₃	0,36 g/L
	KCl	0,23 g/L
	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0,23 g/L
	MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,31 g/L
	1M HCl	40 mL
	CaCl ₂	0,29 g/L
	Na ₂ SO ₄	0,07 g/L
	Tris	6,12 g/L
1M HCl (do ustalenia pH)	0-5 mL	
Płyn Ringera	NaCl	8,60 g/L
	KCl	0,30 g/L
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,48 g/L
Sztuczna ślina	NaCl	0,40 g/L
	KCl	0,40 g/L
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,80 g/L
	Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O	0,78 g/L
	Na ₂ S · 7H ₂ O	0,01 g/L
	Mocznik	1,00 g/L

Tabela 1: Ilościowy i jakościowy skład roztworów wykorzystanych do badań degradacji i pęcznienia.

2.5.2 Pomiar pH oraz przewodnictwa roztworów inkubacyjnych

Podczas inkubacji roztwory, w których umieszczono *scaffolds* były poddane pomiarom pH oraz przewodnictwa. Badania te miały na celu zbadanie interakcji występujących pomiędzy próbkami a płynami inkubacyjnymi. Pomiar pH oraz przewodnictwa były wykonane na pH-metrze CX-701 firmy Elmetron (Zabrze, Polska) w interwałach czasowych.

2.5.3 Pęcznienie równowagowe

Zdolność pianek PGS, PGS/HAp 90/10, PGS/HAp 80/20 oraz PGS/HAp 70/30 do pęcznienia została zbadana w 5 płynach fizjologicznych (SBF, PBS, płyn Ringera, sztuczna ślina i woda destylowana) w czasie 14 dni, z pomiarami wykonanymi po czasie 15 minut, 30 minut, 1 godziny, 2 godzin, 4 godzin, 1 dnia, 2 dni, 7 dni, 9 dni i 14 dni. Próbki o masie początkowej w zakresie 0,14 - 0,22 g zostały umieszczone w jałowych pojemnikach i zalane 75 mL odpowiedniego płynu. Współczynnik pęcznienia (S_w) był wyliczany za pomocą równania 4 [50, 169, 170], gdzie W_t to masa nasiąkniętej próbki po danym czasie, a W_0 to masa początkowa.

$$S_w = \frac{W_t - W_0}{W_0} \cdot 100\% \quad (4)$$

Kinetyka pęcznienia *scaffoldów* była badana z wykorzystaniem modelu Voigta przy pomocy równania 5 [171, 172], gdzie S_t to w pęcznienie w danym czasie t , S_e to pęcznienie równowagowe, a τ to stała szybkości procesu pęcznienia, która jest ekwiwalentem czasu potrzebnego do osiągnięcia 0,63 maksymalnej wartości pęcznienia [173, 174].

$$S_t = S_e \cdot (1 - e^{-\frac{t}{\tau}}) \quad (5)$$

Przyporządkowania funkcji eksponencjalnej z równania dokonano w programie Origin (OriginLab Corporation, USA). Parametr korelacji Pearsona R^2 dla przyporządkowania funkcji nie był niższy niż 0,92.

2.6 Badania biologiczne na modelach komórkowych *in vitro*

Badania biologiczne *in vitro* wytworzonych biomateriałów zostały wykonane w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej Uniwersytetu Łódzkiego przez Zespół pod kierunkiem dr Karoliny Rudnickiej (Promotor pomocnicza) w składzie: dr Marcin Włodarczyk i dr Aleksandra Szwed-Georgiou oraz we współpracy z Pracownią Obrazowania Mikroskopowego i Specjalistycznych Technik Biologicznych Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ, a także z udziałem autora niniejszej rozprawy doktorskiej podczas stażu w powyżej jednostce.

2.6.1 Sterylizacja radiacyjna biomateriałów

Przed wykonaniem badań biologicznych opracowane materiały zostały poddane sterylizacji radiacyjnej w Międzyresortowym Instytucie Techniki Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej. Sterylizacja przebiegała z wykorzystaniem promieniowania gamma o parametrach źródła 35 kGy (^{60}Co), czyli w warunkach rekomendowanych m.in. do wyjaławiania wyrobów medycznych.

2.6.2 Ocena cytozgodności biomateriałów

Warunki hodowli fibroblastów mysich linii L929

Do badań cytokompatybilności została wykorzystana linia komórkowa mysich fibroblastów L929 (CCL-1) z firmy ATCC (Manassas, VA, USA), rekomendowana przez standardy ISO do badań biomateriałów o potencjalnym zastosowaniu biomedycznym (ang. Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity).

Przed wykonaniem badań, hodowle komórek prowadzono w podłożu Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 z 10% dodatkiem inaktywowanej termicznie surowicy płodów bydłych FBS (ang. *fetal bovine serum*) (HyClone, Cytiva, Marlborough, MA, USA), penicyliny (100 U/mL) oraz streptomycyny (100 $\mu\text{g/mL}$) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Niemcy), w atmosferze wzbogaconej o 5% CO_2 , w temperaturze 37°C. Monowarstwy komórkowe po osiągnięciu odpowiedniej konfluencji (<85%) były odklejane od powierzchni naczynia hodowlanego z wy-

korzystaniem 0,5% r-ru trypsyny oraz 0,5 mM r-ru kwasu wersenowego (EDTA; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Następnie zawiesiny komórek poddawano wirowaniu oraz odplukaniu r-ru trypsyny. Po ponownym zawieszeniu w podłożu określano gęstość i żywotność komórek. W tym celu posługiwano się tzw. komorą Bürkera oraz testem wychwytu błękitu trypanu. Zawiesiny komórek o żywotności przekraczającej 95% były użyte do testów *in vitro*.

Ocena cytozgodności biomateriałów

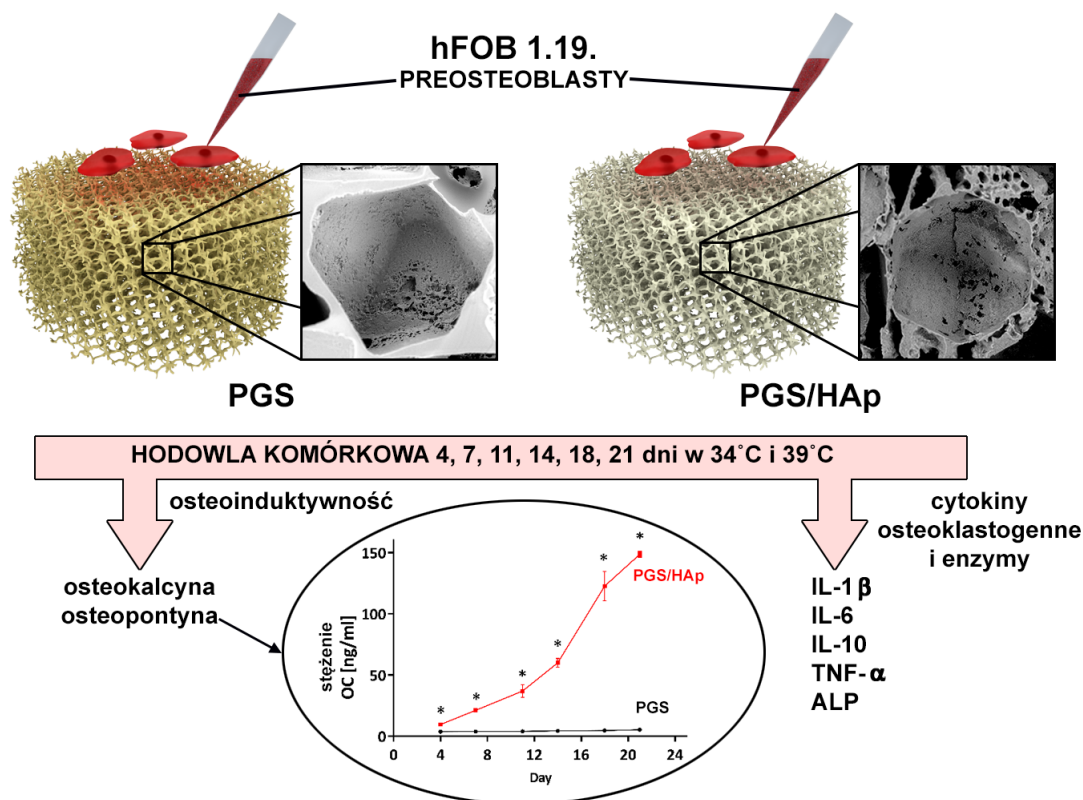
Do oceny cytozgodności wykorzystano materiały piankowe (*scaffoldy*) wykonane z PGS oraz zawierające 10, 20 i 30% napelnacza apatytowego, sieciowane w 130°C przez 168h. Aktywność metaboliczną fibroblastów mysich linii L929 inkubowanych z biomateriałami oceniano z wykorzystaniem testu redukcji MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)- 2,5-difenylotetrazoliowy) [170]. Fibroblasty doprowadzano do gęstości 2×10^5 komórek/mL i nanoszono po 100 μ L/dołek, do płytki 96-dołkowej (Nunclon Delta Surface, Nunc, Rochester, NY, USA), a następnie inkubowano przez noc celem odtworzenia monowarstw komórkowych. Badane biomateriały cięto uzyskując fragmenty stanowiące 1/10 powierzchni dna dołka zgodnie z zaleceniami normy ISO 10993-5:2009. Następnie, podłoże hodowlane usuwano znad monowarstw komórkowych, zastępowano je świeżym medium i wprowadzano, uprzednio przygotowane fragmenty biomateriałów do studzienek płytki 96-dołkowej. Uwzględniano następujące kontrole: kontrolę pozytywną żywotności (komórki hodowane bez badanych biomateriałów); hodowlę referencyjną (komórki hodowane w obecności materiału certyfikowanego – wyrobu medycznego przeznaczonego do kontaktu z płynami ustrojowymi/tkankami (Safety-Lok, BD, Franklin Lakes, NJ, USA)) oraz kontrolę negatywną żywotności (komórki traktowane 3% r-rem nadtlenu wodoru). Każdorazowo uwzględniano 8 powtórzeń. Po całonocnej inkubacji, do każdej studzienki dodawano po 20 μ L MTT (Sigma-Aldrich) i inkubowano przez następne 4h. Następnie supernatant pochodzący usuwano i zastępowano 100 μ L dimetylosulfotlenku (DMSO). Intensywność barwy (absorbancję), proporcjonalną do aktywności metabolicznej fibroblastów, mierzono przy długości fali 570 nm z wykorzystaniem czytnika Multiskan EX reader (Thermo Scientific).

Morfologia komórek i stopień kolonizacji biomateriału

Celem zwizualizowania przylegania oraz rozrostu fibroblastów na powierzchni biomateriałów na bazie PGS, komórki L929 były wysiewane na kompozytach umieszczonych w płytkach 24-dołkowych (Nunclon Sphera, Thermo Fisher Scientific) - każdy materiał w trzech powtórzeniach. W pierwszym etapie *scaffoldy* były inkubowane w 200 μ L medium hodowlanego oraz inkubowane w 37°C i 5% CO₂ przez 2h. Po wstępnym nasączeniu, 20 μ L zawiesiny komórek L929 (5×10^5 komórek) nanoszono na powierzchnię każdego *scaffoldu* i inkubowano przez kolejne 2h. Następnie dodawano 1 mL świeżego medium oraz inkubowano przez kolejne 20h. Po inkubacji badane materiały przemywano buforem PBS oraz utrwalano 3,7% r-rem formaldehydu (Sigma-Aldrich) przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Jądra komórkowe wybarwiano 300 nM r-rem DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindol). *Scaffoldy* skolonizowane przez komórki obrazowano pod mikroskopem konfokalnym (Leica TCS LSI, Leica Microsystems, Frankfurt, Niemcy), z wykorzystaniem soczewki 5/0,50 LWD i ze wzbudzeniem przy 405 nm i emisją w zakresie 430-480 nm. Do obrazowania komórek użyto oprogramowania Leica Application Suite X (LAS X, Leica Microsystems). Preparaty analizowano w Pracowni Obrazowania Mikroskopowego i Specjalistycznych Technik Biologicznych na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

2.6.3 Badania potencjału osteokondukcyjnego *scaffoldów*

Pierwsze porowate materiały na bazie PGS, które po badaniach fizykochemicznych były najbardziej rokujące poddano badaniu wykluczenia działania cytotoksycznego. Następnie włączono je do kompleksowych badań *in vitro* polegających na weryfikacji potencjału osteokondukcyjnego względem ludzkich osteoblastów hFOB 1.19 (Rysunek 9. Do badania wykorzystano piankę polimerową PGS oraz *scaffold* kompozytowy PGS/HAp 75/25 celem zweryfikowania wpływu obecności HAp na potencjał osteoindukcyjny biomateriału. W późniejszych etapach prac zbadano wpływ konkretnej ilości napełniacza 10, 20, 30 wt.% na właściwości fizykochemiczne oraz mechaniczne wytworzonych biomateriałów.



Rysunek 9: Schemat przedstawiający badanie potencjału osteokonduktywnego *scaffoldów* PGS oraz PGS/HAp 75/25 względem ludzkich preosteoblastów linii hFOB 1.19.

Warunki hodowli

Linia komórkowa ludzkich osteoblastów hFOB 1.19 (CRL-11372TM) została pozyskana z firmy American Type Culture Collection (ATCC, Manassas). Komórki hodowano w podłożu Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F12 (1:1 DMEM/F12; Gibco; Thermo Fisher Scientific) zawierającym dodatek 0,3 mg/mL genicytyny (Sigma-Aldrich) oraz 10% FBS (HyClone, Laboratories Inc., Marlborough, MA, USA). Hodowle prowadzono w 34°C w atmosferze zawierającej 5% CO₂ (Inkubator CO₂; Nuair, Plymouth, MN, USA). Kondycję i tworzenie się konfluentnej monowarstwy komórek monitorowano co 2-3 dni przy pomocy mikroskopu odwróconego (Motic AE2000 Xiamen, Chiny). Hodowle komórkowe pasażowano co 3 dni z wykorzystaniem roztworu Trypsin-EDTA 0,5% (Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Gęstość i żywotność komórek oceniano, odpowiednio z wykorzystaniem hemocytometru (kamera Bürkera) oraz użyciem testu

wychwytu błękitu trypanu. Do badań biologicznych używano wyłącznie zawiesiny komórkowe osiągające żywotność powyżej 95%, tworzące monowarstwy o konfluencji w zakresie 80-90%.

Kolonizacja *scaffoldów* przez osteoblasty hFOB 1.19

Pianki umieszczano w studzienkach płytki 24-dółkowej (Nunclon Sphera, Nunc, Thermo Fisher Scientific) i stabilizowano je klejem tkankowym (Super-Vet Glue, EVi-MED, Liszki, Poland). Biomateriały preinkubowano w 34°C, w atmosferze 5% CO₂ przez 24h z 1 mL podłoża hodowlanego. Po wstępnym nasączeniu i aspiracji medium, na powierzchnię każdego *scaffoldu* nanoszono 20 µL 2×10^5 osteoblastów. Tak przygotowane materiały inkubowano przez kolejne 2h, a następnie do każdego dołka dodawano 1 mL podłoża i inkubowano w temp. 34°C przez 7 dni celem podtrzymania proliferacji. W kolejnym etapie *scaffoldy* przemywano roztworem PBS i utrwalano 3,7% roztworem formaldehydu (Sigma-Aldrich) przez 10 minut. Próbki umieszczano w płynie do utrwalania preparatów (Frozen Section Media 22; Leica Biosystems Inc., Buffalo Grove, IL, USA), mrożono, a następnie poddawano sekcji na kriostacie (Leica CM1950, Leica Biosystems Inc.). Powstałe preparaty o grubości 20 µm barwiono metodą May Grunwald'a Giemsa'y, a następnie analizowano w mikroskopie świetlnym (Nikon ECLIPSE 50i, Nikon Inc., Tokyo, Japonia) w Pracowni Obrazowania Mikroskopowego i Specjalistycznych Technik Biologicznych na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

Badanie właściwości osteokonduktywnych *scaffoldów*

Pianki PGS i kompozyty zawierające 25 wt.% frakcji apatytowej hodowano z komórkami hFOB 1.19 w 39°C w medium osteoindukcyjnym suplementowanym askorbinianem fosforanu (Sigma-Aldrich) w stężeniu 50 µg/mL, 1 µM deksametazonu (Sigma-Aldrich) oraz 19 mM soli disodowej β-glicerofosforanu (Sigma-Aldrich). Supernatanty pochodzące posłużyły do oceny rozpuszczalnych markerów różnicowania osteogenicznego, a pianki skolonizowane przez zróżnicowane osteoblasty użyto do oceny zawartości DNA (proliferaacja) i aktywności ALP. Supernatanty zbierano po 4, 7, 11, 18 i 21 dniach hodowli i zabezpieczano w temp. -80°C do momentu oznaczenia markerów kostnienia.

Ocena proliferacji osteoblastów

Proliferację osteoblastów oceniano w oparciu o pomiar komórkowego DNA wykrywanego testem CyQUANT[®] (In-vitrogen, Thermo Fisher Scientific) w piankowych *scaffoldach*, hodowanych w warunkach osteoinduktywnych. W określonych punktach czasowych (opisanych powyżej) pianki przemywano roztworem PBS i mrożono w temperaturze -20°C. Próbkę rozmrażano w temperaturze pokojowej, a komórki poddawano lizie w buforze zawierającym barwnik CyQuant-GR, o powinowactwie do kwasów nukleinowych. Fluorescencję mierzono z wykorzystaniem czytnika płytek (SpectraMax[®]i3x Multi-Mode Microplate Reader; Molecular Devices, San Jose, CA, USA) przy wzbudzeniu falą o długości 480 nm oraz emisji przy długości fali 520 nm.

Oznaczanie osteokalcyny i osteopontyny

Stężenie OC i OPN oznaczano za pomocą testu enzymatycznego fazy stałej ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) w supernatantach z hodowli osteoblastów hFOB 1.19 eksponowanych na badany scaffold przez 4, 7, 11, 14, 18 i 21 dni. Badanie przeprowadzono zgodnie z instrukcjami producenta (Wuhan Fine Biotech Co., Wuhan, Chiny) i normalizowano odpowiednimi krzywymi kalibracyjnymi. Dołki płytki 96-dołkowej opłaszczano przeciwciałami wychytującymi ludzką OC lub OPN i inkubowano przez noc w temp. lodówki. Nadmiar niezwiązanych przeciwciał odplukiwano dwukrotnie odpowiednim buforem. Następnie dodawano po 100µL odpowiednio rozcieńczonego standardu (OC: 1,25–80 ng/mL; OP: 0,156–10 ng/mL) lub dwukrotnie rozcieńczone supernatanty i inkubowano przez 90 min w temp. 37°C. Studzienki płytki przepłukiwano kilkakrotnie buforem, a do dołków наносzono roztwór streptawidyny związanej kowalencyjnie z peroksydazą chrzanową (SaV-HRP) w stosunku 1:100. Płytki ponownie inkubowano przez 30 min w 37°C. Po inkubacji dodawano roztworu tetrametylobenzydyny. Reakcję barwną zatrzymano w ciągu 20-30 minut, a wartość absorbancji mierzono przy długości fali 450 nm z wykorzystaniem aparatu Multiskan EX reader (Thermo Scientific).

Ocena aktywności fosfatazy alkalicznej

Aktywność ALP oceniano w oparciu o stopień hydrolizy p-nitrofenylofosforanu (p-NPP). Do studzienek płytek 96-dołkowych наносono po 100 μL lizatu komórkowego i dodawano po 100 μL p-NPP (o stężeniu 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) i inkubowano w temp. 37°C przez 30 min. Następnie reakcję zatrzymywano poprzez dodanie 2M roztworu NaOH. Gęstość optyczną wyznaczano przy długości fali 405 nm z wykorzystaniem aparatu Multiskan EX reader (Thermo Scientific). Każdorazowo wyznaczano krzywą kalibracyjną ALP w zakresie 0-10 U/mL (Molecular Biology, Thermo Scientific, Waltham).

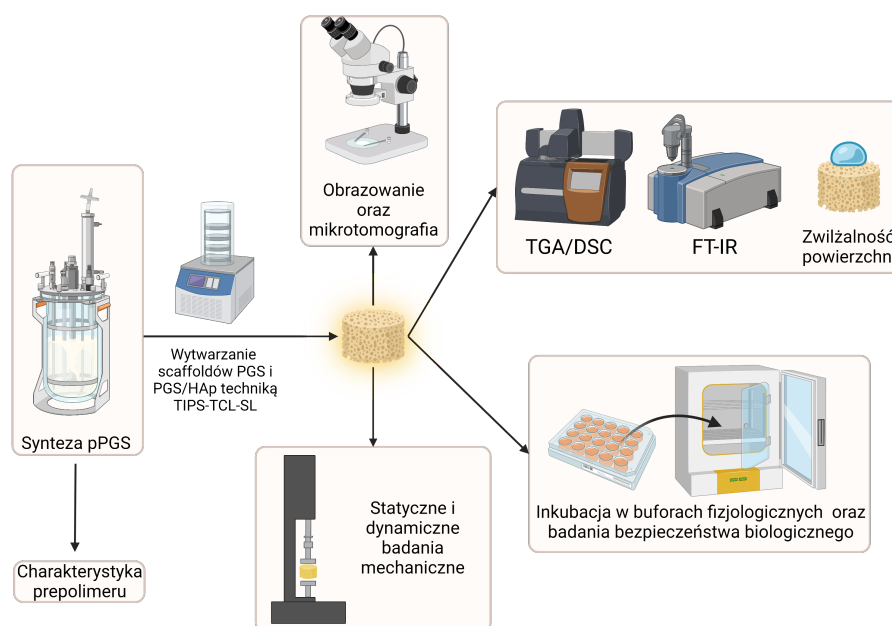
Ocena profilu uwalnianych cytokin

Stężenie interleukin IL-1 β , IL-6, IL-10 oraz czynnika TNF- α (czynnik martwicy guza, ang. *tumor necrosis factor*) w hodowlach osteoblastów ludzkich hFOB 1.19 inkubowanych ze *scaffoldami* PGS oraz PGS/HAp oznaczano za pomocą testu ELISA (BD OptEIA™Set, BD-Pharmingen, Franklin Lakes, USA) zgodnie z instrukcją producenta, w 4, 7, 11, 14, 18 oraz 21 dniu hodowli. Studzienki płytki 96-dołkowej (Greiner Bio-One, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Austria) opłaszczano przeciwciałami monoklonalnymi wychwytyjącymi odpowiednie cytokiny (w 0,1M roztworze węglanu sodu). Płytki inkubowano przez noc w 4°C, a następnie studzienki przemywano roztworem PBS/0,05% Tween 20 (Thermo Scientific) i blokowano roztworem PBS zawierającym 10% FBS przez 1h. Następnie dodawano próbki lub standardy cytokin (IL-1 β : 250-3,9 pg/mL, IL-6: 300-4,7 pg/mL, IL-10: 500-7,8 pg/mL i TNF- α : 500-7,8 pg/mL) i inkubowano przez kolejne 2h. Po odpłukaniu niezwiązanych czynników dodawano przeciwciał wychwytyjących w roztworze PBS/10% FBS i inkubowano przez 1h. W dalszej kolejności płytki inkubowano wraz z kompleksem streptawidyna-peroksydaza chrzanowa w PBS/10% FBS przez 30 minut. Następnie dodawano mieszaninę TMB oraz nadtlenek wodoru. Reakcję barwną zatrzymywano poprzez dodanie 2M H₂SO₄. Wartość absorbancji wyznaczono przy długości fali 450 nm (z korekcją przy 570 nm) z wykorzystaniem urządzenia Multiskan EX reader (Thermo Scientific). Czulość poszczególnych testów wynosi odpowiednio: 3,9 pg/mL dla IL-1 β , 4,7 pg/mL dla IL-6, oraz 7,8 pg/mL dla IL-10 i TNF- α .

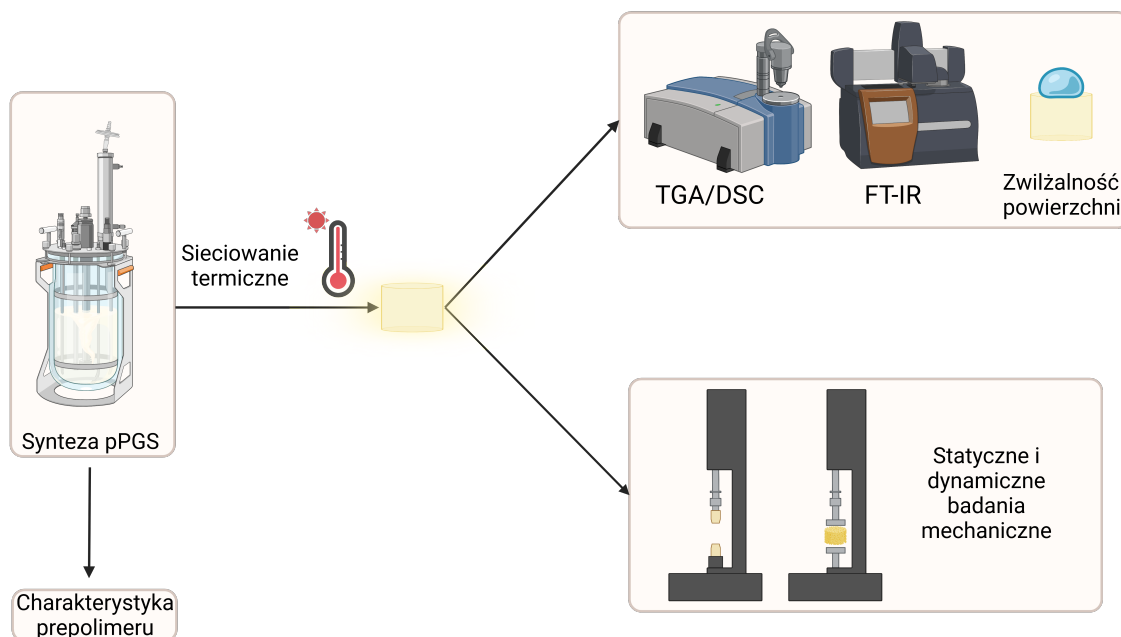
Rozdział 3

Dyskusja uzyskanych wyników

Celem zwizualizowania planu eksperymentalnego przeprowadzonego w toku realizacji pracy doktorskiej, na Rysunku 10 przedstawiono schematycznie badania wykonane na materiałach porowatych oraz na Rysunku 11 na materiałach litych. Na Rysunku 10 widoczna jest preparatyka próbek porowatych oraz metody pomiarowe wykorzystane przy ich charakteryzacji. Z kolei na Rysunku 11 podobnie przedstawiono zrealizowane eksperymenty, ale skoncentrowane na materiałach litych. Te dwie wizualizacje obrazują różnice w podejściu eksperymentalnym w zależności od rodzaju materiałów poddanych badaniom w niniejszej pracy.



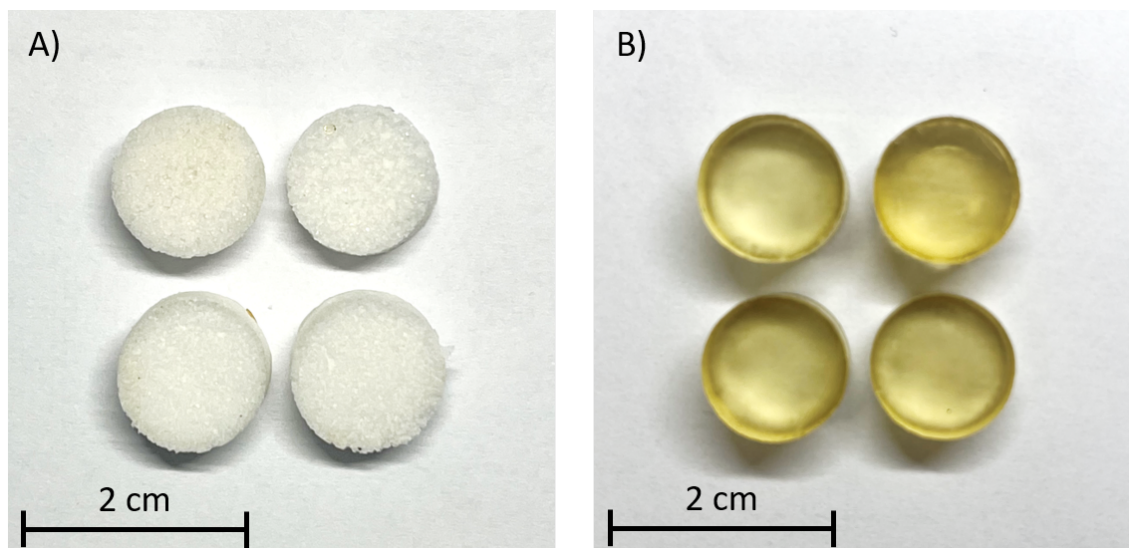
Rysunek 10: Schemat przedstawiający syntezę prepolimeru, formowanie materiałów porowatych oraz plan eksperymentów przeprowadzonych na porowatych *scaffoldach* na bazie PGS. Schemat utworzony za pomocą BioRender.com



Rysunek 11: Schemat przedstawiający syntezę prepolimeru, formowanie materiałów oraz plan eksperymentów przeprowadzonych na litym PGS. Schemat utworzony za pomocą BioRender.com

3.1 Charakterystyka fizykochemiczna pPGS oraz *scaffoldów* i materiałów litych

Po wytworzeniu materiałów litych oraz *scaffoldów*, zostały one poddane analizie właściwości fizykochemicznych. Przykładowe zdjęcia wytworzonych materiałów przedstawiono na Rysunku 12.



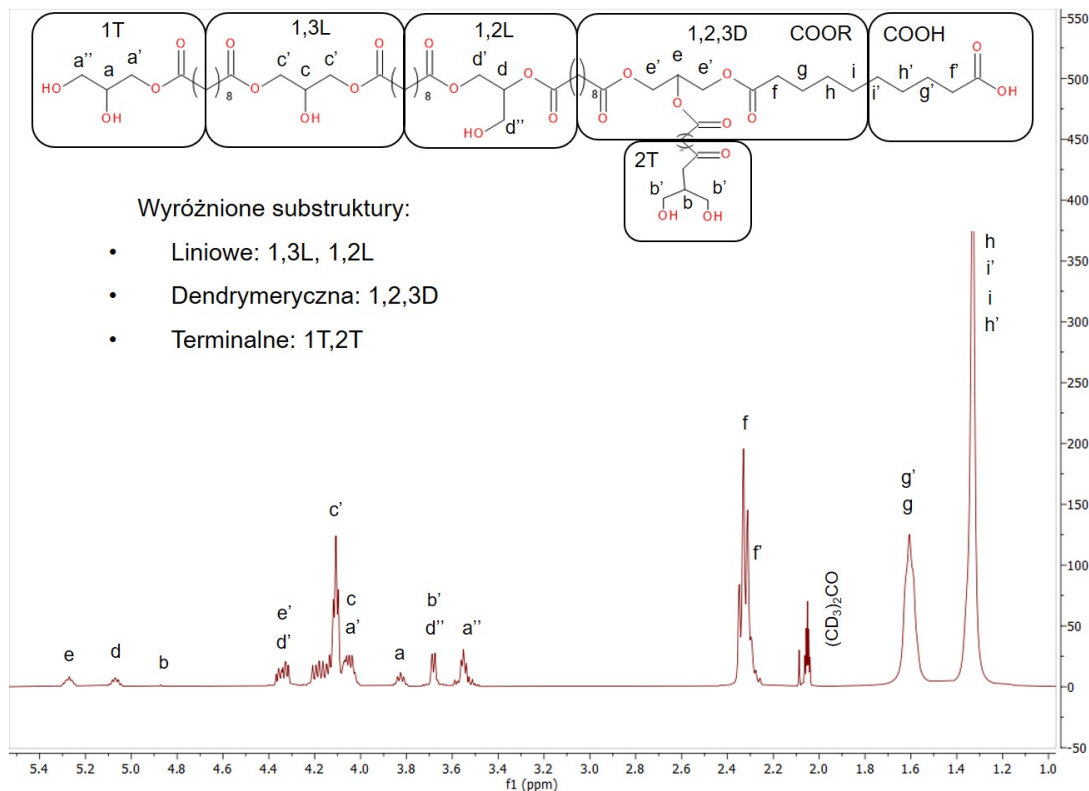
Rysunek 12: Fotografia przykładowych materiałów wytworzonych w toku realizacji pracy. Na fotografii A znajdują się porowate materiały na bazie PGS, a na fotografii B lite cylindry z PGS.

3.1.1 Charakterystyka strukturalna

Analiza strukturalna pPGS techniką ^1H NMR

Magnetyczny rezonans jądrowy jest techniką, która pozwala na zbadanie struktury chemicznej otrzymanego związku. Po wykonaniu syntezy prepolimeru pPGS, zarówno klasyczną polikondensacją temperaturową, jak i syntezą enzymatyczną, zostały zarejestrowane widma protonowe ^1H NMR. Ze względu na słabą rozpuszczalność usieciowanego polimeru w deuterowanych rozpuszczalnikach przeznaczonych do NMR, badaniom zostały poddane jedynie prepolimery. Przypisanie pików zostało wykonane na podstawie źródeł literaturowych opisujących polimery zsyntezowane z glicerolu oraz kwasów dikarboksylowych [5, 13, 175–178]. W strukturze prepolimeru PGS pochodzącego z ww. ścieżek syntetycznych możemy wyróżnić 3 możliwe struktury glicerydowe - liniowe powtarzalne struktury diglicerydowe (1,2L oraz 1,3L), rozgałęziające ugrupowanie trójglicerydowe (1,2,3D) oraz 2 monoglicerydowe struktury terminalne (1T oraz 2T). Opisywane powyżej substruktury łańcucha polimerowego przedstawiono na przykładzie struktury prepolimeru PGS z syntezy enzymatycznej (Rysunek 13). W zakresie przesunięcia chemicznego pomiędzy 1,3-2,3 ppm znajdują się sygnały pochodzące od SA lub sebacynowych części makromolekuły. W zakresie 3,4-4,5 ppm można zauważyć nakładające się sygnały od glicerolu oraz struktur

diglicerydowych. Z kolei pomiędzy 4,8, a 5,3 ppm możemy zauważyć sygnały pochodzące ze struktur zawierających zestryfikowane, drugorzędowe grupy hydroksylowe (1,2L; 1,2,3D oraz 2T) [13].



Rysunek 13: Przykładowe rozwiązanie struktury prepolimeru pPGS techniką ^1H NMR. Materiał otrzymano na drodze syntezy enzymatycznej w 40°C przez 24h. Rozwiązanie struktury obejmuje przypisanie pików do konkretnych atomów oraz wyróżnienie substruktur liniowych (1,3L; 1,2L), dendrymerycznej (1,2,3D), oraz terminalnych (1T i 2T).

Niektóre z obecnych sygnałów nakładają się. Z tego powodu, zawartości niektórych struktur wyliczane były w sposób pośredni. Zawartość nieprzereagowanego glicerolu została wyliczona z następującego równania [13]:

$$x_{gly} = \frac{I_{3,45-3,70\text{ppm}} - 2I_a - 4I_b - 2I_d}{5} \quad (6)$$

Dla 1,3-dwupodstawionej struktury glicerydowej (1,3L), jest obecny sygnał na widmie ^1H NMR. Jej zawartość została wyliczona przy założeniu, że polimer składa się wyłącznie ze struktur wyróżnionych na Rysunku 13 oraz z nieprzereagowanego glicerolu. Średni stopień podstawienia (DS) polimeru został obliczony z wykorzysta-

niem następującego równania [177, 178]:

$$DS = \frac{3\Sigma D + 2\Sigma L + \Sigma T}{\Sigma D + \Sigma L + \Sigma T} \quad (7)$$

Stopień rozgałęzienia (DB) łańcucha obliczono wykorzystując Równanie 8:

$$DB = \frac{\Sigma D + \Sigma T}{\Sigma D + \Sigma L + \Sigma T} \cdot 100\% \quad (8)$$

Parametry strukturalne wyznaczone dla pPGS syntezowanego enzymatycznie z SA oraz GLY w temperaturach 40, 50 oraz 60°C zostały zestawione w Tabeli 2. Dane zostały zebrane dla 2, 4, 6, 8 oraz 10h postępu reakcji. Wyznaczono zawartości jednostek terminalnych (x_{1T} , x_{2T}), liniowych ($x_{1,2L}$, $x_{1,3L}$), dendrymerycznych (x_d) i zawartość nieprzereagowanego glicerolu (x_{gly}). Zaprezentowane zostały również: stopień podstawienia (DS), stopień rozgałęzienia (DB), stopień konwersji grup karboksylowych (p_{COOH}) i hydroksylowych (p_{OH}), stopień polimeryzacji (DPn) oraz liczbowo średnia masa cząsteczkowa (M_n).

T[°C]	t[h]	x_{1T}	x_{2T}	$x_{1,2L}$	$x_{1,3L}$	x_d	x_{gly}	DS	DB [%]	p_{COOH}	p_{OH}	DPn	M_n [Da]
40	2	0,330	0,025	0,110	0,428	0,056	0,050	1,68	43	0,77	0,56	3,9	1005
	4	0,250	0,022	0,140	0,456	0,098	0,035	1,82	38	0,84	0,61	6,0	1555
	6	0,230	0,021	0,150	0,444	0,130	0,025	1,88	39	0,88	0,62	8,4	2175
	8	0,220	0,021	0,160	0,418	0,160	0,021	1,92	41	0,90	0,64	11,2	2909
	10	0,210	0,021	0,160	0,416	0,170	0,023	1,94	41	0,92	0,64	14,0	3616
50	2	0,340	0,025	0,100	0,415	0,044	0,076	1,65	44	0,76	0,55	3,8	970
	4	0,260	0,022	0,140	0,418	0,110	0,050	1,82	41	0,88	0,61	6,9	1793
	6	0,230	0,022	0,160	0,406	0,150	0,032	1,89	42	0,90	0,63	10,0	2584
	8	0,220	0,021	0,160	0,362	0,170	0,067	1,92	44	0,92	0,64	13,0	3359
	10	0,210	0,022	0,170	0,396	0,180	0,022	1,95	42	0,93	0,65	16,3	4207
60	2	0,240	0,018	0,110	0,507	0,082	0,043	1,82	36	0,77	0,60	4,8	1236
	4	0,180	0,014	0,140	0,489	0,160	0,017	1,96	36	0,86	0,66	10,6	2754
	6	0,150	0,014	0,140	0,487	0,190	0,019	2,03	36	0,89	0,68	21,3	5504
	8	0,140	0,014	0,150	0,441	0,230	0,025	2,08	39	0,92	0,69	299	77407
	10	0,140	0,015	0,150	0,443	0,230	0,022	2,08	39	0,92	0,69	1310	$3,4 \cdot 10^5$

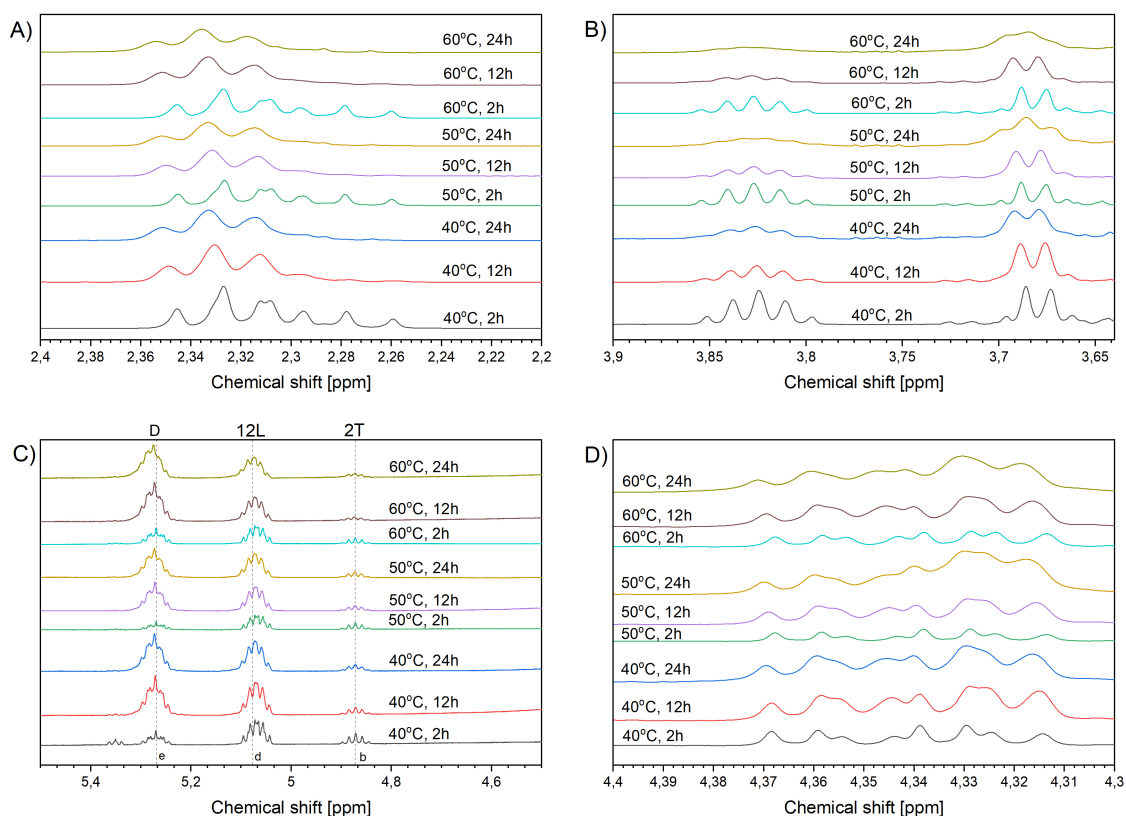
Tabela 2: Parametry strukturalne pPGS syntezowanego enzymatycznie w 40, 50 oraz 60°C po interwałach czasowych 2, 4, 6, 8 oraz 10h reakcji.

Parametry wyznaczone w Tabeli 2 wskazują, że wraz z postępowaniem reakcji, zawartość terminalnych grup glicerydowych podstawionych w pozycji 1 ulega zmniejszeniu, podczas gdy zawartość grup terminalnych 2T utrzymuje się na tym samym poziomie.

Wraz ze wzrostem temperatury zaobserwować można zwiększoną prędkość przyrostu masy cząsteczkowej. Stopień rozgałęzienia prepolimerów zmienia się nieznacz-

nie wraz z postępem reakcji. Dla prepolimerów syntezowanych przez 10h wynosi odpowiednio 41% dla reakcji w 40°C, 42% dla reakcji w 50°C i 39% dla reakcji w 60°C. Po upływie 10h zaobserwowano konwersję grup karboksylowych przekraczającą 90% oraz grup hydroksylowych przekraczającą 60%. Dla syntezy enzymatycznej przeprowadzanej w 60°C po upływie 8h stopień konwersji grup hydroksylowych wyznaczony na bazie widma protonowego NMR przekroczył teoretyczną wartość 66,67% wynikającą z przyjętego modelu [13], co może oznaczać zmianę w kompozycji strukturalnej mieszaniny reakcyjnej, np. delikatne odparowanie nieprzereagowanego glicerolu.

Na widmach ^1H NMR w zakresie przesunięcia chemicznego (δ) 2,25-2,37 ppm obserwujemy stopniowy zanik sygnałów przy niższych wartościach δ . Sygnał ten przypisano grupom metylenowym występujących przy wolnej grupie karboksylowej. Ww. sygnały zostały przedstawione na Rysunku 14.



Rysunek 14: Zmiany w intensywności sygnałów widm ^1H NMR dla reakcji GLY i SA prowadzonej w temperaturach 40, 50 oraz 60°C. Wykresy przedstawiają zakresy przesunięcia chemicznego 2,2-2,4 (A), 3,65-3,9 (B), 4,6-5,4 (C) oraz 4,3-4,4 (D).

W trakcie dializy, nieprzereagowane monomery zostały usunięte z wykorzystaniem membrany odcinającej poniżej masy 1 kDa (1 kDa MWCO). Procesowi oczyszczania zostały poddane produkty polimeryzacji enzymatycznej w temperaturach 40, 50 oraz 60°C uzyskane w trakcie 24-godzinnej syntezy. W produktach poddanych dializie stwierdzono większy stopień polimeryzacji w porównaniu do produktów przed procesem oczyszczania. W porównaniu do innego pPGS syntezowanego enzymatycznie, uzyskano wyższe wartości rozgałęzienia wykorzystując podczas syntezy 1,4-dioksan jako rozpuszczalnik. Porównując uzyskane w pracy wyniki z literaturą dot. syntezy enzymatycznej katalizowanej CALB, Perin et al. [13] otrzymali stopień rozgałęzienia 34-41% w THF, 24-28% w tert-butanolu, 34-42% w acetonie oraz 31-38% w acetonitrylu dla reakcji prowadzonych w 40 oraz 50°C. Uzyskane w toku eksperymentów wyniki wskazują na zwiększający się stopień rozgałęzienia (DB) oraz zawartość liniowej frakcji 1,3L wraz ze wzrostem temperatury reakcji (Tabela 3).

T[°C]	t[h]	x_{1T}	x_{2T}	$x_{1,2L}$	$x_{1,3L}$	x_d	x_{gly}	DPn	M_n [Da]	DB [%]	p_{COOH}
40	24	0,21	0,05	0,17	0,27	0,20	0,448	16,7	4300	49	0,92
	dializa	0,22	0,02	0,16	0,38	0,22	0,012	50,0	12900	47	0,94
50	24	0,21	0,025	0,16	0,41	0,19	0,608	22,2	5700	45	0,93
	dializa	0,19	0,020	0,16	0,41	0,22	0,026	-	-	43	0,95
60	24	0,14	0,019	0,15	0,44	0,25	0,439	-	-	35	0,90
	dializa	0,11	0,010	0,14	0,47	0,27	0,016	-	-	28	0,94

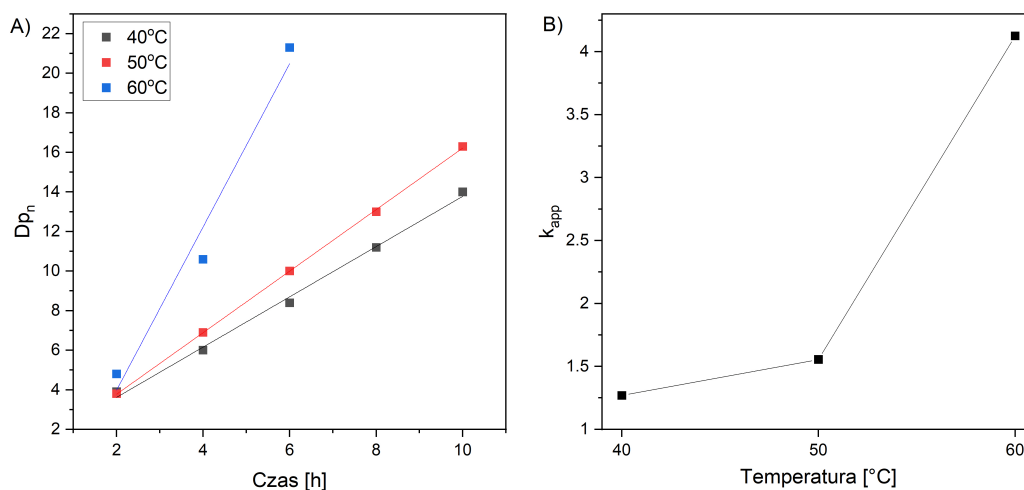
Tabela 3: Porównanie parametrów strukturalnych pPGS syntezowanego enzymatycznie z SA i GLY przez 24h w temperaturach 40, 50 i 60°C przed i po wykonaniu dializy membraną 1 kDa MWCO.

W Tabeli 4 zaprezentowano analogiczne parametry strukturalne jak w Tabeli 3 dla produktów reakcji z wykorzystaniem DMS i GLY w 40, 50 oraz 60°C po wykonaniu dializy. Stopnie polimeryzacji są znacznie niższe w przypadku reakcji transestryfikacji pomiędzy GLY a DMS niż w przypadku polikondensacji SA z GLY. Po wykonaniu dializy dla tych produktów obserwuje się nieco wyższy ciężar cząsteczkowy, który utrzymuje się jednak na stosunkowo niskim poziomie. Najprawdopodobniej wynika to z obecności w mieszaninie reakcyjnej metanolu, który jest produktem ubocznym reakcji transestryfikacji [179]. Negatywny wpływ alkoholu metylowego na enzym CALB został opisany w literaturze i przedstawia metanol jako inhibitor reakcji polikondensacji lub deaktywator CALB w konkretnych przypadkach polimeryzacji enzymatycznej [179–181].

T[°C]	t[h]	x_{1T}	x_{2T}	$x_{1,2L}$	$x_{1,3L}$	x_d	x_{gly}	DPn	M_n [Da]	DB [%]	p_{COOH}
40	24	0,35	0,04	0,13	0,40	0,08	0,418	3,2	818	60	0,94
	dializa	0,30	0,03	0,16	0,39	0,12	0,192	4,8	1230	55	0,96
50	24	0,30	0,03	0,13	0,42	0,12	0,349	4,7	1222	55	0,84
	dializa	0,24	0,02	0,15	0,43	0,16	0,144	10,0	2583	47	0,94
60	24	0,30	0,03	0,12	0,33	0,14	0,408	4,9	1258	59	0,85
	dializa	0,16	0,02	0,14	0,51	0,17	0,146	100	25834	36	0,94

Tabela 4: Porównanie parametrów strukturalnych pPGS syntezowanego enzymatycznie z DMS i GLY przez 24h w temp. 40, 50 oraz 60°C przed i po wykonaniu dializy membraną 1 kDa MWCO.

Pozorna stała szybkości reakcji enzymatycznej polikondensacji (k_{app}) z równomolowej ilości SA i GLY w 1,4-dioksanie została wyznaczona bazując na dwóch założeniach: GLY reaguje jako diol oraz podczas reakcji nie mają miejsca procesy cyklizacji [13]. CALB jest bardziej reaktywny w stosunku do pierwszorzędowych grup hydroksylowych niż w stosunku do drugorzędowych [182]. W literaturze nie wykazano również występowania procesów cyklizacji w polimeryzacjach z wykorzystaniem ww. enzymu. Średni stopień polimeryzacji (Dp_n) w funkcji czasu reakcji dla enzymatycznej reakcji SA i GLY został przedstawiony na Rysunku 15a. Stała k_{app} została wyznaczona jako współczynnik prostej wyznaczonej z regresji liniowej funkcji $Dp_n = f(t)$, a jej wartości przedstawione na Rysunku 15b. Wartości pozornej stałej szybkości reakcji w temperaturach 40 oraz 50°C są podobne do innych wartości, znalezionych w literaturze naukowej, uzyskanych dla enzymatycznej syntezy PGS w innych polarnych rozpuszczalnikach [13]. Natomiast wartości otrzymane dla 60°C są znacznie wyższe i przekraczają wartość $5h^{-1}$. Energia aktywacji wyznaczona z wykresu Arrheniusa ($\ln k_{app} = F(1/T)$) wyniosła 50,7 kJ/mol i jest wyższa niż wartość przedstawiana dla acetonu (32 kJ/mol) [13]. Wartość ta jest jednak niższa niż energia aktywacji dla niekatalizowanej syntezy PGS (71 kJ/mol) [183].



Rysunek 15: Zmiany w intensywności sygnałów widm ^1H NMR dla reakcji GLY i SA prowadzonej w temperaturach 40, 50 i 60°C. Wykresy przedstawiają zakresy przesunięcia chemicznego 2,2-2,4 (A), 3,65-3,9 (B), 4,6-5,4 (C) oraz 4,3-4,4 (D).

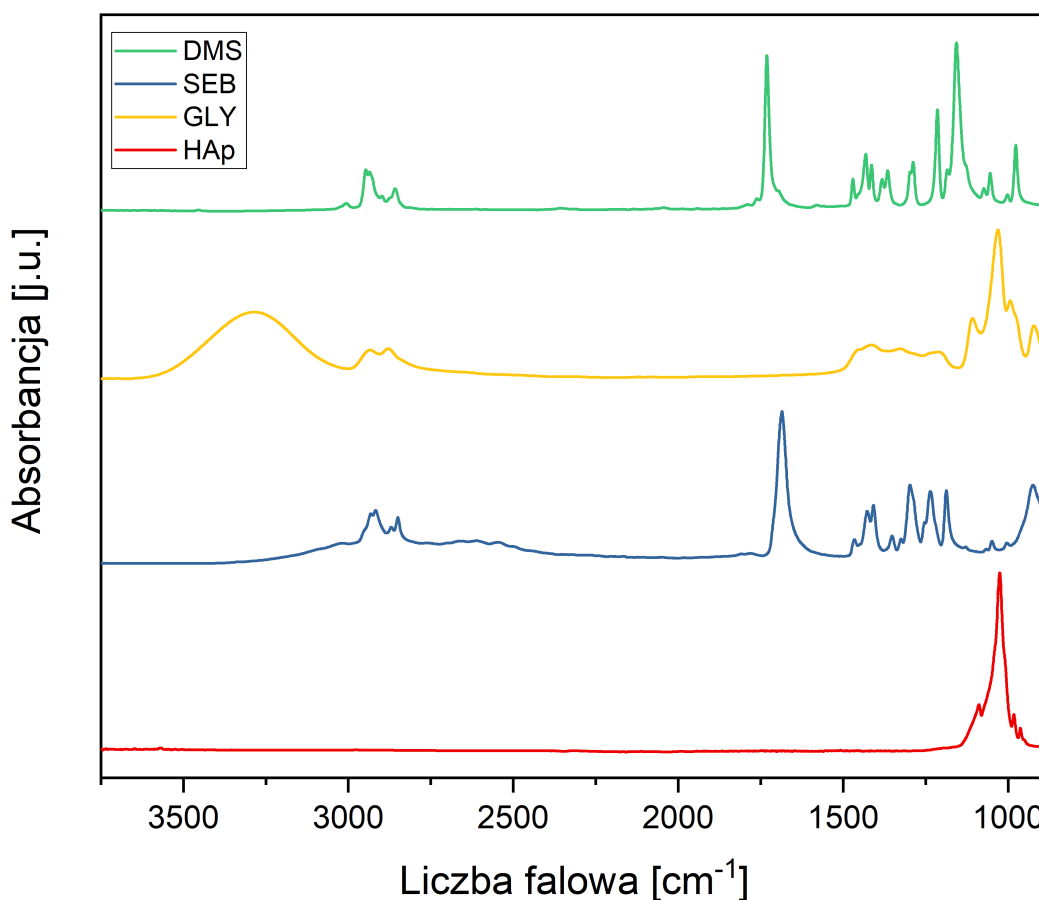
Dokonano również charakterystyki strukturalnej pPGS syntezowanego metodą polikondensacji temperaturowej, a jego parametry strukturalne zestawiono w Tabeli 5 razem z dwoma polimerami wytworzonymi na drodze polimeryzacji enzymatycznej, które posiadały największy stopień polimeryzacji. Do dalszych procesów formowania wytypowany został prepolimer wykonany techniką polikondensacji temperaturowej ze względu na mniejsze zanieczyszczenie monomerem (x_{gly}) oraz zdecydowanie mniejszy stopień rozgałęzienia przy porównywalnym stopniu polimeryzacji. Ponadto w procesie enzymatycznym wydajność syntezy była 22-krotnie niższa w porównaniu do polikondensacji temperaturowej. Dla syntezy enzymatycznej przeprowadzono również proces w zwiększonej skali tzw. *scale-up* (3-krotność ilości monomerów, katalizatora oraz rozpuszczalnika). W rezultacie otrzymano prepolimer o znacznie wyższym stopniu rozgałęzienia i niższym stopniu polimeryzacji w porównaniu do reakcji wyjściowej.

Rodzaj syntezy	T[°C]	t[h]	x_{1T}	x_{2T}	$x_{1,2L}$	$x_{1,3L}$	x_d	x_{gly}	DP _n	DB [%]	p_{COOH}
Polikondensacja temperaturowa (SA/GLY)	130	24	0,24	0,03	0,16	0,38	0,16	0,03	13,2	37	0,91
Synteza enzymatyczna (SA/GLY)	60	24	0,05	0,17	0,17	0,37	0,20	0,45	16,7	49	0,92
Synteza enzymatyczna (DMS/GLY)	60	24	0,30	0,03	0,12	0,33	0,14	0,408	4,9	59	0,85

Tabela 5: Porównanie parametrów strukturalnych pPGS syntezowanego techniką polikondensacji temperaturowej z prepolimerem wykonanym na drodze syntezy enzymatycznej.

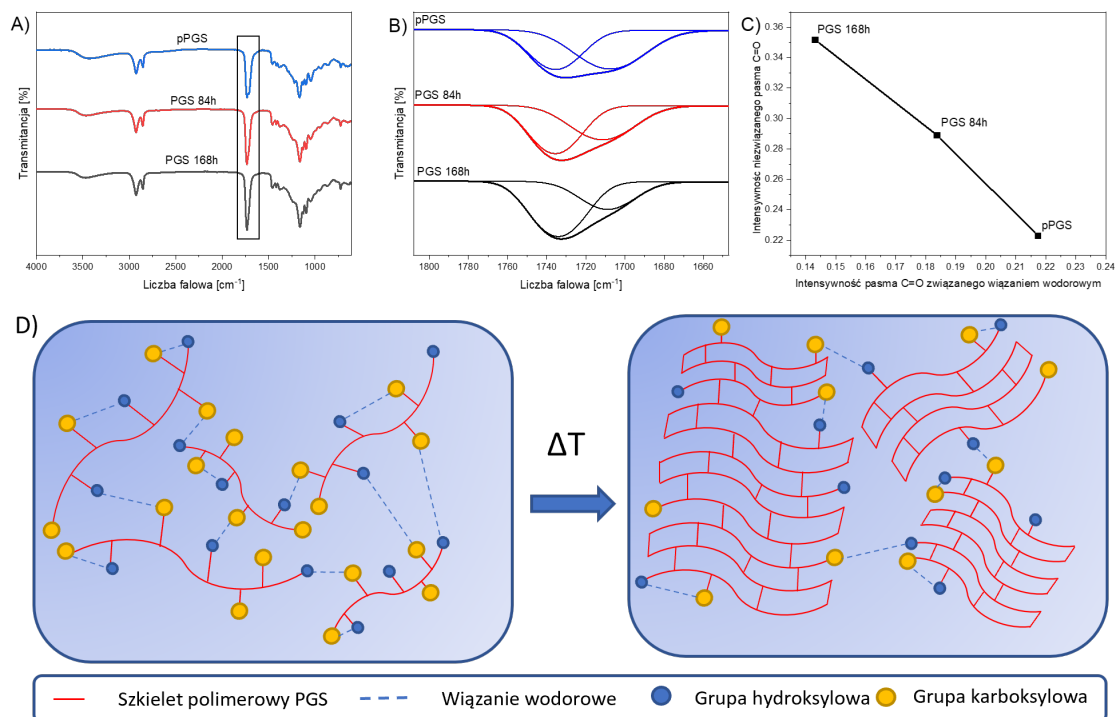
Analiza FT-IR

Na Rysunku 16 przedstawione są widma FT-IR monomerów wykorzystywanych przy syntezach prepolimeru - GLY, SA, DMS oraz ceramiki apatytowej HAp, która wykorzystywana była do wytwarzania porowatych kompozytów. Na widmach możemy zaobserwować charakterystyczne ugrupowania, które ułatwiają interpretację widm prepolimerów oraz PGS po sieciowaniu termicznym. GLY posiada charakterystyczne szerokie pasmo przy 3290 cm^{-1} pochodzące od drgania wiązania -OH w grupie hydroksylowej triolu. Zarówno na widmie DMS, jak i SA obecne jest pasmo pochodzące od wiązania karbonylowego C=O (1690 cm^{-1} dla SA oraz 1731 cm^{-1} dla DMS). Na potrzeby dalszej części rozdziału warto zwrócić uwagę na fakt, że dla DMS pasmo karbonylowe przesunięte jest w kierunku niższej liczby falowej. Na widmie HAp widzimy natomiast jedno istotne pasmo przy 1033 cm^{-1} pochodzące od wiązania P-O w części fosforanowej ceramiki [184, 185].



Rysunek 16: Widma FT-IR monomerów wykorzystywanych do syntezy pPGS (SA, DMS, GLY) oraz HAp wykorzystywanego do wytwarzania porowatych kompozytów.

Jako poliester, PGS posiada grupy estrowe na szkielecie polimerowym oraz terminalne i peryferyjne grupy karboksylowe i hydroksylowe [2, 13, 51, 186]. Podczas sieciowania, w wyniku reakcji kondensacji grupy hydroksylowej (-OH) z karboksylową (-COOH), tworzone są nowe kowalencyjne wiązania estrowe. Mogą one być formowane zarówno inter- jak i intramolekularnie. Poglądowy schemat procesu sieciowania przedstawiono na Rysunku 17D. Widma FT-IR zarejestrowane dla prepolimeru oraz litych cylindrów są przedstawione na Rysunku 17A wraz z dekonwolucją pasma karbonylowego na Rysunku 17B oraz stosunkiem intensywności składowych pasma karbonylowego (Rysunek 17C). Możemy wyróżnić charakterystyczne, obserwowane i opisywane w literaturze [16, 35] pasma dla PGS. Na widmie widoczne są: szerokie pasmo rozciągające grupy hydroksylowej(O-H) ok. 3400 cm^{-1} , rozciągające pasmo grupy karbonylowej (C=O) przy ok. 1730 cm^{-1} oraz pasmo drgania rozciągającego wiązania estrowego (C-O) przy 1169 cm^{-1} . Najistotniejszą różnicą pomiędzy zarejestrowanymi widmami jest geometria pasma karbonylowego podczas postępu procesu sieciowania PGS [51]. Prepolimer poddany badaniu posiadał stopień rozgałęzienia na poziomie 37% [35]. Pomimo stosunkowo wysokiego rozgałęzienia, analizowany poliester PGS nie jest zaliczany do struktur hiper-rozgałęzionych. Możemy jednak zaczerpnąć inspiracji z literatury, która opisuje inne hiper-rozgałęzione poliestry [187]. W przytoczonej publikacji autorzy sprawozdają, że w skład pasma karbonylowego w widmie FT-IR badanych poliestrów wchodzi morfologicznie podobne pasma, odpowiedzialne za wolną grupę karbonylową oraz za grupę karbonylową związaną wiązaniami wodorowymi. W innej publikacji dotyczącej chemicznie sieciowanego poli(sebacynianu butylenu) zawierającego ugrupowania diolowe, na drodze dekonwolucji powiązano części pasma karbonylowego odpowiedzialnego za wolną, jak i związaną grupę karbonylową [188].

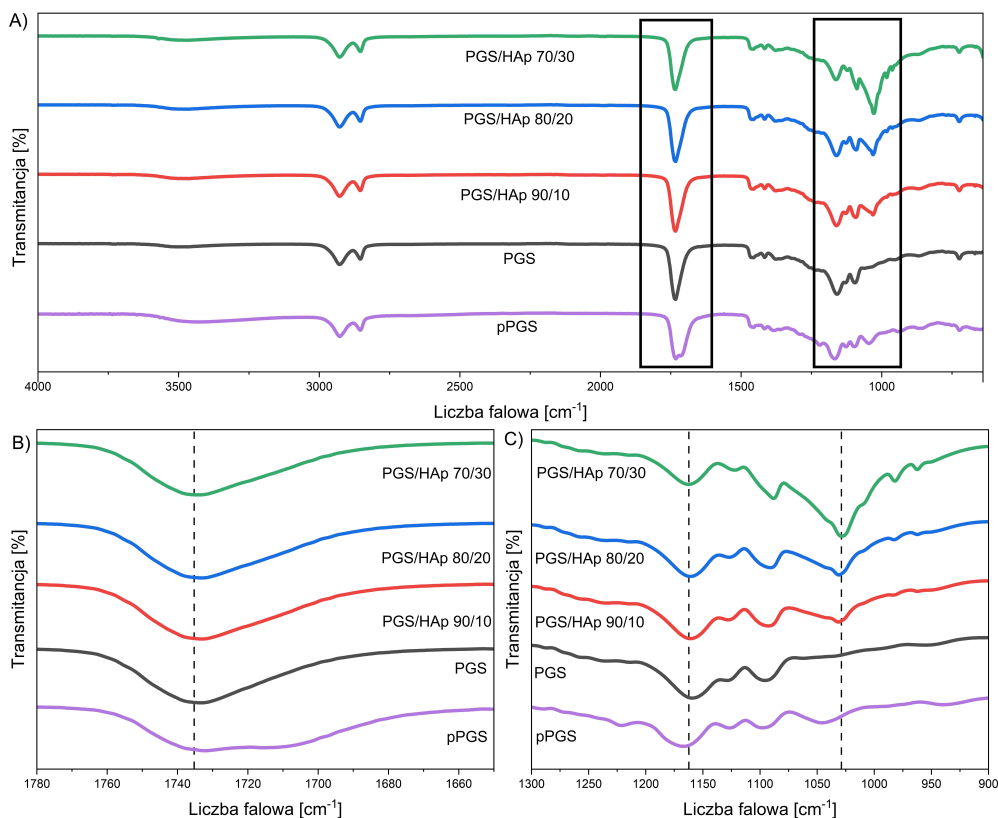


Rysunek 17: Widma FT-IR dla prepolimeru pPGS oraz litego materiału sieciowanego przez 84h (PGS 84h) i 168h (PGS 168h) wraz z zaznaczonym obszarem występowania grupy karbonylowej (A), dekonwolucja pasma karbonylowego z dopasowaniem Gaussowskim (B), stosunek intensywności pasma pochodzącego od wolnych oraz związanych wiązaniem wodorowym grup karbonylowych (C) oraz schemat przedstawiający spadek w udziale wiązań wodorowych podczas sieciowania (D).

Ww. informacje doprowadziły do obserwacji zmian w widmach FT-IR PGS podczas sieciowania. Zawada steryczna estrowej grupy karbonylowej generowana przez wiązanie wodorowe maleje wraz z postępem procesu sieciowania. Przyczyny takiego zjawiska można dopatrywać się w tworzeniu nowych, sztywnych, kowalencyjnych połączeń intra- oraz intermolekularnych podczas procesu sieciowania. Zwiększa to gęstość upakowania struktury polimeru oraz utrudnia wzajemne oddziaływanie ze sobą (np. na skutek wiązań wodorowych) wolnych łańcuchów makromolekularnych. Zarówno sieciowanie, jak i występowanie interakcji powodowanych wiązaniami wodorowymi mają istotny wpływ na właściwości elastomeryczne materiału [2, 189]. Schemat ilustrujący przedstawiony mechanizm znajduje się na Rysunku 17D.

Analizie FT-IR zostały poddane również *scaffoldy* PGS i PGS/HAp zawierające 10, 20 i 30wt.% napelnacza (HAp) oraz prepolimer pPGS, sieciowane przez 168h w 130°C (Rysunek 18). Na widmie można wyróżnić 3 istotne pasma tj. pasmo wiązania P-O pochodzącego od HAp (ok. 1030 cm⁻¹), pasmo wiązania estrowego C-O

(ok. 1160 cm^{-1}) oraz pasmo wiązania karbonylowego C=O przy 1735 cm^{-1} . Takie przypisanie pasm jest zgodne z referencjami w literaturze [16]. Intensywność pasma pochodzącego od wiązania tlen-fosfor w HAp różni się w zależności od ilości napelniacza w spienionym kompozycie (tym niższa wartość transmitancji, im wyższa zawartość).

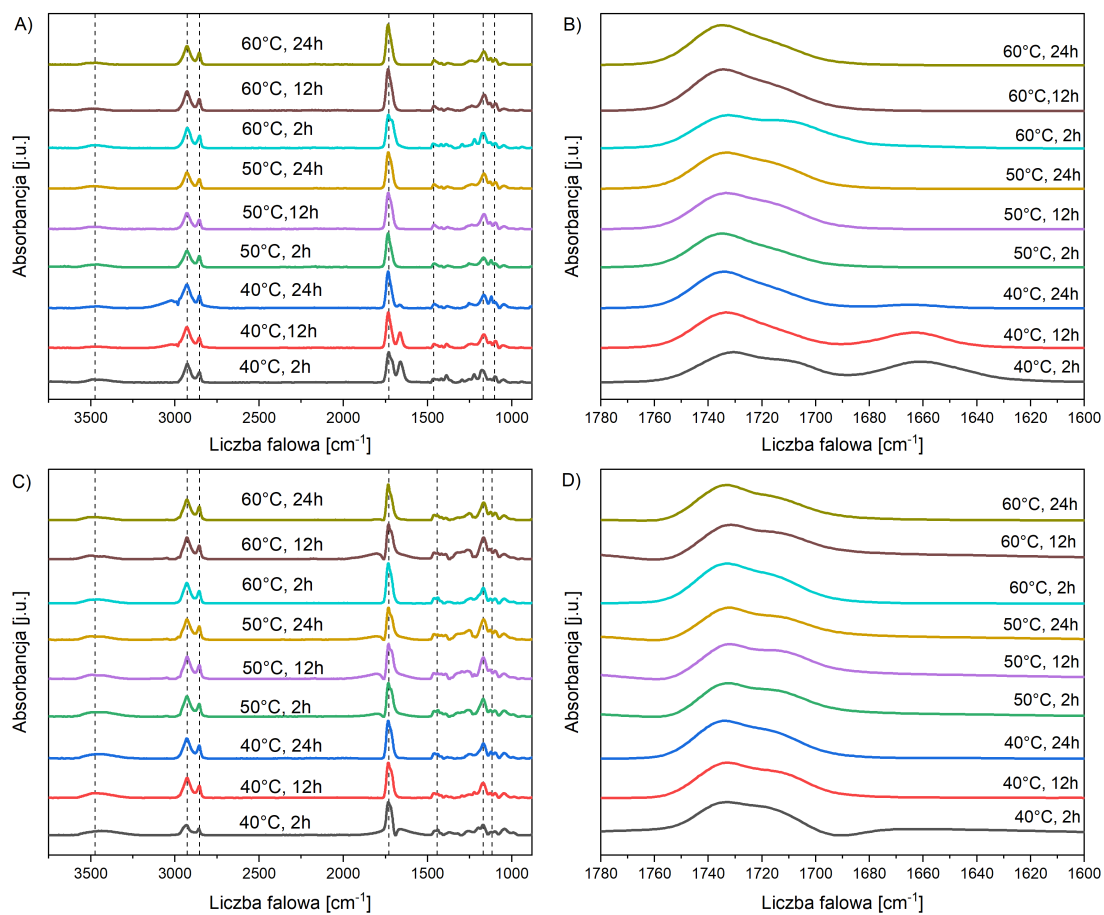


Rysunek 18: Widma FT-IR dla prepolimeru pPGS oraz pianek PGS i PGS/HAp zawierających 10, 20 i 30wt.% HAp (A), przybliżenie widm na zakres $1780\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ (B) oraz na obszar $1300\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ (C).

W przypadku widma prepolimeru obserwujemy również pik przy 1044 cm^{-1} , który posiada podobną morfologię do piku P-O, jednak pochodzi od nakładających się pasm szkieletu alifatycznego [10]. Sygnał pochodzi najprawdopodobniej od pasma rozciągającego drugorzędowego węgla C-O(H), który nie jest obecny w usieciowanej strukturze ze względu na kondensację inter- oraz intramolekularną mającą miejsce podczas procesu sieciowania. Obecne jest również inne pasmo pochodzące od drgań rozciągających estrowej grupy karbonylowej w formie węższego pasma dla struktur usieciowanych i szerszego dla prepolimeru. Zmiany w kształcie pasma karbonylowego dla PGS są powiązane z sieciowaniem, co zostało również zaobserwowane w

literaturze [51]. Pomimo faktu, że technika ATR nie jest ilościowa, na przykładzie opisywanych widm widzimy powiązanie intensywności pasma z zawartością poszczególnych grup.

Analizie FT-IR zostały również poddane prepolimery wytworzone na drodze syntezy enzymatycznej z wykorzystaniem SA oraz DMS i CALB jako katalizatora (Rysunek 19). Krzywe FT-IR opisujące strukturę poli(sebacynianu glicerolu) uzyskanego z SA i DMS są do siebie podobne (Rysunek 19A,C). Na każdej krzywej ATR widoczne są pasma opisane wcześniej, pochodzące od grup, takich jak np. hydroksylowa. W przypadku struktury prepolimeru możemy powiązać ją z występowaniem konkretnych struktur wyróżnionych na Rysunku 13. Występujące grupy hydroksylowe mogą mieć charakter pierwszorzędowy (1T; 2T; 1,2L; terminalna grupa karboksylowa) lub drugorzędowy (1T; 1,3L). Dwa pasma występujące ok. 2930 i 2850 cm^{-1} są powiązane z drganiami rozciągającymi alifatycznych grup $-\text{CH}_3$ i $-\text{CH}_2$ [30, 40]. Pasma przy 1460 cm^{-1} odpowiada drganiom nożycowym grupy $-\text{CH}_2$. Na każdym widmie obecne jest również pasmo rozciągające estrowego wiązania C-O przy 1170 cm^{-1} . Nieopodal pasma C-O znajduje się sygnał pochodzący od drgań rozciągających pierwszorzędowej grupy hydroksylowej [13]. Najistotniejszą częścią widma jest jednak pasmo wiązania karbonylowego przy 1735 cm^{-1} .



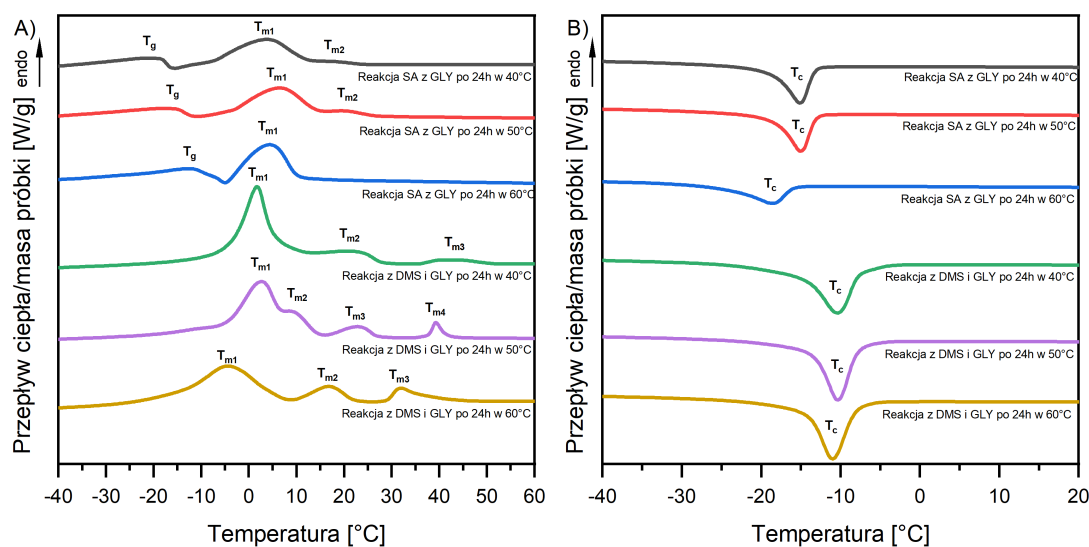
Rysunek 19: Widma FT-IR prepolimerów PGS otrzymanych po 2, 12 i 24h syntezy enzymatycznej w 40, 50 oraz 60°C z wykorzystaniem SA (A i B) oraz DMS (C i D) jako monomerów. Na Rysunkach B i D zostało przedstawione zbliżenie na ewolucję pasma karbonylowego w zakresie 1600-1780 cm^{-1} .

Zmiany w kształcie pasma C=O zostały zwizualizowane na Rysunku 19B. Dla obydwu reakcji widoczne jest, opisywane w literaturze, szerokie pasmo przy 1730 cm^{-1} , które wydłuża się w kierunku niższych długości fali [15, 35]. Co więcej, jego struktura wskazuje na obecność nakładającego się kolejnego pasma karbonylowego przy ok. 1711 cm^{-1} . Ta cecha struktury może być utożsamiana z karbonylem estrowym w odmiennym otoczeniu chemicznym, które zależne jest od stopnia zaawansowania reakcji oraz wariacji strukturalnych PGS występujących w dystrybucji masy pPGS. Co ciekawe, pasmo karbonylowe monomeru DMS nakłada się z głównym pasmem karbonylowym prepolimeru (Rysunek 19D), podczas gdy pasmo pochodzące od SA jest przesunięte w kierunku niższej liczby falowej.

3.1.2 Analiza termiczna

DSC

Analizie termicznej zostały poddane zarówno prepolimery syntezowane enzymatycznie, prepolimer wytworzony polikondensacją termiczną, jak i *scaffoldy* polimerowe i kompozytowe zawierające HAp. Termogramy DSC zarejestrowane dla prepolimerów PGS syntezowanych enzymatycznie pozwoliły na zidentyfikowanie efektów termicznych występujących w materiale. Krzywe związane z grzaniem oraz chłodzeniem są zaprezentowane na Rysunku 20. Podczas ogrzewania, charakterystyczna skokowa zmiana pojemności cieplnej utożsamiana z przejściem szklistym była obecna dla wszystkich reakcji z wykorzystaniem SA jako monomeru.



Rysunek 20: Krzywe DSC podczas grzania (A) oraz chłodzenia (B) dla produktów reakcji enzymatycznych po 24h. Pomiar był prowadzony w zakresie temperatur -70;200°C. Na wykresach przedstawiono tylko zakresy, w których wystąpiły istotne zmiany w przepływie ciepła.

Dla produktu uzyskanego w 40 oraz 50°C temperatura zeszklenia (T_g) była porównywalna (-26,8 i -27,1°C), natomiast dla produktu reakcji uzyskanego w 60°C wzrosła do -17,1°C. Literaturowe wartości temperatury zeszklenia dla PGS są nieznacznie niższe i mieszczą się w zakresie od -37,0 do -28,3°C [15, 30, 35, 40, 51]. Analiza wyników nie wykazała obecności przejścia szklistego dla prepolimerów wytworzonych z wykorzystaniem DMS jako monomeru. Jednakże, pik ten mógł nałożyć się z innymi szerokimi pikami endotermicznymi widocznymi na wykresach.

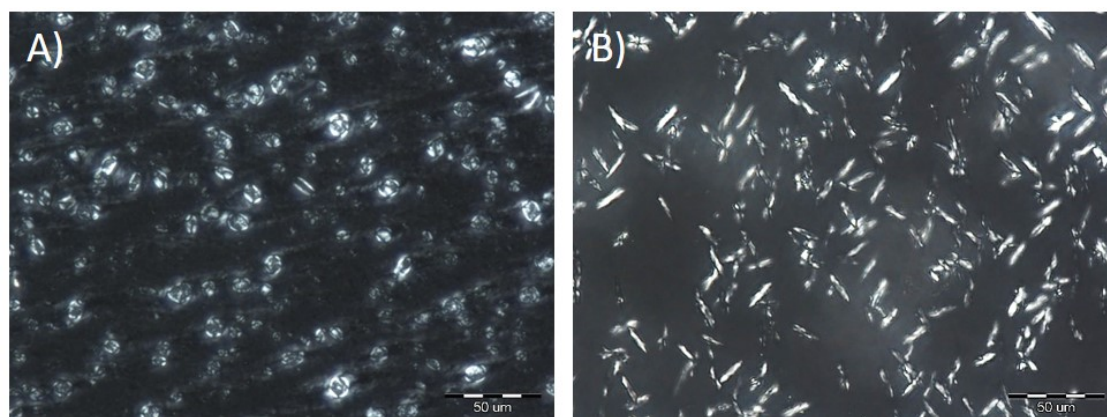
Co więcej, w przebiegu krzywych dla prepolimerów wytworzonych z wykorzystaniem SA zauważono efekt endotermiczny utożsamiany z topnieniem. Manifestował się on dwukrotnie dla pPGS uzyskanego w 40 i 50°C oraz jednokrotnie dla reakcji w 60°C przy temperaturach topnienia $T_{m1} = 3,0; 6,3; 4,2^\circ\text{C}$ i $T_{m2} = 24,1; 20,4^\circ\text{C}$. Te wartości temperatur topnienia są zgodne z wartościami opisanymi w literaturze dla innych prepolimerów PGS [30, 36]. W przypadku reakcji z wykorzystaniem DMS zaobserwowano aż do 4 pików endotermicznych, z których wszystkie były związane z topnieniem, a najwyższa wartość T_{m4} wyniosła 41,3°C

Na wszystkich termogramach, podczas cyklu chłodzenia, zaobserwowano szeroki egzotermiczny pik. W przypadku reakcji z wykorzystaniem SA, temperatura krystalizacji (T_c) była nieznacznie niższa w porównaniu do reakcji z DMS. Wszystkie wartości mieściły się w zakresie -10; -18,5°C. Wartość entalpii krystalizacji (ΔH_c) była w przybliżeniu stała dla reakcji z wykorzystaniem sebacynianu dimetylu. Co więcej, produkt reakcji przeprowadzonej z użyciem SA w 40 i 50°C również posiadał porównywalne wartości ΔH_c . Natomiast, dla reakcji w 60°C zanotowano obniżenie wartości entalpii, które może wynikać z postępu polimeryzacji i wzrostu w gęstości usieciowania prepolimeru. Ten wniosek jest poparty przez fakt, że prepolimer uzyskany z reakcji z DMS posiada prawie dwukrotnie wyższe wartości ΔH_c niż prepolimer wytworzony z SA. Dodatkowo polimer uzyskany z DMS posiada niższą masę cząsteczkową (wyznaczona za pomocą ^1H NMR), niż prepolimer wytworzony z SA. Dzięki obecności wyraźnych pików topnienia oraz krystalizacji, polimer uznawany jest za semikrystaliczny [2, 36] w przypadku obu ewaluowanych reakcji. Wszystkie parametry uzyskane w toku analizy DSC dla prepolimerów uzyskanych na drodze syntezy enzymatycznej zostały przedstawione w Tabeli 6.

Warunki syntezy/sięciowania	Grzanie										Chłodzenie	
	T_g [C]	T_{m1} [C]	ΔH_{m1} [J/g]	T_{m2} [C]	ΔH_{m2} [J/g]	T_{m3}	ΔH_{m3} [J/g]	T_{m4} [C]	ΔH_{m4} [J/g]	T_c [C]	$-\Delta H_c$ [J/g]	
SA/GLY, 40C, 24h	-26,8	3,0	24,1	24,5	2,5	-	-	-	-	-14,5	25,7	
SA/GLY, 50C, 24h	-27,1	6,3	23,2	20,4	3,4	-	-	-	-	-14,5	28,9	
SA/GLY, 60C, 24h	-17,1	4,2	23,9	-	-	-	-	-	-	-18,2	18,8	
DMS/GLY, 40C, 24h	-	-4,7	44,8	23,3	10,6	41,3	3,1	-	-	-9,3	51,5	
DMS/GLY, 50C, 24h	-	-6,0	40,7	14,3	8,2	23,1	5,2	39,1	2,8	-9,6	46,3	
DMS/GLY, 50C, 24h	-	-4,2	39,8	17,0	8,0	31,4	8,0	-	-	-10,0	49,5	

Tabela 6: Zestawienie przejść fazowych oraz ich entalpii na podstawie analizy DSC prepolimerów wykonanych techniką syntezy enzymatycznej.

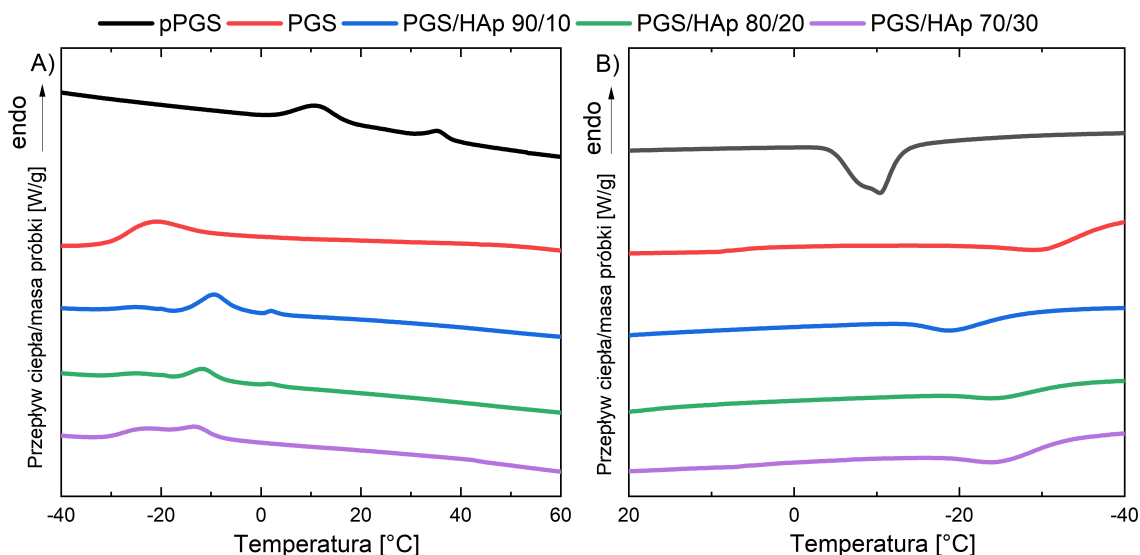
Analiza DSC dla pPGS oraz *scaffoldów* PGS/HAp zawierających 10, 20 i 30 wt. % HAp sieciowanych w warunkach obniżonego ciśnienia oraz w 130°C przez 168h została wykonana na podstawie pierwszego cyklu ogrzewania oraz chłodzenia. Jej wyniki przedstawiono na Rysunku 22. Podczas cyklu ogrzewania pPGS wykazuje dwa efekty endotermiczne. Lokalne maksima pików wynosiły odpowiednio 2,6 oraz 31,3°C i zostały oznaczone jako T_{m1} i T_{m2} . Celem interpretacji wyżej wymienionych efektów przeprowadzono eksperyment z zastosowaniem polaryzacyjnego mikroskopu optycznego w temperaturze zmieniającej się podczas pomiaru. Po schłodzeniu prepolimeru do temperatury -40°C, był on podgrzewany do 60°C w tempie 10°C/min. Schłodzony pPGS posiadał dwie odmienne morfologicznie struktury krystaliczne - jedna odznaczała się drobnymi krystalitami, a druga większymi, bardziej rozwiniętymi strukturami (Rysunek 21A). Podczas podgrzewania od 20°C wzwyż, obserwowano topienie się fazy zawierającej drobniejsze krystality. Druga faza krystaliczna była w tej temperaturze stabilna (Rysunek 21B), a jej topienie rozpoczęło się powyżej 30°C. Analiza mikroskopowa wykazała semikrystaliczność pPGS po syntezie (z dwiema rozdzielnymi fazami krystalicznymi, które ulegały topieniu w innych temperaturach).



Rysunek 21: Fotografie z polaryzacyjnego mikroskopu optycznego zarejestrowane podczas ogrzewania prepolimeru PGS od -40°C do 60°C. Fotografie zarejestrowano w -40°C (A) oraz w 20°C (B).

Dla przeprowadzonego eksperymentu DSC, w zakresie temperatur od -70°C do 60°C oraz z zadaną prędkością grzania/chłodzenia, nie udało się zidentyfikować przejścia szklistego dla prepolimeru. Jest ono natomiast widoczne w próbkach spienionych, zarówno podczas grzania jak i chłodzenia. Temperatura zeszklenia (T_g)

scaffoldu z PGS wynosiła $-27,0^{\circ}\text{C}$ w cyklu grzania oraz $-28,5^{\circ}\text{C}$ w cyklu chłodzenia, a jej wartości były porównywalne, jak te uzyskane dla pianek kompozytowych zawierających 10, 20 oraz 30 wt.% frakcji apatytowej.



Rysunek 22: Krzywe DSC podczas ogrzewania (A) oraz chłodzenia (B) dla *scaffoldów* PGS oraz PGS/HAp sieciowanych przez 168h w 130°C . Pomiar był prowadzony w zakresie temperatur $-70;200^{\circ}\text{C}$. Na wykresach przedstawiono tylko zakresy, w których wystąpiły istotne zmiany w przepływie ciepła.

Pianka PGS wykazuje charakter amorficzny, na co wskazuje brak występowania efektów endotermicznych. Natomiast *scaffoldy* kompozytowe, pomimo obecności usieciowanego PGS, wykazują charakter semikrystaliczny. Wyjaśnienia takiego zjawiska możemy doszukiwać się w potencjalnej nukleacji krystalizacji za pomocą cząstek HAp. Dla próbek PGS/HAp 90/10 oraz PGS/HAp 80/20 widoczne są dwa endotermiczne sygnały, podobnie jak w przypadku prepolimeru. Dla spienionego kompozytu o najwyższej zawartości HAp (30 wt.%) jest obecny tylko jeden pik endotermiczny przypisany niższej temperaturze topnienia ($-12,8^{\circ}\text{C}$). Maksima lokalne odpowiadające za topnienie są przesunięte w kierunku niższych temperatur dla *scaffoldów* kompozytowych w porównaniu do prepolimeru. Wartości ich entalpii (ΔH_{m1} i ΔH_{m2}) są niższe niż w przypadku prepolimeru (Tabela 7). W wartościach entalpii topnienia jest również widoczny trend malejący wraz ze wzrostem zawartości napełniacza w kompozycie.

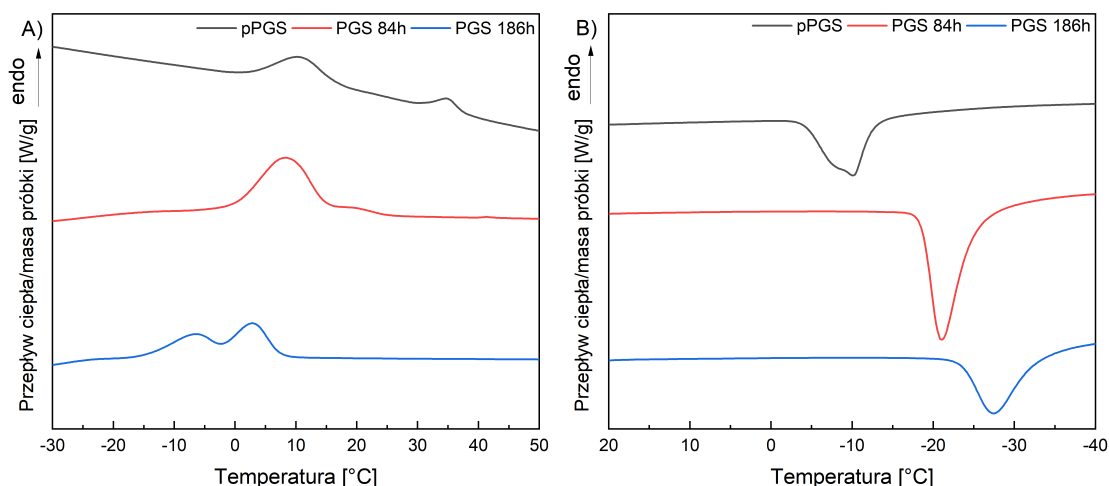
Podczas chłodzenia pPGS ulega krystalizacji na co wskazuje obecny efekt egzotermiczny. Pik krystalizacji osiąga minimum lokalne przy temperaturze $T_c = -10,4^{\circ}\text{C}$

oraz jest rozciągnięty w kierunku wyższych wartości temperatur. Przebieg krzywej DSC dla *scaffoldu* z PGS podczas chłodzenia odznacza się jedynie przejściem szklistym przy temperaturze $-27,0^{\circ}\text{C}$. W przypadku pianek kompozytowych przejście szkliste jest poprzedzone słabym efektem egzoergicznym, który jest odpowiedzialny za krystalizację. Obecność efektu egzotermicznego w przypadku kompozytów wskazuje na nukleację poli(sebacynianu gliceryny) hipotetycznie indukowaną przez cząstki apatytowe. Analiza właściwości termicznych badanych *scaffoldów* wykazuje brak przejść fazowych powyżej temperatury 10°C . Wobec tego, omawiane materiały powyżej tej temperatury wykazują charakter amorficzny. Wnioski wysnute z analizy DSC, wskazują również na fakt, że badane materiały podczas badań właściwości mechanicznych znajdują się w stanie elastycznym.

Próbka	Warunki syntezy/sieciowania	forma	Pierwsze grzanie						Chłodzenie		
			T_g [$^{\circ}\text{C}$]	T_{m1} [$^{\circ}\text{C}$]	T_{m2} [$^{\circ}\text{C}$]	ΔH_{m1} [J/g]	ΔH_{m2} [J/g]	T_g	T_c [$^{\circ}\text{C}$]	$-\Delta H_c$ [J/g]	
pPGS	130 $^{\circ}\text{C}$, 24h	prepolimer	-	2,6	31,3	10,5	2,3	-	-10,4	15,5	
PGS	130 $^{\circ}\text{C}$, 168h, Δp	<i>scaffold</i>	-27	-	-	-	-	-28,5	-	-	
PGS/HAp 90/10	130 $^{\circ}\text{C}$, 168h, Δp	<i>scaffold</i>	-28,2	-9,4	2	3,2	0,2	-27,5	-24	1,2	
PGS/HAp 80/20	130 $^{\circ}\text{C}$, 168h, Δp	<i>scaffold</i>	-28,1	-11,6	1,9	1,6	0,1	-27,9	-24,4	0,6	
PGS/HAp 70/30	130 $^{\circ}\text{C}$, 168h, Δp	<i>scaffold</i>	-27,6	-12,8	-	0,8	-	-28,9	-23,7	0,5	
Próbka	Warunki syntezy/sieciowania	forma	Drugie grzanie						Chłodzenie		
			T_g [$^{\circ}\text{C}$]	T_{m1} [$^{\circ}\text{C}$]	T_{m2} [$^{\circ}\text{C}$]	ΔH_{m1} [J/g]	ΔH_{m2} [J/g]	T_g	T_c [$^{\circ}\text{C}$]	$-\Delta H_c$ [J/g]	
pPGS	130 $^{\circ}\text{C}$, 24h	prepolimer	-25,1	3,3	-	18,6	-	-	-17,8	18,5	
PGS	185 $^{\circ}\text{C}$, 2,5h, Δp	<i>scaffold</i>	-25,8	-9,4	-	3,7	-	-	-23,6	7,7	
PGS/HAp 75/25	185 $^{\circ}\text{C}$, 2,5h, Δp	<i>scaffold</i>	-24,9	-	-	-	-	-28,6	-	-	

Tabela 7: Zestawienie przejść fazowych oraz ich entalpii na podstawie analizy DSC *scaffoldów* oraz prepolimerów PGS, z których zostały wykonane. Tabela przedstawia analizę podczas chłodzenia oraz pierwszego lub drugiego cyklu grzania dla wybranych próbek.

Krzywe DSC zostały również zarejestrowane dla materiałów litych po ich sieciowaniu w czasie 84 i 168h (Rysunek 23). Przebieg termogramu dla pPGS został omówiony powyżej i nie występują w nim żadne odstępstwa od przedstawionego opisu. Podczas cyklu ogrzewania, temperatury topnienia przesuwają się w kierunku niższych wartości wraz z przedłużonym czasem sieciowania. Natomiast przy chłodzeniu obserwujemy przesunięcie się pików odpowiadającego za krystalizację w kierunku niższych temperatur ($-10,1^{\circ}\text{C}$ dla pPGS, $-21,2^{\circ}\text{C}$ dla PGS 84h i $-27,3^{\circ}\text{C}$ dla PGS 168h). Również wartość entalpii krystalizacji ulega systematycznemu zmniejszeniu się wraz z postępem sieciowania.



Rysunek 23: Krzywe DSC podczas grzania (A) oraz chłodzenia (B) dla pPGS oraz litych materiałów wykonanych z PGS sieciowanych przez 84 oraz 168h w 130°C. Pomiar był prowadzony w zakresie temperatur -70;200°C. Na wykresach przedstawiono tylko zakresy, w których wystąpiły istotne zmiany w przepływie ciepła.

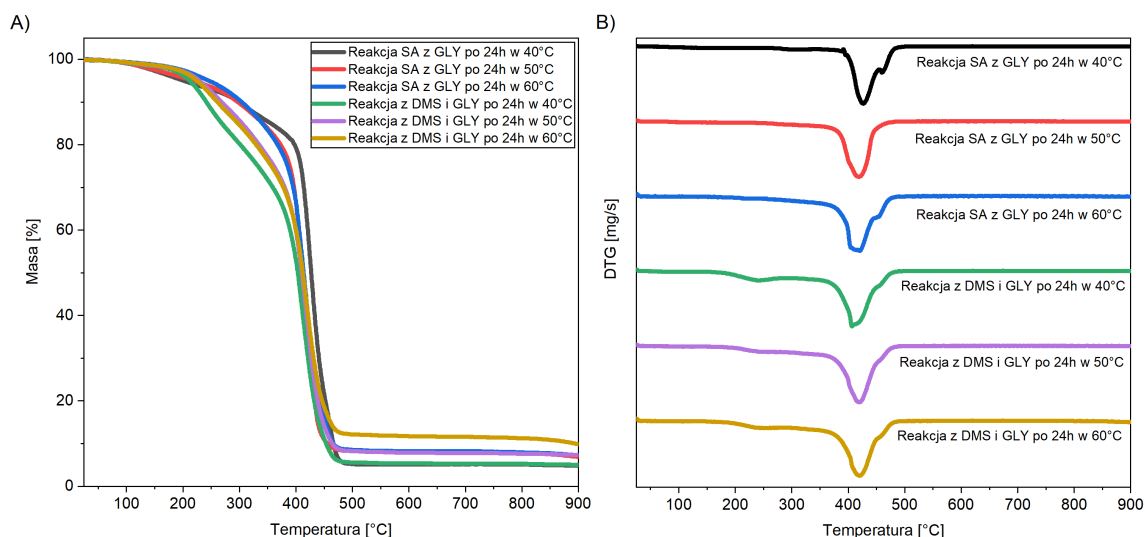
3.1.3 Stabilność termiczna wytworzonych materiałów

Badaniu TGA zostały poddane zarówno prepolimery wytworzone na drodze syntezy enzymatycznej, jak i porowate pianki i lite materiały na bazie usieciowanego PGS. Analiza TGA pozwoliła na zwizualizowanie mechanizmu degradacji, stabilności termicznej oraz zawartości fazy apatytowej w materiałach.

Krzywe TGA oraz pierwsze pochodne po czasie (DTG, ang. *derivative thermogravimetry*) dla prepolimerów z syntezy enzymatycznej zostały przedstawione na Rysunku 24. Krzywe zostały zarejestrowane dla produktów po 24h reakcji w 40, 50 oraz 60°C z wykorzystaniem SA i GLY oraz DMS i GLY jako monomerów. Ich temperatura degradacji (T_d) była wyznaczana jako punkt przegięcia krzywej z wykresu DTG. Dla pPGS syntezowanego z wykorzystaniem SA, T_d malała wraz ze wzrostem temperatury reakcji (od 426,7°C dla pPGS uzyskanego w 40°C do 414,5°C dla pPGS uzyskanego w 60°C). W przypadku reakcji z użyciem DMS jako substratu polimeryzacji, T_d wzrosła od 406,5°C dla reakcji w 40°C do ok. 420°C dla obu pozostałych produktów polimeryzacji (w 50 i 60°C). Wartości temperatury degradacji pPGS dostępne w literaturze pokrywają się z przedstawionymi wartościami dla wszystkich prepolimerów w zakresie $\pm 25^\circ\text{C}$ [35, 51, 190]. Masa próbek w 900°C obniża się wraz ze spadkiem temperatury reakcji, zarówno przy użyciu SA jak i DMS jako

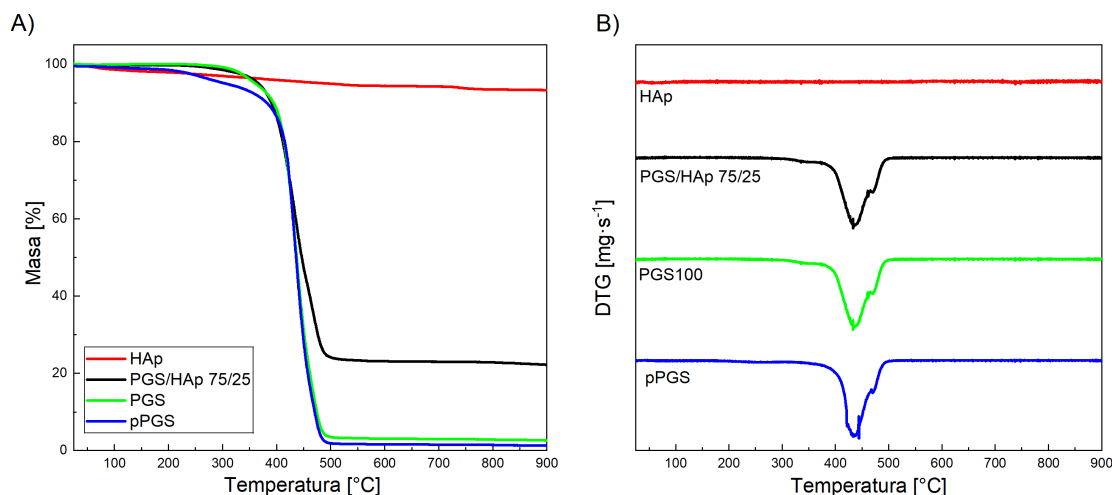
monomerów. Jej wartości mieszczą się w zakresie 88,5-94,9%.

Poza głównym wyraźnym pikiem odpowiadającym za dekompozycję na krzywej DTG dla reakcji z użyciem DMS, obecny jest drugi, mniejszy pik przy 245°C. Może być on związany z dekompozycją nieprzereagowanych monomerów lub struktur o niewielkim stopniu polimeryzacji, np. di- lub trimerycznym. Ten wniosek jest podparty obecnością nieprzereagowanego glicerolu w analizie NMR (Tabela 2).



Rysunek 24: Krzywe TGA dla pPGS zsyntezowanych z dwóch zestawów monomerów (SA i GLY lub DMS i GLY) w 40,50 lub 60°C (A) oraz przebieg wykresów pierwszej pochodnej DTG (B). Pomiar wykonany w atmosferze azotu.

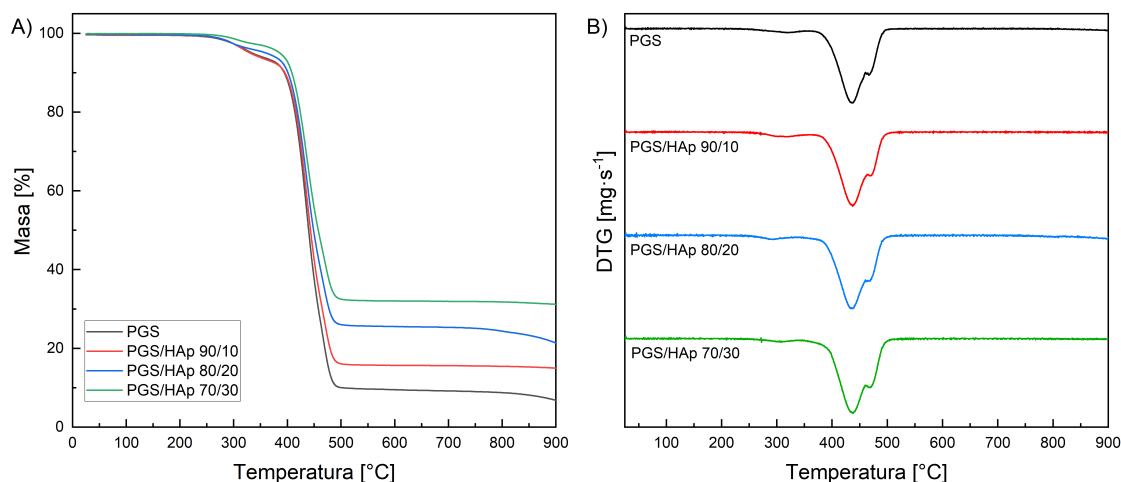
Krzywe TGA oraz DTG dla HAp, prepolimeru oraz *scaffoldu* PGS i PGS/HAp 75/25 sieciowanych w 185°C przez 2.5h zostały przedstawione na Rysunku 25. Stabilność termiczna została określona na podstawie temperatury 5% utraty masy $T_{-5\%}$. Parametr ten jest o ok. 55°C wyższy dla usieciowanej pianki PGS, niż dla prepolimeru pPGS. Dzięki obecności HAp w kompozycie PGS/HAp 75/25 stabilność termiczna została poprawiona o 7°C.



Rysunek 25: Krzywe TGA dla HAp, pPGS oraz *scaffoldów* PGS i PGS/HAp sieciowanych w 185°C przez 2,5h (A) oraz przebieg wykresów pierwszej pochodnej DTG (B). Pomiar wykonany w atmosferze azotu.

Pomiary techniką TGA wykonano również dla *scaffoldów* PGS i PGS/HAp sieciowanych w 130°C przez 168h. Stabilność termiczna materiałów jest wyższa dla układów napełnionych w odniesieniu do nienapełnionych. Stabilność termiczna rozumiana jako temperatura początku degradacji jest wprost proporcjonalna do zawartości apatytu, a utrata masy w 900°C koresponduje z ilością HAp i wynosi odpowiednio 93,2% dla PGS, 85,0% dla PGS/HAp 90/10, 78,6% dla PGS/HAp 80/20 i 68,8 dla PGS/HAp 70/30. Temperatura utraty 5% masy również wykazuje trend wzrostowy wraz ze zwiększającą się ilością HAp. Jej wartości wynoszą odpowiednio: PGS (332,5°C), PGS/HAp 90/10 (330,8°C), PGS/HAp 80/20 (360,2°C), PGS/HAp 70/30 (386,2°C).

Co ciekawe, dla próbek sieciowanych w 130°C przez 168h widoczny jest drugi pomniejszy punkt przegięcia na krzywej DTG widoczny ok. 310°C. Podobny przebieg mają również krzywe DTG uzyskane dla polimeru syntezowanego w obecności enzymu CALB. Jednak w przypadku syntezy enzymatycznej, wartość tej temperatury jest przesunięta w kierunku niższych temperatur w stosunku do polimeru pochodzącego z syntezy temperaturowej. Występujący drugi punkt przegięcia może być skorelowany ze strukturami o małym stopniu polimeryzacji.



Rysunek 26: Krzywe TGA dla *scaffoldów* PGS i PGS/HAp zawierających 10, 20 i 30 wt.% napełniacza, sieciowanych w temperaturze 130°C przez 168h (A) oraz przebieg wykresów pierwszej pochodnej DTG (B). Pomiar wykonany w atmosferze azotu.

Próbka	Warunki syntezy/sieciowania	$T_{-5\%}$ [°C]	Punkt przegięcia [°C]	Utrata masy w 900°C [%]
HAp	Synteza strąceniowa	513	-	5,8
pPGS	CALB, SA/GLY, 40°C, 24h	201,8	426,7	94,9
pPGS	CALB, SA/GLY, 50°C, 24h	219,2	418,7	92,0
pPGS	CALB, SA/GLY, 60°C, 24h	246,2	414,5	91,8
pPGS	CALB, DMS/GLY, 40°C, 24h	212,2	406,5	94,7
pPGS	CALB, DMS/GLY, 50°C, 24h	227,3	419,6	92,2
pPGS	CALB, DMS/GLY, 60°C, 24h	225,2	419,7	88,5
pPGS	130°C, 24h	305,8	433,1	98,4
PGS	130°C, 168h	332,5	435,3	93,2
PGS	185°C, 2,5h	360,1	433,9	97,0
PGS/HAp 90/10	130°C, 168h	330,8	437,2	85,0
PGS/HAp 75/25	185°C, 2,5h	367,8	434,8	77,0
PGS/HAp 80/20	130°C, 168h	360,2	434,8	78,6
PGS/HAp 70/30	130°C, 168h	386,2	436,6	68,8

Tabela 8: Zestawienie parametrów wyznaczonych z analizy TGA dla uzyskanych pPGS oraz *scaffoldów* o przedstawionym składzie, poddanych sieciowaniu termicznemu. Wśród wyznaczonych parametrów znajdują się $T_{-5\%}$, punkt przegięcia z DTG oraz utrata masy po pomiarze.

3.1.4 Kąt zwilżania oraz stopień usieciowania

Kąt zwilżania zmierzony dla pPGS wynosi 48,5°, dla litego PGS sieciowanego w 130°C przez 84h uzyskano wartość 74,5°, a dla próbki sieciowanej przez 168h posiadał wartość 102,7°. Przed wykonaniem pomiaru, próbkę prepolimeru umieszczono na szkiełku mikroskopowym i podgrzano do temperatury 50°C celem równo-

miernego rozprowadzenia materiału po powierzchni. Przedstawione wyniki wskazują na wzrost wartości kąta zwilżania, a co za tym idzie również charakteru hydrofobowego dla PGS podczas jego sieciowania termicznego. Wartości kąta zwilżania dla PGS opisane w literaturze mieszczą się w zakresie od 30°, aż do przedziału 70-80° [1, 24, 41, 47, 191], (co pokrywa się z wartością dla prepolimeru oraz próbki sieciowanej przez 84h). Podczas sieciowania termicznego dochodzi do polikondensacji wewnątrzcząsteczkowej, która prowadzi do zmniejszenia się ilości peryferyjnych grup hydroksylowych w łańcuchach makromolekularnych. W literaturze opisywana jest plazmowa modyfikacja powierzchni PGS, która wprowadzała na nią grupy polarne, w konsekwencji obniżając kąt zwilżania i zwiększając hydrofilowość [41]. W świetle uzyskanych wyników oraz przytoczonej literatury zaproponowane wyjaśnienie dotyczące zmniejszającej się ilości grup hydrofilowych (polarnych) oraz wzrostu hydrofobowości podczas sieciowania zdaje się być prawdopodobne. Wobec powyższego, możemy sklasyfikować badany PGS jako materiał hydrofilowy, który wraz z postępem sieciowania przybiera coraz bardziej hydrofobowy charakter.

Badaniu zostały poddane również materiały porowate, a mianowicie *scaffolds* sieciowane w warunkach obniżonego ciśnienia w 130°C. Średnie wartości kąta zwilżania dla *scaffoldu* z PGS wynosiły 118,6°, a dla pianki zawierającej 25 wt.% HAp 112,3° (Tabela 9). Wyniki wskazują na wzrost charakteru hydrofilowego po dodaniu apatytu, co jest w zgodzie z wnioskami płynącymi z literatury [24]. Porowata morfologia próbki w znaczącym stopniu wpływa na kąt zwilżania ze względu na fakt, że kropla wody nie jest poddana jedynie oddziaływaniom z płaską powierzchnią, a również z porowatą topografią próbki. Wobec powyższego, wyniki dla *scaffoldów* możemy porównywać jedynie względem siebie, a nie możemy ich odnieść do materiałów litych. Nie mniej jednak, podobne wartości kąta zwilżania (105,23°-111,9°) zostały zarejestrowane w badaniu na porowatych *scaffoldach* PGS wytwarzanych techniką sieciowania termicznego wraz z wmywaniem soli (SL) [41].

Dla wybranych materiałów na bazie PGS, określono stopień ich usieciowania. Dokonano tego na podstawie masy odmytej w EtOH. Prepolimer pPGS był całkowicie rozpuszczalny w alkoholu etylowym, wobec czego jego stopień usieciowania określono jako 0%. Dla materiałów litych stopień usieciowania zwiększa się od 81,5% po 84h, do 97,5% po 164h. Oznacza to, że podczas sieciowania, duża część frakcji roz-

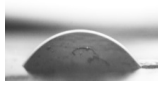
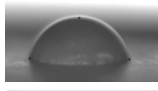



Próbka	Forma	Parametry sieciowania	Kąt zwilżania [°]	Zdjęcia kropli
pPGS	prepolimer	n/d	$48,5 \pm 3,7$	
PGS 84h	materiał lity	130°C, Δp , 84h	$74,5 \pm 5,5$	
PGS 168h	materiał lity	130°C, Δp , 168h	$102,7 \pm 3,0$	
PGS	pianka	185°C, 2,5h	$118,6 \pm 4,3$	
PGS/HAp 75/25	pianka	185°C, 2,5h	$112,3 \pm 3,8$	

Tabela 9: Zestawienie wartości kątów zwilżania uzyskanych dla litych oraz porowatych materiałów na bazie PGS.

puszczalnej w EtOH przekształca się w nierozpuszczalną. Odbywa się to na skutek polikondensacji inter- lub intramolekularnej pomiędzy grupami hydroksylowymi, a karboksylowymi [192]. Wniosek dotyczący zmniejszania się masy frakcji rozpuszczalnej podczas sieciowania termicznego PGS jest zgodny z danymi literaturowymi [6]. W przypadku *scaffoldów* sieciowanych w 130°C przez 168h obserwujemy wartości, które wynoszą odpowiednio $94,0 \pm 3,0\%$ dla pianki PGS gel, $92,4 \pm 2,1\%$ dla pianki PGS/HAp 80/20, $89,3 \pm 6,3\%$ dla PGS/HAp 80/20, oraz $94,8 \pm 2,3\%$ dla PGS/HAp 70/30. Ww. wartości, w tolerancji pomiarowej, wynoszą powyżej 90% i są ze sobą zbieżne, co świadczy o wysokim, powtarzalnym stopniu usieciowania materiałów piankowych niezawierających oraz zawierających zawartości frakcji apatytowej w przedziale od 0 do 30%.

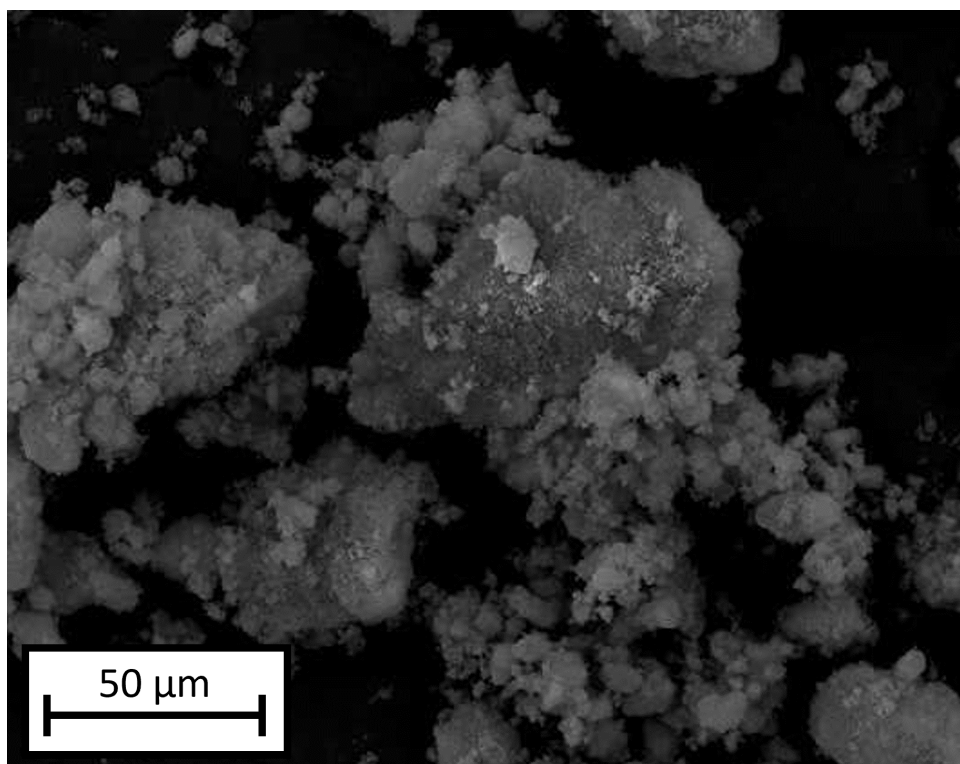
3.2 Obrazowanie oraz rekonstrukcje 3D

Porowate biomateriały PGS oraz PGS/HAp zostały poddane obrazowaniu szeregiem technik, włączając mikroskopię optyczną, SEM oraz μ -CT. Obrazowaniu został poddany również sam HAp wykorzystany do wytwarzania kompozytów. Jego morfologia jest przedstawiona na mikrofotografii SEM na Rysunku 27. Cząstki HAp posia-

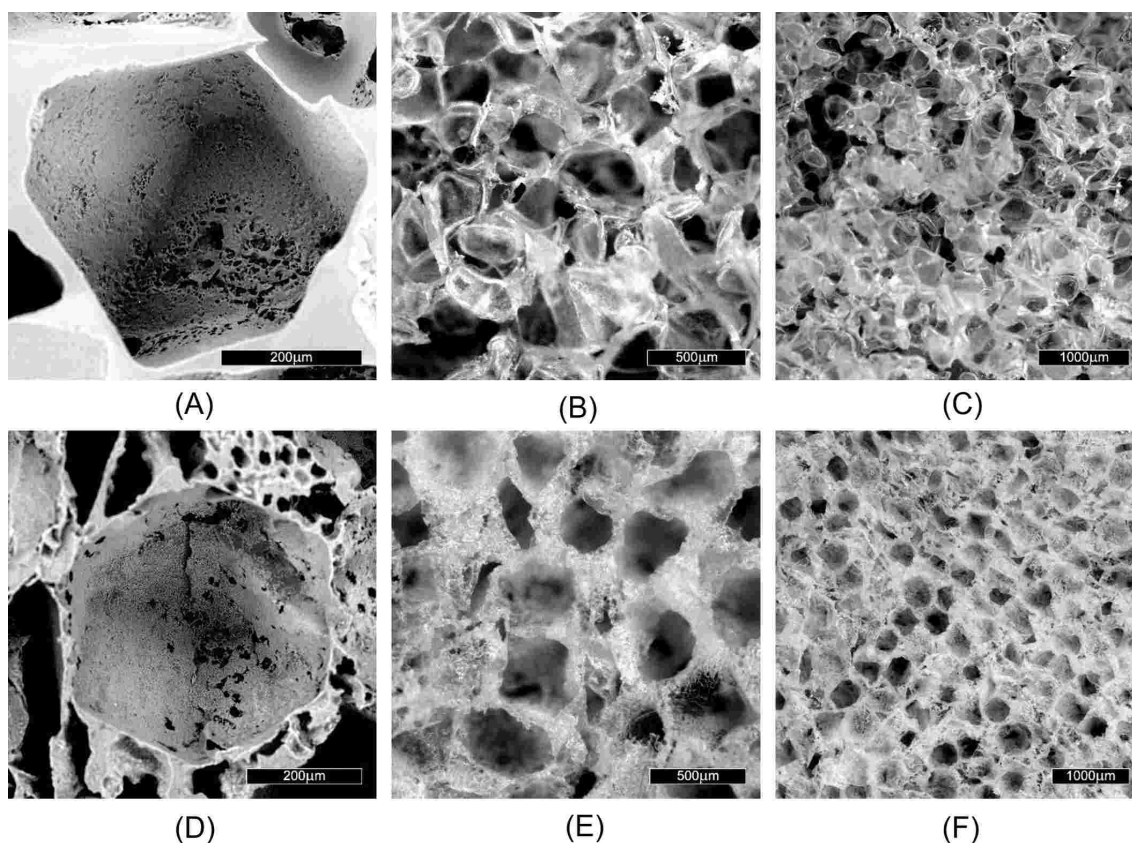
Próbka	Forma	Temperatura sieciowania [°C]	Czas sieciowania [h]	Stożenie usieciowania [%]
pPGS	prepolimer	n/d	n/d	0
PGS	mat. lity	130	84	81,5 ± 1,5
PGS	mat. lity	130	168	97,5 ± 2,4
PGS	<i>scaffold</i>	130	168	94,0 ± 3,0
PGS/HAp 90/10	<i>scaffold</i>	130	168	92,4 ± 2,1
PGS/HAp 80/20	<i>scaffold</i>	130	168	89,3 ± 6,3
PGS/HAp 70/30	<i>scaffold</i>	130	168	94,8 ± 2,3

Tabela 10: Zestawienie wartości stopnia usieciowania dla materiałów litych oraz wybranych *scaffoldów*.

dają kłaczkowaty kształt oraz są zaglomerowane, co jest typowe dla tego rodzaju ceramiki. Aglomeracja cząstek mogła być spowodowana dojrzewaniem Ostwalda. Jest to spontaniczny proces termodynamiczny, polegający na rozpuszczaniu się mniejszych kryształów, ich rekrystalizacji oraz następnym odkładaniu się na powierzchni większych kryształów [193]. Z punktu widzenia termodynamiki, większe cząstki są bardziej preferowane energetycznie niż mniejsze ze względu na ich stabilność.



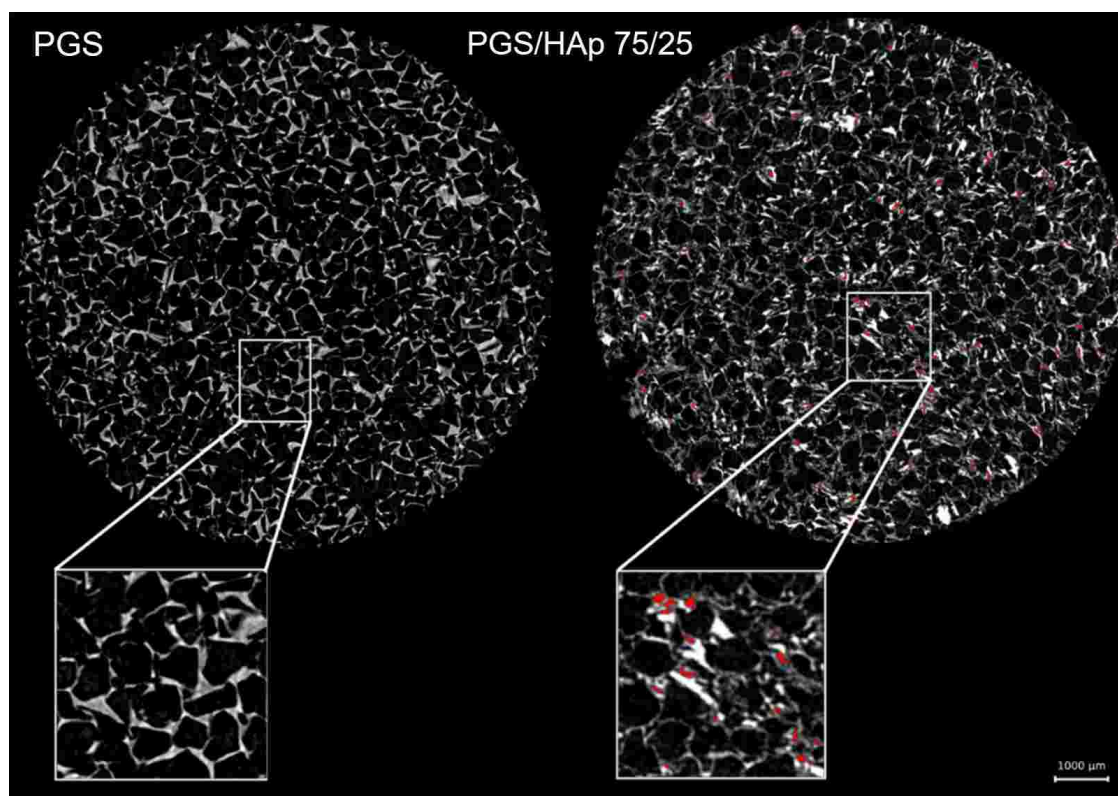
Rysunek 27: Mikrofotografia SEM proszku HAp.



Rysunek 28: Mikrofotografie SEM pokazujące reprezentatywny por w strukturze *scaffoldu* PGS(A) oraz PGS/HAp 75/25(D) oraz zdjęcia z mikroskopu optycznego ukazujące porowatą strukturę pianek PGS(B,C) oraz PGS/HAp 75/25(E,F).

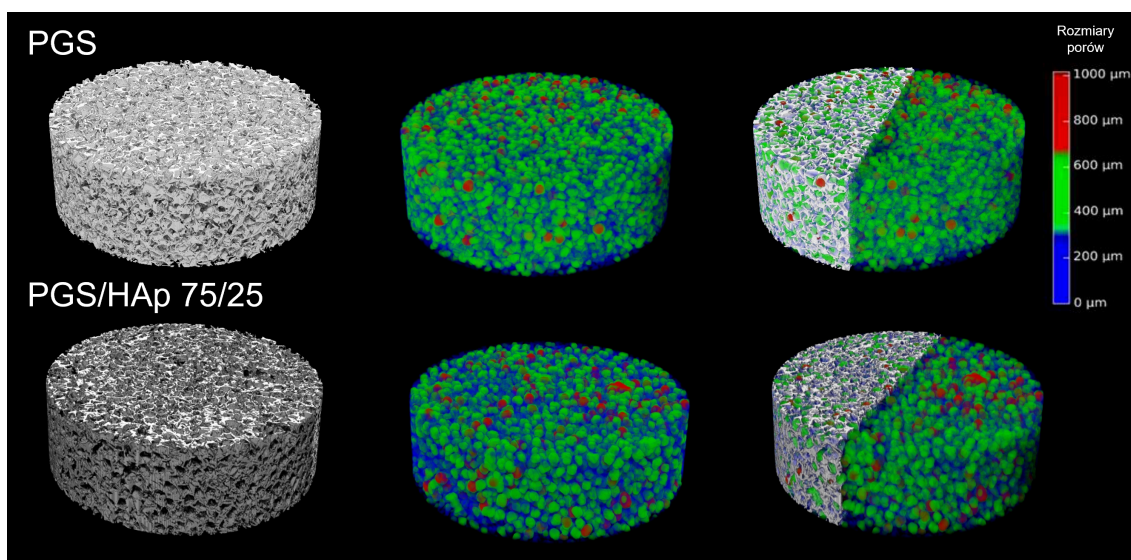
Struktura wewnętrzna pianek PGS oraz PGS/HAp 75/25 sieciowanych w 185°C została przedstawiona na Rysunku 28. Możemy zaobserwować różnice w morfologii próbki polimerowej oraz zawierającej HAp. Ściany *scaffoldu* PGS są lite, podczas gdy pianka z dodatkiem HAp jest co raz bardziej postrzępiona, z większą ilością pustych przestrzeni pomiędzy porami niż pianka PGS. Średnie wartości średnicy porów na Rysunku 28A oraz 28D wynosiły odpowiednio 434,1 μm dla PGS oraz 483,7 μm dla PGS/HAp 75/25. Wartości te zawierają się w zakresie średnicy ziaren poroforu wykorzystanego do wytwarzania *scaffoldów* (NaCl, 400-500 μm).

Wewnętrzna mikrostruktura *scaffoldów* PGS oraz PGS/HAp 75/25 została przedstawiona za pomocą sferyczności i rozmiarów porów oraz uporządkowania przestrzennego materiałów (Rysunek 29). Zaobserwowano liczne rozwarstwienia oraz nieciągłości w strukturze pianki PGS/HAp 75/25, które są również widoczne na mikrofotografii SEM (Rysunek 28D).



Rysunek 29: Przekroje poprzeczne *scaffoldów* PGS oraz PGS/HAp 75/25 uzyskane z μ CT, ukazujące różnice w kształcie porów. Mikropory występujące w strukturze ścian zostały zaznaczone kolorem czerwonym.

Przeprowadzono także analizę ilościową wewnętrznej struktury pianek, włączając w to przedstawienie porowatości średniej, średnicy porów oraz ich sferyczności. Rekonstrukcje zarówno pianki polimerowej, jak i kompozytowej zawierającej 25% wagowych fazy apatytowej przedstawiono na Rysunku 30 wraz z zakodowaną kolorystycznie porowatością.



Rysunek 30: Rekonstrukcja struktury pianki wraz z kolorystycznie kodowanymi rozmiarami porów. Szary kolor reprezentuje ściany *scaffoldu*, a niebieski, zielony i czerwony pory o konkretnych rozmiarach. Średnice z zakresu 0-300 μm - kolor niebieski, 300-650 μm - kolor zielony i powyżej 650 μm - kolor czerwony.

Całkowita porowatość ($Po(\text{tot})$) pianki PGS wynosiła 78,0%, a dla kompozytu 69,8%. W przeważającej większości była to porowatość otwarta (ilość porów zamkniętych była nieznaczna: poniżej 0,001% dla PGS i 0,02% dla PGS/HAp 75/25).

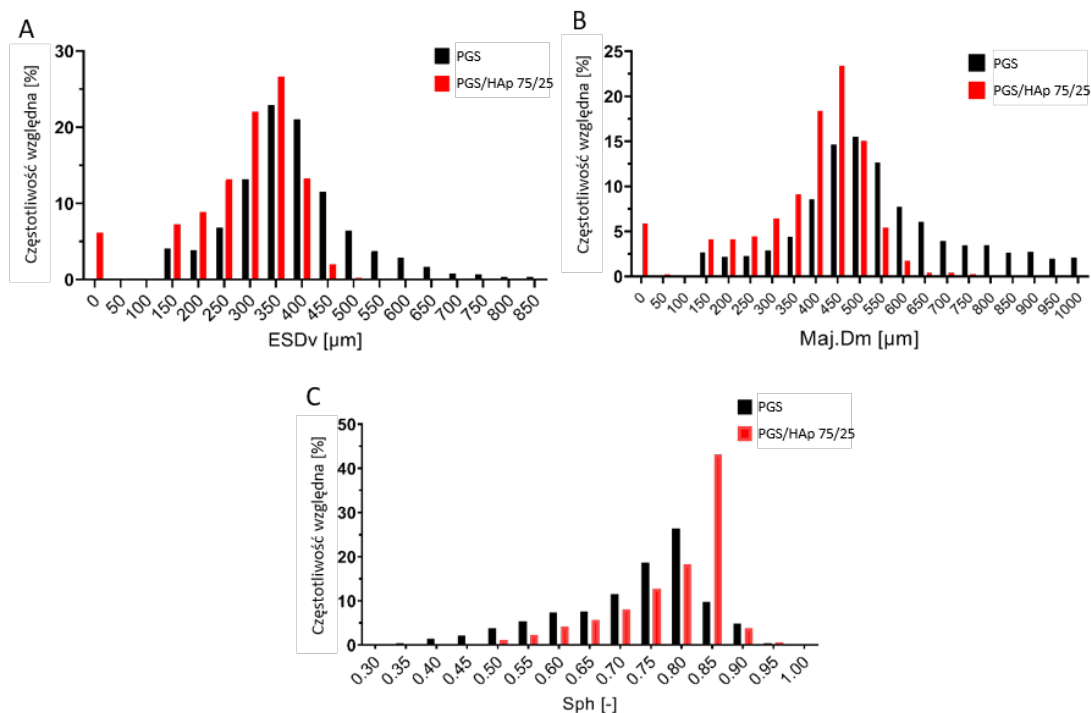
Średnia objętość porów ($Po.V$) wyniosła 216,01 mm^3 dla PGS oraz 193,39 mm^3 dla pianki kompozytowej. Przeprowadzona analiza pozwoliła ustalić również zakres występujących rozmiarów porów. Dla pianki polimerowej był on w zakresie 150-850 μm , a dla *scaffoldu* zawierającego HAp, pory nie były większe niż 450 μm . Jednakże, dla pianki kompozytowej zaobserwowano dużo mniejsze pory w strukturze ściany (Rysunek 28D), które posiadały średnicę 50 μm , a ich udział w ogólnej ilości porów wynosił 6%. Średni rozmiar porów, włączając do analizy ww. mikropory, wynosił 286 ± 103 μm , a największa wyznaczona średnica pora mierzyła 385 ± 147 μm . Po wykluczeniu z analizy mikroporów, wartości te były wyższe i wynosiły odpowiednio 304 ± 77 μm oraz 410 ± 115 μm . Dla porównania, w piance PGS rozmiar porów wyniósł 383 ± 120 μm , a największa średnica porów 596 ± 271 μm . Sferyczność porów (Sph , wartość 1 dla idealnie sferycznych) wyniosła $0,72 \pm 0,12$ dla pianki PGS oraz $0,81 \pm 0,05$ dla pianki PGS/HAp 75/25. Co ciekawe, pory w piance z fazą ceramiczną były bardziej homogeniczne i wykazywały podobny, bardziej sferyczny kształt, w porównaniu do porów referencyjnej pianki polimerowej PGS. Opisane war-

tości przedstawiono w Tabeli 11 oraz na Rysunku 31 w postaci rozkładu wartości.

Parametr	PGS	PGS/HAp 75/25
Po(tot) [%]	78	69,8
Po(op) [%]	78	69,6
Po(cl) [%]	>0,001	0,02
Po.V [mm ³]	216,01	193,39
ESDv [μm]	383 ± 120	304 ± 77
Maj.Dm [μm]	596 ± 271	410 ± 115
Sph [-]	0,81 ± 0,05	0,72 ± 0,12

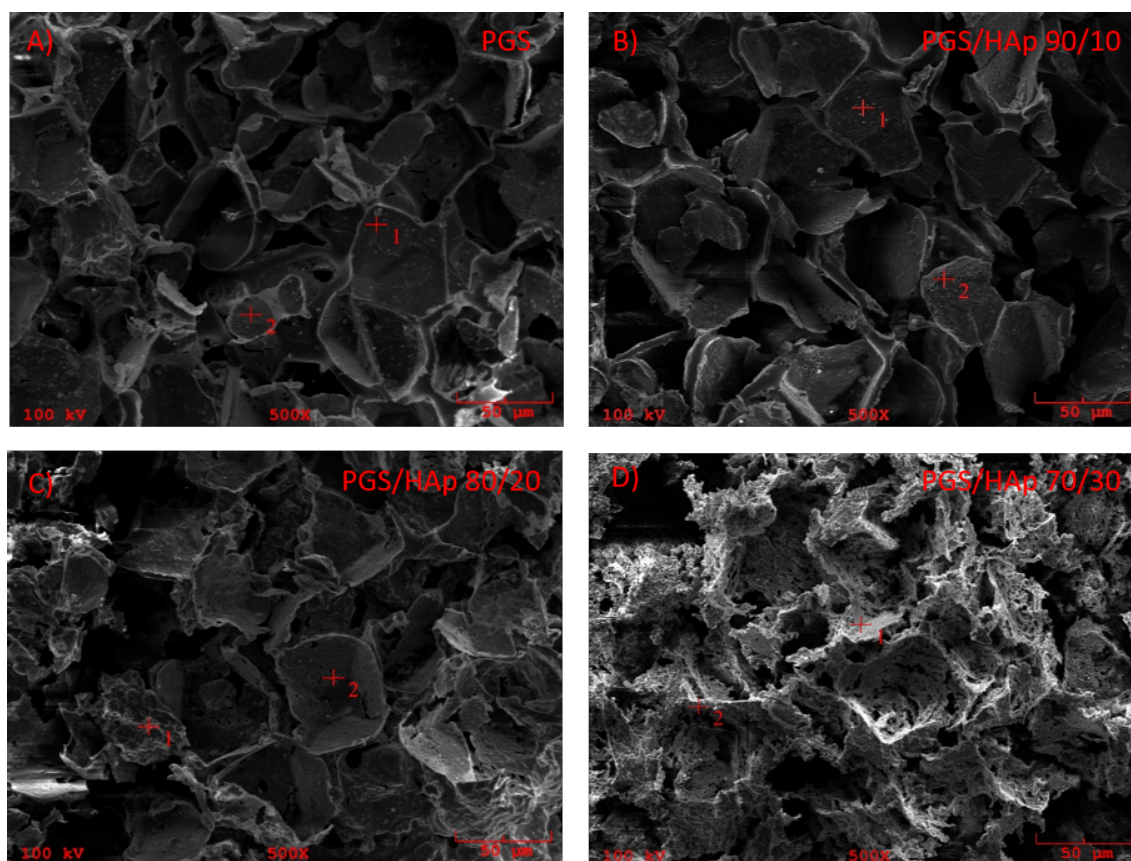
Tabela 11: Charakterystyka porowatości całkowitej, otwartej oraz zamkniętej, jak również objętości porów, ich średniej średnicy, największej średnicy i sferyczności dla pianek PGS oraz PGS/HAp 75/25.

Porowatość zmierzono również alternatywną metodą grawimetryczną na podstawie Równania 1. Na tej podstawie określono, że *scaffolds* sieciowane w 130°C przez 168h posiadały porowatość 79,5% dla PGS, 80,5% dla PGS/HAp 90/10, 80,0% dla PGS/HAp 80/20 oraz 82,6% PGS/HAp 70/30. Jest to wniosek odwrotny niż w przypadku *scaffoldów* opisywanych w badaniu μ -CT, gdyż pianki zawierające HAp posiadają większą porowatość od *scaffoldu* polimerowego. Jest to najprawdopodobniej związane z większym skurczem termicznym podczas krótszego sieciowania w wyższej temperaturze. Nie bez znaczenia pozostaje metodologia pomiarowa i dużo większy potencjał wystąpienia błędu w przypadku techniki grawimetrycznej. Niemniej jednak, porowatość *scaffoldów* polimerowych pozostaje na porównywalnym poziomie ok. 80%.



Rysunek 31: Charakterystyka porowatości badanych kompozytów PGS oraz PGS/HAp 75/25 wyrażona w postaci histogramów jako średnica sfery z aproksymacji objętościowej (ESDv) (A), największa średnica (Maj.Dm) (B) oraz w postaci sferyczności (Sph) (C).

Zobrazowane zostały również *scaffolds* PGS i PGS/HAp zawierające 10, 20 i 30 wt.% HAp, sieciowane w 130°C przez 168h. Na mikrofotografiach SEM, możemy zaobserwować sukcesywną zmianę w morfologii pianki, wraz ze zwiększającą się ilością napełniacza (Rysunek 32). Ściany pianki PGS są gładkie, lecz wraz z coraz większą zawartością ceramiki apatytowej powierzchnia jest bardziej postrzępiona. Możemy zaobserwować sieć połączonych ze sobą porów z mniejszymi otworami w ścianach łączącymi puste sfery ze sobą. Obserwacje te są zgodne ze zmianą morfologii dla pianek sieciowanych w 185°C przez 2,5h opublikowanych [35] i opisywanych powyżej. Co więcej, struktura kompozytu z największą zawartością napełniacza nie posiada wyraźnych granic porów i jest postrzępiona. Podobny efekt strukturalny napełniacza apatytowego został zaobserwowany dla porowatych kompozytów PLLA/HAp [194]. Z coraz to większą ilością HAp pory są mniej sferyczne.



Rysunek 32: Mikrofotografie SEM struktury pianki PGS (A), PGS/HAp 90/10 (B), PGS/HAp 80/20(C) oraz PGS/HAp 70/30 (D) wraz z miejscami pomiarów EDS zaznaczonymi czerwonymi krzyżykami podpisanymi numerem pomiaru. Mikrofotografie zarejestrowano w powiększeniu 500x.

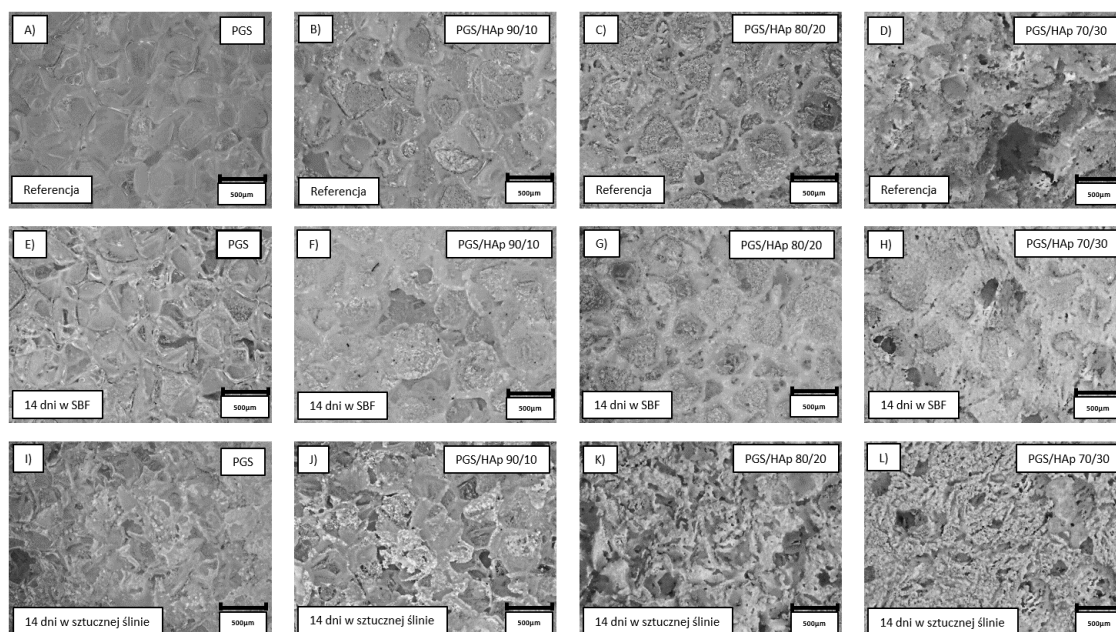
Pomimo iż, nie możemy wyróżnić cząstek apatytu bezpośrednio w matrycy polimerowej, możemy potwierdzić jego obecność pomiarami EDS (Tabela 12) oraz zaobserwować wpływ napelnacza apatytowego na integralność strukturalną *scaffoldów* na mikrofotografiach SEM. Wapń oraz fosfor nie są obecne w pomiarach EDS dla pianki polimerowej, podczas gdy występują w próbkach materiału kompozytowego. Miejsca pomiarów EDS zaznaczone są czerwonymi markerami na Rysunku 32. Na mikrofotografiach SEM cząstki HAp mogły zostać homogenicznie zintegrowane w matrycy na drodze procesu wytwarzania TIPS-TCL-SL.

Scaffoldy PGS i PGS/HAp zawierające 10, 20 i 30 wt.% HAp poddano również obrazowaniu mikroskopem stereoskopowym. Zobrazowano materiał referencyjny oraz po 14 dniach inkubacji w buforze SBF oraz sztucznej ślinie (Rysunek 33). Na podstawie przedstawionych zdjęć wykonane zostały trójwymiarowe rekonstrukcje, które posłużyły do wyznaczenia chropowatości powierzchni i oceny wpływu in-

Próbka	Punkt pomiarowy	C [at.%]	C [wt.%]	O [at.%]	O [wt.%]	P [at.%]	P [wt.%]	Ca [at.%]	Ca [wt.%]
PGS	1	60,6	50,4	39,0	43,2	-	-	-	-
PGS	2	62,5	53,5	37,3	42,5	-	-	-	-
PGS/HAp 90/10	1	66,5	55,0	31,4	34,5	1,0	2,1	0,6	1,6
PGS/HAp 90/10	2	57,0	47,5	41,8	46,4	0,3	0,7	0,5	1,4
PGS/HAp 80/20	1	38,2	31,2	61,0	66,2	0,3	0,5	0,5	1,4
PGS/HAp 80/20	2	32,7	26,5	67,1	72,5	0,1	0,2	0,1	0,3
PGS/HAp 70/30	1	39,0	32,2	60,7	66,9	0,2	0,5	0,1	0,2
PGS/HAp 70/30	2	51,9	43,5	46,4	51,8	0,8	1,7	0,8	2,1

Tabela 12: Waga oraz procent atomowy C, O, P oraz Ca na powierzchni *scaffoldów* na podstawie analizy EDS z dwóch punktów pomiarowych na powierzchni pianek.

kubacji w płynach fizjologicznych na morfologię struktury i procesy degradacyjne. Trójwymiarowe rekonstrukcje oraz wyniki pomiarów chropowatości są dyskutowane w Rozdziale 3,4. Niemniej jednak, struktura materiałów referencyjnych również podlega zniekształceniu pod wpływem zwiększającej się ilości ceramiki apatytowej.

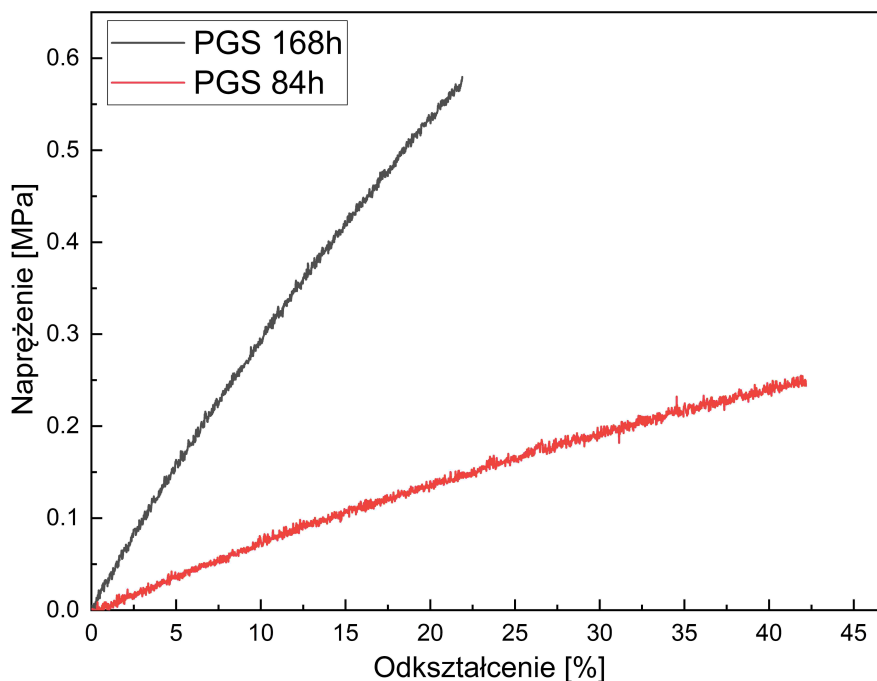


Rysunek 33: Zdjęcia *scaffoldów* PGS oraz PGS/HAp 90/10, PGS/HAp 80/20 i PGS/HAp 70/30 wykonane za pomocą mikroskopu stereoskopowego. Zdjęcia zostały wykonane przed inkubacją (A-D) oraz po 14-dniowej inkubacji w SBF (E-H) i sztucznej ślinie (I-J).

3.3 Analiza statycznych i dynamicznych właściwości mechanicznych *scaffoldów* oraz materiałów litych z PGS i jego kompozytów

3.3.1 Wytrzymałość na zrywanie

W literaturze opisano nieliniowy przebieg krzywej naprężenie-odkształcenie podczas jednoosiowego rozciągania PGS, który jest charakterystyczny dla miękkich elastomerów [1, 2, 50]. Krzywe zebrane podczas ściskania litego PGS zostały przedstawione na Rysunku 34. Reprezentuje on charakterystyczny nieliniowy przebieg opisany powyżej. Przeprowadzona analiza parametrów ukazuje wyższy moduł sprężystości dla próbki sieciowanej dłużej (0,74 MPa dla próbki PGS 84h oraz 2,90 MPa dla próbki PGS 168h). Dodatkowo, najwyższa wytrzymałość na rozciąganie (ang. *ultimate tensile strength*, UTS), jest ponad 2-krotnie wyższa dla próbki sieciowanej przez 168h (0,56 MPa) niż dla polimeru sieciowanego przez 84h (0,25 MPa). W porównaniu z innymi, przedstawionymi w literaturze, testami wytrzymałości na ściskanie sieciowanego termicznie PGS [50], wartość UTS była porównywalna (ok. 0,5 MPa) dla próbek sieciowanych przez 168h. Warto zaznaczyć, że przytoczone powyżej badanie odnosi się do polimeru uzyskanego na drodze syntezy w obniżonym ciśnieniu, a nie konwencjonalnej polikondensacji temperaturowej, jak w niniejszej pracy. Istotnym aspektem analizy właściwości mechanicznych PGS jest fakt, że właściwości polimeru zależą w dużej mierze od obranej ścieżki syntetycznej oraz tzw. *post-processingu* [2], warunkujących stopień polimeryzacji oraz rozgałęzienie. Na podstawie wartości modułu Younga, z prób rozciągania wyznaczono również gęstość usieciowania (zgodnie z Równaniem 3), która przedstawia liczbę aktywnych łańcuchów makrocząsteczkowych w jednostce objętości [168]. Wartość gęstości usieciowania wzrosła z $99,5 \pm 7,3 \text{ mol/m}^3$ dla próbki sieciowanej przez 84h do $389,9 \pm 21,7 \text{ mol/m}^3$ dla próbki sieciowanej przez 168h. Wyznaczone wartości pozostają w tym samym rzędzie wielkości, jak dla sieciowanego termicznie PGS opisywanego w literaturze [6]. Biorąc pod uwagę wartości stopnia usieciowania, możemy potwierdzić postępowanie sieciowania termicznego polimeru wraz z czasem.

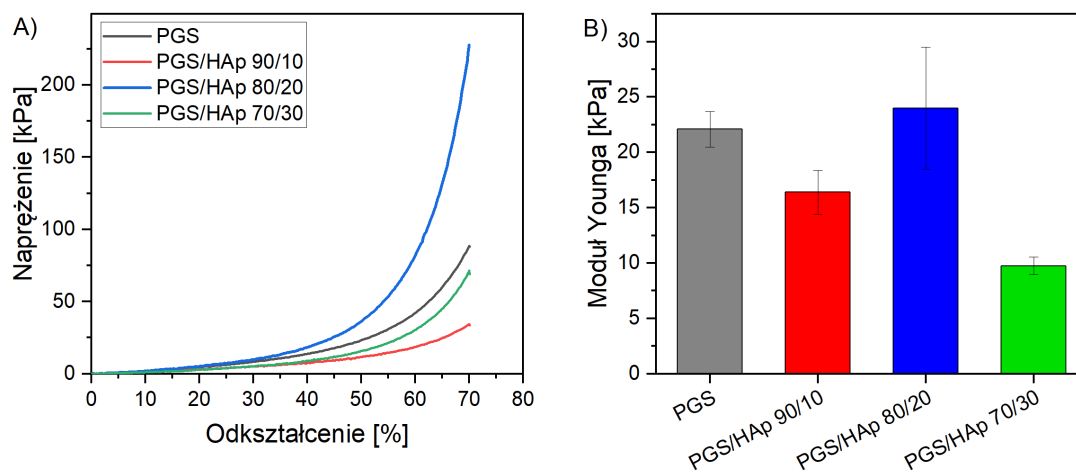


Rysunek 34: Wykres naprężenia od odkształcenia podczas jednoosiowego zrywania statycznego dla próbek z litego PGS.

3.3.2 Wytrzymałość na ściskanie

Pianki polimerowe zawierające 10, 20 i 30 wt.% HAp, sieciowane w 130°C przez 7 dni zostały poddane badaniu jednoosiowego ściskania w 10 cyklach, do odkształcenia 70%. W przebiegu wykresu wyodrębniono liniową zależność naprężenia od odkształcenia dla wszystkich próbek w przedziale pomiędzy 0 a 10%. Po zakończeniu się odcinka liniowego można zaobserwować w przybliżeniu eksponencjalny wzrost wartości spowodowany najprawdopodobniej zagęszczeniem się struktury porowatej materiału [61]. Zakres odkształceń 3-10% wykorzystano do obliczenia modułu ściśliwości (E). Na Rysunku 35 obserwuje się wartości modułów wyliczone dla pierwszego cyklu ściskania. Nie są one proporcjonalne do zawartości napełniacza apatytowego. Dla próbki PGS/HAp 90/10 ($17,1 \pm 2,0$ kPa) wartość była niższa niż dla *scaffoldu* polimerowego PGS ($22,1 \pm 1,6$ kPa). Moduł sprężystości przy ściskaniu dla próbki PGS/HAp 80/20 wynosi $24,0 \pm 5,5$ kPa i jest wyższy niż dla PGS. Natomiast próbka PGS/HAp 70/30 z najwyższą zawartością HAp posiadała najniższą wartość modułu ($9,75 \pm 0,8$ kPa). W literaturze opisywane są przypadki, gdzie dodatek napełniacza wapniowego (lub polimerowego) w kompozycie powoduje zdecydowane

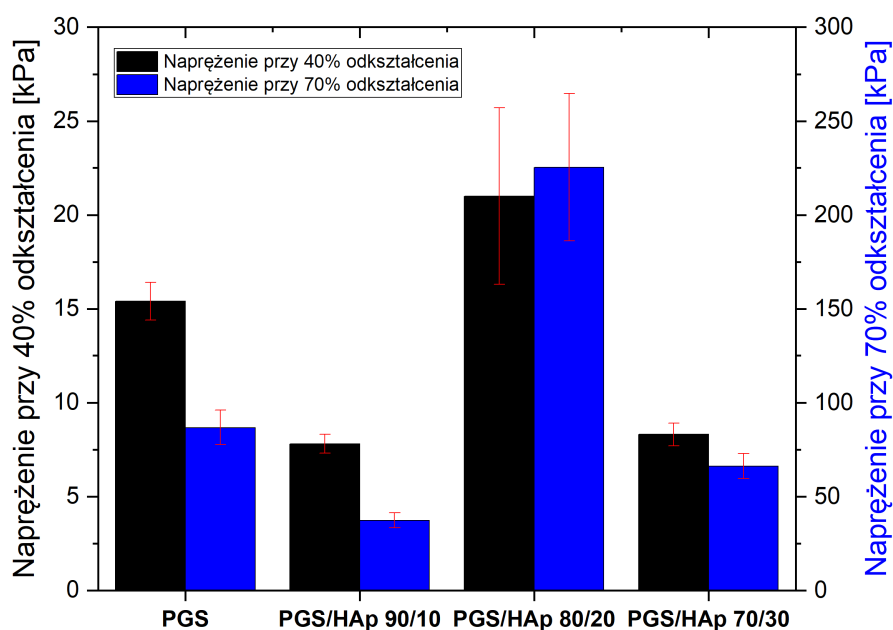
zwiększenie wartości modułu Younga w stosunku do wartości referencyjnej, a większe i mniejsze ilości powodują zmniejszenie wartości modułu [195–197]. W innym badaniu na porowatych kompozytach PLGA/TiO₂, dedykowanych do zastosowania w inżynierii tkankowej, 5% dodatek napełniacza wpłynął na obniżenie wartości modułu sprężystości, a 20% podwyższał jego wartość w stosunku do referencji [198]. Ten efekt jest utożsamiany z porowatością materiału. Wartość porowatości kompozytów PGS/HAp sieciowanych w 130°C przez 168h pozostaje na porównywalnym poziomie co materiałów sieciowanych w 185°C przez 2,5h. W badaniu tomograficznym dla spienionego kompozytu sieciowanego w 185°C przez 2,5h wykazano bimodalną strukturę porów (makropory pochodzące od porogenu oraz mikropory w ściankach), które mogą znacząco wpływać na właściwości mechaniczne [35].



Rysunek 35: Wykres naprężenia od odkształcenia dla pierwszego cyklu ściskania pianek na bazie PGS (A) oraz wyznaczone wartości modułu ścisłości wraz z tolerancjami.

Co więcej, otrzymane wyniki właściwości mechanicznych przekładają się na zmiany w morfologii próbek zobrazonej mikroskopią elektronową SEM przedstawioną w dalszych rozdziałach dyskusji. Pianka z 10% zawartością HAp wykazała najniższą wartość naprężenia przy odkształceniu 70% (3.1 ± 0.3 kPa). Z drugiej strony, zawartość HAp na poziomie 30% również powodowała obniżenie się wartości naprężeń w stosunku do pianki polimerowej PGS. Zobrazowane zmiany w strukturze próbek wynikały najprawdopodobniej ze zwiększonej kruchości materiału, która wraz z niewystarczającą kohezją matrycy z napełniaczem powodowała powstawanie dodatkowych mikroporów.

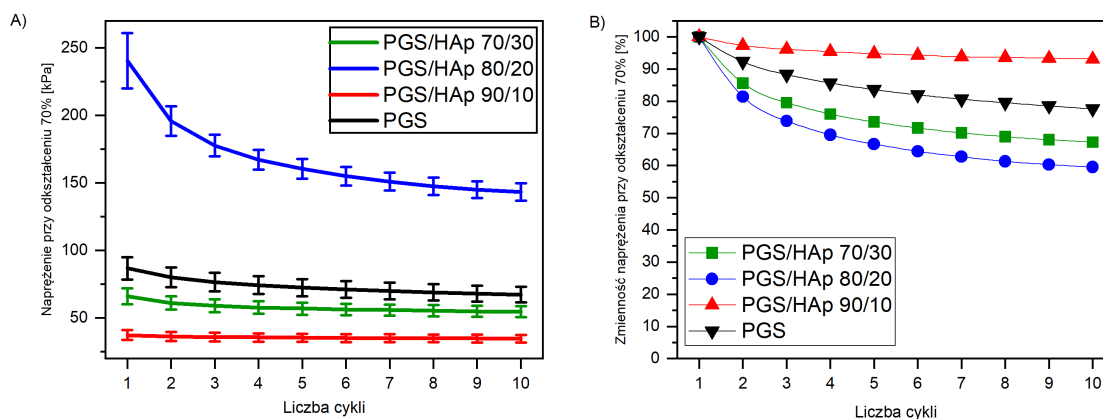
Na Rysunku 36 zestawiono wartości naprężeń przy 40 oraz 70% odkształcenia dla pierwszego cyklu ściskania porowatych *scaffoldów*. Dla obu wartości można zaobserwować ten sam trend. Dla każdej zmierzonej próbki wartości odkształceń przy naprężeniu 70% są wyższe od wartości uzyskanych przy odkształceniu 40% o około rząd wielkości (Rysunek 36). Różnice w wartościach naprężeń są spowodowane opisanym wcześniej zagęszczeniem się struktury porowatej podczas ściskania, jak również rosnącym oporem materiału wraz ze zwiększającym się odkształceniem.



Rysunek 36: Wykres przedstawiający wartości naprężeń przy 40 oraz 70% odkształcenia dla pierwszego cyklu ściskania *scaffoldów*.

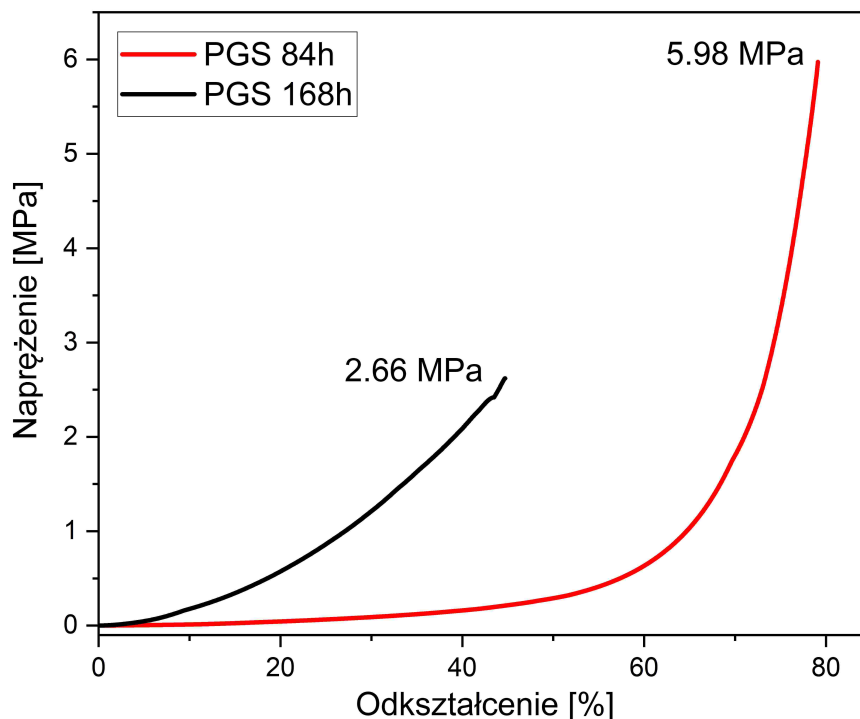
Po dziesięciu cyklach ściskania (Rysunek 37), możemy zaobserwować najwyższe wartości odkształcenia dla próbki PGS/HAp 80/20 ($143,26 \pm 6,39$ kPa). Próbki PGS/HAp 90/10 oraz PGS/HAp 70/30 odznaczały się odkształceniami odpowiednio $34,77 \pm 2,76$ oraz $54,70 \pm 4,04$ kPa, a ich wartości były niższe niż dla referencji ($67,30 \pm 5,79$ kPa). Spadek w wartościach naprężenia przy odkształceniu 70% jest największy po pierwszym cyklu ściskania. Kolejne cykle powodują coraz większe wypłaszczenie się krzywej przedstawionej na Rysunku 37A. Ta obserwacja jest spójna z wynikami uzyskanymi dla cyklicznego ściskania *scaffoldów* na bazie PGS opisanego w literaturze [61]. W niniejszej pracy odkształcano próbkę o 70%, podczas gdy w eksperymencie opisanym w literaturze odkształcenie wynosiło 15%. Na Rysunku 37B pokazano jak zmienia się wartość odkształcenia w funkcji liczby

cykli ściskania. Pomimo iż, próbka PGS/HAp 80/20 początkowo posiadała najwyższe wartości naprężenia, jej wartości ulegały największemu obniżaniu się z każdym kolejnym cyklem.



Rysunek 37: Naprężenie przy odkształceniu 70% dla badanych *scaffoldów* podczas 10 cykli(A) oraz zmienność wartości naprężenia w funkcji cykli(B).

Lite cylindry z PGS również zostały poddane testowi statycznego ściskania jednoosiowego. Na wykresie 38 dla obu materiałów możemy wyróżnić zarówno liniowy segment odkształceń elastycznych, jak i region densyfikacji materiału. Jednakże, dla próbki PGS sieciowanej przez 168h granica tych dwóch segmentów nie jest ostra. Test wytrzymałości na ściskanie wykazał prawie 4-krotny wzrost wartości w modułu Younga - od 0,14 MPa dla PGS 84h do 0,55 MPa dla PGS 168h. W literaturze opisano podobny eksperyment, w którym uzyskane wartości modułu sprężystości przy ściskaniu były o rząd niższe niż prezentowane [61]. W innym przypadku opisywanym literaturowo, lity PGS sieciowany w 130°C w warunkach obniżonego ciśnienia przez 48h, posiadał moduł Younga na poziomie $1,67 \pm 1,15$ MPa [63]. Wspomniana wartość jest 3-krotnie wyższa niż uzyskana dla próbki PGS 168h w niniejszej pracy; nie mniej jednak, błąd pomiaru w literaturze wynosił $\pm 69\%$.



Rysunek 38: Wykres zależności naprężenia od odkształcenia podczas jednoosiowego ściskania statycznego dla próbek z litego PGS.

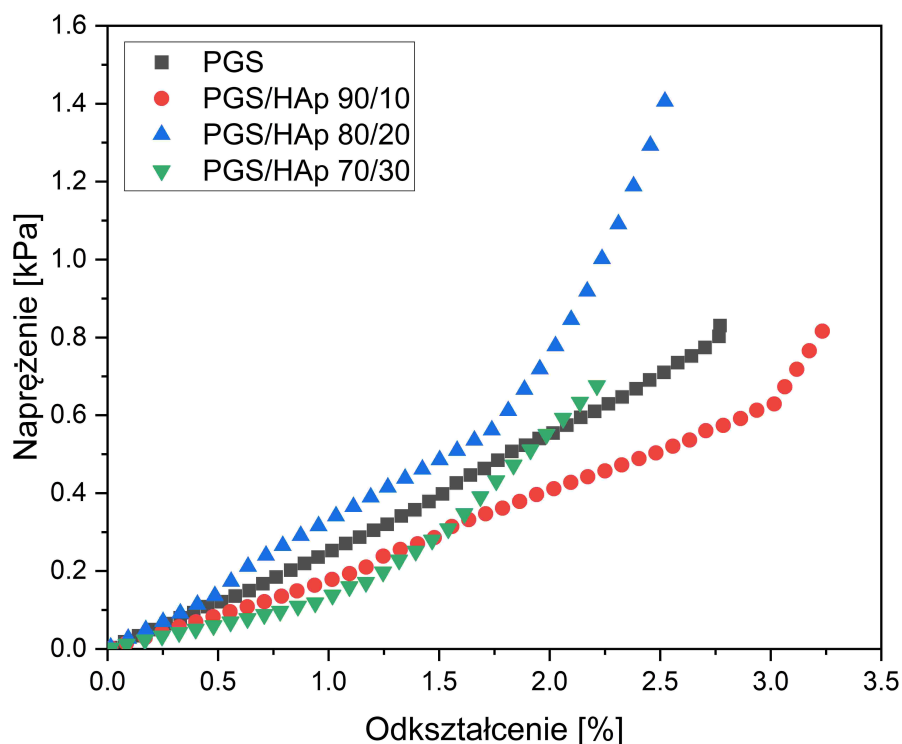
Porównując ze sobą materiał lity i porowaty sieciowane przez 168h w 130°C możemy zauważyć, że wyznaczona wartość modułu Younga jest 25-krotnie wyższa dla materiału litego (550,0 kPa), niż dla porowatego (22,1 kPa). Jeżeli chodzi o maksymalne odkształcenie przy ściskaniu, to materiał porowaty przy 70% odkształcenia posiadał naprężenie ok. 250 kPa, a pomiar był kontynuowany przez 9 cykli. Materiał lity natomiast uległ zniszczeniu przy odkształceniu 45%, a wartość naprężenia w tym punkcie wynosiła 2,66 MPa, czyli ponad 10-krotnie więcej niż materiału porowatego przy 70% odkształcenia.

3.3.3 DMTA

Badanie DMTA materiałów porowatych

Badaniu dynamicznych właściwości mechanicznych zostały poddane *scaffolds* PGS oraz PGS/HAp zawierające 10, 20 i 30 % masowych HAp sieciowane próżniowo przez 168h w 130°C oraz próbki w kształcie cylindrów o średnicy 15 mm i wysokość 8 mm z PGS sieciowane w tych samych warunkach przez 86 i 168h. Materiały porowate zostały poddane przemiataniu odkształceniowemu oraz częstotliwością opisa-

nym w metodologii eksperymentalnej badania DMTA. Celem odzwierciedlenia warunków fizjologicznych badanie zostało przeprowadzone w stałej temperaturze 37°C.

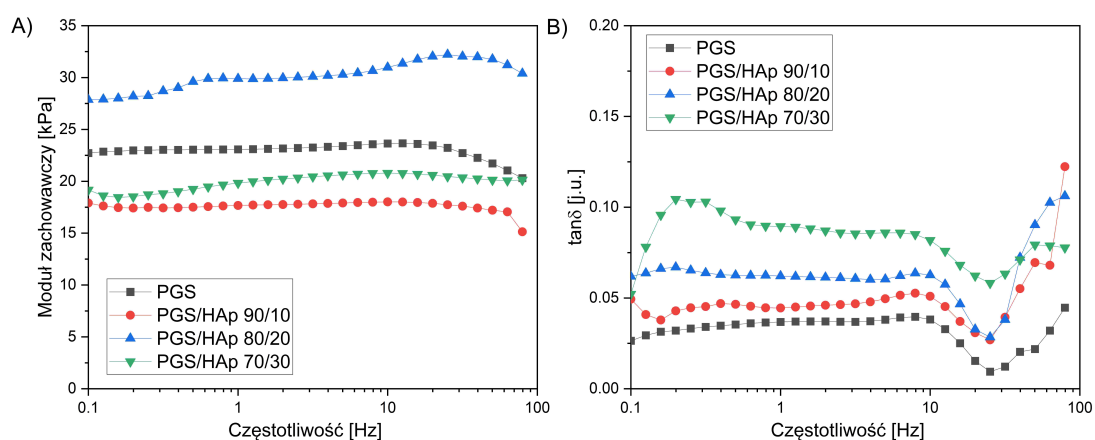


Rysunek 39: Przemiatanie odkształceniowe porowatych *scaffoldów* w badaniu DMTA przy oscylacji na poziomie 1 Hz.

Wykres naprężenia od odkształcenia podczas testu dla materiałów porowatych został przedstawiony na Rysunku 39. Uzyskane wyniki pozwoliły na określenie liniowego zakresu odkształceń lepkosprężystych. Dla materiału porowatego PGS, liniowość wykresu naprężenie-odkształcenie jest zachowana do ok. 3% odkształcenia (180 μm). Dodatek 10% napelnacza nie zmienił zakresu liniowości w sposób znaczący. Natomiast dodatek 20% oraz 30% spowodował obniżenie zakresu liniowości do około 1%, co przekłada się na wysokość ok. 60 μm . Aby przeprowadzić pomiar w zakresie odkształceń lepkosprężystych dla wszystkich próbek, testy przemiatania częstotliwością były przeprowadzane przy amplitudzie odkształceń na poziomie 60 μm .

Wyniki przemiatania częstotliwością są przedstawione na wykresie 40. Wykres 40A przedstawia zależność zachowawczego modułu odkształceń lepkosprężystych (E') od częstotliwości (f), podczas gdy Rysunek 40B przedstawia zależność współczynnika tłumienia ($\tan\delta$) od częstotliwości. Dla wszystkich próbek wartość

E' jest w przybliżeniu stała dla całego zakresu częstotliwości. Fakt ten wskazuje, że dla zadanej amplitudy odkształceń wytworzone materiały są mechanicznie stabilne w szerokim zakresie częstotliwości drgań (od 0,1 do ok. 10 Hz). Niskie wartości $\tan\delta$ dla dużej deformacji (60 μm) potwierdzają elastomeryczną naturę badanych materiałów. Co więcej, na wykresie 40B widoczny jest wzrost wartości $\tan\delta$ proporcjonalny to zawartości napelnacza, co wskazuje na spadek właściwości elastomerycznych wraz ze wzrostem zawartości ceramiki apatytowej. Przeprowadzona analiza DMTA jest zgodna z wynikami wytrzymałości na ściskanie statyczne opisywanymi w podrozdziale dotyczącym wytrzymałości na ściskanie. Z perspektywy właściwości mechanicznych, porowaty materiał PGS/HAp 80/20 posiada największą wytrzymałość mechaniczną spośród wszystkich badanych *scaffoldów*. Jest to potwierdzone zarówno najwyższą wartością E' , jak i najwyższą wartością naprężenia otrzymywaną wraz ze wzrostem amplitudy odkształceń podczas testu przemiatania odkształceniowego. Z drugiej strony, kompozyty zawierające 10 i 30% HAp charakteryzują się wytrzymałością, która jest nieznacznie mniejsza od próbki referencyjnej.



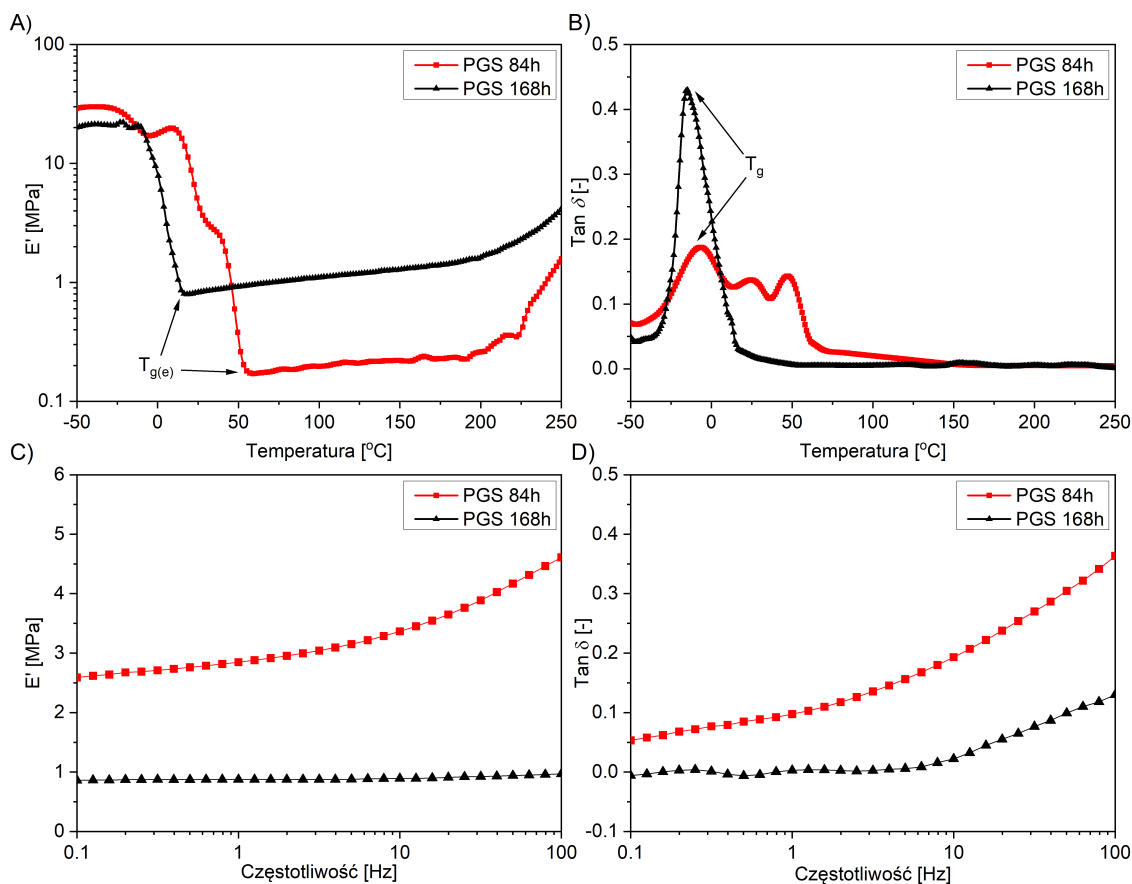
Rysunek 40: A) Moduł zachowawczy oraz B) $\tan\delta$ w badaniu DMTA przemiatania częstotliwością porowatych *scaffoldów*.

Badanie DMTA materiałów litych

Analiza DMTA litego PGS syntezowanego tą samą metodą oraz sieciowanego w tych samych warunkach, co *scaffolds* przedstawione powyżej, pozwoliła na zbadanie jego dynamicznych właściwości mechanicznych. Analizie poddane zostały lite próbki z PGS sieciowane przez 84h oraz 168h. Dla obydwu badanych materiałów wykonano przemiatanie temperaturowe (Rysunek 41) w zakresie odkształceń lepko-

sprężystych. W literaturze, podobne eksperymenty były zazwyczaj wykonywane w niższych temperaturach (od ujemnych wartości do maksymalnie 60°C) w celu zarejestrowania przejścia szklistego [24, 199, 200]. W przeprowadzonym badaniu uwaga została poświęcona przebiegowi krzywych w wyższych temperaturach (badanie w zakresie od -50 do 250°C), niż dla materiałów porowatych (badanie izotermiczne w 37°C) w celu zaobserwowania zmian zachodzących podczas sieciowania termicznego. Zakładając zastosowanie badanego materiału w inżynierii tkankowej, poznanie jego dynamicznej charakterystyki mechaniczno-termicznej jest istotnym zagadnieniem.

Na Rysunku 41A przedstawiono przebieg modułu zachowawczego E' w funkcji temperatury. Wybrane parametry wyznaczone z wykresu $E'(T)$ zostały zestawione w Tabeli 13. W początkowej temperaturze pomiaru (-50°C) obydwa badane materiały były w stanie szklistym. Wartości modułów zachowawczych osiągały wartości maksymalne na poziomie 20-30 MPa. Po osiągnięciu temperatury w okolicy -25°C obserwujemy początek przejścia szklistego, które objawia się znaczącym obniżeniem w wartości modułu E' . W przypadku próbki sieciowanej przez 168h obniżenie się wartości na wykresie jest gwałtowne i jednoznaczne, a dla próbki sieciowanej przez 84h jest kilkustopniowe i rozciągnięte w dłuższym czasie. Natura przejścia szklistego jest zobrazowana przez przebieg wykresu $\tan\delta$ w funkcji temperatury (Rysunek 41B).



Rysunek 41: Przebieg zmian w wartości E' i $\tan \delta$ w funkcji temperatury (A,B) oraz podczas przemiatania częstotliwością (C,D) dla litych cylindrów wykonanych z PGS sieciowanych przez 84 i 168h.

Różnice w stopniu usieciowania materiałów są wyraźnie widoczne na Rysunku 41A. Wartość modułu zachowawczego przy końcu przejścia szklistego ($T_{g(e)}$) jest około 4-krotnie wyższa dla próbki PGS 168h, niż dla PGS 84h. Trend wzrostowy przebiegu funkcji $E'(T)$ jest również interesującym fragmentem wykresu, który wskazuje na dalsze sieciowanie materiału, intensyfikujące się szczególnie powyżej 200°C.

Testy przemiatania częstotliwością zostały wykonane celem zbadania efektu oscylacji na własności lepkosprężyste litego PGS. Na Rysunkach 41C i D ukazane są wartości E' oraz $\tan \delta$ w funkcji zmiennej częstotliwości. Również w Tabeli 13 przedstawione jest porównanie wartości zmierzonych parametrów dla częstości 1 oraz 10 Hz. Wartości modułu zachowawczego dla PGS 168h są względnie stałe. Jednakże, dla próbki PGS 84h, funkcja posiada delikatny trend wzrostowy. Dla próbki sieciowanej krócej, współczynnik tłumienia rośnie w całym badanym zakresie, a dla próbki PGS 168h zaczyna rosnać dopiero od częstotliwości ok. 10 Hz. Wzrost $\tan \delta$ wskazuje

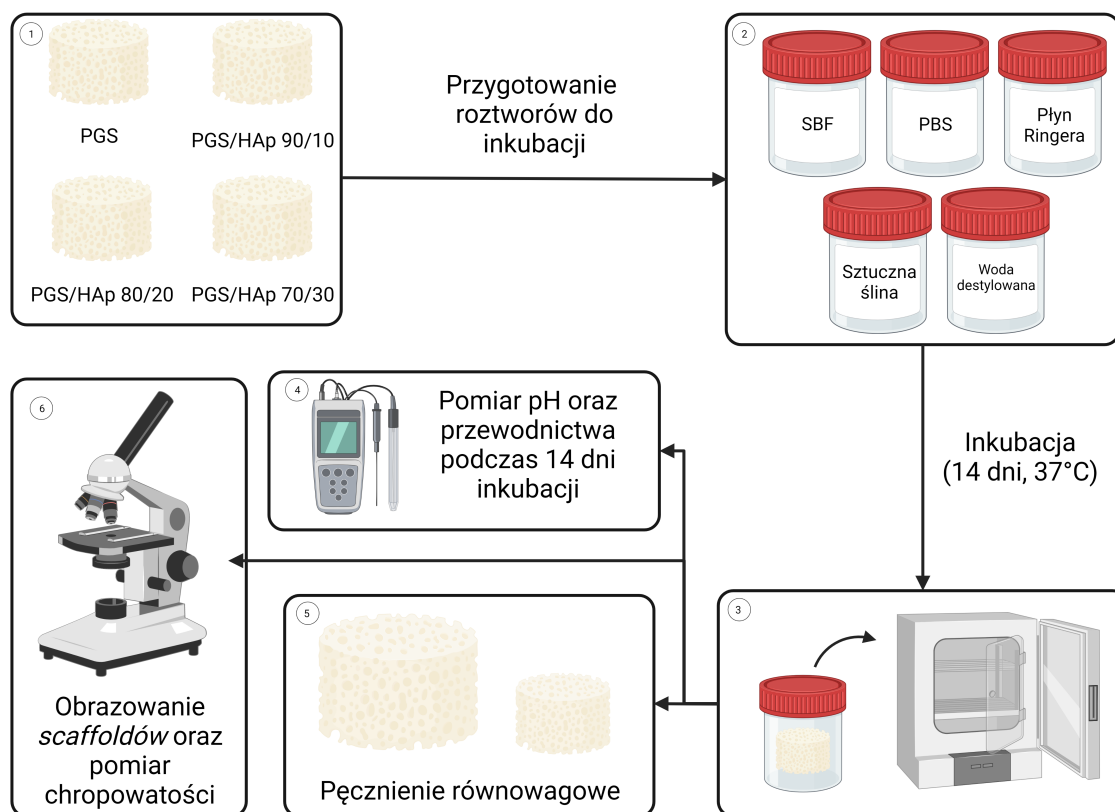
na zwiększanie się wartości modułu stratności (E''), a zatem również lepkiej natury materiału. Podobny efekt obserwujemy w przypadku biomateriałów na bazie uretanowej pochodnej PGS (PGSU), co opisano w literaturze [21, 24, 199]. Podsumowując przedstawione powyżej wyniki, wyższy stopień usieciowania umożliwia otrzymywanie materiałów sztywniejszych oraz mniej podatnych na odkształcenia plastyczne. Właściwości te są pożądane w inżynierii tkankowej w dynamicznym środowisku [21].

Próbka	Przemiatanie temperaturą				Przemiatanie częstotliwością			
	E' [MPa] przy $T_{g(e)}$	E' [MPa] w 250°C	$T_{g(e)}$ [°C]	T_g [°C]	E' [MPa] przy 1 Hz	E' [MPa] przy 10 Hz	Tanδ [-] przy 1 Hz	Tanδ [-] przy 10 Hz
PGS 84h	0,18	1,57	55,2	-19,7	2,85	3,36	0,097	0,193
PGS 168h	0,89	4,05	14,2	-25,6	0,88	0,89	0,002	0,022

Tabela 13: Właściwości termomechaniczne litego PGS z pomiarów DMTA.

3.4 Inkubacja *scaffoldów* w buforach fizjologicznych

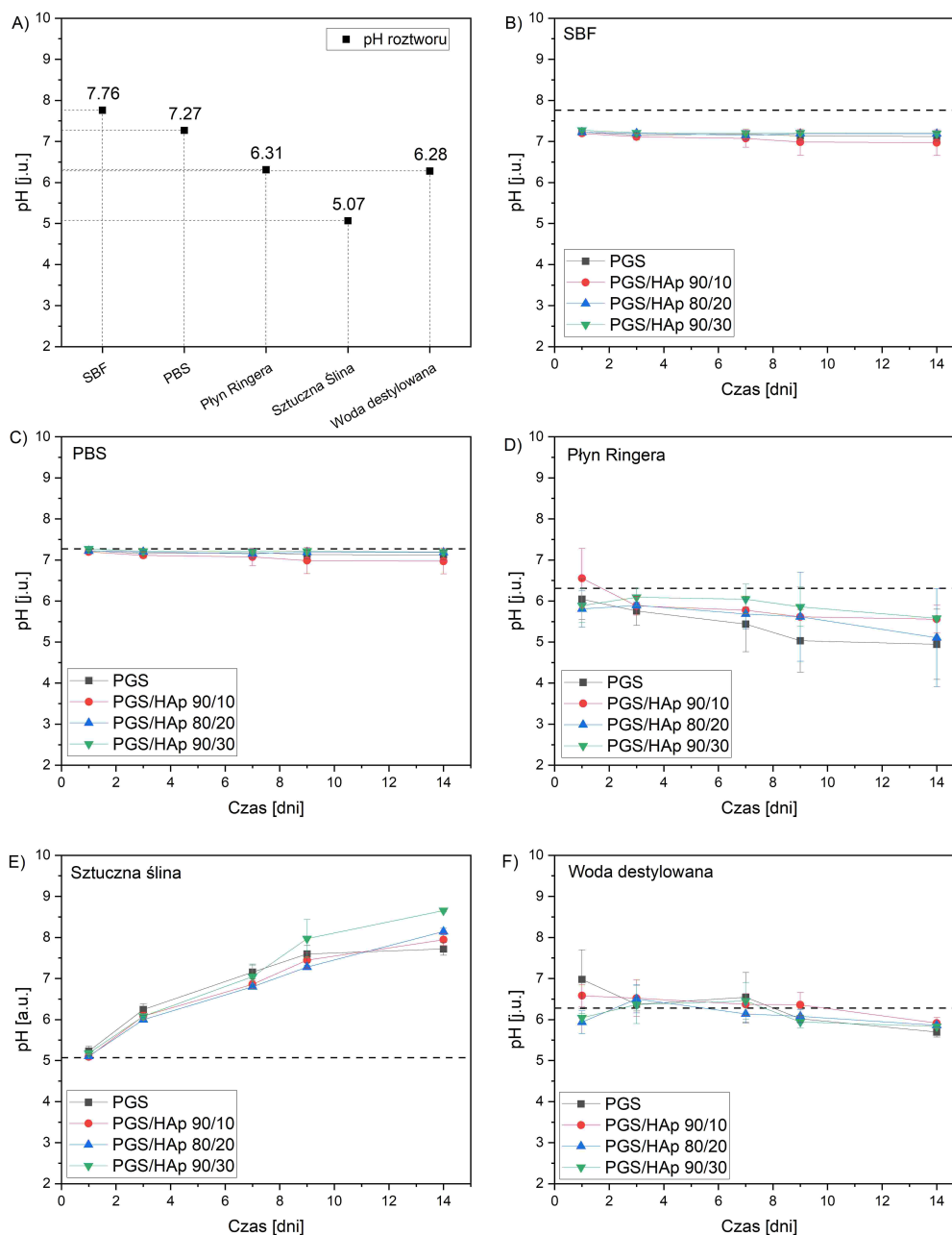
Schemat eksperymentu dotyczącego inkubacji przedstawiono na Rysunku 42. Podczas 14 dniowej inkubacji w SBF, PBS, płynie Ringera, sztucznej ślinie oraz wodzie destylowanej, biomateriały były poddane pomiarom pęcznienia równowagowego, a roztwory inkubacyjne pomiarom pH oraz przewodnictwa. Po inkubacji dokonano obrazowania powierzchni pianek oraz pomiarów chropowatości na podstawie rekonstrukcji 3D fotografii dwuwymiarowych.



Rysunek 42: Schemat eksperymentu dotyczącego inkubacji pianek PGS oraz kompozytowych PGS/HAp 90/10, PGS/HAp 80/20 i PGS/HAp 70/30. Schemat utworzony za pomocą BioRender.com

3.4.1 Pomiary pH oraz przewodnictwa

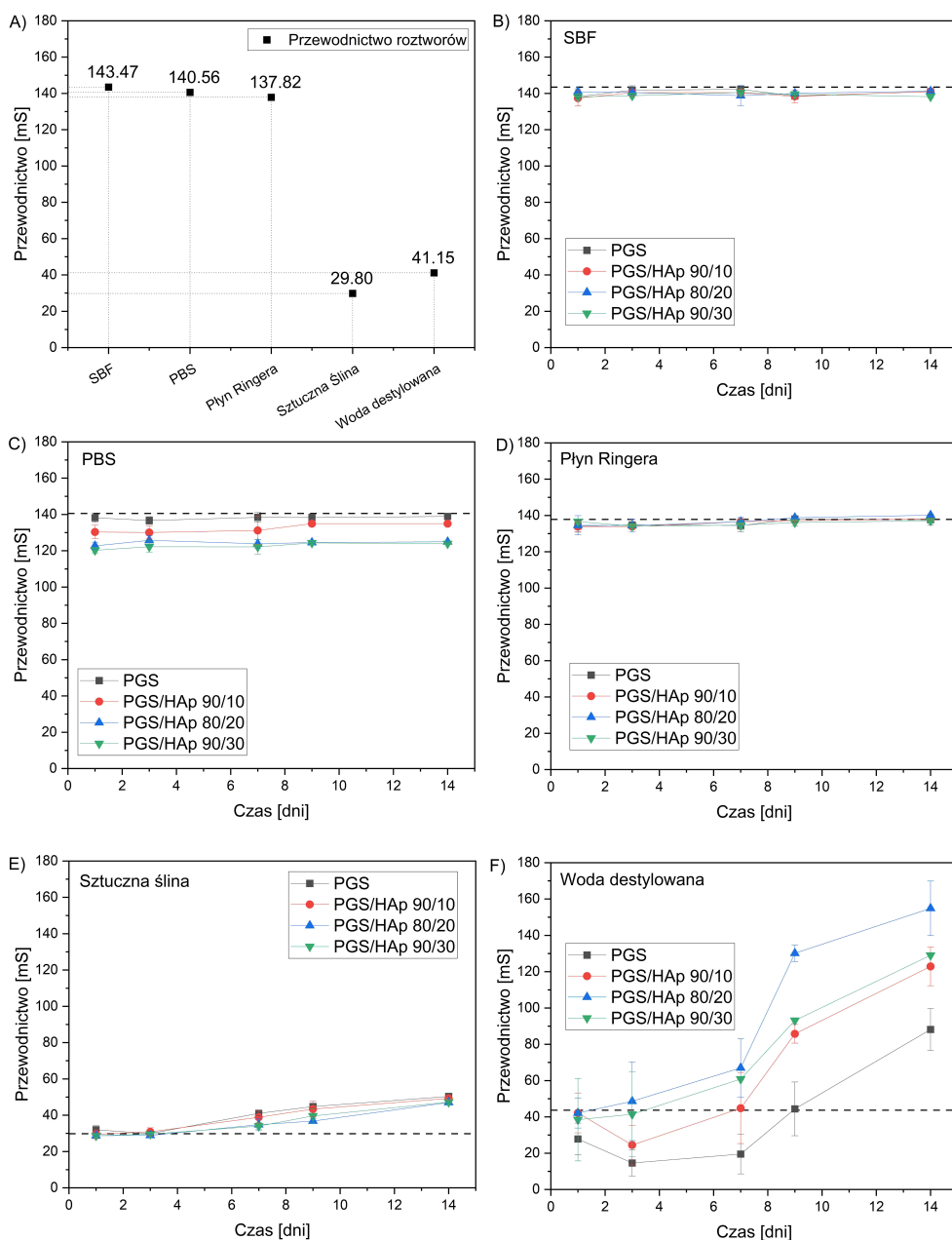
Podczas inkubacji *scaffoldów* w roztworach fizjologicznych zmierzono zmiany pH (Rysunek 43) oraz przewodnictwa (Rysunek 44) po upływie 1, 3, 7, 9 oraz 14 dni. Do badania wykorzystano *scaffoldy* PGS oraz PGS/HAp zawierające 10, 20 i 30 wt.% napelnacza, które były sieciowane w 130°C przez 168h. Wartości referencyjne buforów wynosiły odpowiednio 7,76 dla SBF, 7,27 dla PBS, 6,31 dla płynu Ringera, 5,07 dla sztucznej śliny i 6,28 dla wody destylowanej. W czasie inkubacji, wartości pH praktycznie nie uległy zmianie dla SBF oraz PBS. W płynie Ringera wartości pH uległy obniżeniu do 4,9 dla PGS, 5,56 dla PGS/HAp 90/10, 5,1 dla PGS/HAp 80/20 i 5,58 dla PGS/HAp 70/30 po 14 dniach. Obniżenie wartości było największe dla *scaffoldów* PGS oraz PGS/HAp 80/20.



Rysunek 43: Wartości referencyjne pH użytych buforów (A) oraz przebieg zmian w wartości pH podczas 14-dniowej inkubacji w SBF (B), PBS (C), płynie Ringera (D), sztucznej ślinie (E) oraz w wodzie destylowanej (F) dla *scaffoldów* PGS oraz PGS/HAp zawierających 10, 20 i 30 wt.% napęlniacza.

Odwrotny efekt, mianowicie przyrost wartości pH w czasie, zanotowano w roztworze sztucznej śliny. Wartości pH wzrosły odpowiednio do wartości 7,7 dla PGS, 7,9 dla PGS/HAp 90/10, 8,1 dla PGS/HAp 80/20 i 8,7 dla PGS/HAp 70/30. Były to największe przyrosty ze wszystkich badanych buforów. Jedną z przyczyn takiego zjawiska może być wyjściowe lekko kwasowe pH roztworu referencyjnego (5,07), które

mogło katalizować proces polimeru. Dodatkowo, uwalniające się w procesie jony również mogły mieć wpływ na dalsze zmiany pH. Podczas inkubacji mogło również dojść do częściowego wymywania się HAp z matrycy polimerowej. Pomimo jego słabej rozpuszczalności, roztwór mógł nabrać dodatkowego charakteru zasadowego [201]. W Wodzie destylowanej zanotowano nieznaczne obniżenie się pH w stosunku do wartości referencyjnej czystego płynu.



Rysunek 44: Wartości referencyjne przewodnictwa użytych buforów (A) oraz przebieg zmian w wartości przewodnictwa podczas 14-dniowej inkubacji w SBF (B), PBS (C), płynie Ringera (D), sztucznej ślinie (E) oraz w wodzie destylowanej (F) dla *scaffoldów* PGS oraz PGS/HAp zawierających 10, 20 i 30 wt.% napełniacza.

Wartości przewodnictwa zmieniają się wraz ze stężeniem jonów podczas inkubacji w buforach imitujących środowisko fizjologiczne [202]. Zmierzone wartości przewodnictwa dla roztworów referencyjnych wynosiły 143,5 mS dla SBF, 140,6 mS dla PBS, 137,8 mS dla płynu Ringera, 29,8 mS dla sztucznej śliny oraz 41,2 mS dla wody destylowanej. Wartości przewodnictwa były praktycznie niezmiennie w ciągu 14 dni dla SBF oraz płynu Ringera. W PBS pomiary były również stabilne, jednak zawierały się nieznacznie poniżej wartości referencyjnej dla samego buforu. W sztucznej ślinie przewodnictwo uległo nieznacznemu wzrostowi (od ok. 30 do ok. 50 mS dla wszystkich materiałów). W wodzie destylowanej natomiast, zaobserwowano największą zmienność wartości. Wzrosty wartości przewodnictwa w wodzie wynosiły nawet 400% (dla PGS/HAp 80/20). Tak skokowy przyrost wartości może być skorelowany z niską siłą jonową wyjściowego roztworu, która jest zaburzana przez obecność jakichkolwiek nowych elektrostatycznie nacechowanych cząstek w roztworze [203].

3.4.2 Pęcznienie równowagowe

Pęcznienie równowagowe dla *scaffoldów* PGS, PGS/HAp 90/10, PGS/HAp 80/20 oraz PGS/HAp 70/30 zostało wyznaczone z wykorzystaniem równania 5 i przedstawione na Rysunku 45. Korespondujące wartości S_e oraz τ zostały zebrane w Tabeli 14 oraz 15.

Płyn fizjologiczny	S_e [%]			
	PGS	PGS/HAp 90/10	PGS/HAp 80/20	PGS/HAp 70/30
SBF	488,7 ± 3,7	441,0 ± 8,0	646,9 ± 9,6	166,7 ± 4,7
PBS	335,3 ± 14,1	465,5 ± 15,9	390,4 ± 4,7	236,7 ± 7,9
Płyn Ringera	211,1 ± 6,5	160,2 ± 7,1	61,5 ± 0,9	43,4 ± 0,9
Sztuczna ślina	536,2 ± 19,3	319,6 ± 15,9	562,7 ± 3,5	530,1 ± 10,6
Woda	253,7 ± 8,4	452,1 ± 7,8	436,2 ± 6,0	351,9 ± 7,3

Tabela 14: Wartości współczynnika pęcznienia równowagowego S_e wyznaczonego dla *scaffoldów* PGS oraz PGS/HAp z zawartościami 10, 20 oraz 30 wt.% HAp w płynach fizjologicznych (SBF, PBS, płyn Ringera, sztuczna ślina oraz woda).

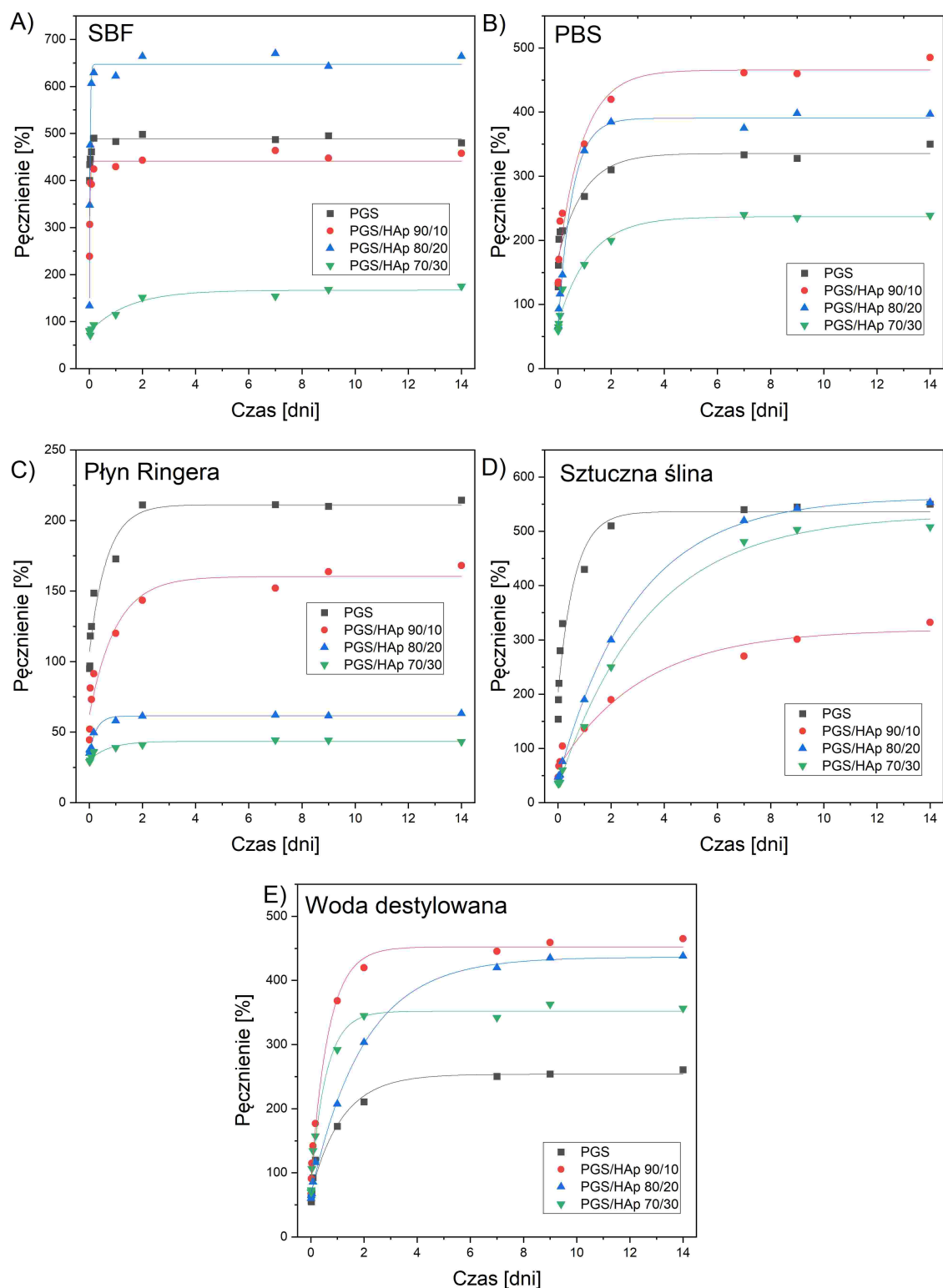
Pomiary pęcznienia równowagowego wykonano w tych samych roztworach fizjologicznych, co pomiary zmiany pH oraz przewodnictwa (SBF, PBS, płyn Ringera, sztuczna ślina i woda destylowana). Bazując na pomiarach pH oraz przewodnictwa, możemy podzielić roztwory na 3 grupy. Pierwszą grupę, w której wartości pH oraz przewodnictwa nie zmieniły się w sposób istotny (G1: SBF i PBS). Drugą grupę, w

	τ [minuty]			
	PGS	PGS/HAp 90/10	PGS/HAp 80/20	PGS/HAp 70/30
SBF	$0,05 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$	$1,46 \pm 0,32$
PBS	$0,94 \pm 0,38$	$0,92 \pm 0,23$	$0,53 \pm 0,05$	$1,17 \pm 0,24$
Płyn Ringera	$0,66 \pm 0,23$	$0,99 \pm 0,33$	$0,26 \pm 0,06$	$0,73 \pm 0,27$
Sztuczna ślina	$0,63 \pm 0,21$	$3,20 \pm 0,72$	$2,91 \pm 0,07$	$3,39 \pm 0,25$
Woda	$1,17 \pm 0,23$	$0,65 \pm 0,08$	$1,98 \pm 0,13$	$0,57 \pm 0,09$

Tabela 15: Wartości stałej szybkości procesu pęcznienia (τ) wyznaczonego dla *scaffoldów* PGS oraz PGS/HAp z zawartościami 10, 20 oraz 30 wt.% HAp w płynach fizjologicznych (SBF, PBS, płyn Ringera, sztuczna ślina oraz woda).

której wartość pH spadała z czasem inkubacji, lecz wartość przewodnictwa nie uległa zmianie (G2: płyn Ringera) oraz grupę trzecią, w której zarówno pH, jak i przewodnictwo zmieniano się w sposób istotny (G3: sztuczna ślina i woda destylowana). Ten podział pozwoli na łatwiejszą interpretację wyników pęcznienia równowagowego.

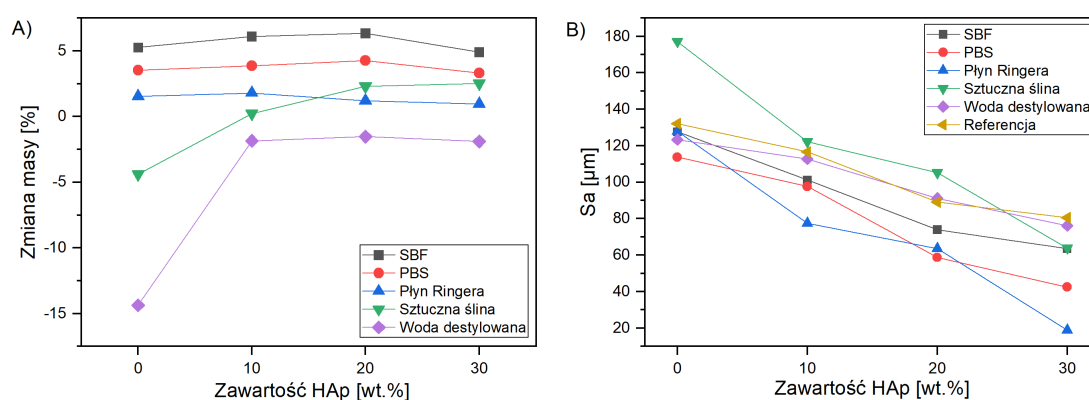
W G1, materiałem wykazującym najniższą wartość pęcznienia równowagowego był PGS/HAp 70/30 z wartością $S_e = 166,7\%$ w SBF oraz $236,7\%$ w PBS. Warto nadmienić, że w buforze SBF za wyjątkiem próbki PGS/HAp 70/30 wszystkie pozostałe materiały posiadały najniższą wartość współczynnika τ spośród wszystkich mierzonych roztworów. Implikuje to najszybszą kinetykę pęcznienia właśnie w SBF. W płynie Ringera (G3) wartości S_e były najniższe spośród wszystkich płynów fizjologicznych i malały wraz z zawartością napelnacza apatytowego (od 211% dla PGS aż do 43% dla PGS/HAp 70/30). W sztucznej ślinie możemy zaobserwować najwyższe wartości współczynnika τ (oprócz *scaffoldu* polimerowego). Wskazuje to najwyższy czas potrzebny do osiągnięcia wartości pęcznienia równowagowego (wartości wynosiły odpowiednio 3,20 dla PGS/HAp 90/10, 2,91 dla PGS/HAp 80/20 i 3,39 dla PGS/HAp 70/30). Wykorzystanie wody destylowanej jako jednego z płynów inkubacyjnych wyeliminowała obecność jonów, a co za tym idzie zakłócenia pomiaru z nich wynikające. W H_2O PGS wykazywał najniższą wartość S_e (211%), a PGS/HAp 90/10 najwyższą (452%). W G3 nie można zaobserwować bezpośrednich zależności pomiędzy wartością pH, przewodnictwem, a wartościami S_e .



Rysunek 45: Zależność pęcznienia *scaffoldów* PGS, PGS/HAp 90/10, PGS/HAp 80/20 oraz PGS/HAp 70/30 w funkcji czasu w SBF (A), PBS (B), płynie Ringera (C), sztucznej ślinie (D) oraz wodzie destylowanej (E).

3.4.3 Morfologia *scaffoldów* po inkubacji

Zmiana masy *scaffoldów* przed i po inkubacji jest przedstawiona na Rysunku 46A. Co ciekawe, na wykresie możemy zaobserwować przyrost masy dla wszystkich pianek inkubowanych w SBF, PBS oraz płynie Ringera. Wskazuje to na depozycję nowych cząstek HAp lub odkładanie się kryształów soli obecnych w badanych roztworach. W przypadku pianki polimerowej PGS, HAp nie jest obecny, na co wskazuje przyrost masy odbywający się na skutek depozycji soli z roztworów inkubacyjnych.

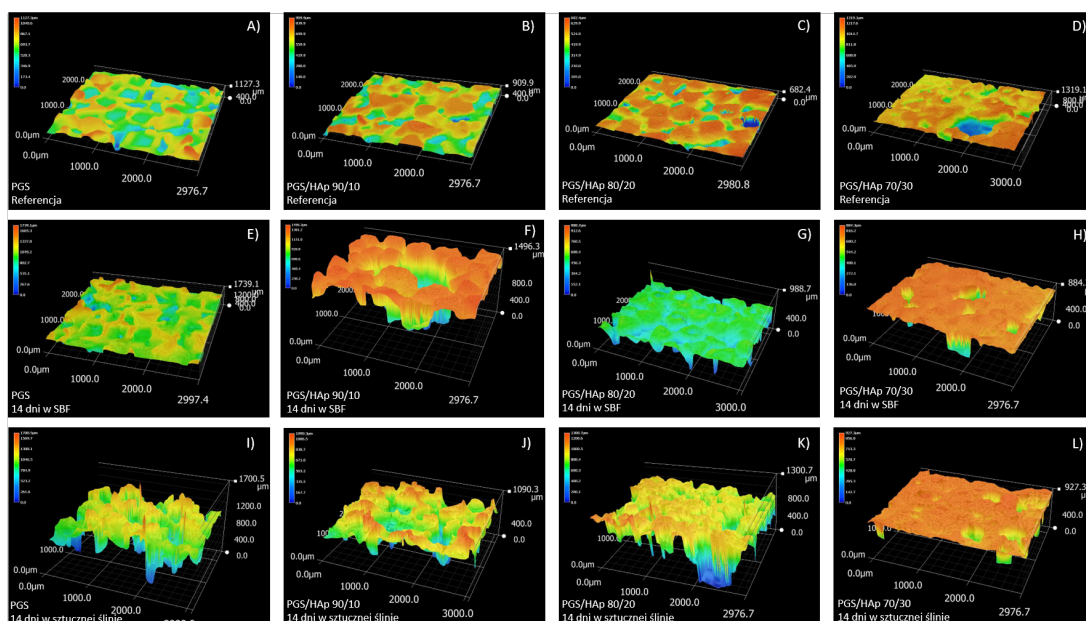


Rysunek 46: Zmiana masy *scaffoldów* po 14-dniowej inkubacji w SBF, PBS, płynie Ringera, sztucznej ślinie oraz wodzie destylowanej (A) oraz wartość chropowatości powierzchni próbek referencyjnych przed inkubacją oraz pianek po inkubacji w ww. płynach (B). Chropowatość została wyznaczona jako średnia arytmetyczna wysokości na badanym obszarze (S_a) i przedstawiona w funkcji ilości napełniacza w próbce.

Ta hipoteza jest potwierdzona przez obniżenie się wartości masy dla wszystkich próbek inkubowanych w wodzie destylowanej, która nie zawiera statystycznie istotnego stężenia jonów. Wzrost wartości pH podczas inkubacji w sztucznej ślinie był największy ze wszystkich badanych układów. Wskazuje to na wystąpienie procesów degradacyjnych dla wszystkich badanych materiałów właśnie w tym roztworze. Jest to pośrednio potwierdzone przez spadek masy pianki polimerowej PGS w sztucznej ślinie o ok.5%. Dla próbek inkubowanych w ślinie zawierających napełniacz apatytowy nastąpił przyrost masy. Ponownie, najbardziej prawdopodobnym wyjaśnieniem jest krystalizacja soli z roztworu po wysuszeniu próbek.

Pomiar chropowatości został wykonany na podstawie trójwymiarowych rekonstrukcji, z których niektóre zostały przedstawione na Rysunku 47. Bazą do wykona-

nia ww. rekonstrukcji były zdjęcia 2D przedstawione na Rysunku 33. Po 14-dniowej inkubacji w buforze SBF widoczna jest depozycja dodatkowych warstw na powierzchni powodująca jej wypłaszczenie, a co za tym idzie spadek chropowatości omawiany powyżej. Natomiast w przypadku sztucznej śliny czyli roztworu, w którym najprawdopodobniej zachodziła częściowa degradacja *scaffoldów*, morfologia powierzchni wydaje się być bardziej postrzępiona i mniej powtarzalna. Wyjątkiem jest próbka PGS/HAp 70/30, dla której możemy zanotować ewidentne obniżenie się wartości chropowatości i depozycję dodatkowych warstw.



Rysunek 47: Trójwymiarowe rekonstrukcje powierzchni pianek PGS, PGS/HAp 90/10, PGS/HAp 80/20 oraz PGS/HAp 70/30 przed inkubacją (A-D) oraz po 14-dniowej inkubacji w SBF (E-H) i sztucznej ślinie (I-L). Topografia powierzchni została uzyskana w trybie rekonstrukcji 3D zdjęć z mikroskopu optycznego ze 100x powiększeniem.

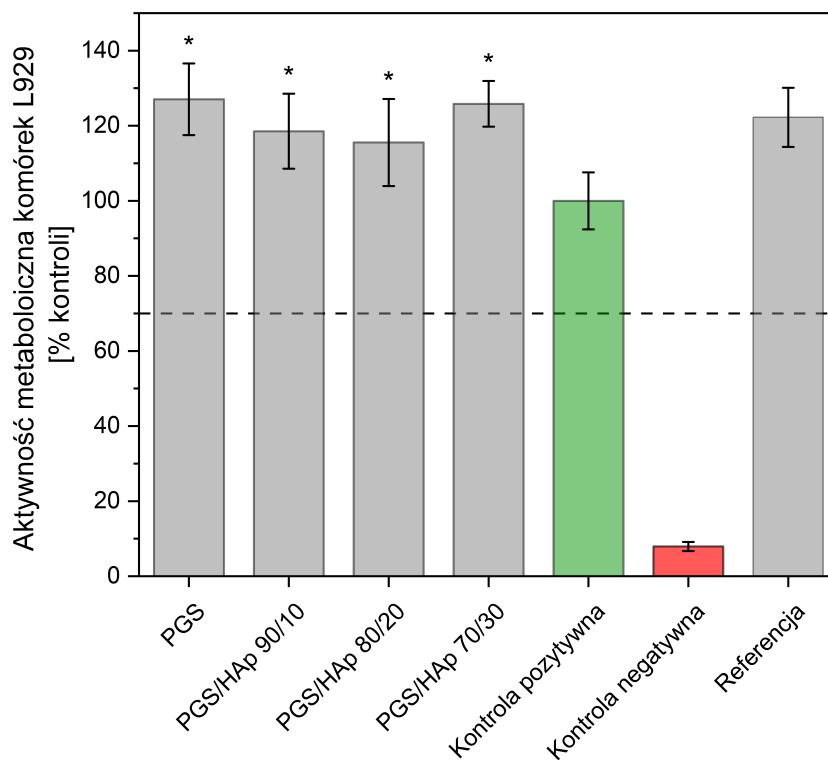
Zmiany w morfologii powierzchni podczas inkubacji są zobrazowane chropowatością powierzchni pianek (Rysunek 46B). Dla próbek referencyjnych (przed inkubacją) możemy zaobserwować obniżenie się chropowatości wraz ze wzrostem ilości napełniacza ceramicznego: 132 µm dla PGS, 116 µm dla PGS/HAp 90/10, 89 µm dla PGS/HAp 80/20 i 81 µm dla PGS/HAp 90/30. Możemy zaobserwować obniżenie się wartości chropowatości wraz ze wzrostem stężenia masowego HAp dla wszystkich badanych materiałów we wszystkich płynach inkubacyjnych. Warto zauważyć, że wartości chropowatości materiału referencyjnego praktycznie nakładają się z warto-

ściami otrzymanymi po inkubacji w wodzie destylowanej. Co więcej, sztuczna ślina była jedynym środowiskiem, w którym wartość chropowatości była większa w stosunku do materiału referencyjnego. Jest to kolejna przesłanka wskazująca właśnie roztwór sztucznej śliny jako ten, w którym dochodziło do wyraźnej degradacji *scaffoldów*. Dla pozostałych płynów fizjologicznych (SBF, PBS oraz płyn Ringera) wartości Sa były niższe w porównaniu do wartości referencyjnych. Wnioskując z obniżenia wartości parametru opisującego chropowatość, odkładanie się dodatkowych warstw powinno być miejsce dla ww. układów.

3.5 Cytozgodność i wpływ na komórki kostne

3.5.1 Cytokompatybilność

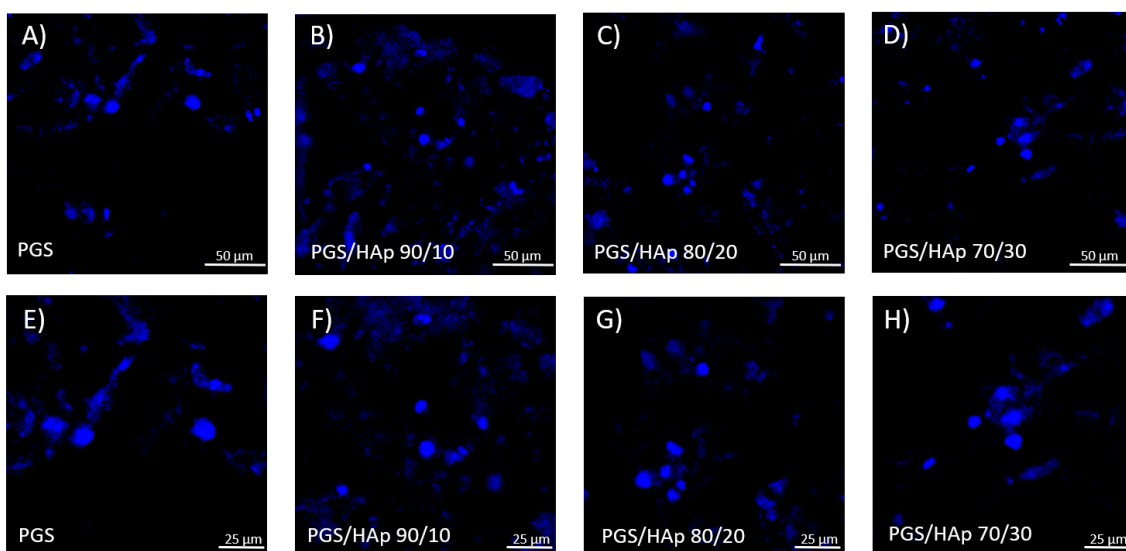
Jak przedstawiono na Rysunku 48, aktywność metaboliczna fibroblastów mysich L929 po ekspozycji na pianki PGS, PGS/HAp 90/10, PGS/HAp 80/20 i PGS/HAp 70/30 wynosiła odpowiednio $127,0\% \pm 10,2\%$, $118,5\% \pm 10,6\%$, $115,6\% \pm 12,4\%$ oraz $125,8\% \pm 6,5\%$, co oznacza, że wszystkie *scaffolds* cechuje wysoki poziom cytozgodności z referencyjną linią komórek L929.



Rysunek 48: Aktywność metaboliczna fibroblastów L929, inkubowanych przez 24h z biokompozytami, badana przy pomocy testu redukcji MTT zgodnie z normą ISO-10993-5:2009. Komórki inkubowane bez biomateriału stanowiły pozytywną kontrolę żywotności (100%). Kontrolę negatywną żywotności stanowiły komórki hodowane w obecności 3% roztworu nadtlenu wodoru. Komercyjnie dostępny certyfikowany biomateriał - element systemu do pobierania krwi posłużył jako materiał referencyjny. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenia standardowe dla trzech osobnych eksperymentów (po 8 powtórzeń w ramach każdego testu). Linia przerywana wskazuje minimalną wartość aktywności metabolicznej komórek (70%), powyżej której materiał jest traktowany jako niecytotoksyczny na poziomie *in vitro*. * $p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą pozytywną, wartość współczynnika p obliczono z wykorzystaniem testu Manna-Whitneya celem określenia istotności statystycznej pomiędzy średnimi.

Co więcej, żywotność fibroblastów hodowanych w środowisku wszystkich materiałów była wyższa w porównaniu do aktywności metabolicznej komórek w hodowli kontrolnej prowadzonej bez dodatku materiału (100% żywotności). Ponadto, nie obserwowano różnic statystycznie znamienych pomiędzy aktywnością komórek hodowanych z poszczególnymi piankami. Uwzględniając powyższe, opracowane materiały spełniają kryteria ISO zachowania żywotności co najmniej 70% komórek po inkubacji z biomateriałem po czasie 24h (ISO 10993-5:2009).

Zachowanie aktywności metabolicznej fibroblastów w środowisku biomateriałów znalazło potwierdzenie w wynikach obrazowania ich jąder komórkowych uzyskanych poprzez barwienie fluorescencyjne i obserwację w mikroskopie konfokalnym (Rysunek 49). Wykazano brak różnic w liczbie oraz stanie morfologicznym jąder komórek w zależności od składu *scaffoldów*. Fibroblasty równomiernie kolonizowały powierzchnię materiału, a ich jądra komórkowe wykazywały fizjologiczną morfologię bez znaków apoptozy. Z uwagi na silną autofluorescencję *scaffoldu*, we wszystkich pozostałych kanałach świecenia, niemożliwe było zwizualizowanie cytoszkieletu komórek za pomocą innych barwników.



Rysunek 49: Kolonizacja fibroblastów L929 po 24h na biomateriałach: PGS (A,E), PGS/HAp 90/10 (B,F), PGS/HAp 80/20 (C,G), PGS/HAp 70/30 (D,H). Jądra komórkowe znakowano barwnikiem DAPI. Próbkę obrazowano przy wzbudzeniu długością fali 405 nm i emisji w zakresie 430-480 nm. Mikrofotografie opracowano w oprogramowaniu Leica Application Suite X (LAX X; Leica Microsystems).

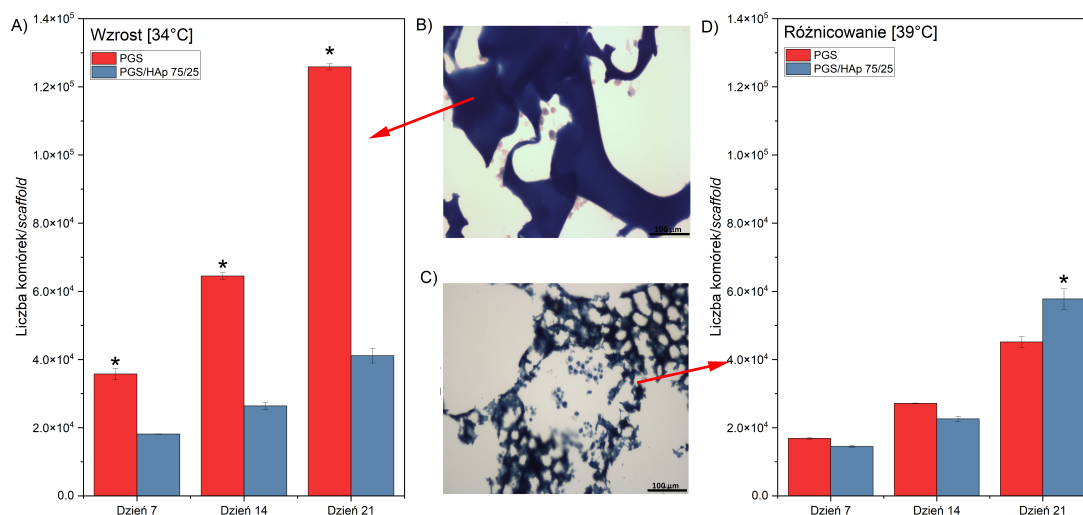
3.5.2 Właściwości osteokondukcyjne

Badaniu oceny potencjału osteokonduktywnego zostały poddane *scaffoldy* PGS oraz PGS/HAp z 25 wt.% dodatkiem HAp, sieciowane w 185°C przez 2,5h. Materiały zostały wybrane tak aby zweryfikować wpływ obecności HAp w matrycy *scaffoldu* na procesy osteokondukcyjne. Badanie zostało schematycznie zwizualizowane na Rysunku 9 w opisie metodologii eksperymentalnej.

Proliferacja osteoblastów

Z uwagi na autofluorescencję *scaffoldów* PGS/HAp 75/25 w zakresie spektralnym działania mikroskopu konfokalnego, celem zobrazowania i monitorowania zachowania komórek hFOB 1.19 na badanych biomateriałach, wykorzystano wybarwienie metodą Grunwalda-Giemsy. Badanie ujawniło zdolność komórek do kolonizowania *scaffoldów* przez osteoblasty oraz ekspansję takich komórek na powierzchni biomateriałów po 7 dniach inkubacji (Rysunek 50(B,C)).

Ludzkie, płodowe komórki osteoblastyczne hFOB 1.19 są linią komórkową, która przypomina preosteoblasty podczas wzrostu w warunkach umożliwiających proliferację (34°C). W temp. 39°C podziały komórkowe są ograniczane na rzecz różnicowania w dojrzałe osteoblasty. Po 7, 14 i 21 dniu hodowli przeprowadzanej zarówno w temp. 34°C jak i w 39°C osteoblasty ulegały proliferacji zależnej od obecności *scaffoldów* (Rysunek 50(A,D)).



Rysunek 50: Zdjęcia przekrojów poprzecznych *scaffoldów* PGS (B) oraz PGS/HAp 75/25 (C), zasiedlonych przez ludzkie komórki osteoblastyczne hFOB 1.19 wybarwione metodą Grunwalda-Giemsy, wykonane za pomocą mikroskopu optycznego. Rysunek przedstawia również liczbę komórek hFOB 1.19 na biomateriałach w warunkach umożliwiających proliferację (34°C) (A) oraz w warunkach osteogenicznych (39°C) (D) w ciągu 21 dni hodowli. Wyniki przedstawiono w postaci: wartość średnia \pm odchylenie standardowe. * $p < 0.05$ pomiędzy wartościami dla PGS, a PGS/HAp 75/25, wartość współczynnika p obliczono z wykorzystaniem testu Manna-Whitneya celem określenia istotności statystycznej zmian.

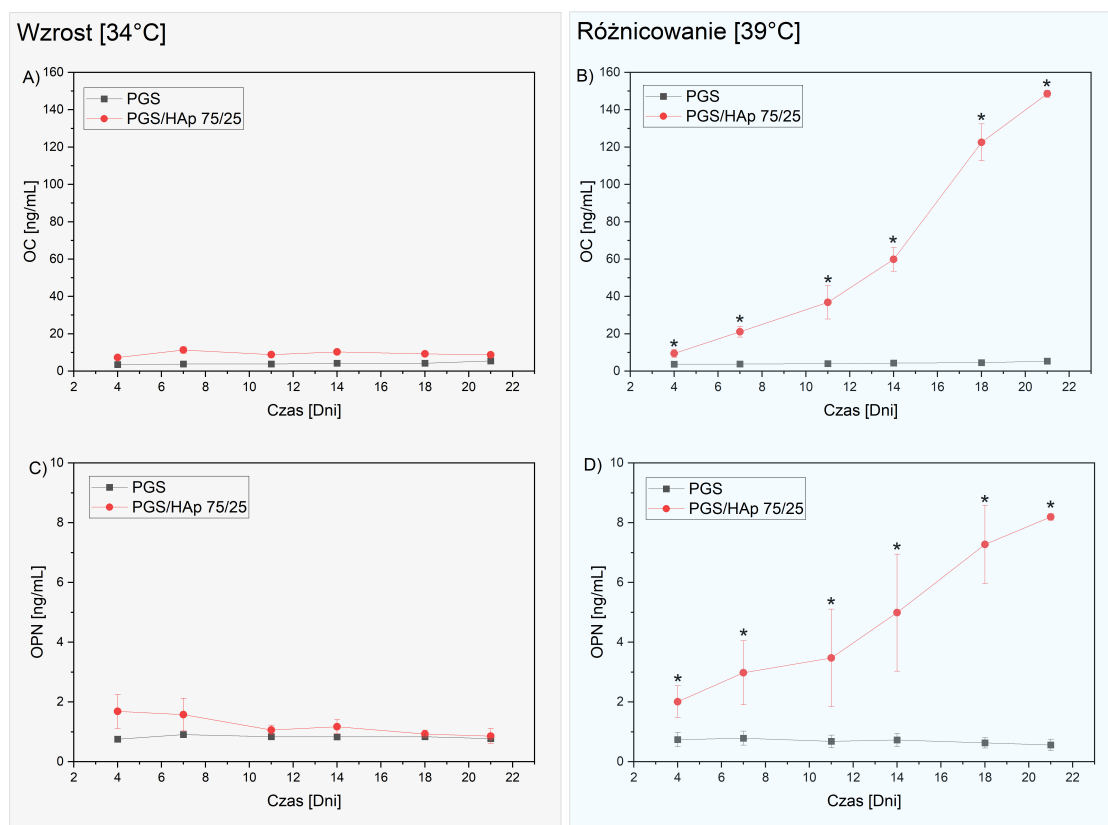
Wartym uwagi zjawiskiem jest ciągły wzrost liczby preosteoblastów kolonizujących biomateriały w ciągu 21 dni inkubacji. Natomiast, w warunkach promujących wzrost (34°C) liczba osteoblastów obecnych na piance PGS była znacząco wyższa we wszystkich punktach czasowych (odpowiednio $3,5 \times 10^4 \pm 2,0 \times 10^3$, $6,4 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^3$, $1,2 \times 10^5 \pm 1,0 \times 10^3$) w porównaniu do liczby komórek hFOB 1.19 hodowanych na *scaffoldzie* PGS/HAp 75/25 ($1,6 \times 10^4 \pm 3,3 \times 10^2$, $p = 0,002$; $2,7 \times 10^4 \pm 1,3 \times 10^2$, $p = 0,002$; $4,5 \times 10^4 \pm 1,8 \times 10^3$, $p = 0,002$). Uwzględniając powyższe, należy wnioskować, że aktywność proliferacyjna osteoblastów hodowanych w warunkach osteogenicznych (39°C) w środowisku *scaffoldu* PGS/HAp 75/25 ulega obniżeniu. Różnicowaniu osteoblastów hFOB 1.19 towarzyszy mniejsze tempo proliferacji, najbardziej znaczące dla *scaffoldu* PGS/HAp 72/25 w dniu 21 ($5,8 \times 10^4 \pm 3,7 \times 10^3$) w porównaniu do ilości komórek na piance bez napelniacza ($4,1 \times 10^4 \pm 2,6 \times 10^3$, $p = 0,002$). Biorąc pod uwagę wrażliwą naturę osteoblastów hFOB 1.19, można wyciągnąć wnioski, że *scaffold* PGS/HAp nie tylko wykazuje optymalną biokompatybilność *in vitro*, ale również długoterminowo podtrzymuje

rozwój zróżnicowanych osteoblastów. Z drugiej strony, dodatek ceramicznego napełniacza w postaci HAp spowolnił podział komórkowy hFOB 1.19 w warunkach wzrostu. Efekt ten mógł być spowodowany ukierunkowania na różnicowanie, kosztem proliferacji.

Produkowana przez osteoblasty OC odgrywa istotną rolę w regulacji metabolicznej oraz mineralizacji kości, podczas gdy OPN jest biomarkerem resorpcji kości [204, 205]. Markery kościotworzenia wytwarzane podczas różnicowania się komórek hFOB 1.19, z uwzględnieniem OC i OPN, były analizowane ilościowo w supernatantach z hodowli z biomateriałami PGS lub PGS/HAp 75/25 w dniach: 7, 11, 14, 18 i 21 (Rysunek 51), zarówno w warunkach wzrostu, jak i osteoindukcyjnych. W warunkach wspierających proliferację (34°C), stężenie OC utrzymywało się na podobnym poziomie w każdym z punktów pomiarowych, a HAp nie wpływał na jego poziom. Stężenie OC wytwarzanej przez komórki hFOB 1.19 w środowisku pianki PGS wynosiło średnio $3,5 \pm 1,7$ ng/mL w dniu 4 i osiągało poziom $8,7 \pm 1,3$ ng/mL w dniu 21. W hodowlach osteoblastów hodowanych w środowisku pianki kompozytowej PGS/HAp 75/25 wynosiło $7,2 \pm 1,5$ ng/mL w dniu 4 ($p = 0,04$) i osiągnęło najwyższe średnie stężenie wynoszące $8,9 \pm 1,5$ ng/mL w dniu 21 ($p = 0,01$).

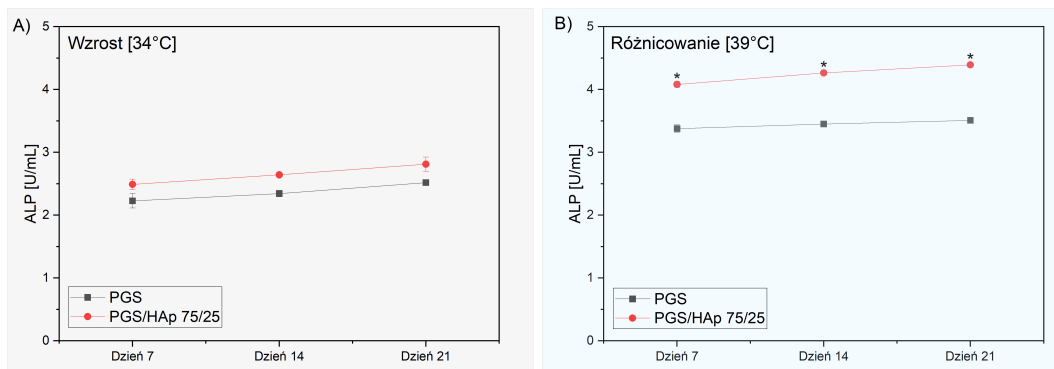
Wydzielanie markerów kostnienia

Biomarkery obrotu kostnego determinują przebieg metabolicznych procesów przebudowy kości, w skład których wchodzi tworzenie się oraz resorpcja tkanki kostnej. Osteoblasty hodowane w warunkach stymulujących różnicowanie (39°C), w środowisku biomateriału wzbogaconego w fazę ceramiczną, wytwarzały wysokie stężenie OC, które sukcesywnie wzrastało w czasie. Niezależnie od temperatury hodowli oraz dodatku czynników osteogenicznych, w środowisku polimerowej pianki PGS, poziom OC pozostał niezmienny (względnie stały) w czasie. Stężenie OC produkowanej w środowisku kompozytów PGS/HAp było o rząd wielkości wyższe, w porównaniu do stężenia w hodowlach inkubowanych z biomateriałem bez HAp. Stężenie OC wytwarzanej w obecności kompozytu PGS/HAp w porównaniu do wykrywanych w środowisku pianki PGS wynosiły odpowiednio $9,5 \pm 2,5$ ng/mL i $7,2 \pm 1,5$ ng/mL w dniu 4 oraz $148,5 \pm 3,3$ ng/mL i $8,7 \pm 1,3$ ng/mL w dniu 21.



Rysunek 51: Stężenie markerów kościotworzenia: OC oraz OPN w warunkach umożliwiających proliferację (34°C) (A,C) oraz w warunkach osteoindukcyjnych (39°C) (B,D). Wyniki przedstawiono w postaci: wartość średnia \pm odchylenie standardowe. * $p < 0,05$ pomiędzy wartościami dla PGS, a PGS/HAp 75/25, wartość współczynnika p obliczono z wykorzystaniem testu Manna-Whitneya celem określenia istotności statystycznej zmian.

Analiza ilościowa produkcji OPN wykazała podobną zależność. W temp. 34°C stężenie OPN pozostało na niskim poziomie w toku całego eksperymentu ($0,7 \pm 0,1$ ng/mL) i nie było zależne od składu biomateriałów. W przypadku materiału kompozytowego stężenie wynosiło $1,6 \pm 0,6$ ng/mL w dniu 4 ($p = 0,04$) i spadło do poziomu $0,8 \pm 0,4$ ng/mL w dniu 21 ($p = 0,01$). Podobnie jak w przypadku OC, w warunkach osteoindukcji (39°C), stężenie OPN produkowanej przez komórki hFOB 1.19 hodowane na piankach PGS/HAp 75/25 rosło znacząco i było wyższe w porównaniu do stężenia OPN produkowanej w hodowli z piankami PGS ($2,0 \pm 0,5$ ng/mL dla PGS/HAp 75/25 i $1,6 \pm 0,6$ ng/mL dla PGS w dniu 4 oraz $8,1 \pm 0,1$ ng/mL dla PGS/HAp 75/25 i $0,8 \pm 0,4$ ng/mL dla PGS w dniu 21).



Rysunek 52: Aktywność ALP w lizatach komórkowych otrzymanych z komórek hFOB 1.19 hodowanych w 34°C (A) lub w środowisku osteoinduktywnym (39°C) (B). Wyniki przedstawiono w postaci: wartość średnia \pm odchylenie standardowe oraz wyrażono w jednostkach (U) na mL. * $p < 0,05$ pomiędzy wartościami dla PGS, a PGS/HAp 75/25, wartość współczynnika p obliczono z wykorzystaniem testu Manna-Whitneya celem określenia istotności statystycznej zmian.

Wytwarzanie ALP przez osteoblasty odzwierciedla proces zwapnienia, a obecność tego enzymu jest niezbędna w procesach tworzenia się tkanki kostnej [206]. Badania wykazały brak różnic w aktywności ALP w hodowlach osteoblastów prowadzonych w środowisku *scaffoldów* PGS i PGS/HAp 75/25 w każdym z punktów czasowych w temperaturze 34°C (odpowiednio $2,2 \pm 0,2$ U/mL oraz $2,4 \pm 0,1$ U/mL w dniu 7 i $2,5 \pm 0,1$ U/mL oraz $2,8 \pm 0,2$ U/mL w dniu 21). Z kolei w warunkach osteoinduktywnych wykazano wzmożoną aktywność ALP w hodowlach osteoblastów prowadzonych w środowisku pianek PGS/HAp 75/25, w porównaniu do wyników otrzymanych dla polimerowej pianki PGS (odpowiednio $4,1 \pm 0,1$ U/mL oraz $3,3 \pm 0,1$ U/mL w dniu 7 ($p = 0,02$), $4,2 \pm 0,1$ U/mL oraz $3,4 \pm 0,1$ U/mL w dniu 14 ($p = 0,02$) i $4,3 \pm 0,1$ U/mL oraz $3,5 \pm 0,1$ U/mL w dniu 21 ($p = 0,02$)).

Produkcja cytokin immunomodulujących

Przemodelowanie tkanki kostnej jest regulowane przez komórki odpornościowe i ich aktywność wydzielniczą, w szczególności w zakresie wytwarzania cytokin pro- i przeciwzapalnych. Rozpuszczalne cząsteczki mediatorów regulują wzrost komórek, różnicowanie oraz ekspresję genów [207]. Osteoblasty, podobnie jak komórki zrębowe, zdolne są do stymulowania aktywacji oraz różnicowania monocytów i makrofagów w osteoklasty, co jest niezbędne w przemodelowywaniu tkanki kostnej [208]. W przedstawianej pracy stężenie IL-1 β , IL-6, IL-10 oraz TNF- α mierzono w supernatantach z hodowli osteoblastów hFOB 1.19 prowadzonych na biomateriałach porowatych PGS i PGS/HAp 75/25 w dniach: 4, 7, 11, 14, 18 oraz 21 w warunkach zapewniających wzrost (34°C) lub różnicowanie (39°C) (Rysunek 53).

IL-1 β , uważana za główny czynnik aktywacji osteoklastów, jest cytokiną istotną na wielu etapach rozwoju komórek kościotwórczych i wpływa na równowagę pomiędzy tworzeniem się tkanki kostnej a jej resorpcją [209]. W warunkach wzrostu komórek (34°C), stężenie IL-1 β utrzymywało się na podobnym poziomie w toku całego badania. Jej produkcja nie była powiązana ze składem biomateriału. Stężenie IL-1 β produkowanej przez komórki hFOB 1.19 na *scaffoldach* PGS wynosiło: $2,8 \pm 0,6$ pg/mL w dniu 4 i wzrastało do wartości $24,4 \pm 0,8$ pg/mL w dniu 21. Porównywalnie, stężenie tej cytokiny w środowisku PGS/HAp 75/25 wynosiło $3,4 \pm 0,3$ pg/mL w dniu 4 i wzrastało znacząco do wartości $24,3 \pm 0,7$ pg/mL w dniu 21. Podobnie, w warunkach osteoindukcyjnych (39°C) stężenie IL-1 β produkowanej przez komórki hFOB 1.19 na kompozycie PGS/HAp 75/25 wrosło z czasem i było istotnie wyższe niż w hodowlach osteoblastów prowadzonych na piance PGS. Dla przykładu, w dniu 4 hodowli w środowisku PGS wynosiło ono $18,7 \pm 1,9$ pg/mL i wzrastało do $39,8 \pm 0,7$ pg/mL ($p = 0,04$). Efekt ten był jeszcze bardziej znaczący w środowisku PGS/HAp 75/25, gdzie stężenie IL-1 β po 4 dniach inkubacji osiągało $22,7 \pm 3,3$ pg/mL, a w dniu 21 wynosiło $359,7 \pm 12,4$ pg/mL ($p = 0,02$) (Rysunek 53B). Istnieje zatem związek pomiędzy produkcją IL-1 β , a postępującym różnicowaniem terminalnym komórek hFOB 1.19. Proces ten był nasilony w środowisku PGS/HAp 75/25.

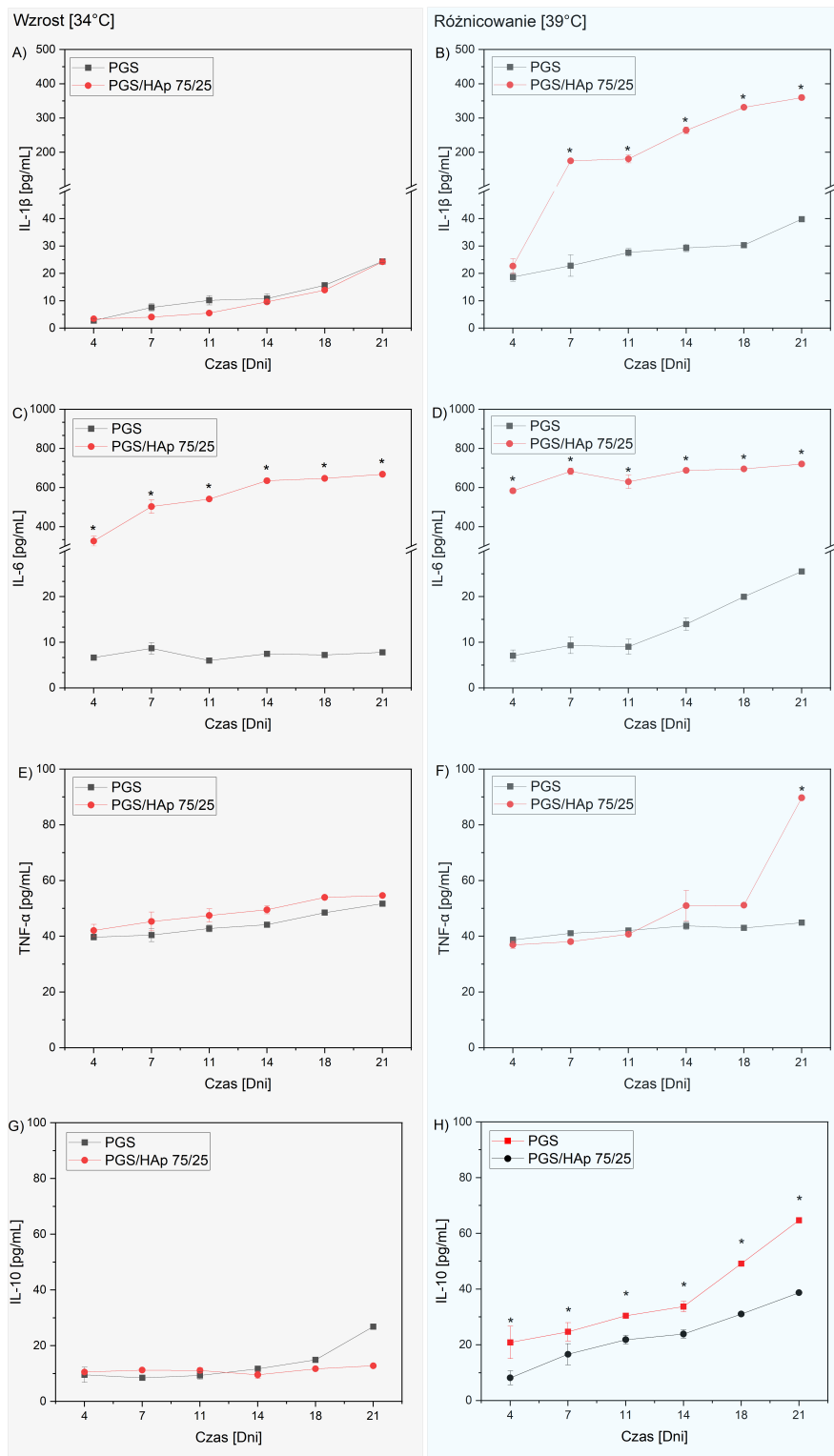
Pośród innych cytokin o właściwościach osteoklastogenicznych, prozapalna IL-6 jest głównym stymulatorem różnicowania się osteoklastów oraz modulacji resorp-

cji tkanki kostnej [210]. W niniejszej pracy wykazano, że osteoblasty hodowane w środowisku pianek PGS wzbogaconych HAp były pobudzane do wytwarzania ww. cytokiny. Stężenie IL-6 wydzielanej przez komórki hodowane na kompozytach PGS/HAp 75/25 w 34°C zwiększało się znacząco we wszystkich punktach pomiarowych. Wynosiło $326,4 \pm 31,7$ pg/mL w dniu 4 i wzrastało dwukrotnie w dniu 21 hodowli ($667,9,4 \pm 14,9$ pg/mL). Dla porównania, stężenie IL-6 w hodowli ze *scaffoldem* PGS nie uległo zmianie i wynosiło $6,7 \pm 0,3$ pg/mL w dniu 4 ($p = 0,02$) oraz $7,8 \pm 0,2$ pg/mL w dniu 21 ($p = 0,02$). Analogiczną zależność obserwowano w hodowlach prowadzonych w warunkach osteoinduktywnych (39°C). Podobnie jak w temp. 34°C, komórki hFOB 1.19 hodowane na piankach kompozytowych PGS/HAp 75/25 produkowały znamienne więcej IL-6 w porównaniu do hodowli osteoblastów prowadzonych w środowisku *scaffoldów* PGS. W dniu 4 doświadczenia stężenia IL-6 wynosiły $582,9 \pm 14,0$ pg/mL dla PGS/HAp 75/25 i $7,1 \pm 1,5$ pg/mL dla PGS ($p = 0,02$). W ostatnim rejestrowanym interwale czasowym analiza ilościowa wykazała stężenie $720,2 \pm 1,3$ pg/mL dla PGS/HAp 75/25 oraz $25,5 \pm 0,7$ pg/mL dla PGS ($p = 0,02$, Rysunek 53 C,D).

TNF- α uważany za silnie indukujący resorpcję kości jest istotnym propagatorem osteoklastogenezy. Jako cytokina plejotropowa (działająca wielokierunkowo) wykazuje zarówno aktywność prozapalną jak również stymuluje makrofagi szpikowe do różnicowania w osteoblasty. Takie działanie może mieć korzystny wpływ na procesy naprawcze podczas regeneracji tkanki kostnej [211, 212]. W niniejszej pracy wykazano brak różnic w stężeniu TNF- α w hodowlach prowadzonych w temp. 34°C (niezależnie od składu biomateriału). Stężenie tej cytokiny w dniu 4 hodowli wynosiło średnio $39,7 \pm 1,4$ pg/mL oraz $42,1 \pm 2,7$ pg/mL, odpowiednio dla PGS i PGS/HAp 75/25. W dniu 21 dla PGS i PGS/HAp 75/25 stężenia były na poziomie $51,7 \pm 0,6$ pg/mL i $54,6 \pm 0,3$ pg/mL. Podobnie, w warunkach osteoinduktywnych (39°C) w dniach 4, do 18 nie ulegał zmianie, niezależnie od składu materiału. Natomiast w dniu 21 zaobserwowano znamienne statystycznie wzrost produkcji TNF- α przez osteoblasty na piance kompozytowej zawierającej frakcję apatytową w porównaniu do stężenia w przypadku *scaffoldu* PGS ($89,7 \pm 1,0$ pg/mL dla PGS/HAp 75/25 vs. $44,9 \pm 0,9$ pg/mL dla PGS ($p = 0,02$), Rysunek 53E,F).

Przeciwwzapalne właściwości interleukiny IL-10 są istotnym elementem homeostazy tkanki kostnej. Odpowiada ona za hamowanie syntezy cytokin prozapalnych (IL-1, IL-6, TNF- α), żelatynaz oraz kolagenaz, jak również bezpośrednio reguluje powstawanie osteoklastów [213]. Wykazano, że w warunkach osteogenicznych, *scaffoldy* PGS/HAp 75/25 powodowały zwiększoną produkcję IL-10 przez osteoblasty w porównaniu do pianki z czystego PGS we wszystkich punktach czasowych ($20,9 \pm 7,1$ pg/mL dla PGS/HAp 75/25 i $8,1 \pm 3,0$ pg/mL dla PGS w dniu 4 ($p = 0,02$) oraz $64,7 \pm 0,7$ pg/mL dla PGS/HAp 75/25 i $38,7 \pm 0,6$ pg/mL dla PGS w dniu 21 ($p = 0,01$). Natomiast, komórki hodowane w 34°C produkowały istotnie mniej IL-10 w porównaniu do hodowli w warunkach osteogenicznych, a stężenie tej cytokiny pozostawało na stałym poziomie podczas całego okresu inkubacji. Pomimo, że trend produkcji IL-10 nie był powiązany ze składem biomateriałów, pianka PGS/HAp 75/25 stymulowała wyższą produkcję w dniu 21. Stężenie IL-10 produkowanej przez komórki hFOB 1.19 na piance PGS wynosiło $9,6 \pm 3,3$ pg/mL w dniu 4 i osiągało $26,8 \pm 1,0$ pg/mL w dniu 21. W hodowlach prowadzonych w środowisku pianki kompozytowej, stężenie IL-10 w dniu 4 wynosiło $10,6 \pm 0,5$ pg/mL, a w dniu 21 osiągnęło wartość $12,8 \pm 0,5$ pg/mL (Rysunek 53G,H).

Badane *scaffoldy* domieszkowane HAp wykazały cytozgodność względem fibroblastów linii L929, zgodnie z wymogami normy ISO 10993-5:2009. Cytozgodność kompozytów na bazie PGS z dodatkiem napelnacza apatytowego jest opisywana w literaturze, jednak struktura matrycy oraz parametry i rodzaj sieciowania materiałów były odmienne w stosunku do wytworzonych w niniejszej pracy [199, 214]. Aktywność osteokonduktywna biomateriału jest istotną własnością w kontekście zastosowania w inżynierii tkanki kostnej. Prezentowane wyniki ukazują potencjał wytworzonego biomateriału do stymulowania różnicowania osteoblastów hFOB 1.19 przy jednoczesnym zwiększeniu wydzielania markerów OC i OPN w czasie 21 dni. W innym badaniu przeprowadzonym na piankach PGS modyfikowanych bezwodnikiem maleinowym z dodatkiem HAp również wykazano zwiększone wydzielanie OC w czasie 7 dni hodowli z wykorzystaniem ludzkich komórek macierzystych linii hADSC [160]. Jednakże w badaniach prezentowanych w niniejszej rozprawie wykazano również nasiloną produkcję markerów prozapalnych (IL-1 β , TNF- α , IL-6), które odgrywają istotną rolę w procesie przemodelowania i odbudowy tkanki kostnej.



Rysunek 53: Wytwarzanie cytokin immunomodulujących (IL-1 β (A,B), IL-6 (C,D), TNF- α (E,F) oraz IL-10 (G,H)) przez komórki hFOB 1.19 w środowisku pianek PGS lub PGS/HAp 75/25 w warunkach zapewniających wzrost (34°C, kolumna lewa) oraz różnicowanie (39°C, kolumna prawa). Wyniki przedstawiono w postaci: wartość średnia \pm odchylenie standardowe. * $p < 0,05$ pomiędzy wartościami dla PGS, a PGS/HAp 75/25, wartość współczynnika p obliczono z wykorzystaniem testu Manna-Whitneya celem określenia istotności statystycznej zmian.

Rozdział 4

Podsumowanie i wnioski

W ramach pracy wytworzono prepolimer pPGS dwiema metodami: polikondensacją temperaturową oraz syntezą enzymatyczną. Nowością nieopisaną dotychczas w literaturze była synteza pPGS katalizowana enzymem CALB przeprowadzona w 1,4-dioksanie. W pracy przedstawiona została szczegółowa charakterystyka strukturalna prepolimeru PGS technikami NMR oraz FT-IR umożliwiające wyznaczenie zawartości poszczególnych podjednostek strukturalnych (terminalnych, rozgałęziającej i liniowych) oraz parametrów strukturalnych, takich jak stopień polimeryzacji oraz stopień rozgałęzienia. Do wytwarzania materiałów typu *scaffold* użyto pPGS wytworzony techniką polikondensacji temperaturowej, ze względu na stopień rozgałęzienia mniejszy o ok. 10% w stosunku do materiału uzyskanego z wykorzystaniem enzymu. Obydwa materiały posiadały podobny stopień polimeryzacji (13,2 dla polimeru pochodzącego z polikondensacji temperaturowej i 16,7 dla PGS wytworzonego syntezą enzymatyczną), lecz wydajność reakcji enzymatycznej była 22-krotnie niższa niż polikondensacji temperaturowej. Dodatkowo, stopień skomplikowania oraz koszt syntezy enzymatycznej był wyższy. Obejmował on zarówno dodatkowy koszt katalizatora (enzymu), jak również jego aktywację w zmniejszonym ciśnieniu i przechowywanie w obniżonej temperaturze na 48h przed przeprowadzeniem reakcji.

Podczas sieciowania termicznego wykazano zwiększanie się hydrofobowości macierzy polimerowej, co zostało zobrazowane badaniami kąta zwilżania oraz wyjaśnione redukcją w ilości peryferyjnych grup hydroksylowych podczas polikondensacji wewnętrzzasteczkowej. Również stopień usieciowania, wyznaczony przez odmycie nieusieciowanej frakcji polimeru etanolem, zwiększał się wraz z przedłużonym czasem

sieciowania i osiągnął wartość maksymalną 97.5% dla litego cylindra PGS sieciowanego przez 168h w 130°C. Obecność oraz zawartość hydroksyapatytu nie wpływała na stopień usieciowania porowatych *scaffoldów*, który wynosił średnio $92,6 \pm 3,4\%$.

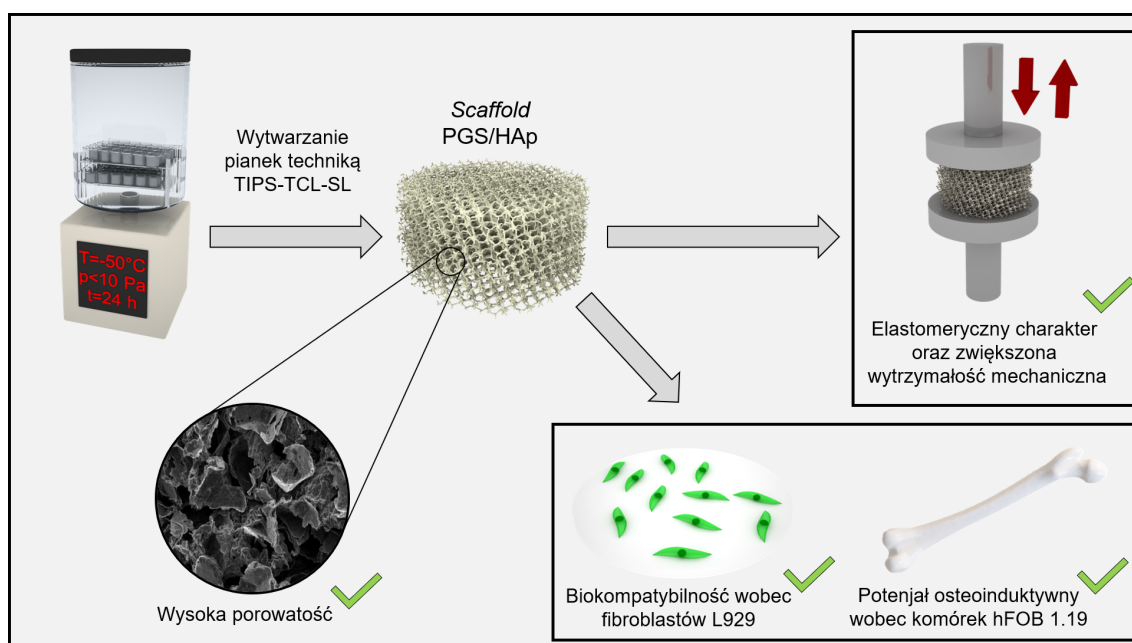
Badanie techniką mikrotomografii pozwoliło na zwizualizowanie trójwymiarowej struktury pianek, a mikroskopia elektronowa oraz stereoskopowa na zbadanie wpływu hydroksyapatytu na morfologię powierzchni. Badane materiały posiadały porowatość struktury dochodzącą do 82,6%, z ilością porów zamkniętych poniżej 0,02%. Materiały sieciowane przez krótszy czas (2.5h) posiadały większy skurcz termiczny, który objawiał się zmniejszeniem wymiarów pianki po wyjęciu z formy. Skutkowało to średnim rozmiarem porów mniejszym od zadanego porogenu.

Obecność hydroksyapatytu w strukturze pianek została potwierdzona obecnością charakterystycznych pasm na widmach FT-IR pochodzących od wiązania P-O, jak również obecnością wapnia i fosforu w badaniu spektroskopowym EDS. Co więcej, wprowadzenie hydroksyapatytu do matrycy polimerowej przyczyniło się do obniżenia kąta zwilżania *scaffoldu* o 6°, a zatem zwiększenia się charakteru hydrofilowego. Ze względu na aglomerację oraz dojrzewanie Ostwalda, hydroksyapatyt może nie zostać zdyspergowany na odpowiednim poziomie wewnątrz matrycy polimerowej próbki o zwiększonej wysokości. W związku z powyższym, w przyszłych badaniach należałoby by dążyć do skrócenia czasu sieciowania lub opracowania metody modyfikacji chemicznej łańcucha bocznego pPGS cząstkami hydroksyapatytu.

Analiza DSC *scaffoldów* PGS oraz kompozytowych zawierających 10, 20 i 30 wt.% frakcji apatytowej wykazała, że powyżej temperatury 10°C badane materiały są amorficzne oraz znajdują się w stanie elastycznym. Podczas sieciowania termicznego PGS, temperatura topnienia przesuwa się w kierunku niższych wartości. Natomiast temperatura krystalizacji przesuwa się w stronę niższych temperatur.

Badanie statycznego ściskania *scaffoldów* PGS i PGS/HAp wykazało największą wytrzymałość mechaniczną dla kompozytu zawierającego 20% napełniacza. Materiał ten charakteryzuje się modułem Younga o wartości 24 kPa i naprężeniem 225 kPa przy 70% odkształcenia. Badanie DMTA pozwoliło na zbadanie dynamicznych właściwości mechanicznych wraz z postępem sieciowania PGS. Wartość wyznaczonego modułu zachowawczego jest bezpośrednio związana z odpornością na odkształcenia. Jego wartość po wystąpieniu przejścia szklistego była prawie 4-krotnie wyższa dla

próbki litego PGS sieciowanego przez 168h w 130° w porównaniu do próbki sieciowanej przez 84h w tych samych warunkach. Dodatkowo, wykonane badanie DMTA wykazuje, że pomimo wysokiego stopnia usieciowania wyznaczonego przez rozpuszczalne polimeru, wciąż zachodzi w nim proces sieciowania termicznego. Niemniej jednak, badane *scaffolds* zachowały zdolność do odwracalnej deformacji pod działaniem obciążeń mechanicznych, a zwiększona kruchość i znacząca utrata charakteru elastomerycznego dotyczyła litego materiału sieciowanego przez 168h w 130°C.



Rysunek 54: Schemat przedstawiający podsumowanie głównych właściwości porowatych kompozytów PGS/HAp.

Badania biologiczne *in vitro* opracowanych biomateriałów wykazały cytozgodność pianek sieciowanych przez 168h w 130°C względem fibroblastów mysich linii L929, co potwierdza ich zgodność z wymogami normy ISO 10993-5:2009. Ponadto, fibroblasty zasiedlają powierzchnię *scaffoldu* polimerowego, jak i pianek kompozytowych z zawartościami wypełniacza ceramicznego 0%, 10%, 20% i 30%. Najistotniejszą, w kontekście inżynierii tkankowej, właściwością kompozytów PGS/HAp jest ich potwierdzona badaniami aktywność osteokondukcyjna, w zakresie stymulowania osteoblastów ludzkich do różnicowania, któremu towarzyszyło zahamowanie proliferacji takich komórek oraz nasilenie wydzielania markerów kostnienia (OC, OPN, ALP), a także nasiloną produkcją markerów prozapalnych tj. IL-1 β , TNF- α , IL-6, równoważonych obecnością regulatorowej IL-10. Dzięki wykazanemu potencjałowi

osteoinduktywnemu oraz zadowalającym właściwościom mechanicznym i fizykochemicznym, porowate kompozyty PGS/HAp mogą znaleźć zastosowanie w medycynie regeneracyjnej układu kostnego jako wypełnienia w chorobach osteodegeneracyjnych (Rysunek 54). W świetle przedstawionych wyników charakterystyki porowatych kompozytów PGS/HAp, potwierdzono główną tezę rozprawy o możliwości implementacji opracowanego materiału do badań *in vivo* i dalszej weryfikacji jego przydatności w inżynierii tkankowej kości.

Bibliografia

- [1] Y. Wang, G. A. Ameer, B. J. Sheppard, R. Langer, *Nature Biotechnology* **2002**, *20*, 602–606.
- [2] R. Rai, M. Tallawi, A. Grigore, A. R. Boccaccini, *Progress in Polymer Science* **2012**, *37*, 1051–1078.
- [3] X. J. Loh, A. A. Karim, C. Owh, *Journal of Materials Chemistry B* **2015**, *3*, 7641–7652.
- [4] M. Nagata, T. Machida, W. Sakai, N. Tsutsumi, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **1999**, *37*, 2005–2011.
- [5] X. Li, A. T. Hong, N. Naskar, H. J. Chung, *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 1525–1533.
- [6] I. Pomerantseva, N. Krebs, A. Hart, C. M. Neville, A. Y. Huang, C. A. Sundback, *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **2009**, *91*, 1038–1047.
- [7] A. K. Gaharwar, A. Patel, A. Dolatshahi-Pirouz, H. Zhang, K. Rangarajan, G. Iviglia, S. R. Shin, M. A. Hussain, A. Khademhosseini, *Biomaterials Science* **2015**, *3*, 46–58.
- [8] C. A. Sundback, J. Y. Shyu, Y. Wang, W. C. Faquin, R. S. Langer, J. P. Vacanti, T. A. Hadlock, *Biomaterials* **2005**, *26*, 5454–5464.
- [9] J. Gao, P. M. Crapo, Y. Wang, *Tissue Engineering* **2006**, *12*, 917–925.
- [10] S. Pashneh-Tala, R. Owen, H. Bahmaee, S. Rekštyte, M. Malinauskas, F. Claeysens, *Frontiers in Physics* **2018**, *6*, 41.
- [11] S. Pashneh-Tala, R. Moorehead, F. Claeysens, *Journal of Biomaterials Applications* **2020**, *34*, 1114–1130.

- [12] H. Xuan, H. Hu, C. Geng, J. Song, Y. Shen, D. Lei, Q. Guan, S. Zhao, Z. You, *Acta Biomaterialia* **2020**, *105*, 97–110.
- [13] G. B. Perin, M. I. Felisberti, *Macromolecules* **2020**, *53*, 7925–7935.
- [14] B. Godinho, N. Gama, A. Barros-Timmons, A. Ferreira w t. 1981, American Institute of Physics Inc., **2018**.
- [15] H. M. Aydin, K. Salimi, Z. M. Rzayev, E. Pişkin, *Biomaterials Science* **2013**, *1*, 503–509.
- [16] P. Deniz, S. Guler, E. Çelik, P. Hosseinian, H. M. Aydin, *Materials Science and Engineering C* **2020**, *106*.
- [17] C. C. Lau, M. A. Qaysi, N. Owji, M. K. Bayazit, J. Xie, J. C. Knowles, J. Tang, *Materials Today Advances* **2020**, *5*, 100023.
- [18] C. L. Nijst, J. P. Bruggeman, J. M. Karp, L. Ferreira, A. Zumbuehl, C. J. Bettinger, R. Langer, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3067–3073.
- [19] J. L. Ifkovits, R. F. Padera, J. A. Burdick, *Biomedical materials (Bristol England)* **2008**, *3*.
- [20] Y. Wu, L. Wang, X. Zhao, S. Hou, B. Guo, P. X. Ma, *Biomaterials* **2016**, *104*, 18–31.
- [21] M. Frydrych, B. Chen, *Polymer* **2017**, *122*, 159–168.
- [22] M. J. N. Pereira, B. Ouyang, C. A. Sundback, N. Lang, I. Friehs, S. Mureli, I. Pomerantseva, J. McFadden, M. C. Mochel, O. Mwizerwa, P. del Nido, D. Sarkar, P. T. Masiakos, R. Langer, L. S. Ferreira, J. M. Karp, *Advanced Materials* **2013**, *25*, 1209–1215.
- [23] R. Wilson, A. V. Divakaran, K. S. A. Varyambath, A. Kumaran, S. Sivaram, L. Ragupathy, *ACS Omega* **2018**, *3*, 18714–18723.
- [24] M. Rostamian, M. R. Kalae, S. R. Dehkordi, M. Panahi-Sarmad, M. Tirgar, V. Goodarzi, *European Polymer Journal* **2020**, *138*, 109985.
- [25] J. Y. Chen, J. V. Hwang, W. S. Ao-Ieong, Y. C. Lin, Y. K. Hsieh, Y. L. Cheng, J. Wang, *Polymers 2018 Vol. 10 Page 1263* **2018**, *10*, 1263.
- [26] Y. Jia, W. Wang, X. Zhou, W. Nie, L. Chen, C. He, *Polymer Chemistry* **2016**, *7*, 2553–2564.

- [27] Y. Wang, H. Wu, Z. Wang, J. Zhang, J. Zhu, Y. Ma, Z. Yang, Y. Yuan, *Polymers* **2019**, *11*, 965.
- [28] X. Zhao, H. Wu, B. Guo, R. Dong, Y. Qiu, P. X. Ma, *Biomaterials* **2017**, *122*, 34–47.
- [29] H. Ye, C. Owh, X. J. Loh, *RSC Advances* **2015**, *5*, 48720–48728.
- [30] I. H. Jaafar, M. M. Ammar, S. S. Jedlicka, R. A. Pearson, J. P. Coulter, I. H. Jaafar, J. P. Coulter, M. M. Ammar, Á. S. S. Jedlicka, R. A. Pearson, *J Mater Sci* **2010**, *45*, 2525–2529.
- [31] Y. Wang, Y. M. Kim, R. Langer, *Journal of Biomedical Materials Research* **2003**, *66A*, 192–197.
- [32] K. W. Lee, P. S. Gade, L. Dong, Z. Zhang, A. M. Aral, J. Gao, X. Ding, C. E. Stowell, M. U. Nisar, K. Kim, D. P. Reinhardt, M. G. Solari, V. S. Gorantla, A. M. Robertson, Y. Wang, *Biomaterials* **2018**, *181*, 67–80.
- [33] C. T. Ferrer, G. Vilariño-Feltrer, M. Rizk, H. G. Sydow, A. Vallés-Lluch, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* **2020**, *69*, 761–772.
- [34] C. C. Lau, M. K. Bayazit, J. C. Knowles, J. Tang, *Polymer Chemistry* **2017**, *8*, 3937–3947.
- [35] P. Piszko, M. Włodarczyk, S. Zielińska, M. Gazińska, P. Płociński, K. Rudnicka, A. Szwed, A. Krupa, M. Grzymajło, A. Sobczak-Kupiec, D. Słota, M. Kobielarz, M. Wojtków, K. Szustakiewicz, *International Journal of Molecular Sciences 2021 Vol. 22 Page 8587* **2021**, *22*, 8587.
- [36] Á. Conejero-García, H. R. Gimeno, Y. M. Sáez, G. Vilariño-Feltrer, I. Ortuño-Lizarán, A. Vallés-Lluch, *European Polymer Journal* **2017**, *87*, 406–419.
- [37] N. Fiedler, D. Arbeiter, S. Oschatz, N. Grabow, K. Lebahn, *Current Directions in Biomedical Engineering* **2021**, *7*, 684–687.
- [38] R. Kocen, M. Gasik, A. Gantar, S. Novak, *Biomedical Materials* **2017**, *12*, 025004.
- [39] D. Qiu, Y. He, Z. Yu, *Materials 2019 Vol. 12 Page 3385* **2019**, *12*, 3385.

- [40] L. L. Liu, F. C. Yi, W. Cai, *Advanced Materials Research* **2012**, 476-478, 2141–2144.
- [41] T. Theerathanagorn, B. Thavornytikarn, W. Janvikul, *Advanced Materials Research* **2013**, 747, 182–185.
- [42] S. Liang, W. D. Cook, Q. Chen, *Polymer International* **2012**, 61, 17–22.
- [43] S. H. Zaky, K. W. Lee, J. Gao, A. Jensen, K. Verdelis, Y. Wang, A. J. Almarza, C. Sfeir, *Acta biomaterialia* **2017**, 54, 95–106.
- [44] H.-p. Lee, L. Gu, D. J. Mooney, M. E. Levenston, O. Chaudhuri, *Nature Materials* **2017**, 16, 1243–1251.
- [45] O. Chaudhuri, L. Gu, M. Darnell, D. Klumpers, S. A. Bencherif, J. C. Weaver, N. Huebsch, D. J. Mooney, *Nature Communications* **2015**, 6, 6365.
- [46] O. Chaudhuri, L. Gu, D. Klumpers, M. Darnell, S. A. Bencherif, J. C. Weaver, N. Huebsch, H.-p. Lee, E. Lippens, G. N. Duda, D. J. Mooney, *Nature Materials* **2016**, 15, 326–334.
- [47] P. Piszko, B. Kryszak, A. Piszko, K. Szustakiewicz, *Polymers in Medicine* **2021**, 51.
- [48] L. Sun, Y. Ma, H. Niu, Y. Liu, Y. Yuan, C. Liu, L. Sun, Y. Ma, H. Niu, Y. Liu, Y. Yuan, C. Liu, *Advanced Functional Materials* **2021**, 31, 2008515.
- [49] G. Matyszczyk, M. Wrzeczonek, A. Gadomska-Gajadhur, P. Ruśkowski, *Organic Process Research and Development* **2020**, 24, 1104–1111.
- [50] Q. Z. Chen, A. Bismarck, U. Hansen, S. Junaid, M. Q. Tran, S. E. Harding, N. N. Ali, A. R. Boccaccini, *Biomaterials* **2008**, 29, 47–57.
- [51] R. Martín-Cabezuelo, J. C. Rodríguez-Hernández, G. Vilariño-Feltrer, A. Vallés-Lluch, *Polymers* **2021**, 13, 1–14.
- [52] B. Xiao, W. Yang, D. Lei, J. Huang, Y. Yin, Y. Zhu, Z. You, F. Wang, S. Sun, *Advanced Healthcare Materials* **2019**, 8, 1801455.
- [53] M. Nagata, T. Machida, W. Sakai, N. Tsutsumi, *Macromolecules* **1997**, 30, 6525–6530.

- [54] G. Tadayyon, K. Krukiewicz, J. Britton, A. Larrañaga, C. Vallejo-Giraldo, M. Fernandez-Yague, Y. Guo, G. Orpella-Aceret, L. Li, A. Poudel, M. J. Biggs, *Materials Science and Engineering C* **2021**, 121.
- [55] D. Singh, A. J. Harding, E. Albadawi, F. M. Boissonade, J. W. Haycock, F. Claeysens, *Acta Biomaterialia* **2018**, 78, 48–63.
- [56] P. Piszko, B. Kryszak, K. Szustakiewicz, *Acta of Bioengineering and Biomechanics* **2023**, 24.
- [57] L. Vogt, F. Ruther, S. Salehi, A. R. Boccaccini, *Advanced Healthcare Materials* **2021**, 10, 2002026.
- [58] A. Castro, US4247498A, **1981**.
- [59] C. Schugens, V. Maquet, C. Grandfils, R. Jerome, P. Teyssie, *Polymer* **1996**, 37, 1027–1038.
- [60] T. Lou, X. Wang, X. Yan, Y. Miao, Y. Z. Long, H. L. Yin, B. Sun, G. Song, *Materials Science and Engineering C* **2016**, 64, 341–345.
- [61] V. Sencadas, S. Sadat, D. M. Silva, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **2020**, 102, 103474.
- [62] A. Samourides, L. Browning, V. Hearnden, B. Chen, *Materials Science and Engineering C* **2020**, 108, 110384.
- [63] P. Kerativitayanan, A. K. Gaharwar, *Acta Biomaterialia* **2015**, 26, 34–44.
- [64] X. Yang, J. Wei, D. Lei, Y. Liu, W. Wu, *Biomaterials* **2016**, 88, 34–47.
- [65] X. Zhao, Y. Wu, Y. Du, X. Chen, B. Lei, Y. Xue, P. X. Ma, *Journal of Materials Chemistry B* **2015**, 3, 3222–3233.
- [66] L. Zhou, H. He, C. Jiang, S. He, *Journal of Applied Polymer Science* **2015**, 132.
- [67] H. Shi, Q. Gan, X. Liu, Y. Ma, J. Hu, Y. Yuan, C. Liu, *RSC Advances* **2015**, 5, 79703–79714.
- [68] D. Lin, B. Cai, L. Wang, L. Cai, Z. Wang, J. Xie, Q. X. Lv, Y. Yuan, C. Liu, S. G. Shen, *Biomaterials* **2020**, 253, 120095.

- [69] Z. Li, C. Wang, *One-Dimensional nanostructures*, Springer Berlin Heidelberg, **2013**.
- [70] S. Sant, C. M. Hwang, S.-H. Lee, A. Khademhosseini, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **2011**, *5*, 283–291.
- [71] S. Salehi, M. Fathi, S. H. Javanmard, T. Bahners, J. S. Gutmann, S. Ergün, K. P. Steuhl, T. A. Fuchsluger, *Macromolecular Materials and Engineering* **2014**, *299*, 455–469.
- [72] A. Tamayol, A. H. Najafabadi, P. Mostafalu, A. K. Yetisen, M. Commotto, M. Aldhahri, M. S. Abdel-wahab, Z. I. Najafabadi, S. Latifi, M. Akbari, N. Annabi, S. H. Yun, A. Memic, M. R. Dokmeci, A. Khademhosseini, *Scientific Reports* **2017**, *7*, 9220.
- [73] I. Apsite, G. Constante, M. Dulle, L. Vogt, A. Caspari, A. R. Boccaccini, A. Synytska, S. Salehi, L. Ionov, *Biofabrication* **2020**, *12*, 035027.
- [74] E. M. Jeffries, R. A. Allen, J. Gao, M. Pesce, Y. Wang, *Acta Biomaterialia* **2015**, *18*, 30–39.
- [75] A. Saudi, S. Amini, N. Amirpour, M. Kazemi, A. Z. Kharazi, H. Salehi, M. Rafienia, *Materials Science and Engineering: C* **2019**, *104*, 110005.
- [76] L. Sfakis, T. Kamaldinov, A. Khmaladze, Z. Hosseini, D. Nelson, M. Larsen, J. Castracane, *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, *19*, 1031.
- [77] A. Memic, M. Aldhahri, A. Tamayol, P. Mostafalu, M. Abdel-wahab, M. Samandari, K. Moghaddam, N. Annabi, S. Bencherif, A. Khademhosseini, *Nanomaterials* **2017**, *7*, 63.
- [78] X. Wu, L. Wang, H. Yu, Y. Huang, *Journal of Applied Polymer Science* **2005**, *97*, 1292–1297.
- [79] M. M. Rad, S. N. Khorasani, L. Ghasemi-Mobarakeh, M. P. Prabhakaran, M. R. Foroughi, M. Kharaziha, N. Saadatkish, S. Ramakrishna, *Materials Science and Engineering: C* **2017**, *80*, 75–87.
- [80] Y. Wang, Y. Xiao, Z. Chen, X. Leng, J. Ren, X. Jiang, *Science of Advanced Materials* **2018**, *10*, 1140–1146.
- [81] A. B. R. Touré, E. Mele, J. K. Christie, *Nanomaterials* **2020**, *10*, 626.

- [82] H. Shi, Z. Zhou, W. Li, Y. Fan, Z. Li, J. Wei, *Crystals 2021 Vol. 11 Page 149* **2021**, *11*, 149.
- [83] R. Zhao, P. Xie, K. Zhang, Z. Tang, X. Chen, X. Zhu, Y. Fan, X. Yang, X. Zhang, *Acta Biomaterialia* **2017**, *59*, 338–350.
- [84] V. P. Orlovskii, V. S. Komlev, S. M. Barinov, *Inorganic Materials* **2002**, *38*, 973–984.
- [85] A. Szcześ, L. Hołysz, E. Chibowski, *Advances in Colloid and Interface Science* **2017**, *249*, 321–330.
- [86] H. L. Oliveira, W. L. D. Rosa, C. E. Cuevas-Suárez, N. L. Carreño, A. F. da Silva, T. N. Guim, O. A. Dellagostin, E. Piva, *Calcified Tissue International* **2017**, *101*, 341–354.
- [87] R. Z. LeGeros, *Chemical Reviews* **2008**, *108*, 4742–4753.
- [88] M. M. Villa, L. Wang, J. Huang, D. W. Rowe, M. Wei, *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* **2015**, *103*, 243–253.
- [89] H. Liu, G. W. Xu, Y. F. Wang, H. S. Zhao, S. Xiong, Y. Wu, B. C. Heng, C. R. An, G. H. Zhu, D. H. Xie, *Biomaterials* **2015**, *49*, 103–112.
- [90] H. L. Kim, G. Y. Jung, J. H. Yoon, J. S. Han, Y. J. Park, D. G. Kim, M. Zhang, D. J. Kim, *Materials Science and Engineering: C* **2015**, *54*, 20–25.
- [91] Y. Kato, H. Tsuchida, K. Dohara, al -, G. O. Bamigboye, F. Oderinde, A. Pal, S. Maity, S. Chabri, S. Bera, A. R. Chowdhury, M. Das, A. Sinha, M. N. Dastur, *Biomedical Physics & Engineering Express* **2017**, *3*, 015010.
- [92] D. L. Goloshchapov, V. M. Kashkarov, N. A. Rumyantseva, P. V. Seredin, A. S. Lenshin, B. L. Agapov, E. P. Domashevskaya, *Ceramics International* **2013**, *39*, 4539–4549.
- [93] H. Maleki-Ghaleh, E. Aghaie, A. Nadernezhad, M. Zargarzadeh, A. Khakzad, M. S. Shakeri, Y. B. Khosrowshahi, M. H. Siadati, *Journal of Materials Engineering and Performance* **2016**, *25*, 2331–2339.
- [94] M. Safarzadeh, S. Ramesh, C. Y. Tan, H. Chandran, A. F. M. Noor, S. Krishnasamy, U. J. Alengaram, *Ceramics International* **2019**, *45*, 3473–3477.

- [95] D. Arcos, M. Vallet-Regí, *Journal of Materials Chemistry B* **2020**, *8*, 1781–1800.
- [96] X. Luo, D. Barbieri, N. Davison, Y. Yan, J. D. D. Bruijn, H. Yuan, *Acta Biomaterialia* **2014**, *10*, 477–485.
- [97] A. E. Porter, N. Patel, J. N. Skepper, S. M. Best, W. Bonfield, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4609–4620.
- [98] T. J. Webster, C. Ergun, R. H. Doremus, R. Bizios, *Journal of Biomedical Materials Research* **2002**, *59*, 312–317.
- [99] F. C. Driessens, M. G. Boltong, E. A. D. Maeyer, R. Wenz, B. Nies, J. A. Planell, *Biomaterials* **2002**, *23*, 4011–4017.
- [100] H. Zhang, Q. W. Fu, T. W. Sun, F. Chen, C. Qi, J. Wu, Z. Y. Cai, Q. R. Qian, Y. J. Zhu, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2015**, *136*, 27–36.
- [101] F. C. Pavia, G. Conoscenti, S. Greco, V. L. Carrubba, G. Gherzi, V. Brucato, *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *119*, 945–953.
- [102] C. E. Corcione, F. Gervaso, F. Scalera, S. K. Padmanabhan, M. Madaghiele, F. Montagna, A. Sannino, A. Licciulli, A. Maffezzoli, *Ceramics International* **2019**, *45*, 2803–2810.
- [103] K. M. Nampoothiri, N. R. Nair, R. P. John, *Bioresource Technology* **2010**, *101*, 8493–8501.
- [104] F. Danhier, E. Ansorena, J. M. Silva, R. Coco, A. L. Breton, V. Prêat, *Journal of Controlled Release* **2012**, *161*, 505–522.
- [105] P. D. Fisher, G. Venugopal, T. A. Milbrandt, J. Z. Hilt, D. A. Puleo, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2015**, *103*, 2365–2373.
- [106] M. Okamoto, B. John, *Progress in Polymer Science* **2013**, *38*, 1487–1503.
- [107] A. Saudi, S. M. Zebarjad, H. Salehi, E. Katoueizadeh, A. Alizadeh, *Materials Chemistry and Physics* **2022**, *275*, 125224.
- [108] A. I. Rezk, K. S. Kim, C. S. Kim, *Polymers 2020 Vol. 12 Page 2667* **2020**, *12*, 2667.
- [109] J. Safari, Z. Zarnegar, *Journal of Saudi Chemical Society* **2014**, *18*, 85–99.

- [110] B. Yang, W. Lv, Y. Deng, *RSC Adv.* **2017**, *7*, 37426–37435.
- [111] Z. J. Sun, C. Chen, M. Z. Sun, C. H. Ai, X. L. Lu, Y. F. Zheng, B. F. Yang, D. L. Dong, *Biomaterials* **2009**, *30*, 5209–5214.
- [112] I. S. Tobias, H. Lee, G. C. E. Jr., D. Macaya, C. J. Bettinger, M. J. Cima, *Journal of Controlled Release* **2010**, *146*, 356–362.
- [113] S. F. Williams, D. P. Martin, D. M. Horowitz, O. P. Peoples, *International Journal of Biological Macromolecules* **1999**, *25*, 111–121.
- [114] R. Lanza, *Principles of tissue engineering*, Academic Press, **2020**.
- [115] B. A. Badeau, M. P. Comerford, C. K. Arakawa, J. A. Shadish, C. A. DeForest, *Nature Chemistry* **2018**, *10*, 251–258.
- [116] B. M. Watson, F. K. Kasper, P. S. Engel, A. G. Mikos, *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 1788–1796.
- [117] B. M. Watson, T. N. Vo, A. M. Tatara, S. R. Shah, D. W. Scott, P. S. Engel, A. G. Mikos, *Biomaterials* **2015**, *67*, 286–296.
- [118] P. Y. Talouki, R. Tamimi, S. Z. Benisi, V. Goodarzi, S. Shojaei, S. H. takkalou, H. R. Samadikhah, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* **2022**.
- [119] Q.-Z. Chen, H. Ishii, G. A. Thouas, A. R. Lyon, J. S. Wright, J. J. Blaker, W. Chrzanowski, A. R. Boccaccini, N. N. Ali, J. C. Knowles, S. E. Harding, *Biomaterials* **2010**, *31*, 3885–3893.
- [120] R. Rai, M. Tallawi, C. Frati, A. Falco, A. Gervasi, F. Quaini, J. A. Roether, T. Hochburger, D. W. Schubert, L. Seik, N. Barbani, L. Lazzeri, E. Rosellini, A. R. Boccaccini, *Advanced Healthcare Materials* **2015**, *4*, 2012–2025.
- [121] S. LUV, A. CHAURASIA, *Patent Application*, WO 2022/146236 A1 (World Intellectual Property Organization), **2022**.
- [122] V. C. Mow, X. E. Guo, *Annual Review of Biomedical Engineering* **2002**, *4*, 175–209.
- [123] C. G. Jeong, S. J. Hollister, *Biomaterials* **2010**, *31*, 4304–4312.
- [124] J. M. Kemppainen, S. J. Hollister, *Journal of biomedical materials research. Part A* **2010**, *94*, 9–18.

- [125] Y. Liu, K. Tian, J. Hao, T. Yang, X. Geng, W. Zhang, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2019**, *30*.
- [126] A. Mahdavi, L. Ferreira, C. Sundback, J. W. Nichol, E. P. Chan, D. J. D. Carter, C. J. Bettinger, S. Patanavanich, L. Chignozha, E. Ben-Joseph, A. Galakatos, H. Pryor, I. Pomerantseva, P. T. Masiakos, W. Faquin, A. Zumbuehl, S. Hong, J. Borenstein, J. Vacanti, R. Langer, J. M. Karp, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105*, 2307–2312.
- [127] P. Shirazaki, J. Varshosaz, A. Z. Kharazi, *Advanced biomedical research* **2017**, *6*, 105.
- [128] N. Bhardwaj, D. Chouhan, B. B. Mandal, *Current Pharmaceutical Design* **2017**, *23*.
- [129] A. R. Amini, C. T. Laurencin, S. P. Nukavarapu, *Critical Reviews in Biomedical Engineering* **2012**, *40*, 363–408.
- [130] G. L. Koons, M. Diba, A. G. Mikos, *Nature Reviews Materials* **2020**, *5*, 584–603.
- [131] C. R. M. Black, V. Goriainov, D. Gibbs, J. Kanczler, R. S. Tare, R. O. C. Oreffo, *Current Molecular Biology Reports* **2015**, *1*, 132–140.
- [132] D. W. Hutmacher, *Biomaterials* **2000**, *21*, 2529–2543.
- [133] E. Seeman, P. D. Delmas, *New England Journal of Medicine* **2006**, *354*, 2250–2261.
- [134] P. Habibovic, K. de Groot, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **2007**, *1*, 25–32.
- [135] A. Barradas, H. Yuan, C. van Blitterswijk, P. Habibovic, *European Cells and Materials* **2011**, *21*, 407–429.
- [136] J. Sowjanya, J. Singh, T. Mohita, S. Sarvanan, A. Moorthi, N. Srinivasan, N. Selvamurugan, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, *109*, 294–300.
- [137] N. Rucci, *Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis Mineral Metabolism and Skeletal Diseases* **2008**, *5*, 49–56.

- [138] S. Bose, M. Roy, A. Bandyopadhyay, *Trends in Biotechnology* **2012**, *30*, 546–554.
- [139] K. Gelse, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, *55*, 1531–1546.
- [140] M. Tavafoghi, M. Cerruti, *Journal of The Royal Society Interface* **2016**, *13*, 20160462.
- [141] W. J. Landis, R. Jacquet, *Calcified Tissue International* **2013**, *93*, 329–337.
- [142] J. A. Burdick, K. S. Anseth, *Biomaterials* **2002**, *23*, 4315–4323.
- [143] H. Huang, Y. Zhao, Z. Liu, Y. Zhang, H. Zhang, T. Fu, X. Ma, *Journal of Oral Implantology* **2003**, *29*, 73–79.
- [144] M. C. Durrieu, S. Pallu, F. Guillemot, R. Bareille, J. Amédée, C. Baquey, C. Labrugre, M. Dard, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2004**, *15*, 779–786.
- [145] M. Gilbert, W. J. Shaw, J. R. Long, K. Nelson, G. P. Drobny, C. M. Giachelli, P. S. Stayton, *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 16213–16218.
- [146] K. M. Hennessy, B. E. Pollot, W. C. Clem, M. C. Phipps, A. A. Sawyer, B. K. Culpepper, S. L. Bellis, *Biomaterials* **2009**, *30*, 1898–1909.
- [147] H. Ceylan, S. Kocabey, H. U. Gulsuner, O. S. Balcik, M. O. Guler, A. B. Tekinay, *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 2407–2418.
- [148] Y. Hamada, K. Yuki, M. Okazaki, W. Fujitani, T. Matsumoto, M. K. Hashida, K. Harutsugu, K. Nokihara, M. Daito, N. Matsuura, J. Takahashi, *Dental Materials Journal* **2004**, *23*, 650–655.
- [149] K. M. Park, Y. Lee, J. Y. Son, J. W. Bae, K. D. Park, *Bioconjugate Chemistry* **2012**, *23*, 2042–2050.
- [150] N. K. Lee, H. Sowa, E. Hinoi, M. Ferron, J. D. Ahn, C. Confavreux, R. Dacquin, P. J. Mee, M. D. McKee, D. Y. Jung, Z. Zhang, J. K. Kim, F. Mauvais-Jarvis, P. Ducy, G. Karsenty, *Cell* **2007**, *130*, 456–469.
- [151] S. Bharadwaj, A. G. T. Naidu, G. V. Betageri, N. V. Prasadarao, A. S. Naidu, *Osteoporosis International* **2009**, *20*, 1603–1611.
- [152] P. Lekic, J. Sodek, C. A. G. McCulloch, *The Anatomical Record* **1996**, *244*, 50–58.

- [153] A. Agarwal, N. Singh, M. Khan, S. M. N. Khan, K. Sahu, S. Jadhav, *International Journal of Preventive and Clinical Dental Research* **2020**, *7*, 69.
- [154] A. Reddi, *Cytokine & Growth Factor Reviews* **2005**, *16*, 249–250.
- [155] A. H. Reddi, A. Reddi, *Cytokine & Growth Factor Reviews* **2009**, *20*, 341–342.
- [156] S. M. Barbalho, A. C. Araújo, C. R. P. Detregiachi, D. V. Buchaim, É. L. Guiguer, *Alternative therapies in health and medicine* **2019**, *25*, 32–39.
- [157] P. S. Bafna, P. H. Patil, S. K. Maru, R. E. Mutha, *Journal of Ethnopharmacology* **2021**, *279*, 114355.
- [158] P. X. Ma, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60*, 184–198.
- [159] A. Tevlek, P. Hosseinian, C. Ogutcu, M. Turk, H. M. Aydin, *Materials Science and Engineering: C* **2017**, *72*, 316–324.
- [160] Y. Wang, N. Sun, Y. Zhang, B. Zhao, Z. Zhang, X. Zhou, Y. Zhou, H. Liu, Y. Zhang, J. Liu, *Scientific Reports 2019 9:1* **2019**, *9*, 1–10.
- [161] P. G. J, T. ZEHRA, *Patent Application*, US 2016/0158408 A1 (United States), **2016**.
- [162] H. J. J, N. C. BRENDAN, G. P. D, E. JARED, G. BRIAN, *Patent Application*, WO 2019/152582 A1 (World Intellectual Property Organization), **2019**.
- [163] G. R. S, *Patent Application*, US 2021/0401580 A1 (United States), **2021**.
- [164] Q. L. Loh, C. Choong, *Tissue Engineering - Part B: Reviews* **2013**, *19*, 485–502.
- [165] M. Prakasam, J. Locs, K. Salma-Ancane, D. Loca, A. Largeteau, L. Berzina-Cimdina, *Journal of Functional Biomaterials* **2015**, *6*, 1099–1140.
- [166] X. L. Guo, X. L. Lu, D. L. Dong, Z. J. Sun, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2014**, *102*, 3903–3907.
- [167] Q. Liu, M. Tian, T. Ding, R. Shi, Y. Feng, L. Zhang, D. Chen, W. Tian, *Journal of Applied Polymer Science* **2007**, *103*, 1412–1419.
- [168] L. Sperling, *Introduction to Physical Polymer Science*, Wiley, **2005**, s. 1–845.

- [169] X. Zhang, C. Jia, X. Qiao, T. Liu, K. Sun, *Polymer Testing* **2016**, *54*, 118–125.
- [170] D. Słota, W. Florkiewicz, K. Piętak, A. Szwed, M. Włodarczyk, M. Siwińska, K. Rudnicka, A. Sobczak-Kupiec, *Materials 2021 Vol. 14 Page 6000* **2021**, *14*, 6000.
- [171] H. Omidian, S. A. Hashemi, P. G. Sammes, I. Meldrum, *Polymer* **1998**, *39*, 6697–6704.
- [172] N. Moini, K. Kabiri, *Iranian Polymer Journal (English Edition)* **2015**, *24*, 977–987.
- [173] K. Kabiri, H. Omidian, S. A. Hashemi, M. J. Zohuriaan-Mehr, *European Polymer Journal* **2003**, *39*, 1341–1348.
- [174] K. Pluta, W. Florkiewicz, D. Malina, K. Rudnicka, S. Michlewska, J. B. Królczyk, A. Sobczak-Kupiec, *Measurement* **2021**, *171*, 108733.
- [175] V. T. Wyatt, G. D. Strahan, *Polymers* **2012**, *4*, 396–407.
- [176] Z. Ning, K. Lang, K. Xia, R. J. Linhardt, R. A. Gross, *Biomacromolecules* **2022**, *23*, 398–408.
- [177] A. S. Kulshrestha, W. Gao, R. A. Gross, *Macromolecules* **2005**, *38*, 3193–3204.
- [178] K. Lang, S. Bhattacharya, Z. Ning, R. J. Sánchez-Leija, M. T. Bramson, R. Centore, D. T. Corr, R. J. Linhardt, R. A. Gross, *Biomacromolecules* **2020**, *21*, 3197–3206.
- [179] T. Kulschewski, F. Sasso, F. Secundo, M. Lotti, J. Pleiss, *Journal of Biotechnology* **2013**, *168*, 462–469.
- [180] H. F. Carvalho, V. Ferrario, J. Pleiss, *Journal of Chemical Theory and Computation* **2021**, *17*, 6570–6582.
- [181] X. Fang, Y. Zhan, J. Yang, D. Yu, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2014**, *104*, 1–7.
- [182] K. R. Yoon, S.-P. Hong, B. Kong, I. S. Choi, *Synthetic Communications* **2012**, *42*, 3504–3512.

- [183] R. Maliger, P. J. Halley, J. J. Cooper-White, *Journal of Applied Polymer Science* **2013**, *127*, 3980–3986.
- [184] A. Michelot, S. Sarda, C. Audin, E. Deydier, E. Manoury, R. Poli, C. Rey, *Journal of Materials Science* **2015**, *50*, 5746–5757.
- [185] M. Markovic, B. O. Fowler, M. S. Tung, Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite reference material, **2004**, s. 553–568.
- [186] A. Gadomska-Gajadhur, M. Wrzeciećek, G. Matyszczyk, P. Pietowski, M. Wiećław, P. Rućkowski, *Organic Process Research and Development* **2018**, *22*, 1793–1800.
- [187] K. K. Jena, K. V. Raju, B. Prathab, T. M. Aminabhavi, *Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111*, 8801–8811.
- [188] T. Calvo-Correas, N. Gabilondo, A. Alonso-Varona, T. Palomares, M. A. Corcuera, A. Eceiza, *European Polymer Journal* **2016**, *78*, 253–263.
- [189] D. Manzanedo, S. M. Allen, **2006**.
- [190] R. Riaz, S. R. Abbas, M. Iqbal, *Journal of Applied Polymer Science* **2022**, *139*, 51963.
- [191] M. H. Aghajan, M. Panahi-Sarmad, N. Alikarami, S. Shojaei, A. Saeidi, H. A. Khonakdar, M. Shahrousvan, V. Goodarzi, *European Polymer Journal* **2020**, *131*.
- [192] H. M. Aydin, K. Salimi, M. Yilmaz, M. Turk, Z. M. O. Rzayev, E. Pişkin, *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* **2016**, *10*, E14–22.
- [193] S. H. Daryan, A. Khavandi, J. Javadpour, *Solid State Sciences* **2020**, *106*, 106301.
- [194] K. Szustakiewicz, M. Gazińska, B. Kryszak, M. Grzymajło, J. Pięłowski, R. J. Wiglusz, M. Okamoto, *European Polymer Journal* **2019**, *113*, 313–320.
- [195] N. Miyata, K.-i. Fuke, Q. Chen, M. Kawashita, T. Kokubo, T. Nakamura, *Biomaterials* **2002**, *23*, 3033–3040.
- [196] S.-H. Rhee, *Biomaterials* **2004**, *25*, 1167–1175.

- [197] L. M. Mathieu, P. E. Bourban, J. A. Månson, *Composites Science and Technology* **2006**, *66*, 1606–1614.
- [198] F. G. Torres, S. N. Nazhat, S. H. S. M. Fadzullah, V. Maquet, A. R. Boccacini, *Composites Science and Technology* **2007**, *67*, 1139–1147.
- [199] V. Fakhri, A. Jafari, M. A. Shafiei, M. V. Ehteshamfar, S. Khalighiyan, H. Hosseini, V. Goodarzi, F. R. Wurm, M. M. Moghaddam, H. A. Khonakdar, *Polymer Chemistry* **2021**, *12*, 6263–6282.
- [200] M. Monem, Z. Ahmadi, V. Fakhri, V. Goodarzi, *Journal of Polymer Research* **2022**, *29*.
- [201] A. Sobczak-Kupiec, K. Pluta, A. Drabczyk, M. Włoś, B. Tyliczszak, *Ceramics International* **2018**, *44*, 13630–13638.
- [202] D. Słota, M. Głab, B. Tyliczszak, T. E. Dogulas, K. Rudnicka, K. Miernik, M. M. Urbaniak, P. Rusek-Wala, A. Sobczak-upiec, *Materials 2021 Vol. 14 Page 2317* **2021**, *14*, 2317.
- [203] Lenntech, <https://www.lenntech.com/applications/ultrapure/conductivity/water-conductivity.html>, (Term. wiz. 27.05.2023).
- [204] T. R. Kuo, C. H. Chen, *Biomarker Research* **2017**, *5*.
- [205] S. Jain, P. Camacho, *Current opinion in endocrinology diabetes and obesity* **2018**, *25*, 366–372.
- [206] S. Vimalraj, *Gene* **2020**, *754*.
- [207] E. Galliera, M. Locati, A. Mantovani, M. M. Corsi, *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* **2008**, *21*, 485–491.
- [208] D. S. Amarasekara, S. Kim, J. Rho, *International Journal of Molecular Sciences 2021 Vol. 22 Page 2851* **2021**, *22*, 2851.
- [209] Y. M. Lee, N. Fujikado, H. Manaka, H. Yasuda, Y. Iwakura, *International Immunology* **2010**, *22*, 805–816.
- [210] Q. Wu, X. Zhou, D. Huang, Y. Ji, F. Kang, *Cellular Physiology and Biochemistry* **2017**, *41*, 1360–1369.
- [211] *Interface Oral Health Science 2007*, (red.: M. Watanabe, O. Okuno, K. Sasaki, N. Takahashi, O. Suzuki, H. Takada), Springer Japan, **2007**.

- [212] M. Wong, D. Ziring, Y. Korin, S. Desai, S. Kim, J. Lin, D. Gjertson, J. Braun, E. Reed, R. R. Singh, *Clinical Immunology* **2008**, *126*, 121–136.
- [213] Q. Zhang, B. Chen, F. Yan, J. Guo, X. Zhu, S. Ma, W. Yang, *BioMed Research International* **2014**, *2014*.
- [214] S. S. Nasiri, Z. Ahmadi, F. Afshar-Taromi, *Life Sciences* **2023**, *312*, 121203.

6. Appendix

6.1 Podsumowanie działalności naukowej

Osiągnięcia uzyskane w czasie realizacji doktoratu (10.2019-06.2023)

Stan dorobku naukowego na dzień: 20.06.2023

Publikacje naukowe

- Piszko P, Włodarczyk M, Zielińska S, Gazińska M, Płociński P, Rudnicka K, Szwed A, Krupa A, Grzymajło M, Sobczak-Kupiec A et al. PGS/HAp Microporous Composite Scaffold Obtained in the TIPS-TCL-SL Method: An Innovation for Bone Tissue Engineering. *Int. J.Mol. Sci.* 2021, 22, 8587.
DOI: 10.3390/ijms22168587, (140 pkt. MEiN, IF = 6.208)
- Piszko P, Kryszak B., Gazińska M., Słota D., Sobczak-Kupiec A., Włodarczyk M., Szwed-Gergiou A., Rudnicka K., Szustakiewicz K. The effect of filler content on mechanical properties and cell response of elastomeric PGS/apatite foam scaffolds. *Ceram. Int.* 2023.
DOI: 10.1016/j.ceramint.2023.05.071, (100 pkt. MEiN, IF = 5.532)
- Piszko P., Kryszak B., Szustakiewicz K.; Influence of cross-linking time on physico-chemical and mechanical properties of bulk poly(glycerol sebacate). *Acta Bioeng Biomech.* 2023, 24(4).
DOI: 10.37190/ABB-02208-2023-04, (100 pkt. MEiN, IF = 1.238)

- Piszko P, Kryszak B, Piszko A, Szustakiewicz K. Brief review on poly(glycerol sebacate) as an emerging polyester in biomedical application: Structure, properties and modifications. *Polim Med.* 2021, 51(1), 43-50.

DOI: 10.17219/pim/139585, (**70 pkt. MEiN**)

- Skorulska A, Piszko P, Rybak Z, Szymonowicz M, Dobrzyński M. Review on Polymer, Ceramic and Composite Materials for CAD/CAM Indirect Restorations in Dentistry—Application, Mechanical Characteristics and Comparison. *Materials* 2021, 14, 1592.

DOI: 10.3390/ma14071592, (**140 pkt. MEiN, IF = 3.748**)

- Raducka M, Piszko A, Piszko P.J, Jawor N, Dobrzynski M, Grzebieluch W, Mikulewicz M, Skośkiewicz-Malinowska K. Narrative Review on Methods of Activating Irrigation Liquids for Root Canal Treatment. *Preprints.org* 2023, 2023052184.

DOI: 10.20944/preprints202305.2184.v1, (**Preprint**)

Indeks Hirscha oraz ilość cytowań

Indeks Hirscha (h-index) oraz ilość cytowań wg. baz danych:

- Web of Science: h-index = 2, ilość cytowań = 42
- Google Scholar: h-index = 3, ilość cytowań = 96
- Scopus: h-index = 3, ilość cytowań = 62

Krajowe zgłoszenia patentowe

- **P.443750**; Porowate elastomerowe aktywne biologicznie kompozyty polimerowo-ceramiczne do wypełniania ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej oraz sposób ich wytwarzania
- **P.443751**; Lite elastomerowe aktywne biologicznie kompozyty polimerowo-ceramiczne oraz sposób ich wytwarzania
- **P.443752**; Biozgodne porowate materiały elastomerowe na bazie poli(sebacynianu glicerolu) przeznaczone do zastosowania jako materiał

implantacyjny do wypełniania ubytków kostnych, materiał powłokowy do zastosowań biomedycznych tkanki kostnej i do regeneracji tkanki kostnej oraz sposób ich wytwarzania

- **P.443753**; Biozgodne lite materiały elastomerowe na bazie poli(sebacynianu glicerolu) przeznaczone do zastosowania jako materiał implantacyjny do wypełniania ubytków kostnych, materiał powłokowy do zastosowań biomedycznych tkanki kostnej i do regeneracji tkanki kostnej oraz sposób ich wytwarzania
- **P.443754**; Hybrydowa pochodna poli(sebacynianu) glicerolu oraz sposób jej wytwarzania

Udział w projektach

- Stypendysta w projekcie TEAM-NET Fundacji na rzecz Nauki Polskiej pt. "Wielofunkcyjne kompozyty aktywne biologicznie do zastosowań w medycynie regeneracyjnej układu kostnego" finansowanym ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego, w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014-2020 (PO IR), Oś IV: Zwiększenie potencjału naukowo- badawczego, Działanie 4.4.: Zwiększanie potencjału kadrowego sektora B+R (nr. POIR.04.04.00-00-16D7/18-00, kwota finansowania: PLN 13,989,500). Okres pobierania stypendium: 03.2020-02.2023.
- Grant wyjazdowy (MLU Halle, Niemcy) w ramach programu STER Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej w zakresie realizowanego w Politechnice Wrocławskiej projektu InterDocSchool umiędzynarodowienia Szkół Doktorskich - 01-31.10.2021.

Wybrane wystąpienia konferencyjne

- Wtryskiwane kompozyty PCL/modyfikowany apatyt o potencjale w inżynierii tkanki kostnej, IV Ogólnopolska Konferencja Naukowa IMPLANTY 2022, 27-28.05.2022 (**Poster**)
- CALB-mediated enzymatic synthesis of poly(glycerol sebacate) prepolymer: investigating a synthesis of a novel prepolymer for tissue engineering, Silesian Meetings on Polymer Materials POLYMAT 2022, 17.03.2022 (**Poster**)

- Porowate kompozyty na bazie poli(sebacynianu gliceryny) oraz hydroksypapieru formowane metodą termicznie indukowanej separacji fazowej, XXV Konferencja Naukowa „Modyfikacja Polimerów”, 06.09.2021 (**Wystąpienie ustne**)
- Life support system in a remote Mars colony, 4th International Wrocław Scientific Meetings, 09-10.10.2020 (**Wystąpienie ustne**)
- Poli(sebacynian glicerolu) do zastosowań w inżynierii tkankowej - synteza i właściwości, II Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Biopolimery - źródło nowych materiałów", 10.12.2020 (**Wystąpienie ustne**)

Wybrane rozdziały w monografiach konferencyjnych

- Szustakiewicz K. et al. Multifunctional composites biologically active for applications in regenerative medicine of bone system, Interdisciplinary FNP Conference, Foundation for Polish Science, 1, 2022
- Piszko A. et al. The dental sealants - a comparison of physico-chemical properties of commercially available materials, 1st International Conference on Advanced Materials for Bio-related Applications, AMBRA, Institute of Low Temperature and Structure Research of the Polish Academy of Sciences and the Wrocław University of Science and Technology. PAS, 81, 2022
- Piszko P. et al. CALB-mediated enzymatic synthesis of poly(glycerol sebacate) prepolymer: investigating a synthesis of a novel prepolymer for tissue engineering, Silesian Meetings on Polymer Materials, POLYMAT 2022, Polish Academy of Sciences Centre of Polymer and Carbon Materials. Zabrze : Centre of Polymer and Carbon Materials. PAS, 57-57, 2022
- Skorulska A. et al., Charakterystyka współczesnych materiałów ceramicznych oraz kompozytowych wykorzystywanych w technologii CAD/CAM w stomatologii, II Sympozjum: Biomateriały w medycynie i kosmetologii, 66-66, 2021
- Zielińska S. et al., Akrylowe pochodne poli(sebacynianu glicerolu) do zastosowań w inżynierii tkankowej, Modyfikacja polimerów: stan i perspektywy w roku 2021, Wydawnictwo TEMPO, 388-391, 2021

- Piszko A. et al., Kompozytowe materiały stomatologiczne z matrycą polimerową stosowane w technologii CAD/CAM, Modyfikacja polimerów: stan i perspektywy w roku 2021, Wydawnictwo TEMPO, 254-255, 2021
- Piszko P. et al., Life support system in a remote Mars colony, 4th International Wrocław Scientific Meetings, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, 194-195, 2020

Rozdziały w książkach

- Solaniuk A., Wójcik A., Kuźma J., Ćwilichowska N., Lis K., Małkowski S., Szczotkowski D., Łój S., Savystkyi O., Liśkiewicz D., Fikus W., Nalewaj J., Jurga A., Orzechowski L., Drozd B., Górniak P., Ratajczak K., Piszko P., Piórunk M.; Twardowsky Colony; Mars colonies: plans for settling the red planet; Lakewood: Polaris Books; 537-566; 2019

Staż

- Dwutygodniowy staż w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej Uniwersytetu Łódzkiego w ramach projektu TEAM-NET dotyczący badań bezpieczeństwa biologicznego materiałów na bazie poli(sebacynianu gliceryny) na modelach *in vitro* (08.2021).
- Miesięczny staż w Martin Luther University of Halle-Wittenberg (Niemcy) dotyczący enzymatycznej syntezy poliestrów, finansowanie z programu STER Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej (10.2021)
- Miesięczny staż w Katedrze Inżynierii Materiałowej Politechniki Krakowskiej w ramach projektu TEAM-NET dotyczący syntezy hydroksyapatytu oraz badań inkubacyjnych porowatych kompozytów poli(sebacynian gliceryny)/hydroksyapatyt (11.2022)

Szkolenia

- 3rd International Summer School on Fatigue and Damage Mechanics of Composite Materials, 04-08.07.2022, Univeristy of Padua, Vicenza, Włochy

6.2 Spis rysunków

1	Liczba publikacji naukowych dotyczących poli(sebacynianu gliceryny), które ukazały się w latach 2002-2023. Źródło: baza danych Web of Science (dostęp 20.03.2023), wyszukiwanie pod hasłem: poly(glycerol sebacate).	11
2	Schemat uzyskiwania prepolimeru oraz sieciowania poli(sebacynianu gliceryny).	12
3	Schemat przedstawiający głównie techniki formowania PGS oraz główne obszary jego wykorzystania.	14
4	Schemat przedstawiający formowanie materiału polimerowego z wykorzystaniem technik rozpuszczalnikowych oraz porogenu. Schemat utworzony za pomocą BioRender.com	18
5	Schemat przedstawiający regenerację tkanki kostnej zajętej osteoporozą z wykorzystaniem modyfikowanego <i>scaffoldu</i> polimerowego. Rysunek utworzony za pomocą BioRender.com	28
6	Schemat enzymatycznej syntezy pPGS, katalizowanej CALB, z dwóch monomerów sebacynowych (SA i DMS).	32
7	Schemat formowania porowatych <i>scaffoldów</i> PGS/HAp techniką TIPS-TCL-SL.	33
8	Schemat formowania litego PGS.	34
9	Schemat przedstawiający badanie potencjału osteokonduktywnego <i>scaffoldów</i> PGS oraz PGS/HAp 75/25 względem ludzkich preosteoblastów linii hFOB 1.19.	46
10	Schemat przedstawiający syntezę prepolimeru, formowanie materiałów oraz plan eksperymentów przeprowadzonych na porowatych <i>scaffoldach</i> na bazie PGS. Schemat utworzony za pomocą BioRender.com	50
11	Schemat przedstawiający syntezę prepolimeru, formowanie materiałów oraz plan eksperymentów przeprowadzonych na litym PGS. Schemat utworzony za pomocą BioRender.com	51

- 12 Fotografia przykładowych materiałów wytworzonych w toku realizacji pracy. Na fotografii A znajdują się porowate materiały na bazie PGS, a na fotografii B lite cylindry z PGS. 52
- 13 Przykładowe rozwiązanie struktury prepolimeru pPGS techniką ^1H NMR. Materiał otrzymano na drodze syntezy enzymatycznej w 40°C przez 24h. Rozwiązanie struktury obejmuje przypisanie pików do konkretnych atomów oraz wyróżnienie substruktur liniowych (1,3L;1,2L), dendrymerycznej (1,2,3D), oraz terminalnych (1T i 2T). 53
- 14 Zmiany w intensywności sygnałów widm ^1H NMR dla reakcji GLY i SA prowadzonej w temperaturach 40, 50 oraz 60°C . Wykresy przedstawiają zakresy przesunięcia chemicznego 2,2-2,4 (A), 3,65-3,9 (B), 4,6-5,4 (C) oraz 4,3-4,4 (D). 55
- 15 Zmiany w intensywności sygnałów widm ^1H NMR dla reakcji GLY i SA prowadzonej w temperaturach 40, 50 i 60°C . Wykresy przedstawiają zakresy przesunięcia chemicznego 2,2-2,4 (A), 3,65-3,9 (B), 4,6-5,4 (C) oraz 4,3-4,4 (D). 58
- 16 Widma FT-IR monomerów wykorzystywanych do syntezy pPGS (SA, DMS, GLY) oraz HAp wykorzystywanego do wytwarzania porowatych kompozytów. 59
- 17 Widma FT-IR dla prepolimeru pPGS oraz litego materiału sieciowanego przez 84h (PGS 84h) i 168h (PGS 168h) wraz z zaznaczonym obszarem występowania grupy karbonylowej (A), dekonwolucja pasma karbonylowego z dopasowaniem Gaussowskim (B), stosunek intensywności pasma pochodzącego od wolnych oraz związanych wiązań wodorowych grup karbonylowych (C) oraz schemat przedstawiający spadek w udziale wiązań wodorowych podczas sieciowania (D). 61
- 18 Widma FT-IR dla prepolimeru pPGS oraz pianek PGS i PGS/HAp zawierających 10, 20 i 30wt.% HAp (A), przybliżenie widm na zakres $1780\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ (B) oraz na obszar $1300\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ (C). 62

- 19 Widma FT-IR prepolimerów PGS otrzymanych po 2, 12 i 24h syntezy enzymatycznej w 40, 50 oraz 60°C z wykorzystaniem SA (A i B) oraz DMS (C i D) jako monomerów. Na Rysunkach B i D zostało przedstawione zbliżenie na ewolucję pasma karbonylowego w zakresie 1600-1780 cm⁻¹. 64
- 20 Krzywe DSC podczas grzania (A) oraz chłodzenia (B) dla produktów reakcji enzymatycznych po 24h. Pomiar był prowadzony w zakresie temperatur -70;200°C. Na wykresach przedstawiono tylko zakresy, w których wystąpiły istotne zmiany w przepływie ciepła. 65
- 21 Fotografie z polaryzacyjnego mikroskopu optycznego zarejestrowane podczas ogrzewania prepolimeru PGS od -40°C do 60°C. Fotografie zarejestrowano w -40°C (A) oraz w 20°C (B). 67
- 22 Krzywe DSC podczas ogrzewania (A) oraz chłodzenia (B) dla *scaffoldów* PGS oraz PGS/HAp sieciowanych przez 168h w 130°C. Pomiar był prowadzony w zakresie temperatur -70;200°C. Na wykresach przedstawiono tylko zakresy, w których wystąpiły istotne zmiany w przepływie ciepła. 68
- 23 Krzywe DSC podczas grzania (A) oraz chłodzenia (B) dla pPGS oraz litych materiałów wykonanych z PGS sieciowanych przez 84 oraz 168h w 130°C. Pomiar był prowadzony w zakresie temperatur -70;200°C. Na wykresach przedstawiono tylko zakresy, w których wystąpiły istotne zmiany w przepływie ciepła. 70
- 24 Krzywe TGA dla pPGS zsyntezowanych z dwóch zestawów monomerów (SA i GLY lub DMS i GLY) w 40,50 lub 60°C (A) oraz przebieg wykresów pierwszej pochodnej DTG (B). Pomiar wykonany w atmosferze azotu. 71
- 25 Krzywe TGA dla HAp, pPGS oraz *scaffoldów* PGS i PGS/HAp sieciowanych w 185°C przez 2,5h (A) oraz przebieg wykresów pierwszej pochodnej DTG (B). Pomiar wykonany w atmosferze azotu. 72

26	Krzywe TGA dla <i>scaffoldów</i> PGS i PGS/HAp zawierających 10, 20 i 30 wt.% napełniacza, sieciowanych w temperaturze 130°C przez 168h (A) oraz przebieg wykresów pierwszej pochodnej DTG (B). Pomiar wykonany w atmosferze azotu.	73
27	Mikrofotografia SEM proszku HAp.	76
28	Mikrofotografie SEM pokazujące reprezentatywny por w strukturze <i>scaffoldu</i> PGS(A) oraz PGS/HAp 75/25(D) oraz zdjęcia z mikroskopu optycznego ukazujące porowatą strukturę pianek PGS(B,C) oraz PGS/HAp 75/25(E,F).	77
29	Przekroje poprzeczne <i>scaffoldów</i> PGS oraz PGS/HAp 75/25 uzyskane z μ CT, ukazujące różnice w kształcie porów. Mikropory występujące w strukturze ścian zostały zaznaczone kolorem czerwonym.	78
30	Rekonstrukcja struktury pianki wraz z kolorystycznie kodowanymi rozmiarami porów. Szary kolor reprezentuje ścianyscaffoldu, a niebieski, zielony i czerwony pory o konkretnych rozmiarach. Średnice z zakresu 0-300 μ m - kolor niebieski, 300-650 μ m - kolor zielony i powyżej 650 μ m - kolor czerwony.	79
31	Charakterystyka porowatości badanych kompozytów PGS oraz PGS/HAp 75/25 wyrażona w postaci histogramów jako średnica sfery z aproksymacji objętościowej (ESDv) (A), największa średnica (Maj.Dm) (B) oraz w postaci sferyczności (Sph) (C).	81
32	Mikrofotografie SEM struktury pianki PGS (A), PGS/HAp 90/10 (B), PGS/HAp 80/20(C) oraz PGS/HAp 70/30 (D) wraz z miejscami pomiarów EDS zaznaczonymi czerwonymi krzyżykami podpisanymi numerem pomiaru. Mikrofotografie zarejestrowano w powiększeniu 500x.	82
33	Zdjęcia <i>scaffoldów</i> PGS oraz PGS/HAp 90/10, PGS/HAp 80/20 i PGS/HAp 70/30 wykonane za pomocą mikroskopu stereoskopowego. Zdjęcia zostały wykonane przed inkubacją (A-D) oraz po 14-dniowej inkubacji w SBF (E-H) i sztucznej ślinie (I-J).	83
34	Wykres naprężenia od odkształcenia podczas jednoosiowego zrywania statycznego dla próbek z litego PGS.	85

35	Wykres naprężenia od odkształcenia dla pierwszego cyklu ściskania pianek na bazie PGS (A) oraz wyznaczone wartości modułu ściśliwości wraz z tolerancjami.	86
36	Wykres przedstawiający wartości naprężeń przy 40 oraz 70% odkształcenia dla pierwszego cyklu ściskania <i>scaffoldów</i>	87
37	Naprężenie przy odkształceniu 70% dla badanych <i>scaffoldów</i> podczas 10 cykli(A) oraz zmienność wartości naprężenia w funkcji cykli(B). . .	88
38	Wykres zależności naprężenia od odkształcenia podczas jednoosiowego ściskania statycznego dla próbek z litego PGS.	89
39	Przemiatanie odkształceniowe porowatych <i>scaffoldów</i> w badaniu DMTA przy oscylacji na poziomie 1 Hz.	90
40	A) Moduł zachowawczy oraz B) $\tan\delta$ w badaniu DMTA przemiatania częstotliwością porowatych <i>scaffoldów</i>	91
41	Przebieg zmian w wartości E' i $\tan\delta$ w funkcji temperatury (A,B) oraz podczas przemiatania częstotliwością (C,D) dla litych cylindrów wykonanych z PGS sieciowanych przez 84 i 168h.	93
42	Schemat eksperymentu dotyczącego inkubacji pianek PGS oraz kompozytowych PGS/HAp 90/10, PGS/HAp 80/20 i PGS/HAp 70/30. Schemat utworzony za pomocą BioRender.com	95
43	Wartości referencyjne pH użytych buforów (A) oraz przebieg zmian w wartości pH podczas 14-dniowej inkubacji w SBF (B), PBS (C), płynie Ringera (D), sztucznej ślinie (E) oraz w wodzie destylowanej (F) dla <i>scaffoldów</i> PGS oraz PGS/HAp zawierających 10, 20 i 30 wt.% napełniacza.	96
44	Wartości referencyjne przewodnictwa użytych buforów (A) oraz przebieg zmian w wartości przewodnictwa podczas 14-dniowej inkubacji w SBF (B), PBS (C), płynie Ringera (D), sztucznej ślinie (E) oraz w wodzie destylowanej (F) dla <i>scaffoldów</i> PGS oraz PGS/HAp zawierających 10, 20 i 30 wt.% napełniacza.	97
45	Zależność pęcznienia <i>scaffoldów</i> PGS, PGS/HAp 90/10, PGS/HAp 80/20 oraz PGS/HAp 70/30 w funkcji czasu w SBF (A), PBS (B), płynie Ringera (C), sztucznej ślinie (D) oraz wodzie destylowanej (E).	100

- 46 Zmiana masy *scaffoldów* po 14-dniowej inkubacji w SBF, PBS, płynie Ringera, sztucznej ślinie oraz wodzie destylowanej (A) oraz wartość chropowatości powierzchni próbek referencyjnych przed inkubacją oraz pianek po inkubacji w ww. płynach (B). Chropowatość została wyznaczona jako średnia arytmetyczna wysokości na badanym obszarze (Sa) i przedstawiona w funkcji ilości napełniacza w próbce. 101
- 47 Trójwymiarowe rekonstrukcje powierzchni pianek PGS, PGS/HAp 90/10, PGS/HAp 80/20 oraz PGS/HAp 70/30 przed inkubacją (A-D) oraz po 14-dniowej inkubacji w SBF (E-H) i sztucznej ślinie (I-L). Topografia powierzchni została uzyskana w trybie rekonstrukcji 3D zdjęć z mikroskopu optycznego ze 100x powiększeniem. 102
- 48 Aktywność metaboliczna fibroblastów L929, inkubowanych przez 24h z biokompozytami, badana przy pomocy testu redukcji MTT zgodnie z normą ISO-10993-5:2009. Komórki inkubowane bez biomateriału stanowiły pozytywną kontrolę żywotności (100%). Kontrolę negatywną żywotności stanowiły komórki hodowane w obecności 3% roztworu nadtlenu wodoru. Komercyjnie dostępny certyfikowany biomateriał - element systemu do pobierania krwi posłużył jako materiał referencyjny. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenia standardowe dla trzech osobnych eksperymentów (po 8 powtórzeń w ramach każdego testu). Linia przerywana wskazuje minimalną wartość aktywności metabolicznej komórek (70%), powyżej której materiał jest traktowany jako niecytotoksyczny na poziomie *in vitro*. * $p < 0,05$ w porównaniu z kontrolą pozytywną, wartość współczynnika p obliczono z wykorzystaniem testu Manna-Whitneya celem określenia istotności statystycznej pomiędzy średnimi. 104
- 49 Kolonizacja fibroblastów L929 po 24h na biomateriałach: PGS (A,E), PGS/HAp 90/10 (B,F), PGS/HAp 80/20 (C,G), PGS/HAp 70/30 (D,H). Jądra komórkowe znakowano barwnikiem DAPI. Próbki obrazowano przy wzbudzeniu długością fali 405 nm i emisji w zakresie 430-480 nm. Mikrofotografie opracowano w oprogramowaniu Leica Application Suite X (LAX X; Leica Microsystems). 105

- 50 Zdjęcia przekrojów poprzecznych *scaffoldów* PGS (B) oraz PGS/HAp 75/25 (C), zasiedlonych przez ludzkie komórki osteoblastyczne hFOB 1.19 wybarwione metodą Grunwalda-Giemsy, wykonane za pomocą mikroskopu optycznego. Rysunek przedstawia również liczbę komórek hFOB 1.19 na biomateriałach w warunkach umożliwiających proliferację (34°C) (A) oraz w warunkach osteogenicznych (39°C) (D) w ciągu 21 dni hodowli. Wyniki przedstawiono w postaci: wartość średnia \pm odchylenie standardowe. * $p < 0.05$ pomiędzy wartościami dla PGS, a PGS/HAp 75/25, wartość współczynnika p obliczono z wykorzystaniem testu Manna-Whitneya celem określenia istotności statystycznej zmian. 107
- 51 Stężenie markerów kościotworzenia: OC oraz OPN w warunkach umożliwiających proliferację (34°C) (A,C) oraz w warunkach osteoinduktywnych (39°C) (B,D). Wyniki przedstawiono w postaci: wartość średnia \pm odchylenie standardowe. * $p < 0,05$ pomiędzy wartościami dla PGS, a PGS/HAp 75/25, wartość współczynnika p obliczono z wykorzystaniem testu Manna-Whitneya celem określenia istotności statystycznej zmian. 109
- 52 Aktywność ALP w lizatach komórkowych otrzymanych z komórek hFOB 1.19 hodowanych w 34°C (A) lub w środowisku osteoinduktywnym (39°C) (B). Wyniki przedstawiono w postaci: wartość średnia \pm odchylenie standardowe oraz wyrażono w jednostkach (U) na mL. * $p < 0,05$ pomiędzy wartościami dla PGS, a PGS/HAp 75/25, wartość współczynnika p obliczono z wykorzystaniem testu Manna-Whitneya celem określenia istotności statystycznej zmian. 110

- 53 Wytwarzanie cytokin immunomodulujących (IL-1 β (A,B), IL-6 (C,D), TNF- α (E,F) oraz IL-10 (G,H)) przez komórki hFOB 1.19 w środowisku pianek PGS lub PGS/HAp 75/25 w warunkach zapewniających wzrost (34°C, kolumna lewa) oraz różnicowanie (39°C, kolumna prawa). Wyniki przedstawiono w postaci: wartość średnia \pm odchylenie standardowe. * $p < 0,05$ pomiędzy wartościami dla PGS, a PGS/HAp 75/25, wartość współczynnika p obliczono z wykorzystaniem testu Manna-Whitneya celem określenia istotności statystycznej zmian. 114
- 54 Schemat przedstawiający podsumowanie głównych właściwości porowatych kompozytów PGS/HAp. 117

6.3 Spis tabel

1	Ilościowy i jakościowy skład roztworów wykorzystanych do badań degradacji i pęcznienia.	41
2	Parametry strukturalne pPGS syntezowanego enzymatycznie w 40, 50 oraz 60°C po interwałach czasowych 2, 4, 6, 8 oraz 10h reakcji. . .	54
3	Porównanie parametrów strukturalnych pPGS syntezowanego enzymatycznie z SA i GLY przez 24h w temperaturach 40, 50 i 60°C przed i po wykonaniu dializy membraną 1 kDa MWCO.	56
4	Porównanie parametrów strukturalnych pPGS syntezowanego enzymatycznie z DMS i GLY przez 24h w temp. 40, 50 oraz 60°C przed i po wykonaniu dializy membraną 1 kDa MWCO.	57
5	Porównanie parametrów strukturalnych pPGS syntezowanego techniką polikondensacji temperaturowej z prepolimerem wykonanym na drodze syntezy enzymatycznej.	58
6	Zestawienie przejść fazowych oraz ich entalpii na podstawie analizy DSC prepolimerów wykonanych techniką syntezy enzymatycznej. . . .	66
7	Zestawienie przejść fazowych oraz ich entalpii na podstawie analizy DSC <i>scaffoldów</i> oraz prepolimerów PGS, z których zostały wykonane. Tabela przedstawia analizę podczas chłodzenia oraz pierwszego lub drugiego cyklu grzania dla wybranych próbek.	69
8	Zestawienie parametrów wyznaczonych z analizy TGA dla uzyskanych pPGS oraz <i>scaffoldów</i> o przedstawionym składzie, poddanych sieciowaniu termicznemu. Wśród wyznaczonych parametrów znajdują się $T_{-5\%}$, punkt przegięcia z DTG oraz utrata masy po pomiarze. . .	73
9	Zestawienie wartości kątów zwilżania uzyskanych dla litych oraz porowatych materiałów na bazie PGS.	75
10	Zestawienie wartości stopnia usieciowania dla materiałów litych oraz wybranych <i>scaffoldów</i>	76

11	Charakterystyka porowatości całkowitej, otwartej oraz zamkniętej, jak również objętości porów, ich średniej średnicy, największej średnicy i sferyczności dla pianek PGS oraz PGS/HAp 75/25.	80
12	Waga oraz procent atomowy C, O, P oraz Ca na powierzchni <i>scaffoldów</i> na podstawie analizy EDS z dwóch punktów pomiarowych na powierzchni pianek.	83
13	Właściwości termomechaniczne litego PGS z pomiarów DMTA. . . .	94
14	Wartości współczynnika pęcznienia równowagowego S_e wyznaczonego dla <i>scaffoldów</i> PGS oraz PGS/HAp z zawartościami 10, 20 oraz 30 wt.% HAp w płynach fizjologicznych (SBF, PBS, płyn Ringera, sztuczna ślina oraz woda).	98
15	Wartości stałej szybkości procesu pęcznienia (τ) wyznaczonego dla <i>scaffoldów</i> PGS oraz PGS/HAp z zawartościami 10, 20 oraz 30 wt.% HAp w płynach fizjologicznych (SBF, PBS, płyn Ringera, sztuczna ślina oraz woda).	99

6.4 Glosariusz skrótów wykorzystanych w pracy

BMSC	multipotencjalne komórki macierzyste szpiku kostnego
CALB	Lipaza B z drożdzy <i>Candida antarctica</i>
CT	tomografia komputerowa
DAPI	4',6-diamidyno-2-fenylindol
DMA	dynamiczna analiza mechaniczna
DMF	dimetyloformamid
DMPA	2-dimetoksy-2-fenylacetofenon
DMS	sebacynian dimetylu
DMTA	dynamiczna mechaniczna analiza termiczna
DNA	kwasy deoksyrybonukleinowe
DSC	skaningowa kalorymetria różnicowa
ECM	macierz zewnątrzkomórkowa
EDS	rentgenowska spektroskopia energodispersyjna
EDTA	kwasy wersenowe
FBS	plądowa surowica bydłęca
FTIR	spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera
GF	czynnik wzrostu
GLY	gliceryna
HAp	hydroksyapatyt
HDI	diizocyjanianem heksametylenu
ICPTES	izocyjanian 3-(trietoksy-sililo)propylu
IL	interleukina
MDI	diizocyjanianem difenylometanu
MeOH	metanol
MTT	bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowy
NMR	magnetyczny rezonans jądrowy
OC	osteokalcyna
OPN	osteopontyna
PBS	buforowana fosforanem sól fizjologiczna

PCL	polikaprolakton
PEG	glikol polietylenowy
PGS	poli(sebacynian gliceryny)
PGS-co-PCL	kopolimer poli(sebacynianu gliceryny) i polikaprolaktonu
PLA	polilaktyd
PLGA	kopolimeru kwasu mlekowego i glikolowego
pPGS	prepolimer poli(sebacynianu gliceryny)
PVP	poli(winylopirolidon)
SA	kwas sebacynowy
SBF	symulowany płyn fizjologiczny
SEM	skaningowa mikroskopia elektronowa
SL	wymywanie soli
TCL	sieciowanie termiczne
TCP	fosforan(III) wapnia
TE	inżynieria tkankowa
TGA	analiza termograwimetryczna
TGF	czynnik wzrostu guza
THF	tetrahydrofuran
TIPS	indukowana termicznie separacja faz
TNF	czynnik martwicy guza
UV	ultrafiolet
VEGF	czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia