



Politechnika
Wroclawska

POLITECHNIKA WROCLAWSKA
WYDZIAŁ CHEMICZNY
KATEDRA INŻYNIERII i TECHNOLOGII POLIMERÓW



Rozprawa doktorska

**Polimerowo - ceramiczne biomateriały do regeneracji
tkanki kostnej**

Mgr inż. Anna Krokos

Promotor: Prof. dr hab. inż. Andrzej Trochimczuk
Promotor pomocniczy: Dr inż. Małgorzata Gazińska

Wrocław, 2023

Podziękowania

Składam serdeczne podziękowania promotorom tej pracy. Dziękuję prof. dr hab. inż. Andrzejowi Trochimczukowi za motywację do pracy naukowej i wspaniały przykład naukowo-dydaktyczny. Dziękuję dr inż. Małgorzacie Gazińskiej za poświęcony czas, cenne rady oraz przekazanie nieocenionej wiedzy dotyczącej analizy termicznej materiałów polimerowych.

Dziękuję także koleżankom i kolegom z Katedry Inżynierii i Technologii Polimerów za mile spędzony czas, życzliwość i pomoc.

Na koniec pragnę podziękować mojemu Mężowi, Rodzicom i Rodzeństwu za to, że zawsze mnie wspierali i dodawali otuchy. Niniejsza praca powstała dzięki ich nieustannego wsparcia i motywacji. Szczególnie dziękuję Mężowi za wiarę we mnie podczas wyjazdów do Drezna.

Dziękuję!

Spis treści

Przedmowa	7
Streszczenie – język polski	10
Streszczenie – język angielski	12
I. Aktualny stan wiedzy	14
1. Wstęp – inżynieria tkankowa i medycyna regeneracyjna	14
2. Inżynieria tkanki kostnej	15
2.1. Kość.....	16
2.1.1. Cytologia kości.....	19
2.2. Materiały implantacyjne przeznaczone do tkanki kostnej	21
3. Biodegradowalne materiały polimerowe	22
3.1. Synteza, struktura i właściwości fizykochemiczne poli(L-laktydu)	23
3.2. Właściwości resorpcyjne poli(L-laktydu)	26
4. Biomateriały ceramiczne	28
4.1. Hydroksyapatyt	29
4.2. Cementy fosforanowo-wapienne.....	32
4.3. Bioaktywne szkło	35
5. Kompozyty polimerowo – ceramiczne	41
6. Modyfikacja powierzchni cząstek ceramicznych	45
6.1. Modyfikacja powierzchni cząstek ceramicznych aminokwasami, głównie L-lizyną... 46	
6.2. Silanizacja powierzchni cząstek ceramicznych.....	49
6.3. Modyfikacja powierzchni cząstek ceramicznych polidopaminą.....	50
7. Formowanie kompozytów technikami druku 3D	54
II. Cele pracy	57
III. Część badawcza – materiały i metodologia	59
1. Materiały	59
2. Metodologia część I: modyfikacja cząstek ceramicznych oraz wytwarzanie i charakterystyka kompozytów na bazie PLLA	62
2.1. Modyfikacja cząstek hydroksyapatytu L-lizyną i poli(glikolem etylenowym).....	62
2.2. Modyfikacja cząstek bioszklą L-lizyną.....	63
2.3. Modyfikacja cząstek hydroksyapatytu polidopaminą i poli(glikolem etylenowym)	68
2.3.1. Preparatyka polidopaminy.....	69
2.4. Wytwarzanie kompozytów z matrycą z PLLA	70
2.5. Charakterystyka strukturalna, termiczna i biologiczna wypełniaczy i kompozytów	70
3. Metodologia część II – drukowanie 3D i charakterystyka rusztowań CPC/PLLA	75
3.1. Wytwarzanie mikrosfer polimerowych PLLA oraz kompozytowych PLLA/HAP	75
3.2. Przygotowanie past CPC/PLLA do druku 3D.....	75

3.3. Druk 3D oparty na wytłaczaniu (ang. extrusion – based 3D printing)	77
3.4. Charakterystyka mikrosfer PLLA i PLLA/HAP, past CPC/PLLA i usieciowanych rusztowań CPC/PLLA	77
IV. Wyniki i dyskusja – część I	81
1. Charakterystyka modyfikacji powierzchni cząstek ceramicznych.....	81
1.1. Modyfikacja hydroksyapatytu L-lizyną i poli(glikolem etylenowym)	81
1.2. Modyfikacja hydroksyapatytu polidopaminą i poli(glikolem etylenowym).....	87
1.3. Modyfikacja bioaktywnego szkła L-lizyną	94
2. Charakterystyka kompozytów PLLA z cząstkami ceramicznymi	103
2.1. Kompozyty z poli(L-laktydu) i hydroksyapatytu modyfikowanego L-lizyną i poli(glikolem etylenowym)	103
2.2. Kompozyty z poli(L-laktydu) i hydroksyapatytu modyfikowanego polidopaminą i poli(glikolem etylenowym)	114
2.3. Kompozyty z poli(L-laktydu) i bioaktywnego szkła modyfikowanego L-lizyną	125
2.4. Degradacja <i>in vitro</i> kompozytów polimerowo - ceramicznych	130
2.5. Podsumowanie części I	132
V. Wyniki i dyskusja – część II	135
1. Charakterystyka past CPC/PLLA i analiza usieciowanych rusztowań kostnych CPC/PLLA	135
1.1. Charakterystyka mikrosfer polimerowych PLLA i PLLA-HAP.....	135
1.2. Właściwości reologiczne past CPC/PLLA	137
1.3. Obrazowanie rusztowań CPC/PLLA	139
1.4. Właściwości mechaniczne kompozytów CPC/PLLA	142
1.5. Uwalnianie jonów wapnia i fosforu oraz degradacja <i>in vitro</i> kompozytów CPC/PLLA	143
1.6. Charakterystyka biologiczna kompozytów CPC/PLLA	150
1.7. Podsumowanie części II	152
VI. Wnioski	155
VII. Literatura	158
VIII. Dorobek naukowy autora.....	172

PRZEDMOWA

Niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod opieką naukową Pani dr inż. Małgorzaty Gazińskiej oraz Pana prof. dr hab. inż. Andrzeja Trochimczuka na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej.

Dysertacja naukowa pt. „Polimerowo - ceramiczne biomateriały do regeneracji tkanki kostnej” zawiera streszczenia w języku polskim i angielskim, wprowadzenie do tematu, cele pracy, materiały i metody, wyniki badań, literaturę oraz dorobek naukowy autora tejże rozprawy. Wprowadzenie dotyczy aktualnego stanu wiedzy zagadnień z inżynierii tkanki kostnej, funkcjonalizacji powierzchni cząstek ceramicznych, druku 3D i wytwarzania dwufazowych rusztowań. W części badawczej opisano modyfikację powierzchni cząstek ceramicznych z wykorzystaniem L-lizyny, polidopaminy i poli(glikolu etylenowego) oraz wpływ modyfikacji cząstek ceramicznych na właściwości fizykochemiczne i biologiczne kompozytów z matrycą z poli(L-laktydu). Zaproponowano także wytwarzanie dwufazowych struktur z fosforanów wapnia i mikrosfer z poli(L-laktydu) oraz przedstawiono analizę właściwości fizykochemicznych i biologicznych otrzymanych kompozytów.

Podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej stanowią dwie publikacje oraz trzy zgłoszenia patentowe.

- Publikacje:

1. Anna Krokos, Małgorzata Gazińska, Bartłomiej Kryszak, Paulina K. Dzienny, Bogusz D. Stępak, Michał Olejarczyk, Piotr Gruber, Ryszard Kwiatkowski, Agnieszka Bondyra, Arkadiusz Antończak, *Comparison of thermal, structural and morphological properties of poly(l-lactide) and poly(l-lactide)/hydroxyapatite microspheres for laser sintering processes*, Polimery, 2020, t. 65, nr 9, s. 605-612.

2. Małgorzata Gazińska, Anna Krokos, Magdalena J. Kobielarz, Marcin Włodarczyk, Paulina Skibińska, Bogusz D. Stępak, Arkadiusz Antończak, Milena Morawiak, Przemysław Płociński, Karolina Rudnicka, *Influence of hydroxyapatite surface functionalization on thermal and biological properties of poly(L-Lactide)- and poly(L-Lactide-co-Glycolide)-based composites*, International Journal of Molecular Sciences, 2020, vol. 21, nr 18, art. 6711, s. 1-21.

- Zgłoszenia patentowe:

1. Małgorzata Gazińska, Anna Krokos, Milena Morawiak, Jacek Pięłowski, *Materiały ceramiczne w postaci powierzchniowo modyfikowanych cząstek oraz sposób ich wytwarzania*, Zgłoszenie patentowe nr P 427351 z 10.10.2018r.
2. Małgorzata Gazińska, Anna Krokos, Milena Morawiak, *Kompozyty polimerowo - ceramiczne oraz sposób ich wytwarzania*, Zgłoszenie patentowe nr P 432700 z 27.01.2020r.
3. Anna Krokos, Małgorzata Gazińska, Ewelina Ortył, Michał K. Grzymajło, Konrad Szustakiewicz, Lidia Ciołek, *Modyfikowane bioszkle do wytwarzania bioaktywnych kompozytów polimerowych i sposób modyfikacji bioszkle do wytwarzania bioaktywnych kompozytów polimerowych*, Zgłoszenie patentowe nr P 440261 z 28.01.2022r.

Badania do rozprawy doktorskiej zostały przeprowadzone:

- i. w ramach projektu „Multifunkcyjne materiały kompozytowe o właściwościach przeciwbakteryjnych i pro-regeneracyjnych do rekonstrukcji tkanki kostnej” GlassPoPep, finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju NCBiR (Techmatstrateg 2/406384/7/NCBR/2019).



Narodowe Centrum
Badań i Rozwoju



- ii. w ramach projektu „Laser modification of bioresorbable polymeric materials in thermal processes of additive manufacturing” finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki NCN (UMO-2017/27/B/ST8/01780).



NARODOWE CENTRUM NAUKI

- iii. w ramach zagranicznego stażu pod kierownictwem Prof. Dr. Michaela Gelinsky’ego w Centre for Translational Bone, Joint and Soft Tissue Research, Faculty of Medicine Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden (Drezno, Niemcy) finansowanego przez organizację DAAD - Deutscher Akademischer Austauschdienst (Niemiecka Centrala Wymiany Akademickiej).



Deutscher Akademischer Austauschdienst
German Academic Exchange Service

Pomysłodawcą modyfikacji powierzchni cząstek hydroksyapatytu z wykorzystaniem L-lizyny i poli(glikoli etylenowych) o różnych masach cząsteczkowych jako napełniaczy do polimerowo – ceramicznych kompozytów opartych na PLLA i PLLGA była dr inż. Małgorzata Gazińska, promotor pomocniczy tejże rozprawy. Przedmiotem tego pomysłu jest wspólna publikacja *Influence of hydroxyapatite surface functionalization on thermal and biological properties of poly(L-Lactide)- and poly(L-Lactide-co-Glycolide)-based composites* oraz wspólne zgłoszenia patentowe nr P 427351 i P 432700. Moim udziałem była praca laboratoryjna w otrzymywaniu zmodyfikowanych cząstek hydroksyapatytu i wytwarzaniu kompozytów z matrycą PLLA i PLLGA oraz wykonywanie analiz spektralnych, termicznych i pomiarów zwilżalności powierzchni. W niniejszej pracy doktorskiej opis analizy DSC kompozytów PLLA z hydroksyapatytem modyfikowanym L-lizyną i poli(glikolami etylenowymi) zaczerpnięto ze wspólnej, wyżej wymienionej publikacji, który przygotowywała dr inż. Małgorzata Gazińska. Obrazy SEM cząstek hydroksyapatytu modyfikowanego L-lizyną i poli(glikolami etylenowymi) wykonywała dr inż. Magdalena Kobielarz. Obrazy z mikroskopu optycznego opracował dr inż. Bogusz Stepak. Badania biologiczne modyfikowanych cząstek hydroksyapatytu i materiałów kompozytowych wykonywał zespół współautorów tej publikacji z Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

Dr inż. Małgorzata Gazińska była również inicjatorem pomysłu modyfikacji cząstek bioaktywnego szkła L-lizyną w projekcie GlassPoPep. Modyfikowane cząstki bioaktywnego szkła zastosowano w kompozytach z matrycą z poli(adypinianu glicerolu). Sposób modyfikacji bioaktywnego szkła z wykorzystaniem czynników sprzęgających zaproponowała mgr inż. Anna Krokos. Sposób ten zastrzeżono w zgłoszeniu patentowym nr P 440261, za który otrzymała nagrodę specjalną w konkursie Student Wynalazca 2023.

STRESZCZENIE – JEZYK POLSKI

Liczba uszkodzeń kości wśród społeczeństwa rośnie i dotyczy złamań urazowych, złamań będących następstwem postępującej osteoporozy oraz ubytków kostnych po resekcji guzów. Dlatego rozwój nowych, syntetycznych, biokompatybilnych i bioresorbowalnych materiałów implantacyjnych cieszy się dużym zainteresowaniem w dziedzinie inżynierii tkanki kostnej. Poszukiwania naukowców dotyczą nowych biomateriałów i sposobów formowania ich w rusztowania kostne, które będą stymulować proces osteointegracji po implantacji. Wymaga się, aby takie materiały ulegały jednocześnie resorpcji na korzyść odrastającej, natywnej tkanki kostnej.

W niniejszej pracy zaprezentowano nowe sposoby modyfikacji chemicznej powierzchni cząstek hydroksyapatytu i bioaktywnego szkła, które są powszechnie stosowane w kompozytach polimerowo – ceramicznych oraz zaproponowano dwufazowe rusztowania kostne składające się z fosforanów wapnia i mikrosfer z poli(L-laktydu) (PLLA). Do funkcjonalizacji powierzchni cząstek hydroksyapatytu wykorzystano L-lizynę, która promuje adhezję i proliferację osteoblastów, oraz polidopaminę, która oprócz właściwości adhezyjnych i bioaktywnych jest także materiałem o wysokim powinowactwie do komórek kościotwórczych. Zastosowane L- lizyna i polidopamina stanowiły łącznik w kowalencyjnym przyłączeniu poli(glikolu etylenowego) o różnych masach molowych do powierzchni ceramicznych. Cząstki bioaktywnego szkła modyfikowano L-lizyną z wykorzystaniem prekursora silanowego oraz karbodiimidowego czynnika sprzęgającego. Następnie funkcjonalizowane cząstki ceramiczne wykorzystano do formowania kompozytów na bazie PLLA metodą wylewania z rozpuszczalnika. Określono wpływ funkcjonalizacji powierzchni cząstek ceramicznych na właściwości fizykochemiczne i biologiczne PLLA oraz oceniono profile degradacji *in vitro* kompozytów.

W pracy przedstawiono również formowanie dwufazowych, makroporowatych rusztowań z cementu fosforanowo-wapiennego (CPC) i mikrosfer PLLA za pomocą druku 3D metodą wytłaczania. Opisano sposób wytwarzania mikrosfer PLLA o średnicy poniżej 50 μm , właściwości reologiczne past do druku 3D oraz właściwości fizykochemiczne i biologiczne dwufazowych rusztowań CPC/PLLA. Określono także profile degradacji *in vitro* mikrosfer PLLA i kompozytów CPC/PLLA.

Na podstawie badań eksperymentalnych potwierdzono efektywność reakcji funkcjonalizacji cząstek hydroksyapatytu L-lizyną i poli(glikolem etylenowym) z karboksylową grupą końcową oraz polidopaminą i poli(glikolem etylenowym)

z aminową/tiolową grupą końcową. Zaproponowana metoda funkcjonalizacji cząstek bioaktywnego szkła z wykorzystaniem 3-aminopropylotrietoksysilanu i L-lizyny charakteryzowała się największą efektywnością reakcji sprzęgania. W wyniku modyfikacji powierzchni cząstek ceramicznych powstały wielofunkcyjne napełniacze do matryc polimerowych, które mogą pełnić rolę czynników zarodkujących, plastyfikujących i ugrupowań bioaktywnych. Stwierdzono, iż modyfikacja cząstek ceramicznych poprawia stabilność termiczną PLLA i kompozytów z PLLA i napełniaczy ceramicznych, co ma istotne znaczenie z perspektywy przetwarzania termicznego kompozytów w celu uzyskiwania spersonalizowanych konstruktów kostnych. Ponadto, stwierdzono, iż immobilizacja L-lizyny, polidopaminy i poli(glikoli etylenowych) na cząstkach ceramicznych wspiera proces mineralizacji kompozytów polimerowo-ceramicznych. Zaprezentowane nowe kompozyty są cytotogodne wobec mysich fibroblastów L929 i ludzkich osteoblastów hFOB 1.19.

Na podstawie badań fizykochemicznych dla układów CPC/PLLA stwierdzono, iż wzrost zawartości mikrosfer PLLA w pastach kompozytowych do wyłaczania rusztowań powoduje wzrost lepkości układów i jednocześnie wyłaczanie stabilnych rusztowań, uzyskując założoną makroporowatość konstruktów. Z uwagi na słabą adhezję na granicy faz CPC i mikrosfer PLLA wytrzymałość mechaniczna kompozytów jest mniejsza niż rusztowań kontrolnych CPC. Te dwufazowe rusztowania oraz wyjściowe mikrosfery PLLA indukują proces mineralizacji w sztucznym roztworze ustrojowym w trakcie 28 tygodni prowadzenia eksperymentu. Stwierdzono, iż mikrosfery PLLA nie wpływają na szybkość degradacji rusztowań CPC/PLLA i nie powodują powstawania nowych porów w usieciowanych pasmach cementu CPC w czasie, w którym prowadzono badania degradacji. Wytworzone kompozyty CPC/PLLA nie są cytotoksyczne i wspierają adhezję, proliferację i migrację mezenchymalnych komórek macierzystych hTERT-MSK na całej powierzchni rusztowań oraz w wytworzonych makroporach.

Zaprezentowane nowe kompozyty polimerowo-ceramiczne wykazują potencjał do zastosowań w regeneracji tkanki kostnej.

STRESZCZENIE – JEZYK ANGIELSKI

The number of bone injuries among the society is growing and concerns traumatic fractures, fractures resulting from progressive osteoporosis and bone defects after tumors resection. Therefore, the development of new, synthetic, biocompatible and bioresorbable implant materials establishes interest in the field of bone tissue engineering. Researchers are looking for new biomaterials and methods of forming them into bone scaffolds that will stimulate the process of osseointegration after implantation. It is required that such materials should simultaneously resorption in favor of the regrowing native bone tissue.

This PhD thesis demonstrates new methods of chemical surface modification of hydroxyapatite and bioactive glass particles, which are commonly used in polymer-ceramic composites, as well as biphasic bone scaffolds consisting of calcium phosphates and poly(L-lactide) (PLLA) microspheres. L-lysine, which promotes the adhesion and proliferation of osteoblasts, and polydopamine, which, apart from adhesive and bioactive properties, is also a material with high affinity for bone-forming cells, were used to functionalization the surface of hydroxyapatite particles. The L-lysine and polydopamine were used as a linker in the covalent attachment of poly(ethylene glycol) with different molar masses to ceramic surfaces. The bioactive glass particles were modified with L-lysine using a silane precursor and a carbodiimide coupling agent. The functionalized ceramic particles were then used to form PLLA-based composites by solvent casting. Influence of surface functionalization of ceramic particles on the physicochemical and biological properties of PLLA was determined and the *in vitro* degradation profiles of the composites were evaluated.

The paper also presents the formation of biphasic, macroporous scaffolds consisted of calcium phosphate cements (CPC) and PLLA microspheres using extrusion-based 3D printing. The method of manufactured PLLA microspheres with a diameter of less than 50 μm , the rheological properties of pastes for 3D printing and the physicochemical and biological properties of biphasic CPC/PLLA scaffolds are described. *In vitro* degradation profiles of PLLA microspheres and CPC/PLLA composites were also determined.

Based on experimental studies, the effectiveness of functionalization of hydroxyapatite particles with L-lysine and poly(ethylene glycol) with a carboxyl end group as well as polydopamine and poly(ethylene glycol) with an amine/thiol end group was confirmed. The proposed method of functionalization of bioactive glass particles using 3-aminopropyltriethoxysilane and L-lysine was characterized by the highest efficiency of the coupling reaction. As a result of surface modification of ceramic particles, multifunctional

fillers for polymer matrices were created, which can act as nucleating agents, plasticizers and bioactive groups. It was found that the modification of ceramic particles improves the thermal stability of PLLA and composites of PLLA and ceramic fillers, which is important from the perspective of thermal processing of composites to obtain personalized bone constructs. In addition, it was found that the immobilization of L-lysine, polydopamine and poly(ethylene glycols) on ceramic particles supports the process of mineralization of polymer-ceramic composites. The presented new composites are cytocompatible towards L929 mouse fibroblasts and hFOB 1.19 human osteoblasts.

Based on the physicochemical studies for the CPC/PLLA systems, it was found that the increase in the content of PLLA microspheres in composite pastes for extrusion of scaffolds causes an increase in the viscosity of the systems, as well as obtaining stable scaffolds after extrusion with the assumed macroporosity of the constructs. Due to poor adhesion on the interface between CPC and PLLA microspheres, the mechanical strength of the composites is lower than the CPC control scaffolds. These biphasic scaffolds and the PLLA microspheres induce the mineralization process in the simulated body fluid during the 28 weeks of experiment. It was found that the PLLA microspheres did not affect the rate of degradation of the CPC/PLLA scaffolds and did not cause the formation of new pores in the crosslinked strands of the CPC during the degradation tests. The manufactured CPC/PLLA composites are not cytotoxic and support the adhesion, proliferation and migration of hTERT-MSK mesenchymal stem cells on the entire surface of the scaffolds and inwards the macropores.

The presented new polymer-ceramic composites exhibit the potential for applications in the regeneration of bone tissue.

I. AKTUALNY STAN WIEDZY

1. WSTĘP – INŻYNIERIA TKANKOWA I MEDYCYNA REGENERACYJNA

Poszukiwanie innowacyjnych rozwiązań w celu poprawy zdrowia ludzi i zwierząt wciąż stanowi globalne wyzwanie. Wśród wielu strategii zmierzających do osiągnięcia tego celu inżynieria tkankowa i medycyna regeneracyjna oferują obiecujące podejście do aktualnych potrzeb pacjentów. Sprzyja temu rozpowszechnienie studiów nauk interdyscyplinarnych, łączących inżynierię materiałową i biomechanikę z naukami chemicznymi, biologicznymi i medycyną. Efektem inżynierii tkankowej i medycyny regeneracyjnej są przeszczepy oraz uzupełnienia narządów i tkanek prowadzące do przywrócenia, zastąpienia lub podtrzymania podstawowych funkcji uszkodzonych tkanek lub narządów. Inżynieria tkankowa łączy rusztowania, komórki i czynniki wzrostu w celu regeneracji tkanek lub odbudowy patologicznie zmienionych tkanek i narządów, podczas gdy medycyna regeneracyjna obejmuje inżynierię tkankową z „samoleczeniem” poprzez integrację z innymi strategiami, w tym terapią komórkową, terapią genową i immunomodulacją, w celu wywołania regeneracji tkanek/narządów *in vivo*. Wraz z intensyfikacją trendu starzenia się światowej populacji i rozwoju chorób nowotworowych, rośnie zapotrzebowanie na naprawę lub wymianę narządów. Inżynieria tkankowa i medycyna regeneracyjna ma potencjał, aby zaspokoić przyszłe potrzeby pacjentów [1,2].

Inżynieria tkankowa ewoluowała dzięki wielopłaszczyznowym badaniom prowadzonym przy użyciu zaawansowanych technologii, a wiele jej produktów jest w fazie zastosowań klinicznych. Wraz ze znacznym postępowaniem technologii inżynierii tkankowej zmierza ona w kierunku coraz większego wyrafinowania, w tym strategii w nanoskali do budowy materiałów i synergicznych metod łączenia z komórkami, czynnikami wzrostu lub innymi makrocząsteczkami. W dziedzinie tej wykorzystuje się dwie główne strategie, które nie wykluczają się wzajemnie:

- i) rusztowania służące jako narzędzia podtrzymujące komórki wysiewane *in vitro*, które są stymulowane do wytwarzania macierzy pozakomórkowej w celu zbudowania struktury tkanki natywnej nadającej się do przeszczepu;
- ii) wykorzystanie rusztowania jako czynnika wzrostu/narzędzia dostarczającego lek, tak aby po implantacji mogły się zasiedlić komórki z organizmu tworząc nową tkankę w obrębie rusztowania.

Struktura i morfologia rusztowań wpływa na zachowanie komórek, dlatego powinny być one idealnie dopasowane do zamierzonego celu. Wiele typów komórek wysiewa się na

rusztowaniach w celu wytworzenia narzędzi inżynierii tkankowej. Komórki spersonalizowane, pobrane od pacjenta i użyte do wysiania na rusztowaniu, mogłyby okazać się idealnym rozwiązaniem. Jednak podejście to ma charakter inwazyjny i istnieje ryzyko, że pobrane komórki będą w stanie chorobowym. W związku z tym, wykorzystuje się komórki przypominające tkankę natywną i mezenchymalne komórki macierzyste, które mogą się różnicować w wiele innych typów komórek np. w adipocyty, chondrocyty czy osteoblasty [1–3].

Zapotrzebowanie na nowe struktury rusztowań i powtarzalne techniki ich wytwarzania stało się sprawą wysokiej wagi. Stosowanie biodegradowalnych polimerów, jak również kompozytów polimerowych, jest już powszechne, jednakże sposoby, w jakie te tworzywa są modyfikowane i przetwarzane, pozwalają na dostosowanie ostatecznych, spersonalizowanych właściwości rusztowania. Niniejsza rozprawa doktorska prezentuje kompozyty polimerowo - ceramiczne, które mają potencjalne zastosowanie w inżynierii tkanki kostnej.

2. INŻYNIERIA TKANKI KOSTNEJ

Kości działają jako struktura stabilizująca w ludzkim ciele i mają za zadanie przenosić głównie wszystkie obciążenia mechaniczne w celu ochrony innych tkanek i narządów przed uszkodzeniem. Liczba uszkodzeń kości wśród społeczeństwa rośnie i dotyczy złamań urazowych, złamań będących następstwem postępującej osteoporozy oraz ubytków kostnych np. po resekcji guza. Według Międzynarodowej Fundacji Osteoporozy (IOF) szacunkowa liczba osób w wieku 50+ z osteoporozą w 2019 r. w Europie wynosiła 32 miliony (5,6 % całkowitej populacji europejskiej w wieku 50+), natomiast szacunkowa liczba złamań u osób w wieku 50+ z przebyłym złamaniem szyjki kości udowej w 2019 r. wynosiła 3 220 181. Co więcej, IOF szacuje, że spodziewana zmiana rocznej liczby złamań osteoporotycznych wzrośnie o 1,06 mln w latach 2019 – 2034 (4,28 mln w 2019 – 5,34 mln w 2034) [4]. Zmiany w rozkładzie wiekowym społeczeństw europejskich potwierdzają powyższe dane, dlatego istnieje pilne zapotrzebowanie na nowe materiały implantacyjne oraz materiały do wypełniania ubytków kostnych, stymulujące regenerację tkanki twardej.

Standardem dla przeszczepów ubytków kostnych jest wciąż kość autologiczna. Jednak takie autoprzeszczepy są wyraźnie ograniczone pod względem dostępności, a pobieranie materiału od pacjenta wiąże się z dodatkowym obciążeniem organizmu. Obok autoprzeszczepów istnieją alloprzeszczepy (od innych ludzi) i ksenoprzeszczepy (od zwierząt). Stosowanie alloprzeszczepów i ksenoprzeszczepów stwarza problemy etyczne i wiąże się z

ryzykiem przeniesienia choroby, odrzucenia i reakcji immunologicznych. Materiały implantacyjne wytwarzane przy użyciu inżynierii tkankowej stanowią obiecującą alternatywę do autologicznych, allogenicznych i ksenogenicznych przeszczepów kostnych. W tym celu stosuje się resorbowalne materiały połączone ze składnikami biologicznymi, czyli komórkami i czynnikami wzrostu, które stymulują tworzenie nowej tkanki kostnej po implantacji u pacjenta i resorbują się na korzyść odrastającej, natywnej kości. Rozwój nowych, syntetycznych, bioresorbowalnych materiałów kostnych cieszy się dużym zainteresowaniem w terapiach regeneracyjnych. Dodatkowo, rozwój w technologii druku 3D sprzyja w wytwarzaniu takich implantów. W tym rozdziale przedstawiono podstawowy temat dotyczący anatomii i fizjologii kości, komórki uczestniczące w procesie osteogenezy, a następnie wyzwania stawiane materiałom implantacyjnym.

2.1. Kość

Kość to kompozyt bioceramiczny, który osiąga zarówno wysoką wytrzymałość, jak i odporność na pękanie dzięki unikalnej architekturze organiczno-nieorganicznej [5]. Kość to hierarchicznie zorganizowana tkanka. Składa się z 50 do 70 % wag. składników mineralnych, 20 do 40 % wag. macierzy organicznej, 5 do 10 % wag. wody i < 3 % wag. lipidów. Matrycę organiczną stanowią głównie włókna kolagenowe typu I oraz zdecydowanie mniejsza część białek niekolagenowych. Matryca nieorganiczna składa się z głównie z jonów wapnia i fosforanów, tworząc heksagonalny kryształ hydroksyapatytu (HAP) $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ (rys. 1 A). Kryształ ten może być uzupełniony i/lub podstawiony różnymi innymi jonami, takimi jak Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , CO_3^{2-} , Cl^- lub F^- . Natywna kość to faza HAP z niedoborem wapnia [6]. Kryształy hydroksyapatytu kości są bardzo małe, mierzą około 200 Å w największym wymiarze i wspierają metabolizm minerałów [7]. Włókna kolagenowe kierują organizacją kryształów HAP. Obecność wody w strukturze kości jest składnikiem drugorzędowym, jednak przyczynia się do ogólnej wytrzymałości biokompozytu, działając na zasadzie plastyfikatora. Z kolei białka niekolagenowe odgrywają kluczową rolę w tworzeniu struktury kostnej [5].

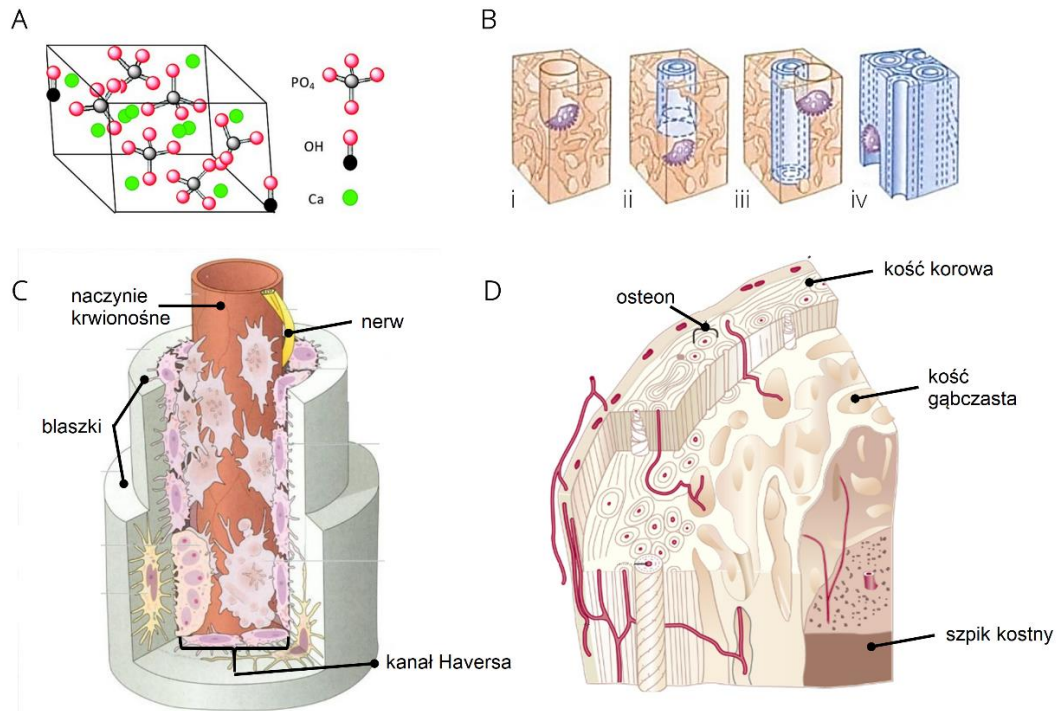
W przeciwieństwie do innych tkanek szkieletowych, takich jak chrząstka, kość stale się reorganizuje i ma wysoką zdolność samoleczenia. We wczesnym stadium rozwoju kości, tj. w rozwoju płodowym, tworzy się nieuporządkowana i przypadkowa postać tkanki kostnej, którą nazywa się tkana kością (rys. 1 B). Tkana kość charakteryzuje się przypadkową orientacją włókien kolagenowych, które są mineralizowane przez kryształy HAP. Mikrostruktura takiej kości jest bardzo porowata. Podczas wtórnego tworzenia kości pierwotna tkana kość jest

przebudowywana do bardziej optymalnej struktury, takiej jak kość blaszkowata, ze względu na interakcje komórek kościotwórczych i resorpcyjnych kości (patrz sekcja 2.1.1). Macierz kostna, w tym włókna kolagenowe i kryształy HAP, jest organizowana w koncentryczne blaszki (rys. 1 B), które tworzą osteony systemu kanałów hawerskich. Koncentryczne blaszki otaczają małe kanały Haversa, które zawierają naczynia krwionośne i włókna nerwowe. Kanały Haversa są połączone ze sobą mniejszymi kanałami Volkmanna. Podsumowując, osteonem nazywa się pojedynczą jednostkę nowych zmineralizowanych, koncentrycznych warstw, kanał Haversa oraz zawarte w nim naczynia krwionośne i nerwy (rys. 1 C). W obrębie osteonu znajdują się wszystkie istotne komórki kostne, takie jak osteoblasty, osteoklasty, osteocyty i ich komórki prekursorowe. Orientacja zmineralizowanych włókien kolagenowych w blaszkach, a tym samym całego osteonu, zależy od obciążenia mechanicznego przyłożonego do tkanki kostnej. Z tego powodu właściwości mechaniczne kości natywnej nie mogą być łatwo oszacowane, ponieważ każda kość ludzkiego ciała wykazuje różne linie sił [5,6,8].

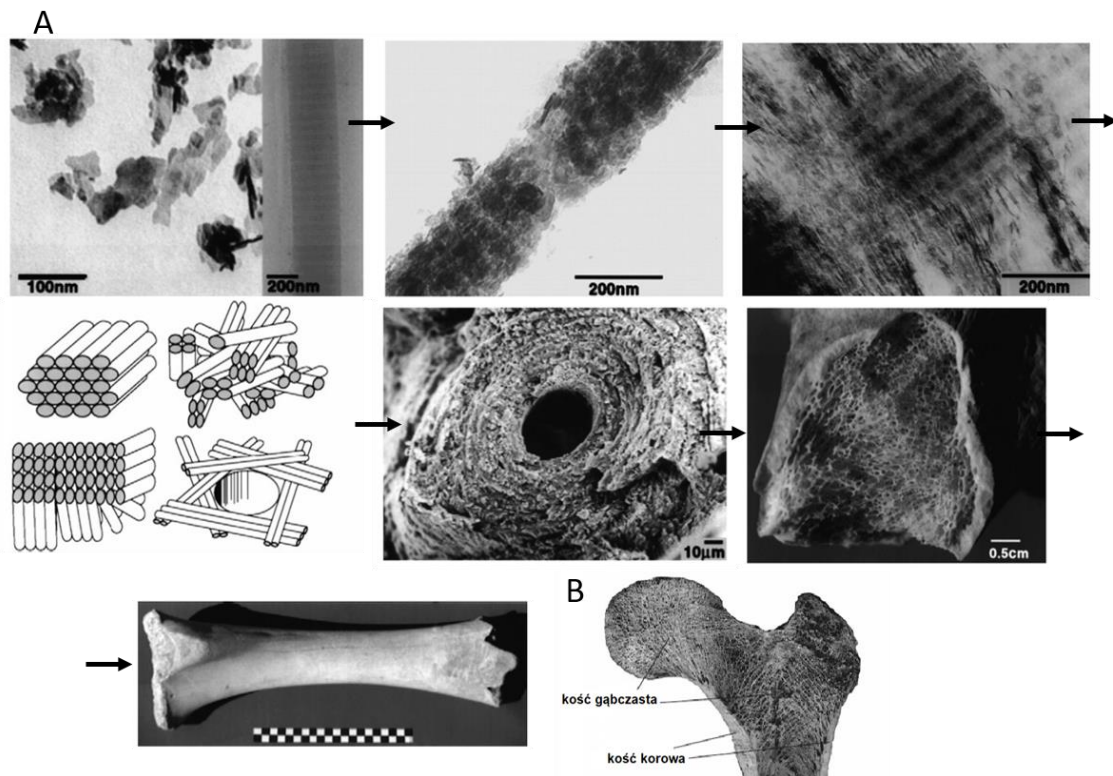
W większej skali rozróżnia się dwa rodzaje kości: kość korową (zbitą/zwartą) i gąbczastą (rys. 1 D). Kość korowa obejmuje kość gąbczastą wraz ze szpikiem kostnym. Znajduje się bezpośrednio w kontakcie z okostną i ma dość gęstą strukturę, która jest przeplatana osteonami oraz kanałami Haversa i Volkmanna. Pomimo że objętość kości korowej jest wyraźnie mniejsza niż objętość kości gąbczastej, można na nią przypisać ponad 80 % całej masy kostnej. Kość gąbczasta jest bardzo porowata i złożona z tak zwanych beleczek. Pory kości gąbczastej zawierają szpik kostny z krwiotwórczymi komórkami macierzystymi, które są istotne dla tworzenia układu krwionośnego [6,8]. Właściwości mechaniczne kości zależą od typu kości. Kość korowa jest zdecydowanie twardsza i wykazuje większą odporność na działania mechaniczne. Moduł sprężystości kości korowej zawiera się w przedziale 3 – 30 GPa, podczas gdy moduł sprężystości kości gąbczastej jest znacznie niższy i wynosi 0,02 – 2 GPa [9]. Omawiając strukturę kości, zwykle odnosimy się do kości wtórnej, która jest często opisywana w kategoriach jej siedmiu hierarchicznych poziomów (rys. 2): nanoskopowe płytki hydroksyapatytu, które są zorientowane i wyrównane w obrębie samoorganizujących się włókien kolagenowych; włókienka kolagenowe są ułożone równolegle w blaszkach; blaszki są ułożone koncentrycznie wokół naczyń krwionośnych, tworząc osteony; ostatecznie osteony są albo gęsto upakowane w kości korowej, albo zawierają beleczkowatą sieć mikroporowatej kości, określanej jako kość gąbczasta [5].

Analizując powyższe, kość jest to żywa, silnie unaczyniona, dynamiczna, zmineralizowana tkanka łączna, która charakteryzuje się twardością, sprężystością i mechanizmami wzrostu oraz zdolnością do samoregeneracji i naprawy. Kość w swoim

naturalnym środowisku jest zaangażowana w ciągły cykl resorpcji i odnowy, przechodzącą ciągłą wymianę chemiczną i przebudowę strukturalną [8].



Rysunek 1. Anatomiczna struktura kości. Heksagonalna komórka elementarna hydroksyapatytu [7](A). Konwersja kości tkanej w kość blaszkową (B). Struktura osteonu (C). Ogólna struktura kości z uwzględnieniem kości korowej, gąbczastej oraz szpiku kostnego [10] (D).



Rysunek 2. Anatomiczna struktura kości. Hierarchiczne poziomy struktury kości wtórnej, zaprezentowanej przez Weiner'a i Wagner'a; pobrano z Olszta M. J. i in., 2007 [5] (A). Przekrojowa głowa kości udowej człowieka ukazująca różnice w strukturze kości; pobrano z Hing K. A., 2004 [8](B).

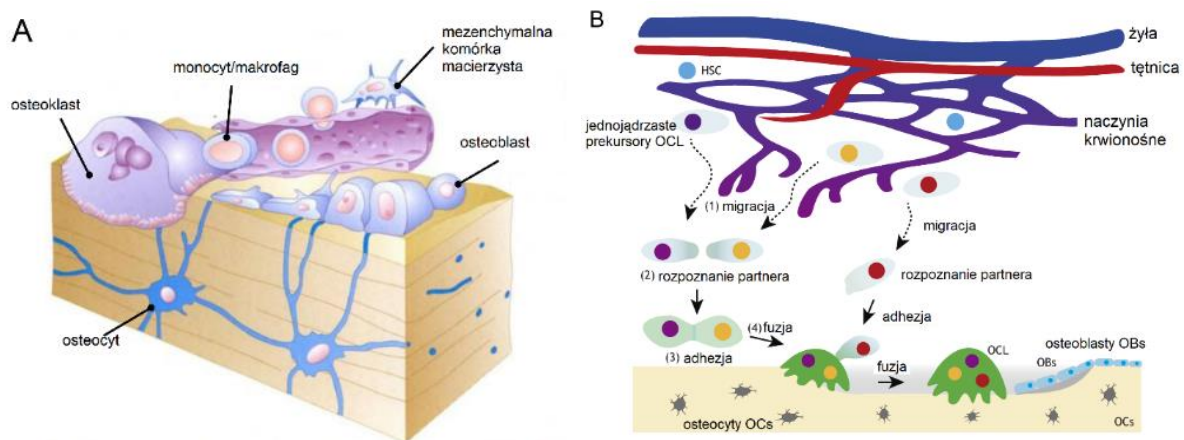
2.1.1. Cytologia kości

Zmineralizowana tkanka kostna zawiera trzy różne typy komórek specyficznych dla kości, a także ich prekursorzy: osteoblasty, osteoklasty i osteocyty (rys. 3). Wszystkie trzy typy komórek kostnych komunikują się ze sobą ze pomocą specjalnych sygnałów w dynamicznie regulowanym procesie, co skutkuje wzajemną regulacją dla tworzenia i resorpcji tkanki kostnej. Równowaga między tworzeniem kości a resorpcją kości w miejscach przebudowy kości jest kontrolowana przez parakryne i autokryne czynniki wzrostu, w tym białka morfogenetyczne kości (BMP), transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β), insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF-1), zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF), płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), aktywator receptora ligandu czynnika jądrowego NF- κ B (RANKL) oraz osteoprotegryny (OPG) [11]. Wzrost i przebudowa tkanki kostnej są związane z funkcją układu odpornościowego. Stała resorpcja kości jest napędzana przez osteoklasty, które są uważane za wysoce wyspecjalizowane komórki odpornościowe. Różnicowanie komórek osteoklastów jest napędzane przez ten sam szlak NF- κ B (RANKL), który ma kluczowe znaczenie dla funkcji różnych komórek odpornościowych. Liczne zaburzenia zapalne mogą negatywnie wpływać na tworzenie kości i gojenie się złamań kości, co wskazuje na znaczenie wzajemnego oddziaływania między tkanką kostną a układem odpornościowym. W związku z tym materiały dedykowane do regeneracji kości nie mogą być immunogenne i nie mogą sprzyjać stanom zapalnym w miejscu przeszczepu [12]. Zrozumienie interakcji między komórkami kostnymi ma kluczowe znaczenie w opracowywaniu nowych podejść terapeutycznych w przypadku chorób związanych z resorpcją kości (np. osteoporoza) lub tworzeniem kości (np. choroba Pageta). Umożliwiają one również dobranie optymalnych szklaków badawczych w celu określenia aktywności biologicznej projektowanych materiałów implantacyjnych.

Osteoblasty – komórki kościotwórcze

Osteoblasty to dojrzałe komórki linii mezenchymalnej. Komórki jednojądrzaste mające wielkość ok. 20 μ m i przejmują funkcję syntezy nowej kości (osteogenezy). Osteoblasty można znaleźć na wewnętrznych ścianach kanałów hawerskich (rys. 1 C i 3) oraz na powierzchni beleczek, gdzie wydzielają organiczną macierz kości, zwłaszcza kolagen typu I. Po syntezie macierzy zewnątrzkomórkowej osteoblasty wykazują ekspresję enzymu fosfatazy alkalicznej (ALP). ALP dostarcza dużą ilość jonów fosforanowych, które w obecności jonów wapnia wytrącają się do faz mineralnych fosforanu wapnia, przekształcając się w nanokrystaliczny

HAP. Zatem aktywność ALP komórek podobnych do osteoblastów można badać w celu analizy wczesnych etapów tworzenia kości [5,6,8,13–15].



Rysunek 3. Komórki tworzące tkankę kostną pochodzą z mezenchymalnej (osteoblasty i osteocyty) lub hematopoetycznej (osteoklasty) linii komórek macierzystych (A). Osteoblasty (OBs), osteocyty (OCs), specyfikacja osteoklastów (OCL). Fuzja i dojrzewanie osteoklastów (OCL): (1) migracja, (2) rozpoznanie partnera, (3) adhezja, (4) fuzja. Jednojądrzaste prekursorzy osteoklastów migrują z jamy szpiku kostnego do miejsc resorpcji na powierzchni kości. Prekursorzy osteoklastów selektywnie rozpoznają swoich partnerów fuzyjnych, po czym następuje fuzja komórka-komórka i dojrzewanie [15] (B).

Osteocyty – komórki dojrzałej tkanki kostnej

Gdy osteoblast wypełni całe swoje otaczające środowisko zmineralizowaną macierzą, przekształca się w osteocyt. Osteocyty pozostają w zmineralizowanej macierzy i mają morfologię dendrytyczną, co umożliwia im kontakt między komórkami (rys. 3). Stanowią 90 – 95 % wszystkich komórek kości i są w kontakcie z naczyniami krwionośnymi zapewniając wymianę substancji odżywczych i metabolitów [5,6,8,13–15].

Osteoklasty – komórki kościogubne

Osteoklasty to komórki wielojądrzaste, które są różnicowane z monocytów lub makrofagów i należą do linii hematopoetycznej (komórek macierzystych szpiku kostnego). Wielkość osteoklastów dochodzi do 100 μm . Zlokalizowane są głównie na styku kanału hawerskiego i zmineralizowanej macierzy oraz na beleczkach i działają jako komórki resorbujące kość. Leżą w zagłębieniach resorpcyjnych na kości i mają pofałdowaną granicę – błonę o dużej powierzchni właściwej, przylegając do powierzchni ulegającej resorpcji. Osteoklasty zakwaszają środowisko poprzez wydzielanie hydrolazy i uwolnienie protonów, co powoduje rozpuszczanie zmineralizowanej matrycy. Matryca organiczna jest rozkładana

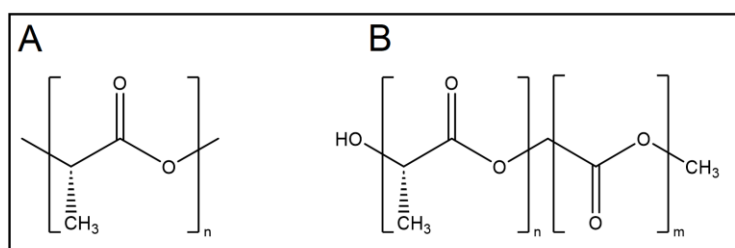
enzymatycznie. Rozpuszczone jony są wewnątrzkomórkowo metabolizowane przez osteoklasty lub przenoszone przez błonę do otaczającego środowiska (rys. 3) [5,6,8,13–15].

2.2. Materiały implantacyjne przeznaczone do tkanki kostnej

Zastosowanie konkretnego materiału implantacyjnego uzależnione jest od jego funkcjonowania w organizmie człowieka. W ciągu ostatniego stulecia naukowcy opracowali szereg biokompatybilnych materiałów do rekonstrukcji tkanki kostnej, w tym trzy klasy materiałów, takie jak polimery, metale i ceramika. Obciążenie, jakie musi przenosić implant, a także jego żywotność i bioaktywny charakter to kluczowe parametry przy wyborze biomateriału [16]. Na przykład implant stawu biodrowego korzystnie składa się z nieulegającego degradacji metalu o dużej żywotności, takiego jak tytan, który jest w stanie przenosić duże obciążenia mechaniczne. Tytan lub stopy tytanu są trwałe, odporne na korozję i wykazują duże powinowactwo do kości [17]. Podobnie popularne implanty tytanowe stosuje się w celu zastąpienia korzeni zębowych. Z kolei materiały polimerowe i ceramiczne w postaci iniekcyjnej lub w formie proszków, pianek, mat, membran, które umożliwiają odrastanie natywnej tkanki kostnej można stosować w miejsca do regeneracji w obszarach ciała, które nie przenoszą nieproporcjonalnie dużego obciążenia. Szeroka gama materiałów biodegradowalnych, takich jak polimery termoplastyczne (np. poli(ϵ -kaprolakton, polilaktyd, poliglikolid), metale (np. pianki żelaza lub stopy magnezu), bioaktywna ceramika (np. bioaktywne szkła) lub hydrożele (np. poli(alkohol winylowy), poli(metakrylan 2-hydroksyetylu), alginian, hialuronian) badano pod kątem ich potencjalnego działania jako substytutów kości. Te biodegradowalne materiały przejmują przez określony czas niektóre funkcje anatomiczne oraz zadania fizyczne i mechaniczne, ale ulegają degradacji na rzecz odrastającej tkanki kostnej. Wszystkie materiały biodegradowalne wchodzi w interakcje z komórkami kostnymi, mogą być biofunkcjonalizowane czynnikami aktywnymi biologicznie, i wdrażane do procesu inżynierii tkankowej [16,18–22]. Materiały implantacyjne lite lub porowate poddaje się badaniom biologicznym. W pierwszej kolejności wykonuje się badania *in vitro* jako testy prognostyczne przed badaniami przedklinicznymi (testy cytotoksyczności wobec komórek zwierzęcych i ludzkich, adhezji, proliferacji) oraz testy *in vivo*. Nietoksyczne i biokompatybilne materiały implantacyjne klasyfikują się do naprawy i regeneracji kości [16].

3. BIODEGRADOWALNE MATERIAŁY POLIMEROWE

W tym rozdziale zaprezentowano opis biomateriałów polimerowych, w szczególności poli(L-laktydu) (PLLA, rys. 4 A) w porównaniu do poli(L-laktyd-*co*-glikolid) (PLLGA) (rys. 4 B). Przedstawiono krótki wstęp dotyczący zastosowań biomedycznych grupy biopolimerów syntetycznych, następnie uwagę skupiono na strukturze, otrzymywaniu i właściwościach fizykochemicznych PLLA i PLLGA (rozd. 3.1). Rozdział 3.2 poświęcono właściwościom resorpcyjnym PLLA i PLLGA.



Rysunek 4. Wzory strukturalne PLLA i PLLGA.

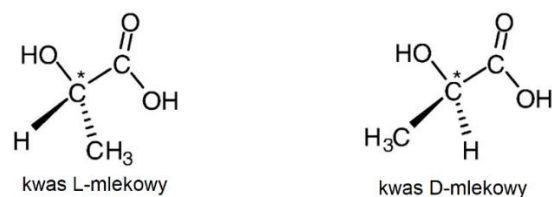
Biodegradowalne polimery klasyfikowane są jako: naturalne i syntetyczne polimery. Szeroko badana grupa syntetycznych polimerów alifatycznych, szczególnie polilaktyd (PLA) i jego enancjomery (PDLA lub PLLA) oraz poli(laktyd-*co*-glikolid) (PLGA), poliglikolid (PGA), poli(glikol etylenowy) (PEG) i poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) jest zatwierdzona przez Agencję Żywności i Leków (FDA) i Europejską Agencję Leków (EMA) i znajduje zastosowanie w sektorach medycznych z uwagi na ich biokompatybilność oraz bioresorbowalność [23]. Ta grupa polimerów syntetycznych dedykowana do inżynierii tkanki kostnej, głównie jako matryce polimerowe w kompozytach z napełniaczem w postaci hydroksyapatytu i bioszklą, które zostaną szerzej omówione w rozdziale 4. Ponadto, materiały polimerowe cieszą się dużą popularnością w wytwarzaniu modeli sercowo – naczyniowych (stenty, plastry kardiologiczne), jako rusztowania do regeneracji komórek nabłonka, w regeneracji skóry, w farmaceutyce w systemach dostarczania leków, w druku 3D, w stomatologii i ortopedii (szwy i pręty chirurgiczne), jako powłoki przeciwbakteryjne i środki ochrony osobistej [24].

Nano- lub mikrosfery PLA i PLGA wytwarzane metodami rozpuszczalnikowymi stosowane są w inteligentnych systemach dostarczania leków, także do terapii i diagnostyki nowotworów. Systemy te oparte na PLGA mogą zawierać hydrofobowe i hydrofilowe leki chemioterapeutyczne, fotosensybilizatory, antybiotyki, leki przeciwzapalne i inne środki terapeutyczne. Masa cząsteczkowa i stosunek laktydu do glikolidu mają wpływ na szybkość uwalniania i degradacji leków dlatego nośniki PLGA można projektować i modyfikować tak,

aby wykazywały wydłużony czas krążenia we krwi i miały zdolność celowania molekularnego w zmienioną chorobowo tkankę. Zastosowanie takich systemów pozwala również na określenie kiedy rozpocznie się leczenie i jak długo potrwa, co wpływa na precyzyjność leczenia i zmniejszenie toksyczności ogólnoustrojowej [25–28]. Mikrosfery PLA stosuje się także w nowoczesnych technologiach addytywnych do druku 3D porowatych konstruktywów kostnych. Istnieją nowe rozwiązania w technologii SLS (ang. selective laser sintering), które dowodzą, iż spiekanie laserowe proszków PLA ogranicza ich degradację termiczną i w konsekwencji mogą być stosowane do aplikacji medycznych [29,30]. Druk 3D z poliestrów alifatycznych zrewolucjonizował także obszar wszczepialnych, bioresorbowalnych rusztowań uwalniających leki. Zdolność do dostosowywania i tworzenia spersonalizowanych rusztowań może potencjalnie pomóc w rozwiązaniu problemów związanych z nieodpowiednim rozmiarem i konstrukcją stentu, zniesienie późnej zakrzepicy w stencie i pomoc we wzroście tętnicy [31]. Do innych zastosowań polimerów syntetycznych należy wytwarzanie hybrydowych powłok PLLA zawierających nanocząstki srebra wykazujące wysoką skuteczność przeciwbakteryjną [32].

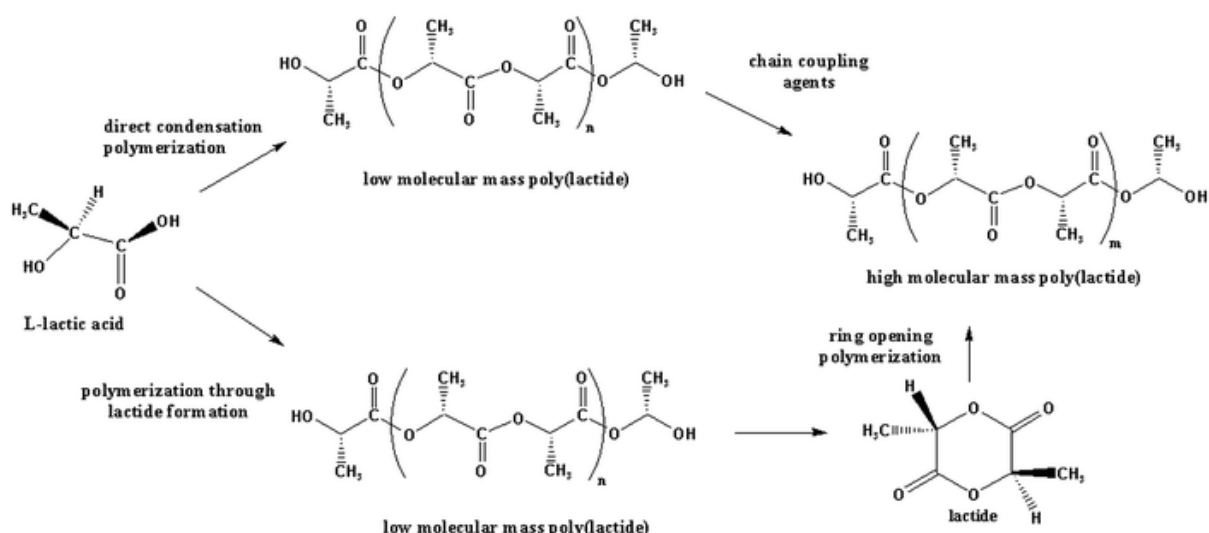
3.1. Synteza, struktura i właściwości fizykochemiczne poli(L-laktydu)

PLLA i PLLGA to biodegradowalne polimery produkowane z surowców odnawialnych pochodzenia roślinnego, takich jak skrobia i cukier. Główne metody syntezy polilaktydu to polimeryzacja z otwarciem pierścienia laktydu i polikondensacja kwasu mlekowego. Polimery na bazie kwasów mlekowych nazywane są poli(kwasem mlekowym). W obu przypadkach używany jest skrót PLA. Związkiem wyjściowym do polimeryzacji PLA może być kwas mlekowy, posiadający chiralny atom węgla, czyli występuje w postaci enancjomerów kwasu L(+)-mlekowego lub kwasu D(-)-mlekowego lub cykliczny dimer kwasu mlekowego - laktyd (rys. 5). W zależności od typu enancjomeru kwasu mlekowego otrzymuje się L-laktyd, D-laktyd lub mieszaninę racemiczną L,D-laktydu. Kwas L-mlekowy otrzymuje się drodze fermentacji glukozy wobec bakterii *Lactococcus lactis* LL0018 i *Lactobacillus casei* sp., kwas D-mlekowy wobec bakterii *Lactobacillus delbrueckii* LD0025 i *Sporolactobacillus inulinus* SI0073. Czystą postać kwasu mlekowego uzyskuje się na drodze neutralizacji mieszaniny fermentacyjnej lub z zastosowaniem technologii ultrafiltracji membranowej [33–35].



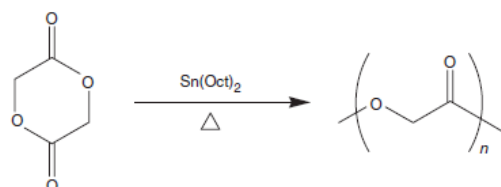
Rysunek 5. Struktura kwasu mlekowego z chiralnym atomem węgla.

Polikondensacja laktydu pozwala na uzyskanie produktu o niskiej masie cząsteczkowej, ponieważ trudno jest usunąć wodę – produktu ubocznego podczas polimeryzacji, co sprzyja depolimeryzacji. W celu uzyskania dużej masy cząsteczkowej PLA niezbędne są środki sprzęgające, co czyni tę metodę nieekonomiczną. Zdecydowana większość prac dotyczy syntezy PLLA o dużej masie cząsteczkowej ($\sim 10^5$ Da) z wykorzystaniem metody polimeryzacji L-laktydu z otwarciem pierścienia (ROP) (rys. 6). ROP pozwala na lepszą kontrolę procesu (kontrola stopnia polimeryzacji, sekwencji monomerów, grup końcowych). Do efektywnego przeprowadzenia reakcji stosuje się zwykle katalizator 2-etyloheksanian cyny(II) ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$, oktanian cyny II), który uzyskał atest FDA. Podczas ROP laktydu następuje atak nukleofilowy tego alkoholanu na laktyd, po którym następuje otwarcie pierścienia. Ta metoda prowadzi do otrzymania semikrystalicznego PLLA o temperaturze topnienia T_m bliskiej 180°C z grupami końcowymi w postaci drugorzędowej grupy alkoholowej i grupy estrowej [33–35]. Do polimeryzacji ROP diestrów stosuje się różne typy katalizatorów metalicznych, takie jak alkoholany glinu(III), cyny(II), butanolany cynku(II), mleczan cynku(II), także chlorek cyny(II), a mechanizm polimeryzacji katalizowanej przez te katalizatory został szeroko zbadane przez Dechy-Cabaret i in. [33]. W związku z dużym zapotrzebowaniem na polikatyd ze względów ekonomicznych i ekologicznych zaczęto testować inne metody polimeryzacji PLA. Rozwija się synteza enzymatyczna PLLA i PLLGA. Przeprowadzono taką syntezę w cieczy jonowej heksafluorofosforanu 1-heksylo-3-metyloimidazoliowego [HMIM][PF₆], w której pośredniczy enzym lipaza B z *Candida antarctica* (Novozym 435) [36]. Inne doniesienia literaturowe sugerują polimeryzację ROP katalizowaną enzymatycznie w stanie stopionym [37]. Zastosowanie biokatalizatorów enzymatycznych ma tę zaletę, że przebiegają one w łagodnych warunkach reakcji bez zanieczyszczeń toksycznymi substancjami organicznymi lub metalami, co może zwiększyć ich zastosowanie, szczególnie w zastosowaniach biomedycznych.



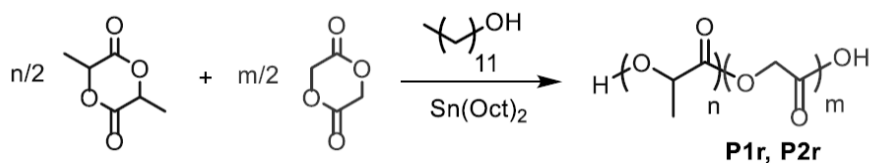
Rysunek 6. Różne metody syntezy PLLA z kwasu L-mlekowego. Schemat zaproponowany przez Ristić i in. [38].

Struktura PGA jest podobna do PLLA, jednakże PLLA wykazuje inne właściwości chemiczne, fizyczne i mechaniczne z uwagi na obecność bocznej grupy metylowej na węglu alfa (α). PGA syntezuje się również metodą ROP glikolidu w obecności $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ (rys. 7). Kwas glikolowy syntezowany jest chemicznie (w przemyśle wytwarzany przez hydrolizę kwasu monochlorooctowego w 50% wodnym roztworze NaOH), biologicznie (wykorzystując hydroksyacetonitryl lub glikol jako prekursor oraz hydrolazę nitrylową lub hydrogenazę mikrobiologiczną jako czynniki enzymatyczne) lub elektrochemicznie (doniesienia literaturowe wskazują na elektrochemiczne utlenianie glikolu etylenowego) [39,40].



Rysunek 7. Reakcja polimeryzacji PGA.

Kopolimer L-laktydu i glikolidu PLLGA otrzymuje się na poprzez syntezę ROP cyklicznych dimerów L-laktydu i glikolidu w obecności $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ jako katalizatora i 1-dodekanolu jako inicjatora (rys. 8). Właściwości fizykochemiczne PLLGA zależą od stosunku wagowego L-laktydu do glikolidu. [41].



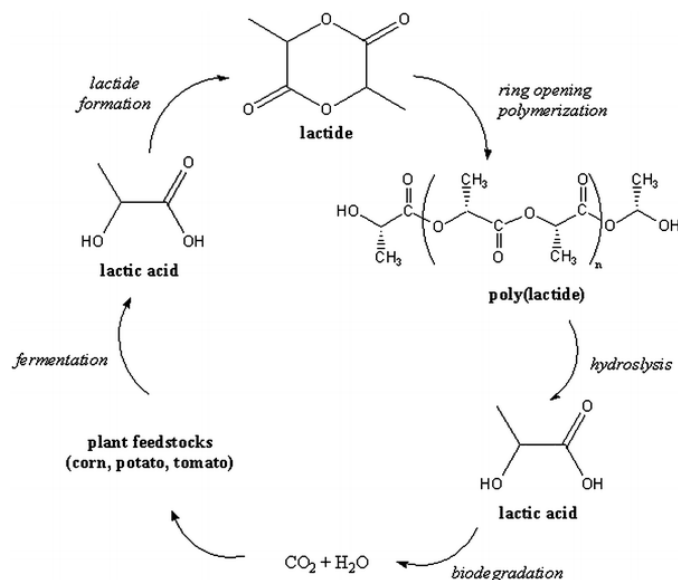
Rysunek 8. Reakcja polimeryzacji PLGA.

Właściwości fizykochemiczne PLLA i PLLGA, w tym hydroliza, biodegradacja, właściwości termiczne i mechaniczne, zależą od ich struktury molekularnej. Wykazano, że masa cząsteczkowa polimeru i stereochemia, w przypadku chiralnego monomeru laktydu, mają ogromny wpływ na właściwości fizyczne polimeru. Na przykład polimery PLLA o masie cząsteczkowej rzędu milionów są semikrystaliczne, podczas gdy polimery poli(D,L-laktydu) (PDLGA) o podobnej masie cząsteczkowej są amorficzne. Właściwości semikrystaliczne wykazuje również PGA, natomiast w kopolimerach laktydu i glikolidu krystaliczność zależy od zawartości glikolidu, co prowadzi do zwiększenia szybkości hydratacji i hydrolizy. PLLA jest bardziej hydrofobowy niż PGA, dlatego bogate w laktyd kopolimery PLLGA są mniej hydrofilowe niż PGA i absorbują mniej wody, co prowadzi do wolniejszej degradacji łańcuchów polimeru PLLGA w stosunku do PGA, ale szybszej w porównaniu do czystego PLLA. Na podstawie danych literaturowych moduł sprężystości podłużnej dla PLLA jest około dwukrotnie wyższy niż dla PLLGA. Natomiast większym wydłużeniem przy zerwaniu charakteryzuje się PLLGA. Oznacza to, że PLLGA wykazuje mniejszą wytrzymałość mechaniczną przy jednocześnie większej elastyczności. Zmiana stosunku laktydu do glikolidu z 85:15 na 50:50 nie wykazała znaczących różnic mechanicznych. Większy udział glikolidu wpływa znacząco na właściwości termiczne i czas degradacji hydrolitycznej. W kopolimerach PLLGA wraz ze wzrostem udziału glikolidu znacząco zmniejsza się temperatura zeszklenia T_g (~ 63 °C dla PLLA, ~ 59 °C dla PLLGA 85:15, ~ 32 °C dla PLLGA 50:50). Warto zaznaczyć, że wartość T_g dla PLLGA 50:50 jest poniżej temperatur fizjologicznych. Udział glikolidu zmniejsza czas degradacji hydrolitycznej, który dla czystego PLLA wynosi około 12-18 miesięcy (doniesienia literaturowe wskazują, że do całkowitej resorpcji PLLA potrzeba nawet 6 lat), dla PLLGA 85:15 około 5-6 miesięcy, natomiast dla PLLGA 50:50 czas ten jest bardzo krótki i wynosi około 1-2 tygodnie [12,42–45].

3.2. Właściwości resorpcyjne poli(L-laktydu)

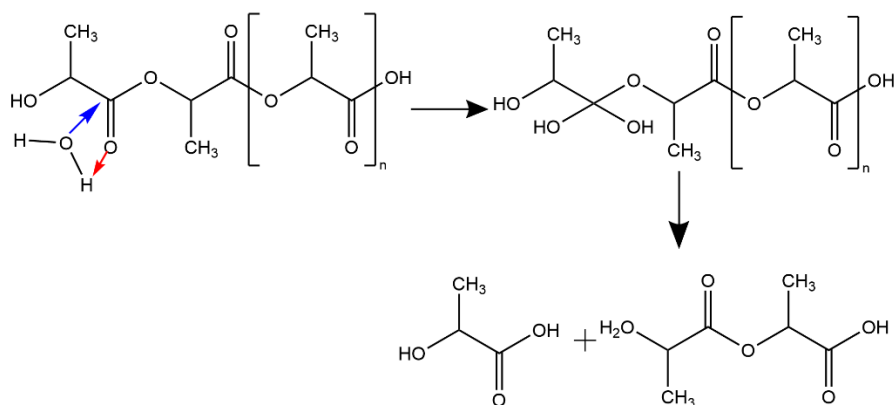
Termoplasty PLLA i PLLGA hydrolizują w środowisku organizmu do bezpiecznych i dobrze metabolizowanych produktów podczas procesu degradacji takich jak woda i dwutlenek węgla CO_2 , Rysunek 9 przedstawia cykl PLA od początku syntezy do końca degradacji. Wyróżnia się degradację hydrolityczną, enzymatyczną, powierzchniową, objętościową, natomiast w organizmie człowieka PLLA i PLLGA ulegają procesowi degradacji hydrolitycznej. Degradacja łańcucha polimerowego zachodzi na drodze statystycznego cięcia łańcucha. Wiązanie estrowe w cząsteczkach polimerów jest losowo atakowane przez cząsteczki

wody, a łańcuchy polimerowe są cięte na mniejsze fragmenty. W miarę postępu hydrolizy polimery rozkładają się na rozpuszczalne w wodzie monomery i oligomery, a następnie na wodę i dwutlenek węgla, które są wydalane z organizmu. Na proces degradacji istotny wpływ ma krystaliczność, masa cząsteczkowa, zawartość L i D laktydu w strukturze PLLA, stosunek laktydu do glikolidu w strukturach PLLGA, niewątpliwie środowisko hydrolizy tj. pH i temperatura [43,46,47].



Rysunek 9. Schemat cyklu życiowego poli(laktydu) w przyrodzie zaproponowany przez Ristić i in. [38].

Hydroliza tych polimerów jest jednak złożonym procesem chemicznym i fizycznym, obejmującym absorpcję wody przez matrycę, cięcie wiązania estrowego i dyfuzję oligomeru, co przedstawiono na rysunku 10.



Rysunek 10. Schemat depolimeryzacji łańcucha PLA.

Mniejsza gęstość fazy amorficznej i splecionych łańcuchów zwiększa prawdopodobieństwo kontaktu z wodą i hydrolizę w porównaniu do obszarów krystalicznych z uporządkowanymi łańcuchami i większej gęstości. Przypadkowe cięcie wiązania estrowego następuje podczas dyfuzji wody do obszaru amorficznego w wyniku rozrywania siły van der Waalsa oraz wiązań

wodorowych. Następuje rozerwanie wiązań kowalencyjnych, czego wynikiem jest zmniejszenie masy cząsteczkowej, temperatury zeszklenia T_g i wzrost stopnia krystaliczności polimeru w miarę postępu degradacji. W obszarze krystalicznym degradacja zachodzi stopniowo, gdy makrocząsteczkowy łańcuch PLLA zostanie zhydrolizowany do wielu małych łańcuchów cząsteczkowych. Wtedy PLLA traci swoją siłę kohezyjną (integralność), łańcuch cząsteczkowy staje się krótszy a stężenie grupy karboksylowej wzrasta (końcowe grupy karboksylowe autokatalizują proces degradacji). Wówczas cząsteczki PLLA stają się bardziej hydrofilowe i rozpuszczają się w środowisku wodnym do rozpuszczalnych oligomerów i monomerów kwasu mlekowego [46–50].

4. BIOMATERIAŁY CERAMICZNE

Fosforany wapnia (skrót CaP) należą do klasy biomateriałów ceramicznych, które są wysoce biokompatybilne. Materiały CaP od wielu lat są szeroko stosowane w inżynierii tkanki kostnej i zastosowaniach klinicznych ze względu na podobieństwo składu do mineralnej fazy kości i doskonałą biozgodność. CaP są bioaktywne, co oznacza, że umożliwiają wytrącanie się kryształów HAP na ich powierzchni. Ponadto większość materiałów na bazie CaP ulega biodegradacji i może być metabolizowana przez osteoklasty [51,52]. Przypisuje się to ich chemicznemu podobieństwu do fazy mineralnej tkanki kostnej, jednak należy wziąć pod uwagę wielkość kryształów. Nanokrystaliczne kryształy CaP wykazują zbliżoną resorpcję osteoklastyczną do naturalnej kości, podczas gdy kryształy wielkości mikronów są ograniczone pod względem resorpcji. Dlatego nanokrystaliczne fosforany wapnia mogą służyć jako syntetyczne analogi naturalnej kości do zastosowań ortopedycznych [51,53]. Rodzaje CaP można podzielić na fazy według ich stechiometrii, a dokładniej stosunku molowego jonów wapnia do fosforu [Ca/P] lub ich rozpuszczalności. Rozpuszczalność faz CaP zależy nie tylko od stechiometrii, ale także od pH i temperatury [54,55].

W niniejszej rozprawie doktorskiej szczególną uwagę poświęcono modyfikacji powierzchni cząstek hydroksyapatytu i bioszklą stosowanych jako napelniacz do kompozytów polimerowo – ceramicznych. Dlatego w tym rozdziale przedstawiono strukturę, właściwości fizykochemiczne i biologiczne fosforanów wapnia (hydroksyapatytu i cementu fosforanowo-wapiennego) i bioszklą.

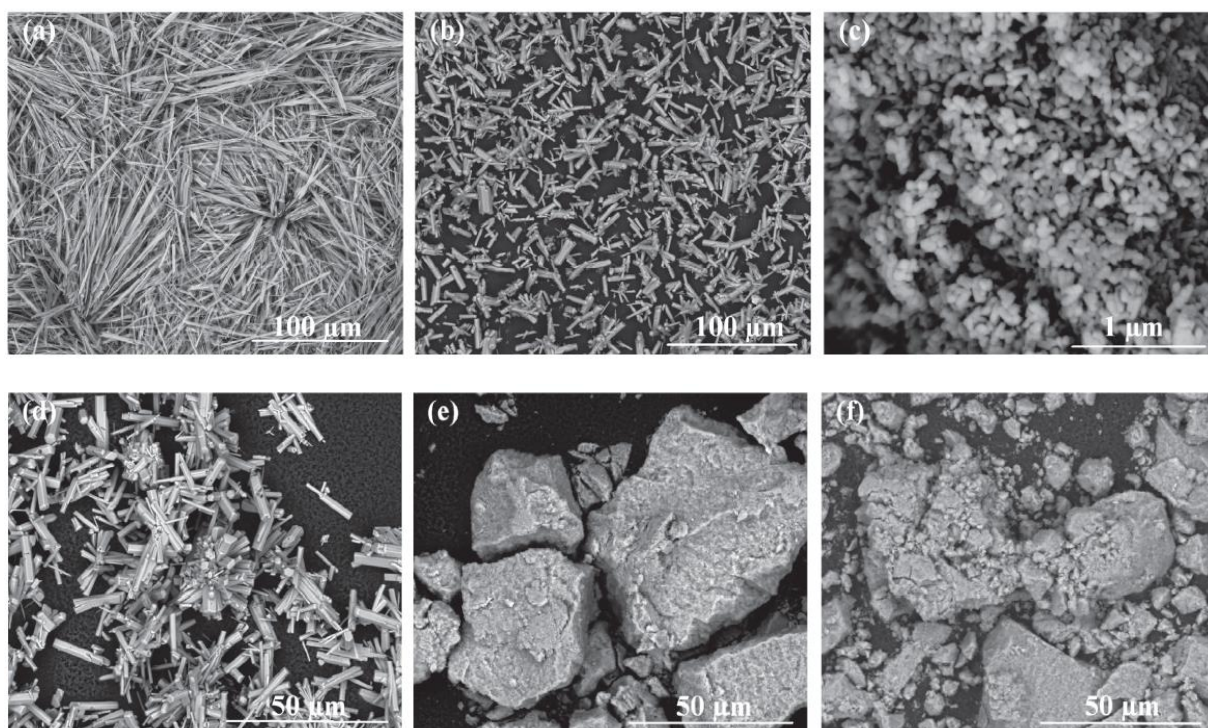
4.1. Hydroksyapatyt

Hydroksyapatyt ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) to materiał ceramiczny fosforanowo – wapienny. Dokładny stosunek stechiometryczny Ca/P hydroksyapatytu jest równy 1,67. HAP jest najslabiej rozpuszczalną fazą CaP w fizjologicznym zakresie pH. Chemicznie czysty HAP krystalizuje w jednoskośnej grupie przestrzennej P21/b. W temperaturze powyżej 250 °C zachodzi przemiana fazowa z jednoskośnej do heksagonalnej, jednak niewielkie zanieczyszczenia (wakansy, substytuty jonowe, węglany, wodorofosforany, potas, sól, azotany, chlorki, zastąpienie grupy -OH fluorem lub chlorem; jony, które są zwykle wprowadzane do układu wytrącającego wraz z reagentami [56]) stabilizują heksagonalną strukturę HAP w temperaturze otoczenia. Wynika z tego, że heksagonalny HAP rzadko jest fazą stechiometryczną, a bardzo rzadkie monokryształy naturalnego HAP zawsze wykazują heksagonalną grupę przestrzenną. Heksagonalna struktura HAP z grupą przestrzenną $P6_3/m$ ma wymiary komórki $a = b = 9,37 \text{ \AA}$, oraz $c = 6,88 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$ (rys. 1 A, sekcja 2.1). Natywny HAP (niestechiometryczny) ma również strukturę heksagonalną [7,54].

Oprócz czystego HAP $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ wyróżnia się także HAP z niedoborem wapnia [$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ($0 < x < 1$)]. Stosunek molowy Ca/P HAP z niedoborem wapnia wynosi (CDHA) 1,5-1,67, w związku z tym charakteryzuje się wyższą rozpuszczalnością. Kryształy CDHA mają bardzo dużą powierzchnię właściwą, typowo 25-100 m²/g. Po podgrzaniu powyżej 700 °C, CDHA z Ca/P = 1,5 przekształca się w β -TCP, a ten ze stosunkiem Ca/P 1,5 - 1,67 w dwufazowy związek HAP i β -TCP [54].

Różne metody syntezy HAP skutkują różnymi morfologiami, rozmiarami i krystalicznością faz. Uzyskanie nanocząsteczkowego HAP jest istotne ze względu na to, że HAP ludzkiej kości mieści się w zakresie nanometrycznym. Nano HAP ma doskonałe właściwości kliniczne w porównaniu z mikrometrycznym HAP. Ponadto stwierdzono, że nano HAP poprawia proliferację komórek i aktywność komórkową we wzroście kości, co czyni go bardziej odpowiednim jako biomateriał do implantów kostnych [57]. Syntetyczny HAP można syntetyzować różnymi technikami, które zostały podzielone ogólnie na metody suche, mokre i wysokotemperaturowe. Do metod suchych zalicza się kalcynację i mielenie prekursorów chemicznych zawierających wapń i fosforan w fazie stałej oraz metodę mechanochemiczną wykorzystującą ściskanie, ścinanie lub tarcie poprzez mielenie w celu wywołania przemiany chemicznej. Do metod mokrych zalicza się chemiczne strącanie w zasadowym pH, hydrolizę, metodę hydrotermalną z wysoką temperaturą i ciśnieniem i metodę zol-żel. Wyróżnia się także techniki syntezy HAP wspomagane mikrofalami, np. technikę mikrofalową – hydrotermalną.

Metody wysokotemperaturowe to spalanie i piroliza, są najrzadziej stosowane z uwagi na słabą kontrolę nad parametrami przetwórstwa [58–60]. HAP może być również pozyskiwany z zasobów naturalnych np. kości odzwierzęcych, muszli morskich, skorupki jaj [7,61]. Do istotnych właściwości HAP zaliczają się kształt i morfologia otrzymywanych cząstek, które odgrywają ważną rolę we wzmacnianiu kompozytów i które zależą od układu rozpuszczalników, środków dyspergujących, stężenia jonów Ca^{2+} , metod suszenia i pH. HAP otrzymuje się w postaci kulistej, heksagonalnej, w formie prętów, igieł, płytek, rurek, whiskersów [60,62,63]. Wpływ pH i stężenia jonów Ca^{2+} na różną morfologię HAP pokazali w pracy Szterner i Biernat [60] (rys. 11).



Rysunek 11. Obrazy SEM HAP syntezowanych metodą hydrotermalną (200°C, 20 bar, 5h) (a) whiskersy, Ca^{2+} 0,2M, pH 3,1, (b) pręciki heksagonalne Ca^{2+} 0,2M, pH 4,2, (c) nanopręciki Ca^{2+} 0,05M, pH 9,0, (d) Ca^{2+} 0,2M, pH 4,2, (e) Ca^{2+} 0,05M, pH 9,3, (f) Ca^{2+} 0,05M, pH 11,06. Zaczepnięto z pracy Szternera i Biernat [60].

HAP jest wysoce bioaktywny i osteokonduktywny. Oznacza to, że wspomaga regenerację tkanki kostnej na powierzchni poprzez adhezję, proliferację i tworzenie macierzy zewnątrzkomórkowej przez osteoblasty. Nanokrystaliczny HAP jest bioresorbowalny przez osteoklasty, co oznacza, że jest osadzony w procesie przebudowy kości. Wykazano jednak, że resorpcja rusztowań kostnych składających się z minerałów CaP (głównie HAP) jest zbyt wolna dla prawidłowej odbudowy tkanki kostnej [64–66]. HAP z uwagi na stosunek Ca/P równy 1,67 jest najmniej rozpuszczalną fazą CaP. W warunkach *in vivo* szybkość resorpcji zmienia się w obrębie grupy fosforanów wapnia w następujący sposób $\alpha\text{-TCP} > \beta\text{-TCP} > \text{HAP}$. Uwalnianie

jonów nieorganicznych w trakcie procesu biodegradacji CaP jest niezbędne do modyfikacji zachowania komórek i zwiększenia osteoindukcyjności biomateriałów. Osteoindukcyjność opisuje zdolność materiału do indukowania tworzenia nowej kości bez obecności czynników osteogennych (biomateriały osteoinduktywne stymulują różnicowanie komórek macierzystych oraz osteoprogenitorowych w kierunku osteoblastów). W obecnie dostępnej literaturze pokazano, że wszczepione implanty fosforanowo wapienne wykazują słabą osteointegrację z powodu niewystarczającego unaczynienia i sygnałów osteoindukcyjnych. Jednak biomateriały dedykowane na rusztowania kostne, które mają strukturę porowatą i odpowiednią wielkość cząstek (skala nano) wpływają korzystnie na proces osteoindukcji. Cały proces tworzenia nowej tkanki (procesy osteointegracji i mineralizacji powierzchni czyli tworzenie bioaktywnej warstwy apatytu na powierzchni implantu) wspiera również biofunkcjonalizacja powierzchni cząstek CaP [20,67,68].

Fosforany trójwapniowe TCP

Istnieją dwie formy polimorficzne fosforanów trójwapniowych (TCP): α - i β -TCP [α/β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$]. α - i β -TCP powstają przez rozkład termiczny hydroksyapatytu z niedoborem wapnia lub reakcje kwasowo-zasadowe w stanie stałym między kwaśnymi fazami fosforanu wapnia i zasadami np. CaO. Fazy TCP powstają, gdy stosunek Ca/P wynosi dokładnie 1,5. Do powstania β -TCP konieczna jest temperatura powyżej 800 °C, a do powstania fazy α wymagana jest temperatura powyżej 1125 °C [54]. Fazy TCP krystalizują w romboedrycznej grupie przestrzennej R3c. Różnica między fazami α i β polega na objętości struktury krystalicznej. Skutkuje to różną szybkością degradacji, chociaż obie fazy są lepiej rozpuszczalne w porównaniu z HAP. W roztworach wodnych α -TCP jest bardziej reaktywny i szybko hydrolizowany do HAP z niedoborem wapnia. β -TCP jest bardziej stabilny w temperaturze pokojowej lub w temperaturze ciała niż α -TCP. Ważną zaletą β -TCP jest to, że jako jedyna faza CaP wykazuje potencjał osteoindukcyjny. Rozpuszczalność β -TCP jest zbliżona do rozpuszczalności minerału kostnego, w wyniku czego β -TCP nie jest rozpuszczany w warunkach fizjologicznych, ale jest resorbowany przez osteoklasty [69,70].

Wodorofosforan wapnia DCPA

Wodorofosforan wapnia występuje w postaci bezwodnej (CaHPO_4) i uwodnionej ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Znany są również pod nazwami bezwodny lub dihydrat fosforanu

dwuwapniowego (DCPA lub DCPD; ich minerały nazywane są odpowiednio monetytem i bruszytem). Obie fazy są jeszcze lepiej rozpuszczalne w roztworach wodnych niż TCP. Stosunek Ca/P wynosi 1,0. DCPD otrzymuje się przez strącanie zawiesiny $\text{Ca}(\text{OH})_2$ w roztworze H_3PO_4 o tym stosunku molowym Ca/P. DCPA powstaje, gdy temperatura tego roztworu przekracza $80\text{ }^\circ\text{C}$. Wiadomo, że zarówno DCPA, jak i DCPD inicjują powstawanie HAP. DCPD występuje w patologicznych zwapnieniach (kamień nazębny, kamienie moczowe). W stomatologii stosowany jako półprodukt do remineralizacji zębów [54].

Głównym ograniczeniem ceramiki CaP są słabe właściwości mechaniczne. Dlatego cząstki CaP są stosowane zwykle jako napełniacz do kompozytów polimerowo – ceramicznych. Biodegradowalna i biokompatybilna osnowa polimerowa ma zapewnić większą wytrzymałość mechaniczną rusztowania, podczas gdy ceramika CaP właściwości osteokonduktywne i osteoindukcyjne. Jak wspomniano wyżej, syntetyczny HAP, który jest przedmiotem pracy doktorskiej, jest przede wszystkim osteokonduktywny. Dlatego prowadzone są liczne badania dotyczące modyfikacji powierzchni cząstek HAP cząsteczkami biologicznymi. Biofunkcjonalizacja powierzchni HAP może wspierać indukowanie lokalnych komórek macierzystych do różnicowania się w komórki kostne bez jakiegokolwiek odpowiedzi immunologicznej. Dlatego w niniejszej pracy zastosowano modyfikację powierzchni HAP i bioaktywnego szkła L-lizyną i polidopaminą, co zostanie wyjaśnione w rozdziale 6.

4.2. Cementy fosforanowo-wapienne

Cementy fosforanowo-wapienne (CPC) są zatwierdzone przez FDA. CPC to preparaty jednej lub kilku sproszkowanych faz CaP, które samorzutnie przechodzą proces transformacji w obecności roztworów wodnych. Proces spontanicznej przemiany nazywany jest procesem samowiązającym, stąd preparaty CPC są powszechnie nazywane samowiązającymi. Oznacza to, że materiały CPC po zmieszaniu prekursorów fazy stałej CaP i ciekłej tworzą pastę zdolną do samoczynnego wiązania i twardnienia *in situ* w miejscu ubytku kostnego, tworząc stabilne termodynamicznie rusztowanie dla wzrostu natywnej tkanki w temperaturze ciała. Na etapie wiązania lepki charakter cementu zostaje zmieniony na bardziej stały [71]. Ze względu na zależne od czasu reakcje faz CaP, które wytrącają się, hydrolizują i ponownie wytrącają, aż do osiągnięcia stanu najbardziej nierozpuszczalnego, wiązanie cementu charakteryzuje się początkowym i końcowym czasem wiązania, które reprezentują czasy, po których związany cement przenosi określone obciążenia (zgodnie z normą ASTM C266-04) [72]. Niemniej jednak pełne wiązanie nastąpi dopiero po osiągnięciu stanu równowagi, co powinno zająć

więcej czasu niż początkowy i końcowy czas wiązania. Cały proces wiązania, w tym reakcje chemiczne, twardnienie, krystalizacja i tworzenie końcowych produktów reakcji, zależy głównie od wartości pH. W zależności od wartości pH cementy ortofosforanowe mogą tworzyć dwa główne produkty: wytrącony, słabo krystaliczny HAP i CDPA przy $\text{pH} > 4,2$, w tym fizjologicznym $\text{pH} 7,4$ (w tym zakresie najmniej rozpuszczalną fazą jest HAP), lub CDPD przy $\text{pH} < 4,2$ (w tym zakresie najmniej rozpuszczalną fazą jest CDPD). Z tego powodu często rozróżnia się CPC tworzące HAP i CDPD. Chemiczny charakter reakcji może być albo reakcją kwasowo-zasadową albo przekształceniem fazy metastabilnej w bardziej stabilną. Końcowy utwardzony produkt CPC ma ogromne znaczenie, ponieważ decyduje o rozpuszczalności, a zatem o bioresorbowalności *in vivo* [70].

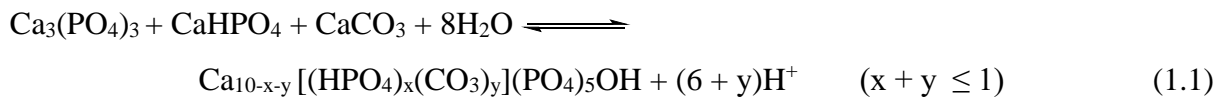
Po zmieszaniu prekursorów CaP i odpowiedniego roztworu tworzy się lepka i dająca się formować pasta, która została się od kilku minut do kilku godzin (w zależności od składu). W tej pracy wykorzystano zatwierdzoną klinicznie pastę CPC, która składa się z prekursorów fosforanu wapnia (głównie α -TCP) i biokompatybilnego, ale hydrofobowego płynu nośnego (na bazie krótkołańcuchowych trójglicerydów). Taka kompozycja pozwala na długie przechowywanie i nieograniczoną przydatność do ekstruzji w łagodnych warunkach [64,73,74]. Porowate rusztowania CPC można wydrukować z dużą dokładnością, a następnie utwardzić je w środowisku wodnym [75,76]. W czasie wiązania płyn nośny wypływa ze struktury rusztowania bez pozostałości, a prekursorzy reorganizują się w nanokrystaliczny HAP z niedoborem wapnia, który może być resorbowany przez osteoklasty. Reakcja wiązania cementu zachodzi dopiero w ostatecznym zastąpieniu cieczy nośnej wodą, przy czym obie ciecze są oddzielone wyraźną granicą faz (IF) (rys. 12). Specyficzne dla pacjenta struktury rusztowań z pasty CPC można wytwarzać za pomocą druku 3D metodą wytłaczania [64,77].



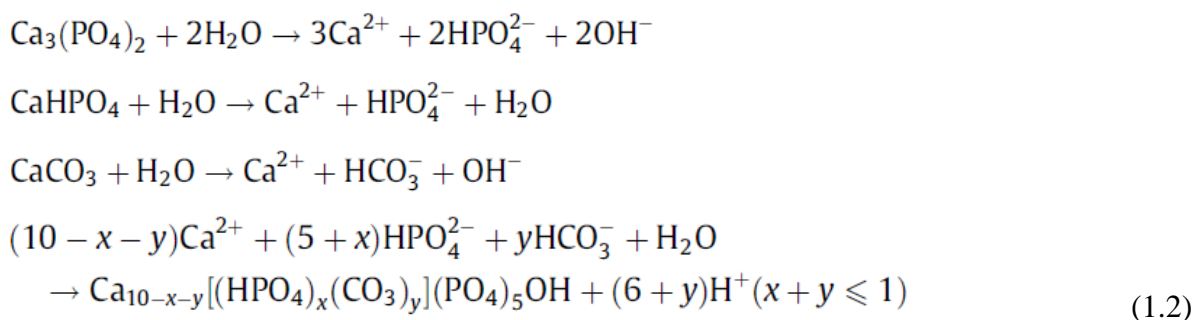
Rysunek 12. Schemat wiązania cementu CPC [77] oraz przykład usieciowanego rusztowania CPC po 3 dniach inkubacji w atmosferze wodnej i temperaturze $37\text{ }^{\circ}\text{C}$; widoczna faza olejowa, która wypłynęła na zewnątrz rusztowania.

Prekursory pasty CPC (wykorzystanej w pracy) to α -TCP, DCPA, CaCO_3 i HAP. Niewielka ilość czystego HAP działa jako nukleant dla szybszego wiązania i powstawania

mniejszych kryształów. Podczas wiązania w środowisku wodnym (37 °C) pasta CPC przekształca się w węglanowy HAP z niedoborem wapnia zgodnie z równaniem 1.1.



Reakcje chemiczne podczas procesu sieciowania zaczynają się od hydratacji i rozpuszczania kolejno α -TCP, DCPA, CaCO_3 zgodnie z podanymi niżej równaniami. Dalsza inkubacja w środowisku wodnym prowadzi do zmniejszenia ilości materiałów wyjściowych i zwiększenia osadzania się bardziej stabilnej węglanowego HAP z niedoborem wapnia (1.2) [77].



Ze względu na podobieństwo fizykochemiczne do fazy mineralnej kości, zbadano potencjał cementów tworzących HAP jako substytutów kości. Można je podawać pacjentom w postaci preparatów do wstrzykiwań, które wiążą się w obecności krwi lub jako już utwardzone i wstępnie uformowane implanty [71]. Pasty CPC są z powodzeniem stosowane w chirurgii do wypełniania małych ubytków kostnych. Z uwagi na właściwości samowiązące i utwardzanie pasty w temperaturze ciała oraz ściśle dopasowanie pasty do ubytku kostnego bezpośrednie stosowanie CPC w chirurgii kostnej stało się pod koniec XX wieku innowacyjną metodą regeneracji tkanki twardej [70]. Rusztowania wykonane z pasty CPC pozwalają na rozprzestrzenianie się, proliferację i różnicowanie mezenchymalnych komórek macierzystych, komórek osteoblastycznych i innych komórek kości [66,78]. Badania *in vivo* wykazały wysoką biokompatybilność struktur CPC i mocowanie do natywnej kości, jednak wciąż niską szybkość degradacji [65]. Idealnie rusztowanie kostne powinno rozkładać się w takim samym tempie, w jakim tworzy się nowa kość. Materiały CaP ulegają biodegradacji przede wszystkim poprzez dwa mechanizmy: bierny proces resorpcji poprzez rozpuszczanie chemiczne i aktywną resorpcję poprzez proces komórkowy. Zwiększenie degradacji rusztowań CPC osiągnięto poprzez dodanie szybko degradowalnego porogenu PLGA, w celu wytworzenia makroporów w implantacie po degradacji PLGA [71,79]. Wielokrotnie wykazano, że CPC działa osteokondukcyjnie, a powstały HAP jest bioaktywny. Wciąż istniejącym ograniczeniem jest

osteoindukcyjność. Wykazano jednak, że właściwości takie jak topografia powierzchni, porowatość lub skład (np. przez dodatkowe jony, takie jak Sr^{2+} , Zn^{2+}) wpływają korzystnie na zdolność materiału do osteoindukcji. Rozbudowana architektura implantu pozwala na uwięzienie i koncentrację krążących czynników wzrostu i komórek osteoprogenitorowych *in vivo*, nadając zdolność do osteoindukcji [71,80,81].

Ważnym zagadnieniem związanym z pastami CPC jest proporcja ciała stałego faz CaP do cieczy, ponieważ określa zarówno bioresorbowalność, właściwości reologiczne istotne z punktu widzenia druku 3D past CPC, i wstrzykiwalność, ważny parametr podczas implementacji klinicznej pasty. Wstrzykiwalność określana jest jako siła potrzebna do przecięcia preparatu przez igłę lub strzykawkę o określonej geometrii. Sieciowanie pasty prowadzi do wzrostu siły pogarszającej zdolność do wstrzykiwania. Podczas druku 3D implantów CPC lub podczas wstrzykiwań klinicznych past CPC pojawia się problem zapychania igły/strzykawki związany z niejednorodnym przemieszczaniem cząstek CaP w fazie ciekłej. W konsekwencji prowadzi to do separacji faz. Zatem dobór odpowiednich parametrów, takich jak stosunek cząstek CaP do fazy ciekłej, wielkość cząstek, geometria strzykawki, szybkość i siła wyłaczania wpływają na zachowanie jednorodności materiału podczas procesu iniekcji [82].

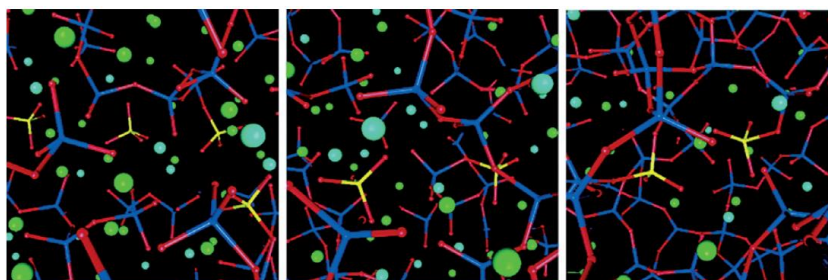
4.3. Bioaktywne szkło

Bioaktywne szkło (bioszkło, BG, ang. bioactive glass) jest materiałem ceramicznym składającym się z minerałów, które naturalnie występują w organizmie. BG jest klasą nieorganicznych, szklistych struktur i biokompatybilnych materiałów, które znajdują zastosowanie w implantologii. BG wykazują zdolność do rozwijania silnego wiązania z tkanką kostną i wiązania z kością szybciej niż inne bioaktywne materiały ceramiczne. Główne cechy BG to wysoka osteokonduktywność, działanie osteostymulujące i duża szybkość degradacji, co czyni je obiecującymi materiałami do zastosowań w regeneracji kości [83].

Oryginalny Bioglass® odkryty przez Hencha w 1969 r. dzisiaj jest biomateriałem implantacyjnym trzeciej generacji, ze względu na rolę biologiczną, którą odgrywają jego jonowe produkty uwalniane bezpośrednio do środowiska fizjologicznego, zdolność wiązania z tkanką żywą i budowaniem międzyfazowej warstwy CaP. Skład Bioglass® (45S5) to 45% SiO_2 , 24,5% Na_2O , 24,5% CaO i 6% P_2O_5 . Zapewnia on dużą ilość CaO z pewną ilością P_2O_5 w matrycy $\text{Na}_2\text{O-SiO}_2$. Skład jest bardzo zbliżony do trójskładnikowej eutektyki, dzięki czemu łatwo się topi. W badaniach *in vitro* dowiedziono, że Bioglass® (45S5) sprzyja formowaniu

warstwy HAP w roztworach testowych niezawierających jonów wapnia ani fosforu. W badaniach *in vivo* stwierdzono, iż kryształy HAP związane były z włóknami kolagenowymi wytwarzanymi przez osteoblasty. Badania te dały początek szeroko rozwijanej grupie bioszkieł [84].

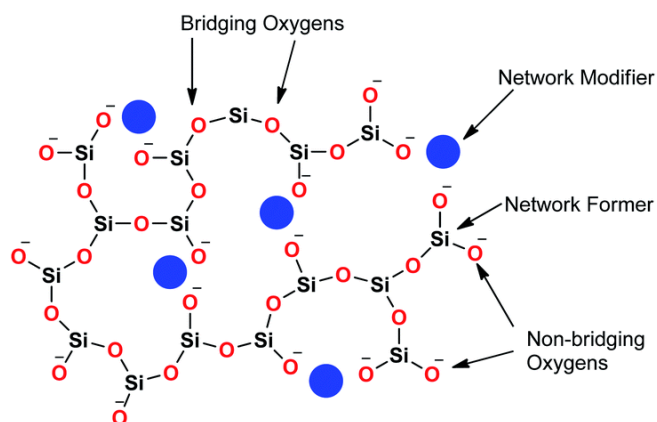
W przypadku większości BG podstawowymi składnikami są zwykle SiO_2 , CaO , P_2O_5 i Na_2O . Badaniom poddaje się kompozycje BG dwuskładnikowe ($\text{SiO}_2 - \text{CaO}$), trójskładnikowe (np. $\text{SiO}_2 - \text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5$ lub $\text{SiO}_2 - \text{CaO} - \text{Na}_2\text{O}$) oraz czteroskładnikowe (np. Bioglass®). Tlenki P_2O_5 i Na_2O nie występuje we wszystkich składach BG. Na_2O jest to dodatkowy składnik skutecznie obniżający temperaturę topnienia szkła wytwarzanego metodą hartowania ze stopu. Natomiast zarówno dodatek P_2O_5 i Na_2O wpływają na szybszy proces degradacji warstw BG. Dzięki postępowi w chemii zol-żel obecnie możliwe są do uzyskania liczne kompozycje bioaktywnych BG zawierających do 90% molowych SiO_2 . W przypadku metody hartowania ze stopu bioaktywne BG można otrzymać przy zawartości maksymalnej 60% molowych SiO_2 . Szkła mają amorficzną strukturę. Nie mają symetrii, okresowości w strukturze i nie wykazują uporządkowania dalekiego zasięgu – w przeciwieństwie do kryształów. Ze względu na brak symetrii szkła mają właściwości izotropowe [84–86]. Budowa amorficzna wpływa na obecność temperatury zeszklenia T_g , która określa moment przejścia układu z przechłodzonej cieczy w ciało stałe. Szkła przy podgrzaniu wykazują płynne zmniejszenie lepkości o kilka rzędów wielkości, dzięki czemu można je łatwo przetwarzać. BG to szkła krzemianowe, które charakteryzują się obecnością krzemionki (SiO_2) jako sieci tworzącej tlenek, gdzie podstawową jednostką jest tetraedr SiO_4 (rys. 13 i 14).



Rysunek 13. Symulacje MD (Molecular Dynamics simulations) struktur BG z 46,1 % mol SiO_2 (Bioglass 45S5, po lewej), 56,5 % mol SiO_2 (BG55, środek) i 66,9 % mol SiO_2 (BG65, po prawej), pokazujące malejącą liczbę kationów modyfikujących i bardziej usieciowaną sieć od lewej do prawej. (O czerwony, Si niebieski, P żółty, Na zielony, Ca cyjan/błękitny) [87].

Każda jednostka SiO_4 tworzy trójwymiarową sieć i łączy się ze sobą (z maksymalnie czterema sąsiednimi tetraedrami SiO_4) poprzez wiązania kowalencyjne $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$ zwane mostkowymi wiązaniami tlenowymi. Sód, wapń, fosfor, potas, magnez i inne pierwiastki metali alkalicznych działają jako modyfikatory sieci, które zakłócają sieć, tworząc niemostkowe wiązania tlenowe (wiązania jonowe) [86–88]. Rysunek 13 przedstawia struktury BG wraz ze zwiększającą się

zawartością SiO₂. Im więcej krzemionki, tym mniej dodatkowych jonów, modyfikatorów sieci, które wpływają na szybkość rozpuszczania BG.

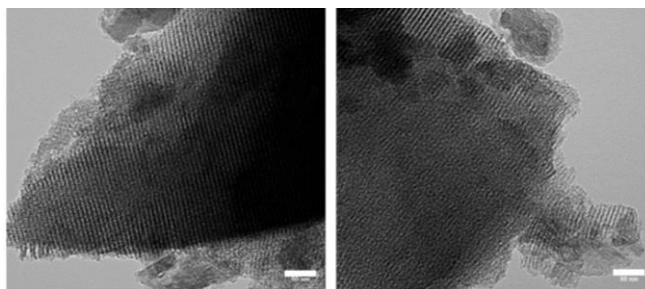


Rysunek 14. Dwuwymiarowy schemat sieci BG z modyfikatorami sieci szkła [88].

Bioszklą są otrzymywane za pomocą dwóch głównych metod: hartowania ze stopu (melt – quenching) i procesów zol-żel. W procesie hartowania ze stopu wsad (tlenki nieorganiczne, węglany, fluorki i inne) jest podgrzewany do wysokich temperatur (zwykle >1300 °C) i hartowany w celu zamrożenia nieuporządkowanej struktury atomowej stopu w celu uzyskania szkła amorficznego. Jeśli chłodzenie jest wystarczająco szybkie, krystalizacja zostanie zahamowana i powstanie szkło [86,87]. W większości przypadków szkło poddaje się obróbce cieplnej w niższych temperaturach w celu ograniczenia naprężeń termomechanicznych w strukturze wywołanych szybkim chłodzeniem. W procesie zol-żel wykorzystuje się nieorganiczne lub organiczne prekursorzy (np. alkoholany, takie jak ortokrzemian tetraetylu), które poddaje się różnym procesom hydrolizy i kondensacji, a następnie obróbce cieplnej suszenia i stabilizacji termicznej. Dokładniej synteza zol-żel składa się z dwóch odrębnych faz: roztworu i żelowania. W pierwszej fazie powstaje roztwór koloidalny z prekursorów (zol), który zazwyczaj otrzymuje się poprzez kontrolowaną hydrolizę i kondensację prekursorów. W drugiej fazie zachodzi reakcja polikondensacji, która w wyniku dodania katalizatora (kwasu lub zasady) prowadzi do powstania sztywnej i wzajemnie połączonej sieci 3D (żelu) zawierającej odrębne cząstki lub łańcuchy polimeru. Za pomocą tego procesu można formować BG w postaci proszku, nanocząstek, sfer, cienkich warstw, włókien, monolitów, pianek, które mogą być wytwarzane z tego samego składu bezpośrednio z roztworów [84,86,88–90]. Bioszklą otrzymywane metodą zol-żel mają więcej zalet. BG z procesu zol-żel są nanoporowate, a wskaźnik bioaktywności i szybkość tworzenia warstwy apatyty są większe dla szkieł zol-żel z uwagi na większą frakcję uwalniania krzemionki, która zarodkuje kryształy HAP w porach BG. Dużą zaletą BG otrzymywanych metodą zol-żel jest to, że łatwo można je

dotować innymi jonami terapeutycznymi (np. Zn, Sr, Mg, Cu, Ta, Co, F, Al, Ag, Ga) [84,91–94]. Stront (Sr) jest niezbędnym elementem śladowym ludzkiego ciała, który ma korzystny wpływ na metabolizm kości (promowanie tworzenia kości i replikacji osteoblastów), zwiększa różnicowanie osteogenne i pomaga ustabilizować strukturę kości. Procesy interakcji Sr z tkanką kostną oparte są na mechanizmach odbywających się fizjologicznie z udziałem wapnia. Szybkość, z jaką Sr jest włączany do kości, jest bardzo podobna do tego, do której włączono wapń. Wyższa zawartość strontu występuje w kości beleczkowej w porównaniu z kością korową. Sr promuje tworzenie nowej tkanki kostnej wpływając na osteoblasty, zwiększa ich proliferację i różnicowanie. Wskazuje na to wzrost ekspresji genów osteogennych. Sr wzmacnia syntezę białek macierzy kostnej osteoblastów oraz hamuje apoptozę tych komórek, która promuje przeżycie osteoblastów [95,96]. Z kolei cynk (Zn) znajduje się we wszystkich tkankach biologicznych, jest niezbędnym mikroelementem w metabolizmie kości. Odgrywa znaczącą rolę w procesie wzrostu, w układzie nerwowym oraz w układzie odpornościowym. Niedobór lub nadmiar Zn może prowadzić do szeregu zaburzeń, ponieważ jony Zn są składnikami lub aktywatorami wielu enzymów zaangażowanych w procesy metaboliczne. Zn indukuje tworzenie kości *in vitro* i zapobiega nadmiernej resorpcji kości. Dodatkowo Zn wykazuje działanie przeciwbakteryjne i przeciwzapalne. Niedobór tego pierwiastka spowalnia wzrost szkieletu i powoduje zmiany w zwapnieniach kości. Uwalniane jony Zn stymulują proliferację i różnicowanie mezenchymalnych komórek macierzystych w osteoblasty. Zn jako dodatek w składzie bioszkleła przyspiesza tworzenie warstwy apatytu na powierzchni BG [86,92,93,97,98].

Inny rodzaj BG to mezoporowate bioszkleła (MBG). MBG specjalny rodzaj BG znany z wysoce uporządkowanej, mezoporowatej struktury kanałowej SiO₂ (rys. 15) i dużej powierzchni właściwej. Zhu i in. [99] zsyntetyzowali MBG zawierające odpowiednio 80, 5 i 15 % wag. Si, P i Ca. MBG wykazało dobrą cytokompatybilność i rozprzestrzenianie się ludzkich komórek pochodzących z kości po wysianiu na rusztowaniach MBG. Dzięki dużej powierzchni właściwej kanały MBG mogą być łatwo wypełniane lekami, czynnikami wzrostu lub specjalnymi jonami. Lokalne uwalnianie jonów i leków w celu wywołania określonych efektów terapeutycznych (poprawa osteogenezy i angiogenezy, właściwości antybakteryjne) pozwala na wykorzystanie tych materiałów w systemach dostarczania [99,100].

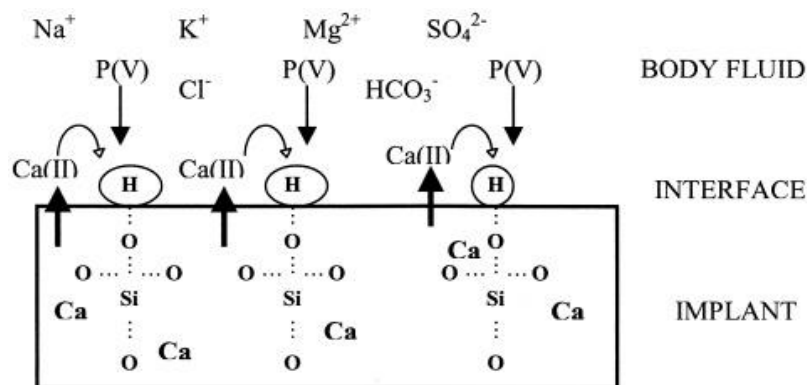


Rysunek 15. Obrazy TEM (transmisyjny mikroskop elektronowy) pokazujące kanałową strukturę MBG zawierającą 10 i 15 % mol. Zn. Skala 50 nm [92].

Ogólnie metoda syntezy zol-żel jest uznawana za technikę opartą na chemii mokrej, która oferuje obiecujące i elastyczne podejście do otrzymywania różnego rodzaju nowatorskich i funkcjonalizowanych materiałów, takich jak szkło, ceramika i materiały hybrydowe organiczno/nieorganiczne o różnej morfologii, w niskich temperaturach i łagodnych warunkach chemicznych [88].

Mechanizm powstawania apatyty na cząstkach BG

Mechanizm powstawania warstwy apatyty na powierzchni BG przedstawiono na rysunku 16. Cząstki BG w kontakcie z roztworami wodnymi (np. płynami ustrojowymi), zaczynają się rozpuszczać i uwalniać jony np. wapnia, fosforu, sodu. Jednym z rezultatów tego uwalniania jonów jest tworzenie się powierzchniowej warstwy apatyty. Porowata powierzchnia, otwarta sieć krzemianowa bioaktywnych szkieł, obecność niemostrkowych atomów tlenu i dodatek kationów modyfikujących umożliwiają cząsteczkom wody penetrację sieci. Gdy cząstki BG wchodzi w interakcje z wodą, na granicy bioszkło/woda zachodzi wymiana jonowa między jonami modyfikującym sieć BG i jonami hydroniowymi roztworu fizjologicznego. Ta wymiana jonowa powoduje szybki wzrost pH. Następnie dochodzi do zasadowej hydrolizy wiązań $-Si-O-Si-$ i reakcji kondensacji między grupami $Si-OH$, co prowadzi do repolimeryzacji warstwy krzemionkowej. Rozzerwana sieć krzemionkowa jest dogodnym miejscem do zarodkowania apatyty. W kolejnym etapie tworzy się amorficzna warstwa bogata w $CaO - P_2O_5$ na wierzchu warstwy krzemionkowej poprzez migrację jonów Ca^{2+} i PO_4^{3-} . W ostatnim etapie rozpoczyna się krystalizacja warstwy $CaO - P_2O_5$ przez włączenie do sieci jonów OH^- i CO_2^{3-} i w konsekwencji powstaje hydroksyłowęglan apatyty (HCA) na powierzchni szkła [84,86,87,101].



Rysunek 16. Schemat tworzenia warstwy HCA na powierzchni bioz szkła [101].

Inżynieria tkanki kostnej jest jednym z najbardziej obiecujących zastosowań medycznych BG ze względu na ich doskonałe właściwości osteokonduktywne i angiogenne, osteoinduktywne, wytrzymałość mechaniczną i optymalną szybkość degradacji. Właściwości mechaniczne BG zol-żel są gorsze w porównaniu do BG wytwarzanych ze stopu, z uwagi na dużą porowatość, która zależy od użytych prekursorów. Są jednak doniesienia literaturowe, że można zwiększyć wytrzymałość mechaniczną BG zol-żel dotując strukturę BG jonami o większej sile jonowej [88]. Zastąpienie Ca^{2+} jonami Mg^{2+} lub Ti^{4+} wzmacnia strukturę BG dzięki zmniejszeniu długości wiązań. W konsekwencji szkła podstawione Ti^{4+} i Mg^{2+} wykazywały lepszą twardość, wytrzymałość na zginanie i odporność na pękanie w porównaniu z BG wolnymi od Ti^{4+} i Mg^{2+} . Można także wnioskować, że im większa zawartość Si w strukturze tym mniejsze parametry mechaniczne [102]. Porowatość bioz szkła pogarsza właściwości mechaniczne, ale wykazano, że sprzyja adhezji komórek do biomateriału [98]. Karadjian i in. wykonali kompozyty CaP/BG i pokazali, że BG wpływa korzystnie na osteogenne różnicowanie komórek prekursorowych *in vitro* (na ich adhezję, żywotność i proliferację) oraz BG wspiera integrację kompozytów CaP/BG z kością *in vivo* [103]. Yun i in. wykorzystali metylocelulozę jako porogen o dużych porach do przygotowania MBG, które wykazywały doskonałą zdolność tworzenia apatytu w roztworze SBF i pomagały w proliferacji komórek osteoblastopodobnych MG-63 [104]. W innym badaniu Zhu i in. wykazali, że rusztowania MBG o składzie 80Si15Ca5P wykazują najlepszą zdolność do mineralizacji apatytu i pomagają w proliferacji i różnicowaniu mezenchymalnych komórek macierzystych [105].

5. KOMPOZYTY POLIMEROWO – CERAMICZNE

Kompozyty polimerowo-ceramiczne stanowią atrakcyjną alternatywę substytucji i regeneracji kości, ponieważ wykorzystują właściwości zarówno matrycy polimerowej oraz nieorganicznego napełniacza CaP. Naśladują kość, która także jest materiałem kompozytowym, choć bardziej skomplikowanym. Rusztowania wykorzystywane w inżynierii tkanki kostnej mają nie tylko pobudzać regenerację tkanek i wzmacniać proces osteointegracji ale także spełniać funkcje podporowe. Synergistyczny efekt wykazują biodegradowalne i osteokonduktywne kompozyty polimerowo – ceramiczne. Biopolimerowe rusztowania poprawiają pierwotną strukturę i stabilność tworzenia tkanki, natomiast proces degradacji powoduje obniżenie właściwości mechanicznych konstrukcji. Przygotowanie kompozytów zawierających napełniacz w postaci HAP lub BG staje się realną alternatywą dla spełnienia zapotrzebowania na bioaktywność, degradowalność i właściwości mechaniczne. W pracach dotyczących kompozytów dedykowanych do inżynierii tkankowej poddaje się hipotezie, że napełniacze ceramiczne zwiększą biokompatybilność matrycy polimerowej, wpłyną na szybkość degradacji kompozytu (co jest związane z procentowym udziałem cząstek ceramicznych i zwiększeniem ich bioaktywności) oraz na tworzenie silnych wiązań między implantem a tkanką kostną [88,106–108]. W tym rozdziale zaprezentowano przegląd literaturowy takich kompozytów z uwzględnieniem technik ich formowania.

Wybór odpowiednich metod wytwarzania kompozytów jest trudnym zagadnieniem ze względu na trudność uformowania implantów o pożądanym właściwościach. Tradycyjne techniki wytwarzania to spienianie gazowe, odlewanie rozpuszczalnikowe, mieszanie w stanie stopionym, elektroprzędzenie, liofilizacja i ługowanie solą są szeroko stosowane do wytwarzania rusztowań. Ich zaletą jest prostota wykonania. Natomiast ograniczenia wymienionych metod dotyczą braku całkowitej kontroli architektury rusztowań (np. wielkości porów) [106]. Zarówno sposób przygotowania, jak i skład wpływają na wielkość porów i porowatość rusztowania. Wielkość porów i porowatość należą do najważniejszych właściwości porowatych rusztowań 3D. W ostatnich latach w obszarze wytwarzania kompozytów poczyniono jednak wiele postępów. Dotyczą one np. wytwarzania kompozytów metodą wymywania cząstek stałych (PL), separacji faz indukowanych termicznie (TIPS) i połączenia tych obu technik (TIPS-PL) stosując NaCl jako porogen. w procesie TIPS pory pojawiają się w materiale w wyniku rozdzielenia faz i usunięcia rozpuszczalnika metodą liofilizacji. W procesie TIPS-PL rozmiar porów reguluje się za pomocą dodatkowego porogenu, który można usunąć z kompozytu po liofilizacji w procesie ługowania [109,110].

Inne techniki, znane jako techniki druku AM (ang. additive manufacturing) lub 3D zostały niedawno zademonstrowane jako potencjalne możliwości w zakresie produkcji rusztowań. Formowanie addytywne to nowa i nowoczesna technika, która wykazuje ogromny potencjał w zakresie oferowania pełnej kontroli morfologii detali (wielkość porów). Technika ta cieszy się dużym zainteresowaniem w druku 3D spersonalizowanych implantów. Istnieją różne odmiany druku 3D, w tym stereolitografia (SLA), modelowanie warstwowe struktur z topionego tworzywa (FDM), selektywne spiekanie laserowe (SLS) i najnowocześniejsze biodrukowanie. Etapy procesu drukowania 3D w celu zbudowania rusztowania są konfigurowane w 3 krokach: (1) projekt rusztowania za pomocą oprogramowania do projektowania modeli wspomaganego komputerowo (CAD), w praktyce na podstawie obrazów tomografii komputerowej (2) generowanie pliku w standardowym języku (.STL) i programowanie warstw obiektu 3D oraz (3) drukowanie i dobór optymalnych parametrów drukowania [106,107]. Technikę SLS i biodrukowania omówiono szerzej w rozdziale 7.

Sztywność podłoża ma również duże znaczenie i może wpływać na zachowanie komórek poprzez wiązanie integryn (grupa adhezyjnych białek powierzchniowych), podobnie jak topografia powierzchni biomateriału. Migracja komórek wzdłuż podłoża wyzwała siłę trakcji komórkowej, która służy jako początkowy bodziec do mechanotransdukcji komórkowej. Wytworzona siła jest przekazywana przez integryny w celu zainicjowania dalszych szlaków, które prowadzą do określonych zachowań komórkowych. Istnieją również dowody na to, że cytoszkielet komórki wraz z integrynami pomaga w konwersji bodźców mechanicznych na reakcje biochemiczne komórki. Po przeniesieniu sztywności mechanicznej przez integryny i cytoszkielet, substraty, które odpowiadają fizjologicznej sztywności tkanki docelowej, spowodują zróżnicowanie do odpowiedniego typu tkanki. Oznacza to, że sztywność materiału może modulować różnicowanie komórek macierzystych w różne linie. Miękkie podłoża (<1 kPa) prowadzą do różnicowania w kierunku komórek nerwowych, podłoża o średniej sztywności (<100 kPa) powodują różnicowanie chondrogenne, podczas gdy sztywniejsze podłoża (>100 kPa) mogą prowadzić do różnicowania osteogenne [111]. McCoy i współautorzy wykazali, że mechaniczne obciążenie rusztowania podczas hodowli tkanki kostnej zwiększa ekspresję białek morfogenetycznych kości, zmiany w środowisku pozakomórkowym, kształt komórek, odkładanie się wapnia i odstęp międzyfibrylarne. Rusztowanie powinno również umożliwiać przenoszenie naprężeń na rosnące na nim komórki, a komórki powinny być w stanie wyczuć naprężenia w rusztowaniach [112]. W związku z tym przypuszcza się, że właściwości mechaniczne rusztowań wpływają na aktywność biologiczną komórek. Rusztowanie powinno mieć odpowiednią wytrzymałość mechaniczną, aby

wytrzymać obciążenia dostarczane podczas rozwoju tkanki. Dlatego kompozyty na bazie PLA i PLGA z cząstkami ceramicznymi są odpowiednim wyborem do zastosowań małych ubytków kostnych lub konstrukcji nienośnych, wymagających degradacji materiału w czasie odbudowy nowej tkanki [106,113].

Lu H. H. i in. opracowali porowate rusztowanie metodą spiekania laserowego z mikrosfer PLGA i BG 45S5 oraz cienkie filmy metodą wylewania z roztworu. Stwierdzono, że kompozyty PLGA/BG są biodegradowalne, bioaktywne i nadają się do zastosowań w inżynierii tkanki kostnej. Przeprowadzono test bioaktywności w SBF, aby ocenić tworzenie warstwy CaP w ciągu 7 dni. Wykazano, że bioaktywne cząstki BG promują ekspresję kolagenu (typu I) przez ludzkie osteoblasty. Kontrolne rusztowanie PLGA wykazywało 31% całkowitej porowatości przy średniej średnicy porów 116 μm , podczas gdy kompozyt PLGA/BG wykazuje 43% całkowitej porowatości przy średniej średnicy porów 89 μm . Ponadto zbadano właściwości mechaniczne rusztowania z kompozytu i zaobserwowano wzrost modułu sprężystości do $51,3 \pm 6,1$ MPa w porównaniu z modułem sprężystości ($26,5 \pm 3,4$ MPa) kontrolnego rusztowania PLGA. Wyniki te wskazują, że BG zwiększa bioaktywność kompozytów na bazie polimerów do potencjalnych zastosowań w regeneracji kości [114]. Zhang K. i współautorzy opracowali porowate kompozyty PLLA/BG metodą separacji faz. Średnica cząstek BG wynosiła 1,5 μm . Zbadano wpływ zawartości BG i modyfikacji BG 3-aminopropylotrimetoksylosilanem na mikrostrukturę, właściwości mechaniczne i tworzenie apatytu kompozytów. Autorzy wykazali, że mikrostruktury kompozytowe składają się z porowatej matrycy PLLA z równomiernie rozmieszczonymi cząstkami BG. Zawartość BG nie wpłynęła znacząco na mikrostrukturę kompozytów, z kolei modyfikacja cząstek BG silanem skutkowała lepszym wbudowaniem BG w osnowę polimerową. Dodatek BG zwiększył moduł sprężystości kompozytów, ale obniżył wytrzymałość na rozciąganie i plastyczność kompozytów. Modyfikacja BG silanem poprawiła właściwości mechaniczne kompozytów w porównaniu z kompozytami czyste BG. Eksperyment inkubacji kompozytów w symulowanym płynie ustrojowym (SBF) w 37 °C wykazał tworzenie kościopodobnego apatytu wewnątrz i na ich powierzchni PLLA/BG, a modyfikacja cząstek BG silanem opóźniła tworzenie się apatytu *in vitro* [115]. Gruber i in. zaprezentowali otrzymywanie porowatych kompozytów PLA/HAP nową metodą druku 3D w technologii DBLS (dwuwiązkowe spiekanie laserowe). Metoda ta została szerzej omówiona w rozdziale 7. Proszek kompozytowy PLLA/HAP o rozmiarze mikrosfer <100 μm przygotowano techniką emulsyjną z odparowaniem rozpuszczalnika (S/O/W), który okazał się porowaty już na etapie wytwarzania. Wykazano, że wzrost ilości HAP zmniejsza płynność kompozytu, co istotnie

wpływa na przetwarzalność surowca. Metoda DBLS pozwoliła na wytworzenie struktur o małej gęstości i porowatości otwartej. Wykazano, że na porowatość może wpływać zarówno ilość napelnacza HAP, jak i dwa parametry procesu DBLS – temperatura procesu i moc lasera spiekania. Porowatość otwarta zmniejszała się wraz ze wzrostem stopnia spiekania, a zwiększała się wraz ze wzrostem ilości HAP. Wzrost ilości HAP działał niekorzystnie na właściwości mechaniczne, z uwagi na dużą porowatość próbki, która wynosiła maksymalnie 49,71 % dla próbki spiekanej przy najniższej temperaturze procesu i najsłabszej mocy lasera [116]. Richter R. i in. w pierwszej pracy przedstawili druk 3D oparty na wytłaczaniu kompozytów CPC/MBG, z uwagi na to, iż mają zwiększone właściwości degradacji w porównaniu z czystym CPC. Druk 3D oparty na wytłaczaniu to rodzaj biodruku 3D bez wykorzystania żywych komórek (rozdz. 7). Rusztowania składały się z kompozytu CPC i 4, 6 i 8 % wag. MBG. Takie kompozycje można było swobodnie drukować 3D metodą wytłaczania. Podczas gdy charakterystyka mechaniczna rusztowań wykazywała wpływ MBG, nie zaobserwowano żadnych zmian mikrostruktury. Stwierdzono, że podczas degradacji kompozytu uwalnianie jonów Ca^{2+} i Sr^{2+} może być kontrolowane przez skład MBG, a wykreślone makroporowate rusztowania wykazywały znaczne wyższe uwalnianie tych jonów niż próbki lite. Wyniki te pokazują wysoką elastyczność w zakresie uwalniania jonów z kompozytów i sugerują wykorzystanie zdolności wiązania leków MBG jako perspektywnego systemu dostarczania białek aktywnych biologicznie. Co więcej, opracowany system CPC/MBG może znaleźć zastosowanie w terapiach indywidualnych pacjentów: degradowalne rusztowania mogą być wytwarzane w kształcie wymaganym do określonej wady, a uwalnianie biologicznych substancji czynnych może być dostosowane do dawek indywidualnych pacjentów [117]. Richter R. i współautorzy w swojej drugiej pracy znacząco rozszerzyli badania nad różnymi układami CPC/MBG. Wykorzystali pastę CPC i pastę CPC domieszkowaną jonami Sr^{2+} , czyste MBG, MBG z jonami Sr^{2+} oraz cząstki MBG modyfikowane białkami lizozymu i czynnikami wzrostu rhVEGF₁₆₅. Przy modyfikacji MBG wykorzystali dużą powierzchnię właściwą MBG jako system nośnika dla białek. Pokazali, że zawartość MBG w kompozycie wpływa na degradację końcowych rusztowań. Modyfikując fazę CPC cząstkami MBG z jonami aktywnymi terapeutycznie, stężenie uwolnionego jonu można zmieniać w szerokim zakresie. Opracowali metodę umożliwiającą włączenie modyfikowanych białkami cząstek MBG do past CPC bez negatywnego wpływu na właściwości wytłaczania kompozytów CPC/MBG. Wykazali, że uwolnione białka z czystych MBG lub struktur kompozytowych 3D utrzymywały ich aktywność biologiczną. Dlatego

połączenie CPC i MBG pozwala na tworzenie wysoce elastycznego układu kompozytowego, co czyni go obiecującym kandydatem do inżynierii tkanki kostnej [118].

PLA wykazuje wysoką wytrzymałość mechaniczną, ale jest kruchy, a temperatura zeszklenia wynosi około 55 – 60 °C. Podejmowano różne próby poprawy przetwarzalności i elastyczności tych polimerów. Na przykład stosowanie plastyfikatorów i mieszanie polimerów to najczęściej stosowane metody zwiększania elastyczności polimerów [106]. Aby zwiększyć kompatybilność między powierzchnią napełniacza a matrycą polimerową, skutecznym rozwiązaniem jest szczepienie cząsteczek mieszających się z polimerami na cząsteczkach napełniacza. Znany plastyfikator PLA o właściwościach biokompatybilnych to poli(glikol etylenowy) (PEG). PEG jest jednym z najczęściej badanych polimerów do zastosowań związanych z biologią ze względu na swoją bioinertność i wszechstronność. Z uwagi na jego hydrofilowy charakter i wysoką biokompatybilność oraz brak immunogenności stosuje się go do modyfikacji powierzchni, biokoniugacji, dostarczania leków, w inżynierii tkankowej i szeroko pojętych zastosowaniach biomedycznych. PEG ma strukturę liniową lub rozgałęzioną (wieloramienną lub gwiazdzistą). Podstawową strukturą PEG jest PEG-diol z dwoma końcowymi grupami hydroksylowymi, które można przekształcić w inne grupy funkcyjne. Dwie funkcjonalne grupy końcowe mogą być takie same (symetryczne) lub różne (asymetryczne), które są wszechstronne w tworzeniu hydrożeli lub sprzęganiu z biomolekułami [119]. PEG miesza się z PLLA na poziomie molekularnym, a granica mieszalności zależy od jego masy cząsteczkowej. Im mniejsza masa cząsteczkowa PEG tym zwiększa się mieszalność PEG i PLLA. Dodatkowo PEG o odpowiedniej masie cząsteczkowej pełni rolę plastyfikatora semikrystalicznego PLLA skutecznie obniżając T_g PLLA i poprawiając właściwości elastyczne PLLA [120,121].

6. MODYFIKACJA POWIERZCHNI CZĄSTEK CERAMICZNYCH

W tym rozdziale przedstawiono przegląd biofunkcjonalizacji powierzchni cząstek hydroksyapatytu i bioszklą do zastosowań w inżynierii tkanki kostnej. Pomimo wysokiej biozgodności HAP i BG brakuje idealnego materiału implantacyjnego. Dlatego poszukiwania naukowców w tym obszarze dotyczą optymalizacji metod funkcjonalizacji biozgodnych materiałów, które mogłyby wspierać proces osteointegracji i wpływać na efekt biomineralizacji. Właściwości powierzchniowe biomateriałów odgrywają ważną rolę w zwiększaniu ich interakcji z otaczającymi tkankami. Funkcjonalizacja powierzchni biomateriałów może wpływać także na zwiększenie zdolności adsorpcyjnej dla biomolekuł,

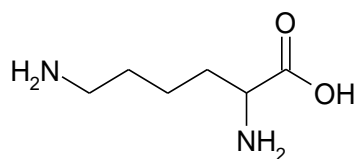
zwiększenie skłonności do dostarczania tych biomolekuł do komórek lub tkanek oraz wzmocnienie ogólnej biozgodności. Modyfikując powierzchnie możemy wpływać także na hydrofilowość lub hydrofobowość powierzchni i dostosowywać obecną powierzchnię w bardziej pożądaną kompozycję, aby stworzyć funkcjonalny biomateriał, który może być przydatny do zastosowań biologicznych [88].

6.1. Modyfikacja powierzchni cząstek ceramicznych aminokwasami, głównie L-lizyną

Aminokwasy to podstawowe jednostki budulcowe dużych struktur białkowych. α -aminokwasy to takie, w których atom węgla α połączony jest z pierwszorzędową grupą aminową ($-\text{NH}_2$), grupą karboksylową ($-\text{COOH}$), atomem wodoru i łańcuchem bocznym. W zależności od budowy łańcucha bocznego aminokwasy różnią się takimi właściwościami jak polarność, zasadowość/kwasowość, reaktywność chemiczna. Wartości pH środowiska wodnego wpływa na protonowanie grupy $-\text{NH}_2$ i dysocjację grupy $-\text{COOH}$ aminokwasu ($\text{NH}_2 \leftrightarrow \text{NH}^{3+}$, $\text{COOH} \leftrightarrow \text{COO}^-$). Stąd α -aminokwasy mogą wykazywać różną adsorpcję do innych związków na przykład poprzez przyciąganie elektrostatyczne, wiązanie kowalencyjne czy wodorowe [122].

L-lizyna

Lizyna jest podstawową jednostką konstrukcyjną białek i niezbędnym α -aminokwasem dla organizmu człowieka (rys. 17). Lizyna zawiera alifatyczny, elastyczny łańcuch boczny zawierający trzy grupy metylowe i końcową grupę ϵ -aminową (amina pierwszorzędowa). W warunkach fizjologicznych amina pierwszorzędowa jest naładowana dodatnio.



Rysunek 17. Wzór strukturalny lizyny.

Lizyna, podobnie jak arginina, jest niezbędna dla ogólnej stabilności białek poprzez tworzenie oddziaływań jonowych i wiązań wodorowych w białkach, DNA oraz poprzez interakcje z cząsteczkami wody. Co ważne dla badań przedstawionych w niniejszej rozprawie jest to, że L-lizyna pełni terapeutyczną rolę w osteoporozie i gojeniu złamań kości, co udowodniono w badaniach *in vivo*. Złamania kości i osteoporoza są bardzo częstymi schorzeniami ortopedycznymi i czasami są trudne do opanowania. L-lizyna to niezbędny aminokwas, który

może być stosowany przy stanach osteoporotyczne, jak i złamania lub wady kości. W szczególności uzasadnieniem stosowania L-lizyny w osteoporozie i złamaniach jest stymulacja jelitowej absorpcji wapnia i ochrony nerek oraz procesu sieciowania kolagenu kostnego. Fini, Torricelli i in. ocenili wpływ L-lizyny na ekspresję genów osteoblastów pochodzących z normalnej i osteopenicznej kości beleczkowej szczura, a następnie ludzkich osteoblastów. Pokazali efekt terapeutyczny L-lizyny związany z syntezą kolagenu typu I przez osteoblasty szczurze w zdrowej i osteopenicznej kości. W tym drugim przypadku, faza syntezy kolagenu została poprzedzona początkowym wzrostem proliferacji komórek. Udowodnili także, że L-lizyna wykazuje pozytywny wpływ na ludzkie osteoblasty, co jest częściowo związane z wytwarzaniem czynników wymaganych do syntezy macierzy kostnej, a częściowo z aktywacją proliferacji komórek [123,124]. L-lizyna zwiększa gęstość mineralną kości i zmniejsza częstość występowania osteoporozy. Pozytywnie oceniono skuteczność L-lizyny w tworzeniu kości jako promotora proliferacji i różnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych w hodowli komórek szpiku kostnego *in vitro*. Inne badania potwierdziły, że L-lizyna promuje adhezję i proliferację osteoblastów do powierzchni biomateriału PLGA/HAP. Ponadto, L-lizyna wykazuje duże powinowactwo do hydroksyapatytu z uwagi na interakcje między kationami wapnia i anionami karboksylowymi oraz z uwagi na ujemnie naładowaną powierzchnię hydroksyapatytu i wpływa na regulację wytrącania hydroksyapatytu [125–127].

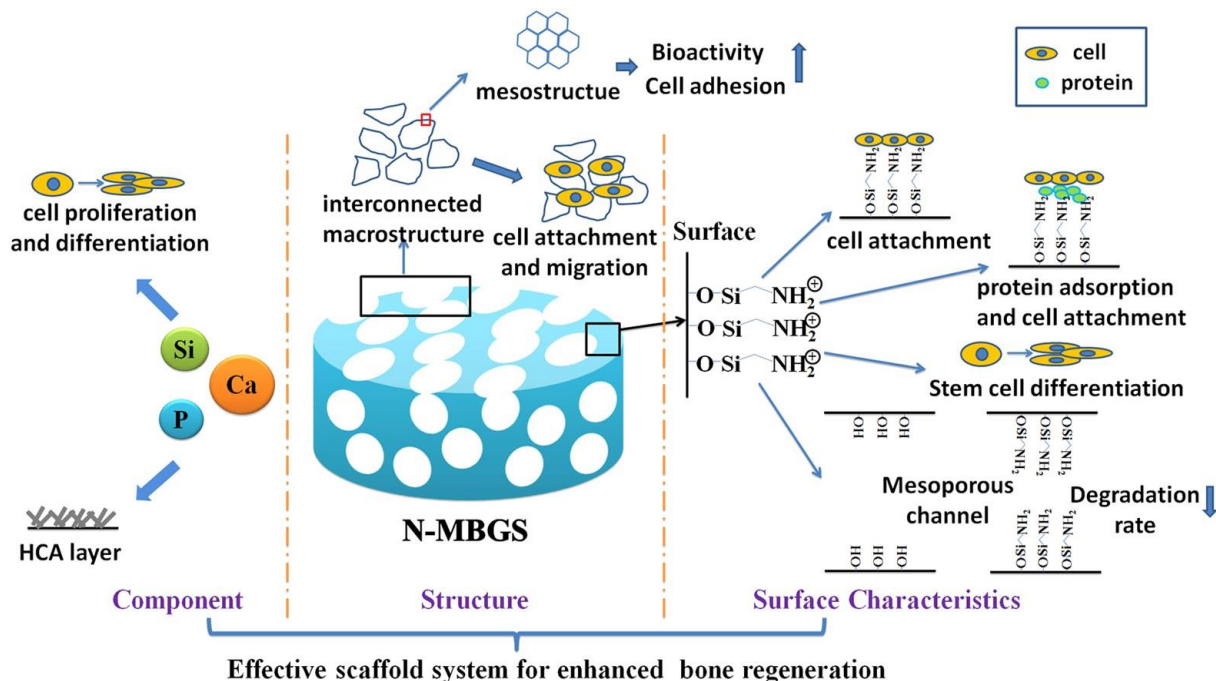
Próbując zrozumieć proces biomineralizacji, zbadano wpływ aminokwasów i peptydów na mineralizację HAP. Przegląd literaturowy zaproponowany przez Tavafoghi i Cerruti wyjaśnia, że polarne aminokwasy z ładunkiem ulegają silnej ekspresji w białkach niekolagenowych i biorą udział w mineralizacji HAP *in vivo*. Ujemnie naładowane aminokwasy, takie jak kwas asparaginowy, kwas glutaminowy i fosfoseryna, są w dużej mierze wyrażane w białkach niekolagenowych i odgrywają kluczową rolę w kontrolowaniu zarodkowania i wzrostu HAP. Dodatnio naładowane, takie jak arginina lub lizyna, są silnie zaangażowane w zarodkowanie HAP w białkach macierzy zewnątrzkomórkowej, takich jak kolagen. Ich dodatek może zwiększyć gęstość mineralną kości poprzez stymulację produkcji hormonu wzrostu. Badania *in vitro* sugerują, że rola aminokwasów w kontrolowaniu wytrącania HAP zależy od ich mobilności. Podczas gdy rozpuszczone aminokwasy mogą hamować wytrącanie i wzrost HAP poprzez chelatowanie jonów Ca^{2+} i PO_4^{3-} lub wiązanie się z jądrami fosforanu wapnia i zapobieganie ich dalszemu wzrostowi, aminokwasy związane z powierzchniami mogą sprzyjać wytrącaniu HAP poprzez przyciąganie jonów Ca^{2+} i PO_4^{3-} i zwiększanie lokalnego przesylenia [125]. Aminokwasy z ładunkiem dodatnim hamują zarodkowanie i nukleację HAP, zapobiegając dalszemu procesowi mineralizacji. Dlatego mogłyby być stosowane w leczeniu

chorób patologicznych spowodowanych nadmierną mineralizacją HAP [128]. Kollath i in. zaproponowali metodę funkcjonalizacji cząstek HAP z zastosowaniem lizyny, argininy i fosfoseryny jako nanoskalowych łączników, które zmieniając elektrostatyczny charakter powierzchni HAP wpływają na zwiększenie zdolności adsorpcyjnej białek (w przypadku pracy albuminy surowicy bydlęcej BSA). Zastosowanie biologicznych łączników (lizyny i argininy) zwiększyło zdolność adsorpcyjną białka BSA do powierzchni HAP, podczas gdy fosfoseryna wykazała działanie odwrotne [129]. Kitadai i in. zaproponowali badania stanów dysocjacji lizyny zaadsorbowanej na powierzchni krzemionki metodą FTIR-ATR. W badaniach dowiedli, że lizyna zaadsorbowana na amorficznej krzemionce była obecna w formie kationowej i obojnaczej. Dodatkowo pokazali, że adsorpcja lizyny jest napędzana oddziaływaniem elektrostatycznym z ujemnie naładowaną powierzchnią krzemionki ($\text{Si-O}^- \cdots \text{Lys}^+ \text{Si-O}^- \cdots \text{Lys}^+$) i może być uzupełniona przez oddziaływanie hydrofobowe między obojnaczą lizyną a mostkami siloksanowymi na powierzchni krzemionki [122]. Rhilassi i in. zaproponowali modyfikację cząstek HAP (CDHA, Ca/P = 1,59) aminokwasami L – lizyną i DL – leucyną zaadsorbowanych w warunkach fizjologicznych. Autorzy potwierdzili metodą spektroskopową adsorpcję aminokwasów pomiędzy grupami karboksylowymi aminokwasów $-\text{COO}^-$ i jonami wapnia Ca^{2+} hydroksyapatytu. Aminokwasy zaadsorbowane na cząstkach CDHA mogą zostać uwolnione w wyniku odwróconej reakcji wymiany jonowej z udziałem grup funkcyjnych tych aminokwasów oraz grup jonowych na powierzchni hydroksyapatytu, dzięki obecności uwodnionych warstw powierzchniowych hydroksyapatytu. Wyróżnione reakcje wymiany między powierzchniami hydroksyapatytu podobnymi do minerału kostnego, który wcześniej związał aminokwasy, a otaczającym środowiskiem, mogą być analogiczne do tych zaangażowanych w regulację metabolizmu kości [130]. Goel i Santhiya zaproponowali hybrydowe kserożele z modyfikowanymi L-lizyną cząstkami MBG. Cząsteczki L-lizyny zostały włączone do sieci MBG już na etapie syntezy MBG w łagodnych warunkach otoczenia. Autorzy pracy wykazali, że otrzymane lepkosprężyste materiały są wstrzykiwalne i bioaktywne. Ponadto, zaobserwowali uwalnianie się 7-dehydrocholesterolu (prekursora witaminy D) w roztworze SBF. Udowodnili, że kserożele z MBG i L-lizyną to materiały nowej generacji dostarczające składniki odżywcze dla wzrostu komórek, ale także zawierają dostosowaną morfologię i właściwości reologiczne do ukierunkowanych zastosowań w inżynierii kości [131].

6.2. Silanizacja powierzchni cząstek ceramicznych

Silanizacja powierzchni to skuteczna metoda kowalencyjnej modyfikacji cząstek ceramicznych. Odgrywa ważną rolę w funkcjonalizacji powierzchni z uwagi na wprowadzenie na powierzchnię cząstek ceramicznych dodatkowych grup funkcyjnych w celu dalszej immobilizacji aminokwasów, białek, leków itd. Zatem wprowadza możliwość łączenia składników nieorganicznych z organicznymi. Najczęściej stosowanym silanem do funkcjonalizacji powierzchni i wprowadzania grupy aminowej na bioaktywną powierzchnię ceramiki jest 3-aminopropylotrietoksyilan (APTS), który jest również znany jako czynnik sprzęgający lub wiążący białka. Silanizację powierzchni ceramicznych można osiągnąć albo na etapie syntezy cząstek ceramicznych albo poprzez adsorpcję w wodzie, etanolu lub toluenie [88]. Rehman i in. zbadali kilka metod modyfikacji nanoprętów HAP za pomocą APTS. Przeprowadzili funkcjonalizację w temperaturze pokojowej (12h), w 80 °C (12h) oraz w roztworze wodnym poddanym działaniu mikrofal (600 W, 5 min). Wykazali, że temperatura reakcji nie ma wpływu na produkty końcowe, a żywotność osteoblastów wskazuje, że zaproponowane produkty HAP-APTS są biokompatybilne [132]. B. Atak i in. zaproponowali rusztowania złożone z chitozanu i modyfikowanego nanoHAP przy użyciu APTS do inżynierii tkanki kostnej. NanoHAP zmodyfikowali poprzez adsorpcję APTS w zasadowym roztworze EtOH/H₂O o stosunku objętościowym 9/1. Wykazali, że otrzymane rusztowania są biokompatybilne bez cech cytotoksycznych w teście dehydrogenazy mleczanowej (LDH) dla ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych kości (hBM-MSC). Za pomocą testu aktywności fosfatazy alkalicznej (ALP) zostały udowodnione właściwości osteoindukcyjne rusztowań, które wskazują na istotny wpływ APTS w podejściach inżynierii tkanki kostnej [133]. Badania przeprowadzone przez Wang i in. dotyczą funkcjonalizacji powierzchni nanoHAP za pomocą APTS, a następnie wprowadzono bezwodnik octowy i bezwodnik bursztynowy odpowiednio w celu neutralizacji pozytywnego ładunku HAP/APTS i uzyskania grup –COOH na powierzchni HAP. Test MTT w kierunku cytotoksyczności wobec mysich fibroblastów wykazał niewielką toksyczność układu HAP/APTS, jednak można ją wyeliminować przez postfunkcjonalizację amin APTS do grupy acetylowej i karboksylowej [134]. Zhang i in. opracowali rusztowania MBG (80S15C) o wysokiej wytrzymałości mechanicznej, które były funkcjonalizowane APTS (rys. 18). W badaniach *in vitro* zaobserwowano, że zsyntetyzowane MBG znacząco sprzyjały proliferacji, jak również osteogennemu różnicowaniu komórek szpiku kostnego królika. Badania *in vivo* wykazały, że bioaktywne szkła funkcjonalizowane APTS mogą ułatwiać wyższy poziom regeneracji kości

w porównaniu do niemodyfikowanych MBG. Wspomniano, że obecność grup aminowych na bioaktywnej powierzchni szkła ma odgrywać kluczową rolę w zwiększaniu proliferacji i różnicowania komórek. Odkrycia te wskazują, że MBGS są obiecującymi materiałami o potencjalnych praktycznych zastosowaniach w regeneracji kości [135].



Rysunek 18. Schemat funkcjonalnego rusztowania MBG/APTS dla lepszej regeneracji kości zaprezentowany przez Zhanga i in. [135].

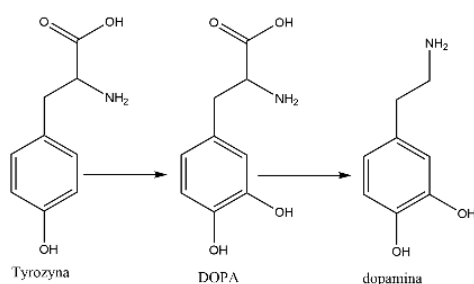
Jak pokazano na rysunku 18, jony Ca i Si uwolnione z rusztowań N-MBGS (MBG/APTS) mogą poprawić proliferację i różnicowanie komórek, podczas gdy jony Ca i P mogą przyspieszyć tworzenie warstwy HCA. Makroporowata sieć N-MBGS jest pomocna w adhezji i migracji komórek. Modyfikacja powierzchni za pomocą grup -NH₂ nie tylko zapewnia komórkom odpowiednie powierzchnie do przylegania, proliferacji i różnicowania, ale także zmniejszają tempo degradacji MBG w celu dostosowania tworzenia się nowej kości. W rezultacie takie rusztowania nadają właściwości osteogenne *in vitro* i *in vivo* [135].

6.3. Modyfikacja powierzchni cząstek ceramicznych polidopaminą

Polidopamina

Wyjątkowym polimerem do tworzenia silnych warstw adhezyjnych jest polidopamina (PDA). Zainteresowanie PDA po raz pierwszy podjęła grupa prof. Messersmith'a i wykazali, że PDA jest uniwersalną, funkcjonalną powłoką klejącą. Ciągła warstwa PDA może być utworzona *in situ* z wodnego roztworu dopaminy w procesie polimeryzacji w łagodnych warunkach na dowolnym podłożu. Podejście do osadzania PDA na różnych podłożach ma

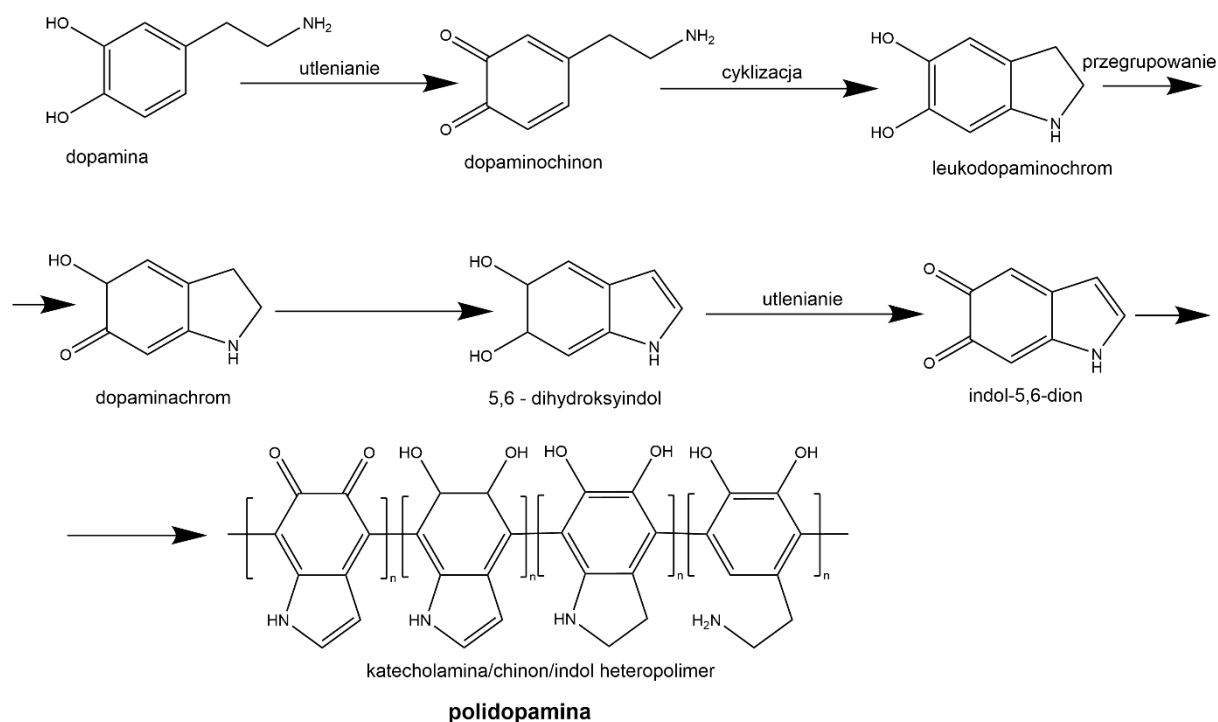
charakter biomimetyczny. Biomimetyka odnosi się do naśladowania naturalnych struktur i mechanizmów z korzyścią dla ludzkości. W tym przypadku, osadzenie PDA jest zainspirowane białkami adhezyjnymi (Mefp5) wydzielanymi przez małże w celu przyczepiania się do mokrych powierzchni organicznych i nieorganicznych. Białka adhezyjne małży złożone są w dużej ilości z 3,4-dihydroksy-l-feniloalaniny (DOPA) i innych aminokwasów (np. lizyny i histydyny). DOPA tworzy silne oddziaływania kowalencyjne i niekowalencyjne z substratami [136]. DOPA to naturalny aminokwas i prekursor dopaminy, który w organizmie jest metabolitem pośrednim w szlaku syntezy adrenaliny. Powstaje na skutek hydroksylacji L-tyrozyny, podczas reakcji katalizowanej enzymatycznie przez hydroksylazę tyrozynową. DOPA jest przekształcana w dopaminę przez enzym zwany dekarboksylazą DOPA (rys. 19) [137].



Rysunek 19. Szlak powstawania dopaminy w organizmie.

DOPA dobrze sprawdza się jako środek adhezyjny do powlekania tylko powierzchni nieorganicznych. Dowiedziono, że współistnienie grup katecholowych (od DOPA) i etyloaminowych ma kluczowe znaczenie dla uzyskania wysokiej adhezji do szerokiego spektrum materiałów. Syntetyczna dopamina (3,4-dihydroksyfenyloetyloamina) w zasadowych warunkach samopolimeryzuje do końcowego produktu – polidopaminy. Zanurzenie dopaminy w roztworze wodnym (pH 8,5) prowadzi do spontanicznego osadzania cienkich filmów polimerowych na praktycznie dowolnej powierzchni materiału. Grubość warstwy polimerowej po 24 h prowadzenia reakcji wynosiła około 50 nm przy stężeniu dopaminy 2 mg/ml [136,138]. Mechanizm powstawania polidopaminy przedstawiony został na rysunku 20 i składa się z kilku etapów, które do tej pory pozostają przedmiotem dyskusji. Powłoki PDA tworzą się w wyniku utleniającej polimeryzacji dopaminy (siłą napędową powstawania PDA jest rozpuszczony tlen przy alkalicznym pH roztworu). Produkt utleniania dopamina-chinon ulega nukleofilowej reakcji cyklizacji wewnątrzcząsteczkowej, prowadzącej do powstania leukodopaminochromu. Ten utlenia się i przekształca, tworząc 5,6-dihydroksyindol i indol-5,6-dion. Wszystkie produkty katecholowe, chinonowe i indolowe

powstałe w wyniku powyższych reakcji są uważane za główne elementy budulcowe struktury PDA [136,138–140].



Rysunek 20. Polimeryzacja dopaminy w alkalicznych warunkach.

Polidopamina oprócz właściwości adhezyjnych jest również materiałem biokompatybilnym o wysokim powinowactwie do komórek, który ma potencjał w zastosowaniach biomedycznych. Grupy katecholowe i aminowe w strukturze PDA silnie oddziałują z grupami fosforanowymi i cholinowymi błon komórkowych. W oparciu o te zalety, materiały funkcjonalizowane PDA okazały się skuteczne w terapii raka i innych zastosowaniach międzykomórkowych [141,142]. Poza tym wykorzystuje się również PDA do inżynierii tkanek miękkich i twardych oraz w systemach dostarczania leków. Cienkie warstwy PDA można wykorzystać do tworzenia bioaktywnych powłok. Biorąc pod uwagę wyjątkowe właściwości adhezyjne PDA, Liu i in. zastosowali układy CPC/PDA najpierw w celu zwiększenia wytrzymałości na ściskanie kompozytu, a następnie wykazali, że PDA w kompozytach CPC/PDA przyspieszyła konwersję dihydratu fosforanu dwuwapniowego (DCPD) i α -TCP do HAP we wczesnych stadiach, promując w ten sposób szybką mineralizację warstwy HAP na powierzchni kompozytu. Warstwa HAP ostatecznie uzyskała dużą powierzchnię, co korzystnie wpływa na proliferację komórek i białek [143]. Mineralizacja HAP w symulowanym płynie ustrojowym (SBF) silnie zależy od właściwości powierzchni materiału. Warto zauważyć, że warstwa powłoki PDA odgrywa rolę zakotwiczenia kationów

Ca^{2+} na podłożu, ale także umożliwiała nukleację HAP. Tworzenie biominerałów CaP na powierzchni pokrytej PDA opiera się na schemacie wzrostu warstwa po warstwie ze względu na silne powinowactwo CaP z ugrupowaniami katecholowymi i aminowymi PDA. Osadzone na powierzchni ugrupowania katecholamin w polidopaminie ułatwiają osadzanie jonów wapnia i tworzenie kryształów hydroksyapatytu, które są wyrównane do osi c, równoległe do warstwy polidopaminy, jak obserwuje się w naturalnych hydroksyapatytach w zmineralizowanych tkankach [144]. Tsai W.B. i in. zaproponowali osadzanie warstw PDA na biodegradowalnych filmach polimerowych z PCL, PLA, PLGA i poliuretanu (PU) żeby zwiększyć powinowactwo kilku polimerów biodegradowalnych do chondrocytów. Ocenili adhezję i proliferację chondrocytów królika (komórek tkanki chrzęstnej) wyizolowanych z chrząstki kości udowej i kolana królików. Adhezja komórek została znacznie zwiększona już po 15 sekundach inkubacji dopaminy, a 4 minuty inkubacji wystarczyły do osiągnięcia maksymalnej adhezji komórek. Komórki proliferowały szybciej na podłożach z PDA niż na podłożach niemodyfikowanych. Wzrost powinowactwa komórek do substratów pokrytych PDA wykazano poprzez wzmocnienie immobilizacji białek adhezyjnych surowicy, takich jak fibronektyna. W ramach pracy powstały także porowate rusztowania PU/PDA, a wyniki badań biologicznych dla PU/PDA okazały się lepsze niż dla czystych rusztowań PU. Wyniki pokazały, że osadzanie warstwy PDA na porowatych rusztowaniach jest prostą i obiecującą strategią inżynierii tkanki chrzęstnej i może być stosowane do innych rodzajów inżynierii tkankowej [145]. Bardzo ciekawą pracę zaprezentowali Yu Y. i in., która dotyczyła cząstek HAP/PDA osadzanych na implantach tytanowych w celu poprawy osteointegracji tych implantów. Wykonali badania w środowisku kontrolnym i z wysokim poziomem reaktywnego tlenu (ROS), co występuje często u pacjentów z chorobami cukrzycy, osteoporozy i zapalenia przyzębia i zaburza osteointegrację implantów. Wykazali, że właściwości powłok HAP/PDA (tj. grubość, skład, hydrofilowość) można kontrolować za pomocą stężenia dopaminy w roztworze i czasem mineralizacji. Ponadto PDA jest idealną matrycą dla wzrostu HAP ze względu na silne zdolności chelatowania metali przez grupy katecholowe. Powłoki HAP/PDA wykazują zdolność wychwytywania reaktywnego tlenu, promują proliferację komórek MC3T3 (mysich komórek prekursorowych osteoblastów) i zwiększają aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) oraz ekspresję genów związanych z osteogenezą w środowiskach z wysokim poziomem ROS i normalnych, co sprzyja osteointegracji [146]. Deng Z. i in. pokazali działanie powłok PDA osadzonych w płytkach do hodowli komórkowych *in vitro*. Celem eksperymentów było zbadanie PDA do wychwytywania ROP w celu ekspansji ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych (hMSC). Wykazali, że PDA zmniejsza stres oksydacyjny i uszkodzenia

mitochondriów w replikujących się hMSC. Podłoże pokryte PDA (1 mg/ml, 2h) silnie sprzyjało szybkości proliferacji długoterminowej hMSC, podczas gdy charakter i potencjał różnicowania komórek macierzystych zostały zachowane. Ponieważ powłoka PDA może promować aktywność osteogenezy i zmniejszać stan zapalny modyfikacja powierzchni implantów ortopedycznych za pomocą PDA może potencjalnie przyspieszyć i poprawić ich korzystną integrację z kością [147].

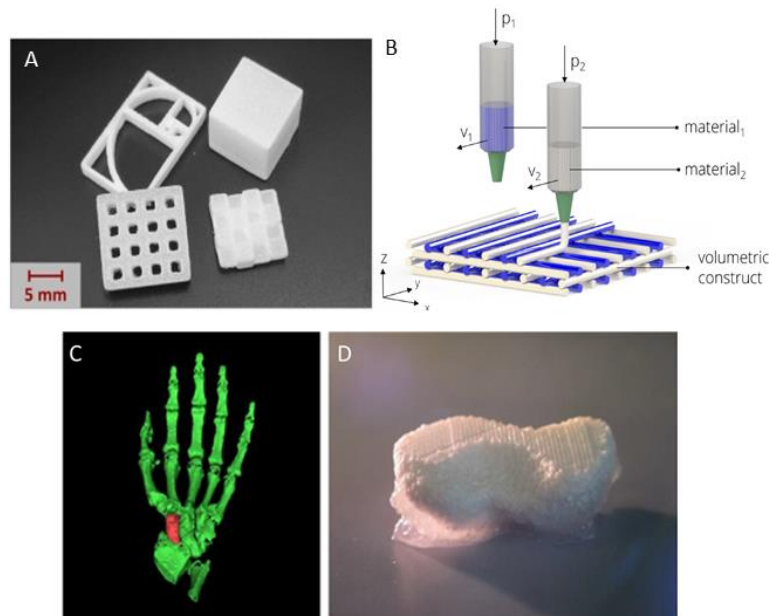
Powyższe przykłady literaturowe dotyczące mineralizacji układów HAP/PDA, wpływu modyfikacji powierzchni HAP na zachowanie komórek kościotwórczych oraz możliwości immobilizacji innych cząsteczek do powierzchni PDA przyczyniło się do pomysłu rozwoju tematu modyfikacji cząstek HAP poli(glikolem etylenowym) z zastosowaniem PDA jako łącznika. Podsumowując i mając na uwadze powyższy stan wiedzy zaprezentowano w niniejszej rozprawie doktorskiej kilka nowatorskich rozwiązań, polegających na funkcjonalizacji cząstek ceramicznych. Pierwszym z nich jest szczepienie poli(glikolu etylenowego) do hydroksyapatytu za pomocą nanoskalowego łącznika L-lizyny. Drugim, jest silanizacja powierzchni cząstek BG i przyłączenie L-lizyny za pomocą wiązania amidowego z wykorzystaniem karbodiimidowych czynników sprzęgających. Trzecim rozwiązaniem zaproponowanym w ramach modyfikacji powierzchni cząstek ceramicznych jest polimeryzacja dopaminy na powierzchni cząstek HAP, a następnie przyłączenie poli(glikolu etylenowego) do polidopaminy w reakcji addycji Michaela/Schiffa. Otrzymane nowe, funkcjonalizowane cząstki HAP lub BG wykorzystano jako napełniacz w polimerowo – ceramicznych kompozytach opartych na PLLA.

7. FORMOWANIE KOMPOZYTÓW TECHNIKAMI DRUKU 3D

Ten rozdział poświęcono omówieniu dwóch technologii addytywnych druku 3D, mianowicie druku 3D metodą SLS (selective laser sintering) i druku 3D opartym na wytłaczaniu materiałów wiskoelastycznych, ponieważ otrzymywane w pracy materiały mogą być wykorzystane do przetwarzania tymi technologiami w złożone konstrukty kostne.

Ostatnio szybko rozwinęło się drukowanie trójwymiarowe (3D), aby umożliwić wytwarzanie spersonalizowanych rusztowań polimerowych, ceramicznych lub polimerowo – ceramicznych. Druk 3D to proces wytwarzania przyrostowego, w którym dane geometryczne są wykorzystywane do tworzenia struktur 3D poprzez nakładanie/spiekanie materiałów warstwa po warstwie. Technika SLS zakłada spiekanie kolejnych warstw proszku polimerowego lub kompozytowego. Zwykle polimer utrzymywany jest w wysokiej temperaturze, zarówno w funkcji czasu procesu jak i całej objętości materiału. Przetwarzając

w ten sposób biopolimery dochodzi do degradacji materiału i obniżenia jego właściwości użytkowych. Jednak w tym obszarze poczyniono duży postęp projektując dwuwiązkową drukarkę typu SLS (Dual Beam Laser Sintering). Zaletą tej nowej technologii jest to, że pierwsza wiązka podgrzewa materiał do temperatur bliskich temperaturze zeszklenia, a druga dokonuje właściwego spiekania. Efektem jest wyeliminowanie nagrzewania całej objętości proszku do temperatury złoża podczas całego procesu, co zmniejsza stopień degradacji spiekanych struktur [30]. Dzięki opracowaniu tej technologii możliwe będzie drukowanie spersonalizowanych implantów kostnych wykorzystując polimery biodegradowalne i biofunkcjonalizowaną ceramikę (rys. 21 A). Drugim rodzajem druku jest druk 3D oparty na wytłaczaniu materiałów wiskielstycznych na potrzeby każdego pacjenta/defektu (rys. 21 C,D). Nazywany jest plotowaniem 3D lub po prostu drukowaniem 3D, natomiast wykorzystując jednocześnie tusz wraz z komórkami/czynnikami wzrostu mówimy o biodrukowaniu 3D.



Rysunek 21. Przykłady próbek spiekanych z proszku PLA metodą Dual Beam Laser Sintering zaproponowane przez Antończaka i in. [30] (A). Zasada trójwymiarowego drukowania wielokanałowego. Dwa lub więcej materiałów jest układanych warstwowo, uzyskując wolumetryczne, dwufazowe rusztowania z predefiniowaną strukturą porów (B). Wytwarzanie kości łódeczkowatej na podstawie danych z tomografii komputerowej zaproponowane przez Ahlfelda i in. [148] (C, D).

Rozmiar biodrukarek jest niewielki, dlatego istnieje możliwość biodruku w sterylnych warunkach. Jest to technologia druku, w której stosuje się pasty lub lepkie materiały jako formę wyjściową i osadza się je sekwencyjnie jako pasma za pomocą specjalnej dyszy w sposób warstwa po warstwie w oparciu o wcześniej zaprojektowane struktury. W tym przypadku drukowalność zależy od równomiernego rozprowadzenia, lepkości, płynności, wydajności

wytłaczania, czasu wiązania pasty i stabilności kształtu drukowanych pasm, aby wytrzymać ciężar struktury podczas druku. Czas wiązania (np. pasty CPC) odgrywa ważną rolę w kontrolowaniu czasu drukowania pasty. Kwestią krytyczną dla rozdzielczości drukowania jest średnica dyszy i stabilność wytłaczanych pasm. Zaletą technologii opartych na wytłaczaniu jest łatwa obsługa kilku pojemników z materiałami, które umożliwiają łączenie więcej niż jednego materiału na rusztowanie, jak pokazano schematycznie na rysunku 21B. Wielokanałowe kreślenie to zaawansowana technologia umożliwiająca kontrolę parametrów przetwarzania, takich jak prędkość i ciśnienie wytłaczania niezależnie dla każdego biomateriału. Do tego typu druku 3D z powodzeniem wykorzystuje się pasty CPC oraz hydrożele. Podsumowując, drukowanie 3D ma dwie zalety: (1) umożliwia łatwe drukowanie kombinacji różnych materiałów oraz (2) dzięki łagodnym warunkom umożliwia jednoczesne drukowanie komórek lub czynników wzrostu, znane jako biodrukowanie [71,74–76,148,149].

II. CELE PRACY

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie i wytworzenie nowych materiałów mających potencjalne zastosowanie w inżynierii tkanki kostnej. Praca opiera się dwufazowych kompozytach polimerowo-ceramicznych, które są biokompatybilne, biodegradowalne i osteokonduktywne. Zastosowane w pracy cząstki ceramiczne poddano różnym modyfikacjom w celu poprawy wiązania między napełniaczem i matrycą polimerową, zwiększenia stabilności termicznej PLLA oraz uzyskania nowych, cytozgodnych kompozytów. Do funkcjonalizacji powierzchni cząstek HAP i BG wykorzystano cząsteczki, które mogą zwiększać potencjał osteogeniczny biomateriału. W pracy wykorzystano również druk 3D do otrzymywania makroporowatych rusztowań kostnych składających się z fosforanów wapnia CPC i mikrosfer PLLA. Szczegółowy zakres badań przedstawiono poniżej:

- i. Dwuetapowa modyfikacja powierzchni HAP L-lizyną oraz PEG z karboksylową grupą końcową o masach cząsteczkowych 600 i 2100 g/mol.
- ii. Dwuetapowa modyfikacja powierzchni HAP polidopaminą i PEG z aminową grupą końcową o masach cząsteczkowych 750 i 5000 g/mol, oraz PEG z tiolową grupą końcową o masie cząsteczkowej 800 g/mol.
- iii. Dwuetapowa funkcjonalizacja cząstek BG oraz cząstek BG dotowanych cynkiem i strontem przy użyciu prekursora silanowego i następnie L-lizyny.
- iv. Wytwarzanie kompozytów polimerowych w postaci folii z matrycą z PLLA i modyfikowanym powierzchniowo cząstkami HAP lub BG metodą wylewania z rozpuszczalnika.
- v. Analiza wpływu modyfikacji HAP/BG na morfologię, właściwości termiczne, biologiczne i degradację *in vitro* otrzymywanych kompozytów.
- vi. Wytwarzanie mikrosfer z PLLA i PLLA/HAP o średnicy poniżej 50 μm .
- vii. Druk 3D dwufazowych struktur składających się z CPC i mikrosfer PLLA.
- viii. Charakterystyka reologiczna past kompozytowych CPC/PLLA przeznaczonych do druku 3D metodą wytłaczania, analiza mechaniczna i biologiczna usieciowanych rusztowań CPC/PLLA oraz profil uwalniania jonów wapnia i fosforu i degradacja hydrolytyczna *in vitro* rusztowań CPC/PLLA.

Hipotezy badawcze

Przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej hipotezy badawcze są następujące:

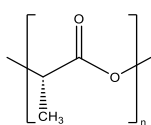
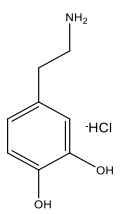
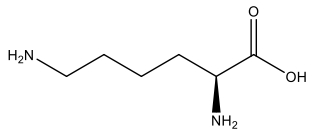
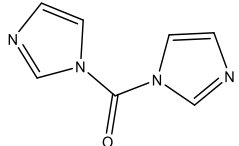
- i. Modyfikowane cząstki HAP z PEG poprawią adhezję na granicy międzyfazowej polimer-napełniacz dzięki mieszalności PLLA i PEG.
- ii. Nowe kompozyty PLLA z modyfikowanymi cząstkami HAP z L-lizyną i PEG oraz cząstkami BG z L-lizyną nie obniżą stabilności termicznej kompozytów PLLA z niemodyfikowanymi cząstkami HAP lub BG, co zwiększy ich możliwości w druku 3D standardowymi technikami. Stabilność termiczna kompozytów z HAP modyfikowanym polidopaminą będzie wyższa niż PLLA/HAP ze względu na właściwości uniepalniające polidopaminy.
- iii. Nowe kompozyty PLLA z modyfikowanymi cząstkami HAP lub BG będą bioaktywne oraz niecytotoksyczne.
- iv. Makroporowate kompozyty CPC/PLLA będą ulegały szybszej degradacji *in vitro* niż rusztowania kontrolne CPC zwiększając ich porowatość.
- v. Mikrosfery PLLA zwiększą lepkość past na bazie CPC do druku 3D metodą wytłaczania, dzięki czemu będzie można uzyskać stabilne rusztowania kostne.
- vi. Kompozyty CPC/PLLA będą wspierały adhezję mezenchymalnych komórek macierzystych bardziej niż kontrolne rusztowania CPC.

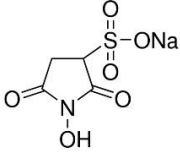
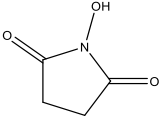
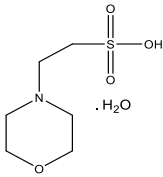
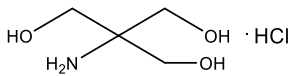
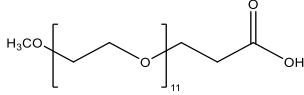
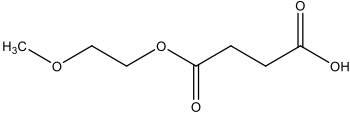
III. CZĘŚĆ BADAWCZA – MATERIAŁY I METODOLOGIA

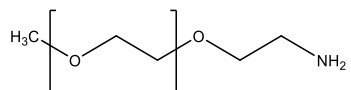
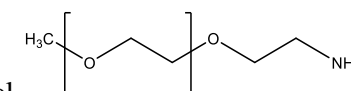
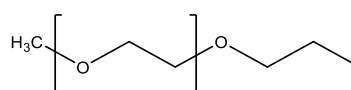
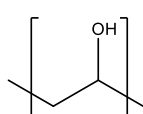
1. MATERIAŁY

W części badawczej do modyfikacji powierzchni cząstek HAP i BG, do wytwarzania kompozytów polimerowo – ceramicznych oraz do oceny biologicznej materiałów zostały wykorzystane polimery i odczynniki przedstawione w tabeli 1.

Tabela 1. Zestawienie materiałów i odczynników użytych w pracy.

Materiał	Źródło	Wzór/informacje dodatkowe
Poli(L-laktyd) PLLA	Evonik	Resomer L 207 S, 1.5 - 2.0 dl/g 
Hydroksyapatyt HAP	Sigma Aldrich	#677418, proszek, rozmiar cząstek <200 nm, $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$, $M = 502,31 \text{ g/mol}$
Bioszkło BG	Sieć Badawcza Łukasiewicz	BG (SiO_2 , P_2O_5 , CaO) o różnym uziarnieniu i BG dotowane cynkiem i strontem – tabela 2 (rozdz. III, 2.2.)
Dopamina	Sigma Aldrich	#H8502, Chlorowodorek 3,4-dihydroksyfenetylaminy, $M = 189,64 \text{ g/mol}$ 
L-lizyna	Sigma Aldrich	#62840, krystaliczna, $\geq 98.0\%$, $M = 146,19 \text{ g/mol}$ 
CDI	Sigma Aldrich	#21860, 1,1' - karbonylodiimidazol, $M = 162,15 \text{ g/mol}$ 

EDC	Sigma Aldrich	# 03450, Chlorowodorek N-(3-dimetyloaminopropylo)-N'-etylokarbodiimidu, M = 191,7 g/mol	$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}=\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{N}(\text{CH}_3)_2$
Sulfo-NHS	Sigma Aldrich	#56485, sól sodowa N-hydroksysulfosukcynoimidu, $\geq 98\%$, M = 217,13 g/mol	
NHS	Sigma Aldrich	#130672, N-hydroksysukcynoimid, 98%, M = 115,09 g/mol	
Bufor MES	Sigma Aldrich	#69892, M = 213,25 g/mol, Kwas 2-(N-morfolino)etanosulfonowy $>99,0\%$,	
Bufor TRIS	Sigma Aldrich	#T5941, TRIS HCl, M = 157,60 g/mol, Chlorowodorek tris(hydroksymetylo)aminometanu	
PEG 600	Sigma Aldrich	#689556, M = 588,86 g/mol glikol O-(2-karboksyloetylo)-O'-metylo-undekanoetylenowy,	
PEG 2100	Sigma Aldrich	#17928, M = 2100 g/mol, bursztynian glikolu monoetoksy-polietylenowy	

PEG NH₂ 750	Sigma Aldrich	#07964, glikol O-(2-aminoetylo)-O'-metylopolietylenowy,  M = 750 g/mol
PEG NH₂ 5000	Sigma Aldrich	#06679, glikol O-(2-aminoetylo)-O'-metylopolietylenowy,  M = 5000 g/mol
PEG SH 800	Sigma Aldrich	#729108, poli(glikol etylenowy) eterometylowy tiol,  M = 800 g/mol
Dichlorometan	Stanlab	CH ₂ Cl ₂ , cz.d.a, M = 84,93 g/mol
PVA	Sigma Aldrich	Poli(alkohol winylowy), Mowiol 18-88, M ~ 130000 g/mol 
Pasta CPC	Innotere GmbH	Cement fosforanowo-wapienny CPC, skład: tabela 3 (rozd. III, 3.2.)

Materiały do analizy biologicznej:

Linie komórkowe:

L929	ATCC® CCL-1™
hFOB 1.19	ATCC® CRL-11372™
THP1-Blue™ NF-κB	InvivoGen
hTERT-MSC	Laboratorium Chirurgii Doświadczalnej i Medycyny Regeneracyjnej, Szpital Uniwersytecki w Monachium (LMU), Monachium, Niemcy

Podłoża hodowlane:

RPMI-1640	HyClone Cytiva
DMEM/Hama F-12	Gibco

Pozostałe odczynniki:

Penicylina/streptomycyna, glutamina, normocyna, blastycydyna, genetycyna, MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliwy), DMSO, LPS E. coli, BSA, Triton-X100, formaldehyd, gentamycyna, amfotercyna B – Sigma Aldrich; **FCS** – HyClone Cytiva; **trypsyna/EDTA, HEPES, błękit trypanu, PBS** – Gibco; **bufor QUANTI-Blue™** – InvivoGen; **DAPI, falloidyna AlexaFluor 488** – ThermoFisher, **Cytotoxicity Detection KitPLUS (LDH)** – Roche.

2. METODOLOGIA CZĘŚĆ I: MODYFIKACJA CZĄSTEK CERAMICZNYCH ORAZ WYTWARZANIE I CHARAKTERYSTYKA KOMPOZYTÓW NA BAZIE PLLA

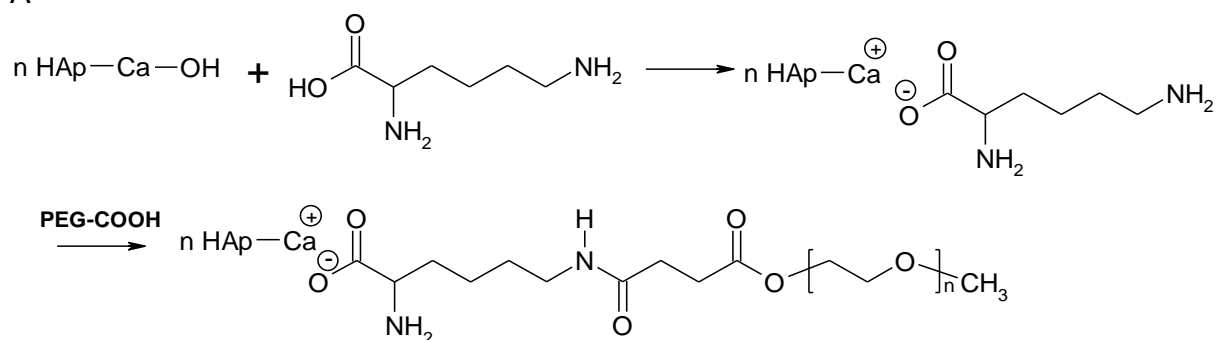
2.1. Modyfikacja cząstek hydroksyapatytu L-lizyną i poli(glikolem etylenowym)

Przed przystąpieniem do etapu modyfikacji cząstek HAP suszono je w suszarce próżniowej w temperaturze 110 °C przez 24 h. Dyspersję 0,5 g hydroksyapatytu w 5 ml wody destylowanej (stężenie 0,1 g/ml) poddano działaniu ultradźwięków przez 10 minut. Do zawiesiny dodano 0,146 g L-lizyny (przy zachowaniu stosunku molowego reagentów 1:1), którą mieszano przez 24 h na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej. Produkt oddzielono przez wirowanie (300 rpm, 5 min), przemyto 3-krotnie wodą destylowaną i suszono w temperaturze 40 °C w suszarce próżniowej przez 24 h. Wykonano także modyfikację HAP L-lizyną przy stosunku molowym 4:1, 2:1, 1:2 i 1:5. Zwiększanie ilości L-lizyny w układzie nie powodowało większej ilości przyłączenia proporcjonalnie do ilości L-lizyny. Zweryfikowano również przyłączenie L-lizyny poprzez wstępną silanizację powierzchni HAP 3-aminopropylotrietoksylanem (APTS). Stopień przyłączenia L-lizyny do HAP według tej metody był niższy o ok. 20-30 %. Zawartość L-lizyny na powierzchni HAP określano jakościowo na podstawie widm FTIR i ilościowo na podstawie analizy TGA. W dalszej części pracy do zmodyfikowanych L-lizyną cząstek HAP zastosowano oznaczenie HAP/LYS.

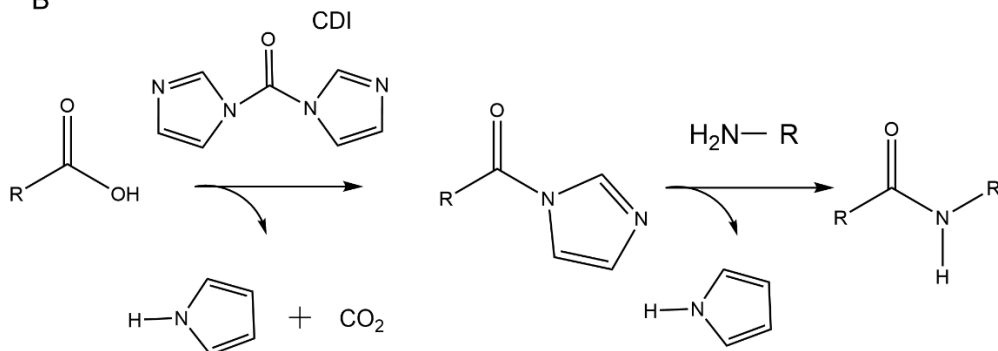
Poli(glikole etylenowe) z karboksylową grupą końcową o masach cząsteczkowych 600 g/mol i 2100 g/mol szczepiono na cząstkach HAP zmodyfikowanych L-lizyną z zastosowaniem 1,1'-karbonylodiiimidazolu (CDI) w stosunku molowym grupy aminowej pierwszorzędowej (HAP/LYS):PEG:CDI (1:1:1,3). CDI jest jednym z kilku powszechnie stosowanych odczynników do sprzęgania kwasów karboksylowych z aminami alifatycznymi lub aromatycznymi z wytworzeniem amidów [150]. Poli(glikole etylenowe) z karboksylową grupą końcową aktywowano środkiem sprzęgającym CDI w 10 ml dichlorometanu (DCM) przez 2 godziny w temperaturze pokojowej w atmosferze argonu. Dyspersję HAP modyfikowanego L-lizyną (0,05 g) w 10 ml DCM poddano działaniu ultradźwięków i dodano do roztworu PEG. Zawiesinę mieszano w temperaturze pokojowej przez 4 godziny w atmosferze argonu. Produkt oddzielono przez wirowanie (3000 rpm, 5 min.) i suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 40 °C przez 24 godziny. Schemat reakcji modyfikacji HAP L-lizyną i PEG przedstawiono na rysunku 22 A. Do szczepienia PEG na powierzchni HAP poprzez L-lizynę testowano również inny czynnik sprzęgający z grupy karbodiimidów N,N'-diizopropylkarbodiimid (DIC), który ostatecznie nie wpływał korzystnie na efektywność modyfikacji.

Reakcje acylowania (rysunek 22 B) są szeroko stosowane w syntezie produktów naturalnych i cząsteczek biologicznie czynnych. Aby mogły być przeprowadzone skutecznie używa się rozpuszczalników np. DCM. CDI jest stosunkowo tani i łatwo dostępny w dużych ilościach, a jedynymi produktami ubocznymi są dwutlenek węgla i imidazol. Te korzyści sprawiają, że CDI jest doskonałym odczynnikiem do aktywacji reakcji sprzęgania amidów na dużą skalę [150].

A



B



Rysunek 22. Schemat reakcji modyfikacji HAP L-lizyną i PEG (A). Reakcja sprzęgania grupy karboksylowej i aminowej z wykorzystaniem CDI (B).

Zawartość PEG na powierzchni cząstek HAP/LYS określono metodą FTIR i TGA. W dalszej części pracy do zmodyfikowanych L-lizyną i PEG o masie cząsteczkowej 600 g/mol i 2100 g/mol cząstek HAP zastosowano oznaczenie odpowiednio HAP/LYS/PEG600 i HAP/LYS/PEG2100.

2.2. Modyfikacja cząstek bioszklą L-lizyną

Przed przystąpieniem do etapu modyfikacji cząstek BG suszono je w suszarce próżniowej w temperaturze 80 °C przez 24 h. Modyfikacji L-lizyną poddano cząstki BG oraz

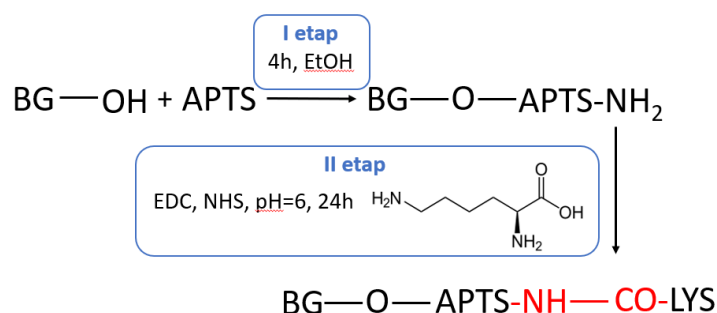
BG dotowane cynkiem i strontem o dwóch różnych uziarnieniach, które przedstawiono w tabeli 2. Przedstawione cząstki BG otrzymano z Instytutu Ceramiki i Materiałów Budowlanych (Sieć Badawcza Łukasiewicz) w ramach projektu GlassPoPep „Multifunkcyjne materiały kompozytowe o właściwościach przeciwbakteryjnych i pro-regeneracyjnych do rekonstrukcji tkanki kostnej”. W tym projekcie jednym z zadań była modyfikacja powierzchni cząstek BG, którym się zajmowałam. Zmodyfikowane cząstki BG L-lizyną stanowiły wypełniacz do kompozytów na bazie poli(adypinianu glicerolu), które zostały opisane w czterech zgłoszeniach patentowych. Cząstki BG syntezowano niskotemperaturową metodą zol-żel, gwarantująca wysoką czystość chemiczną i dużą homogeniczność według sposobu przedstawionego przez Ciołek L. i współautorów [91]. Opracowane cząstki BG należały do układu CaO-SiO₂-P₂O₅. Jako materiał podstawowy zastosowano BG o zawartości 70 % wag. SiO₂, 5 % wag. P₂O₅ i 25 % wag. CaO. W przypadku BG domieszkowanych ZnO lub SrO, 5 % wag. CaO w składzie BG zastąpiono odpowiednim tlenkiem. Po przeprowadzeniu mieszanin reakcyjnych od zolu do żelu i procesie suszenia przeprowadzono obróbkę cieplną w temperaturze 600 °C przez 6 godzin w piecu elektrycznym. Otrzymano proszki gruboziarniste, które następnie rozdrobniono w młynku mechanicznym. Otrzymano cząstki BG o dwóch frakcjach granulacji [91].

Tabela 2. Rodzaje BG zastosowanych do modyfikacji L-lizyną.

Nazwa próbki_uziarnienie	Uziarnienie [μm]	Skład
BG_I	d _{0,1} 7,138	SiO ₂ 70 % wag. CaO 25 % wag. P ₂ O ₅ 5 % wag.
	d _{0,5} 59,866	
	d _{0,9} 215,547	
BG_II	d _{0,1} 4,244	SiO ₂ 70 % wag. CaO 20 % wag. P ₂ O ₅ 5 % wag. ZnO 5 % wag.
	d _{0,5} 38,095	
	d _{0,9} 105,062	
ZBG_I	d _{0,1} 7,960	SiO ₂ 70 % wag. CaO 20 % wag. P ₂ O ₅ 5 % wag. ZnO 5 % wag.
	d _{0,5} 68,088	
	d _{0,9} 198,461	
ZBG_II	d _{0,1} 5,349	SiO ₂ 70 % wag. CaO 20 % wag.
	d _{0,5} 42,334	
	d _{0,9} 118,711	
SrBG_I	d _{0,1} 7,869	SiO ₂ 70 % wag. CaO 20 % wag.
	d _{0,5} 61,789	
	d _{0,9} 173,734	

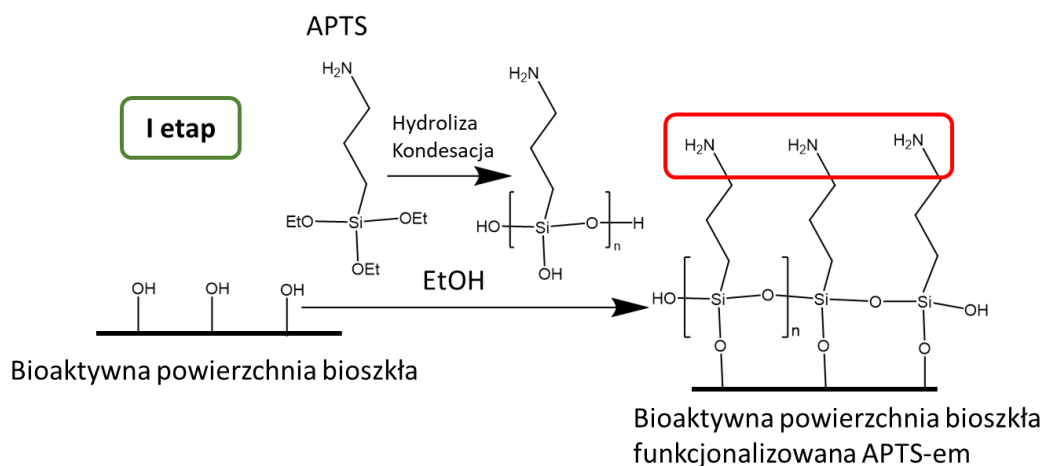
SrBG_II	d _{0,1} 4,857 d _{0,5} 37,739 d _{0,9} 106,024	P ₂ O ₅ 5 % wag. SrO 5 % wag.
---------	---	--

Naważkę 1,0 g BG o odpowiednim składzie i uziarnieniu dodano do 18 ml 95% wodnego roztworu acetonu. Układ mieszano na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej przez 4 h. Po tym czasie zawiesinę odwirowano (3000 rpm, 5 min) i przemyto trzykrotnie 95% acetonem, a następnie wodą destylowaną. Oczyszczone cząstki BG suszono w temperaturze 80 °C w czasie 24 h. Suche cząstki BG poddano różnym rodzajom modyfikacji w celu wprowadzenia na ich powierzchnię L-lizyny. Celem zadania było uzyskanie jak największej ilości L-lizyny. Zweryfikowano ilość przyłączenia L-lizyny w reakcjach bezpośrednich BG z L-lizyną (stosunki molowe 1:1 i 1:2, reakcja w H₂O) oraz w reakcjach dwuetapowych z wykorzystaniem APTS (BG:APTS 1:1 i 1:2, reakcje w EtOH). W reakcjach z EtOH do cząstek HAP/APTS przyłączano L-lizynę w ilości 10 % wag. w EtOH. W wymienionych reakcjach L-lizyna była związana z powierzchnią BG adhezyjnie, a stopnie przyłączenia L-lizyny określone na podstawie TGA wynosiły maksymalnie 2 %. Ostatecznie zaproponowano dwustopniową modyfikację cząstek BG według rysunku 23.



Rysunek 23. Schemat dwuetapowej modyfikacji cząstek bioszklą L-lizyną.

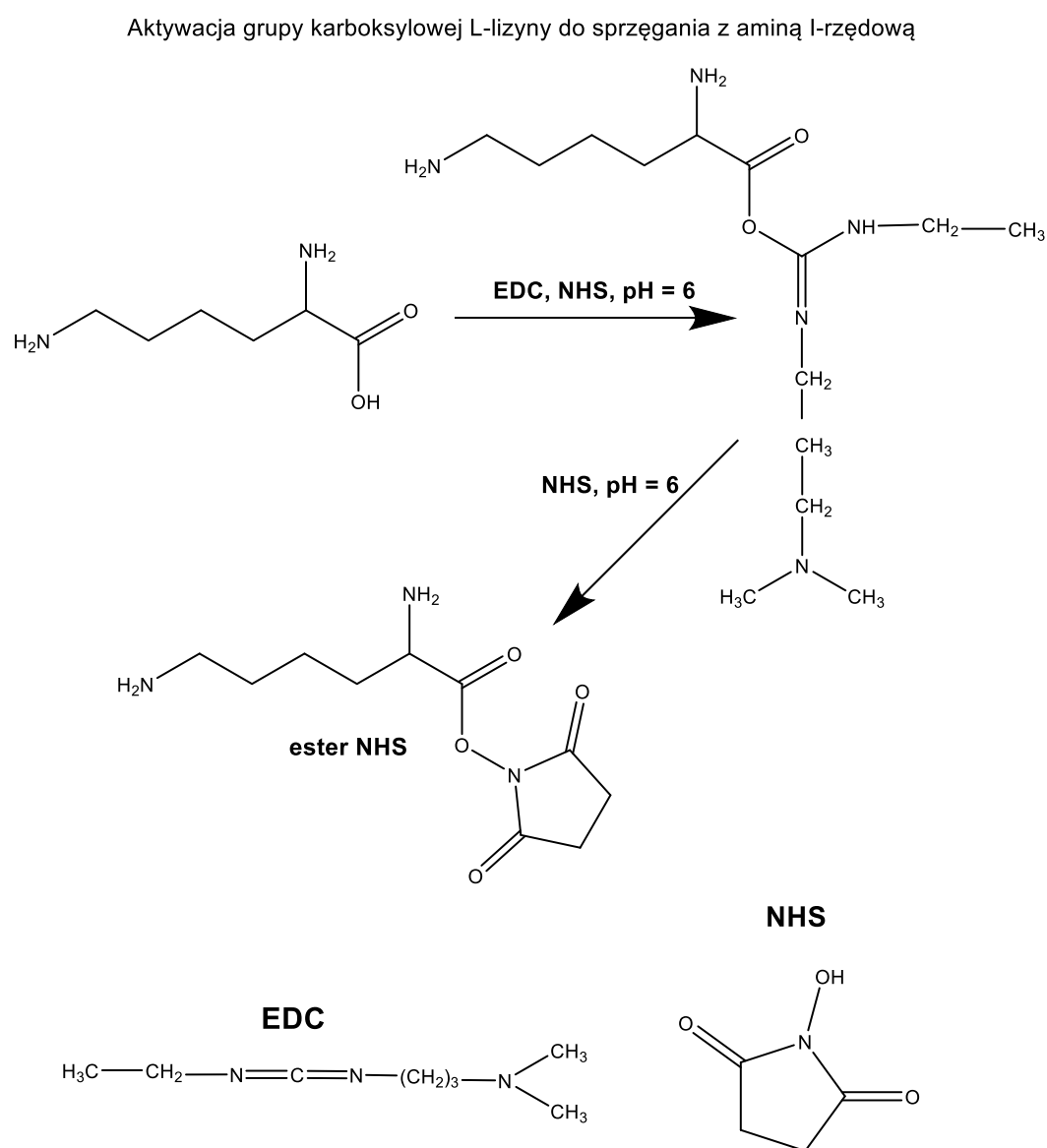
W pierwszym etapie do 1,0 g cząstek BG dodano 18 ml 96 % etanolu i mieszano na mieszadle magnetycznym 30 min. Następnie do dyspersji cząstek BG dodano 1 ml (0,949 g) APTS i układ mieszano na mieszadle magnetycznym przez kolejne 4 h. Po tym czasie cząstki BG/APTS oddzielono poprzez wirowanie (3000 rpm, 5 min) i przemywanie świeżymi porcjami etanolu. Obecność APTS na powierzchni cząstek BG określono jakościowo na podstawie widm FTIR i ilościowo na podstawie analizy TGA. Schemat pierwszego etapu modyfikacji BG przedstawiono na rysunku 24.



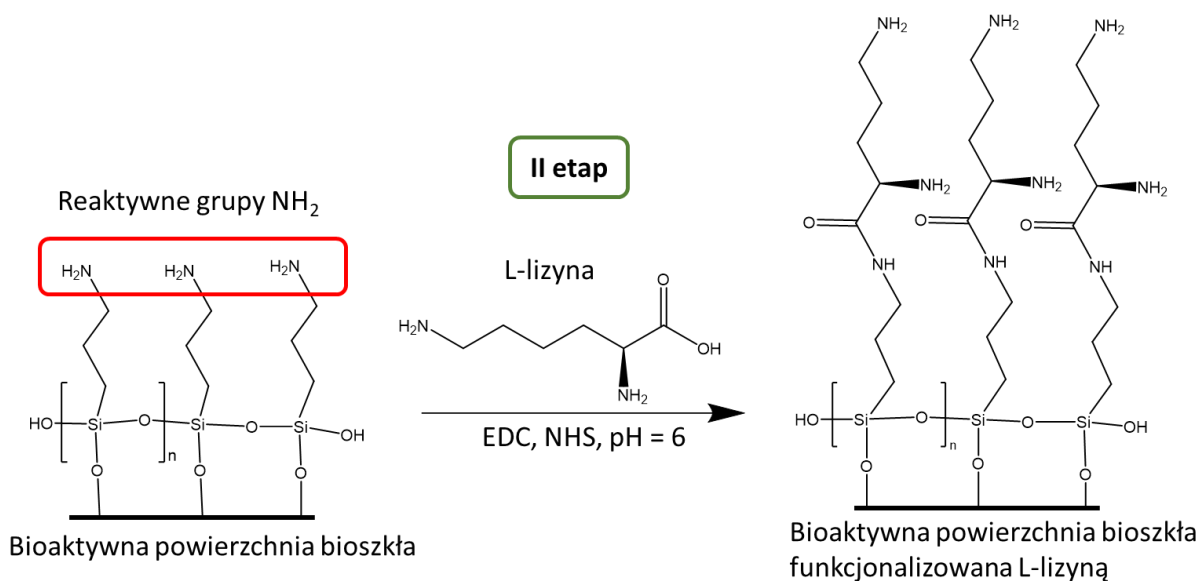
Rysunek 24. I etap modyfikacji BG z użyciem APTS.

W drugim etapie cząstki BG/APTS poddano modyfikacji L-lizyną w obecności EDC - karbodiimidowego czynnika sprzęgającego grupy aminowe pochodzące od APTS i karboksylowe pochodzące od L-lizyny. Do reakcji zastosowano także N-hydroksysukcynoimid (NHS) w celu zwiększenia skuteczności reakcji sprzęgania. NHS umożliwia reakcję karbodiimidów polegającą na aktywacji karboksylanów (-COOH) do sprzęgania z aminami pierwszorzędowymi (-NH₂) (rysunek 25). Reakcję przyłączania L-lizyny do cząstek BG/APTS przeprowadzono 24h w 0,05 M buforze MES, o pH = 6, który zapewnia odpowiednie środowisko reakcyjne ponieważ jest pozbawiony dodatkowych grup karboksylowych i aminowych. Bufor MES jest stabilnym chemicznie i enzymatycznie buforem obojętnym. Ma zakres pH od 5,8 do 6,5 i jest powszechnie stosowany w pożywkach do hodowli komórkowych, jako powszechny bufor w elektroforezie i do oczyszczania białek w chromatografii. MES jest również przydatny jako bufor niekoordynujący w chemii z udziałem jonów metali. W pierwszej kolejności aktywowano grupy karboksylowe L-lizyny w 10 ml buforu MES przy stosunku molowym reagentów L-lizyna : EDC : NHS = 1 : 1.1 : 1.3, oraz APTS : L-lizyna = 1 : 1.5, mieszając układ 30 minut na mieszadle magnetycznym. Następnie przygotowano dyspersję cząstek BG/APTS w buforze MES o stężeniu 0,05 g/ml i dodano do roztworu L-lizyny. Całość mieszano w temperaturze pokojowej przez 24 h. Ostatecznie produkt odwirowano (3000 rpm, 5 min), przemyto 3-krotnie buforem MES i suszono pod próżnią 24 h w temperaturze 40 °C. Zawartość przyłączonej L-lizyny do BG/APTS potwierdzono na podstawie termogramu TGA i analizy FTIR. W dalszej części pracy do zmodyfikowanych L-lizyną cząstek BG_I i II, ZBG_I i II oraz SrBG_I i II posłużono się oznaczeniami odpowiednio BG_I/APTS/LYS, ZBG_I/APTS/LYS itd. II etap funkcjonalizacji cząstek BG przedstawiono na rysunku 26.

Zastosowany w II etapie modyfikacji karbodiimidowy czynnik sprzęgający tj. chlorowodorek N-(3-dimetyloaminopropylo)-N'-etylokarbodiimidu (EDC), reaguje najpierw z grupą karboksylową i tworzy reaktywny wobec aminy związek pośredni O-acylomocznik, który następnie reaguje z grupą aminową tworząc wiązanie amidowe z uwolnieniem izomocznikowego produktu ubocznego. Ten produkt pośredni jest niestabilny w roztworach wodnych, dlatego użyto NHS do stabilizacji reakcji. Atak nukleofilowy NHS na O-acylomocznik powoduje utworzenie stabilnego estru NHS, który następnie umożliwia skuteczne sprzężenie z pierwszorzędowymi aminami. Mechanizm aktywacji molekularnej EDC/NHS pokazano na rysunku 25 [151,152].



Rysunek 25. Schemat aktywacji grupy karboksylowej L-lizyny z zastosowaniem EDC/NHS.



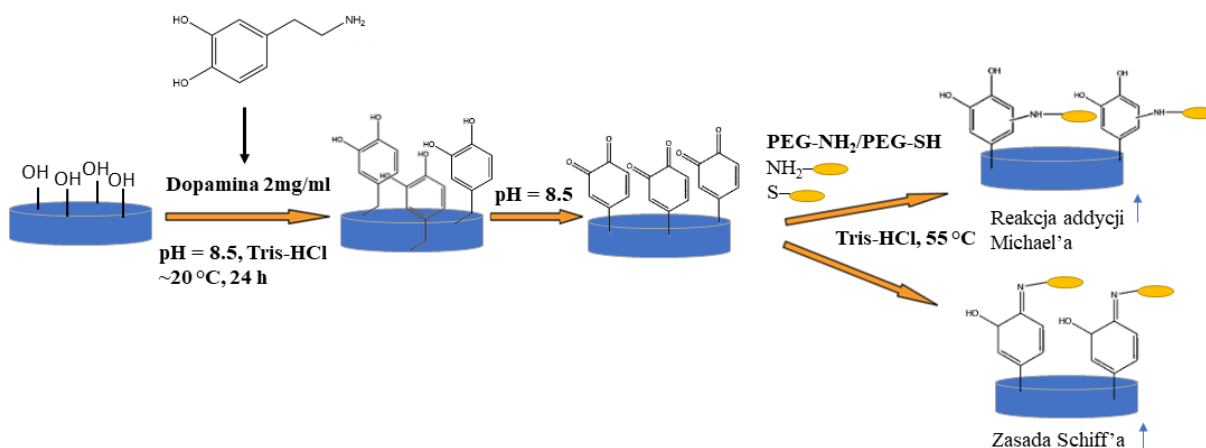
Rysunek 26. Funkcjonalizacja bioaktywnej powierzchni bioszklą L-lizyną (II etap).

2.3. Modyfikacja cząstek hydroksyapatytu polidopaminą i poli(glikolem etylenowym)

Polidopaminę (PDA) na powierzchni cząstek HAP otrzymano w wyniku polimeryzacji *in situ* dopaminy w obecności utleniacza – buforu TRIS. Przed przystąpieniem do etapu modyfikacji cząstek HAP suszono je w suszarce próżniowej w temperaturze 110 °C przez 24 h. Przygotowano dyspersję 0,5 g hydroksyapatytu w 5 ml buforu TRIS (0,01 M, pH = 8,5) i poddano działaniu ultradźwięków przez 10 minut. Stężenie HAP w buforze TRIS wynosiło zatem 0,1 g/ml. Następnie do zawiesiny HAP dodano roztwór dopaminy w buforze TRIS o stężeniu 2 mg/ml, przy zachowaniu stosunku molowego HAP i dopaminy 1:1. Cały układ mieszano na mieszadło magnetycznym w temperaturze pokojowej przez 24 h w celu umożliwienia polimeryzacji dopaminy na cząstkach HAP. Produkt odwirowano (3000 rpm, 5 min), przemyto 3-krotnie buforem TRIS i wodą, następnie suszono w temperaturze 40 °C w suszarce próżniowej przez 24 h. Zawartość PDA na powierzchni HAP określono na podstawie termogramu TGA. W dalszej części pracy do zmodyfikowanych polidopaminą cząstek HAP zastosowano oznaczenie HAP/PDA. Na rysunku 27 przedstawiono uproszczony schemat polimeryzacji dopaminy i osadzanie struktur PDA na cząstkach HAP.

Poli(glikole etylenowe) z aminową grupą końcową o masach cząsteczkowych 750 g/mol i 5000 g/mol oraz PEG z tiolową grupą końcową o masie cząsteczkowej 800 g/mol szczepiono do zmodyfikowanych PDA cząstek HAP w reakcji addycji typu Michaela i/lub

formacjach zasady Schiffa. W reakcjach tych immobilizuje się kowalencyjnie grupy nukleofilowe PEG do struktury PDA (rysunek 27).



Rysunek 27. Schemat polimeryzacji dopaminy i szczepienia PEG na cząstkach HAP.

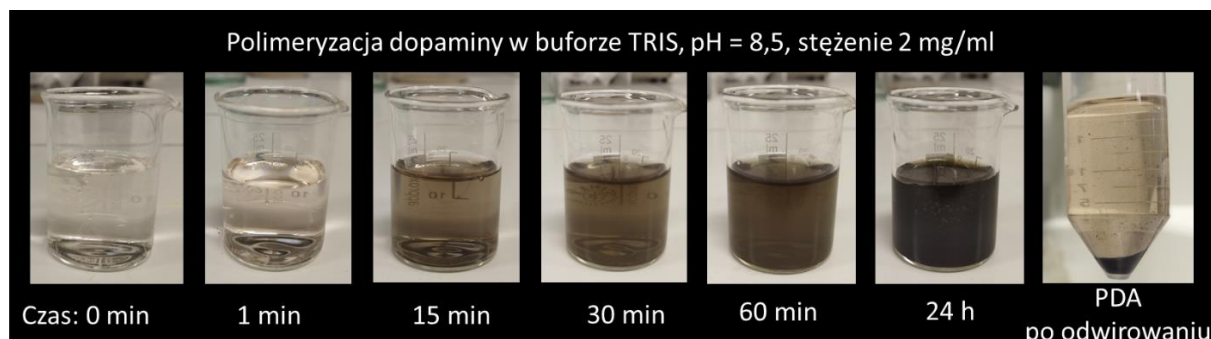
Założono szczepienie PEG w ilości 10 % wag. w stosunku do cząstek HAP/PDA. Dyspersję 0,5 g cząstek HAP:PDA w 5 ml buforu TRIS poddano działaniu ultradźwięków przez 10 min. Po tym czasie dodano roztwór PEG w buforze TRIS o stężeniu 3 mg/ml. Układ HAP/PDA/PEG mieszano 24 h w temperaturze 55 °C pod chłodnicą zwrotną. Reakcję szczepienia PEG zakończono poprzez odwirowanie na wirówce (3000 rpm, 5 min). Następnie produkt przemyto 3-krotnie buforem TRIS i suszono w suszarce próżniowej 24 h, 40 °C. Zawartość PEG na powierzchni cząstek HAP/PDA określono jakościowo na podstawie widm FTIR i ilościowo na podstawie analizy TGA. W przypadku PEG z tiolową grupą końcową powyższą reakcję przeprowadzono w atmosferze inertej w argonie w celu zapobiegania utlenianiu mostków siarczkowych.

W dalszej części pracy cząstki HAP/PDA ze szczepionym PEG o masie cząsteczkowej 750 g/mol, 5000 g/mol i 800 g/mol nazwano odpowiednio HAP/PDA/PEG NH₂750, HAP/PDA/PEG NH₂5000, HAP/PDA/PEG SH800.

2.3.1. Preparatyka polidopaminy

Wykonano polimeryzację dopaminy w obecności środka utleniającego – buforu TRIS o pH = 8,5. Sporządzono roztwór dopaminy w 0,01 M buforze TRIS o stężeniu 2 mg/ml, który mieszano na mieszadle magnetycznym przez 24 h w temperaturze pokojowej. Polimeryzacja rozpoczyna się po 1 minucie kontaktu dopaminy z buforem TRIS na co wskazuje lekkie zabarwienie roztworu. W trakcie trwania polimeryzacji oligomery dopaminy samoorganizują

się i tworzą cząstki koloidalne, które tworzą czarny osad (rysunek 28), co świadczy o zajściu procesu samopolimeryzacji. Po 24 h mieszania cząstki PDA odwirowano na wirówce (3000 obr/min, 5 min), i suszono w suszarce próżniowej w temperaturze 40 °C przez 24 h.



Rysunek 28. Polimeryzacja dopaminy w czasie 24 h.

2.4. Wytwarzanie kompozytów z matrycą z PLLA

Serię kompozytów z matrycą PLLA i napełniaczem w postaci niemodyfikowanych i modyfikowanych cząstek HAP i BG wykonano w stosunku wagowym 9:1. Granulat PLLA w ilości 0,45 g rozpuszczono w 10 ml dichlorometanu (DCM), następnie dodawano dyspersję 0,05 g odpowiedniego napełniacza w 5 ml DCM uprzednio poddaną działaniu ultradźwięków przez 10 minut. Układ polimer/napełniacz mieszano 10 minut i sonikowano kolejne 10 minut. Następnie dyspersje ponownie mieszano na mieszadle magnetycznym 10 minut. Folie kompozytowe uformowano przez wylewanie odpowiednich dyspersji na szalki Petriego (\varnothing 90 mm) i suszenie 24 h w temperaturze pokojowej w celu odparowania rozpuszczalnika, a następnie suszenie 4 h w temperaturze 40 °C pod próżnią. Średnia grubość folii kompozytowych po wysuszeniu wynosiła 35 ± 5 μm .

2.5. Charakterystyka strukturalna, termiczna i biologiczna napełniaczy i kompozytów

Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR)

Modyfikowane cząstki HAP i BG czynnikami biologicznymi i PEG analizowano przy użyciu spektroskopii FTIR. Widma rejestrowano na spektrofotometrze Nicolet iZ10 (Thermo Scientific) w zakresie średniej podczerwieni $4000 - 600$ cm^{-1} , z rozdzielczością 4 cm^{-1} i 32 skanami tła. Wykorzystano technikę całkowitego osłabionego, wewnętrznego odbicia promieniowania IR (FTIR-ATR).

Mikroskopia

Do obrazowania cząstek HAP i BG oraz folii kompozytowych zastosowano skaningowy mikroskop elektronowy SEM (Phenom ProX; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) oraz mikroskop cyfrowy Keyence VHX-5000 (Keyence, Osaka, Japonia).

Skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC)

Właściwości termiczne kompozytów rejestrowano z wykorzystaniem aparatu DSC1 Mettler Toledo z systemem chłodzącym Huber TC100. Kalorymetr kalibrowano przy użyciu dwóch standardowych wzorców: indu ($T_m = 156.6\text{ °C}$, $\Delta H_m = 28.45\text{ J/g}$) i cynku ($T_m = 419.7\text{ °C}$, $\Delta H_m = 107.0\text{ J/g}$). Próbki o masie $3.0\text{ mg} \pm 0.3\text{ mg}$ zostały umieszczone w tyglach aluminiowych o pojemności $40\text{ }\mu\text{l}$ i następnie ogrzewane zgodnie z ustalonym programem termicznym w atmosferze inertnej.

Program temperaturowy dla kompozytów z matrycą PLLA:

- I ogrzewanie: $25 - 200\text{ °C}$, 10 °C/min , $\text{N}_2\text{ }60\text{ ml/min}$,
- Chłodzenie: $200 - 25\text{ °C}$, 10 °C/min , $\text{N}_2\text{ }60\text{ ml/min}$,
- II ogrzewanie: $25 - 200\text{ °C}$, 10 °C/min , $\text{N}_2\text{ }60\text{ ml/min}$.

Analiza termogravimetryczna (TGA)

Stabilność termiczną oraz zawartość napełniacza w kompozytach analizowano na podstawie termogramów TGA. Analizy TGA przeprowadzono przy użyciu aparatu TGA/DSC 1 Mettler Toledo w zakresie temperaturowym $25 - 900\text{ °C}$ w atmosferze azotu. Szybkość ogrzewania to 10 °C/min , przepływ azotu 30 ml/min . Próbki o masie $10\text{ mg} \pm 1.0\text{ mg}$ zostały umieszczone w tyglach ceramicznych z Al_2O_3 o pojemności $70\text{ }\mu\text{l}$ i następnie ogrzewane zgodnie z ustalonym programem temperaturowym.

Degradacja hydrolityczna w roztworze SBF

Biodegradowalność przedstawionych w pracy folii kompozytowych z matrycą PLLA i HAP modyfikowanym L-lizyną i PEG, HAP modyfikowanym PDA i PEG, BG i BG modyfikowanym L-lizyną badano poprzez zanurzenie próbek o masie $\sim 25\text{ mg}$ w 3 ml roztworu SBF ($\text{pH} = 7,4$) w zamkniętych fiolkach. Roztwór SBF przygotowano dokładnie według procedury Kokubo i Takadama [153]. Stężenie jonów i pH roztworu SBF są takie same jak w osoczu krwi ludzkiej, dlatego SBF jest najczęściej stosowanym roztworem do eksperymentów degradacji i mineralizacji w warunkach statycznych. Próbki inkubowano w temperaturze 37 °C , a całkowity czas eksperymentu przedstawiony w pracy to 25 tygodni.

Roztwór SBF zmieniano 1 raz w tygodniu. Próbkę i roztwory do pomiarów ubytku masy i zmiany pH pobierano po: 4, 8, 15, 20, 25 tygodniach. Pobrane próbki w określonych odcinkach czasowych przemywano wodą i suszono w suszarce z obiegiem powietrza 24 h w 37 °C. Współczynnik zmiany masy (próbek obliczono według równania (2):

$$W = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \cdot 100\%, \quad (2)$$

w którym W_0 oznacza masę początkową próbki, a W_1 masę próbki po degradacji w wybranym odcinku czasowym.

Pomiar kąta zwilżania

Pomiar kąta zwilżania wodą demineralizowaną folii kompozytowych przeprowadzono z użyciem goniometru PGX+. Objętość osadzanych kropeł wynosiła 5 µl. Kroplę wody zarejestrowano kamerą PGX+, a kąt zwilżania określono na podstawie obrazu kropli wody na powierzchni kompozytu. Kąt zwilżania wodą mierzono w pięciu różnych miejscach na powierzchni poszczególnych folii, aby zminimalizować błędy eksperymentalne.

Charakterystyka hodowli komórkowej

Przed rozpoczęciem badań *in vitro* próbki w postaci folii kompozytowych sterylizowano z wykorzystaniem sterylizatora parowego w warunkach: temperatura 121°C, ciśnienie 1,05 bar, długość cyklu: 22 minut.

Wpływ kompozytów na żywotność komórek oceniono zgodnie z normą ISO 10993-5:2009 (Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 5: Testy cytotoksyczności *in vitro*) w odniesieniu do dwóch linii komórkowych: linia fibroblastów mysiej skóry L929 i linia ludzkich płodowych osteoblastów hFOB 1.19. Przed eksperymentami fibroblasty hodowano w pożywce RPMI-1640 uzupełnionej 10 % FCS, penicyliną (100 U/ml) i streptomycyną (100 µg/ml) w inkubatorze do hodowli komórkowych (37 °C, 5 % CO₂). Osteoblasty hFOB 1.19 hodowano w mieszaninie 1:1 DMEM i Hama F-12 uzupełnionej 10 % FCS i 0,3 mg/mL genetycyny (G418) w inkubatorze do hodowli komórkowych. W celu podhodowli, konfluentne monowarstwy komórek oddzielono od naczynia hodowlanego za pomocą 0,5 % roztworu trypsyny/EDTA i zawieszono w pożywce hodowlanej. Żywotność i gęstość komórek określono odpowiednio stosując komorę Brukera i barwienie błękitem trypanu. Komórki stosowano w doświadczeniach tylko wtedy, gdy żywotność komórek przekraczała 95 %.

Test cytotoksyczności MTT

Komórki o gęstości $4 \cdot 10^5$ komórek/ml (dla hFOB 1.19) lub $2 \cdot 10^5$ komórek/ml (dla L929) przeniesiono do 96-dołkowych płytek hodowlanych w ilości 100 μ l/studzienkę i inkubowano 24 h w celu odtworzenia pojedynczych warstw komórek. Po inkubacji hodowle komórkowe obserwowano przy użyciu mikroskopu biologicznego w układzie odwróconym upewniając się, że utworzyły się konfluentne i jednorodne monowarstwy i wykluczyć zanieczyszczenie. Pożywkę zastąpiono 100 μ l świeżej pożywki hodowlanej, a do wybranych studzienek dodano próbki kompozytów odpowiadające 1/10 powierzchni studzienki ($n = 6$). Po 24 h inkubacji oceniano stan pojedynczych warstw komórek pod mikroskopem świetlnym i rejestrowano wszelkie zmiany w ich morfologii. Hodowle komórkowe w pożywce bez badanych materiałów zastosowano jako pozytywną kontrolę żywotności. Aby określić ilościowo żywotność komórek, do każdej studzienki dodano 20 μ l bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowego (MTT) i kontynuowano inkubację przez następne 4 h. Po odwirowaniu (450 g, 10 min) i usunięciu supernatantów, do każdej studzienki dodano 100 μ l DMSO (dimetylosulfotlenku) w celu rozpuszczenia niebieskich kryształów formazanu. W kolejnym etapie po 200 μ l roztworu z każdego dołka przeniesiono do oddzielnej 96-dołkowej płytki. Na koniec zmierzono absorbancję zawartości każdego dołka przy długości fali 570 nm za pomocą fotometru Multiskan EX (Thermo Scientific).

Test prozapalny THP1-Blue™ NF- κ B

Ludzkie monocyty THP1-Blue™ NF- κ B niosące konstrukt reporterowy SEAP indukowany przez NF- κ B, zostały użyte do określenia aktywacji szlaku transdukcji sygnału NF- κ B za pomocą testowanych materiałów. Ta linia komórkowa jest bioczujnikiem aktywacji komórek odporności wrodzonej. Indukcja czynnika transkrypcyjnego NF- κ B powoduje wydzielanie embryonalnej fosfatazy alkalicznej (SEAP) do pożywki hodowlanej. Stężenie enzymu odpowiada intensywności stymulacji. Ludzkie monocyty hodowano w pożywce RPMI zawierającej 10 % FCS, 25 mM kwasu 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetanosulfonowego (HEPES), 100 U/ml penicyliny, 100 μ g/ml streptomycyny, 2 mM glutaminy, oraz czynniki selekcyjne (100 μ g/ml normocyny i 10 μ g/ml blastocydyny) w wilgotnej atmosferze z 5 % CO₂ w temperaturze 37 °C. Monocyty THP1-Blue™ NF- κ B doprowadzono do $1 \cdot 10^6$ komórek/ml i 200 μ l zawiesiny komórek przeniesiono do każdej studzienki. Następnie do wybranych dołków dodano próbki kompozytów odpowiadające 1/10 powierzchni studzienki ($n = 6$). Monocyty inkubowane w pożywce służyły jako kontrola negatywna, podczas gdy monocyty stymulowane LPS E. coli (100 ng/ml) zastosowano jako kontrolę pozytywną aktywacji NF- κ B.

Wytwarzanie SEAP oznaczano ilościowo przez połączenie 20 µl supernatantu wolnego od komórek z 180 µl buforu QUANTI-Blue™ i inkubowano w 37 °C z 5 % CO₂ przez 4 h. Absorbancję mierzono przy długości fali 650 nm za pomocą fotometru Multiskan EX (Thermo Scientific).

Test LDH

Naważki 50 mg cząstek BG (BG/LYS, ZBG/LYS i SrBG/LYS) zostały umieszczone w insertach. Następnie komórki hFOB 1.19 (ATCC, USA) zostały wysiane na płytki 12-dółkowe w ilości 3·10⁵ komórek/dółek w objętości 800 µl. Inserty z cząstkami BG oraz pusty insert (kontrola komórek) zostały umieszczone w płytkach wielodółkowych. Do każdego insertu dodano 400 µl medium DMEM/F-12 zawierającego 10 % FCS, gentamycynę o stężeniu końcowym 10 µg/ml i amfoterycynę B o stężeniu końcowym 0,25 µg/ml. Komórki inkubowano 48 h (37 °C, 95% wilgotności, 5% CO₂). Test LDH wykonano po inkubacji biomateriałów przez 48 h. Przed przystąpieniem do pobierania próbek medium, do dołek z kontrolą pozytywną dodano 50 µl 1 % roztworu Triton X-100 po czym płytki ponownie umieszczono w inkubatorze na czas 15 minut. Następnie z każdego dołka pobrano po 6 próbek medium o objętości 50 µl do uprzednio przygotowanej płytki 96 - dołkowej. Następnie przygotowano roztwór do badania aktywności dehydrogenazy mleczanowej przy użyciu zestawu Cytotoxicity Detection KitPLUS (Roche) zgodnie z protokołem dostawcy. Przygotowany roztwór natychmiast dodano w objętości 50 µl do dołek z próbkami. Płytkę następnie inkubowano w ciemności przez 30 min w temperaturze pokojowej, po czym przeprowadzono pomiar absorbancji za pomocą czytnika płytek przy długości fali 490 nm oraz 690 nm. Cytotoksyczność wyznaczono za pomocą wzoru (3):

$$\text{Cytotoksyczność LDH} = \frac{A_{\text{próbka}} - A_{\text{kontrola}}}{A_{\text{kontroli dodatniej}} - A_{\text{kontrola}}} \times 100\% \quad (3)$$

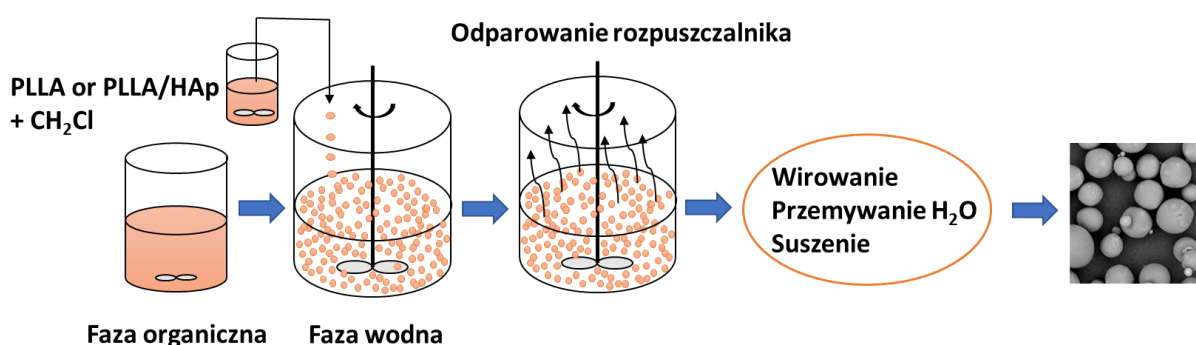
Ocena statystyczna

Istotność statystyczną różnic między grupami uzyskaną w badaniach biologicznych oceniono za pomocą testu U Manna–Whitneya. Różnice uznano za istotne statystycznie, gdy $p < 0,05$. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism 7. Wyniki przedstawione jako wartości średnie ± odchylenie standardowe dla n powtórzeń opracowano w programie Origin 2021.

3. METODOLOGIA CZĘŚĆ II – DRUKOWANIE 3D I CHARAKTERYSTYKA RUSZTOWAŃ CPC/PLLA

3.1. Wytwarzanie mikrosfer polimerowych PLLA oraz kompozytowych PLLA/HAP

Mikrosfery z PLLA oraz mikrosfery kompozytowe PLLA z zawartością 10 % wag. HAP wytworzono techniką emulsyjną z odparowaniem rozpuszczalnika (ang. oil – in – water technique (O/W) dla mikrosfer PLLA oraz ang. solid – in – oil – in – water emulsification S/O/W dla mikrosfer PLLA/HAP). Schemat wytwarzania jest przedstawiony na rysunku 29. W tym celu sporządzono 1 % roztwór poli(alkoholu winylowego) (PVA) w wodzie destylowanej (7,5 g PVA, 750 ml wody destylowanej) poprzez mieszanie na mieszadle magnetycznym 48 h w temperaturze 70 °C i następnie schłodzenie do temperatury otoczenia. Sporządzono roztwory PLLA o stężeniach 1 %, 2 % i 4 % w 250 ml DCM, które emulgowano do wodnych roztworów PVA kropla po kropli za pomocą pompy perystaltycznej. Szybkość mieszania fazy wodnej wynosiła 800 obr/min. Stosunek objętościowy fazy organicznej do fazy wodnej wynosił zawsze 1:3. Mikrosfery kompozytowe przygotowano według powyższej procedury, przy czym hydroksyapatyt w ilości 10 % wag. dodawano do roztworu PLLA w DCM, który poddawano działaniu ultradźwięków przez 10 minut, a następnie emulgowano w wodnym roztworze PVA. Mikrosfery PLLA i PLLA/HAP mieszano 48 h na mieszadle magnetycznym w celu odparowania rozpuszczalnika. Po tym czasie mikrosfery oddzielono poprzez wirowanie na wirówce (3000 rpm, 5 min), przemywano 3-krotnie wodą w celu odmycia PVA i suszono w temperaturze 40 °C w suszarce próżniowej przez 24 h. Gotowy produkt ucierano w młynku i przesiewano przez sito o rozmiarze 100 µm.



Rysunek 29. Schemat wytwarzania mikrosfer PLLA i PLLA/HAP.

3.2. Przygotowanie past CPC/PLLA do druku 3D

Pasta CPC (Innotere GmbH) jest mineralnym cementem kostnym i składa się z prekursorów soli wapnia i fosforanów, które zostały dokładnie rozproszone

w biokompatybilnej fazie olejowej złożonej z krótkołańcuchowych triglicerydów (trójglicerydy kaprylowe/kaprynowe - Miglyol 812) i dwóch emulgatorów (etoksylogowany olej rycynowy n=35 Cremophor ELP i fosforan cetylu Amphisol A). Trójglicerydy kaprylowe/kaprynowe i etoksylogowany olej rycynowy są wytwarzane z surowców roślinnych. Zawartość fazy stałej i nośnika ciekłego w paście CPC wynoszą odpowiednio 86 % wag. i 14 % wag. Pasta CPC jest gładka i jednorodna oraz nie wykazuje oddzielania się oleju w teście stabilności. Szczegółowy skład pasty CPC pokazano w tabeli 3. Kompozyty CPC i PLLA przygotowano przez dokładne ręczne wymieszanie gotowej do użycia pasty CPC i mikrosfer PLLA. Na podstawie ilości pasty CPC dodano odpowiednią część mikrosfer PLLA [$w_{\text{PLLA}}/w_{\text{CPC}}$ %]. Przegląd wszystkich przygotowanych kompozycji wraz z obliczeniem udziału procentowego ciała stałego i nośnika ciekłego w kompozycie pokazano w tabeli 4.

Tabela 3. Szczegółowy skład pasty CPC.

Składnik CPC	Skład procentowy fazy stałej i ciekłej [%]	Udział procentowy fazy stałej i ciekłej w paście CPC [%]
α -TCP $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	60	86
DCPA CaHPO_4	26	
CaCO_3	10	
HAP	4	
Miglyol 812	80,4	14
Cremophor ELP	14,7	
Amphisol A	4,9	

Tabela 4. Kompozyty CPC/PLLA o różnych stężeniach.

Nazwa próbki	PLLA [$w_{\text{PLLA}}/w_{\text{CPC}}$ %]	CPC [g]	PLLA [g]	Część stała [% wag.]	Nośnik ciekły [% wag.]
CPC	0	3	0	86	14
CPC/PLLA 3	3	3	0,09	86,4078	13,5922
CPC/PLLA 10	10	3	0,3	87,2727	12,7273
CPC/PLLA 20	20	3	0,6	88,3333	11,6667

3.3. Druk 3D oparty na wytłaczaniu (ang. extrusion – based 3D printing)

Druk 3D oparty na wytłaczaniu przygotowanej kompozycji materiałowej wymaga od użytkownika zaprojektowania rusztowania, określenia procedury wytłaczania i przetwarzania końcowego. W tym doświadczeniu rusztowania kompozytowe 3D z pasty CPC i mikrosfer PLLA zostały wykonane przy użyciu wielokanałowego plotera 3D (Bioscaffolder 3.1, GeSiM mbH, Radeberg, Niemcy). Rusztowania z orientacją warstwa do warstwy 90°, grubością warstwy 0,32 mm i odległością wypełnienia 1,0 mm wykreślono za pomocą stożkowej igły o średnicy $\varnothing = 410 \mu\text{m}$. Rozmiar rusztowań na obrazowanie i badania degradacji hydrolytycznej wynosił 7,2 x 7,2 x 1,5 mm; na badania mechaniczne 7,2 x 7,2 x 15 mm; na badania biologiczne i obrazowanie konfokalne 3,5 x 3,5 x 0,8 mm. Parametry druku do wytwarzania rusztowań dla różnych składów materiałowych przedstawiono w tabeli 5. Po procesie druku rusztowania inkubowano w atmosferze pary wodnej przez 3 dni w temperaturze 37 °C (wilgotność > 95%) w celu sieciowania struktury.

Tabela 5. Parametry drukowania 3D dla różnych kompozycji CPC/PLLA.

Nazwa próbki	Ciśnienie [kPa]	Szybkość kreślenia [mms^{-1}]
CPC	75	10,5
CPC/PLLA 3	95	10
CPC/PLLA 10	115	9
CPC/PLLA 20	240	9

3.4. Charakterystyka mikrosfer PLLA i PLLA/HAP, past CPC/PLLA i usieciowanych rusztowań CPC/PLLA

Rozmiar mikrosfer

Do pomiaru wielkości i rozkładu cząstek proszku zastosowano suchą spektroskopię dyfrakcji laserowej (HELOS/BR 4470 C, RODOS/T4, R4). W celu zapewnienia odpowiedniego zagęszczenia optycznego próbki podawano podajnikiem VIBRI (z posuwem 80% i szerokością szczeliny 3,5 mm) i dyspergowano ciśnieniem 0,2 MPa. Wraz ze skumulowanym rozkładem i gęstością rozkładu określono rozmiar cząstek d_{10} , d_{50} , d_{90} , które reprezentują średnicę cząstek proszku występującą w ilości 10, 50 i 90 %.

Właściwości wytłaczania – szybkość płynięcia

Właściwości wytłaczania kompozytów CPC/PLLA oceniano mierząc przepływ masy przez stożkową igłę kreślącą (\varnothing 410 mm) w trzech powtórzeniach ($n = 3$). Kartridże drukarskie wypełniono odpowiednią pastą CPC/PLLA i wytłaczano próbki w czasie 20 s przy różnych wartościach ciśnienia powietrza (100, 150, 200, 300, 400, 500 kPa). Następnie zmierzono wyciskaną masę z użyciem wagi analitycznej. Przechowalność past CPC/PLLA określono mierząc przepływ masy świeżo przygotowanych past CPC/PLLA i powtarzając pomiar po 7 dniach.

Czas sieciowania

Właściwości wiążące zbadano za pomocą testu Gillmore-needle (masa = 113,4 g, średnica igły = 2,13 mm). Cylindryczne próbki ($\varnothing = 12$ mm, $h = 7$ mm, $n = 10$) dla czystej pasty CPC i pasty z największą zawartością PLLA CPC/PLLA20 umieszczono w środowisku nasyconym wodą (wilgotność > 95%) w temperaturze 37 °C i początkowo mierzone czas wiązania w odstępach pomiarowych: 15 min do osiągnięcia czasu związania przez pierwszą próbkę, potem 5 min.

Reologia

Badania reologiczne past CPC i CPC/PLLA przeprowadzono przy użyciu reometru płytkowego Rheotest RN 4, Medingen, Niemcy (tryb płytka – płytka; $\varnothing = 36$ mm, odległość płytek 0,1 mm, temperatura 25 °C). Lepkość past wyznaczono stosując stałą szybkość ścinania 10 s^{-1} w czasie 180 s. Określono również zależność lepkości przy zwiększającej szybkości ścinania od 0 do 100 s^{-1} w ciągu 300 s (wykonano trzy powtórzenia $n = 3$ dla każdego wariantu pomiarowego).

Mikroskopia

Mikrostrukturę mikrosfer PLLA, PLLA/HAP oraz usieciowanych rusztowań CPC/PLLA obserwowano za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (Phenom ProX; Thermo Scientific). Stosunek Ca/P oceniany za pomocą EDS analizowano na podstawie masy i procentu atomowego. Makroporowatość i wierność kształtu wydrukowanych rusztowań CPC/PLLA badano za pomocą mikroskopii stereoskopowej (Leica M205C, Wetzlar, Niemcy) z kamerą DFC295 (Leica, Wetzlar, Niemcy).

Charakterystyka mechaniczna

Wydrukowane rusztowania (7,2 mm x 7,2 mm, h = 15 mm, n = 5) CPC i CPC/PLLA 3,10,20 poddano próbie jednoosiowego ściskania z prędkością 1 mm/min na uniwersalnej maszynie wytrzymałościowej Zwick (Z010 wyposażonej w czujnik tensometryczny 10 kN, Zwick, Ulm, Niemcy). Z danych uzyskano moduł sprężystości liniowej i wytrzymałość na ściskanie.

Uwalnianie jonów w pożywce do hodowli komórkowych

Stężenia jonów wapnia i fosforu mierzono dla rusztowań CPC i CPC/PLLA podczas inkubacji w 1 ml pożywki do hodowli komórkowej DMEM zawierającej 9 % płodowej surowicy cielęcej (FCS) oraz 100 U/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny (PS) przez 21 dni. Supernatanty zbierano i zmieniano po 3, 7, 10, 14, 18 i 21 dniach. Wszystkie zebrane pożywki przechowywano w temperaturze 4 °C do czasu analizy. Próbkę (n = 3) przed eksperymentem rozcieńczono 2 % kwasem azotowym (1:5). Stężenia jonów mierzono za pomocą optycznej spektroskopii emisyjnej z plazmą indukcyjnie sprzężoną (ICP-OES, Plasma Quant PQ 9000 Elite, Analytik Jena, Jena, Niemcy).

Degradacja hydrolityczna w SBF

Degradację hydrolityczną kompozytów CPC/PLLA oraz mikrosfer PLLA i PLLA/HAP przeprowadzono w roztworze SBF w warunkach *in vitro*. Próbkę CPC/PLLA o masie ~150 mg (7,2 x 7,2 x 1,5 mm) oraz mikrosfer PLLA i PLLA/HAP (masa ~50 mg) zanurzano w 1,5 ml roztworu SBF. Próbkę inkubowano w temperaturze 37 °C, a całkowity czas eksperymentu to 28 tygodni (7 miesięcy). Roztwór SBF zmieniano 1 raz w tygodniu. Próbkę i roztwory do pomiarów ubytku masy i zmiany pH pobierano po: 2, 4, 6, 8, 13, 16, 20, 25 i 28 tygodniach. Pobrane próbki w określonych odcinkach czasowych przemywano wodą i suszono w suszarce z obiegiem powietrza 24 h w 37 °C. Mikrosfery PLLA i PLLA/HAP po przemyciu wodą odwirowywano (3 min, 2000 rpm). Współczynnik zmiany masy (próbek obliczono według równania (2):

$$W = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \cdot 100\%, \quad (2)$$

w którym W_0 oznacza masę początkową próbki, a W_1 masę próbki po degradacji w wybranym odcinku czasowym. W wybranych odcinkach czasowych 2, 12, 20 i 28 tygodni wykonano charakterystykę DSC dla mikrosfer PLLA i PLLA/HAP poddanych degradacji hydrolitycznej

według metody przedstawionej wyżej dla folii kompozytowych z matrycą PLLA. Eksperymenty przeprowadzono dla 3 powtórzeń każdej próbki (n=3).

Charakterystyka biologiczna in vitro

Przed przystąpieniem do badań *in vitro* rusztowania CPC i CPC/PLLA dezynfekowano poprzez dwukrotne zanurzenie rusztowań w 70 % etanolu na 30 minut pod komorą laminarną. Następnie usunięto etanol a próbki pozostawiono do całkowitego odparowania etanolu.

Warunki hodowli komórkowej: wpływ kompozytów CPC/PLLA na żywotność komórek oceniono w odniesieniu do linii nieśmiertelnionych ludzkich, mezenchymalnych komórek macierzystych (hMSC) wykazujących ekspresję odwrotnej transkryptazy ludzkiej telomerazy (hTERT-MSC). Linia hTERT-MSC została udostępniona dzięki uprzejmości prof. Matthiasa Schiekera (Laboratorium Chirurgii Doświadczalnej i Medycyny Regeneracyjnej, Szpital Uniwersytecki w Monachium (LMU), Monachium, Niemcy). Do hodowli komórek hTERT-MSC zastosowano pożywkę DMEM z 15 % FCS i 1 % PS w pierwszym dniu, a w kolejnych DMEM z 10 % FCS i 1 % PS. Rusztowania umieszczono w płytkach 48-dołkowych z agarem. Na każde rusztowanie wysiano $2,5 \cdot 10^4$ komórek w objętości 400 μ l, po czym inkubowano je w temperaturze 37 °C (5 % CO₂) przez 21 dni. Pożywkę do hodowli komórkowej zmieniano 2 razy w tygodniu. W dniach 1, 3, 7, 14 i 21 po wysianiu komórek analizowano rusztowania po barwieniu fluorescencyjnym cytoszkieletu i jąder. Rusztowania z zasianymi komórkami utrwalono w 4 % roztworze formaldehydu w PBS przez 30 minut po dwukrotnym przemyciu ich ciepłym roztworem PBS. Przepuszczalność błony komórkowej uzyskano przez 5 minutową inkubację w roztworze 0,1 % Triton-X100/PBS. Następnie rusztowania przemyto 5-krotnie roztworem PBS. Aby zablokować autofluorescencję rusztowania inkubowano je w 1 % roztworze albuminy surowicy bydlęcej (BSA) w PBS przez 60 minut. Następnie jądra komórkowe i cytoszkielety wybarwiono 1,0 μ g/mL DAPI i 0,17 μ M falloidyny AlexaFluor 488 w ciemności. Po utrwaleniu komórek na rusztowaniach zastosowano system obrazowania fluorescencyjnego Keyence BZ-X810 (Keyence Deutschland GmbH), działający przy powiększeniu $\times 20$ i $\times 4$.

Ocena statystyczna – Wyniki przedstawione jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe dla n powtórzeń opracowano w programie Origin 2021.

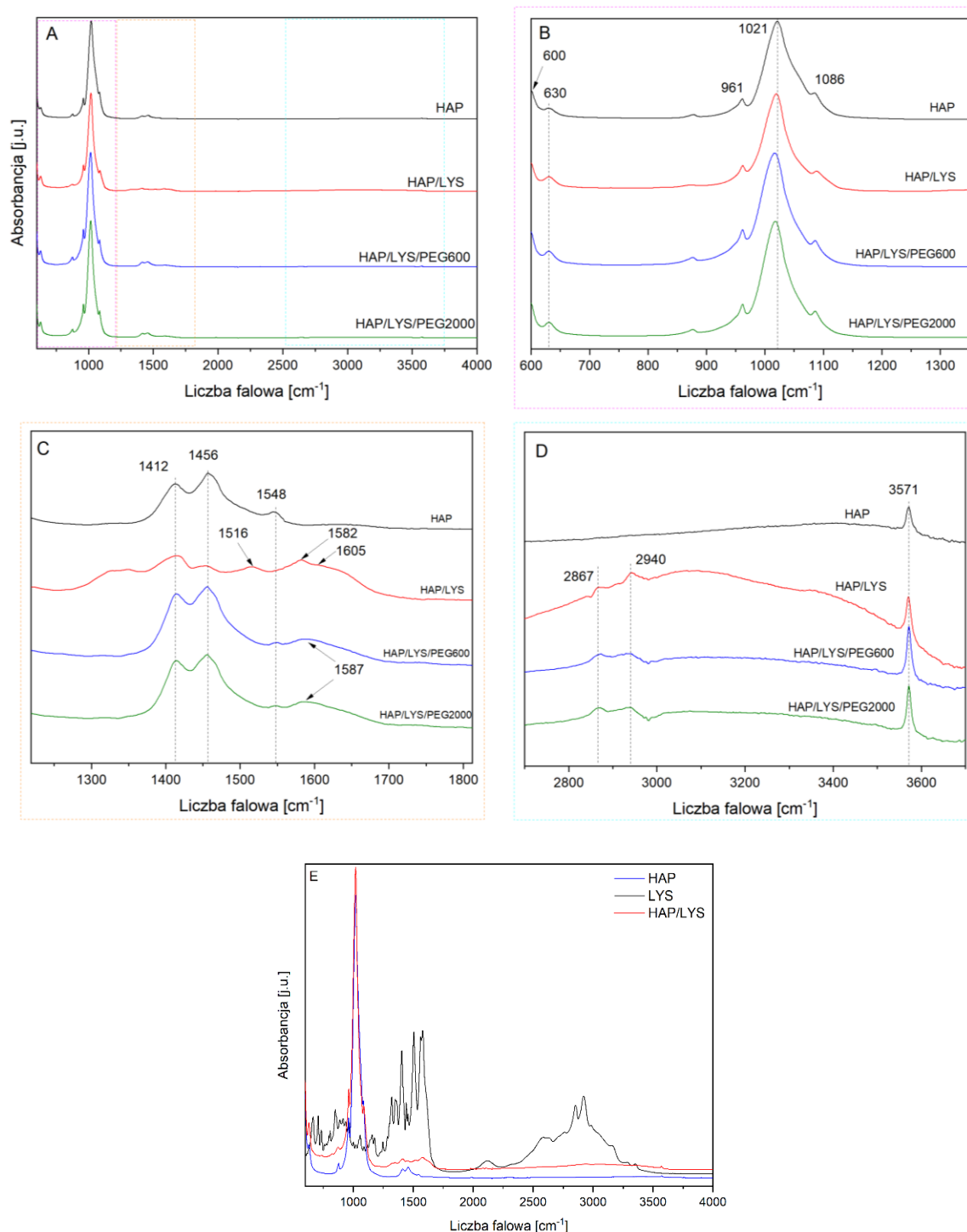
IV. WYNIKI I Dyskusja – Część I

1. CHARAKTERYSTYKA MODYFIKACJI POWIERZCHNI CZĄSTEK CERAMICZNYCH

1.1. Modyfikacja hydroksyapatytu L-lizyną i poli(glikolem etylenowym)

Analiza jakościowa FTIR

Rysunek 30 A-D przedstawia widma spektralne FTIR-ATR w zakresie $600\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ niemodyfikowanych cząstek HAP, HAP o powierzchni zmodyfikowanej L-lizyną i HAP modyfikowanego L-lizyną i PEG o masie cząsteczkowej 600 i 2000 g/mol. Na widmie HAP pasma przy 600 i 961 cm^{-1} określają symetryczne drgania rozciągające wiązań P-O w grupach PO_4^{3-} . Intensywne pasma przy 1021 i 1086 cm^{-1} odpowiadają asymetrycznym drganiom wiązań P-O w grupach PO_4^{3-} . Charakterystyczne pasma przy 877 , 1412 , 1456 oraz 1548 cm^{-1} wskazują na wiązania C-O w grupach CO_3^{2-} . Ponadto, pasma przy 630 i 3571 cm^{-1} określają drgania odpowiednio zginające i rozciągające w grupach hydroksyloowych krystalicznej fazy hydroksyapatytu. Szerokie i słabe pasmo w zakresie $3200\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ odpowiada za drgania grup hydroksyloowych określających zaadsorbowaną wodę na powierzchni cząstek HAP [154]. Na obecność L-lizyny w widmie HAP/LYS wskazują dodatkowe pasma absorpcji charakterystyczne dla czystej L-lizyny, jak pokazano na rysunku 30 E. Podwójne pasma w zakresie $1300\text{-}1370\text{ cm}^{-1}$ odpowiadają drganiom deformacyjnym C-H i CH_2 . Pasma przy 1412 i 1456 cm^{-1} odpowiadają zarówno za drgania grup CO_3^{2-} w HAP oraz świadczą o symetrycznym rozciąganiu wiązań C-O w grupach karboksyloowych COO^- L-lizyny. Pasma przy 1516 cm^{-1} opisuje drgania deformacyjne wiązań N-H. W zakresie $1550\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ zaobserwowano szerokie, podwójne pasmo z maksimum przy 1582 cm^{-1} oraz 1605 cm^{-1} , które świadczy o drganiach wiązań N-H i utworzeniu karboksylanu wapnia $\text{Ca}^{2+}\text{COO}^-$ pomiędzy L-lizyną i HAP [122,127]. Pasma absorpcyjne przy 2867 i 2940 cm^{-1} wskazują na drgania rozciągające wiązania C-H w łańcuchu alkanowym L-lizyny.



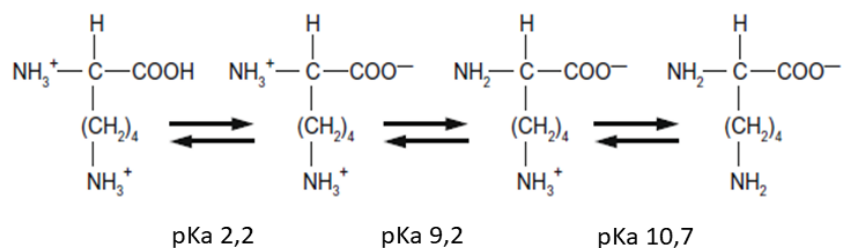
Rysunek 30. Widma spektralne FTIR - ATR dla cząstek HAP modyfikowanych L-lizyną i PEG o masie cząsteczkowej 600 g/mol i 2000 g/mol (A-D) w zakresie 600-4000 cm^{-1} (A), 600-1350 cm^{-1} (B), 1250-1800 cm^{-1} (C), 2750-3700 cm^{-1} (D). Widma FTIR w zakresie 600-4000 cm^{-1} cząstek HAP, HAP/LYS i L-lizyny (E).

W pierwszym etapie modyfikacji cząstek HAP zastosowano L-lizynę jako organiczny łącznik w szczepieniu PEG na powierzchni HAP. W tym celu zastosowano PEG z karboksylowymi grupami końcowymi, które aktywowano CDI (N N'-karbonyldiimidazolem) w celu sprzęgnięcia z grupami aminowymi L-lizyny, według reakcji przedstawionej na rysunku 22 B. Szczepienie PEG na powierzchni cząstek HAP/LYS cząstek

HAP potwierdzono metodą FTIR-ATR. Pasma absorpcji przy 2871 i 2938 cm^{-1} (HAP/LYS/PEG2100) oraz 2873 i 2930 cm^{-1} (HAP/LYS/PEG600) odpowiadają drganiom rozciągającym C–H grupy alkanów i wskazują na obecność L-lizyny i PEG na powierzchni HAP. Powstanie wiązania amidowego C(O)NH w reakcji końcowej grupy karboksylowej PEG i grupy aminowej pierwszego rzędu L-lizyny zostało potwierdzone charakterystycznym, szerokim II pasmem amidowym w zakresie 1570-1650 cm^{-1} z maksimum przy 1587 cm^{-1} [129,155].

Liuyun J. i in przeprowadzili modyfikację cząstek HAP w dimetyloformamidzie w stosunkach wagowych HAP:LYS 2:1 i 1:1.5, utrzymując reakcje w warunkach 9 h, 150 °C, N_2 . Obecność L-lizyny potwierdzili metodą FTIR (pasma C-H przy 2937,1 cm^{-1} i pasmo COO^- przy 1596,4 cm^{-1}). Na podstawie analizy TGA określili całkowitą ilość przyłączonej L-lizyny, która wynosiła 4,246 % (2:1) i 5,577 % (1:1.5). Co więcej, zauważyli, że modyfikacja HAP L-lizyną poprawia stabilność dyspersji w dichlorometanie. Stwierdzili, że L-lizyna zmienia zwilżalność powierzchni i zapobiega aglomeracji cząstek HAP ponieważ cząstki HAP/LYS utrzymywały stabilność koloidalną przez 10 h [127]. Kollath i in. zastosowali L-lizynę jako łącznik pomiędzy cząstkami HAP i białkiem BSA (albumina surowicy bydłowej). Funkcjonalizację HAP przeprowadzili poprzez mieszanie 2 ml roztworu L-lizyny w wodzie (50 mmol L^{-1}) i 0,2 g cząstek HAP w czasie 16 h, a następnie do 0,2 g cząstek HAP/LYS dodali 2 mL roztworu BSA w różnych stężeniach i mieszały przez 2 h w pH 7.1. Na podstawie FTIR stwierdzili występowanie II pasma amidowego (1586 cm^{-1}) i następnie pasm odpowiednich dla wiązań C-H (2869 i 2934 cm^{-1}), które są przesunięte o kilka liczb falowych w porównaniu do widma czystej Lizyny, co świadczy o słabym oddziaływaniu L-lizyny z HAP [129].

W tej pracy reakcja HAP/LYS prowadzona była w wodzie dejonizowanej przy założeniu stosunku molowego reagentów 1:1. pH mieszaniny reakcyjnej znacznie wzrosło do wartości pH=9.5 po wprowadzeniu L-lizyny do wodnej dyspersji HAP. Według dostępnej literatury adsorpcja aminokwasu prowadzi do zmiany ładunku powierzchniowego cząstek HAP. Punkt izoelektryczny HAP wynosi ~ 7 , natomiast po wprowadzeniu L-lizyny na powierzchnię HAP punkt izoelektryczny przesuwa się w kierunku zasadowych wartości pH. Wskazuje to na obecność dodatnio naładowanych grup funkcyjnych na powierzchni HAP i wynika wprost z wartości pKa i stanów protonowania grupy α -aminowej, grupy aminowej w łańcuchu bocznym i grupy karboksylowej przy węglu α w strukturze L-lizyny.



Rysunek 31. Struktury Lewisa cząsteczki L-lizyny dla różnych wartości pH.

W roztworach wodnych L-lizyna może występować jako cząsteczka kationowa, anionowa lub obojnacza w zależności od pH, jak pokazano na rysunku 31. Ładunek cząsteczki zmienia się od LYS^{2+} przy niskim pH do LYS^{-1} przy bardzo wysokim pH.

- LYS^{2+} (pH < 2,2): wszystkie grupy karboksylowa i aminowe są protonowane,
- LYS^{1+} (2,2 < pH < 9,2): deprotonowana grupa karboksylowa i protonowane grupy aminowe,
- LYS^0 (9,2 < pH < 10,7): L-lizyna występuje w postaci obojnaczej z protonowaną końcową grupą NH_2 łańcucha alifatycznego i deprotonowaną grupą karboksylową,
- LYS^- (pH > 10,7): grupy aminowe są całkowicie zobojętnione, a grupa karboksylowa jest zdeprotonowana.

Podczas funkcjonalizacji L-lizyną, grupa karboksylowa oddziałuje z jonami Ca^{2+} na powierzchni HAP. Z wartości pKa pokazanych na rys. 31 wynika, że grupa karboksylowa jest zdeprotonowana powyżej pH 2,2 i anion karboksylanowy oddziałuje elektrostatycznie z powierzchniowymi jonami Ca^{2+} HAP. Dodatkowo grupa NH_3^+ może wiązać się z grupami fosforanowymi HAP poprzez słabe wiązania wodorowe, co generuje mechanizm interakcji wielomiejskowych [122,129,130,156]. Po dokładnym, 3-krotnym odmyciu niezaadsorbowanej L-lizyny na powierzchni HAP i suszeniu, pH dyspersji cząstek HAP/LYS było obojętne, zatem na powierzchni cząstek HAP były obecne protonowane wolne grupy aminowe do sprzężenia z grupami karboksylowymi PEG.

Analiza ilościowa TGA

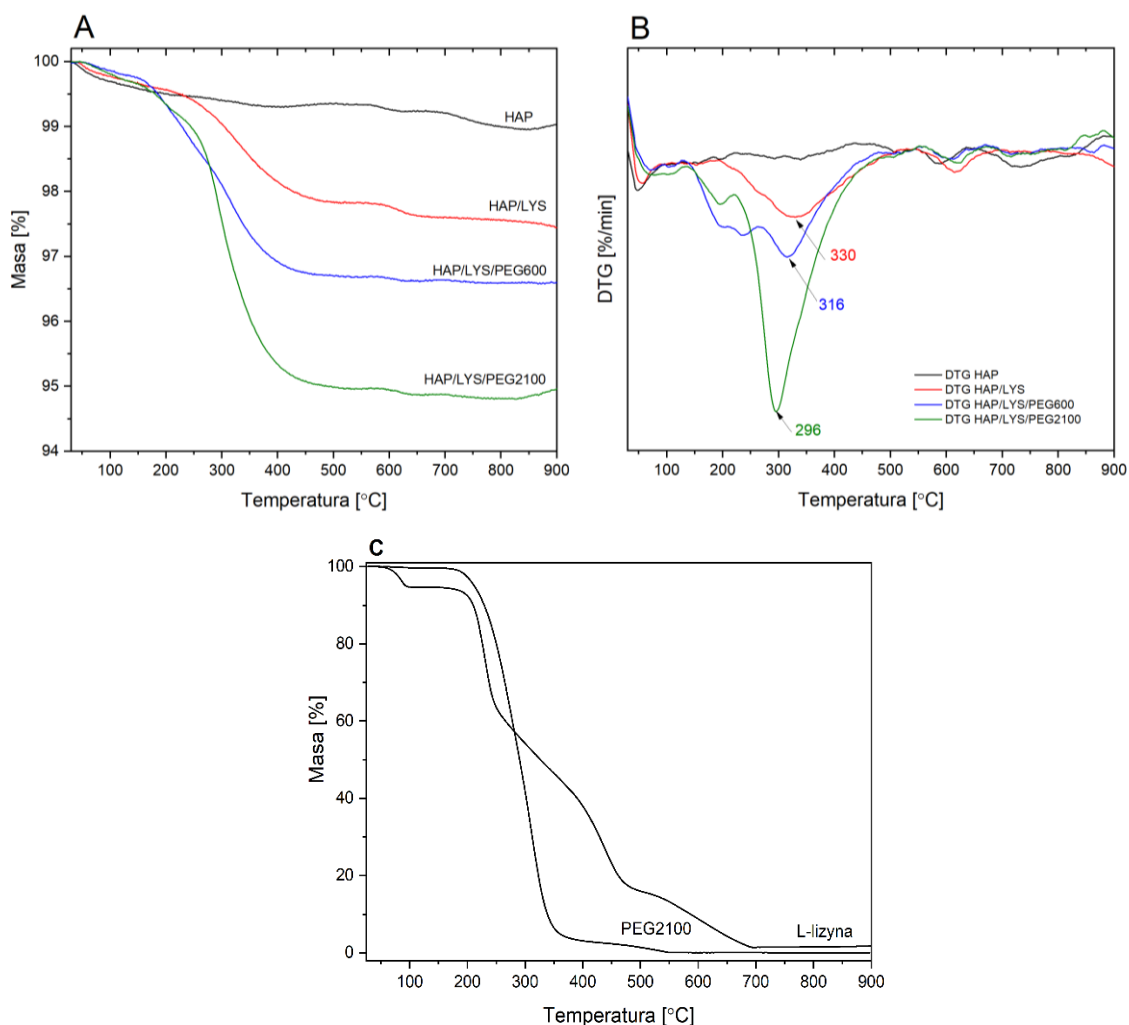
Na podstawie analizy TGA określono całkowite ilości L-lizyny i PEG przyłączone do powierzchni HAP oraz etapy utraty masy cząstek (rysunek 32 A, B). Wszystkie dane liczbowe z analizy TGA zebrano w tabeli 6. Zgodnie z krzywymi TGA przedstawionymi na rysunku 32 A ubytki mas w temperaturze 900 °C dla czystego HAP, HAP modyfikowanego L-lizyną i HAP modyfikowanego L-lizyną/PEG600 i L-lizyną/PEG2100 wynosiły odpowiednio 0,93%, 3,18 % i 5,01 %. PEG600, PEG2100 i L-lizyna uległy całkowitej degradacji do 900 °C (rysunek

32 C), dlatego całkowitą ilość L-lizyny, a następnie L-lizyny/PEG600 i L-lizyny/PEG2100 obliczono z pozostałości w 900 °C, biorąc pod uwagę 0,93 % utraty masy HAP. Całkowita ilość zaadsorbowanej L-lizyny na powierzchni HAP wynosiła 1,49 %. Całkowita ilość PEG600 na cząstkach HAP/LYS wynosiła 0,76 %, a PEG2100 2,59 %. Wyniki te dowodzą, że zarówno L-lizyna, PEG600 i PEG 2100 zostały przyłączone na powierzchnię HAP. Ponadto, wyższa zawartość PEG2100 na powierzchni HAP związana jest z większą masą cząsteczkową i zgadza się z przyjętym systemem obliczeniowym, który zakładał zachowanie stosunku molowego reagentów 1:1. W obu reakcjach HAP/LYS/PEG600 i HAP/LYS/PEG2100 nie uzyskano 100 % wydajności przyłączenia PEG (PEG_{100%}) do L-lizyny obecnej na powierzchni HAP, które powinny wynosić odpowiednio 5,77 % i 16,94 %. Ilość przyłączonego PEG600 do cząstek HAP/LYS jest równa 0,76 %, natomiast ilość PEG2100 wynosi 2,59 %.

Na podstawie pomiarów ubytku masy w zakresie 25-200 °C zaobserwowano, iż wszystkie cząstki adsorbują wodę z otoczenia, ponieważ pierwszy etap degradacji jest w zakresie do 200 °C, jak pokazano na wykresach i pochodnej DTG (rys. 32 B). Najwięcej wody pochłaniają cząstki HAP/LYS/PEG2100. Najprawdopodobniej wynika to z największej hydrofilowości powierzchni tych cząstek (co wpływa następnie na zwilżalność powierzchni kompozytów PLLA (rozdz. IV, 2.1)). Wartości temperatury określonej dla maksimum piku i pochodnej T_{DTG} opisują temperaturę największej szybkości dekompozycji materiału i dla cząstek HAP/LYS, HAP/LYS/PEG wskazują na dekompozycję fazy organicznej. Ponadto, zaobserwowano zwiększenie stabilności termicznej L-lizyny związanej z HAP w porównaniu do wolnej L-lizyny.

Tabela 6. Analiza TGA czystych cząstek HAP i cząstek HAP modyfikowanych L-lizyną i PEG.

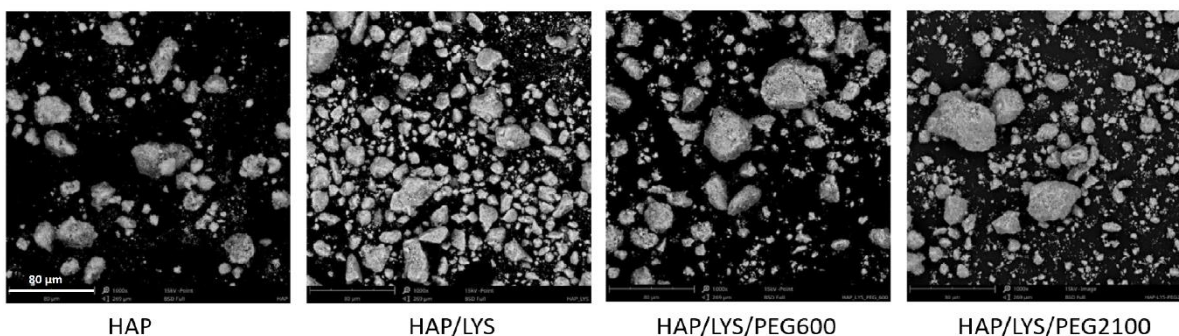
Nazwa próbki	Ubytek masy 25-200°C [%]	Ubytek masy 25-900°C [%]	LYS [%]	PEG [%]	PEG _{100%} [%]
HAP	0,40	0,93	-	-	-
HAP/LYS	0,29	2,42	1,49	-	-
HAP/LYS/PEG600	0,48	3,18		0,76	5,77
HAP/LYS/PEG2100	0,51	5,01		2,59	16,94



Rysunek 32. Krzywe TGA i DTG dla hydroksyapatytu niemodyfikowanego i modyfikowanego L-lizyną i PEG o masie cząsteczkowej 600 i 2100 g/mol (A,B). Krzywe TGA dla czystej L-lizyny i PEG2100 (C).

Skaningowy mikroskop elektronowy

Na rysunku 33 przedstawiono obrazy SEM obrazujące zewnętrzną morfologię cząstek HAP i HAP modyfikowanych L-lizyną i PEG. Wszystkie cząstki mają nieregularny kształt i duży rozrzut wielkości. Modyfikacja HAP L-lizyną i PEG nie wpłynęła na morfologię powierzchni HAP. Granica faz między nieorganicznym HAP i fazą organiczną jest nie do odróżnienia, głównie ze względu na wysokie powinowactwo kryształów nieorganicznych do matrycy polimerowej PEG. Według Gaharwara A.K. i in. [157] związki organiczne mogą hamować aglomerację nieorganicznych materiałów. Zależność tą zaobserwowano podczas otrzymywania kompozytów. Cząstki HAP/LYS/PEG były lepiej zdyspergowane i mniej zagregowane w matrycy polimerowej, jak pokazano na rysunku 44. Jest to pożądana cecha materiałowa w zastosowaniach biomedycznych.



Rysunek 33. Obrazy SEM pokazujące morfologię cząstek HAP i HAP modyfikowanych L-lizyną i PEG.

1.2. Modyfikacja hydroksyapatytu polidopaminą i poli(glikolem etylenowym)

Analiza jakościowa FTIR

Rysunek 34 A-E przedstawia widma spektralne FTIR-ATR w zakresie 600-4000 cm^{-1} niezmodyfikowanych cząstek HAP, HAP powierzchniowo modyfikowanego polidopaminą i HAP modyfikowanego polidopaminą i PEG z aminową grupą końcową o masie cząsteczkowej 750 i 5000 g/mol oraz PEG z tiolową grupą końcową o masie cząsteczkowej 800 g/mol. Zmierzono także widma FTIR-ATR czystej dopaminy i PDA w celu określenia grup funkcyjnych przed i po polimeryzacji dopaminy.

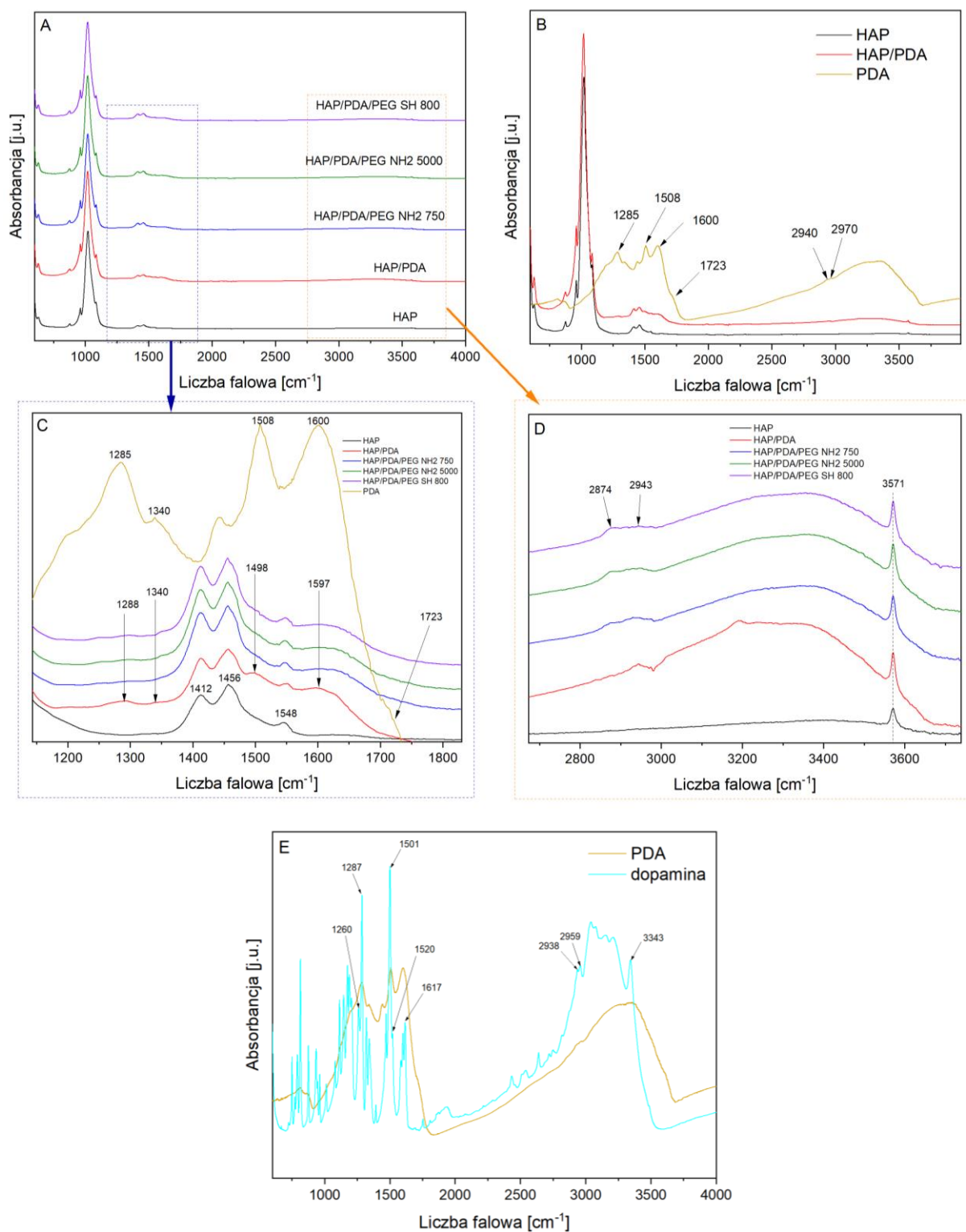
Na widmie FTIR-ATR czystej dopaminy (rys. 34 E) widoczne jest charakterystyczne pasmo przy 3344 cm^{-1} odpowiadające za drgania rozciągające N-H w i rzędowej aminie. Pasma przy 3147 i 3209 cm^{-1} przypisuje się drganiom rozciągającym grup O-H należących do ugrupowania benzenowego ($>\text{C}-\text{OH}$). Typowe pasma przy 3039 i 3075 cm^{-1} oznaczają drgania rozciągające C-H w pierścieniu aromatycznym, natomiast pasma przy 2959 i 2938 cm^{-1} przypisuje się drganiom rozciągającym C-H w łańcuchu alkilowym. Wyróżniające się pasmo przy 1617 cm^{-1} odpowiada za drgania wiązań zginających N-H w i rzędowej aminie i wiązania C-C w pierścieniu aromatycznym. Ponadto, pasmo przy 1520 cm^{-1} opisuje aromatyczne drgania rozciągające C=C, natomiast pasma przy 1471 i 1501 cm^{-1} odpowiadają drganiom rozciągającym C-C również w pierścieniu aromatycznym. Charakterystyczne wąskie pasma przy 1321, 1190 i 1176 cm^{-1} odpowiadają odpowiednio drganiom zginającym C-O-H i drganiom rozciągającym C-O i C-C. Z kolei podwójne pasmo przy 1260 i 1287 cm^{-1} przypisuje się drganiom rozciągającym C-N w cząsteczkach aromatycznych. Pasma w zakresie 1250-1000 cm^{-1} odpowiadają drganiom zginającym C-H w pierścieniu benzenowym, natomiast

pasma w zakresie $910\text{--}650\text{ cm}^{-1}$ charakteryzują zarówno drgania aromatyczne C-H jak i drgania zginające N-H amin i rzędowych [158–160].

W warunkach alkalicznych monomer dopaminy tj. (4-(2-aminoetylo)benzeno-1,2-diol), samorzutnie utlenia się pod wpływem rozpuszczonego tlenu. Wysoce reaktywne produkty powstałe na końcu kaskady utleniania czyli 5,6-dihydroksyindol i indolo-5,6-chinon (= indol-5,6-diol) (rysunek 28 - polimeryzacja dopaminy w alkalicznych warunkach, str. 70) ostatecznie tworzą nierozpuszczalny w wodzie oligomer lub polimer poprzez polikondensację między jednostkami indolu [138,139,161]. Widmo FTIR dla PDA (rys. 34 E) wskazuje na powodzenie samorzutnej reakcji polimeryzacji dopaminy z utworzeniem cząstek PDA. Szerokie i intensywne pasmo w zakresie $3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ przypisuje się drganiom rozciągającym wiązań N-H w aminach i I i II rzędowych, O-H i C-H w pierścieniach aromatycznych. Słabo intensywne pasma przy 2940 i 2970 cm^{-1} świadczą o wiązaniach C-H ugrupowań alkilowych katecholaminy. Co więcej, szerokie pasmo w zakresie $1730\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ wskazuje na wiązanie C=O w cząsteczkach chinonu.

W pracy Zangmeister R.A. i in. [162] stwierdzili, że pasmo przy 1700 cm^{-1} wskazuje na obecność pośrednich form indolo-5,6-chinonu (po kilku minutach reakcji polimeryzacji dopaminy), natomiast przy dłuższych czasach polimeryzacji (10 i 60 min) pojawia się pasmo przy 1723 cm^{-1} , które właśnie odpowiada wiązaniom C=O w chinonie. Istotne jest to, że pasmo to zmniejsza swoją intensywność wraz z czasem prowadzenia polimeryzacji, co wskazuje, że ugrupowania chinonowe mają mały udział wagowy w warstwach PDA.

Intensywne pasmo przy 1600 cm^{-1} wskazuje zarówno na drgania wiązań zginających N-H w i rzędowej aminie w cząsteczce katecholaminy, jak i na wiązanie C=C i C-C w ugrupowaniach aromatycznych. Pasma przy 1508 i 1443 cm^{-1} wskazują podobnie jak pasmo przy 1600 cm^{-1} na drgania rozciągające aromatycznych wiązań C=C i C-C indolu, natomiast pasma przy 1340 i 1285 cm^{-1} opisują drgania wiązań C-N w heteropolimerze PDA. Dodatkowo, w zakresie $1250\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ zaobserwowano pasma C-N amin zarówno aromatycznych i alifatycznych [159,160,162]. Na podstawie powyższych wyników stwierdzono, że w trakcie polimeryzacji dopaminy zachodziła wewnątrzcząsteczkowa reakcja cyklizacji z utworzeniem pochodnych indolu i chinonu, wskazując na strukturę polidopaminy.



Rysunek 34. Widma FTIR-ATR dla cząstek HAP, HAP/PDA oraz HAP/PDA/PEG z aminową grupą końcową o masie cząsteczkowej 750 i 5000 g/mol, oraz PEG z tiolową grupą końcową o masie cząsteczkowej 800 g/mol (A-D). Widma FTIR-ATR dla dopaminy i polidopaminy (E).

Oligomery dopaminy samoorganizują się i tworzą cząstki koloidalne, które następnie agregują i tworzą czarny osad w układzie lub cienką warstwę na powierzchniach mających kontakt z roztworem. Procesy polimeryzacji dopaminy i adsorpcji koloidalnych cząstek PDA

uczestniczą w tworzeniu warstwy. Siła wiązania PDA z różnymi materiałami wynika z reaktywności podjednostek chinonu/katecholu, które mogą tworzyć wiązania koordynacyjne z powierzchniowymi tlenkami metali lub wiązania kowalencyjne z grupami nukleofilowymi. Przy jednoczesnym działaniu słabszych oddziaływań, takich jak wiązania wodorowe, oddziaływania van der Waalsa i oddziaływania hydrofobowe, warstwa PDA może mocno przylegać do szerokiej gamy materiałów [161]. Ponadto, powłoki PDA działają jako wtórne platformy reaktywne do dalszej funkcjonalizacji z różnymi cząsteczkami poprzez wiązania wodorowe, układy π - π , koordynacyjne wiązania kowalencyjne i wiązania kowalencyjne. Obecność PDA na powierzchni materiału powoduje, że różne nukleofile w tym grupy aminowe, tiolowe lub imidazolowe, mogą być kowalencyjnie sprzężone z grupami katecholowymi w warstwie PDA. Powłoki PDA wykazują ukryte powinowactwo do różnych bioaktywnych cząsteczek zawierających te grupy funkcyjne. Zatem PDA umożliwia funkcjonalizację powierzchni naturalnych lub syntetycznych materiałów organicznych lub nieorganicznych. Oprócz tego, PDA jest biokompatybilna i biodegradowalna oraz może wspomagać wzrost komórek, zapewniając tym samym jej bezpieczeństwo, co jest podstawowym wymogiem stawianym biomateriałom stosowanym *in vivo*. Co więcej, PDA z uwagi na grupy katecholowe, wykazuje właściwości przeciwutleniające i przeciwbakteryjne, dlatego może być wykorzystywana do skutecznego usuwania wysokoreaktywnych form tlenu ROS z okolic implantu (tak jak inne przeciwutleniacze, np. witamina D) [139,146].

W związku z powyższym w niniejszej pracy poddano modyfikacji cząstki HAP z wykorzystaniem PDA jako bioaktywnego łącznika do sprzęgnięcia HAP z PEG. W tym przypadku modyfikacji poddano ten sam HAP, jak w przypadku modyfikacji L-lizyną i PEG. W związku z tym opis pasm absorpcyjnych FTIR-ATR struktury HAP znajduje się w poprzednim rozdziale 1.1. Na widmach spektralnych dla cząstek HAP/PDA (rys. 34 A-D), oprócz charakterystycznych pasm dla HAP, zaobserwowano dodatkowe pasma absorpcyjne, które wskazują na adsorpcję PDA do cząstek HAP. Są to pasma przy 1288 i 1340 cm^{-1} wskazujące na wiązania C-N. Następnie pasma przy 1498 i 1597 cm^{-1} charakteryzują drgania rozciągające aromatycznych wiązań C=C i C-C struktur indolowych i katecholowych. Pasma przy 1597 cm^{-1} jednocześnie wskazuje na wiązania N-H amin i rzędowych. Wyszczególnione pasma są delikatnie przesunięte w porównaniu do pasm absorpcyjnych czystej PDA co świadczy o oddziaływaniu między HAP i PDA. Dzięki silnym wiązaniom wodorowym w grupach katecholowych warstwa PDA utworzona *in situ* wykazuje silne przyleganie do praktycznie wszystkich rodzajów powierzchni organicznych lub nieorganicznych [163]. Dodatkowo pasma przy ok. 2900 cm^{-1} oraz intensywne i szerokie pasmo w zakresie 3000-3500

cm⁻¹ wskazują na adhezję cząstek PDA do powierzchni HAP. Jak wspomniano wyżej, PDA ze względu na reaktywne grupy katecholowe jest podatna na immobilizację molekuł zawierających grupy NH₂ i SH w reakcjach wtórnych. Dlatego wykorzystano PEG z aminową i tiolową grupą końcową do sprzęgania z cząsteczkami PDA w reakcji addycji Michaela lub formacjach zasady Schiffa (rys. 27, str. 69). Te wtórne reakcje mogą wykorzystywać niekowalencyjne oddziaływania wiązania lub reakcje kowalencyjne z cząsteczkami zawierającymi grupy nukleofilowe lub inne grupy reaktywne. Na widmach FTTR-ATR w zakresie 1150-1800 cm⁻¹ dla cząstek HAP/PDA/PEG zaobserwowano te same pasma absorpcyjne jak w przypadku HAP/PDA, z tym że, pasma przy ok. 1600 cm⁻¹ są przesunięte w kierunku wyższych liczb falowych. W zakresie 3750 – 3700 cm⁻¹ występują charakterystyczne pasma przy 2874 i 2943 cm⁻¹ wskazujące na wiązania C-H w grupach alkilowych PEG. Są one przesunięte w kierunku niższych liczb falowych i cechują się większą intensywnością w porównaniu do widma HAP/PDA. Podsumowując, z powodzeniem zaszczerpiono PEG-NH₂ i PEG-SH do cząstek HAP za pośrednictwem PDA. Ilościowy opis modyfikacji cząstek HAP przedstawiono poniżej za pomocą metody TGA.

Analiza ilościowa TGA

Na podstawie analizy TGA określono całkowite ilości PDA i PEG przyłączone do powierzchni HAP. Wykresy TGA i pierwszej pochodnej DTG pokazano na rysunku 35 A i B, natomiast wartości liczbowe zebrano w tabeli 7.

Tabela 7. Analiza TGA cząstek HAP modyfikowanych PDA i PEG NH₂ 750 i 5000 oraz PEG-SH 800.

Nazwa próbki	Ubytek masy 25-200°C [%]	Ubytek masy 25-900°C [%]	PDA [%]	PEG [%]
HAP	0,40	0,93	-	-
PDA	6,48	55,89	-	-
HAP/PDA	2,06	10,19	16,85	-
HAP/PDA/PEG NH ₂ 750	2,65	14,02		3,83
HAP/PDA/PEG NH ₂ 5000	2,77	18,19		8,00
HAP/PDA/PEGSH800	1,88	11,40		1,21

Całkowite ubytki mas w zakresie 25-900 °C dla cząstek HAP, PDA i HAP/PDA wynoszą odpowiednio 0,93 %, 55,89 % i 10,19 %. W związku z tym, iż PDA nie degraduje

całkowicie w zakresie do 900 °C (tak jak L-lizyna i PEG) obliczono zawartość PDA na cząstkach HAP na podstawie układu równań (2), która jest równa 16,85 %.

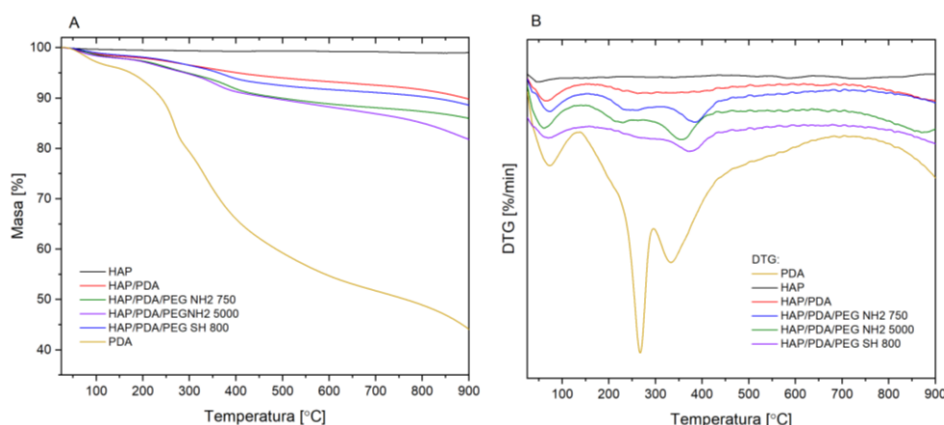
$$\begin{cases} x_{HAP} + y_{PDA} = 1 \\ 0,93\%x_{HAP} + 55,89\%y_{PDA} = 10,19\% \end{cases} \quad (2)$$

W związku z tym, iż PEG degradowuje całkowicie w podanym zakresie temperaturowym, ilość przyłączonego PEG na powierzchni cząstek HAP/PDA obliczono na podstawie różnicy całkowitego ubytku mas HAP/PDA/PEG i HAP/PDA, która wynosi 3,83 %, 8,00 % i 1,21 % odpowiednio dla PEG NH₂ 750, 5000 i PEG SH 800. Ostateczny skład modyfikowanych cząstek wyrażony w procentach wagowych przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Udział wagowy poszczególnych składników w cząstkach HAP/PDA oraz cząstkach HAP/PDA/PEG.

Próbka	HAP [%]	PDA [%]	PEG [%]
HAP/PDA	83,15	16,85	-
HAP/PDA/PEG NH ₂ 750	79,96	16,21	3,83
HAP/PDA/PEG NH ₂ 5000	76,50	15,50	8,00
HAP/PDA/PEG SH 800	82,14	16,65	1,21

Ilość PEG użyta do reakcji wynosiła 10 % wag. w stosunku do cząstek HAP/PDA. Efektywność reakcji modyfikacji cząstek HAP/PDA/PEG wynosi odpowiednio 38,34 %, 80,04 % oraz 12,13 % i jest największa dla PEG NH₂ o masie molowej 5000 g/mol. Ponadto, zaobserwowano wpływ grup końcowych PEG o podobnej masie cząsteczkowej (750 i 800 g/mol) na efektywność reakcji. Cząsteczki PEG zakończone grupami NH₂ są bardziej reaktywne wobec grupy katecholowej PDA na powierzchni HAP, a efekt jest bardziej widoczny dla PEG o większej masie molowej (5000 g/mol).

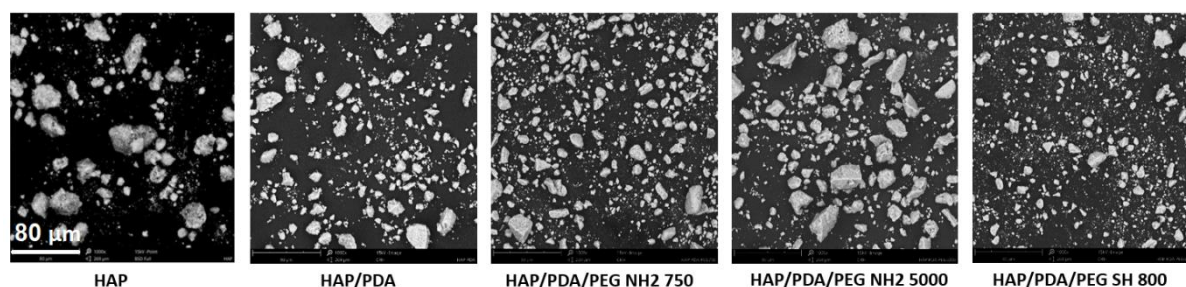


Rysunek 35. TGA i DTG modyfikowanych cząstek HAP/PDA/PEG.

Na podstawie ubytku mas w zakresie 25-200 °C zaobserwowano, iż wszystkie cząstki HAP adsorbują wodę z otoczenia, ponieważ pierwszy etap degradacji jest w zakresie do 200 °C, jak pokazano na wykresach i pochodnej DTG (rys. 35 B). W porównaniu do cząstek HAP modyfikowanych L-lizyną i PEG ubytki mas do 200 °C cząstek HAP z PDA i PEG są znacznie większe i mają wartości w zakresie od 1,88 do 2,65 %. Adsorpcja wody przez te materiały jest bardzo efektywna. Xiong S. i in. [164] stwierdzili, że nie można znaleźć dobrze określonej temperatury rozkładu dla cząstek PDA, w przeciwieństwie do dopaminy. Degradacja PDA jest wieloetapowa (rys. 35 B), co sugeruje, że ma niejednorodną strukturę i obecność różnych grup chemicznych. Masa resztkowa PDA w temperaturze 900 °C wynosi 44,1 %, co wskazuje na karbonizację PDA. Tiwari i in. [165] na podstawie TGA pokazali, że PDA degraduje trój etapowo, tracąc ok. 13 % masy w pierwszym etapie do 179 °C, kolejne 8 % masy uległo degradacji podczas ogrzewania do 324 °C, i następną dużą utratą około 22 % masy została zaobserwowana powyżej 324 °C. Znaczny ubytek masy w ostatnim etapie związany jest z degradacją głównego łańcucha PDA.

Skaningowy mikroskop elektronowy

Na rysunku 36 przedstawiono obrazy SEM obrazujące zewnętrzną morfologię cząstek HAP i HAP modyfikowanych PDA i PEG. Wszystkie cząstki, tak samo jak w przypadku HAP/LYS/PEG mają nieregularny kształt i duży rozrzut wielkości. Zaobserwowano, iż większość cząstek ma wymiar poniżej 50 µm. Modyfikacja HAP z PDA i PEG nie wpłynęła na morfologię powierzchni HAP, a granica faz między nieorganicznym HAP i fazą organiczną jest nie do odróżnienia. Stwierdzono, iż modyfikacja HAP nie powoduje aglomeracji cząstek.



Rysunek 36. Obrazy SEM cząstek HAP, HAP/PDA i HAP/PDA/PEG.

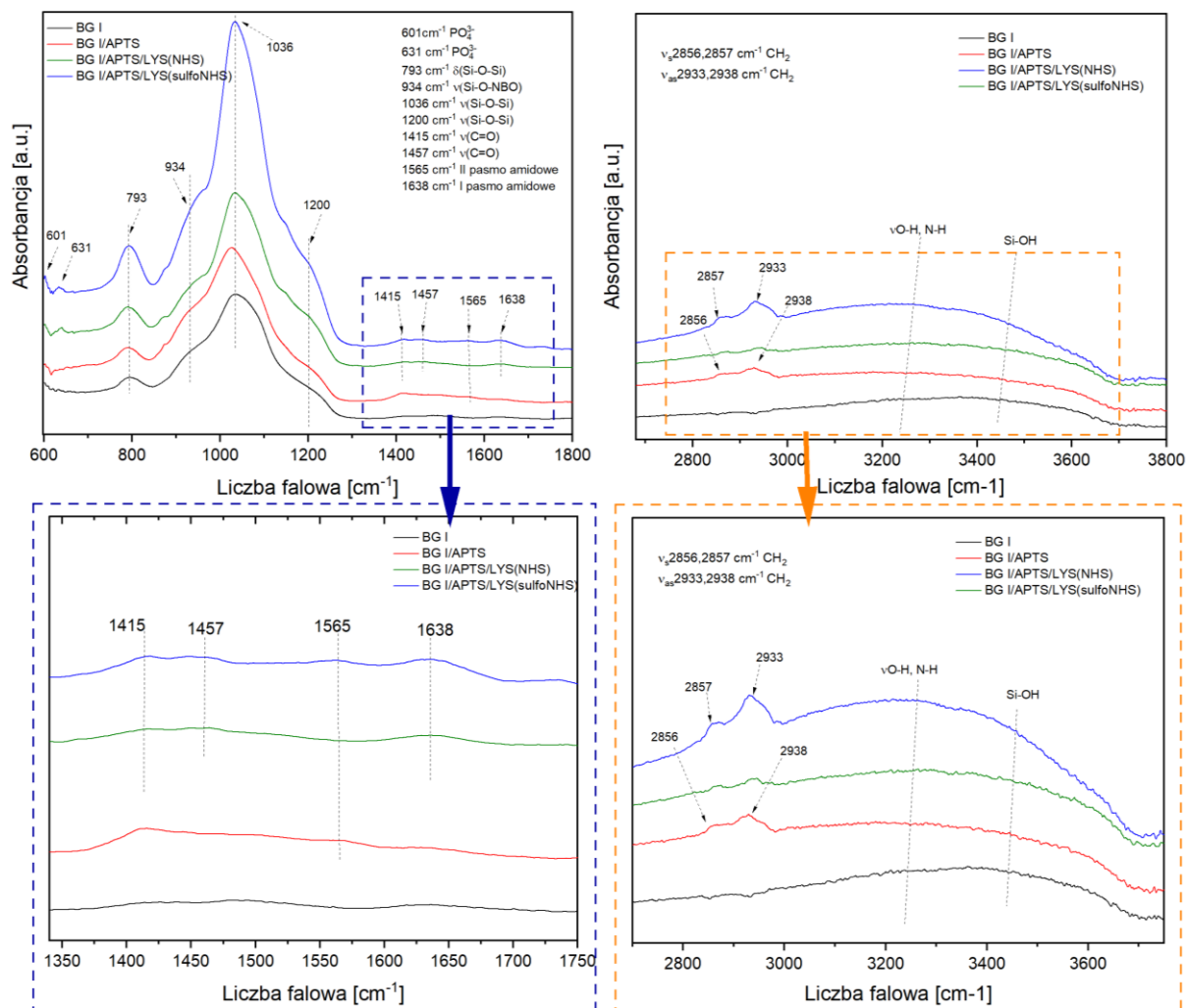
1.3. Modyfikacja bioaktywnego szkła L-lizyną

Analiza jakościowa FTIR

Rysunek 37 przedstawia widma FTIR-ATR dla czystych cząstek BG oraz dla cząstek BG modyfikowanych APTS i L-lizyną. Widmo dla cząstek BG (czarna krzywa) prezentuje charakterystyczne pasma dla trójskładnikowego BG. Pasma przy liczbach falowych 601, 631 cm^{-1} odpowiadają za wiązania w grupach fosforanowych PO_4^{3-} , pasmo przy 631 cm^{-1} odpowiada dodatkowo za wiązania Si-O. Główne pasmo przy 1036 cm^{-1} pochodzi od asymetrycznych drgań rozciągających wiązań Si-O-Si tetraedrów SiO_4 oraz od asymetrycznych drgań rozciągających wiązań P-O w grupach PO_4^{3-} . Pasma przy liczbach falowych 793, 934 i 1200 cm^{-1} charakteryzują odpowiednio zginające i rozciągające drgania wiązań Si-O. Drgania wiązań Si-O w zakresie liczb falowych 890-975 cm^{-1} związane są dodatkowo z jednym niemostkowym tlenem Si-O-NBO (one non-bridging oxygen) w czworościanie SiO_4 . Efekt drgań Si-O-NBO przypisuje się zmniejszeniu lokalnej symetrii wynikającej z włączenia jonów alkalicznych do szklistej sieci krzemionki. Słabe pasmo przy 1628 cm^{-1} dla czystych cząstek BG wskazuje na drgania zginające wiązań HO-O w zaadsorbowanych cząsteczkach wody. Słabe pasma przy 1420 i 1480 cm^{-1} pochodzą od asymetrycznych drgań rozciągających C-O w grupach CO_3^{2-} , które stanowią pozostałość po syntezie BG. Obecność szerokiego i mało intensywnego pasma w zakresie 3700-3100 cm^{-1} świadczy o drganiach rozciągających wiązań O-H w grupach silanolowych (Si-OH) oraz o drganiach HO-O w zaadsorbowanych cząsteczkach wody [96,166]. Pojawienie się dodatkowych pasm absorpcyjnych przy 1565, 2856 i 2938 cm^{-1} (czerwona krzywa) wskazuje na występowanie na cząstkach BG prekursora silanowego APTS i potwierdza to strukturę produktu BG/APTS z pierwszego etapu modyfikacji cząstek BG. Słabe pasmo przy 1565 cm^{-1} wskazuje na drgania zginające N-H grup aminowych NH_2 . Charakterystyczne pasma przy 2856 i 2938 cm^{-1} odpowiadają drganiom rozciągającym symetrycznym i asymetrycznym w grupach CH_2 .

Drugi etap modyfikacji cząstek BG zakładał przyłączenie L-lizyny do wolnych grup aminowych pochodzących od APTS. W tym celu poddano aktywacji molekularnej grupy karboksylowej L-lizyny z wykorzystaniem karbodiimidowego czynnika sprzęgającego EDC i czynnika NHS stabilizującego reakcję i zwiększającego wydajność modyfikacji. Standardową metodą immobilizacji biomolekuł zawierających grupę NH_2 i grupę karboksylową poprzez kowalencyjne wiązanie amidowe jest użycie EDC i NHS, które są dobrze znane w syntezie peptydów. Podejście aktywacyjne EDC/NHS pozwala na wysoką wydajność konwersji

i zachowanie łagodnych warunków reakcji oraz doskonałą biokompatybilność. Dzięki tym zaletom aktywacja EDC/NHS kwasów karboksylowych i następująca po niej reakcja amidowania są szeroko stosowane w biomolekularnej koniugacji i immobilizacji białek, peptydów, DNA i wielu rodzajów podłoży polimerowych [151].

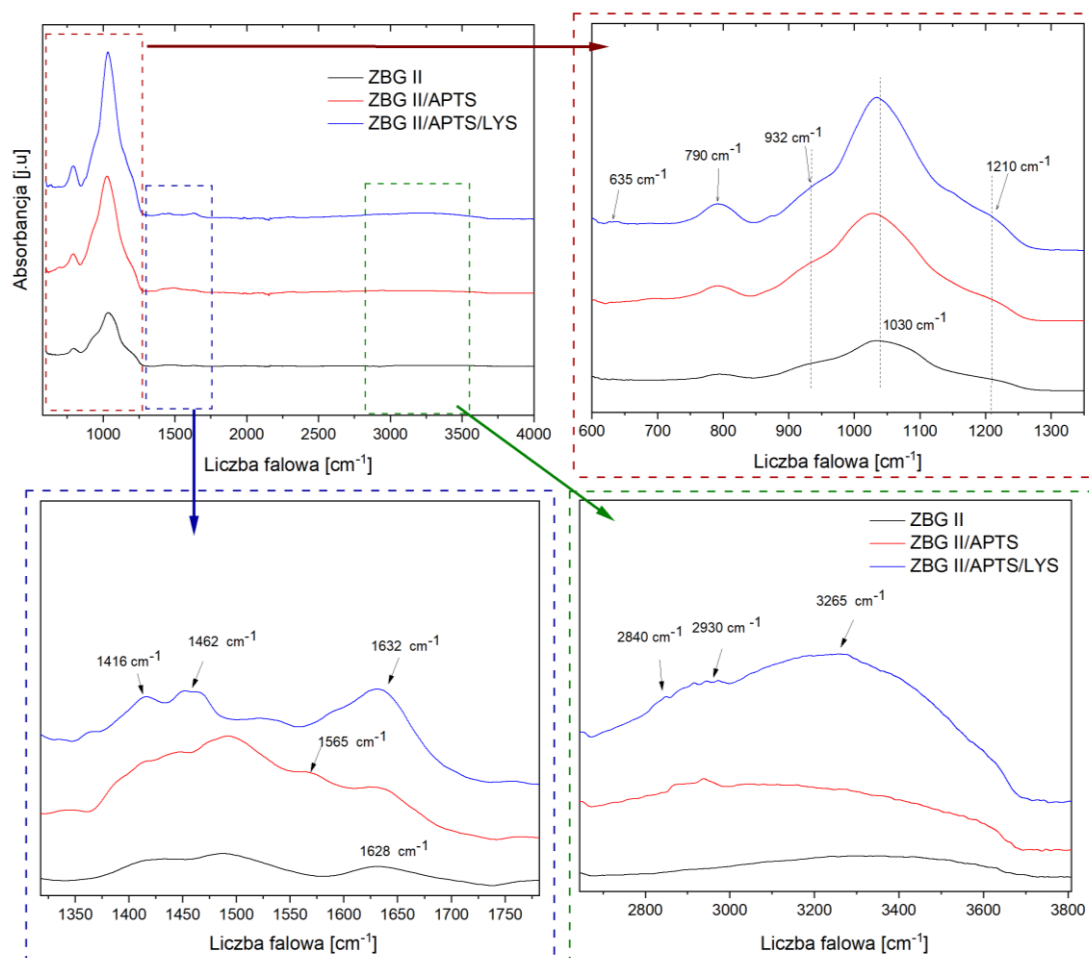


Rysunek 37. Widma spektralne FTIR dla cząstek BG i cząstek BG modyfikowanych APTS i L-lizyną.

Reakcję sprzęgania L-lizyny przeprowadzono z wykorzystaniem soli sodowej NHS (sulfo-NHS) oraz NHS (niebieska i zielona krzywa). Pasma absorpcyjne przy 1638 cm^{-1} wskazują na i pasmo amidowe pochodzące od drgań wiązań N-H (zarówno dla BG I/APTS/LYS(NHS) jak i BG I/APTS/LYS(sulfoNHS)) i świadczą o kowalencyjnym przyłączeniu L-lizyny do powierzchni BG za pośrednictwem APTS. Pasma przy 1415 i 1457 cm^{-1} wskazują w obu przypadkach na wiązania C=O pochodzące od grupy $-C(O)NH$ i również potwierdzają szczyplenie L-lizyny do APTS [96,167]. Zwykle powierzchnia BG ma ujemnie naładowaną powierzchnię (ładunek ujemny). Unieruchomienie APTS i L-lizyny może zmienić ładunek BG

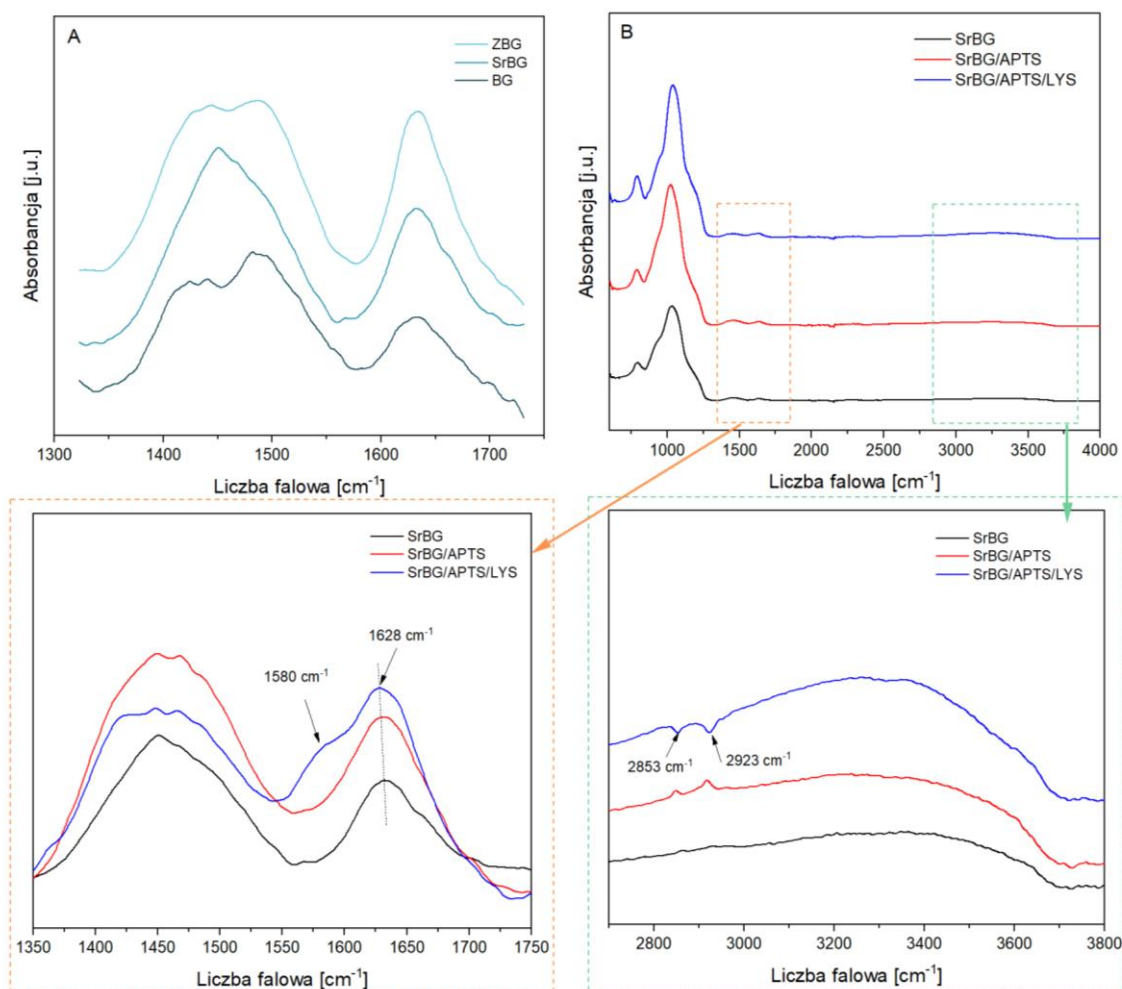
na wartość dodatnią z uwagi na aminowe grupy funkcyjne, dzięki temu cząsteczki te mogą oddziaływać w środowisku organizmu [167].

Cząstki BG dotowane jonami cynku (ZBG) czyste i modyfikowane APTS i L-lizyną (rysunek 38) wykazują na widmach spektralnych takie same pasma absorpcyjne jak cząstki BG przesunięte jedynie w granicach kilku liczb falowych. Pasma odpowiadające wiązaniom N-H, CH₂ i grup amidowych -C(O)NH pokazane na rys. 38 świadczą o przyłączeniu L-lizyny do APTS na cząstkach ZBG.



Rysunek 38. Widma FTIR dla cząstek ZBG II oraz cząstek ZBG II modyfikowanych APTS i L-lizyną.

Efekt sprzężenia L-lizyną widoczny jest również dla cząstek BG dotowanych strontem SrBG (rysunek 39 B). W tej grupie bioszkieł zaobserwowano pasma od grup CH₂ (2853 i 2923 cm⁻¹). Natomiast na drgania wiązań N-H wskazujących na APTS nakładają się dość silne pasma od grup HO-H i CO₃²⁻ w cząstkach SrBG. Na i pasmo amidowe wskazujące na przyłączenie L-lizyny przy 1628 cm⁻¹ nakłada się również pasmo od grup HO-H, jednak pasmo to dla cząstek SrBG/APTS/LYS ma największą intensywność. Ponadto, potwierdzeniem obecności L-lizyny jest pasmo przy 1580 cm⁻¹, które może wskazywać na ugrupowania N-H w II pasmie amidowym.



Rysunek 39. Zestawienie cząstek BG, ZBG i SrBG w zakresie 1300 - 1750 cm^{-1} (A). Widma FTIR-ATR dla cząstek SrBG modyfikowanych APTS i L-lizyną (B).

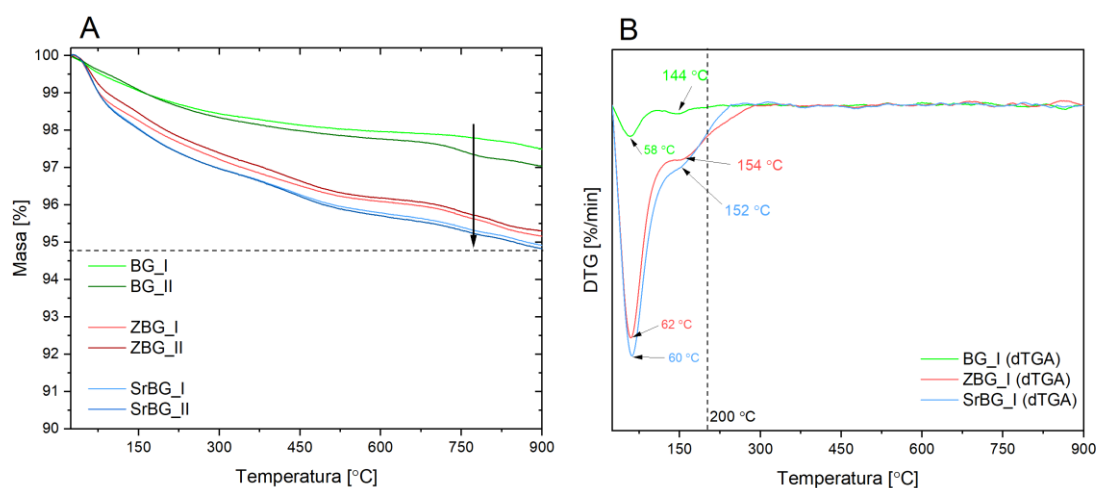
Na widmach FTIR dla cząstek ZBG i SrBG zaobserwowano większą intensywność pasma przy 1628 cm^{-1} w porównaniu do czystych cząstek BG (rysunek 39 A). Pasma to wskazuje na drgania zginające wiązań HO-O w zaadsorbowanych cząsteczkach wody. Wszystkie cząstki przed pomiarami i syntezą z APTS były suszone w tych samych warunkach tj. 24 h 80 °C w suszarce próżniowej. Okazuje się, że cząstki BG chłoną wodę z otoczenia, a cząstki ZBG i SrBG absorbują jej więcej, co potwierdzono ilościowo na podstawie analizy TGA. Na podstawie widm FTIR-ATR dla cząstek ZBG i SrBG stwierdzono brak oddziaływań dodatkowych jonów cynku i strontu w artykule Manoochehri H. i in. zsyntezowali cząstki BG dotowane Sr metodą zol-żel. Stwierdzili występowanie pasma absorpcyjnego przy 940 cm^{-1} w widmie FTIR dla BG-Sr, które nie występuje w widmie FTIR dla czystego BG [96]. W przypadku badanych bioszkieł zawartość ZnO lub SrO wprowadzana do syntezy stanowiła 5 % wag. Prawdopodobnie szerokie pasmo przy ok 900 cm^{-1} dla widm ZBG jak i SrBG nakłada się na drgania wiązań Si-O-NBO, stąd nie zaobserwowano znaczących różnic pomiędzy widmem FTIR dla BG, ZBG i SrBG. W pracy Manoochehri H. układ bioszkieła $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO-}$

SrO dodatkowo był wspomagany tlenkiem Na₂O. Stąd pasmo absorpcyjne charakteryzujące niemostkowe wiązania tlenowe mogło mieć większą intensywność, przez co można było odróżnić pasma czystego BG i BG dotowanego strontem. Dzieje się tak, ponieważ pierwiastki metali alkalicznych działają jako modyfikatory sieci, które zakłócają sieć, tworząc niemostkowe wiązania tlenowe [86–88].

Technika FTIR-ATR opisuje jakościowo strukturę cząstek BG, zatem uziarnienie cząstek BG nie ma wpływu na położenie pasm absorpcyjnych FTIR. Uziarnienie cząstek może wpływać jedynie na ilość przyłączonych molekuł (APTS i L-lizyny) i pokazano to na podstawie analizy ilościowej TGA.

Analiza ilościowa TGA

Na podstawie analizy TGA w zakresie temperaturowym od 25-900 °C określono całkowity ubytek masy próbek BG oraz ubytek masy próbek w zakresie 25-200 °C związany z odparowaniem wody zaadsorbowanej na powierzchni i wody krystalicznej. Obliczono całkowitą ilość przyłączonego APTS oraz L-lizyny do powierzchni BG biorąc pod uwagę całkowitą utratę masy BG. Wyznaczono także i pochodną DTG i temperaturę pików i pochodnej T_{DTG}. Wyniki analizy TGA zestawiono w tabeli 9, a wykresy przedstawiono na rysunku 40 A-B i 41 A-F.

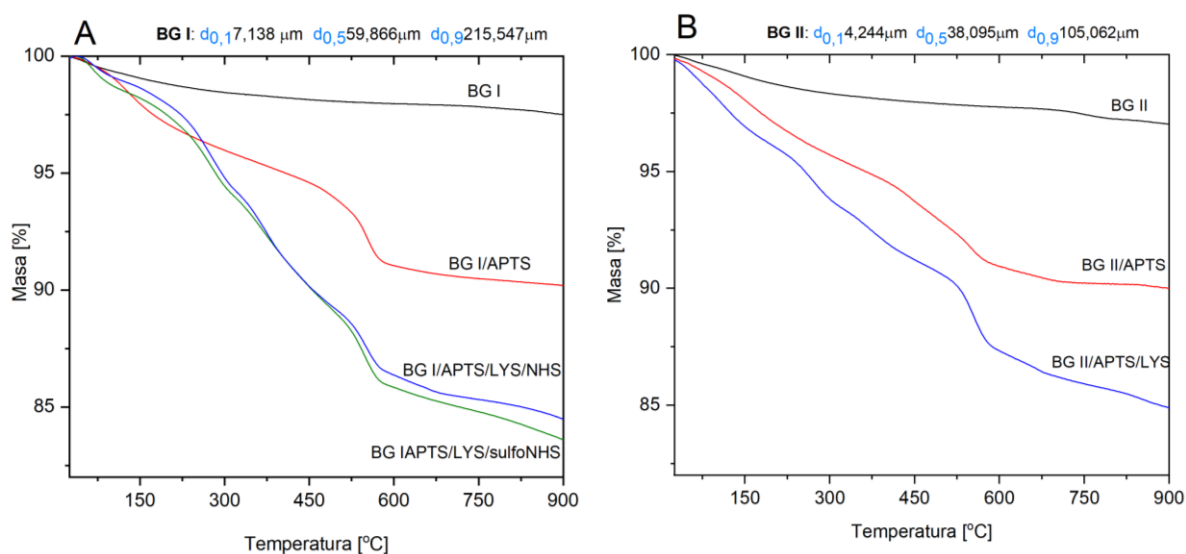


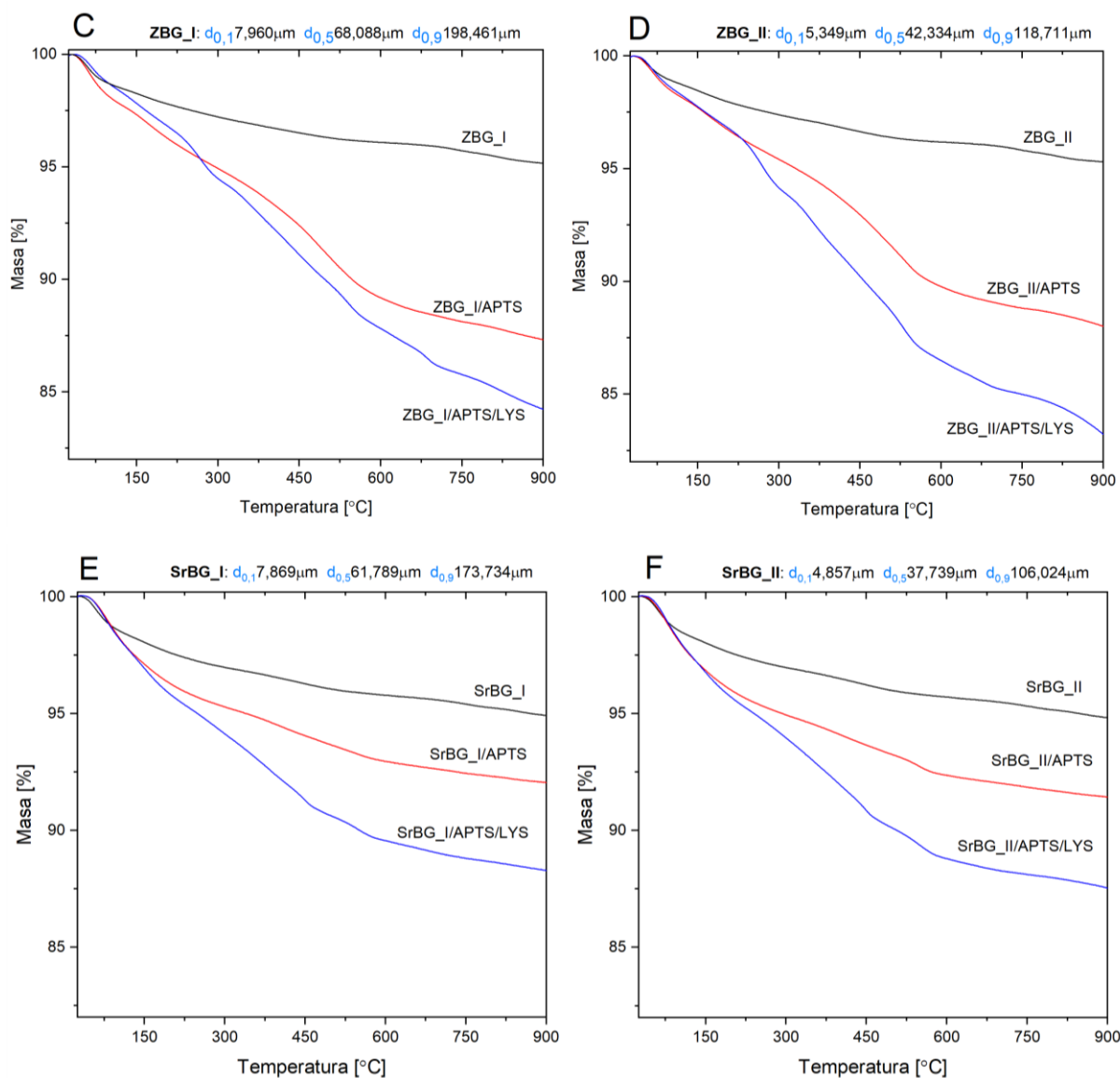
Rysunek 40. Analiza TGA i dTGA dla wyjściowych cząstek BG, ZBG i SrBG.

Cząstki BG, ZBG i SrBG charakteryzują się dwuetapową degradacją do 200 °C (rysunek 40 A, B). W pierwszym etapie z maksimum pików i pochodnej przy ok. 60 °C, odparowuje woda zaadsorbowana na powierzchni próbki i jest to największy etap ubytku masy. W temperaturze odpowiadającej maksimum kolejnego pików i pochodnej przy około 150 °C,

następuje mniejszy ubytek masy związany z odparowaniem wody krystalicznej ze struktury bioszkieł. Zdecydowanie więcej wody powierzchniowej pochłaniają cząstki ZBG i SrBG, przez co są mniej stabilne. Uziarnienie cząstek BG nie ma wpływu na wielkość ubytku masy, jednak ma wpływ na efektywność przyłączenia APTS i L-lizyny.

Krzywe TGA opisujące cząstki BG modyfikowane APTS i L-lizyną rozpoczynają się ubytkiem masy związanym z odparowaniem wody, a następnie obserwuje się wyraźny ubytek masy w wyniku rozkładu fazy organicznej APTS i L-lizyny. Termogramy TGA dla cząstek BG modyfikowanych APTS i następnie L-lizyną pokazano na rysunku 41 A-F. Wszystkie modyfikowane cząstki wykazują wieloetapową degradację termiczną, z uwagi na wieloetapowy rozkład samej fazy organicznej. Ponieważ cząstki ZBG i SrBG pochłaniają około 2 razy więcej wody z otoczenia niż cząstki BG są mniej podatne na modyfikację chemiczną czynnikami organicznymi. Po 24 h prowadzenia reakcji wszystkie cząstki przemywano buforem MES i odwirowywano powtarzając taki cykl trzykrotnie. Cząsteczki APTS i L-lizyny, które nie były związane z BG lub były luźno związane ze strukturą BG zostały odmyte. Na wykresie 41 a pokazano dodatkowo całkowity ubytek masy cząstek BG_I/APTS/LYS otrzymany w obecności EDC przy użyciu sulfoNHS i NHS, które zwiększają wydajność sprzęgania. Przebieg krzywych TGA jest taki sam, a użycie sulfoNHS powoduje, iż L-lizyny przyłącza się około 20 % więcej. Wynika to z obecnej w sulfoNHS naładowanej grupy sulfonowej, która zwiększa rozpuszczalność cząsteczki karboksylanu w roztworze wodnym o określonym pH. Pomimo to, dalsze reakcje funkcjonalizacji prowadzone były wobec NHS, który nie generuje dużych kosztów funkcjonalizacji cząstek BG (koszt sulfoNHS jest 13,5-krotnie większy niż NHS) i jest również wydajny.





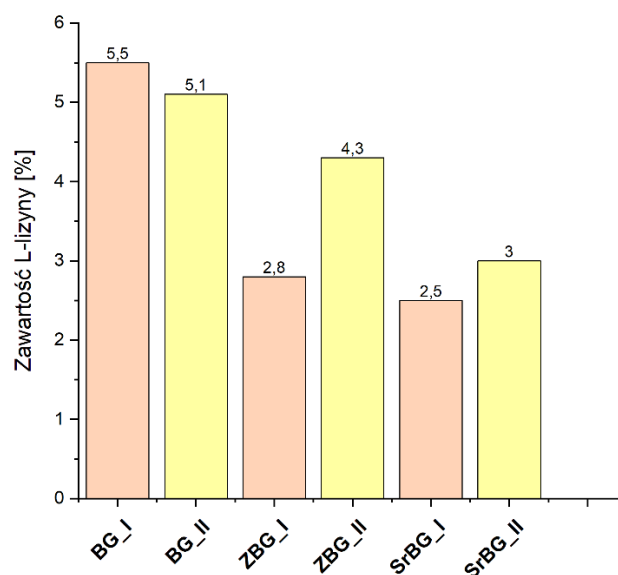
Rysunek 41. Termogramy TGA dla funkcjonalizowanych cząstek BG (A,B), ZBG (C,D) i SrBG (E,F).

Biorąc pod uwagę, że APTS i L-lizyna degradowują całkowicie w podanym zakresie temperaturowym, to pozostała masa w temperaturze 900 °C odpowiada masie BG w układach. Dlatego na podstawie tych wartości oszacowano ilość APTS i L-lizyny na powierzchni cząstek BG jako różnica całkowitego ubytku masy BG, BG/APTS i BG/APTS/LYS. Całkowita ilość L-lizyny na powierzchni BG jest równa 5,5 %, 6,7 %, 5,1%, 2,8 %, 4,3 %, 2,5 % i 3,0 % odpowiednio dla BG I, BG I_(sulfoNHS), BG II, ZBG I, ZBG II, SrBG i i SrBG II. Analizując rysunek 42, który przedstawia wykres zawartości L-lizyny na powierzchni wszystkich cząstek BG oraz ZBG i SrBG zauważono tendencję malejącą w grupach cząstek BG, ZBG i SrBG o uziarnieniu i i II. Uziarnienie czystych cząstek BG nie wpływa znacząco na efektywność sprzężenia L-lizyny. W przypadku cząstek ZBG i SrBG stwierdzono, że cząstki o mniejszym

uziarnieniu (II) są bardziej podatne na przyłączenie L-lizyny niż cząstki o większym uziarnieniu. Co więcej, na rysunku 42 podsumowano, że najwięcej L-lizyny zostało przyłączone do czystych cząstek BG a najmniej do cząstek SrBG. Jednak analizując wydajności reakcji funkcjonalizacji BG z L-lizyną (LYS/LYS₁₀₀), które są równe 83,3 %, 101,5 %, 80,9 %, 39,4 %, 62,1 %, 68,9 % i 76,9 % odpowiednio dla cząstek dla BG I, BG I_(sulfoNHS), BG II, ZBG I, ZBG II, SrBG i i SrBG II potwierdzono, iż czyste cząstki BG są najbardziej podatne na modyfikację, a cząstki ZBG najmniej przy podobnej zawartości APTS na powierzchni.

Tabela 9. Wyniki analizy TGA dla czystych i modyfikowanych cząstek BG.

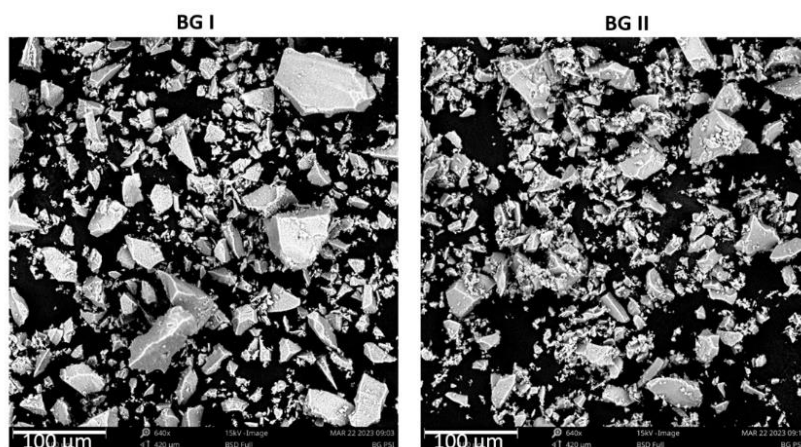
Nazwa próbki	Ubytek masy 25-200°C [%]	Ubytek masy 25-900°C [%]	APTS [%]	LYS [%]	LYS ₁₀₀ [%]
BG I	1,2	2,5	-	-	-
BG I/APTS	2,9	9,6	7,1	-	-
BG I/LYS	2,1	15,1		5,5	6,6
BG I/LYS_{sulfoNHS}	2,5	16,3		6,7	
BG II	1,2	3,0	-	-	-
BG II/APTS	2,9	9,8	6,8	-	-
BG II/LYS	3,9	14,9		5,1	6,3
ZBG I	2,2	4,8	-	-	-
ZBG I/APTS	3,6	12,5	7,7	-	-
ZBG I/LYS	3,1	15,3		2,8	7,1
ZBG II	2,0	4,7	-	-	-
ZBG II/APTS	3,2	12,2	7,5	-	-
ZBG II/LYS	3,1	16,5		4,3	6,9
SrBG I	2,4	5,1	-	-	-
SrBG I/APTS	3,8	8,9	3,8	-	-
SrBG I/LYS	4,2	11,4		2,5	3,6
SrBG II	2,4	5,2	-	-	-
SrBG II/APTS	4,0	9,3	4,1	-	-
SrBG II/LYS	4,3	12,3		3,0	3,9



Rysunek 42. Zawartość L-lizyny na poszczególnych cząstkach BG.

Skaningowy mikroskop elektronowy

Na podstawie analizy SEM potwierdzono, że cząstki BG o uziarnieniu II mają większy udział mniejszej frakcji. Cząstki BG II o rozmiarze $< 38,095 \mu\text{m}$ stanowią 50 % wszystkich cząstek, podczas gdy 50 % cząstek BG I ma rozmiar $< 59,866 \mu\text{m}$ (tabela 2). Ponadto, nie stwierdzono różnic w morfologii cząstek dotowanych cynkiem i strontem oraz cząstek BG modyfikowanych APTS i L-lizyną, tak jak w przypadku cząstek HAP modyfikowanych PEG za pośrednictwem LYS i PDA. Zaobserwowano także brak aglomeracji modyfikowanych cząstek BG.



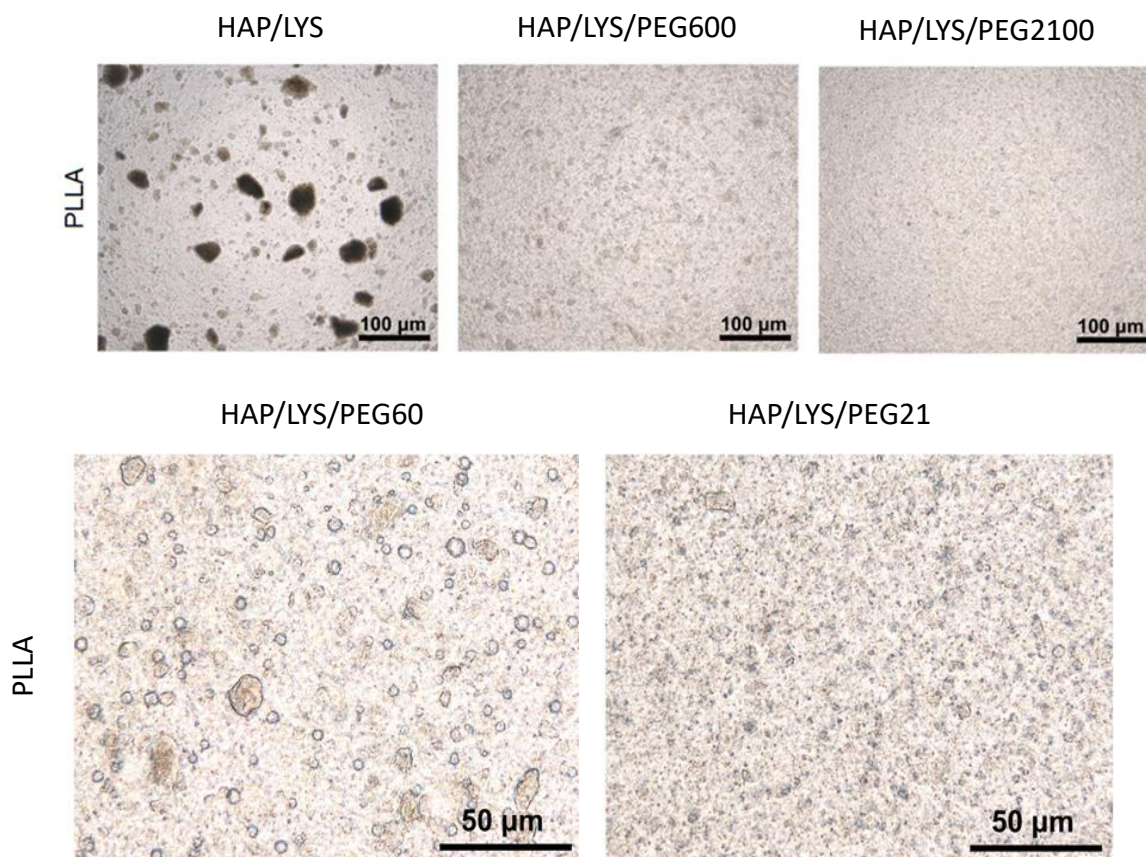
Rysunek 43. Obrazy SEM cząstek BG I i BGII.

2. CHARAKTERYSTYKA KOMPOZYTÓW PLLA Z CZĄSTKAMI CERAMICZNYMI

2.1. Kompozyty z poli(L-laktydu) i hydroksyapatytu modyfikowanego L-lizyną i poli(glikolem etylenowym)

Morfologia kompozytów

Kompozyty w postaci folii otrzymywano przez wylewanie na szalkę Petriego dyspersji PLLA/HAP w DCM stosując do wszystkich kompozytów takie same warunki mieszania i sonikacji dyspersji, wylewania i następnie suszenia. Folie kompozytowe obrazowano przy użyciu mikroskopu optycznego przy powiększeniu x300 i x1000 w świetle odbitym. Dla wszystkich próbek zastosowano takie same warunki oświetlenia. Na rysunku 44 można zobaczyć aglomeraty HAP o różnej wielkości w zależności od rodzaju modyfikacji powierzchni HAP. Jasność aglomeratów ujawniła ich grubość. Modyfikacja powierzchni cząstek HAP z L-lizyną i PEG poprawiła jednorodność rozkładu cząstek w matrycy polimerowej i spowodowała znaczne zmniejszenie wielkości rozproszonych aglomeratów. Widoczna jest zależność, że im większa masa cząsteczkowa PEG tym aglomeraty HAP są mniejsze, a kompozyty bardziej homogeniczne.

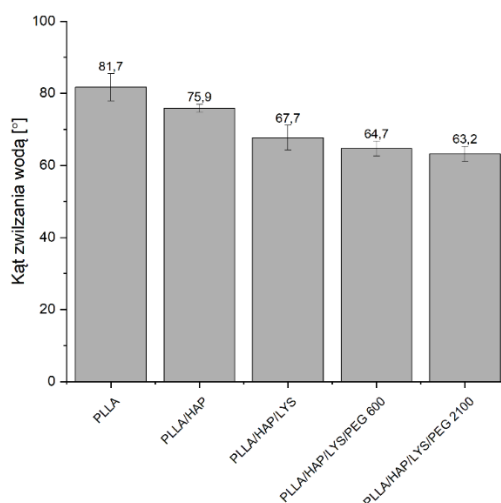


Rysunek 44. Obrazy kompozytów PLLA/HAP/LYS/PEG.

Kąt zwilżania

Zwilżalność powierzchni PLLA i kompozytów PLLA z czystym HAP i HAP modyfikowanym LYS i PEG badano mierząc statyczny kąt zwilżania osadzonej kropli wody dejonizowanej na powierzchni próbki. Wyniki pomiarów kąta zwilżania wodą matrycy PLLA i kompozytów PLLA z czystym i modyfikowanym HAP przedstawiono na rysunku 45. Wartości kąta zwilżania folii kompozytowych na bazie PLLA w obecności cząstek HAP zmniejszają się i wynoszą odpowiednio $81,7 \pm 3,7^\circ$, $75,9 \pm 1,1^\circ$, $67,7 \pm 3,4^\circ$, $64,7 \pm 2,1^\circ$, $63,2 \pm 2,1^\circ$ dla PLLA, PLLA/HAP, PLLA/HAP/LYS, PLLA/HAP/LYS/PEG600 i PLLA/HAP/LYS/PEG2100. W artykule [168] Aronov D. i in. pokazali, iż wartość kąta zwilżania dla czystego HAP wynosi $\sim 10^\circ$. Dodatek 10 % wag. czystego HAP powoduje zmniejszenie kąta zwilżania PLLA o 7,1 %. Cząstki HAP modyfikowane LYS i PEG o masie cząsteczkowej 600 i 2100 g/mol spowodowały zmniejszenie kąta zwilżania powierzchni PLLA odpowiednio o 20,8 % i 22,6 %. Wyniki te oznaczają wzrost hydrofilowości powierzchni z uwagi na obecność cząstek HAP. Wzrost ten jest bardziej zauważalny w przypadku cząstek HAP modyfikowanym L-lizyną i PEG, co jest istotne dla zastosowań kompozytów do regeneracji kości.

Kontrolowanie zwilżalności powierzchni biomateriałów jest intensywnie badane w celu zrozumienia mechanizmów integracji komórek biologicznych, immobilizacji biomolekuł, rozwoju biomateriałów do inżynierii tkankowej, dostarczania leków i genów. Adhezja makrocząstek biologicznych do powierzchni biomateriałów jest przypisywana głównie właściwościom hydrofobowym/hydrofilowym biomateriałów, a zwilżalność jest krytycznym czynnikiem immobilizacji komórek biologicznych. Powierzchnia rusztowań stosowanych w inżynierii tkanki kostnej powinna być hydrofilowa dla optymalnego wzrostu i proliferacji komórek [168,169].



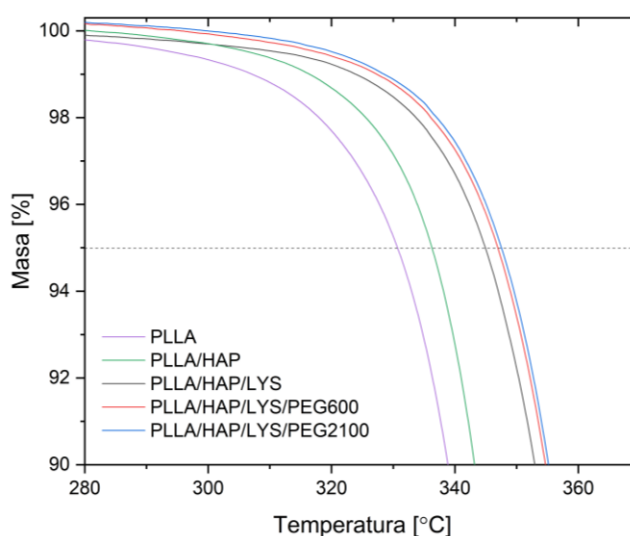
Rysunek 45. Kąt zwilżania wodą kompozytów PLLA/HAP i PLLA/HAP/LYS.

Właściwości termiczne

Na podstawie analizy TGA kompozytów (tabela 10 i rysunek 46) określono stabilność termiczną kompozytów. Kompozyty zawierały 10 % wag. napełniacza w postaci niemodyfikowanego HAP lub HAP modyfikowanego L-lizyną i PEG. PLLA oraz kompozyty PLLA/HAP charakteryzują się wysoką stabilnością termiczną. Temperatura stabilności termicznej określona na podstawie 5 % ubytku masy próbki ($T_{-5\%}$) jest równa 330,8 °C dla PLLA i 336,2 °C dla PLLA/HAP. Temperatury te są zgodne z doniesieniami literaturowymi [170]. Temperatura stabilności termicznej dla PLLA/HAP/LYS wynosi 345,0 °C, dla PLLA/HAP/LYS/PEG600 347,0 °C oraz dla PLLA/HAP/LYS/PEG2100 347,6 °C. Zarówno L-lizyna i PEG poprawiają stabilność termiczną kompozytów, dlatego mogą być stosowane w wysokotemperaturowym przetwórstwie. Na podstawie analizy TGA dla kompozytów potwierdzono, że stabilność termiczna L-lizyny związanej z HAP jest większa w porównaniu do L-lizyny wolnej (rozd. IV, 1.1)

Tabela 10. Analiza TGA kompozytów PLLA, PLLA/HAP i PLLA/HAP/LYS/PEG.

Nazwa próbki	$T_{-5\%}$ [°C]
PLLA	330,8
PLLA/HAP	336,2
PLLA/HAP/LYS	345,0
PLLA/HAP/LYS/PEG600	347,0
PLLA/HAP/LYS/PEG2100	347,6

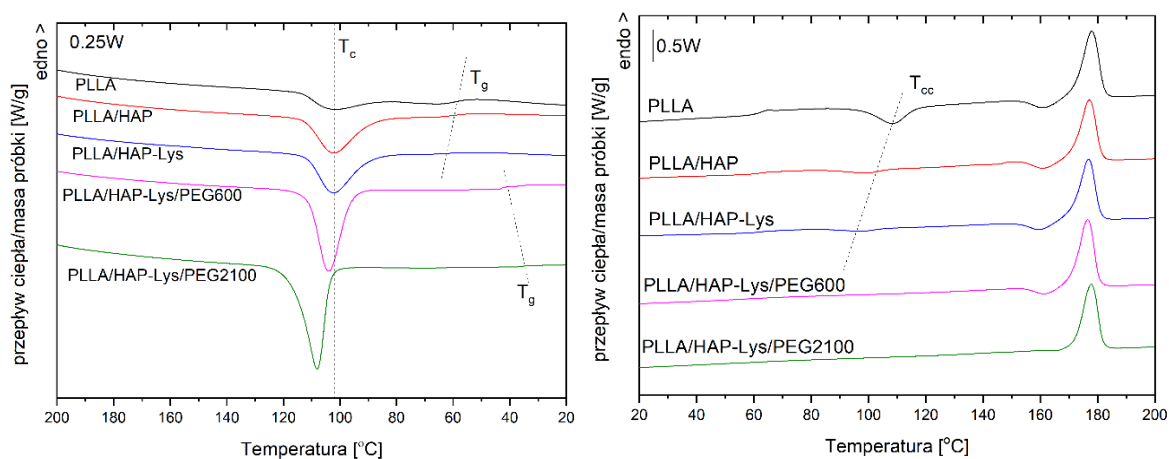


Rysunek 46. Analiza stabilności termicznej kompozytów PLLA, PLLA/HAP i PLLA/HAP/LYS/PEG.

W celu zbadania wpływu modyfikacji powierzchni HAP L-lizyną i PEG na właściwości termiczne kompozytów na bazie PLLA przeprowadzono eksperymenty DSC. Pierwszy skan ogrzewania do 200 °C zastosowano w celu usunięcia poprzedniej historii termicznej próbki. Krzywe DSC skanu chłodzenia i II ogrzewania dla serii kompozytów PLLA pokazano na rysunku 47, a wartości termiczne DSC przedstawiono w tabeli 11.

Tabela 11. Wartości termiczne ze skanu chłodzenia DSC dla kompozytów PLLA i modyfikowanego HAP [12].

Próbka	T_c^{onset} [°C]	T_c [°C]	ΔH_c [J/g]	T_g [°C]
PLLA	114,0	102,5	11,9	59,7
PLLA/HAP	112,8	102,2	23,8	58,6
PLLA/HAP/LYS	112,0	102,2	24,0	61,5
PLLA/HAP/LYS/PEG600	111,2	104,0	32,1	43,7
PLLA/HAP/LYS/PEG2100	116,5	108,2	37,9	35,2



Rysunek 47. Skany DSC z chłodzenia i II ogrzewania dla kompozytów PLLA i modyfikowanego HAP [12].

Podczas chłodzenia ze stopu PLLA uległ krystalizacji z początkiem w temperaturze T_c^{onset} przy 114,0 °C. Entalpia krystalizacji ze stopu (ΔH_c) miała najniższe wartości dla czystego polimeru PLLA (11,9 J/g). Entalpia krystalizacji ze stopu PLLA w obecności cząstek HAP i HAP/LYS wzrastała, jednakże krystalizacja rozpoczynała się wcześniej i T_c^{onset} wynosiła odpowiednio o 1,3 °C i 2,1 °C mniej. W kompozytach PLLA z HAP modyfikowanym PEG600 i PEG2100 wzrost ΔH_c był znacznie wyraźniejszy. ΔH_c wynosiła odpowiednio 1,35 i 1,6 razy więcej niż ΔH_c czystego PLLA. W przypadku HAP zmodyfikowanego PEG2100 początek krystalizacji w stanie stopionym przesunął się o około 1,5 °C w kierunku wyższych temperatur, przy węższym zakresie temperatur krystalizacji w stanie stopionym. Wyniki te wskazują na

aktywność zarodkowania HAP modyfikowanego PEG, z wyższą wydajnością zarodkowania krystalizacji ze stopu wykazywaną przez HAP modyfikowany PEG2100. Temperatura zeszklenia (T_g) podczas chłodzenia czystego PLLA, określona jako punkt przegięcia obniżenia pojemności cieplnej, wynosiła 59,7 °C. Kompozyty PLLA z HAP modyfikowanym PEG600 i PEG2100 wykazują zdecydowanie niższe wartości T_g w porównaniu do PLLA odpowiednio o 16 °C i 24,5 °C. Obniżenie T_g kompozytów oraz wzrost temperatury krystalizacji ze stopu wskazują na efekt plastyfikujący PEG. Aby ocenić skuteczność plastyfikacji PEG2100 i PEG600, rozważono kilka czynników.

(1) Skuteczność plastyfikacji zależy od masy cząsteczkowej PEG, wykazując wzmocnione działanie przy PEG o niższej masie cząsteczkowej [171]. Większy efekt plastyfikacji PEG2100 w porównaniu z PEG600, zinterpretowany przez niższą wartość T_g i wyższe temperatury T_c i T_c^{onset} , może być związany z większą masą polimeru użytą podczas modyfikacji HAP z uwagi na zastosowane jednakowe stosunki molowe dla PEG 600 i 2100, co potwierdziła także analiza TGA.

(2) T_g semikrystalicznego PLLA zależy również od morfologii układu polimerowego i ruchliwości segmentów. Faza amorficzna PLLA opisywana jest jako model dwufazowy, który składa się z niekrystalicznej fazy amorficznej (ruchomej frakcji amorficznej) i krystaliczno-amorficznych obszarów międzyfazowych z niewielką ruchliwością segmentową. Niższą wartość T_g wykazuje PLLA o niższym stopniu krystaliczności ze względu na niższą zawartość sztywnej frakcji amorficznej. Większe ilości sztywnej frakcji amorficznej skutkują wyższą wartością T_g [172].

(3) Zastosowane PEG zakończone grupą karboksylową mają różną budowę chemiczną. Jak podano w tabeli 1, PEG2100 to bursztynian glikolu monoetoksy-polietylenowy, podczas gdy PEG 600 to glikol O-(2-karboksyloetylo)-O'-metylo-undekanoetylenowy. Struktura tych cząsteczek może również wpływać na efekt plastyfikacji PEG. PEG2100 jest zakończony kwasem karboksylowym, ale w strukturze ma jeszcze jedną grupę karboksylową sprzężoną bezpośrednio z n powtórzonym monomerem. W literaturze opisano wpływ różnych grup końcowych PEG na plastyfikację PLLA. Lai i in. [173] zbadali wpływ grup końcowych OH i CH₃ PEG na mieszalność i krystalizację PLLA/PEG. Wpływ PEG zakończonego dwoma grupami końcowymi OH w porównaniu z dwoma końcowymi grupami CH₃ w PEG o masie cząsteczkowej 2100 g/mol odnotowano dla stężenia PEG 70 % wag w układzie. Zmniejszenie równowagowej T_m było większe dla PEG zakończonego grupami CH₃ niż grupami OH. PEG zakończony dwiema grupami hydroksylowymi i PEG z jedną grupą hydroksylową, a drugą metylową zbadali Kulinski i Piórkowska [171]. Nie stwierdzili wyraźnego wpływu końcowej

grupy plastyfikatora PEG na właściwości termiczne plastyfikowanego PLLA dla zawartości PEG 5 i 10 % wag. Wszystkie zastosowane plastyfikatory obniżyły T_g i zwiększyły zdolność PLLA do zimnej krystalizacji.

Właściwości termiczne z II skanu ogrzewania DSC przedstawiono w tabeli 12. Podczas drugiego ogrzewania w temperaturach powyżej T_g egzotermiczny pik zimnej krystalizacji jest widoczny dla PLLA, kompozytów PLLA z czystym HAP i HAP modyfikowanym L-lizyną. Entalpia zimnej krystalizacji (ΔH_{cc}) jest niższa dla PLLA z cząstkami HAP niż dla czystego PLLA, ponieważ faza krystaliczna częściowo tworzyła się podczas chłodzenia w obecności cząstek HAP. Obniżenie początku zimnej krystalizacji (T_{cc}^{onset}) i temperatury pikowej zimnej krystalizacji (T_{cc}) wskazywało na ułatwioną krystalizację PLLA w obecności cząstek HAP.

Tabela 12. Wartości z II skanu ogrzewania DSC dla kompozytów PLLA i modyfikowanych cząstek HAP [12].

Nazwa próbki	T_g [°C]	T_{cc}^{onset} [°C]	T_{cc} [°C]	ΔH_{cc} [J/g]	$T_{\alpha'-\alpha}$ [°C]	$\Delta H_{\alpha'-\alpha}$ [J/g]	T_m [°C]	ΔH_m [J/g]
PLLA	62,6	97,2	108,9	25,7	160,9	6,4	177,9	46,4
PLLA/HAP	61,4	84,9	99,1	8,7	160,5	6,1	170,8	42,7
PLLA/HAP/LYS	63,1	84,3	97,8	6,7	159,5	5,7	170,6	41,8
PLLA/HAP/LYS/PEG600	57,0	76,5	115,8	2,0	161,5	4,0	170,9	43,3
PLLA/HAP/LYS/PEG2100	46,0	-	-	-	-	-	172,0	41,2

Brak efektu zimnej krystalizacji w kompozytach PLLA z HAP/LYS/PEG600 oraz HAP/LYS/PEG2100 wskazywał, że PLLA wykrył w trakcie chłodzenia ze względu na wysoką wydajność zarodkowania zmodyfikowanych cząstek HAP. Różnica między HAP modyfikowanym PEG600 i PEG2100 dotyczy występowania przejścia fazowego α' - α , widocznego przed głównym pikiem topnienia. Jest to niewielki efekt egzotermiczny dla PLLA, PLLA/HAP, PLLA/HAP/LYS i PLLA/HAP/LYS/PEG600. Pik ten wskazuje na przejście fazowe krystalicznej fazy α' do termodynamicznie stabilnej formy α [174]. Brak efektu egzotermicznego przejścia fazowego α' - α dla PLLA/HAP/LYS/PEG2100 wskazuje, że PLLA krystalizował podczas chłodzenia wyłącznie w postaci α . Cząstki HAP modyfikowane PEG2100 zarodkują krystalizację fazy α w porównaniu z PEG600. T_g dla PLLA z drugiego skanu ogrzewania wynosiła 62,5 °C. W kompozytach PLLA/HAP/LYS/PEG600 i PLLA/HAP/LYS/PEG2100 T_g została obniżona odpowiednio do 57 °C i 46 °C. Wyniki te potwierdzają taką samą tendencję w skanie chłodzenia. Temperatury topnienia (T_m) kompozytów zawierających modyfikowany powierzchniowo HAP były również niższe od T_m

PLLA (177,9 °C) odpowiednio o 7 °C i 5,9 °C dla PLLA/HAP/LYSPEG600 i PLLA/HAP/LYS/PEG2100. Obniżone wartości T_g wraz ze wzrostem krystaliczności w kompozytach zawierających HAP modyfikowany L-lizyną i PEG600/PEG2100 potwierdziły znaczący efekt plastyfikujący osiągnięty przy niskiej zawartości PEG w wyniku modyfikacji powierzchni HAP. Saeidlou i in. [175] stwierdzili, że dodatek PEG do PLLA obniża wartość T_g o około 2 °C na 1 % wag. plastyfikatora. W tej pracy, zawartość PEG w modyfikowanych cząstkach HAP wynosi poniżej 5 % wag., a ilość napełniacza w kompozytach jest równa 10 % wag. Dlatego warto zaznaczyć, że niewielka ilość PEG w całej objętości kompozytu skutecznie obniża wartość T_g PLLA.

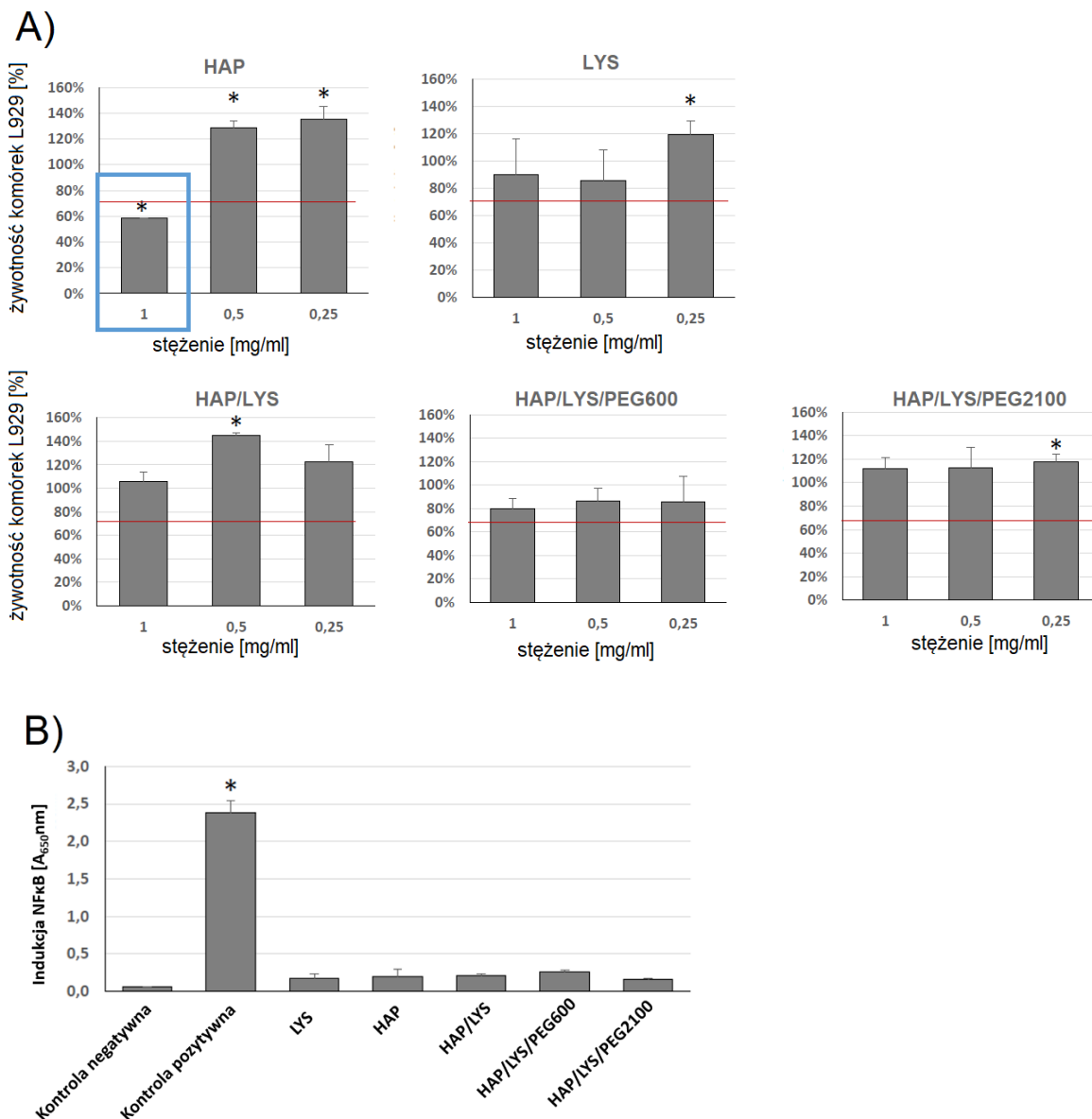
Właściwości biologiczne

PLLA oraz HAP są silnymi kandydatami do zastosowań biomedycznych. Ze względu na cytokompatybilność, biodegradowalność PLLA, nietoksyczność i właściwości mechaniczne zarówno PLLA jak i kompozyty PLLA/HAP są szeroko stosowane do wytwarzania rusztowań inżynierii tkankowej, co zostało opisane we wstępie teoretycznym dotyczącym aktualnego stanu wiedzy. Z uwagi na biologiczne zastosowanie prezentowanych materiałów, pracę wzbogacono o podstawowe, przesiewowe badania *in vitro*.

Biomateriały do zastosowań medycznych przeznaczone do implantacji lub długotrwałego kontaktu z tkanką muszą spełniać określone kryteria cytokompatybilności *in vitro* (ISO 10993-5:2009). Biorąc pod uwagę kompozyty wieloskładnikowe, na wczesnych etapach badań warto określić cytotoksyczność osobnych składników kompozytu. W tym przypadku wykonano test cytotoksyczności oraz test prozapalny dla czystej matrycy PLLA oraz napełniaczy w postaci cząstek HAP i cząstek HAP modyfikowanych L-lizyną i PEG.

W pierwszej kolejności dla cząstek napełniaczy (HAP, HAP/LYS, HAP/LYS/PEG600 i HAP/LYS/PEG2100) określono cytokompatybilność wobec standardowej linii mysich fibroblastów L929 oraz aktywność prozapalną ocenianą wobec linii monocytarnej THP1-Blue™ w oparciu o aktywację czynnika jądrowego NF- κ B (rysunek 48 A-B). Wyniki testu redukcji bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylo-tetrazoliowego (MTT), który określa funkcję metaboliczną komórek poprzez pomiar aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej, wykazały, że wszystkie cząstki HAP nie są cytotoksyczne w stężeniach 0,25-0,5 mg/ml. Stężenie 1 mg/ml czystych cząstek HAP powoduje przeżywalność komórek L929 na poziomie 60 %, co nie jest zgodne z normą ISO. Biomateriały według normy ISO 10993-5:2009 są uznane za cytotoksyczne, gdy żywotność komórek mających kontakt

z biomateriałem przez 24 h wynosi poniżej 70 %. Warto zauważyć, że modyfikacja cząstek HAP, zarówno L-lizyną jak i PEG powoduje wzrost przeżywalności mysich fibroblastów przy stężeniu cząstek 1 mg/ml. Najlepsze rezultaty w pełnym zakresie stężeń uzyskano dla cząstek HAP/LYS/PEG2100, dla których żywotność mysich fibroblastów jest większa w porównaniu do kontroli.



Rysunek 48. Żywotność mysich fibroblastów L929 w kontakcie 24 h z cząstkami HAP, HAP/LYS, HAP/LYS/PEG i LYS (A). Immunozgodność ludzkich monocytów THP1-Blue™ w szlaku NF-κB dla L-lizyny i cząstek HAP (B). * $p < 0,05$ liczone względem hodowli kontrolnej (100% żywotności).

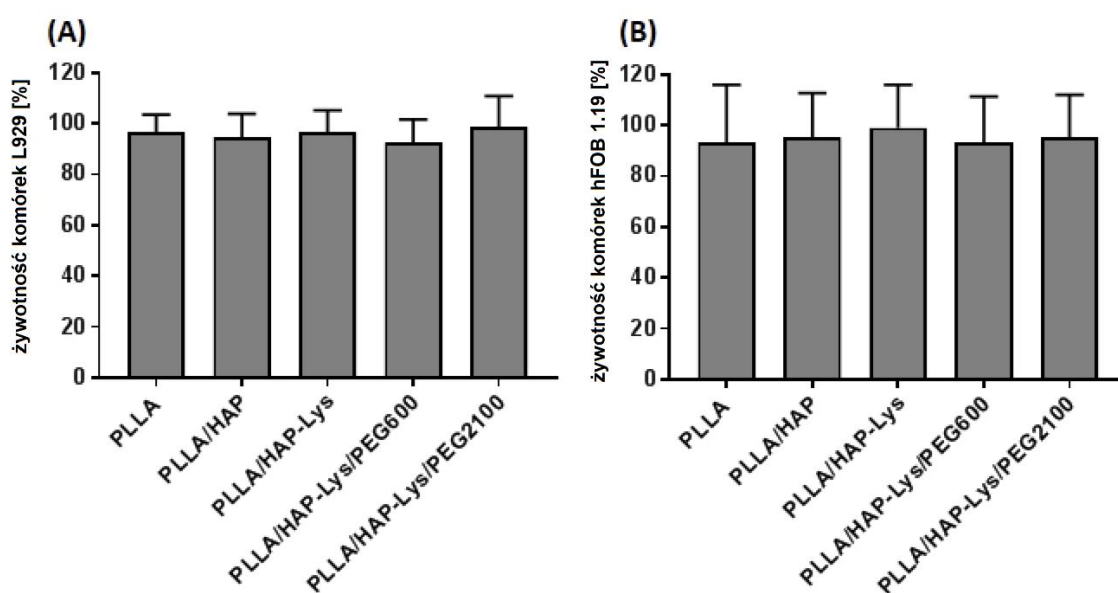
Monocyty należą do najbardziej wrażliwych komórek, które po aktywacji szybko indukują kaskadę zapalną. Kontrolowany stan zapalny prowadzi do rewaskularyzacji i regeneracji tkanek w miejscach urazu. Jednak zbyt silna aktywacja monocytów przez

składniki biomateriału lub zanieczyszczenia, takie jak endotoksyny, wywołuje ostry stan zapalny, którego skutkiem jest tworzenie się ropy, degradacja tkanek i rozpad barier komórkowych [176]. Biorąc pod uwagę rolę monocytów w procesie regeneracji kości, wykorzystano w pracy ludzkie monocyty THP1-Blue™ jako czuły wskaźnik zdolności biomateriałów do indukowania prozapalnej aktywacji tych komórek. Komórki THP1-Blue™, podobnie jak inne monocyty, reagują na ligandy, takie jak peptydy, endotoksyny i glikokoniugaty, poprzez receptory toll-podobne (TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6 i TLR-8). Po stymulacji TLR aktywowany jest szlak NF-κB; następnie enzym reporterowy jest wydzielany do środowiska hodowli komórkowej. W przeciwieństwie do badań opartych na monocytach krwi obwodowej, protokół ten nie wymaga zgody komisji etycznej, nie zależy od zmienności genetycznej dawców, jest powtarzalny i ilościowy. Wyniki uzyskane w teście zgodności immunologicznej *in vitro* przy użyciu komórek THP1-Blue™ wykazały, że cząstki HAP, HAP/LYS i HAP/LYS/PEG nie stymulują ludzkich monocytów, a tym samym nie wykazują reakcji zapalnych i mogą być użyte jako składniki biokompozytów. Uzyskane wartości stężeń wydzielanej embrionalnej fosfatazy alkalicznej (SEAP) utrzymywały się na poziomie hodowli niestymulowanych ($0,158 \pm 0,06$). Zatem produkcja SEAP przez monocyty w odpowiedzi na HAP, HAP/LYS, HAP/LYS/PEG600 i HAP/LYS/PEG600 wyniosła odpowiednio $0,253 \pm 0,09$, $0,264 \pm 0,03$, $0,326 \pm 0,04$, $0,204 \pm 0,02$. Dla porównania, za pozytywną kontrolę przyjęto LPS (lipopolisacharyd *Escherichia coli* 100 ng/ml), który silnie aktywuje monocyty THP1-Blue™ i jest dobrze znanym bodźcem bakteryjnym. Stężenie SEAP dla LPS wynosiło $2,485 \pm 0,300$.

W związku z powyższym potwierdzeniem, iż modyfikowane cząstki HAP są cytokompatybilne i nie wykazują reakcji prozapalnych wykonano kolejne badania biologiczne dla kompozytów z matrycą PLLA. Warto zauważyć, że do wytwarzania kompozytów wykorzystano metodę rozpuszczalnikową. Jednym z najlepszych rozpuszczalników PLLA jest DCM, który znajduje się w 2 klasie klasyfikacji rozpuszczalników. Klasa 2 to rozpuszczalniki, które powinny być ograniczone, jednak odpowiednie warunki suszenia kompozytów umożliwiają całkowitą eliminację DCM.

W badaniach biologicznych dla kompozytów, oprócz standardowej linii mysich fibroblastów L929, które są zalecane przez normy ISO, wykorzystano linię ludzkich osteoblastów hFOB 1.19, które naśladują środowisko przeznaczone do regeneracji kości. Wyniki pokazują, że żywotność komórek docelowych eksponowanych na czystym polimerze PLLA i kompozytach PLLA z niemodyfikowanym i modyfikowanym HAP pozostaje na tym samym poziomie, co nietraktowane kontrole. Wyniki testu MTT wykazały, że kompozyty

PLLA z HAP nie wykazywały cytotoksyczności po bezpośrednim kontakcie z komórkami. Jak pokazano na rysunku 49 A i B, żywotność mysich fibroblastów eksponowanych na PLLA, PLLA/HAP, PLLA/HAP/LYS, PLLA/HAP/LYS/PEG600 i PLLA/HAP/LYS/PEG2100 wynosiła $96,6\% \pm 6,8\%$, $94,6\% \pm 9,1\%$, $96,6\% \pm 8,4\%$, $92,4\% \pm 9,2\%$ i $98,6\% \pm 12,2\%$. Podobny efekt zaobserwowano, gdy osteoblasty hFOB 1.19 były eksponowane na kompozytach z matrycą PLLA (rysunek 49 B). W przypadku osteoblastów żywotność tych komórek wynosiła dokładnie $93,4\% \pm 22,5\%$, $95,2\% \pm 17,5\%$, $98,9\% \pm 17,0\%$, $93,2\% \pm 18,0\%$ i $95,1\% \pm 16,9\%$ odpowiednio dla PLLA, PLLA/HAP, PLLA/HAP/LYS, PLLA/HAP/LYS/PEG600 i PLLA/HAP/LYS/PEG2100.

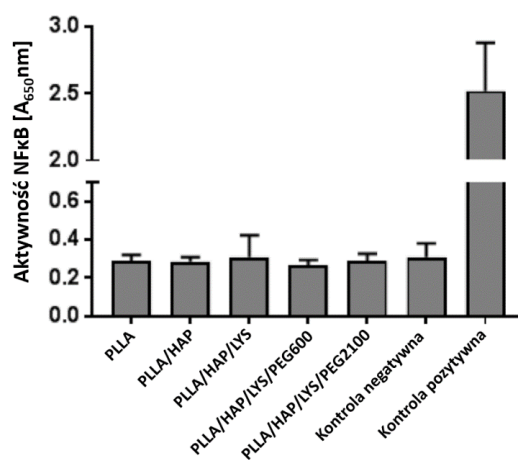


Rysunek 49. Żywotność komórek L929 (A) i hFOB 1.19 (B) na kompozytach PLLA z modyfikowanym powierzchniowo HAP.

Otrzymane kompozyty spełniły kryterium normy ISO zachowania żywotności co najmniej 70 % komórek poddanych kontaktowi z biomateriałem przez 24 h (ISO 10993-5:2009). Analiza statystyczna wykazała, że HAP modyfikowany L-lizyną i PEG w kompozytach z matrycą PLLA nie wpływa na żywotność komórek docelowych w porównaniu z fizjologiczną żywotnością kontrolnych hodowli komórkowych. Wyniki te są zgodne z obserwacjami innych autorów. Funkcjonalizowanie powierzchni za pomocą niektórych peptydów może wspomagać osteointegrację implantów ortopedycznych. Udowodniono wpływ L-lizyny na przyczepianie się i żywotność komórek w środowisku biomateriałów medycznych. Ostatnio Castillo-Cruz i in. opracowali hydrożel na bazie L-lizyny, który zwiększa adhezję komórek dzięki pozostałościom L-lizyny. Zaobserwowano, że przyczepianie się komórek do hydrożelu

modyfikowanego L-lizyną było pięciokrotnie skuteczniejsze w porównaniu z powłoką poli(L-lizyny). Interakcja między biomateriałem a komórkami może zachodzić poprzez oddziaływanie elektrostatyczne między dodatnim ładunkiem z $-NH_3^+$ i ujemnie naładowanymi substancjami na powierzchni komórki, takimi jak glikozoaminoglikany [177,178]. Opisano również synergistyczną rolę L-lizyny i HAP w procesach gojenia się osteoblastów [127]. Przedstawione tutaj wyniki, jak również odkrycia innych grup sugerują, że PLLA z HAP modyfikowanym L-lizyną wspierają cytokompatybilność kompozytów.

Wyniki uzyskane w teście zgodności immunologicznej *in vitro* przy użyciu komórek THP1-Blue™ wykazały, że kompozyty na bazie PLLA nie stymulują ludzkich monocytów (rys. 45). Uzyskane wartości stężeń SEAP utrzymywały się na poziomie hodowli niestymulowanych ($0,308 \pm 0,07$). Zatem produkcja SEAP przez monocyty w odpowiedzi na biomateriały PLLA, PLLA/HAP, PLLA/HAP/LYS, PLLA/HAP/LYS/PEG600 i PLLA/HAP/LYS/PEG2100 wyniosła odpowiednio $0,286 \pm 0,03$, $0,284 \pm 0,02$, $0,308 \pm 0,115$, $0,266 \pm 0,02$ i $0,287 \pm 0,03$. Pozytywna kontrola (LPS) wykazała silną aktywację monocytów THP1-Blue™ $2,52 \pm 0,360$.



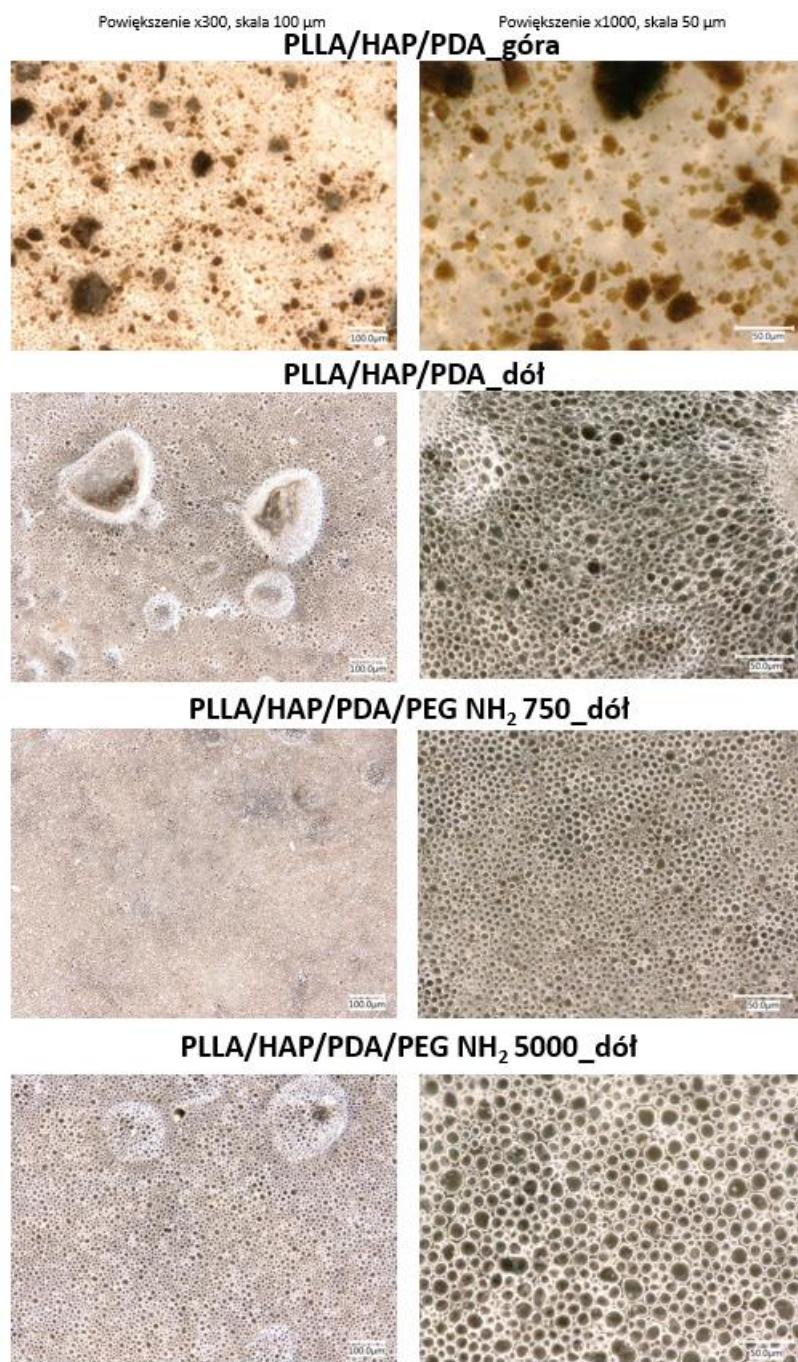
Rysunek 50. Immunozgodność ludzkich monocytów THP1-Blue™ w szlaku NF-κB dla kompozytów PLLA i modyfikowanych cząstek HAP.

Ponieważ związki biologicznie czynne, takie jak peptydy, mogą prowadzić do patologicznej aktywacji monocytów, odkrycia dotyczące braku właściwości immunostymulujących kompozytów PLLA zawierających HAP i L-lizynę przemawiają za ich bezpieczeństwem biologicznym.

2.2. Kompozyty z poli(L-laktydu) i hydroksyapatytu modyfikowanego polidopaminą i poli(glikolem etylenowym)

Morfologia kompozytów

Kompozyty PLLA/HAP/PDA/PEG w postaci folii otrzymywano w ten sam sposób jak kompozyty PLLA/HAP/LYS/PEG. Folie PLLA z napelniczem w postaci HAP modyfikowanego PDA obrazowano przy użyciu mikroskopu optycznego przy powiększeniu x300 i x1000 w świetle przechodzącym, z uwzględnieniem strony filmu kompozytowego (górną/dół). Jak zaobserwowano na rysunku 51, cząstki HAP oraz HAP/PD w matrycy PLLA mają nieregularny rozkład i nie zauważono widocznych aglomeratów cząstek ceramicznych. PDA wyraźnie poprawia interakcję międzyfazową między HAP i PLLA. Obserwacje mikroskopowe wykazały, że folie po wylaniu z rozpuszczalnika i wysuszeniu mają dwie różne powierzchnie. Górna strona kompozytów jest chropowata, co może ułatwiać osadzaniu się komórek kościotwórczych. Dolna strona kompozytów, z uwagi na metodę wytwarzania jest gładka (poprzez kontakt z szalką Petriego). Obrazy dolnej części kompozytów charakteryzują się zupełnie inną morfologią niż górna powierzchnia i wskazują na duże siły międzycząsteczkowe pomiędzy PDA i matrycą PLLA (separacja faz PLLA i PDA). Taki sam efekt zaobserwowano dla kompozytów z cząstkami HAP/PDA/PEG przy czym dodatek PEG o mniejszej masie cząsteczkowej wpłynął na zmniejszenie rozmiaru wysp wskazujących na separację faz pomiędzy polimerami. Li Gang i in. [179] analizowali kompozyty PLA z cząstkami nanoHAP pokrytymi PDA. Na podstawie analizy SEM stwierdzili, że dyspersja HAP w kompozytach PLA poprawia się wraz ze wzrostem ilości PDA. Zaproponowali wniosek, że obecność PDA poprawia interakcję międzyfazową między nanoHAP i PLA. Po pierwsze, aglomeracja nanoHAP podczas procesu mieszania jest osłabiana przez obecność PDA. Po drugie, siły międzycząsteczkowe istniejące między zmodyfikowanym nanoHAP i PLA są większe. Dlatego proces polimeryzacji dopaminy *in situ* można wykorzystać do poprawy dyspergowalności cząstek nieorganicznych w matrycach polimerowych.

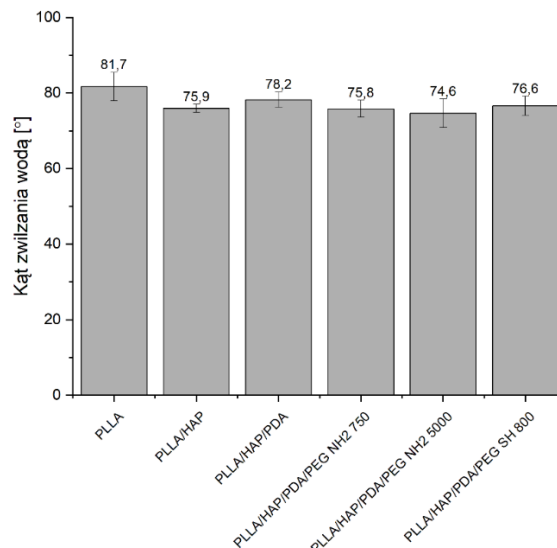


Rysunek 51. Obrazy z mikroskopu optycznego dla kompozytów PLLA/HAP/PDA i PLLA/HAP/PDA/PEG w świetle przechodzącym, z uwzględnieniem strony filmu kompozytowego (góra/dół).

Kąt zwilżania

Biorąc pod uwagę, że PDA może sprzyjać w łączeniu biomolekuł, oczekiwano, że może również zmienić hydrofilowość powierzchni folii kompozytowych. Wyniki pomiarów kąta zwilżania wodą folii PLLA i kompozytów PLLA z HAP i HAP modyfikowanym PDA i PEG przedstawiono na rysunku 52. Wartości kąta zwilżania folii kompozytowych PLLA/HAP, PLLA/HAP/PDA i PLLA/HAP/PDA/PEG są bardzo zbliżone i wynoszą odpowiednio $75,9^\circ \pm$

1,1°, 78,2° ± 2,0°, 75,8° ± 2,3°, 74,6° ± 3,8°, 76,6° ± 2,5° oraz są mniejsze o około 7 % w stosunku do kąta zwilżania PLLA. W związku z tym nie stwierdzono wpływu modyfikacji cząstek HAP PDA i PEG na wzrost hydrofilowości powierzchni kompozytów. Jednak w literaturze kilka grup naukowców zaobserwowało zależności zgodne z założeniem początkowym, to znaczy zmniejszenie kąta zwilżania dla warstw PDA. W pracy Deng i in. [147] zbadali, że kąt zwilżania wodą na podłożach pokrytych PDA był niższy niż kąt zwilżania standardowych płytek do hodowli tkankowych na bazie polistyrenu, na których osadzali PDA. Autorzy prowadzili polimeryzację *in situ* dopaminy o stężeniu 0,5 mg/ml i 0,1 mg/ml. Zauważyli, że większa warstwa PDA związana jest z większym stężeniem dopaminy i wykazuje mniejszy kąt zwilżania powierzchni na których została osadzona. Yu Y. i współautorzy [146] pokrywali dyski tytanowe warstwą PDA i HAP/PDA (przy zastosowaniu stężenia dopaminy 2 mg/ml). Pokazali, że warstwy PDA i HAP/PDA poprawiają zwilżalność powierzchni tytanu i stwierdzili, że obecność grup katecholowych w PDA i grup hydroksylowych HAP powoduje, że powłoka jest hydrofilowa, co jest korzystne dla gojenia się tkanek i wczesnej osteointegracji. Podkreślili, że kąt zwilżania wodą wszystkich badanych powierzchni mieści się w przedziale 40°-80°, co uznaje się za odpowiednie dla adhezji komórek.



Rysunek 52. Pomiar kąta zwilżania kompozytów PLLA/HAP/PDA/PEG.

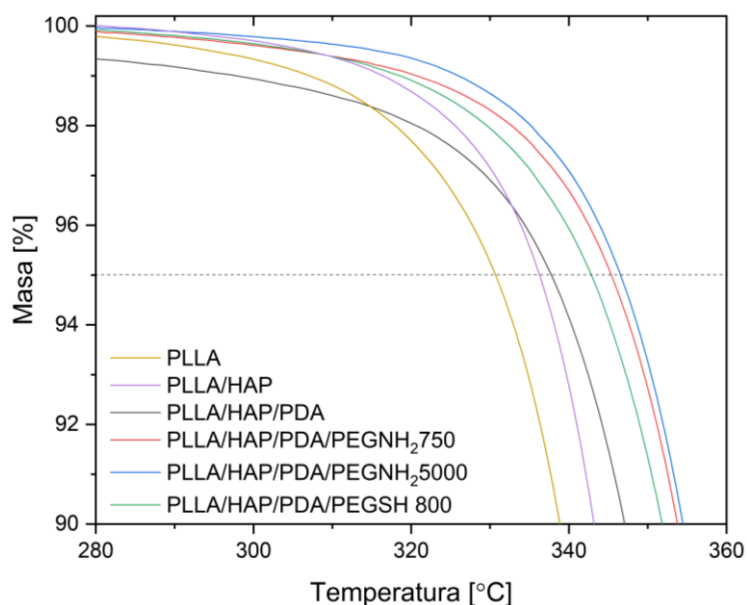
Właściwości termiczne

Analizując stabilność termiczną kompozytów PLLA/HAP/PDA/PEG (tabela 13, rys. 53) określoną na podstawie 5 % ubytku masy próbki stwierdzono, że obecność zaadsorbowanej

PDA na cząstkach HAP poprawia stabilność PLLA o 7 °C i kompozytów PLLA/HAP o 1,6 °C. Cząstki HAP modyfikowane PDA i PEG NH₂ 750, 5000, PEG SH 800 poprawiają stabilność termiczną PLLA/HAP odpowiednio o 9,1 °C, 10,5 °C i 5,0 °C i jednocześnie zwiększają stabilność termiczną matrycy PLLA. Zauważono, że oprócz PDA, także PEG wpływa na poprawę stabilności termicznej kompozytów PLLA, co potwierdzono również w przypadku kompozytów z cząstkami HAP modyfikowanymi L-lizyną i PEG. Tawiah i in. [180] otrzymywali folie PLA z nanocząstkami PDA jako „zielone”, przyjazne dla środowiska materiały zmniejszające palność. Na podstawie analizy TGA pokazali zwiększenie wartości T_{5%} przy rosnącej zawartości PDA w porównaniu do czystego PLA.

Tabela 13. Analiza TGA kompozytów PLLA/HAP/PDA/PEG.

Nazwa próbki	T _{5%} [°C]
PLLA	330,8
PLLA/HAP	336,2
PLLA/HAP/PDA	337,8
PLLA/HAP/PDA/PEG NH ₂ 750	345,3
PLLA/HAP/PDA/PEG NH ₂ 5000	346,7
PLLA/HAP/PDA/PEG SH 800	342,8



Rysunek 53. Krzywe TGA dla PLLA, PLLA/HAP i PLLA/HAP/PDA/PEG.

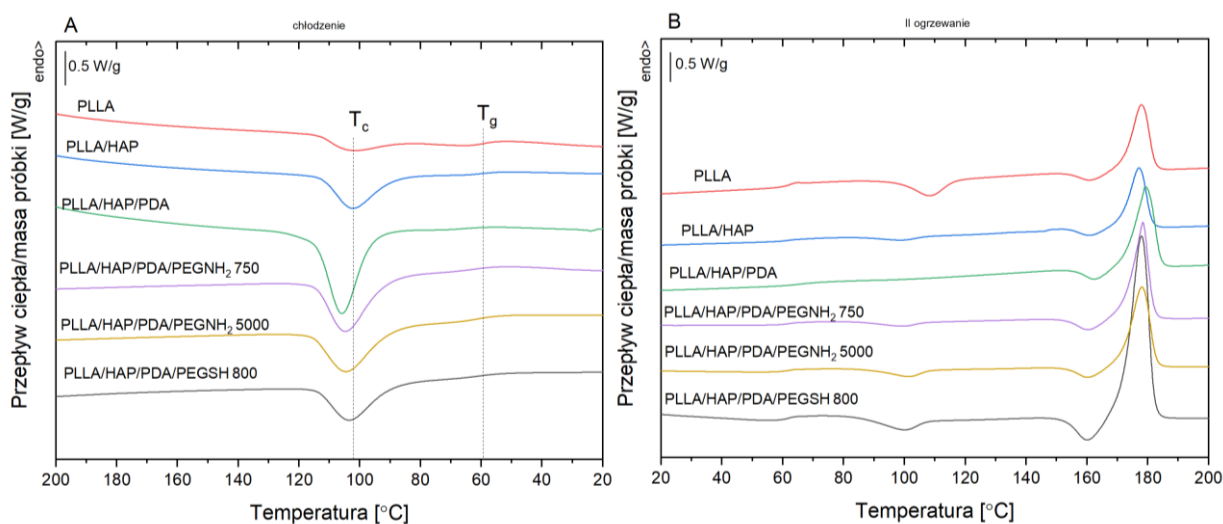
Wprowadzenie napełniacza do matrycy polimerowej może wpływać na ruchliwość łańcuchów polimerowych, wpływając w ten sposób na zachowanie termiczne, zwłaszcza polimerów semikrystalicznych. W celu zbadania wpływu modyfikacji powierzchni HAP za pomocą PDA i PEG z aminową i tiolową grupą końcową na właściwości termiczne kompozytów PLLA przeprowadzono eksperymenty DSC w ten sam sposób jak dla kompozytów PLLA/HAP/LYS/PEG. Krzywe DSC ze skanu chłodzenia i II ogrzewania serii kompozytów PLLA z PDA i PEG pokazano na rysunku 54.

Wartości DSC ze skanu chłodzenia pokazano w tabeli 14. Podczas krystalizacji ze stopu PLLA zaczyna krystalizować w temperaturze 114,0 °C z temperaturą pikową krystalizacji równą 102,5 °C. Dodatek 10 % wag. napełniacza w postaci czystego HAP powoduje obniżenie temperatury początku krystalizacji T_c^{onset} o 1,2 °C oraz nieznacznie temperatury pikowej krystalizacji T_c . T_c^{onset} oraz T_c dla kompozytów PLLA zawierających HAP modyfikowany PDA i PEG przesuwają się w kierunku wyższych temperatur. T_c dla PLLA/HAP/PDA oraz dla PLLA z HAP modyfikowanym PEG NH₂ 750, 5000 i PEG SH 800 wzrasta odpowiednio o 0,4 °C, 2,1 °C, 2 i 1 °C w porównaniu do T_c PLLA. Cząstki HAP modyfikowane PDA bardzo efektywnie nukleują krystalizację ze stopu PLLA, zdecydowanie bardziej niż czysty HAP. Entalpia krystalizacji ΔH_c zwiększa się aż o 33,5 J/g dla PLLA/HAP/PDA w porównaniu do entalpii krystalizacji PLLA oraz o 21,6 J/g w porównaniu do PLLA/HAP. Czysta PDA nie wykazuje na termogramach DSC przejść szklistych, krystalizacji i pików topnienia z powodu swojej amorficznej struktury. W pracy Tawiaha B. i in. [180] badano kompozyty PLA/PDA i pokazano, że wraz ze wzrostem zawartości PDA w kompozycie wzrasta wartość entalpii krystalizacji i stopnia krystaliczności układu, co świadczy o heterogenicznym efekcie zarodkowania PDA. W przypadku kompozytów PLLA/HAP/PDA efekt silnej nukleacji krystalizacji ze stopu indukuje zarówno czysty HAP oraz PDA, która dodatkowo zwiększa temperaturę krystalizacji PLLA w kompozycie. Warto zauważyć, że przyłączony PEG do PDA obniża entalpię krystalizacji PLLA/HAP/PDA o 11,9 J/g, 17,8 J/g i 18,8 J/g odpowiednio PEG NH₂ o masie molowej 750 i 5000 g/mol oraz PEG SH o masie molowej 800 g/mol. Temperatura zeszklenia jest większa o 5 °C dla PLLA/HAP/PDA w porównaniu do T_g czystej matrycy PLLA. Z teorii entropii konformacyjnej przejścia szklistego wynika, że zwiększona temperatura przejścia szklistego jest wynikiem ograniczonego ruchu łańcuchów polimerowych. Niniejsze wartości T_g sugerują, że istnieją silne interakcje między cząstkami PDA i PLLA. Przyłączenie PEG spowodowało obniżenie T_g układu PLLA/HAP/PDA o 1 °C, 2,8 i 4 °C odpowiednio dla PEG NH₂ 750, 5000 g/mol i PEG SH 800 g/mol z powodu zwiększonej ruchliwości łańcucha. Warto zaznaczyć, że również w tym przypadku PEG wykazuje efekt

plastyfikujący ponieważ obniża T_g kompozytów PLLA/HAP/PDA i powoduje przesunięcie T_c w kierunku wyższych temperatur.

Tabela 14. Wartości DSC ze skanu chłodzenia dla kompozytów PLLA z HAP modyfikowanym PDA i PEG.

Nazwa próbki	$T_{c\text{ onset}}$ [°C]	T_c [°C]	ΔH_c [J/g]	T_g [°C]
PLLA	114,0	102,5	11,9	59,7
PLLA/HAP	112,8	102,2	23,8	58,6
PLLA/HAP/PDA	114,8	102,9	45,4	64,7
PLLA/HAP/PDA/PEG NH ₂ 750	114,7	104,6	33,5	63,7
PLLA/HAP/PDA/PEG NH ₂ 5000	115,8	104,5	27,6	61,9
PLLA/HAP/PDA/PEG SH 800	114,7	103,5	26,6	60,7



Rysunek 54. Termogramy DSC dla kompozytów PLLA z HAP modyfikowanym PDA i PEG. Skan chłodzenia (A) i II ogrzewania (B).

Parametry termiczne wyznaczone z drugiego ogrzewania przedstawiono w tabeli 15. Podczas drugiego ogrzewania dla PLLA oraz dla wszystkich kompozytów pojawia się egzotermiczny pik zimnej krystalizacji w zakresie temperaturowym powyżej T_g i poniżej piku przejścia fazowego α' - α . Temperatury początku zimnej krystalizacji $T_{c\text{ onset}}$ oraz temperatury piku zimnej krystalizacji T_{cc} przesuwają się w kierunku niższych temperatur w stosunku do czystego PLLA oraz wartości entalpii zimnej krystalizacji ΔH_{cc} są wyraźnie mniejsze dla kompozytów PLLA, co wskazuje na łatwiejszą krystalizację PLLA w obecności czystych cząstek HAP i cząstek HAP modyfikowanych PDA i PEG oraz efekt zarodkowania HAP i PDA. Duża wartość ΔH_{cc} dla PLLA wskazuje na to, że polimer nie wykrył się całkowicie podczas skanu chłodzenia i dokryształizowuje podczas II ogrzewania. Mniejsze

wartości entalpii zimnej krystalizacji dla kompozytów świadczą o tym, iż bardziej krystalizowały w segmencie chłodzenia. Przed endotermicznym pikiem topnienia obecny jest egzotermiczny pik wskazujący na przejście fazowe PLLA α' - α . Zarówno PLLA jak i kompozyty PLLA z niemodyfikowanym i modyfikowanym HAP krystalizowały podczas chłodzenia jako mieszanina dwóch faz α i α' .

Tabela 15. Wartości DSC z II ogrzewania dla kompozytów PLLA z HAP modyfikowanym PDA i PEG.

Nazwa próbki	T _g [°C]	T _{cc} ^{onset} [°C]	T _{cc} [°C]	ΔH _{cc} [J/g]	T _{α'-α} [°C]	ΔH _{α'-α} [J/g]	T _m [°C]	ΔH _m [J/g]
PLLA	62,6	97,2	108,9	25,7	160,9	6,4	177,9	46,4
PLLA/HAP	61,4	84,9	99,1	8,7	160,5	6,1	170,8	42,7
PLLA/HAP/PDA	66,4	85,6	106,4	2,9	162,4	7,2	179,4	61,1
PLLA/HAP/PDA/PEG NH ₂ 750	62,3	85,5	99,1	5,4	160,3	9,1	178,4	60,7
PLLA/HAP/PDA/PEG NH ₂ 5000	62,3	88,9	101,1	9,0	160,1	8,0	178,1	59,9
PLLA/HAP/PDA/PEG SH 800	62,1	85,4	100,0	6,7	160,1	6,5	177,6	44,8

Temperatura zeszklenia, podobnie jak w skanie chłodzenia, jest największa dla PLLA/HAP/PDA (64,6 °C), następnie obecność PEG obniża T_g kompozytów PLLA/HAP/PDA o 4,1 °C (PEG NH₂) i 4,3 °C (PEG SH). Warto zauważyć, że wartość T_g kompozytów PLLA/HAP/PDA/PEG jest także niższa niż T_g czystego PLLA. Entalpia topnienia (ΔH_m) dla kompozytów PLLA/HAP/PDA ma największą wartość, co wskazuje, że nukleacja HAP i PDA powoduje wzrost krystaliczności i może poprawić właściwości mechaniczne kompozytów. Temperatury topnienia kompozytów zawierających modyfikowany powierzchniowo HAP z PEG były również niższe od T_m PLLA/HAP/PDA (179,4 °C) odpowiednio o 1 °C, 1,3 °C i 1,8 °C dla PLLA/HAP/PDA/PEGNH₂750 i 5000 oraz PLLA/HAP/PDA/PEGSH800. T_m kompozytów z HAP modyfikowanym PEG nie zmieniły się znacząco w stosunku do T_m czystego PLLA. Obniżone wartości T_g wraz ze wzrostem krystaliczności w kompozytach zawierających HAP modyfikowany PDA i PEG NH₂ 750/5000 lub PEG SH 800 potwierdziły znaczący efekt plastyfikujący osiągnięty przy niskiej zawartości PEG i sugerują kompatybilność faz.

Jest dostępnych kilka doniesień literaturowych wskazujących na efekt heterogenicznego zarodkowania PDA i większą krystaliczność kompozytów z udziałem PDA oraz jednocześnie wskazujących na przeróżne zastosowania PDA. Oprócz wcześniej cytowanej pracy Tawiaha B. i in. [180], którzy otrzymywali folie PLA z nanocząstkami PDA i zwracali uwagę na efekt

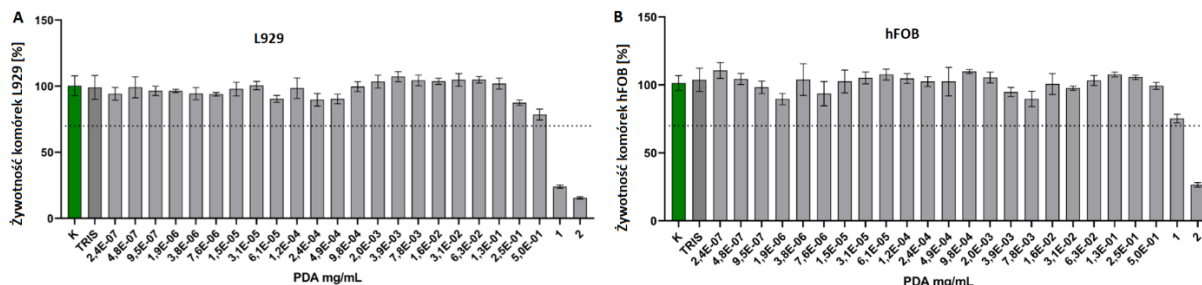
nukleacji PDA, Liu R. i in. [181] zaproponowali membrany polietylenu o wysokiej masie molowej (UHMWPE) z nanocząstkami PDA modyfikowanymi PEG-NH₂. Pokazali kompatybilność faz UHMWPE i PEG-NH₂, większą stabilność termiczną kompozytów, większą krystaliczność układów zwiększającą się wraz ze wzrostem ilości PDA oraz doskonałą hydrofilowość membran. Sihan i in. [182] zaproponowali powlekanie mikrosfer polistyrenu (PS) za pomocą PDA w celu poprawy właściwości uniepalniających. Udowodnili, że PDA zwiększa T_g PS jak również właściwości mechaniczne i trudnopalne, co przypisują silnym interakcjom międzyfazowym pomiędzy PDA i PS i dobrej zdolności PDA do wychwytywania wolnych rodników. Ciekawe badania zaproponował Tiwari i in. [165], którzy opracowali elektroprzędzone maty złożone z PCL, PDA i doksorubicyny w celu utworzenia specjalnej platformy do terapii nowotworowych. Na podstawie badań termicznych PDA i kompozytów PCL/PDA stwierdzili, że PDA ma postać amorficzną i powstawanie cech transkrystalicznych zachodzących na powierzchniach międzyfazowych włókien PCL i PDA może poprawić krystaliczność polimeru.

Właściwości biologiczne

Tak jak w przypadku cząstek HAP modyfikowanych L-lizyną i PEG badaniom biologicznym poddano cząstki HAP modyfikowane PDA i PEG, czystą PDA w celu określenia bezpiecznych stężeń PDA, a następnie kompozyty PLLA z HAP/PDA/PEG.

Czystą PDA poddano testom cytotoksyczności z uwagi na doniesienia literaturowe o toksyczności większych stężeń PDA. Nieto i in. [142] w pracy dotyczącej badań cytotoksyczności różnych wymiarów cząstek PDA udowodnili, że najwyższe stężenie nanocząstek PDA spośród badanych (0,0074 mg/ml, 0,015 mg/ml, 0,029 mg/ml, 0,042 mg/ml) powoduje przeżywalność 50-60 % różnych traktowanych linii komórek nowotworowych. W związku z tym zauważono potrzebę wykonania badań w kierunku cytotoksyczności dla PDA z wykorzystaniem hodowli komórkowych przeznaczonych do inżynierii tkankowej. Cytokompatybilność PDA o różnych stężeniach określono wobec linii L929 i hFOB, a wyniki oceniające żywotność komórek L929 i hFOB w teście MTT przedstawiono na rysunku 55 A-B. Bezpieczne stężenia PDA powodujące przeżywalność mysich fibroblastów L929 powyżej 70 % wynoszą powyżej 0,5 mg/ml. Z kolei, przeżywalność ludzkich osteoblastów hFOB powyżej 70 % oceniono dla stężeń PDA powyższej 1 mg/ml. W większych stężeniach w środowisku medium komórkowego PDA wykazuje właściwości cytotoksyczne i należy ją wykluczyć z dalszych etapów badań biologicznych. Jednak powlekanie cząstek HAP dopaminą

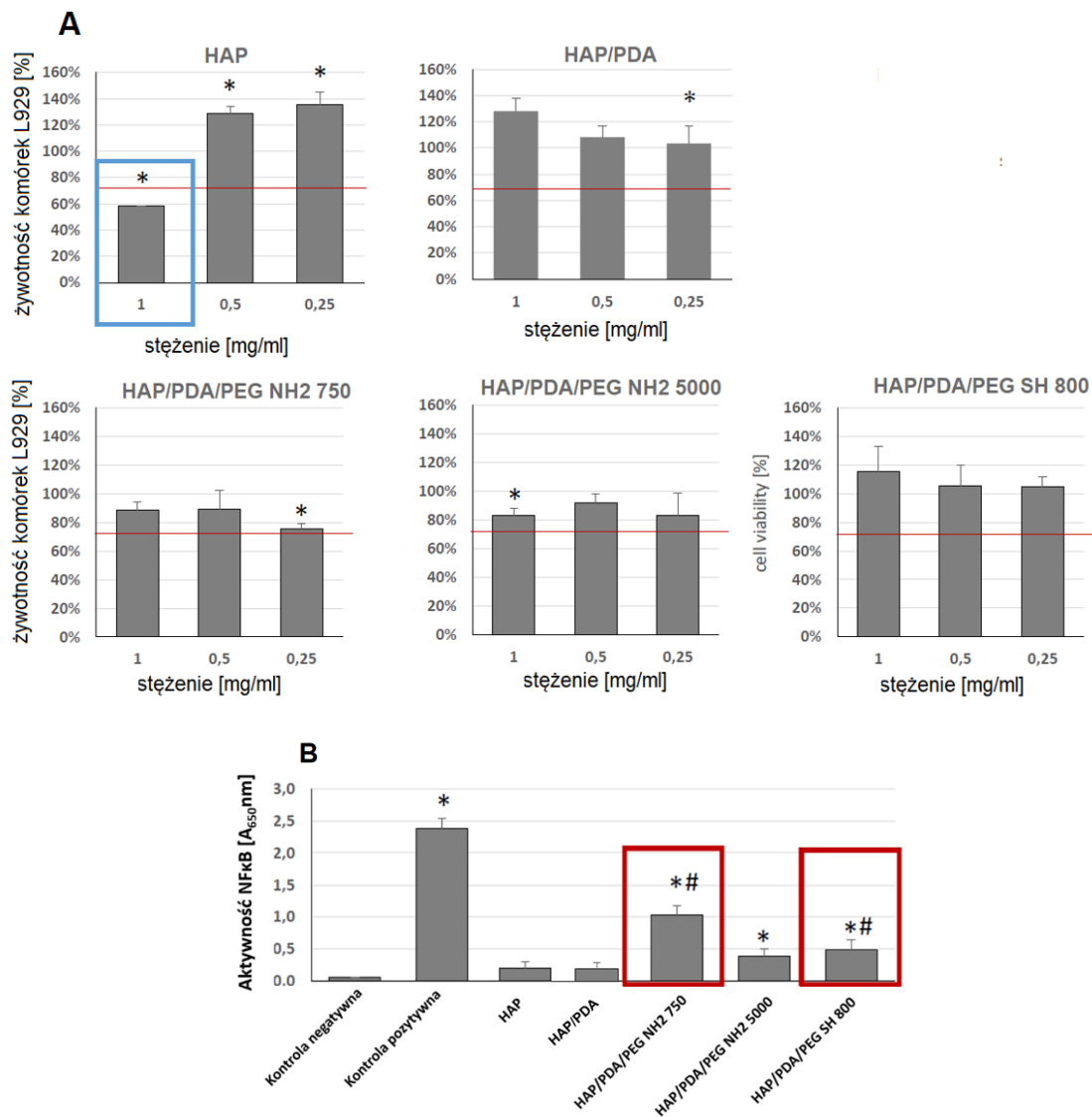
o stężeniu 2 mg/ml, które jest najbardziej popularne w literaturze do powlekania różnych powierzchni, jest bezpieczne z uwagi na niecałkowitą ilość przyłączonej PDA do powierzchni HAP (16,85 % wag. PDA w próbce HAP według analizy TGA). Dopamina, która nie uległa procesom polimeryzacji *in situ* i PDA słabo związana z powierzchnią HAP została odmyta po reakcji polimeryzacji.



Rysunek 55. Ocena przeżywalności komórek L929 (A) i hFOB (B) dla PDA w szerokim zakresie stężeń.

Cytotoksyczność napełniaczy (HAP, HAP/PDA, HAP/PDA/PEGNH₂ 750, HAP/PDA/PEGNH₂ 5000 i HAP/PDA/PEGSH 800) określono wobec hodowli komórkowej L929, a aktywność prozapalną wobec linii monocytarnej THP1-Blue™ tak jak w przypadku cząstek HAP modyfikowanych L-lizyną i PEG (rysunek 56 A-B). Wyniki testu MTT, wykazały, że cząstki HAP modyfikowane PDA i HAP modyfikowane PDA i PEG nie są cytotoksyczne w pełnym zakresie stężeń 0,25-1 mg/ml. Żywotność mysich fibroblastów po 24 godzinnym kontakcie z poszczególnymi cząstkami jest powyżej 70 % i jest to zgodne z normą ISO. Wyniki otrzymane w teście zgodności immunologicznej *in vitro* przy użyciu komórek THP1-Blue™ wykazały, że badane cząstki HAP modyfikowane PDA i PEG mają delikatnie właściwości immunomodulacyjne. Najwyższą stymulacją ludzkich monocytów charakteryzują się cząstki HAP z PDA i PEG o mniejszej masie cząsteczkowej (750 g/mol i 800 g/mol). W próbkach wykazujących immunomodulację większą niż kontrola negatywna sprawdzono czy wynikają one z zanieczyszczenia LPS. W tym celu wykorzystano polimyksynę w celu usunięcia endotoksyn. NF-κB indukuje uwalnianie cytokin i chemokin, a zatem działa jako kluczowy mediator odpowiedzi zapalnych, które są niezbędne do kontrolowania i ostatecznie eliminowania infekcji. Obecność endotoksyn w preparatach rekombinowanych białek może zaburzać wyniki eksperymentów i wykluczać zastosowania *in vivo* [183]. Polimyksyna to antybiotyk, który wykazuje wysokie powinowactwo do bakteryjnych lipopolisacharydów. W związku ze stwierdzonym brakiem klasycznego zanieczyszczenia LPS stymulacja monocytów jest wynikiem badanych materiałów. Produkcja SEAP przez monocyty w odpowiedzi na HAP, HAP/PDA, HAP/PDA/PEGNH₂ 750 i HAP/PDA/PEGNH₂ 5000

i HAP/PDA/PEGSH 800 wyniosła odpowiednio $0,243 \pm 0,08$, $0,235 \pm 0,07$, $1,106 \pm 0,121$, $0,413 \pm 0,07$, $0,514 \pm 0,114$. Dla porównania, stężenie SEAP pozytywnej kontroli czyli LPS (100 ng/ml), która silnie aktywuje monocyty THP1-Blue™ jako bodziec bakteryjny wynosiło $2,476 \pm 0,207$.

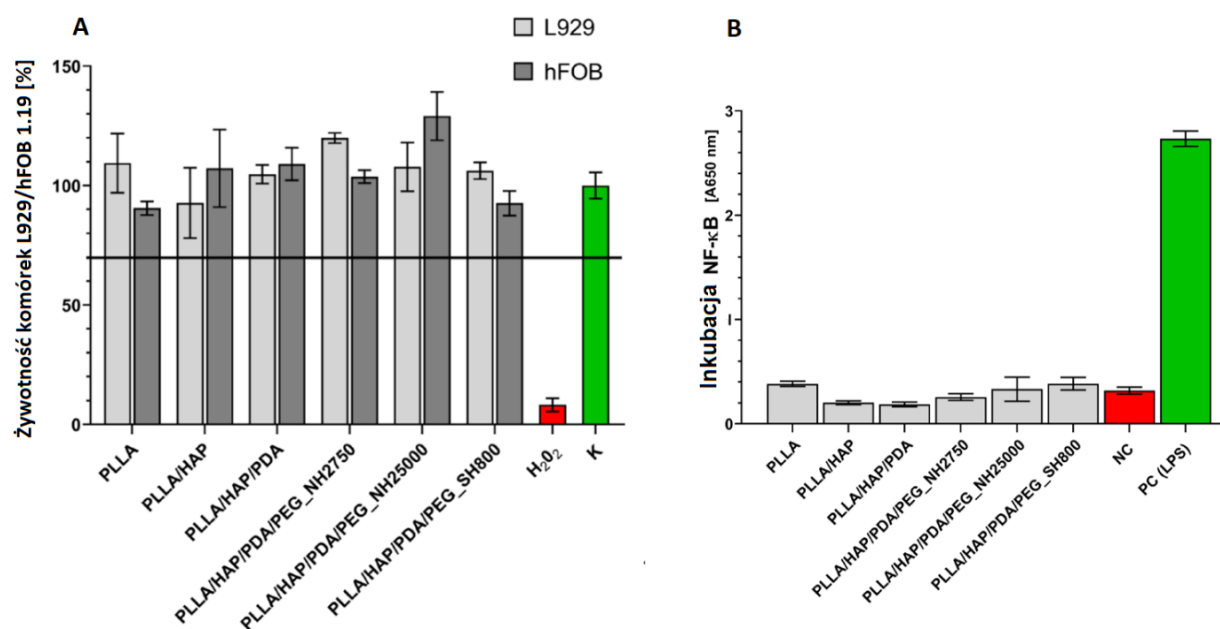


Rysunek 56. Żywność mysich fibroblastów L929 w kontakcie 24 h z cząstkami HAP, HAP/PDA, HAP/PDA/PEGNH₂ 750, HAP/PDA/PEGNH₂ 5000, HAP/PDA/PEGSH 800 (A). Immunozgodność ludzkich monocytów THP1-Blue™ w szlaku NF-κB dla cząstek HAP i HAP modyfikowanego PDA i PEG (B). * $p < 0,05$ liczone względem hodowli kontrolnej (100 % żywności), # $p < 0,05$ liczone względem HAP.

W badaniach określających cytotoksyczność kompozytów PLLA z wypełniaczem w ilości 10 % wag., wobec linii mysich fibroblastów L929 i linii ludzkich osteoblastów hFOB 1.19, stwierdzono, że żywność komórek docelowych ekspozowanych na czystym polimerze PLLA i kompozytach PLLA z PDA i PEG pozostaje na tym samym poziomie, co nietraktowane kontrole. Wyniki testu MTT (rysunek 57 A) wykazały, że kompozyty PLLA z HAP nie wykazywały cytotoksyczności po bezpośrednim kontakcie z komórkami. Jak pokazano na

rysunku 57 A, żywotność mysich fibroblastów ekspozowanych na PLLA, PLLA/HAP, PLLA/HAP/PDA, i PLLA/HAP/PDA z PEGNH₂ 750, 5000 i PEGSH 800 wynosiła odpowiednio 109,6% ± 14,3%, 92,3% ± 15,1%, 108,2 % ± 7,1%, 116,5% ± 5,2%, 109,8% ± 8,5% i 107,2% ± 3,5%. Podobny efekt zaobserwowano, gdy osteoblasty hFOB 1.19 były ekspozowane na kompozytach z matrycą PLLA. W przypadku osteoblastów żywotność tych komórek wynosiła dokładnie 90,1% ± 3,2%, 106,0% ± 17,3%, 109,9% ± 6,4%, 103,8% ± 3,1%, 129,8% ± 11,2% i 92,8% ± 4,1% odpowiednio dla PLLA, PLLA/HAP, PLLA/HAP/PDA, i PLLA/HAP/PDA z PEGNH₂ 750, 5000 i PEGSH 800.

Wyniki uzyskane w teście zgodności immunologicznej *in vitro* przy użyciu komórek THP1-Blue™ (rysunek 57 B) wykazały, że kompozyty PLLA z HAP modyfikowanym PDA i PEG nie aktywowały monocytów do indukcji czynnika transkrypcyjnego NF-κB. Uzyskane wartości stężeń SEAP utrzymywały się na poziomie hodowli niestymulowanych (0,312 ± 0,04). Zatem produkcja SEAP przez monocyty w odpowiedzi na biomateriały PLLA, PLLA/HAP, PLLA/HAP/PDA, i PLLA/HAP/PDA z PEGNH₂ 750, 5000 i PEGSH 800 wyniosła odpowiednio 0,392 ± 0,03, 0,205 ± 0,02, 0,194 ± 0,03, 0,218 ± 0,04, 0,263 ± 0,07 i 0,303 ± 0,05. Pozytywna kontrola (LPS) wykazała silną aktywację monocytów THP1-Blue™ 2,71 ± 0,115.



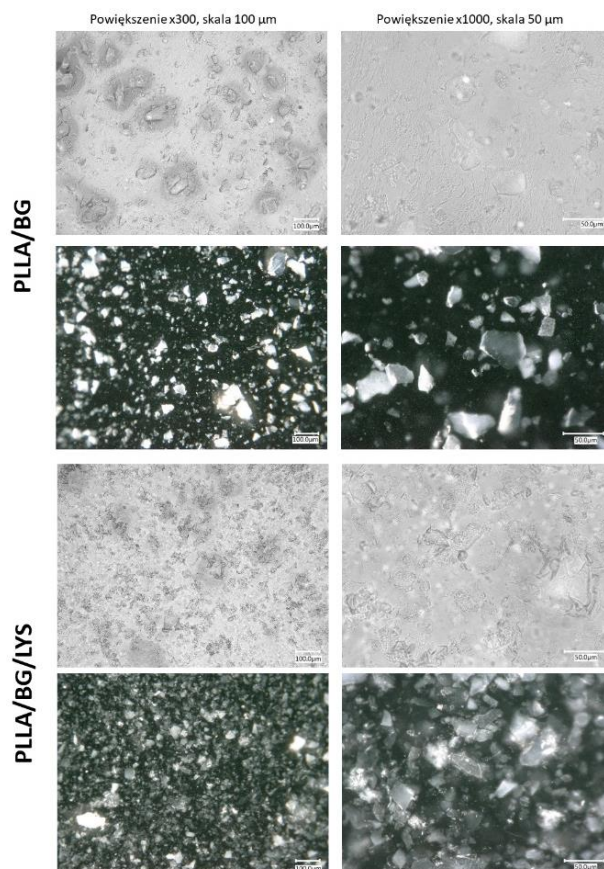
Rysunek 57. Żywotność komórek L929 i hFOB 1.19 w 24 h kontakcie z kompozytami PLLA z HAP i modyfikowanym powierzchniowo HAP z PDA i PEG (A). Immunozgodność ludzkich monocytów THP1-Blue™ w szlaku NF-κB w 24 h kontakcie z kompozytami PLLA z HAP i modyfikowanym powierzchniowo HAP z PDA i PEG (B).

2.3. Kompozyty z poli(L-laktydu) i bioaktywnego szkła modyfikowanego L-lizyną

Do wytworzenia kompozytów PLLA/BG i PLLA/BG/LYS zastosowano czyste cząstki BG o uziarnieniu I, z uwagi na największą ilość przyłączonej L-lizyny. Nie obserwowano zmian parametrów termicznych pomiędzy cząstkami BG, ZBG i SrBG.

Morfologia kompozytów

Na podstawie obrazów z mikroskopu optycznego przy powiększeniu x300 i x1000 dla kompozytów PLLA/BG i PLLA/BG/LYS w świetle odbitym i przechodzącym (rysunek 58) stwierdzono, że L-lizyna wyraźnie poprawia homogeniczność kompozytów dzięki oddziaływaniu pomiędzy nieorganicznymi cząstkami napełniacza i organiczną matrycą PLLA. Cząstki BG mają nieregularny kształt, przez co kompozyty PLLA/BG i PLLA/BG/LYS mają chropowatą powierzchnię. L-lizyna poprawia stopień zdyspergowania cząstek BG w całej objętości PLLA.

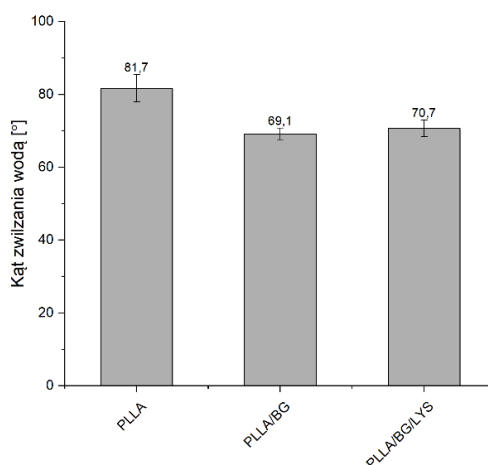


Rysunek 58. Obrazy mikroskopowe dla kompozytów PLLA/BG/LYS.

Kąt zwilżania

Wykonano pomiary kąta zwilżania wodą dla kompozytów PLLA/BG i PLLA/BG/LYS przy zachowaniu takich samych warunków pomiarowych jak w przypadku kompozytów PLLA

z cząstkami HAP i wyniki pokazano na rysunku 59. Kąt zwilżania dla PLLA jest równy $81,7^\circ \pm 3,7^\circ$, a dla kompozytów jest mniejszy o ok 10° i wynosi $69,1^\circ \pm 1,7^\circ$ i $70,7^\circ \pm 2,3^\circ$ odpowiednio dla PLLA/BG i PLLA/BG/LYS. BG jest materiałem wysoce hydrofilowym ze względu na obecność grup OH na powierzchni, tak jak HAP i powoduje obniżenie wartości kąta zwilżania PLLA. Jednak w przypadku cząstek BG z L-lizyną nie zaobserwowano wpływu modyfikacji na zwiększenie hydrofilowości powierzchni kompozytów PLLA/BG. Jest to związane z wybranym sposobem funkcjonalizacji L-lizyną za pośrednictwem silnie hydrofobowego APTS. Obecność APTS na powierzchni BG znacząco zmienia zwilżalność materiału. Według Massery i in. [184] BG funkcjonalizowane APTS zwiększa kąt zwilżania ponad dwukrotnie w porównaniu do czystego BG. Biorąc pod uwagę brak wyraźnej zmiany kąta zwilżania pomiędzy PLLA/BG i PLLA/BG/LYS można przypuszczać, że L-lizyna promuje zwilżalność powierzchni PLLA pomimo hydrofobowego APTS, którego użyto jako łącznika w sprzęganiu cząstek BG i L-lizyny.



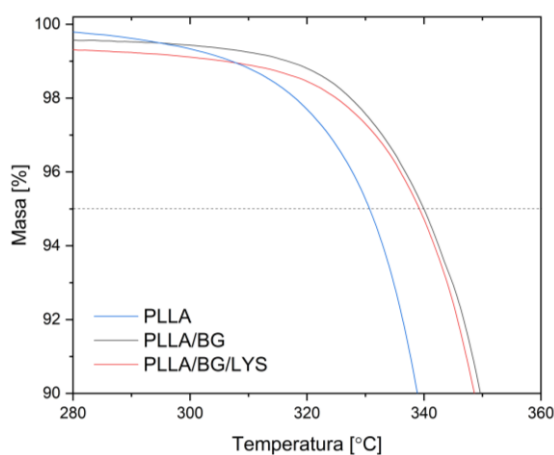
Rysunek 59. Kąt zwilżania dla kompozytów PLLA/BG/LYS.

Właściwości termiczne

Parametry stabilności termicznej kompozytów PLLA, PLLA/BG i PLLA/BG/LYS przedstawiono w tabeli 16 i na rysunku 60. Cząstki bioaktywnego szkła zwiększają stabilność termiczną PLLA o $9,2^\circ\text{C}$. $T_{-5\%}$ dla PLLA wynosi $330,8^\circ\text{C}$, dla PLLA/BG $340,0^\circ\text{C}$ i dla PLLA/BG/LYS $339,2^\circ\text{C}$. Modyfikacja cząstek BG z wykorzystaniem prekursora silanowego APTS i L-lizyny nie zmieniła znacząco stabilności termicznej kompozytów PLLA/BG.

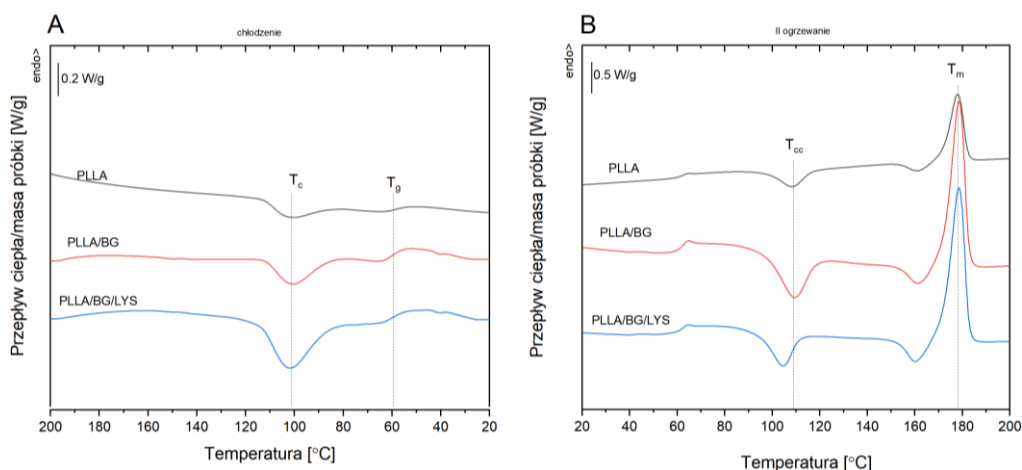
Tabela 16. Wartości z analizy TGA dla kompozytów PLLA/BG i PLLA/BG/LYS.

Nazwa próbki	T _{-5%} [°C]
PLLA	330,8
PLLA/BG	340,0
PLLA/BG/LYS	339,2



Rysunek 60. Krzywe TGA dla kompozytów PLLA/BG/LYS.

W celu zbadania wpływu napelnacza w postaci cząstek BG i BG modyfikowanego L-lizyną na właściwości termiczne PLLA przeprowadzono analizę DSC analogicznie jak we wcześniej opisanych kompozytach. Krzywe DSC ze skanu chłodzenia i II ogrzewania serii kompozytów PLLA z BG i BG/LYS pokazano na rysunku 61.



Rysunek 61. Termogramy DSC ze skanu chłodzenia (A) i II ogrzewania (B) dla kompozytów PLLA/BG i PLLA/BG/LYS.

Wartości termiczne kompozytów ze skanu chłodzenia pokazano w tabeli 17. Temperatura zeszklenia PLLA nie różni się znacząco po wprowadzeniu cząstek BG zarówno podczas

krystalizacji ze stopu oraz II ogrzewania. Zachowanie to potwierdzają także Canales i in. [185]. Podczas krystalizacji ze stopu dla PLLA/BG zauważono przesunięcie temperatury piku krystalizacji T_c i T_c^{onset} w kierunku niższych temperatur oraz zmniejszenie entalpii krystalizacji PLLA o 5,7 °C. Cząstki BG/LYS delikatnie obniżają wartości T_c i ΔH_c PLLA, jednak nie zaobserwowano istotnego wpływu modyfikacji cząstek BG L-lizyną na krystalizację PLLA. Cząstki BG oraz BG/LYS nie nukleują krystalizacji ze stopu PLLA tak jak czyste i modyfikowane L-lizyną lub PDA i PEG cząstki HAP.

Tabela 17. Wartości termiczne DSC ze skanu chłodzenia dla kompozytów PLLA/BG i PLLA/BG/LYS.

Nazwa próbki	T_c^{onset} [°C]	T_c [°C]	ΔH_c [J/g]	T_g [°C]
PLLA	114,0	102,5	11,9	59,7
PLLA/BG	112,1	100,4	6,2	60,1
PLLA/BG/LYS	114,6	101,9	11,6	59,4

W kolejnym skanie ogrzewania (tabela 18) dodatek napełniacza w postaci cząstek BG powoduje zwiększenie początku zimnej krystalizacji PLLA o 0,3 °C, a cząstki BG/LYS zmniejszają wartość T_c^{onset} o 2,9 °C. Cząstki BG i BG/LYS powodują również efektywne zmniejszenie entalpii zimnej krystalizacji PLLA o 4,7 i 11 °C, co oznacza, iż kompozyty te łatwiej krystalizują ze stopu i charakteryzują się wyższymi wartościami stopnia krystaliczności. Na krzywych PLLA z BG i BG/LYS obecne są egzotermiczne piki przy ~160 °C wskazujące na przejście fazy α' do α , natomiast temperatury topnienia kompozytów PLLA/BG i PLLA/BG/LYS przesuwają się delikatnie w kierunku wyższych temperatur w porównaniu do czystej matrycy.

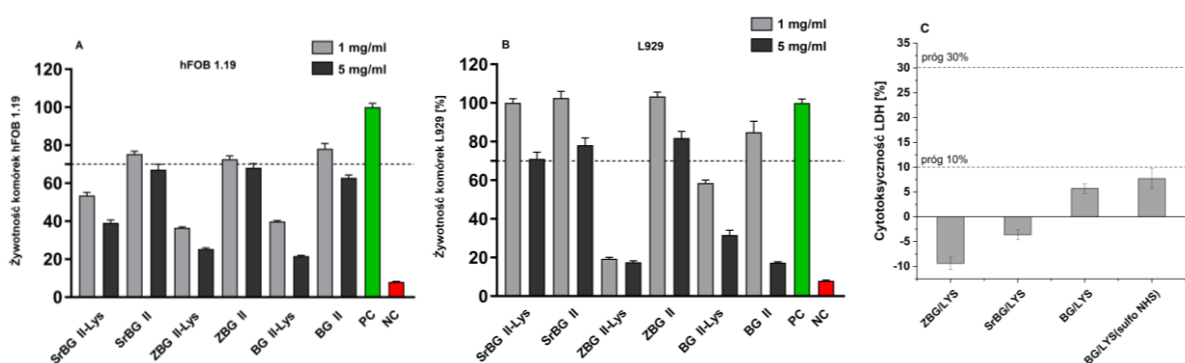
Tabela 18. Wartości termiczne DSC z II ogrzewania dla kompozytów PLLA/BG i PLLA/BG/LYS.

Nazwa próbki	T_g [°C]	T_{cc}^{onset} [°C]	T_{cc} [°C]	ΔH_{cc} [J/g]	$T_{\alpha'-\alpha}$ [°C]	$\Delta H_{\alpha'-\alpha}$ [J/g]	T_m [°C]	ΔH_m [J/g]
PLLA	62,6	97,2	108,9	25,7	160,9	6,4	177,9	46,4
PLLA/BG	62,6	97,5	109,3	21,0	161,1	6,2	178,3	40,7
PLLA/BG/LYS	62,4	94,3	104,5	14,7	160,1	6,8	178,3	39,6

Właściwości biologiczne cząstek BG

We wstępnych badaniach *in vitro* zbadano cytotoksyczność wszystkich cząstek BG opisanych w rozdziale IV 1.3. Celem tego badania było sprawdzenie wpływu cynku i strontu

wprowadzonych do struktury BG oraz modyfikacji cząstek BG L-lizyną na przeżywalność mysich fibroblastów L929 oraz ludzkich osteoblastów hFOB 1.19. Test MTT, dla którego wyniki pokazano na rysunku 62 A i B to test bezpośredniego kontaktu pomiędzy komórkami i badanym materiałem. Oznaczenia dokonano dla dwóch różnych stężeń cząstek BG w medium hodowlanym 1 i 5 mg/ml. Przeżywalność hFOB1.19 dla niemodyfikowanych cząstek BG (BG II, ZBG II, SrBG II) wynosi około 70 % i jest niższa dla stężenia cząstek BG 5 mg/ml. Przeżywalność komórek L929 dla niemodyfikowanych cząstek BG II, ZBG II i SrBG II o stężeniu 1 mg/ml wynosi odpowiednio $84,9 \pm 13,9$ %, $103,4 \pm 5,6$ % i $102,5 \pm 8,6$ % w stosunku do kontroli, zatem według normy ISO 10993-5:2009 cząstki te nie są cytotoksyczne. Z kolei przeżywalność komórek L929 cząstek BG II, ZBG II i SrBG II o stężeniu 5 mg/ml jest mniejsza i wynosi odpowiednio $17,5 \pm 1,1$ %, $81,9 \pm 8,4$ % i $78,2 \pm 9,0$ %. Czyste cząstki BG II wywołują toksyczność wobec komórek L929. Na podstawie testu MTT modyfikacja cząstek BG L-lizyną za pośrednictwem APTS powoduje ostrą cytotoksyczność cząstek BG wobec osteoblastów ludzkich. Przeżywalność hFOB w kontakcie z BG II/LYS, ZBG II/LYS i SrBG II/LYS jest poniżej 50 %. Przeżywalność mysich fibroblastów w 24 h kontakcie z cząstkami BG II/LYS i ZBG II/LYS jest poniżej 50 %, podczas gdy przeżywalność komórek w kontakcie z SrBG II/LYS o stężeniu 1 mg/ml wynosi $100,1 \pm 5,4$ %. Przypuszcza się, że ten rodzaj testu jest niepoprawny dla materiałów sypkich z uwagi na sedymentację cząstek BG, co prowadzi do przygniatań i zaduszanie komórek L929 i hFOB 1.19 poprzez utrudniony dostęp tlenu. Osteoblasty, wysiane na spodzie płytki hodowlanej wydają się być bardziej wrażliwe na trudne warunki hodowlane. W związku z tym, nie przeprowadzono kolejnych badań związanych z aktywnością prozapalną.



Rysunek 62. Cytotoksyczność czystych cząstek BG II, ZBG II i SrBG II oraz modyfikowanych L-lizyną w teście MTT wobec hFOB 1.19 (A) i L929 (B). Cytotoksyczność cząstek BG II/LYS, ZBG II/LYS i SrBG II/LYS w teście LDH wobec hFOB 1.19 (C).

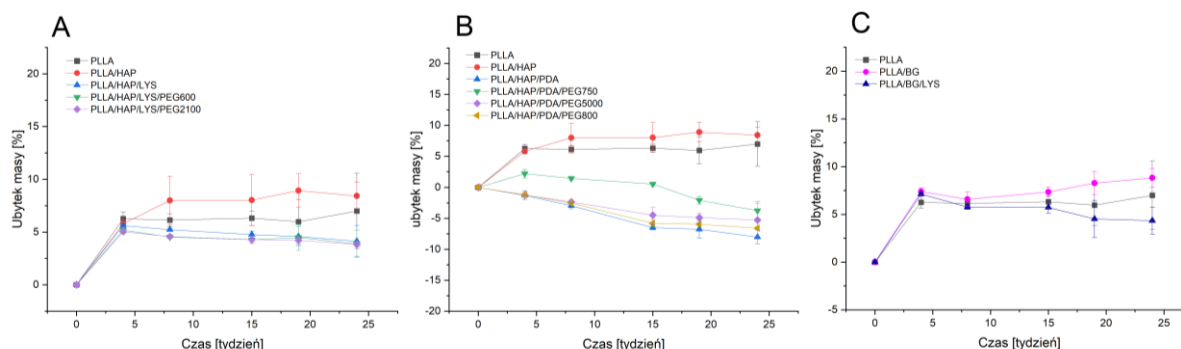
Test dehydrogenazy mleczanowej LDH, który jest także powszechnie stosowany do oceny biomateriałów, określa stopień uszkodzenia błony komórkowej komórek znajdujących

się w ekstrakcie hodowlanym. W tym teście materiały badane umieszczane są w insertach, które wkłada się do przygotowanych płytek z wysianymi komórkami i dodaje się do nich odpowiednią ilość pożywki. Następnie materiały inkubuje się 48 h (37 °C, 95 % wilgotności, 5 % CO₂). Komórki nie mają bezpośredniego kontaktu z materiałem i ocenia się stopień uszkodzenia błony komórkowej komórek zdyspergowanych w ekstrakcie. Taki test dla cząstek bioaktywnych szkieł modyfikowanych L-lizyną przeprowadzili w ramach projektu GlassPoPep („Multifunkcyjne materiały kompozytowe o właściwościach przeciwbakteryjnych i pro-regeneracyjnych do rekonstrukcji tkanki kostnej”) naukowcy z Instytutu Biotechnologii i Medycyny Molekularnej IBMM, a wyniki przedstawiono na rysunku 62 C. Według wyników dostępnych na rys. 62 C apoptoza komórek w kontakcie z ekstraktem BG II/LYS wynosi $5,7 \pm 1,0$ % i jest poniżej bezpiecznego progu 10 %. Cząstki ZBG i SrBG modyfikowane L-lizyną wykazują większą przeżywalność komórek hFOB 1.19 niż sama kontrola. Dlatego według testu LDH cząstki BG modyfikowane L-lizyną nie są cytotoksyczne. W związku z tym, kompozyty PLLA z BG i BG modyfikowanym L-lizyną będą analizowane w kierunku cytozgodności i testów prozapalnych w kolejnych etapach badań. Przypuszcza się, że materiały kompozytowe PLLA zawierające 10 % wag. cząstek BG lub BG/LYS uformowane metodą rozpuszczalnikową również okażą się bezpieczne do zastosowań w inżynierii tkanki kostnej. Schätzlein E. i in. zaproponowali porowate rusztowania PLA/BG do regeneracji ubytków kostnych o dużym rozmiarze. Pokazali, że kompozyty są bezpieczne do zastosowań biomedycznych. Dodatkowo zauważyli, że kontrolowana kinetyka uwalniania wapnia wpływa na potencjał adhezyjny mezenchymalnych komórek macierzystych i ich proliferację [186].

2.4. Degradacja *in vitro* kompozytów polimerowo - ceramicznych

Aby poznać zmianę właściwości fizykochemicznych kompozytów po wszczepieniu do organizmu, niezbędne są badania *in vitro*. Test degradacji hydrolitycznej *in vitro* przeprowadzono w roztworze SBF dla wszystkich folii kompozytowych opisanych w rozdziale IV 1.1 – 1.3. Cały eksperyment zaplanowano na czas 1.5 roku. Dotychczas zgromadzono wyniki eksperymentu z pierwszych 25 tygodni. Wartości pH roztworów kompozytów zmieniały się zgodnie z przewidywaniami i oscylowały w zakresie 7,5 – 6,9, przy czym

najniższe wartości pH w 25 tygodniu oznaczono dla PLLA. Ubytki mas próbek przedstawiono na rysunku 63.



Rysunek 63. Ubytek masy podczas degradacji hydrolytycznej w roztworze SBF dla PLLA i kompozytów PLLA z niemodyfikowanym HAP i HAP modyfikowanym L-lizyną i PEG (A), HAP modyfikowanym PDA i PEG (B) BG i BG modyfikowanym L-lizyną (C).

Rysunek 63 A przedstawia zmiany masy folii PLLA i kompozytów PLLA z niemodyfikowanym HAP i HAP modyfikowanym L-lizyną i PEG. Największą szybkość degradacji hydrolytycznej dla PLLA oraz PLLA z HAP niemodyfikowanym i modyfikowanym L-lizyną i PEG zaobserwowano do 5 tygodnia, a następnie dla PLLA i PLLA/HAP ubytek masy nie zmienił się znacząco. Taką samą tendencję pokazali Yan W. i in. [187]. W ich badaniach w ciągu pierwszych 4 tygodni tempo degradacji kompozytu HAP/PLLA w SBF było szybsze niż tempo odkładania się apatytu kostnego, po 4 tygodniu (do 6 tyg. włącznie) dominowało tempo odkładania się apatytu kostnego. W 25 tygodniu eksperymentu ubytek masy dla PLLA wyniósł $7,0 \pm 3,6$ %, dla PLLA/HAP $8,4 \pm 1,3$ %, dla PLLA/HAP/LYS $4,1 \pm 1,5$ %, dla PLLA/HAP/LYS/PEG600 $3,9 \pm 1,3$ % oraz dla PLLA/HAP/LYS/PEG2100 $3,8 \pm 0,2$ %. Profile degradacji PLLA i PLLA/HAP są podobne. Profile degradacji dla kompozytów PLLA z modyfikowanym HAP L-lizyną i PEG wskazują na tendencję malejącą ubytku masy, co przekłada się na wzrost masy apatytu. Na rysunku 63 C pokazano profil degradacji kompozytów PLLA z cząstkami BG i BG modyfikowanego L-lizyną. Zaobserwowano identyczną tendencję jak w przypadku kompozytów z PLLA i HAP/LYS/PEG. W 25 tygodniu eksperymentu ubytek masy dla PLLA/BG wyniósł $8,8 \pm 1,0$ % oraz dla PLLA/BG/LYS $4,3 \pm 1,4$ %. Cząstki HAP i BG stosuje się jako wypełniacze w kompozytach polimerowych głównie z uwagi na właściwości osteokondukcyjne i bioaktywne istotne w zastosowaniach biomedycznych. W szczególności bioaktywne kompozyty oparte na cząstkach BG

i biodegradowalnych polimerach, takich jak PLA, są bardzo obiecującymi systemami do regeneracji kości ze względu na ich wysoką osteokonduktywność i biodegradowalność [83].

Inny profil degradacji w SBF przedstawiają kompozyty z PLLA i HAP modyfikowanym PDA (rysunek 63 B). Dla tych kompozytów zaobserwowano wzrost masy w czasie od samego początku eksperymentu. Wskazuje to na proces mineralizacji indukowany PDA. W 25 tygodniu eksperymentu wzrost masy dla PLLA/HAP/PDA wyniósł $8,0 \pm 1,1$ %, dla PLLA/HAP/PDA/PEG NH₂ 750 $3,8 \pm 1,4$ %, dla PLLA/HAP/PDA/PEG NH₂ 5000 $5,3 \pm 2,6$ %, oraz dla PLLA/HAP/PDA/PEG SH 800 $6,6 \pm 0,2$ %. Pomimo, iż próbki po pobraniu były dokładnie przepłukiwane wodą, po wysuszeniu obserwowano biały osad. Osadzanie nowej warstwy apatytu na powierzchni próbek blokowało wchłanianie wody. Li G. i in. [179] wykazali, że HAP modyfikowany PDA zapobiega niszczeniu powierzchni poli(D,L-laktydu) w trakcie 12 tygodni degradacji oraz wraz ze wzrostem zawartości PDA w układach zmienia się morfologia powierzchni zmineralizowanej i zauważalny był wzrost jonów Ca²⁺ na powierzchni materiałów określany za pomocą techniki SEM i EDS. Gdy zawartość PDA wynosiła 8 % wag., morfologia zmineralizowanej próbki była zbliżona do wyniku mineralizacji naturalnej kości.

2.5. Podsumowanie części I

Celem badań w części I niniejszej rozprawy doktorskiej było zaprojektowanie nowych kompozytów polimerowo-ceramicznych z matrycą PLLA i funkcjonalizowanymi powierzchniowo cząstkami HAP lub BG. Na powierzchnię HAP wprowadzono poli(glikole etylenowe) o różnej masie molowej i innych grupach końcowych za pośrednictwem L-lizyny lub polidopaminy. Powierzchnię BG zmodyfikowano L-lizyną przyłączając ją chemicznie za pośrednictwem APTS. Modyfikację powierzchni cząstek ceramicznych potwierdzono jakościowo za pomocą metody FTIR-ATR i ilościowo metodą TGA. Następnie oceniono wpływ modyfikacji powierzchni cząstek ceramicznych na morfologię, zwilżalność, właściwości termiczne, biologiczne i degradację kompozytów na bazie PLLA.

Na podstawie przeprowadzonych badań dowiedziono, że w wyniku modyfikacji powierzchni cząstek ceramicznych powstały wielofunkcyjne napełniacze do matryc polimerowych, które mogą pełnić rolę czynników zarodkujących, plastyfikatorów i ugrupowań bioaktywnych. Funkcjonalizacja powierzchni cząstek HAP oraz BG przebiegła z różną wydajnością. L-lizynę przyłączono do powierzchni HAP z utworzeniem karboksylanu wapnia, a następnie do wolnych grup aminowych L-lizyny przyłączono PEG o różnych masach

cząsteczkowych z utworzeniem wiązania amidowego [12]. Reakcje wtórne charakteryzowały się efektywnością równą 13,1 % i 15,3 % dla PEG600 i PEG2100.

Z większą wydajnością zaadsorbowano PDA na powierzchni cząstek HAP w procesie polimeryzacji *in situ* dopaminy, następnie przyłączono PEG z grupą końcową NH₂ o masach cząsteczkowych 750 i 5000 g/mol oraz PEG z tiolową grupą końcową o masie cząsteczkowej 800 g/mol. Końcowa efektywność przyłączenia PEGNH₂ 750, 5000 i PEGSH 800 do powierzchni HAP wynosi 38,34 %, 80,04 % oraz 12,13 %. W celu uzyskania efektywnej modyfikacji cząstek BG z L-lizyną, które były przedmiotem projektu GlassPoPep, wykonano dwuetapową modyfikację powierzchni cząstek BG. Wprowadzono grupy aminowe na powierzchnię BG w reakcji silanizacji APTS i następnie efektywnie przyłączono L-lizynę wykorzystując karbodiimidowy czynnik sprzęgający EDC i NHS. Wydajność reakcji szczipienia L-lizyny do powierzchni cząstek BG I z zastosowaniem czynników sprzęgających EDC i NHS wynosi 83,3 %.

Modyfikacja HAP za pomocą PEG zwiększyła dyspersję cząstek HAP w matrycy polimerowej. Zależność tą obserwowano zarówno dla HAP modyfikowanego PEG za pomocą L-lizyny oraz PDA. Zwilżalność kompozytów wyraźnie zwiększała się dla kompozytów PLLA z HAP modyfikowanym L-lizyną i PEG. W przypadku kompozytów HAP modyfikowanym PDA nie zaobserwowano różnicy w zwilżalności powierzchni PLLA/HAP. Kąt zwilżania dla kompozytów PLLA z cząstkami BG modyfikowanymi APTS i L-lizyną również był podobny co do wartości do PLLA/BG. Stwierdzono, iż jest to związane z obecnością silnie hydrofobowego APTS.

Modyfikacje powierzchni cząstek HAP poprawiły stabilność termiczną PLLA i kompozytów PLLA/HAP, co ma istotne znaczenie z perspektywy przetwarzania termicznego kompozytów w celu uzyskiwania spersonalizowanych konstrukcji kostnych.

Analiza wyników DSC wykazała, że HAP modyfikowany PEG aktywnie nukleuje krystalizację ze stopu PLLA z wydajnością zależną od rodzaju PEG i wybranego łącznika (L-lizyny lub PDA). Stwierdzono, że w obecności HAP modyfikowanego PEG2100, PLLA krystalizował ze stopu w postaci α , natomiast w obecności cząstek HAP modyfikowanych PEG600, PLLA krystalizował jako mieszanina faz α' i α . Wykazano także wpływ heterogenicznego efektu zarodkowania PDA na krystalizację ze stopu PLLA oraz istnienie silnych interakcji między cząsteczkami PDA i PLLA. Ponadto, potwierdzono efekt plastyfikujący od PEG na podstawie zmniejszenia wartości T_g i T_m PLLA. Te wyniki są istotne dla zastosowania kompozytów w medycynie regeneracyjnej jako rusztowań kostnych. Postać

krystaliczna PLLA istotnie wpływa na właściwości mechaniczne, a modyfikacja powierzchni HAP lub BG wykazuje różny przebieg degradacji hydrolitycznej.

Biodegradacja i biokompatybilność to bardzo ważne cechy dla zastosowań biomateriałów w inżynierii tkanki kostnej. W pracy pokazano, iż modyfikacja powierzchni cząstek ceramicznych zmienia profile degradacji hydrolitycznej w roztworze SBF czystej matrycy PLLA i kompozytów PLLA z niemodyfikowanym HAP. Immobilizacja L-lizyny, PDA i PEG na cząstkach ceramicznych wspiera proces mineralizacji kompozytów, z największą efektywnością dla cząstek HAP modyfikowanych PDA.

Z uwagi na potencjalne zastosowanie opisywanych materiałów pracę wzbogacono o podstawowe, przesiewowe badania *in vitro*, na podstawie których w dalszych etapach badań będą rozwijać potencjał przedstawionych w pracy kompozytów nie tylko pod kątem biologicznym, ale również pod kątem formowania kompozytów w porowate konstrukty kostne.

Badane kompozyty oparte na PLLA okazały się nietoksyczne wobec mysich fibroblastów L929 w teście redukcji MTT i nie zmniejszały żywotności ludzkich osteoblastów hFOB 1.19. Co ważne, potwierdzono, że wszystkie badane materiały kompozytowe są niepirogenne, ponieważ nie powodowały znaczącej aktywacji ludzkich komórek THP1-Blue™, systemu wykrywania stanu zapalnego za pośrednictwem monocytów/makrofagów. Biomateriały funkcjonalizowane L-lizyną i PEG lub PDA i PEG potwierdziły żywotność ludzkich osteoblastycznych komórek progenitorowych. Pod względem bezpieczeństwa biologicznego i cytozgodności dodatek L-lizyny, PDA oraz PEG do materiałów na bazie HAP stosowanych do regeneracji kości jest bardzo korzystny dla poprawy ich właściwości. Istotną apoptozę mysich fibroblastów i ludzkich osteoblastów zaobserwowano dla cząstek BG modyfikowanych APTS i L-lizyną. Na tym etapie badań uznano, że wynika to z zastosowanego testu oznaczenia MTT, który określa kontakt bezpośredni pomiędzy komórkami i badanym materiałem. Sedymentacja cząstek BG na komórkach ograniczyła dostęp tlenu do komórek w zaproponowanym badaniu. Według testu LDH metoda modyfikacji cząstek BG nie wpłynęła na cytotoksyczność materiałów i uzyskano wysoką przeżywalność ludzkich osteoblastów. Uznano, iż immobilizacja L-lizyny i polidopaminy na cząstkach ceramicznych może poprawiać właściwości osteoindukcyjne kompozytów, a badania pod tym kątem zaplanowano w kolejnych etapach.

V. WYNIKI I Dyskusja – Część II

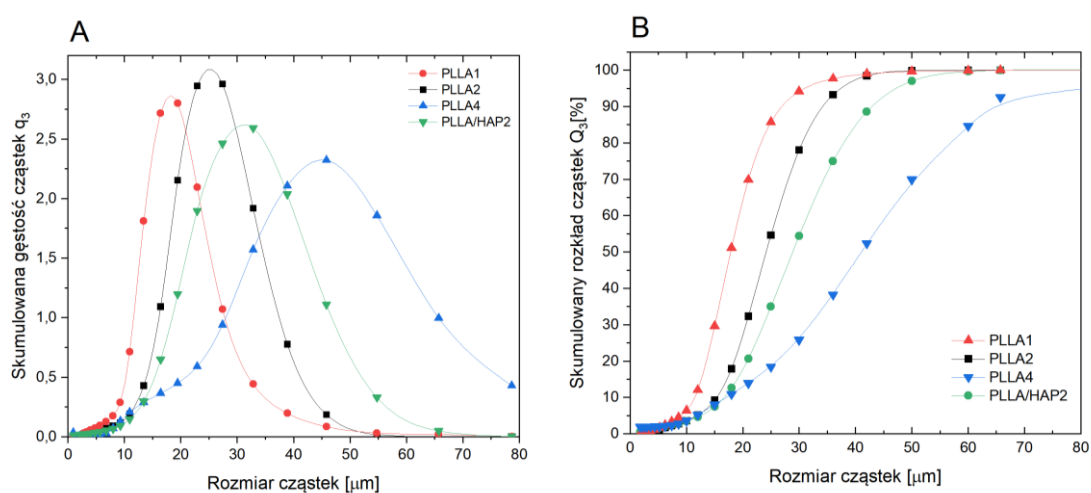
1. Charakterystyka past CPC/PLLA i analiza usieciowanych rusztowań kostnych CPC/PLLA

W tej części pracy przedstawiono wyniki badań dotyczących wytwarzania mikrosfer PLLA o średnicy poniżej 50 μm , przygotowanie past CPC/PLLA do druku 3D metodą wytłaczania oraz charakterystykę usieciowanych rusztowań CPC/PLLA, które mają potencjalne zastosowanie w inżynierii tkanki kostnej.

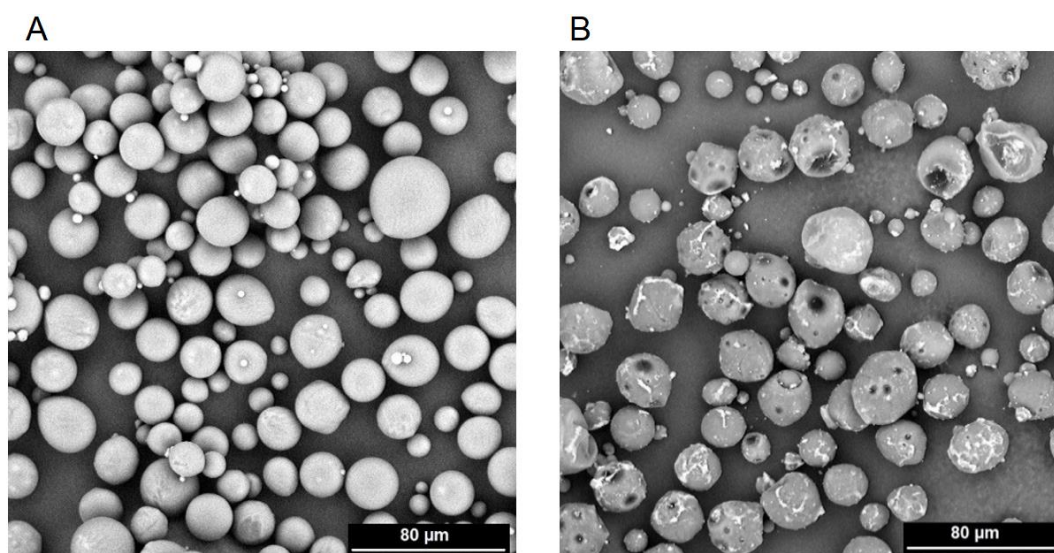
1.1. Charakterystyka mikrosfer polimerowych PLLA i PLLA-HAP

Mikrosfery PLLA oraz PLLA/HAP wytworzono metodą emulsyjną z odparowaniem rozpuszczalnika. Rozmiar mikrosfer kontrolowano trzema istotnymi parametrami: stężeniem roztworu polimerowego, stężeniem fazy wodnej (PVA w wodzie) oraz stosunkiem objętościowym fazy polimerowej do fazy wodnej. Badane stężenia roztworu polimerowego wynosiły początkowo 1, 2, 4 wag. %, stężenia fazy wodnej 0,5 i 1 wag. % oraz stosunki objętościowe fazy polimerowej do fazy wodnej 1:3 oraz 1:5. Zbadano łącznie 12 układów. Ostatecznie, najbardziej powtarzalne wyniki uzyskano dla stężenia fazy wodnej 1 % i stosunku objętościowego fazy polimerowej do fazy wodnej 1:3 [188]. Dla tych dwóch parametrów dostosowywano rozmiar mikrosfer trzecim parametrem, jakim jest stężenie roztworu polimerowego. Były dwa założenia dotyczące rozmiaru wytwarzanych mikrosfer: i) rozmiar mikrosfer z zakresu 20-80 μm , który jest optymalny do procesu druku 3D metodą SLS [189]; ii) rozmiar mikrosfer < 50 μm do past CPC/PLLA, który jest odpowiedni do wytłaczania ich przez dyszę o standardowo zdefiniowanej geometrii (\varnothing 410 μm). Mikrosfery PLLA i PLLA/HAP o większej średnicy wykorzystano do druku 3D dwuwiązkową metodą spiekania laserowego w projekcie „*Laser modification of bioresorbable polymeric materials in thermal processes of additive manufacturing*”, którego efektem są przedstawione publikacje w dorobku naukowym autora i nie są omawiane w rozprawie doktorskiej. Do wytwarzania rusztowań CPC/PLLA w ramach stażu w *Centre for Translational Bone, Joint and Soft Tissue* w Niemczech użyto mikrosfery PLLA o średnicy < 50 μm . Rozmiar mikrosfer przy stężeniu roztworu PLLA 1, 2, 4 % wag. badano z użyciem analizatora wielkości cząstek techniką suchej dyfrakcji laserowej, a wyniki przedstawiono na rysunku 64. Wszystkie rozkłady proszków można scharakteryzować jako symetryczne i jednomodalne. Najszerszy rozkład wielkości cząstek zaobserwowano dla PLLA4 (mikrosfery wytwarzane z roztworu PLLA o stężeniu 4 % wag.). Ostatecznie mikrosfery użyte do przygotowania past CPC/PLLA miały średnicę < 50

μm i otrzymywano je dozując kropla po kropli roztwór PLLA w DCM o stężeniu 2 % wag. (PLLA2) do roztworu PVA w wodzie (1 %) za pomocą pompy perystaltycznej, przy zachowaniu stosunku objętościowego tych faz 1:3. Mikrosfery PLLA/HAP2 użyto w badaniach degradacji hydrolytycznej w celu porównania procesu degradacji z mikrosferami PLLA2 i rusztowaniami CPC/PLLA. Mikrosfery PLLA2 charakteryzują się następującym rozkładem wielkości: $d_{0,1} = 15,26 \mu\text{m}$, $d_{0,5} = 24,17 \mu\text{m}$, $d_{0,9} = 34,71 \mu\text{m}$. Rozkład wielkości mikrosfer kompozytowych jest następujący: $d_{0,1} = 16,48 \mu\text{m}$, $d_{0,5} = 28,86 \mu\text{m}$, $d_{0,9} = 43,33 \mu\text{m}$.



Rysunek 64. Rozkład rozmiaru mikrosfer PLLA i PLLA/HAP.



Rysunek 65. Obrazy SEM mikrosfer PLLA2 (A) i mikrosfer kompozytowych PLLA/HAP2 (B).

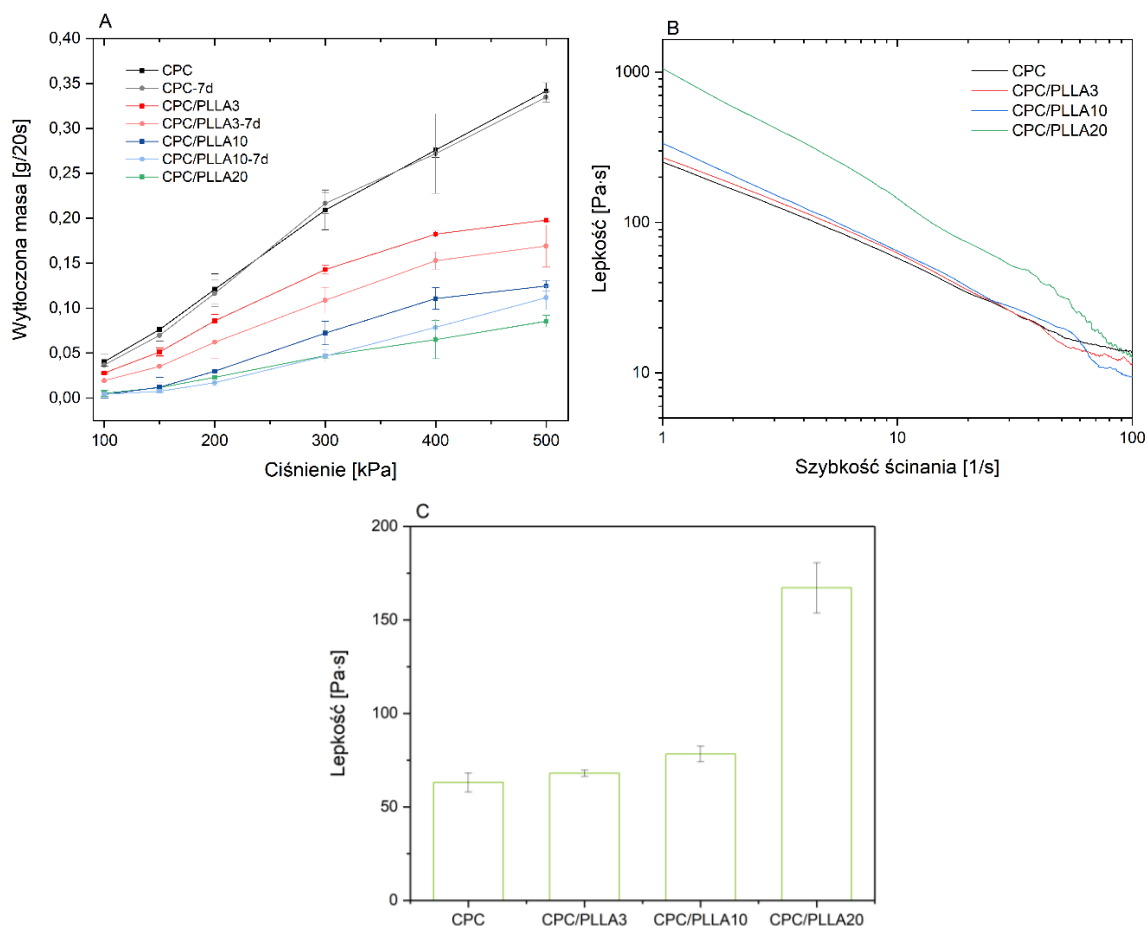
Obrazy SEM dla PLLA2 i PLLA/HAP2 przedstawiono na rysunku 65 odpowiednio a i B. Mikrosfery PLLA charakteryzują się kulistym kształtem o gładkiej i jednorodnej powierzchni, co przekłada się na lepszą sypkosć i dużą gęstość upakowania proszku dla

procesów przetwórczych. Mikrosfery kompozytowe mają widoczne wtrącenia od ziaren HAP. W porównaniu do PLLA, mikrosfery PLLA/HAP mają zmniejszoną sferyczność i gładkość powierzchni. Co więcej, widoczne są pory w niektórych mikrosferach PLLA/HAP2.

1.2. Właściwości reologiczne past CPC/PLLA

Przygotowano układy CPC/PLLA z zawartością mikrosfer PLLA 0, 3, 10, 20 % wag. (tabela 4, rozdz. III, 3.2). Pasty CPC można przechowywać przez lata, o ile nie jest narażona na działanie wody lub wilgotnej atmosfery [73]. Aby zbadać wpływ PLLA na trwałość past zmierzono ich profile wytłaczania przez dyszę drukarki 3D bezpośrednio po przygotowaniu i po 7 dniach przechowywania (rysunek 66 A). Profil wytłaczania określano przez pomiar wytłoczonej masy w ciągu 20 s przez dyszę o średnicy 410 μm . Profil wytłaczania czystej pasty CPC charakteryzuje się liniowym nachyleniem bezpośrednio po wytłaczaniu i po 7 dniach przechowywania, co wskazuje, że masowe natężenie przepływu wzrastało liniowo wraz ze wzrostem ciśnienia powietrza. Materiały kompozytowe CPC/PLLA charakteryzują się mniejszą płynnością i zauważalne jest pogorszenie profilu wytłaczania po 7 dniach ich przechowywania. Dla kompozytu CPC/PLLA20 nie udało się zmierzyć profilu wytłaczania po 7 dniach, pasta miała zbyt dużą lepkość.

Charakterystyka płynięcia i lepkość past CPC jest istotna. Podczas procesu druku ważne jest, aby pasta była wytłaczana przy możliwie niskich naprężeniach ścinających przez głowicę drukującą, bez separacji faz proszek-ciecz podczas procesu druku, co zależy głównie od odpowiednich właściwości reologicznych past CPC [190]. Właściwości reologiczne materiałów opisują ich zdolność do reagowania na siły ścinające. W druku ekstruzyjnym materiały są narażone na okresowo zmieniające się naprężenia ścinające, które zależą od materiału igły (dyszy), średnicy igły oraz od przepływu masowego. Aby zrozumieć zmiany fizykochemiczne materiałów viskoelastycznych podczas wytłaczania i po wytłaczaniu, należy dokładnie ocenić ich reologię. Lepkość tuszów jest najważniejszym parametrem dla procesów druku metodą wytłaczania. Materiał o zbyt niskiej lepkości musi być stabilizowany zewnątrz, aby zachować kształt, podczas gdy materiał o dużej lepkości nie będzie płynął i można zachować kształt naniesionego pasma. Materiały nadające się do druku 3D metodą wytłaczania zmniejszają swoją lepkość wraz ze wzrostem szybkości ścinania i nazywane są pseudoplastycznymi (rozrzedzane ścinaniem), które można opisać modelem potęgowym [191].

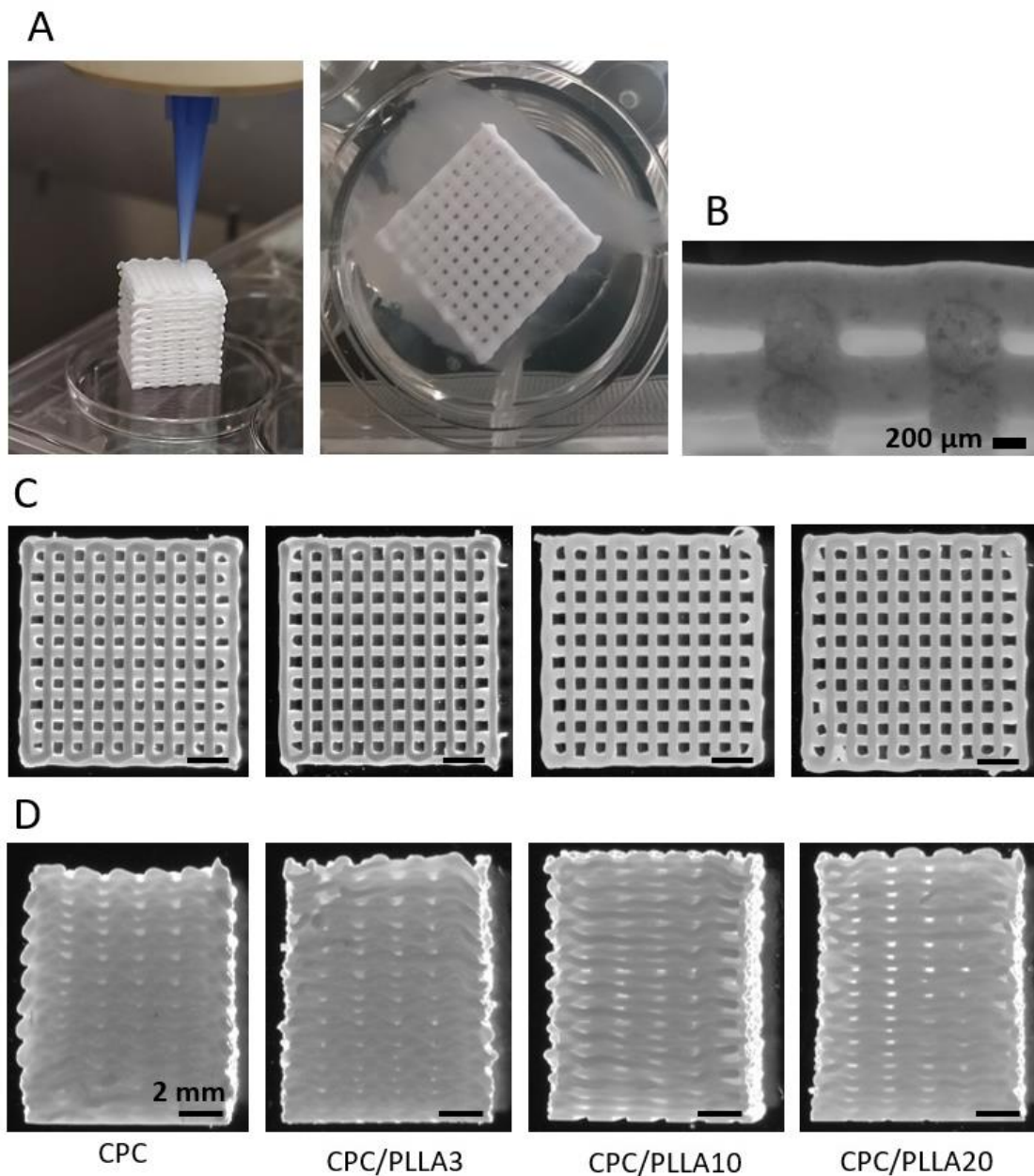


Rysunek 66. Profile wytłaczania past CPC/PLLA bezpośrednio po przygotowaniu i po 7 dniach przechowywania (A). Właściwości reologiczne past CPC/PLLA: zależność lepkości od szybkości ścinania (B), lepkość przy stałej szybkości ścinania 10 s^{-1} (C).

Aby ocenić przydatność past do kreślenia 3D, zbadano właściwości reologiczne przy rosnących szybkościach ścinania (rysunek 66 B). Wszystkie pasty wykazywały właściwości rozrzedzania ścinaniem (pseudoplastyczne), co jest najważniejszą właściwością materiałów bazowych do druku 3D opartego na wytłaczaniu. Zgodnie z oczekiwaniami, lepkość past CPC/PLLA była zależna od stężenia wagowego PLLA. Wraz ze wzrostem zawartości PLLA w układach zwiększała się lepkość przygotowanych past, co potwierdzają także wyniki dotyczące profilu wytłaczania. Zatem układ CPC/PLLA20 wykazał najwyższą lepkość, następnie CPC/PLLA10, CPC/PLLA3 i CPC. W celu dalszego porównania past CPC/PLLA oceniono lepkość past przy stałej szybkości ścinania 10 s^{-1} , co ma zastosowanie do oceny zachowania materiału podczas wytłaczania (rysunek 66 C). Lepkość pasty CPC wyniosła $63,1 \pm 5,1 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ i była niższa w porównaniu z CPC/PLLA3 ($68,0 \pm 1,8 \text{ Pa}\cdot\text{s}$), CPC/PLLA10 ($78,3 \pm 4,2 \text{ Pa}\cdot\text{s}$) i CPC/PLLA20 ($167,1 \pm 13,4 \text{ Pa}\cdot\text{s}$).

1.3. Obrazowanie rusztowań CPC/PLLA

Lepkość i charakter pseudoplastyczny past CPC/PLLA pozwoliły na druk 3D metodą wytłaczania trójwymiarowych rusztowań w celu zastosowania ich jako materiały implantacyjne do inżynierii tkanki kostnej. Rusztowania CPC/PLLA wykreślono z orientacją 90° (warstwa do warstwy) z odstępem między pasmami materiału 1,0 mm. Następnie rusztowania zostały usieciowane w atmosferze pary wodnej. Obrazy z przygotowania rusztowań, rusztowań bezpośrednio po usieciowaniu i obrazy ze stereomikroskopu (widok z góry i z boku) przedstawiono na rysunku 67 A-D.

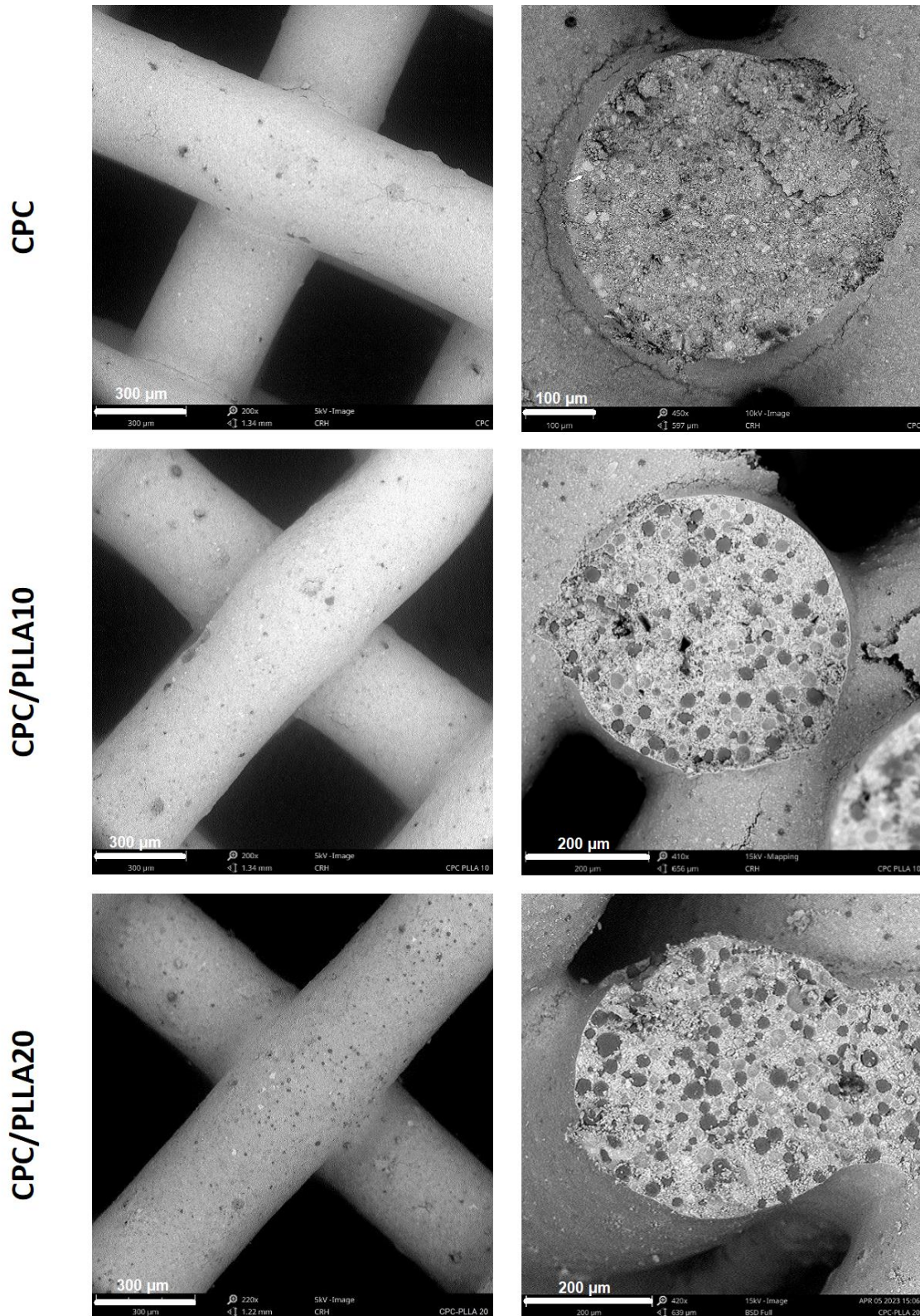


Rysunek 67. Rusztowania CPC i CPC/PLLA w trakcie wytłaczania i po usieciowaniu (A). Obrazy ze stereomikroskopu usieciowanych rusztowań CPC/PLLA, widok z boku (B), widok z góry (C), widok z boku większych próbek (D).

Na rysunku 67 A przedstawiono rusztowania CPC/PLLA w trakcie procesu druku oraz po usieciowaniu. Zauważalna jest faza olejowa, która wypłynęła na zewnątrz w trakcie wiązania pasty CPC. Rysunki 67 B-D przedstawiają obrazy stereomikroskopowe z widokiem bocznym, z góry oraz z widokiem bocznym dużych próbek. Dokładność odwzorowania kształtu rusztowań CPC/PLLA3, 10 i 20 jest porównywalna. Wytłoczone pasma nie różnią się znacząco szerokością w całym obszarze rusztowania. Utworzone makropory są łatwo zauważalne i charakteryzują się prostokątną budową (widok z góry). Rozmiar porów zwiększa się wraz ze wzrostem stężenia PLLA w układach. Jest to związane z większą lepkością past CPC/PLLA co potwierdzają pomiary reologiczne. Średni rozmiar makroporów w kompozytach CPC jest równy $422 \pm 46 \mu\text{m}$, następnie dla kompozytów odpowiednio CPC/PLLA3, CPC/PLLA10 i CPC/PLLA20 rozmiar makroporów jest równy $479 \pm 51 \mu\text{m}$, $541 \pm 34 \mu\text{m}$ i $544 \pm 20 \mu\text{m}$. W każdym układzie CPC/PLLA uzyskano porowatość boczną, a tym samym sieć wzajemnie połączonych porów w całym rusztowaniu. Rusztowania z czystej pasty CPC różnią się od układów kompozytowych. Szersze pasma CPC wpływają na mniej prostokątną strukturę makroporów. W dużych próbkach CPC (wysokość $\sim 15 \text{ mm}$, 47 warstw, rys. 67 D) obserwuje się zapadanie wykreślonych dolnych pasm pod wpływem własnego ciężaru. Powoduje to obniżenie założonej wysokości rusztowania i zmniejszoną porowatość w osi XY w dolnych warstwach. Dodatek 10 % wag. PLLA powoduje wzrost lepkości pasty CPC i utworzenie stabilnego rusztowania z otwartą makroporowatością we wszystkich trzech kierunkach XYZ.

Za pomocą mikroskopii SEM obrazowano rusztowania CPC i CPC/PLLA w celu zinterpretowania tekstury powierzchni rusztowań i mikrostruktury w przekroju poprzecznym (rysunek 68). Rusztowania CPC charakteryzują się zdecydowanie gładszą powierzchnią niż CPC/PLLA. Nie zaobserwowano znaczących mikropęknięć w teksturze CPC, głównie z uwagi na sposób wiązania CPC. Według Akkineni A.R. i in. [75] rusztowania CPC sieciowane w atmosferze pary wodnej mają zdecydowanie mniej mikropęknięć niż rusztowania CPC sieciowane poprzez zanurzenie w wodzie. Powierzchnia rusztowań kompozytowych przy zawartości 10 i 20 % wag. PLLA ma charakterystyczne wgłębienia wskazujące na obecność mikrosfer PLLA w pasmach. Taka pofalowana powierzchnia może sprzyjać osadzeniu się komórek. W przekroju poprzecznym pasm zaobserwowano jasne wgłębienia i ciemne wypukłości. Ciemne miejsca oznaczają mikrosfery PLLA, z kolei jasne oznaczają miejsca, z których mikrosfery wypadły w momencie złamania próbki przed obrazowaniem. Wskazuje to na słabą adhezję pomiędzy PLLA i CPC. Z uwagi na zbyt małą rozdzielczość aparatu SEM nie udało się zobrazować krystalitów HAP przy dużych powiększeniach ($<10\ 000$). Można

jednak przypuszczać, że włączenie PLLA do struktury CPC nie utrudnia tworzenia CHDA, podobnie jak włączenie MBG do struktury CPC w pracy Richtera R.F. i in. [117].



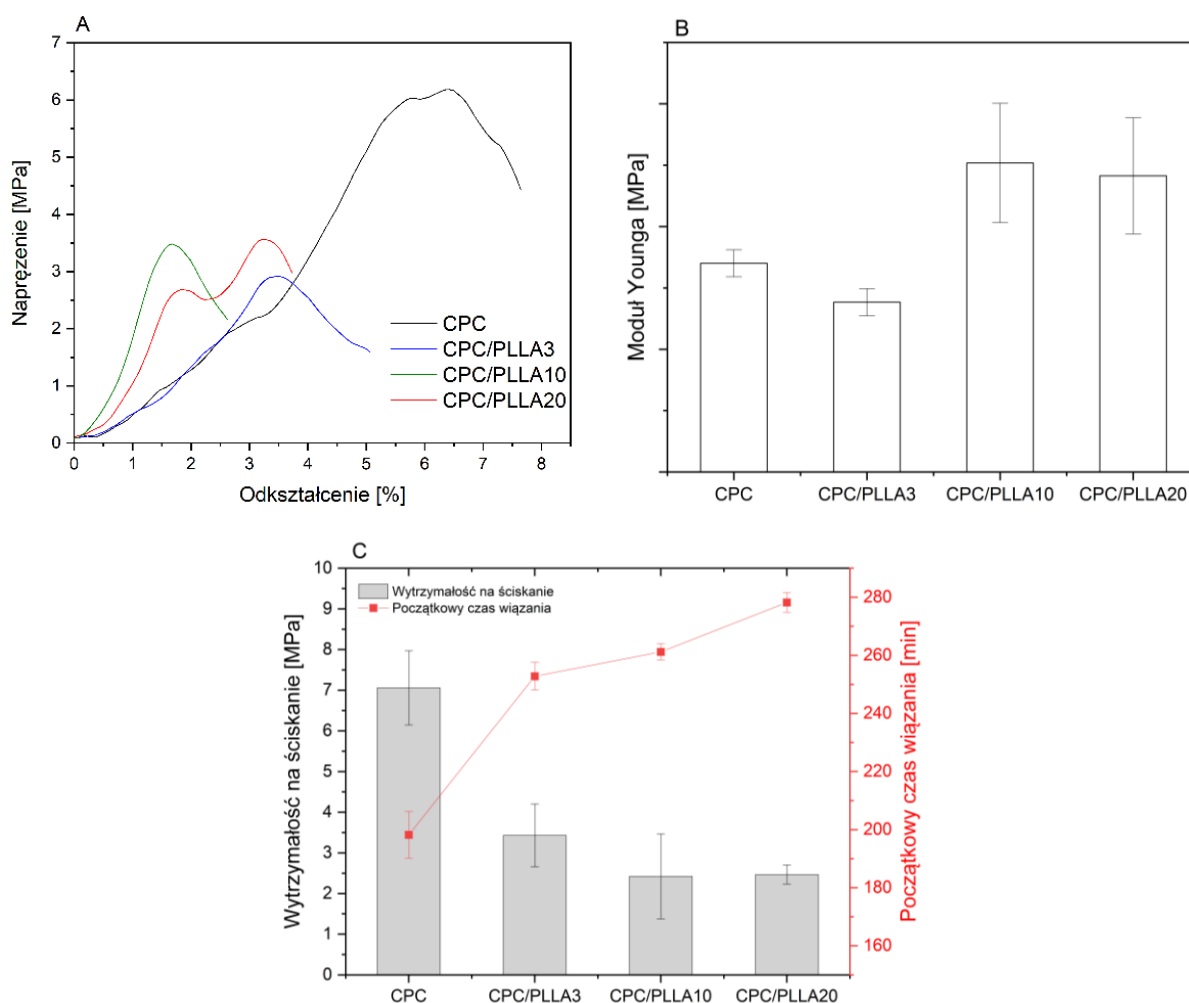
Rysunek 68. Obrazy SEM dla CPC i CPC/PLLA 10 i CPC/PLLA 20.

1.4. Właściwości mechaniczne kompozytów CPC/PLLA

Wytrzymałość na ściskanie, związana z zastosowaniami klinicznymi, była wskazaniem do pomiaru zdolności do przenoszenia obciążeń rusztowania po związaniu. Właściwości mechaniczne rusztowań zbadano za pomocą testów jednoosiowego ściskania, przyjmując jako kontrolę czyste rusztowania CPC o tej samej geometrii. Zależność naprężenia od odkształcenia, wartości modułu Younga, wytrzymałości na ściskanie i początkowego czasu wiązania pokazano na rysunku 69. Dla wszystkich rusztowań zaobserwowano obszar liniowo-sprężystej deformacji, który wyraźnie kończył się pęknięciem. Rusztowania CPC i CPC/PLLA20 wykazywały ponownie rosnące naprężenie ściskające wraz ze wzrostem odkształcenia, aż do ponownego zniszczenia rusztowania. Moduł Younga i wytrzymałość na ściskanie analizowano z pierwszego obszaru liniowego. Wytrzymałość na ściskanie jest równa $7,06 \pm 0,91$ MPa, $3,43 \pm 0,77$ MPa, $2,42 \pm 1,04$ MPa i $2,47 \pm 0,23$ MPa odpowiednio dla rusztowań CPC, CPC/PLLA3, CPC/PLLA10 i CPC/PLLA20. Dodatek 3 % wag. mikrosfer PLLA powoduje zmniejszenie wytrzymałości na ściskanie o 51,4 %. PLLA w ilości 10 i 20 % wag. powoduje zmniejszenie wytrzymałości na ściskanie o ok. 65 %. Analizując wpływ PLLA na moduł odkształcalności liniowej zaobserwowano, że PLLA w ilości 10 i 20 % wag. powoduje wzrost wartości tego modułu. Moduł Younga wynosi $100,34 \pm 6,47$ MPa, $81,65 \pm 6,55$ MPa, $148,55 \pm 28,65$ MPa i $142,35 \pm 27,86$ MPa odpowiednio dla rusztowań CPC, CPC/PLLA3, CPC/PLLA10 i CPC/PLLA20. Zmiana właściwości mechanicznych wskazuje na istotny wpływ mikrosfer PLLA i słabą adhezję pomiędzy CPC i mikrosferami PLLA. Według Wu R. i in [192] którzy badali układy lite CPC/PLGA również zaobserwowali zmniejszenie wytrzymałości na ściskanie o około 50 % po dodaniu PLGA.

Wpływ dodatku PLLA na początkowy czas wiązania pasty CPC określono według testu Gilmore'a w atmosferze pary wodnej (wilgotność > 95 %). Woda penetrująca strukturę pasty CPC wymywa nośnik będący mieszkanką olejową, co prowadzi do wydłużonego czasu wiązania w porównaniu do past opartych wyłącznie na proszku CPC i wodzie. Czas wiązania dla zastosowanej w pracy pasty CPC wynosi 198 ± 8 min i następnie 253 ± 5 min, 261 ± 3 min i 278 ± 4 min odpowiednio dla układów CPC/PLLA3, CPC/PLLA10 i CPC/PLLA20. Dodatek PLLA powoduje wydłużenie początkowego czasu wiązania kompozytów. Nie określono końcowego czasu wiązania, jednak po 3 dniach inkubacji próbek w atmosferze pary wodnej wszystkie kompozyty były związane i utwardzone. Wpływ PLLA na początkowy czas wiązania CPC można wyjaśnić przedłużającą się hydratacją wynikającą ze zwiększenia się względnych stosunków ciała stałego do cieczy w układzie. Według Wu R. i in. [192] twerdnienie CPC

związane jest z nagromadzeniem kryształów HAP. Mikrosfery polimerowe zmniejszą kontakt pomiędzy komponentami, co zaburza proces tworzenia się kryształów HAP.

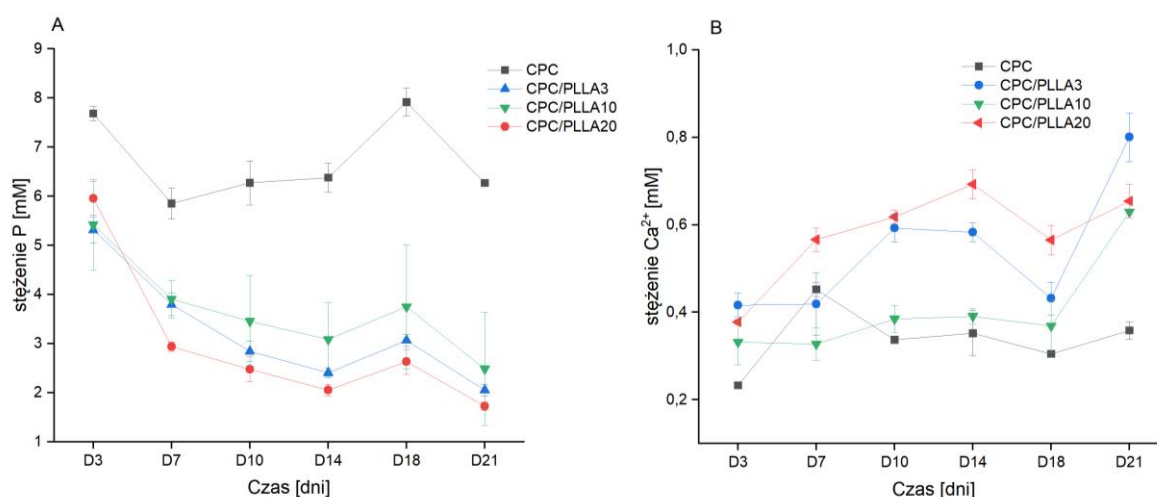


Rysunek 69. Zależność naprężenia i odkształcenia (A), moduł Younga (B), wytrzymałość na ściskanie i początkowy czas wiązania kompozytów CPC, CPC/PLLA (C).

1.5. Uwalnianie jonów wapnia i fosforu oraz degradacja *in vitro* kompozytów CPC/PLLA

Wyższe stężenia PLLA w kompozytach CPC/PLLA powinny przyspieszać czas całkowitej degradacji rusztowań oraz wpływać na ilość uwalnianych jonów bioaktywnych wapnia i fosforu. Rusztowania CPC i CPC/PLLA inkubowano w medium komórkowym DMEM przez 21 dni z całkowitą wymianą supernatantów w dniu 3, 7, 10, 14, 18 i 21. Wykresy uwalniania jonów wapnia i fosforu pokazano na rysunku 70. Krzywe wskazują, że oba jony były uwalniane w sposób ciągły, co wskazuje na stałe uwalnianie jonów z rusztowań. Profile uwalniania jonów fosforu dla rusztowań CPC i CPC/PLLA są podobne. Najwięcej jonów fosforu zostało uwolnionych z czystych rusztowań CPC, a najmniej z rusztowań zawierających

20 % wag. PLLA. Jest to zgodne z oczekiwaniami ponieważ rusztowania CPC to 100 % wag. fosforanów wapnia, których ilość zmniejsza się wraz ze wzrostem stężenia PLLA. Najwięcej jonów fosforu we wszystkich materiałach zostało uwolnione bezpośrednio po zanurzeniu rusztowań w medium, w 3 dniu. Następnie ilość uwolnionych jonów fosforu maleje, z wyjątkiem dla CPC w dniu 18. Profile uwalniania jonów wapnia dla wszystkich rusztowań są zbliżone i również wykazują ciągłe uwalnianie jonów przez 21 dni z tendencją rosnącą. Wbrew oczekiwaniom, najwięcej jonów wapnia wydziela się z kompozytów z zawartością PLLA. Może mieć to związek z obecnością wolnych przestrzeni na granicy faz CPC i PLLA i jednocześnie z łatwiejszą ingerencją roztworu medium komórkowego wewnątrz pasm CPC co w konsekwencji ułatwia uwalnianie jonów wapnia.



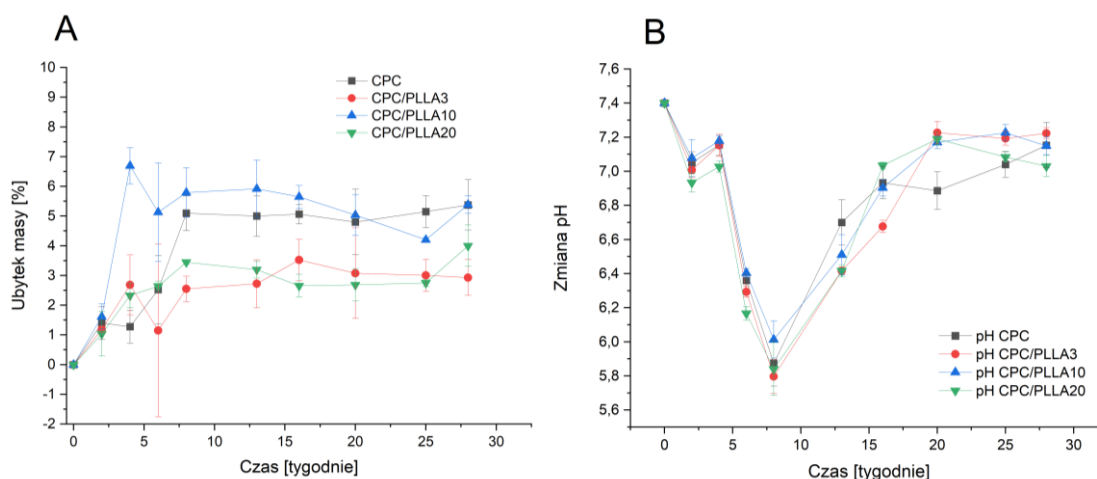
Rysunek 70. Uwalnianie jonów fosforu (A) i jonów wapnia (B) z rusztowań CPC zawierających mikrosfery PLLA (3-20 %) do roztworu DMEM, oznaczane ilościowo za pomocą ICP-OES. Wyniki przedstawiają średnie wartości stężeń jonów \pm SD, $n = 3$.

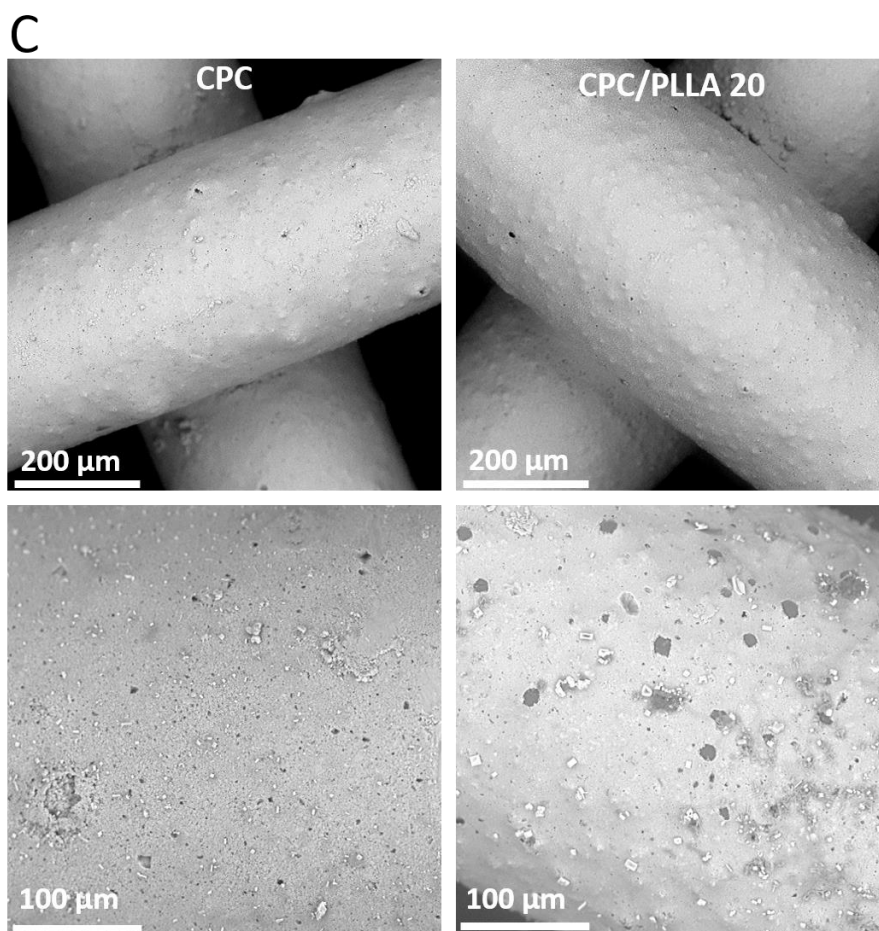
Głównym celem, który chciałam osiągnąć w tym projekcie, było zbadanie degradacji hydrolytycznej mikrosfer PLLA i kompozytowych mikrosfer PLLA/HAP o wielkości do 50 μ m oraz porównanie ich profili degradacji hydrolytycznej do rusztowań składających się z CPC z osadzonymi mikrosferami PLLA. Analizowano postawioną hipotezę badawczą, czy dodatek mikrosfer PLLA do CPC pozwoli na szybszą degradację rusztowań w celu tworzenia nowych makroporów – dodatkowych powierzchni do adhezji komórek. Z punktu widzenia zastosowań biomedycznych niezwykle istotna jest szczegółowa analiza degradacji w środowisku symulowanego płynu ustrojowego (SBF). Stężenia jonów i pH SBF są takie same jak w osoczu ludzkiej krwi, dlatego SBF jest najczęściej stosowanym roztworem do analizy degradacji biomateriałów w warunkach statycznych. Oprócz pomiarów uwalniania/pobierania jonów wapnia i fosforu w czasie, dla rusztowań CPC i CPC/PLLA mierzono również pH i masę trzech

grup materiałów aby wyciągnąć wnioski na temat ich bioaktywności (wytrącania się fosforanów wapnia na powierzchni).

Eksperyment degradacji hydrolytycznej przeprowadzono w roztworze SBF dla czystych mikrosfer PLLA, mikrosfer PLLA/HAP (10 % wag. HAP) i rusztowań CPC i CPC/PLLA o zawartości 3, 10 i 20 % wag. PLLA. Analizowano zmianę pH roztworów i masy próbek trzech grup materiałowych. Eksperyment zaplanowano na 28 tygodni z wymianą roztworów 1 raz w tygodniu. Wyniki ubytku masy i zmiany pH roztworów SBF dla odcinków czasowych 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 28 [tygodni] przedstawiono na rysunku 71. Mikrosfery PLLA i PLLA/HAP dodatkowo badano za pomocą DSC w celu analizy wpływu czasu degradacji mikrosfer na T_g i T_m PLLA.

Ubytek masy CPC i kompozytów CPC/PLLA ma tendencję rosnącą do 8 tygodnia, następnie do 28 tygodnia nie zaobserwowano znaczących zmian (rys. 71 A). W 28 tygodniu całkowity ubytek masy CPC wyniósł $5,4 \pm 0,8$ %, natomiast dla CPC/PLLA3, CPC/PLLA10 i CPC/PLLA20 wynosił odpowiednio $2,9 \pm 0,6$ %, $5,4 \pm 0,3$ % i $4,0 \pm 0,7$ %. Wartości pH roztworów pobranych z CPC i CPC/PLLA 3, 10, 20 pokazują taką samą tendencję w czasie niezależnie od zawartości mikrosfer PLLA (rys. 71 B). Do 8 tygodnia eksperymentu zaobserwowano znaczne zmniejszenie wartości pH z 7,4 do 5,8, a następnie liniowy wzrost wartości pH do ok. 7 – 7,3 i stabilizację pH od około 20 tygodnia do końca czasu eksperymentu. Na podstawie wartości ubytku masy i wartości pH można stwierdzić, że do 8 tygodnia następuje degradacja rusztowań co potwierdzają zarówno wzrost ubytków masy oraz wyraźne zmniejszenie wartości pH. Po tym czasie materiały indukują proces mineralizacji na powierzchni, co potwierdza ich charakter bioaktywny. Wyniki te sugerują również, że biomineralizacja może wymagać początkowego okresu zarodkowania minerałów. Degradacja rusztowań jest związana z uwolnieniem jonów fosforu i wapnia, co potwierdzają wyniki ICP.





Rysunek 71. Profile degradacji *in vitro* w roztworze SBF dla rusztowań CPC i CPC/PLLA: zmiana masy (A), zmiana pH (B). Obrazy SEM dla CPC i CPC/PLLA 20 po 28 tygodniach degradacji *in vitro* (C).

Na rysunku 71 C pokazano obrazy SEM dla CPC i CPC/PLLA 20 po 28 tygodniach inkubacji w SBF. Zaobserwowano, że powierzchnie CPC nie ulegają znaczącym zmianom w czasie doświadczenia. Układy CPC/PLLA20 charakteryzują się chropowatą powierzchnią z uwagi na obecność PLLA w pasmach, tak jak to pokazano na obrazach SEM wykonanych przed procesem degradacji (rys. 68). Po 28 tygodniach degradacji *in vitro* obecne są na powierzchni tych kompozytów odkryte mikrosfery PLLA ale tylko w niektórych miejscach kompozytów. Zdecydowana większość mikrosfer PLLA pozostała wewnątrz CPC nienaruszona. W obu przypadkach zaobserwowano na powierzchni pasm osadzenie się kryształów apatytu o stosunku Ca/P $1,45 \pm 0,05$. Choć tekstura powierzchni w rusztowaniach kompozytowych jest chropowata i może ułatwiać adhezję komórek kościotwórczych, to nie osiągnięto zamierzonego efektu związanego z degradacją PLLA w kompozytach. Aby uzyskać makroporowatość wykreślonych pasm najpierw powierzchnia fosforanów wapnia powinna ulec resorpcji, tak aby mikrosfery PLLA mogły zacząć degradować, a ten proces trwa zdecydowanie dłużej niż 28 tygodni. W przypadku kompozytów z dużą zawartością PLLA (20

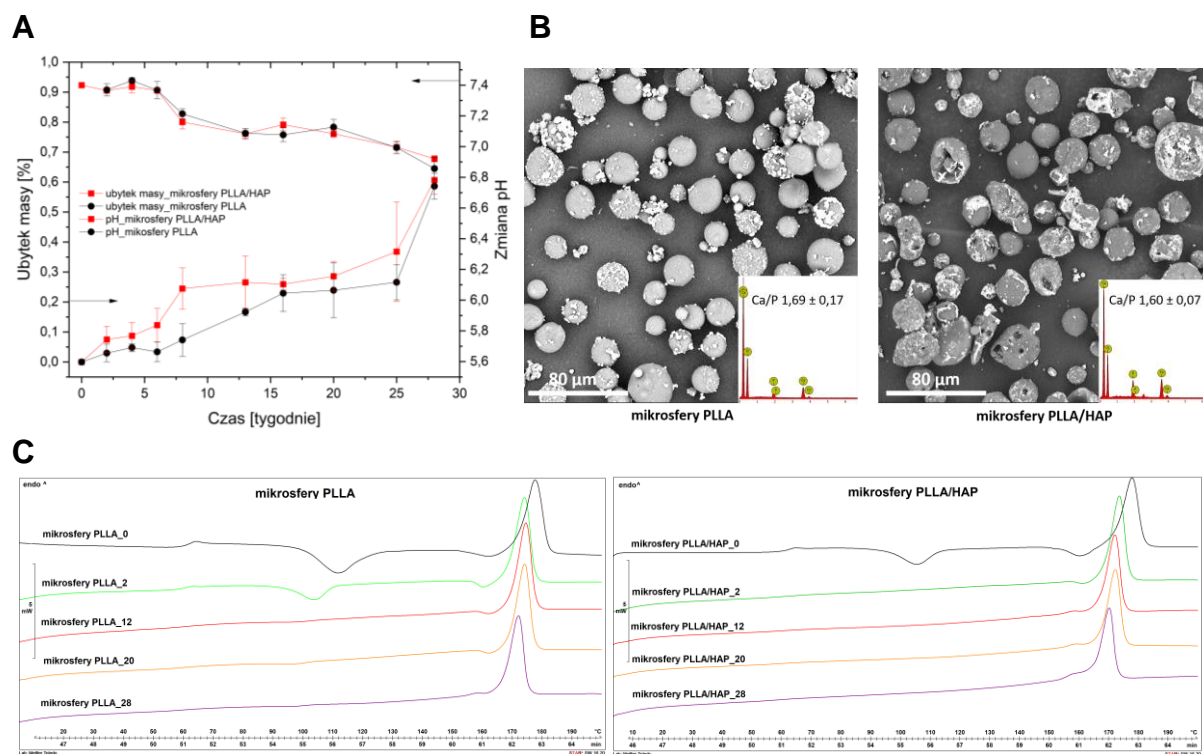
% wag.) proces ten prawdopodobnie będzie najszybszy. W literaturze przyjmuje się, że związane konstrukty CPC są stabilne i ulegają bardzo wolnej resorpcji. Ahlfeld T. i in. [193] w badaniach dotyczących dwufazowych rusztowań 3D opartych na fosforanie wapnia CPC i hydrożelu z alginianu i gumy gellanowej (AlgGG) obciążonych czynnikiem angiogennym VEGF wykazali pełną stabilność *in vivo* rusztowań kontrolnych CPC bez wyraźnych śladów degradacji w czasie 12 tygodni. Ponadto pokazali tworzenie nowej kości w miejscach kontaktu rusztowań CPC z kością żywiciela potwierdzając doskonałą biokompatybilność i aktywność osteoklastów w bezpośrednim kontakcie z materiałem. Habraken W. i in. [194] otrzymywali układy CPC z 20 % zawartością mikrosfer PLGA (~150 μm) jako cylindryczne materiały kompozytowe o wymiarach 4,5 x 9 mm, z zastosowaniem roztworu Na₂HPO₄ w H₂O jako nośnika ciekłego. Wykorzystali PLGA o masie molowej ~ 50 000 g/mol ze stosunkiem laktydu do glikolidu 54:46. Analizowali degradację materiałów *in vivo* po wszczepieniu kompozytów w kości czaszki królikom doświadczalnym. W trakcie eksperymentu obserwowali zmniejszenie masy cząsteczkowej PLGA i wytrzymałości na ściskanie kompozytów. Po 12 tygodniach implantacji zaobserwowali całkowitą degradację PLGA w masie kompozytu.

W przeciwieństwie do PLGA, PLLA degradowuje zdecydowanie dłużej. Na rysunku 72 A przedstawiono zmianę wartości pH i masy dla mikrosfer PLLA i PLLA/HAP. Profile degradacji mikrosfer pokazują taką samą tendencję niezależną od obecności HAP. Zmiana pH dla obu materiałów jest ciągła od 7,4 do 6,9 w 28 tygodniu doświadczenia. Podczas degradacji PLLA, cząsteczki o długim łańcuchu są rozkładane na krótsze łańcuchy. Cząsteczki o mniejszej masie molowej w produktach degradacji PLLA mają charakter kwasowy, dlatego PLLA zwykle ulega autokatalizowanej degradacji spowodowanej wytwarzaniem kwaśnych produktów degradacji, co skutkuje wzmożoną degradacją [195].

Ubytek masy tych materiałów pokazuje tendencję rosnącą, który w 28 tygodniu wynosi $0,59 \pm 0,05$ % dla PLLA i $0,61 \pm 0,04$ % dla PLLA/HAP. Wyniki te potwierdzają brak znaczącego wpływu PLLA na degradację *in vitro* kompozytów CPC/PLLA w badanym okresie czasowym. Mikrosfery kompozytowe charakteryzują się nieco większym ubytkiem masy we wszystkich odcinkach czasowych eksperymentu, co może wynikać z wypłukiwania się cząstek HAP z mikrosfer PLLA, które następnie zostały odwirowane i usunięte podczas zmiany roztworu. Inne przypuszczenie związane jest z wzmożonym indukowaniem mineralizacji przez mikrosfery PLLA, bardziej niż PLLA/HAP, co może zakłócać stosunek ubytków mas. Jak dotąd, nie potwierdzono stopnia mineralizacji mikrosfer ilościowo. Otrzymane wyniki ubytku masy są niewielkie, oscylują poniżej 1 % wag. Obrazy SEM na rys. 72 B wraz z analizą EDS przedstawiają mikrosfery PLLA i PLLA/HAP po 28 tygodniach degradacji *in vitro*. Mikrosfery

PLLA zostały pokryte losowo apatytem o stosunku Ca/P $1,69 \pm 0,17$. Nie zaobserwowano istotnej różnicy w wyglądzie mikrosfer PLLA/HAP przed i po degradacji *in vitro*. Jednak zastosowany HAP podczas formowania mikrosfer kompozytowych miał stosunek Ca/P 1,67, natomiast po eksperymencie degradacji w 28 tygodniu warstwy apatyty charakteryzowały się stosunkiem Ca/P równym $1,60 \pm 0,07$ ($n = 12$). Wartości te wskazują, iż HAP działa jako nukleant do powstawania kryształów hydroksyapatytu z niedoborem wapnia o mniejszym stosunku Ca/P [54]. Na podstawie analizy DSC (rys. 72 C) dla mikrosfer PLLA i PLLA/HAP odnotowano zmniejszenie wartości T_g i T_m wraz z czasem degradacji (tabela 19). Wartości T_g dla PLLA zmniejszają się od 62,3 do 60,0 °C, podczas gdy dla PLLA/HAP wartości T_g zmniejszają się od 62,6 do 60,0 °C. Podobnie, wartości T_m dla PLLA zmniejszają się od 177,4 do 171,8 °C oraz dla PLLA/HAP od 177,6 do 169,8 °C. Szybkość degradacji PLLA można kontrolować różnymi technikami, np. kopolimeryzacją z glikolidem lub plastyfikacją. Zmniejszenie wartości T_g wskazuje na efekt plastyfikujący od wody penetrującej strukturę PLLA podczas procesu degradacji. Oprócz wyraźnego przesunięcia temperatury zeszklenia i pików temperatury topnienia w kierunku niższych temperatur dla obu tych materiałów zaobserwowano zmniejszenie wartości temperatury pików zimnej krystalizacji i następnie zanik zimnej krystalizacji po 2 tygodniach eksperymentu dla czystego PLLA, natomiast dla PLLA/HAP przed 2 tygodniem doświadczenia. Wyniki te wskazują na wzrost stopnia krystaliczności PLLA w trakcie degradacji, który jest bezpośrednio związany ze wzrostem wartości entalpii topnienia fazy krystalicznej. Wzrost stopnia krystaliczności dowodzi, iż degradacja semikrystalicznych poliestrów rozpoczyna się w obszarach amorficznych. Zmniejszenie wartości T_m wskazuje na większą ruchliwość makrocząsteczek, która pozwala na reorientację w niższych temperaturach i wynika z powstawania krótszych łańcuchów polimerowych [195,196]. Dodatkowo, krótsze łańcuchy makrocząsteczek łatwiej krystalizują co również wpływa na zwiększenie wartości entalpii topnienia PLLA w mikrosferach PLLA i PLLA/HAP. Ponadto, na zwiększenie wartości ΔH_m PLLA w trakcie eksperymentu może wpływać wzrost kryształów apatyty, które nukleują krystalizację PLLA ze stopu. W celu analizy zmiany masy molowej PLLA w trakcie degradacji *in vitro* planowane są w przyszłości badania chromatografii żelowej GPC. Na podstawie badań chromatografii żelowej grupa Yang F. i in. [195] oszacowała masę molową PLLA (Resomer L207S, użyty także w tym doświadczeniu) wynoszącą ~ 195000 g/mol (M_w/M_n 1,74). Przeprowadzili badania degradacji hydrolytycznej w roztworze PBS dla mikrosfer PLLA zawierających cząstki magnezu oraz lek BSA. Wybrali PLLA o wysokiej masie cząsteczkowej w celu wyeliminowania wpływu degradacji polimeru na szybkość uwalniania leku. Eksperyment trwał 28 dni. Dla czystych

mikrosfer PLLA odnotowali zmniejszenie wartości pH z 7,4 do ~7 w warunkach *in vitro*, bez zmiany masy cząsteczkowej (GPC). Z kolei w warunkach *in vivo* na zwierzętach masa cząsteczkowa mikrosfer PLLA zmniejszyła się z 195000 do 149000 g/mol po 30 dniach implementacji, co wskazuje na przyspieszony mechanizm degradacji mikrosfer PLLA w warunkach *in vivo*.



Rysunek 72. Profile degradacji *in vitro* w SBF dla mikrosfer PLLA i PLLA/HAP (A). Obrazy SEM mikrosfer PLLA i PLLA/HAP po 28 tygodniach degradacji (B). Termogramy DSC dla mikrosfer PLLA i PLLA/HAP po degradacji *in vitro* w tygodniu 0, 2, 12, 20 i 28 (C).

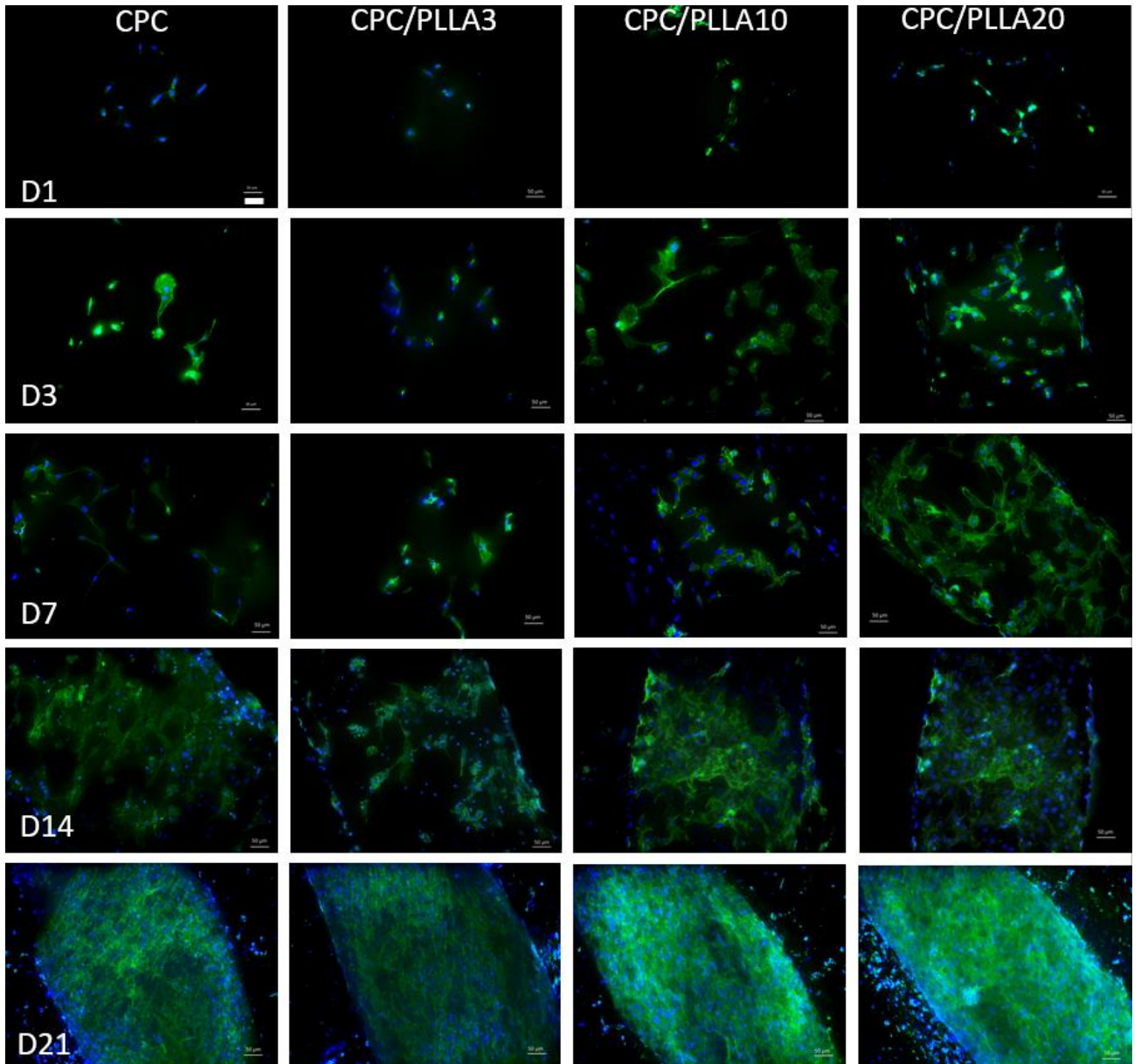
Tabela 19. Parametry termiczne DSC z drugiego segmentu ogrzewania mikrosfer PLLA i PLLA/HAP po degradacji hydrolytycznej w tygodniu 0, 2, 12, 20 i 28.

Nazwa próbki	T _g [°C]	T _m [°C]	ΔH _m [J/g]
mikrosfery PLLA_0	62,3	177,4	42,7
mikrosfery PLLA_2	60,9	173,8	53,5
mikrosfery PLLA_12	60,7	174,2	53,6
mikrosfery PLLA_20	60,4	173,7	51,1
mikrosfery PLLA_28	60,0	171,8	58,9
mikrosfery PLLA/HAP_0	62,6	177,6	43,1
mikrosfery PLLA/HAP_2	61,4	173,1	48,4
mikrosfery PLLA/HAP_12	60,9	171,6	48,6
mikrosfery PLLA/HAP_20	60,9	171,8	50,9
mikrosfery PLLA/HAP_28	60,2	169,8	50,3

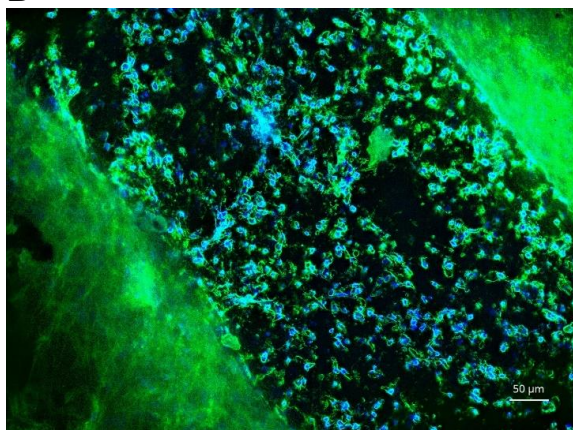
1.6. Charakterystyka biologiczna kompozytów CPC/PLLA

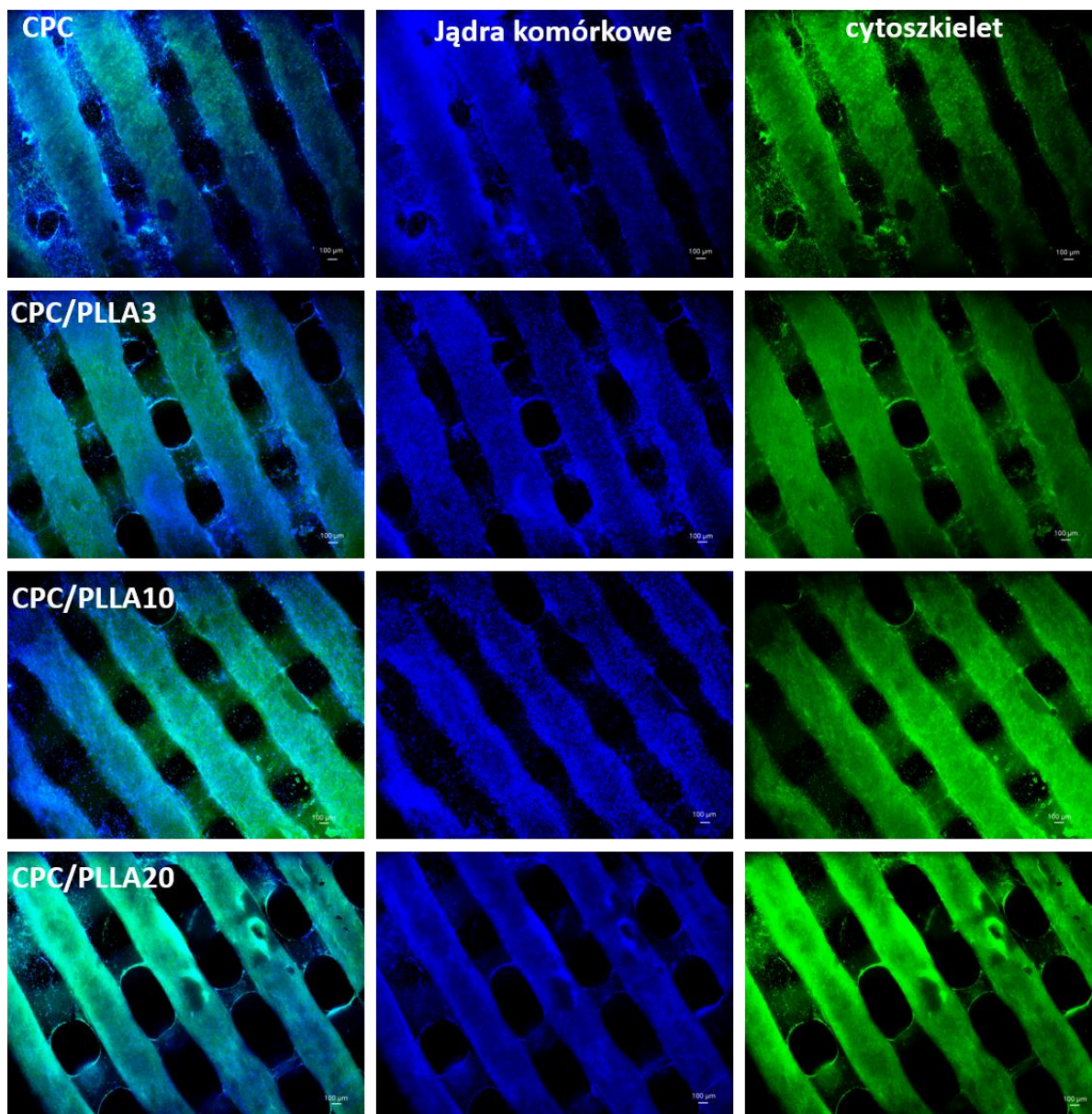
Na rusztowania CPC i CPC/PLLA naniesiono mezenchymalne komórki macierzyste hTERT-MSC i inkubowano je przez 21 dni. Medium hodowlane zmieniano 2 razy w tygodniu. Jądra komórkowe i cytoszkielety komórek hTERT-MSC obsadzonych na rusztowaniach CPC i CPC/PLLA utrwalano DAPI i falloidyną odpowiednio po następujących punktach czasowych: 1, 3, 7, 14 i 21. Adhezję komórek MSC obrazowano z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego, a obrazy przedstawiono na rysunku 73 A-C. Zaobserwowano znaczny przyrost komórek między dniem 1 i 21 dla wszystkich badanych materiałów z utworzeniem macierzy komórkowej w makroporach rusztowań w trakcie 21 dni inkubacji (rys. 73 A-B). Wszystkie rodzaje rusztowań mogą realnie wspierać długoterminową proliferację hTERT-MSC. Ponadto zauważono rozrost sieci białkowych komórek MSC w kolejnych punktach czasowych. Pierwszego dnia komórki przyczepiły się do wszystkich materiałów raczej losowo. Stwierdzono, że w dniach 1-14 linia komórkowa hTERT-MSC wykazywała wyraźnie widoczną różnicę w zachowaniu komórek pomiędzy materiałem kontrolnym CPC i materiałami kompozytowymi CPC/PLLA. Materiałem najbardziej sprzyjającym adhezji i proliferacji hTERT-MSC był kompozyt CPC/PLLA20. Jest to związane z chropowatą powierzchnią związanych pasm rusztowania i dużą zawartością mikrosfer PLLA o czystości medycznej. Na rysunku 73 C pokazano zaadherowane komórki na górnej powierzchni rusztowań po 21 dniach inkubacji z uwzględnieniem zarówno samych jąder komórkowych i osobno cytoszkieletu. Całe powierzchnie rusztowań otoczyły komórki z bardzo gęstą siecią cytoszkieletów zarówno na warstwie wierzchniej i dolnej. Świadczy to o doskonałej migracji i rozprzestrzenianiu się komórek MSC na zaproponowanych materiałach.

A



B



C

Rysunek 73. Adhezja komórek hTERT-MSCs na rusztowaniach CPC i CPC/PLLA w dniach 1, 3, 7, 14 i 21. Skala 50 µm (A). Utworzona sieć komórkowa MSC w makroporach CPC/PLLA20 po 21 dniach inkubacji. Skala 50 µm (B). Warstwa wierzchnia rusztowań CPC i CPC/PLLA po 21 dniach inkubacji komórek hTERT-MSCs na tych rusztowaniach z uwzględnieniem samych jąder komórkowych i cytoszkieletu. Skala 100 µm (C).

1.7. Podsumowanie części II

W rusztowaniach dedykowanych inżynierii tkankowej konstrukcje z otwartymi porami sprzyjają odpowiedniemu wysiewaniu komórek *in vitro* lub infiltracji komórek *in vivo* i w konsekwencji mogą powodować wzrost odpowiedniej tkanki i naczyń po implantacji. Docelowe substytuty tkanki kostnej powinny indukować proces mineralizacji, którą zapewnia wysoka zawartość CPC. Generalnie oczekiwana wielkość porów dla takich rusztowań powinna

mieścić się w przedziale 150-500 μm , przy udziale 60-80 % połączonych ze sobą porów [197]. Jednak CPC nie mają wewnętrznej makroporowatości. Przeszczepy kostne wymagają makroskopowo połączonej porowatości, która gwarantuje unaczynienie potrzebne do dostarczania składników odżywczych i tlenu do kolonizujących komórek kostnych [198]. Dlatego zaproponowano rusztowania formowane metodą druku 3D i składające się z fosforanów wapnia i mikrosfer PLLA o czystości medycznej. Za pomocą druku 3D metodą wytłaczania wytworzono dwufazowe rusztowania o wielkości porów 422-544 μm . Postawiono hipotezę, że mikrosfery PLLA będą degradowały szybciej niż CPC powodując porowatość pasm. Mikrosfery PLLA otrzymywano metodą emulsyjną z odparowaniem rozpuszczalnika. 90 % mikrosfer PLLA miało rozmiar poniżej 34,71 μm przy zastosowaniu następujących parametrów wytwarzania: 2 % roztwór PLLA, 1 % roztwór PVA, stosunek fazy olejowej do wodnej 1:3 (rys. 64). W celu przygotowania dwufazowych rusztowań CPC/PLLA analizowano charakterystykę płynięcia i lepkość past do procesu wytłaczania. Stwierdzono, że zarówno pasta CPC oraz pasty CPC/PLLA z zawartością 3, 10 i 20 % wag. PLLA wykazują charakter pseudoplastyczny. Na podstawie badań reologicznych materiały do druku 3D zmniejszały swoją lepkość wraz ze wzrostem szybkości ścinania. Pokazano, że wzrost zawartości PLLA w kompozytach opartych na CPC wpływa na wzrost lepkości past CPC/PLLA po 7 dniach przechowywania. Kompozyty CPC z zawartością 20 % wag. PLLA nie nadawały się do druku po 7 dniach przechowywania. Dlatego w celu formowania rusztowań do zastosowań w inżynierii tkanki kostnej istotne jest przygotowywanie past bezpośrednio przed drukiem określonych rusztowań. Wykreślone rusztowania utwardzano 3 dni w atmosferze pary wodnej w temperaturze 37 °C. Na podstawie obrazów z stereomikroskopu dla utwardzonych rusztowań udowodniono, iż wraz ze wzrostem ilości PLLA w kompozytach zwiększa się rozmiar makroporów w rusztowaniach. W rusztowaniach CPC i CPC/PLLA uzyskano porowatość boczną, a tym samym sieć wzajemnie połączonych porów w całym rusztowaniu. Wzrost ilości PLLA w układach spowodował wzrost lepkości past i formowanie bardziej stabilnych rusztowań z otwartą makroporowatością w całej objętości kompozytów. Na podstawie obrazów SEM stwierdzono obecność mikrosfer PLLA w przekrojach poprzecznych utwardzonych pasm oraz zauważono, iż wzrost zawartości PLLA w kompozytach powoduje większą chropowatość powierzchni. W pomiarach jednoosiowego ściskania obserwowano obszary liniowo-sprężystych odkształceń, które kończyły się zniszczeniem rusztowania. Wzrost zawartości PLLA w układach CPC/PLLA powodował obniżenie wytrzymałości na ściskanie rusztowań i wzrost modułu Younga. Ze wszystkich analizowanych kompozytów jony wapnia i fosforu były uwalniane ciągle w czasie trwania eksperymentu. Najwięcej jonów fosforu zostało

uwolnionych z czystych rusztowań CPC, które stanowiły 100 % wag. fosforanów wapnia. Oceniono profile degradacji *in vitro* w roztworze SBF kompozytów CPC/PLLA, mikrosfer PLLA i mikrosfer PLLA/HAP. Ubytki mas kompozytów CPC/PLLA są większe niż czystych mikrosfer PLLA i potwierdzają uwalnianie jonów wapnia i fosforu ze struktury CPC. Nie stwierdzono jednak istotnego wpływu PLLA na degradację rusztowań CPC/PLLA w badanym okresie czasowym z uwagi na umieszczenie mikrosfer PLLA wewnątrz pasm CPC. Stwierdzono, że w strukturze mikrosfer PLLA i PLLA/HAP, które były narażone na bezpośredni kontakt z roztworem SBF, zachodzą zmiany w czasie 28 tygodni doświadczenia. Dla tych materiałów zaobserwowano przesunięcie temperatury zeszklenia i topnienia w kierunku niższych temperatur wraz z czasem procesu degradacji oraz wzrost entalpii topnienia. Wyniki sugerują, że degradacja PLLA rozpoczyna się w obszarach amorficznych, następuje cięcie łańcucha polimerowego i zauważalny jest wzrost ruchliwości krótszych makrocząsteczek. Wszystkie materiały są bioaktywne. Oznacza to, że indukują proces mineralizacji, powstawania apatytów. Warto podkreślić, iż każdy z tych materiałów wspiera osadzanie apatytów o innym stosunku Ca/P. Czyste mikrosfery PLLA indukują powstawanie najmniej rozpuszczalnej fazy apatytu o najwyższym stosunku Ca/P $1,69 \pm 0,17$. HAP w mikrosferach PLLA/HAP działa jako nukleant do powstawania kryształów HAP z niedoborem wapnia o stosunku Ca/P równym $1,60 \pm 0,07$, natomiast kryształy apatytu na strukturach CPC/PLLA charakteryzowały się najniższym stosunkiem Ca/P równym $1,45 \pm 0,05$. Badania biologiczne z wykorzystaniem linii mezenchymalnych komórek macierzystych potwierdziły, że struktury CPC z PLLA wspierają proces adhezji i proliferacji komórek hTERT-MSC. Kompozyt CPC/PLLA 20 najbardziej sprzyjał adhezji i proliferacji komórek hTERT-MSC, co jest związane z jego chropowatą powierzchnią. Stwierdzono, iż po 21 dniach inkubacji, komórki są zdolne do tworzenia gęstych struktur w makroporach rusztowań CPC oraz CPC/PLLA, co wskazuje na przydatność tych materiałów w dziedzinie inżynierii tkanki kostnej.

VI. WNIOSKI

Nadrzędnym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było wytwarzanie nowych kompozytów polimerowo-ceramicznych do regeneracji tkanki kostnej. Zaproponowane kompozyty składały się z biokompatybilnego i biodegradowalnego poli(L-laktydu) oraz osteokonduktywnych fosforanów wapnia. W I części pracy przedstawiono nowe sposoby funkcjonalizacji cząstek HAP i BG oraz wpływ funkcjonalizacji cząstek ceramicznych na właściwości fizykochemiczne i biologiczne PLLA. W II części pracy przedstawiono druk 3D metodą wytłaczania makroporowatych rusztowań składających się z fosforanów wapnia i mikrosfer PLLA oraz wpływ mikrosfer PLLA na właściwości fizykochemiczne i biologiczne cementu CaP. Dla wszystkich kompozytów polimerowo-ceramicznych przedstawiono ich profile degradacji *in vitro*. Wnioski dotyczące badań eksperymentalnych z I i II części pracy są następujące:

- i. Powierzchnię cząstek HAP zmodyfikowano L-lizyną w wyniku utworzenia wiązania jonowego karboksylanu wapnia, a następnie przyłączono PEG o masie molowej 600 g/mol i 2100 g/mol poprzez wiązanie amidowe wykorzystując karbodiimidowy czynnik sprzęgający. Efektywność reakcji przyłączenia PEG600 do L-lizyny wynosi 13,1 %, podczas gdy PEG2100 15,3 %.
- ii. Cząstki HAP sfunkcjonalizowano powierzchniowo polidopaminą w wyniku polimeryzacji *in situ* dopaminy i przyłączono PEG z aminową grupą końcową o masach cząsteczkowych 750 i 5000 g/mol oraz PEG z tiolową grupą końcową o masie cząsteczkowej 800 g/mol do wolnych grup katecholowych polidopaminy. Im większa masa molowa PEG tym większa efektywność reakcji przyłączenia PEG do polidopaminy (dla PEGNH₂ 5000 wydajność reakcji przyłączenia jest równa 80,0%).
- iii. Wykonano dwuetapową modyfikację powierzchni cząstek BG poprzez reakcję silanizacji prekursorem APTS i następnie przyłączono L-lizynę wykorzystując karbodiimidowy czynnik sprzęgający EDC i NHS. Ten sposób modyfikacji powierzchni cząstek ceramicznych jest najskuteczniejszy, a efektywność reakcji przyłączenia L-lizyny do BG za pośrednictwem APTS wynosi 83,7 % dla cząstek BG o większym uziarnieniu i 80,8 % dla cząstek BG o mniejszym uziarnieniu.
- iv. W wyniku modyfikacji powierzchni cząstek ceramicznych powstały wielofunkcyjne napełniacze do matryc polimerowych, które mogą pełnić rolę czynników zarodkujących, plastyfikujących i ugrupowań bioaktywnych.

- v. Modyfikacja powierzchni cząstek ceramicznych zwiększyła ich dyspersję w matrycy polimerowej. Modyfikacja powierzchni cząstek HAP z L-lizyną i PEG wyraźnie poprawiła zwilżalność matrycy PLLA w kompozytach, natomiast modyfikacja cząstek BG z APTS i L-lizyną nie zmieniła wartości kąta zwilżania kompozytów PLLA/BG z uwagi na silnie hydrofobowy łącznik APTS. Modyfikacja powierzchni cząstek HAP z polidopaminą i PEG nie zmieniła wartości kąta zwilżania kompozytów PLLA/HAP.
- vi. Modyfikacje powierzchni cząstek HAP z PEG poprawiły stabilność termiczną PLLA i kompozytów PLLA/HAP, co ma istotne znaczenie z perspektywy przetwarzania termicznego kompozytów w celu uzyskiwania spersonalizowanych konstruktywów kosztowych.
- vii. Cząstki HAP modyfikowane PEG aktywnie nukleują krystalizację ze stopu PLLA z wydajnością zależną od rodzaju PEG i wybranego łącznika (L-lizyny lub PDA). PEG obecny na powierzchni cząstek HAP wykazuje efekt plastyfikujący w kompozytach z matrycą PLLA.
- viii. Modyfikacja powierzchni cząstek ceramicznych zmienia profile degradacji *in vitro* czystej matrycy PLLA i kompozytów PLLA z niemodyfikowanym HAP. Immobilizacja L-lizyny, PDA i PEG na cząstkach ceramicznych wspiera proces mineralizacji kompozytów. Badane kompozyty oparte na PLLA są cytozgodne wobec mysich fibroblastów L929 i ludzkich osteoblastów hFOB 1.19 w teście redukcji MTT. Kompozyty te są niepirogenne, ponieważ nie powodowały znaczącej aktywacji ludzkich komórek THP1-BlueTM, systemu wykrywania stanu zapalnego.
- ix. Wytworzono dwufazowe rusztowania CPC z mikrosferami PLLA za pomocą druku 3D metodą wytłaczania. Podczas otrzymywania mikrosfer PLLA zaobserwowano, iż większe stężenie roztworu PLLA wpływa na otrzymywanie większych mikrosfer polimerowych techniką emulsyjną z odparowaniem rozpuszczalnika.
- x. Wzrost zawartości PLLA w pastach CPC/PLLA powoduje wzrost lepkości past, co potwierdza postawioną hipotezę i przekłada się na wytłaczanie bardziej stabilnych, makroporowatych rusztowań uzyskując założoną porowatość w całej objętości kompozytów.
- xi. Zaobserwowano szybszą degradację CPC w porównaniu do PLLA co ma związek ze stałym uwalnianiem jonów fosforu i wapnia. Nie uzyskano porowatych pasm CPC w wyniku degradacji PLLA w okresie 28 tygodni według założonej hipotezy.
- xii. Rusztowania CPC/PLLA oraz mikrosfery PLLA i PLLA/HAP indukują proces mineralizacji w SBF w trakcie 28 tygodni prowadzenia eksperymentu. Czyste

mikrosfery PLLA indukują powstawanie najmniej rozpuszczalnej fazy apatytu o najwyższym stosunku Ca/P, podczas gdy HAP w mikrosferach PLLA/HAP oraz CPC w kompozytach CPC/PLLA nukleują powstawanie kryształów HAP z niedoborem wapnia.

- xiii. Kompozyty CPC/PLLA wspierają adhezję i proliferację komórek hTERT-MSK z uwagi na chropowatą powierzchnię. Komórki macierzyste hTERT-MSK po 21 dniach inkubacji utworzyły gęste struktury w makroporach rusztowań, co potwierdza doskonałą migrację mezenchymalnych komórek macierzystych na zaproponowanych materiałach.
- xiv. Powyższe wnioski wskazują na przydatność dwufazowych, polimerowo-ceramicznych kompozytów do regeneracji tkanki kostnej.

VII. LITERATURA

1. Han, F.; Wang, J.; Ding, L.; Hu, Y.; Li, W.; Yuan, Z.; Guo, Q.; Zhu, C.; Yu, L.; Wang, H.; et al. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Achievements, Future, and Sustainability in Asia. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 1–35, doi:10.3389/fbioe.2020.00083.
2. Petrosyan, A.; Montali, F.; Peloso, A.; Citro, A.; Byers, L.N.; La Pointe, C.; Suleiman, M.; Marchetti, A.; McNeill, E.P.; Speer, A.L.; et al. Regenerative medicine technologies applied to transplant medicine. An update. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, *10*, 1–18, doi:10.3389/fbioe.2022.1015628.
3. Howard, D.; Buttery, L.D.; Shakesheff, K.M.; Roberts, S.J. Tissue engineering: Strategies, stem cells and scaffolds. *J. Anat.* **2008**, *213*, 66–72, doi:10.1111/j.1469-7580.2008.00878.x.
4. Kanis, J.A.; Norton, N.; Harvey, N.C.; Jacobson, T.; Johansson, H.; Lorentzon, M.; McCloskey, E. V.; Willers, C.; Borgström, F. SCOPE 2021: a new scorecard for osteoporosis in Europe. *Arch. Osteoporos.* **2021**, *16*, 82, doi:10.1007/s11657-020-00871-9.
5. Olszta, M.J.; Cheng, X.; Jee, S.S.; Kumar, R.; Kim, Y.Y.; Kaufman, M.J.; Douglas, E.P.; Gower, L.B. Bone structure and formation: A new perspective. *Mater. Sci. Eng. R Reports* **2007**, *58*, 77–116, doi:10.1016/j.mser.2007.05.001.
6. Clarke, B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* **2008**, S131-9, doi: 10.2215/CJN.04151206.
7. Rujitanapanich, S.; Kumpapan, P.; Wanjanoi, P. Synthesis of hydroxyapatite from oyster shell via precipitation. *Energy Procedia* **2014**, *56*, 112–117, doi:10.1016/j.egypro.2014.07.138.
8. Hing, K.A. Bone repair in the twenty-first century: Biology, chemistry or engineering? *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2004**, *362*, 2821–2850, doi:10.1098/rsta.2004.1466.
9. Wang, X.; Xu, S.; Zhou, S.; Xu, W.; Leary, M.; Choong, P.; Qian, M.; Brandt, M.; Xie, Y.M. Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: A review. *Biomaterials* **2016**, *83*, 127–141, doi:https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.012.
10. Compact-bone @ www.britannica.com. Dostęp z dnia 6.03.2023 r.
11. Garimella, R.; Tague, S.E.; Zhang, J.; Belibi, F.; Nahar, N.; Sun, B.H.; Insogna, K.; Wang, J.; Anderson, H.C. Expression and synthesis of bone morphogenetic proteins by osteoclasts: A possible path to anabolic bone remodeling. *J. Histochem. Cytochem.* **2008**, *56*, 569–577, doi:10.1369/jhc.2008.950394.
12. Gazińska, M.; Krokos, A.; Kobielarz, M.; Włodarczyk, M.; Skibińska, P.; Stępak, B.; Antończak, A.; Morawiak, M.; Płociński, P.; Rudnicka, K. Influence of hydroxyapatite surface functionalization on thermal and biological properties of poly(L-lactide)-and poly(l-lactide-co-glycolide)-based composites. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1–21, doi:10.3390/ijms21186711.
13. Rinaldo Florencio-Silva, Gisela Rodrigues da Silva Sasso, Estela Sasso-Cerri, Manuel Jesus Simões, and P.S.C. Physiology of bone tissue. *Immuno-analyse Biol. Spécialisée* **2015**, *7*, 17–24.
14. Donsante, S.; Palmisano, B.; Serafini, M.; Robey, P.G.; Corsi, A.; Riminucci, M. From Stem Cells to Bone-Forming Cells. **2021**, 1–23.
15. Yahara, Y.; Nguyen, T.; Ishikawa, K.; Kamei, K.; Alman, B.A. The origins and roles of osteoclasts in bone development, homeostasis and repair. *Development* **2022**, *149*, doi:10.1242/dev.199908.

16. Qu, H.; Fu, H.; Han, Z.; Sun, Y. Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: A review. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 26252–26262, doi:10.1039/c9ra05214c.
17. Liu, J.; Ruan, J.; Chang, L.; Yang, H.; Ruan, W. Porous Nb-Ti-Ta alloy scaffolds for bone tissue engineering: Fabrication, mechanical properties and in vitro/vivo biocompatibility. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *78*, 503–512, doi:10.1016/j.msec.2017.04.088.
18. Cancedda, R.; Giannoni, P.; Mastrogiacomo, M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials* **2007**, *28*, 4240–4250, doi:10.1016/j.biomaterials.2007.06.023.
19. Pereira, H.F.; Cengiz, I.F.; Silva, F.S.; Reis, R.L.; Oliveira, J.M. Scaffolds and coatings for bone regeneration. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2020**, *31*, doi:10.1007/s10856-020-06364-y.
20. García-Gareta, E.; Coathup, M.J.; Blunn, G.W. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone* **2015**, *81*, 112–121, doi:10.1016/j.bone.2015.07.007.
21. Haugen, H.J.; Basu, P.; Sukul, M.; Mano, J.F.; Reseland, J.E. Injectable biomaterials for dental tissue regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21103442.
22. Ehashi, T.; Kakinoki, S.; Yamaoka, T. Water absorbing and quick degradable PLLA/PEG multiblock copolymers reduce the encapsulation and inflammatory cytokine production. *J. Artif. Organs* **2014**, *17*, 321–328, doi:10.1007/s10047-014-0791-z.
23. Allyn, M.M.; Luo, R.H.; Hellwarth, E.B.; Swindle-Reilly, K.E. Considerations for Polymers Used in Ocular Drug Delivery. *Front. Med.* **2022**, *8*, 1–25, doi:10.3389/fmed.2021.787644.
24. DeStefano, V.; Khan, S.; Tabada, A. Applications of PLA in modern medicine. *Eng. Regen.* **2020**, *1*, 76–87, doi:10.1016/j.engreg.2020.08.002.
25. Saravanakumar, K.; Hu, X.; Shanmugam, S.; Chelliah, R.; Sekar, P.; Oh, D.-H.; Vijayakumar, S.; Kathiresan, K.; Wang, M.-H. Enhanced cancer therapy with pH-dependent and aptamer functionalized doxorubicin loaded polymeric (poly D, L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles. *Arch. Biochem. Biophys.* **2019**, *671*, 143–151, doi:https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.07.004.
26. Chereddy, K.K.; Vandermeulen, G.; Pr eat, V. PLGA based drug delivery systems: Promising carriers for wound healing activity. *Wound Repair Regen.* **2016**, *24*, 223–236, doi:https://doi.org/10.1111/wrr.12404.
27. Ruirui, Z.; He, J.; Xu, X.; Li, S.; Peng, H.; Deng, Z.; Huang, Y. PLGA-based drug delivery system for combined therapy of cancer: research progress. *Mater. Res. Express* **2021**, *8*, doi:10.1088/2053-1591/ac3f5e.
28. Shen, X.; Li, T.; Xie, X.; Feng, Y.; Chen, Z.; Yang, H.; Wu, C.; Deng, S.; Liu, Y. PLGA-Based Drug Delivery Systems for Remotely Triggered Cancer Therapeutic and Diagnostic Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 1–19, doi:10.3389/fbioe.2020.00381.
29. Lee, S.H.; Zhou, W.Y.; Wang, M.; Cheung, W.L.; Ip, W.Y. Selective Laser Sintering of Poly(L-Lactide) Porous Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *J. Biomimetics, Biomater. Tissue Eng.* **2008**, *1*, 81–89, doi:10.4028/www.scientific.net/jbte.1.81.
30. Anto czak, A.J.; Wiczorek, M.; Dzienny, P.; Kryszak, B.; Krokos, A.; Gruber, P.; Olejarczyk, M.; Gazi nska, M. First, do not degrade – Dual Beam Laser Sintering of polymers. *Addit. Manuf.* **2022**, *53*, doi:10.1016/j.addma.2022.102715.
31. Khalaj, R.; Tabriz, A.G.; Okereke, M.I.; Douroumis, D. 3D printing advances in the development of stents. *Int. J. Pharm.* **2021**, *609*, 121153, doi:https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121153.

32. Taheri, S.; Baier, G.; Majewski, P.; Barton, M.; Förch, R.; Landfester, K.; Vasilev, K. Synthesis and surface immobilization of antibacterial hybrid silver-poly(l-lactide) nanoparticles. *Nanotechnology* **2014**, *25*, 305102, doi:10.1088/0957-4484/25/30/305102.
33. Dechy-cabaret, O.; Martin-vaca, B.; Bourissou, D. Controlled Ring-Opening Polymerization of Lactide and Glycolide. **2004**, 20–23.
34. Pretula, J.; Slomkowski, S.; Penczek, S. Polylactides—Methods of synthesis and characterization. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *107*, 3–16, doi:https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.05.002.
35. Kaihara, S.; Matsumura, S.; Mikos, A.G.; Fisher, J.P. Synthesis of poly (L -lactide) and polyglycolide by ring-opening polymerization. **2007**, *2*, 2767–2771, doi:10.1038/nprot.2007.391.
36. Mena, M.; Ramı, M. Enzymatic synthesis of poly- L -lactide and poly- L -lactide-co-glycolide in an ionic liquid. **2010**, 629–638, doi:10.1007/s00449-009-0388-8.
37. Fujioka, M.; Hosoda, N.; Nishiyama, S.; Noguchi, H.; Shoji, A. Note One-pot Enzymatic Synthesis of Poly (L , L -lactide) by Immobilized Lipase Catalyst. 2–4.
38. Tanasic, L.; Ristic, I.S. The Properties of Poly (L -Lactide) Prepared by Different Synthesis Procedure. **2011**, 419–430, doi:10.1007/s10924-011-0297-1.
39. Li, T.; Tan, Z.; Tang, Z.; Liu, P.; Liu, H.; Zhu, L.; Ma, Y. One-pot chemoenzymatic synthesis of glycolic acid from formaldehyde. *Green Chem.* **2022**, *24*, 5064–5069, doi:10.1039/D2GC00688J.
40. Si, D.; Xiong, B.; Shi, J. Article Highly selective and efficient electrocatalytic synthesis of glycolic acid in coupling with hydrogen evolution Highly selective and efficient electrocatalytic synthesis of glycolic acid in coupling with hydrogen evolution. 941–955, doi:10.1016/j.cheecat.2021.08.001.
41. Phan, V.H. Synthesis of poly (lactide- co -glycolide) containing high glycolide contents by ring-opening polymerization as well as their structural characterizations , thermal properties , morphologies , and hydrophilicity. **2023**, 1–10, doi:10.1002/app.53328.
42. Aniśko, J.; Barczewski, M. Polylactide : from Synthesis and Modification to Final Properties. **2021**, *15*, 9–29.
43. Gentile, P.; Chiono, V.; Carmagnola, I.; Hatton, P. V An Overview of Poly (lactic- co -glycolic) Acid (PLGA) -Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering. **2014**, 3640–3659, doi:10.3390/ijms15033640.
44. In, P.; Park, P.; Jonnalagadda, S. Predictors of Glass Transition in the Biodegradable Poly- lactide and Poly-lactide- co -glycolide Polymers. **2005**, *100*, doi:10.1002/app.22135.
45. Bartkowiak-jowska, M.; Kozłowska, A.; Filipiak, J.; Pezowicz, C. Mechanical , rheological , fatigue , and degradation behavior of PLLA , PGLA and PDGLA as materials for vascular implants. **2013**, 721–731, doi:10.1007/s11012-012-9626-2.
46. da Silva, D.; Kaduri, M.; Poley, M.; Adir, O.; Krinsky, N.; Shainsky-Roitman, J.; Schroeder, A. Biocompatibility, biodegradation and excretion of polylactic acid (PLA) in medical implants and theranostic systems. *Chem. Eng. J.* **2018**, *340*, 9–14, doi:10.1016/j.cej.2018.01.010.
47. Feng, P.; Jia, J.; Liu, M.; Peng, S.; Zhao, Z.; Shuai, C. Degradation mechanisms and acceleration strategies of poly (lactic acid) scaffold for bone regeneration. *Mater. Des.* **2021**, *210*, 110066, doi:10.1016/j.matdes.2021.110066.
48. Tosakul, T.; Suetong, P.; Chanthot, P.; Pattamaprom, C. Degradation of polylactic acid and polylactic acid/natural rubber blown films in aquatic environment. *J. Polym. Res.* **2022**, *29*, doi:10.1007/s10965-022-03039-w.

49. Maharana, T.; Mohanty, B.; Negi, Y.S. Melt-solid polycondensation of lactic acid and its biodegradability. *Prog. Polym. Sci.* **2009**, *34*, 99–124, doi:10.1016/j.progpolymsci.2008.10.001.
50. Zaaba, N.F.; Jaafar, M. A review on degradation mechanisms of polylactic acid: Hydrolytic, photodegradative, microbial, and enzymatic degradation. *Polym. Eng. & Sci.* **2020**, *60*, 2061–2075, doi:https://doi.org/10.1002/pen.25511.
51. Detsch, R.; Hagemeyer, D.; Neumann, M.; Schaefer, S.; Vortkamp, A.; Wuelling, M.; Ziegler, G.; Epple, M. The resorption of nanocrystalline calcium phosphates by osteoclast-like cells. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 3223–3233, doi:10.1016/j.actbio.2010.03.003.
52. Sheikh, Z.; Abdallah, M.N.; Hanafi, A.A.; Misbahuddin, S.; Rashid, H.; Glogauer, M. Mechanisms of in vivo degradation and resorption of calcium phosphate based biomaterials. *Materials (Basel)*. **2015**, *8*, 7913–7925, doi:10.3390/ma8115430.
53. Macmillan, A.K.; Lamberti, F. V.; Moulton, J.N.; Geilich, B.M.; Webster, T.J. Similar healthy osteoclast and osteoblast activity on nanocrystalline hydroxyapatite and nanoparticles of tri-calcium phosphate compared to natural bone. *Int. J. Nanomedicine* **2014**, *9*, 5627–5637, doi:10.2147/IJN.S66852.
54. Dorozhkin, S. V. *Calcium orthophosphates (CaPO₄): occurrence and properties*; **2016**; Vol. 5; ISBN 4020401500.
55. Dorozhkin, S. V. Calcium orthophosphates. *J. Mater. Sci.* **2007**, *42*, 1061–1095, doi:10.1007/s10853-006-1467-8.
56. Koutsopoulos, S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *62*, 600–612, doi:https://doi.org/10.1002/jbm.10280.
57. Mohd Pu'ad, N.A.S.; Abdul Haq, R.H.; Mohd Noh, H.; Abdullah, H.Z.; Idris, M.I.; Lee, T.C. Synthesis method of hydroxyapatite: A review. *Mater. Today Proc.* **2020**, *29*, 233–239, doi:https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.05.536.
58. Sopyan, I.; Toibah, A.R.; Natasha, A.N. Nanosized bioceramic hydroxyapatite powders via sol-gel method. *Int. J. Mech. Mater. Eng.* **2008**, *3*, 133–138.
59. Chen, J.; Liu, J.; Deng, H.; Yao, S.; Wang, Y. Regulatory synthesis and characterization of hydroxyapatite nanocrystals by a microwave-assisted hydrothermal method. *Ceram. Int.* **2020**, *46*, 2185–2193, doi:10.1016/j.ceramint.2019.09.203.
60. Szterner, P.; Biernat, M. The Synthesis of Hydroxyapatite by Hydrothermal Process with Calcium Lactate Pentahydrate: The Effect of Reagent Concentrations, pH, Temperature, and Pressure. *Bioinorg. Chem. Appl.* **2022**, *2022*, doi:10.1155/2022/3481677.
61. Wu, S.C.; Hsu, H.C.; Hsu, S.K.; Tseng, C.P.; Ho, W.F. Preparation and characterization of hydroxyapatite synthesized from oyster shell powders. *Adv. Powder Technol.* **2017**, *28*, 1154–1158, doi:10.1016/j.apt.2017.02.001.
62. DileepKumar, V.G.; Sridhar, M.S.; Aramwit, P.; Krut'ko, V.K.; Musskaya, O.N.; Glazov, I.E.; Reddy, N. A review on the synthesis and properties of hydroxyapatite for biomedical applications. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2022**, *33*, 229–261, doi:10.1080/09205063.2021.1980985.
63. Wang, P.; Li, C.; Gong, H.; Jiang, X.; Wang, H.; Li, K. Effects of synthesis conditions on the morphology of hydroxyapatite nanoparticles produced by wet chemical process. *Powder Technol.* **2010**, *203*, 315–321, doi:10.1016/j.powtec.2010.05.023.
64. Korn, P.; Ahlfeld, T.; Lahmeyer, F.; Kilian, D.; Sembdner, P.; Stelzer, R.; Pradel, W.; Franke, A.; Rauner, M.; Range, U.; et al. 3D Printing of Bone Grafts for Cleft Alveolar Osteoplasty – In vivo Evaluation in a Preclinical Model. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 1–16, doi:10.3389/fbioe.2020.00217.

65. Thormann, U.; Ray, S.; Sommer, U.; ElKhassawna, T.; Rehling, T.; Hundgeburth, M.; Henß, A.; Rohnke, M.; Janek, J.; Lips, K.S.; et al. Bone formation induced by strontium modified calcium phosphate cement in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats. *Biomaterials* **2013**, *34*, 8589–8598, doi:<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.036>.
66. Bernhardt, A.; Schumacher, M.; Gelinsky, M. Formation of Osteoclasts on Calcium Phosphate Bone Cements and Polystyrene Depends on Monocyte Isolation Conditions. *Tissue Eng. Part C Methods* **2015**, *21*, 160–170, doi:[10.1089/ten.tec.2014.0187](https://doi.org/10.1089/ten.tec.2014.0187).
67. Zhang, Y.; Shu, T.; Wang, S.; Liu, Z.; Cheng, Y.; Li, A.; Pei, D. The Osteoinductivity of Calcium Phosphate-Based Biomaterials: A Tight Interaction With Bone Healing. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, *10*, 1–9, doi:[10.3389/fbioe.2022.911180](https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.911180).
68. Li, M.; Jia, W.; Zhang, X.; Weng, H.; Gu, G.; Chen, Z. Hyaluronic acid oligosaccharides modified mineralized collagen and chitosan with enhanced osteoinductive properties for bone tissue engineering. *Carbohydr. Polym.* **2021**, *260*, 117780, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117780>.
69. Bohner, M.; Santoni, B.L.G.; Döbelin, N. β -tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties. *Acta Biomater.* **2020**, *113*, 23–41, doi:[10.1016/j.actbio.2020.06.022](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.06.022).
70. Dorozhkin, S. V. Self-Setting Calcium Orthophosphate Formulations: Cements, Concretes, Pastes and Putties. *Int. J. Mater. Chem.* **2012**, *1*, 1–48, doi:[10.5923/j.ijmc.20110101.01](https://doi.org/10.5923/j.ijmc.20110101.01).
71. Xu, H.H.K.; Wang, P.; Wang, L.; Bao, C.; Chen, Q.; Weir, M.D.; Chow, L.C.; Zhao, L.; Zhou, X.; Reynolds, M.A. Calcium phosphate cements for bone engineering and their biological properties. *Bone Res.* **2017**, *5*, 1–19, doi:[10.1038/boneres.2017.56](https://doi.org/10.1038/boneres.2017.56).
72. Cement, H.; Cabinets, M.; Rooms, M.; Statements, B.; Mass, D. Standard Test Method for Time of Setting of Hydraulic-Cement Paste by Gillmore. *Water* **2010**, 1–4.
73. Lode, A.; Meissner, K.; Luo, Y.; Sonntag, F.; Glorius, S.; Nies, B.; Vater, C.; Despang, F.; Hanke, T.; Gelinsky, M. Fabrication of porous scaffolds by three-dimensional plotting of a pasty calcium phosphate bone cement under mild conditions. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2014**, *8*, 682–693, doi:<https://doi.org/10.1002/term.1563>.
74. Ahlfeld, T.; Doberenz, F.; Kilian, D.; Vater, C.; Korn, P.; Lauer, G.; Lode, A.; Gelinsky, M. Bioprinting of mineralized constructs utilizing multichannel plotting of a self-setting calcium phosphate cement and a cell-laden bioink. *Biofabrication* **2018**, *10*, 45002, doi:[10.1088/1758-5090/aad36d](https://doi.org/10.1088/1758-5090/aad36d).
75. Akkineni, A.R.; Luo, Y.; Schumacher, M.; Nies, B.; Lode, A.; Gelinsky, M. 3D plotting of growth factor loaded calcium phosphate cement scaffolds. *Acta Biomater.* **2015**, *27*, 264–274, doi:[10.1016/j.actbio.2015.08.036](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.08.036).
76. Ahlfeld, T.; Akkineni, A.R.; Förster, Y.; Köhler, T.; Knaack, S.; Gelinsky, M.; Lode, A. Design and Fabrication of Complex Scaffolds for Bone Defect Healing: Combined 3D Plotting of a Calcium Phosphate Cement and a Growth Factor-Loaded Hydrogel. *Ann. Biomed. Eng.* **2017**, *45*, 224–236, doi:[10.1007/s10439-016-1685-4](https://doi.org/10.1007/s10439-016-1685-4).
77. Heinemann, S.; Rössler, S.; Lemm, M.; Ruhnnow, M.; Nies, B. Properties of injectable ready-to-use calcium phosphate cement based on water-immiscible liquid. *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 6199–6207, doi:[10.1016/j.actbio.2012.12.017](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.12.017).
78. Guo, H.; Su, J.; Wei, J.; Kong, H.; Liu, C. Biocompatibility and osteogenicity of degradable Ca-deficient hydroxyapatite scaffolds from calcium phosphate cement for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* **2009**, *5*, 268–278, doi:<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.07.018>.
79. Grosfeld, E.-C.; Hoekstra, J.W.M.; Herber, R.-P.; Ulrich, D.J.O.; Jansen, J.A.; van den Beucken, J.J.J.P. Long-term biological performance of injectable and degradable

- calcium phosphate cement. *Biomed. Mater.* **2016**, *12*, 15009, doi:10.1088/1748-605X/12/1/015009.
80. Schumacher, M.; Gelinsky, M. Strontium modified calcium phosphate cements – approaches towards targeted stimulation of bone turnover. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 4626–4640, doi:10.1039/C5TB00654F.
 81. LeGeros, R.Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 4742–4753, doi:10.1021/cr800427g.
 82. O'Neill, R.; McCarthy, H.O.; Montufar, E.B.; Ginebra, M.P.; Wilson, D.I.; Lennon, A.; Dunne, N. Critical review: Injectability of calcium phosphate pastes and cements. *Acta Biomater.* **2017**, *50*, 1–19, doi:10.1016/j.actbio.2016.11.019.
 83. Ribas, R.G.; Schatkoski, V.M.; Montanheiro, T.L. do A.; de Menezes, B.R.C.; Stegemann, C.; Leite, D.M.G.; Thim, G.P. Current advances in bone tissue engineering concerning ceramic and bioglass scaffolds: A review. *Ceram. Int.* **2019**, *45*, 21051–21061, doi:10.1016/j.ceramint.2019.07.096.
 84. Hench, L.L. The story of Bioglass®. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2006**, *17*, 967–978, doi:10.1007/s10856-006-0432-z.
 85. Dukle, A.; Murugan, D.; Nathanael, A.J.; Rangasamy, L.; Oh, T.H. Can 3D-Printed Bioactive Glasses Be the Future of Bone Tissue Engineering? *Polymers (Basel)*. **2022**, *14*, 1–20, doi:10.3390/polym14081627.
 86. Fernandes, H.R.; Gaddam, A.; Rebelo, A.; Brazete, D.; Stan, G.E.; Ferreira, J.M.F. Bioactive glasses and glass-ceramics for healthcare applications in bone regeneration and tissue engineering. *Materials (Basel)*. **2018**, *11*, 1–54, doi:10.3390/ma11122530.
 87. Brauer, D.S. Bioactive glasses - Structure and properties. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2015**, *54*, 4160–4181, doi:10.1002/anie.201405310.
 88. Deshmukh, K.; Kovářik, T.; Křenek, T.; Docheva, D.; Stich, T.; Pola, J. Recent advances and future perspectives of sol-gel derived porous bioactive glasses: a review. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 33782–33835, doi:10.1039/d0ra04287k.
 89. Fiume, E.; Barberi, J.; Verné, E.; Baino, F. Bioactive glasses: From parent 45S5 Composition to Scaffold-Assisted Tissue-Healing Therapies. *J. Funct. Biomater.* **2018**, *9*, doi:10.3390/jfb9010024.
 90. Paramita, P.; Ramachandran, M.; Narashiman, S.; Nagarajan, S.; Sukumar, D.K.; Chung, T.W.; Ambigapathi, M. Sol-gel based synthesis and biological properties of zinc integrated nano bioglass ceramics for bone tissue regeneration. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2021**, *32*, doi:10.1007/s10856-020-06478-3.
 91. Ciołek, L.; Biernat, M.; Jaegermann, Z.; Tymowicz-Grzyb, P.; Taźbierski, P.; Jastrzębska, A.; Olszyna, A. Controlling the microstructure of lyophilized porous biocomposites by the addition of ZnO-doped bioglass. *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* **2017**, *14*, 1107–1116, doi:10.1111/ijac.12739.
 92. Guduric, V.; Belton, N.; Richter, R.F.; Bernhardt, A.; Spangenberg, J.; Wu, C.; Lode, A.; Gelinsky, M. Tailorable zinc-substituted mesoporous bioactive glass/alginate-methylcellulose composite bioinks. *Materials (Basel)*. **2021**, *14*, 1–21, doi:10.3390/ma14051225.
 93. Wetzal, R.; Blochberger, M.; Scheffler, F.; Hupa, L.; Brauer, D.S. Mg or Zn for Ca substitution improves the sintering of bioglass 45S5. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–10, doi:10.1038/s41598-020-72091-7.
 94. Mutlu, N.; Kurtuldu, F.; Unalan, I.; Neščáková, Z.; Kaňková, H.; Galusková, D.; Michálek, M.; Liverani, L.; Galusek, D.; Boccaccini, A.R. Effect of Zn and Ga doping on bioactivity, degradation, and antibacterial properties of borate 1393-B3 bioactive glass. *Ceram. Int.* **2022**, *48*, 16404–16417, doi:10.1016/j.ceramint.2022.02.192.
 95. Kołodziejska, B.; Stępień, N.; Kolmas, J. The influence of strontium on bone tissue

- metabolism and its application in osteoporosis treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22126564.
96. Manoochehri, H.; Ghorbani, M.; Moosazadeh Moghaddam, M.; Nourani, M.R.; Makvandi, P.; Sharifi, E. Strontium doped bioglass incorporated hydrogel-based scaffold for amplified bone tissue regeneration. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 1–18, doi:10.1038/s41598-022-14329-0.
 97. Ciołek, L.; Biernat, M.; Jaegermann, Z.; Zaczyńska, E.; Czarny, A.; Jastrzębska, A.; Olszyna, A. The studies of cytotoxicity and antibacterial activity of composites with ZnO-doped bioglass. *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* **2019**, *16*, 541–551, doi:10.1111/ijac.13144.
 98. O'Connor, J.P.; Kanjilal, D.; Teitelbaum, M.; Lin, S.S.; Cottrell, J.A. Zinc as a therapeutic agent in bone regeneration. *Materials (Basel)*. **2020**, *13*, 1–22, doi:10.3390/ma13102211.
 99. Zhu, Y.; Wu, C.; Ramaswamy, Y.; Kockrick, E.; Simon, P.; Kaskel, S.; Zreiqat, H. Preparation, characterization and in vitro bioactivity of mesoporous bioactive glasses (MBGs) scaffolds for bone tissue engineering. *Microporous Mesoporous Mater.* **2008**, *112*, 494–503, doi:10.1016/j.micromeso.2007.10.029.
 100. Baino, F.; Fiorilli, S.; Vitale-Brovarone, C. Bioactive glass-based materials with hierarchical porosity for medical applications: Review of recent advances. *Acta Biomater.* **2016**, *42*, 18–32, doi:10.1016/j.actbio.2016.06.033.
 101. Saravanapavan, P.; Jones, J.R.; Pryce, R.S.; Hench, L.L. Bioactivity of gel – glass powders in the CaO-SiO₂ system : A comparison with ternary (CaO-P₂O₅-SiO₂) and quaternary glasses (SiO₂-CaO-P₂O₅-Na₂O). **2003**, 17–19.
 102. Li, H.C.; Wang, D.G.; Hu, J.H.; Chen, C.Z. Effect of various additives on microstructure, mechanical properties, and in vitro bioactivity of sodium oxide-calcium oxide-silica-phosphorus pentoxide glass-ceramics. *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *405*, 296–304, doi:https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.04.046.
 103. Karadjian, M.; Essers, C.; Tsitlakidis, S.; Reible, B.; Moghaddam, A.; Boccaccini, A.R.; Westhauser, F. Biological Properties of Calcium Phosphate Bioactive Glass Composite Bone Substitutes: Current Experimental Evidence. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20020305.
 104. Yun, H.; Kim, S.; Hyun, Y.; Heo, S.; Shin, J. Hierarchically mesoporous–macroporous bioactive glasses scaffolds for bone tissue regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2008**, *87B*, 374–380, doi:https://doi.org/10.1002/jbm.b.31114.
 105. Zhu, Y.; Wu, C.; Ramaswamy, Y.; Kockrick, E.; Simon, P.; Kaskel, S.; Zreiqat, H. Preparation, characterization and in vitro bioactivity of mesoporous bioactive glasses (MBGs) scaffolds for bone tissue engineering. *Microporous Mesoporous Mater.* **2008**, *112*, 494–503, doi:https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2007.10.029.
 106. Alizadeh-Osgouei, M.; Li, Y.; Wen, C. A comprehensive review of biodegradable synthetic polymer-ceramic composites and their manufacture for biomedical applications. *Bioact. Mater.* **2019**, *4*, 22–36, doi:10.1016/j.bioactmat.2018.11.003.
 107. Jang, J.W.; Min, K.E.; Kim, C.; Shin, J.; Lee, J.; Yi, S. Review: Scaffold Characteristics, Fabrication Methods, and Biomaterials for the Bone Tissue Engineering. *Int. J. Precis. Eng. Manuf.* **2023**, *24*, 511–529, doi:10.1007/s12541-022-00755-7.
 108. Ansari, M.A.A.; Golebiowska, A.A.; Dash, M.; Kumar, P.; Jain, P.K.; Nukavarapu, S.P.; Ramakrishna, S.; Nanda, H.S. Engineering biomaterials to 3D-print scaffolds for bone regeneration: practical and theoretical consideration. *Biomater. Sci.* **2022**, *10*, 2789–2816, doi:10.1039/d2bm00035k.
 109. Ujčić, A.; Sobótka, M.; Šlouf, M.; Róžański, A.; Szustakiewicz, K. Structure-property

- relationships in PCL porous scaffolds obtained by means of the TIPS and TIPS-PL methods. *Polym. Test.* **2023**, *118*, 107906, doi:https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2022.107906.
110. Szustakiewicz, K.; Gazińska, M.; Kryszak, B.; Grzymajło, M.; Pięłowski, J.; Wigłusz, R.J.; Okamoto, M. The influence of hydroxyapatite content on properties of poly(L-lactide)/hydroxyapatite porous scaffolds obtained using thermal induced phase separation technique. *Eur. Polym. J.* **2019**, *113*, 313–320, doi:10.1016/j.eurpolymj.2019.01.073.
 111. Kim, H.; Kumbar, S.G.; Nukavarapu, S.P. Biomaterial-directed cell behavior for tissue engineering. *Curr. Opin. Biomed. Eng.* **2021**, *17*, doi:10.1016/j.cobme.2020.100260.
 112. McCoy, R.J.; Jungreuthmayer, C.; O'Brien, F.J. Influence of flow rate and scaffold pore size on cell behavior during mechanical stimulation in a flow perfusion bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109*, 1583–1594, doi:10.1002/bit.24424.
 113. Gonzalez, G.; Albano, C.; Palacios, J. PLLA-HA composites: Synthesis and characterization. *AIP Conf. Proc.* **2012**, *1459*, 241–243, doi:10.1063/1.4738456.
 114. Lu, H.H.; El-Amin, S.F.; Scott, K.D.; Laurencin, C.T. Three-dimensional, bioactive, biodegradable, polymer–bioactive glass composite scaffolds with improved mechanical properties support collagen synthesis and mineralization of human osteoblast-like cells in vitro. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2003**, *64A*, 465–474, doi:https://doi.org/10.1002/jbm.a.10399.
 115. Zhang, K.; Wang, Y.; Hillmyer, M.A.; Francis, L.F. Processing and properties of porous poly(l-lactide)/bioactive glass composites. *Biomaterials* **2004**, *25*, 2489–2500, doi:https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.09.033.
 116. Gruber, P.; Ziółkowski, G.; Gazińska, M.; Kryszak, B.; Krokos, A.; Olejarczyk, M.; Szymczyk-Ziółkowska, P.; Dzienny, P.; Antończak, A.J. High porosity composite structures produced from poly(lactic acid)/hydroxyapatite microspheres using novel Dual Beam Laser Sintering method: Analysis of structural, mechanical and thermal properties. *J. Manuf. Process.* **2022**, *84*, 1284–1297, doi:10.1016/j.jmapro.2022.11.010.
 117. Richter, R.F.; Ahlfeld, T.; Gelinsky, M.; Lode, A. Development and Characterization of Composites Consisting of Calcium Phosphate Cements and Mesoporous Bioactive Glass for Extrusion-Based Fabrication. *Materials (Basel)*. **2019**, *12*, doi:10.3390/ma12122022.
 118. Richter, R.F.; Ahlfeld, T.; Gelinsky, M.; Lode, A. Composites consisting of calcium phosphate cements and mesoporous bioactive glasses as a 3D plottable drug delivery system. *Acta Biomater.* **2023**, *156*, 146–157, doi:https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.01.034.
 119. Zhu, J. Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* **2010**, *31*, 4639–4656, doi:https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.02.044.
 120. Wang, S.; Wen, S.; Shen, M.; Guo, R.; Cao, X.; Wang, J.; Shi, X. Aminopropyltriethoxysilane-mediated surface functionalization of hydroxyapatite nanoparticles: synthesis, characterization, and in vitro toxicity assay. *Int. J. Nanomedicine* **2011**, *6*, 3449–3459, doi:10.2147/IJN.S27166.
 121. Chieng, B.W.; Ibrahim, N.A.; Zin, W.; Yunus, W.; Hussein, M.Z. Plasticized Poly (lactic acid) with Low Molecular Weight Poly (ethylene glycol): Mechanical , Thermal , and Morphology Properties. **2013**, 4576–4580, doi:10.1002/app.39742.
 122. Kitadai, N.; Yokoyama, T.; Nakashima, S. ATR-IR spectroscopic study of L-lysine adsorption on amorphous silica. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *329*, 31–37, doi:10.1016/j.jcis.2008.09.072.

123. Fini, M.; Torricelli, P.; Giavaresi, G.; Carpi, A.; Nicolini, A.; Giardino, R. Effect of L-lysine and L-arginine on primary osteoblast cultures from normal and osteopenic rats. *Biomed. Pharmacother.* **2001**, *55*, 213–220, doi:[https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(01\)00054-3](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(01)00054-3).
124. Torricelli, P.; Fini, M.; Giavaresi, G.; Giardino, R.; Gnudi, S.; Nicolini, A.; Carpi, A. L-Arginine and L-Lysine stimulation on cultured human osteoblasts. *Biomed. Pharmacother.* **2002**, *56*, 492–497, doi:[https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(02\)00287-1](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(02)00287-1).
125. Tavafoghi, M.; Cerruti, M. The role of amino acids in hydroxyapatite mineralization. *J. R. Soc. Interface* **2016**, *13*, doi:10.1098/rsif.2016.0462.
126. Yoshikawa, M.; Shimomura, Y.; Kakigi, H.; Tsuji, N.; Yabuuchi, T.; Hayashi, H. Effect of L-lysine in culture medium on nodule formation by bone marrow cells. *J. Biomed. Sci. Eng.* **2012**, *05*, 587–592, doi:10.4236/jbise.2012.510072.
127. Liuyun, J.; Lixin, J.; Chengdong, X.; Lijuan, X.; Ye, L. Effect of l-lysine-assisted surface grafting for nano-hydroxyapatite on mechanical properties and in vitro bioactivity of poly(lactic acid-co-glycolic acid). *J. Biomater. Appl.* **2016**, *30*, 750–758, doi:10.1177/0885328215584491.
128. Jahromi, M.T.; Yao, G.; Cerruti, M. The importance of amino acid interactions in the crystallization of hydroxyapatite. *J. R. Soc. Interface* **2013**, *10*, 20120906, doi:10.1098/rsif.2012.0906.
129. Ozhukil Kollath, V.; den Broeck, F.; Fehér, K.; Martins, J.C.; Luyten, J.; Traina, K.; Mullens, S.; Cloots, R. A Modular Approach To Study Protein Adsorption on Surface Modified Hydroxyapatite. *Chem. – A Eur. J.* **2015**, *21*, 10497–10505, doi:<https://doi.org/10.1002/chem.201500223>.
130. El Rhilassi, A.; Mourabet, M.; Bennani-Ziatni, M.; El Hamri, R.; Taitai, A. Interaction of some essential amino acids with synthesized poorly crystalline hydroxyapatite. *J. Saudi Chem. Soc.* **2016**, *20*, S632–S640, doi:10.1016/j.jscs.2013.05.003.
131. Goel, H.; Santhiya, D. Effect of pH on bio-inspired synthesis of L-Lysine templated bioactive glass hybrid xerogels for tailored textural and rheological properties. *Mater. Chem. Phys.* **2022**, *281*, 125828, doi:<https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2022.125828>.
132. Rehman, S.; Khan, K.; Mujahid, M.; Nosheen, S. Synthesis of nano-hydroxyapatite and its rapid mediated surface functionalization by silane coupling agent. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *58*, 675–681, doi:<https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.09.014>.
133. Atak, B.H.; Buyuk, B.; Huysal, M.; Isik, S.; Senel, M.; Metzger, W.; Cetin, G. Preparation and characterization of amine functional nano-hydroxyapatite/chitosan bionanocomposite for bone tissue engineering applications. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *164*, 200–213, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.100>.
134. Wang, S.; Wen, S.; Shen, M.; Guo, R.; Cao, X.; Wang, J.; Shi, X. Aminopropyltriethoxysilane-mediated surface functionalization of hydroxyapatite nanoparticles: synthesis, characterization, and in vitro toxicity assay. *Int. J. Nanomedicine* **2011**, *6*, 3449–3459.
135. Zhang, X.; Zeng, D.; Li, N.; Wen, J.; Jiang, X.; Liu, C.; Li, Y. Functionalized mesoporous bioactive glass scaffolds for enhanced bone tissue regeneration. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–12, doi:10.1038/srep19361.
136. Lee, H.; Dellatore, S.M.; Miller, W.M.; Messersmith, P.B. Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings. *Science (80-.)*. **2007**, *318*, 426–430, doi:10.1126/science.1147241.
137. Burzio, L.A.; Waite, J.H. Reactivity of peptidyl-tyrosine to hydroxylation and cross-linking. *Protein Sci.* **2001**, *10*, 735–740, doi:<https://doi.org/10.1110/ps.44201>.

138. Kaushik, N.; Nhat Nguyen, L.; Kim, J.H.; Choi, E.H.; Kumar Kaushik, N. Strategies for Using Polydopamine to Induce Biomineralization of Hydroxyapatite on Implant Materials for Bone Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21186544.
139. Ryu, J.H.; Messersmith, P.B.; Lee, H. Polydopamine Surface Chemistry: A Decade of Discovery. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 7523–7540, doi:10.1021/acsami.7b19865.
140. Scheidt, H.A.; Filip, C.; Turcu, R.; Bende, A.; Beck, S. Structure of Polydopamine: A Never-Ending Story? **2013**.
141. Mrówczyński, R. Polydopamine-Based Multifunctional (Nano)materials for Cancer Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 7541–7561, doi:10.1021/acsami.7b08392.
142. Nieto, C.; Vega, M.A.; Enrique, J.; Marcelo, G.; Del Valle, E.M.M. Size matters in the cytotoxicity of polydopamine nanoparticles in different types of tumors. *Cancers (Basel)*. **2019**, *11*, 9–14, doi:10.3390/cancers11111679.
143. Liu, Z.; Qu, S.; Zheng, X.; Xiong, X.; Fu, R.; Tang, K.; Zhong, Z.; Weng, J. Effect of polydopamine on the biomimetic mineralization of mussel-inspired calcium phosphate cement in vitro. *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, *44*, 44–51, doi:https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.07.063.
144. Ryu, J.; Ku, S.H.; Lee, H.; Park, C.B. Mussel-Inspired Polydopamine Coating as a Universal Route to Hydroxyapatite Crystallization. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 2132–2139, doi:https://doi.org/10.1002/adfm.200902347.
145. Tsai, W.-B.; Chen, W.-T.; Chien, H.-W.; Kuo, W.-H.; Wang, M.-J. Poly(dopamine) coating of scaffolds for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 4187–4194, doi:https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.07.024.
146. Yu, Y.; Li, X.; Li, J.; Li, D.; Wang, Q.; Teng, W.; Ros, H. Materials Science & Engineering C Dopamine-assisted co-deposition of hydroxyapatite-functionalised nanoparticles of polydopamine on implant surfaces to promote osteogenesis in environments with high ROS levels. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *131*, 112473, doi:10.1016/j.msec.2021.112473.
147. Deng, Z.; Wang, W.; Xu, X.; Nie, Y.; Liu, Y.; Gould, O.E.C.; Ma, N.; Lendlein, A. Biofunction of Polydopamine Coating in Stem Cell Culture. **2021**, doi:10.1021/acsami.0c22565.
148. Ahlfeld, T.; Köhler, T.; Czichy, C.; Lode, A.; Gelinsky, M. A Methylcellulose Hydrogel as Support for 3D Plotting of Complex Shaped Calcium Phosphate Scaffolds. *Gels* **2018**, *4*, doi:10.3390/gels4030068.
149. Ahlfeld, T.; Guduric, V.; Duin, S.; Akkineni, A.R.; Schütz, K.; Kilian, D.; Emmermacher, J.; Cubo-Mateo, N.; Dani, S.; Witzleben, M. V.; et al. Methylcellulose—a versatile printing material that enables biofabrication of tissue equivalents with high shape fidelity. *Biomater. Sci.* **2020**, *8*, 2102–2110, doi:10.1039/d0bm00027b.
150. Woodman, E.K.; Chaffey, J.G.K.; Hopes, P.A.; Hose, D.R.J.; Gilday, J.P. N,N'-Carbonyldiimidazole-Mediated Amide Coupling: Significant Rate Enhancement Achieved by Acid Catalysis with Imidazole·HCl. *Org. Process Res. & Dev.* **2009**, *13*, 106–113, doi:10.1021/op800226b.
151. Wang, C.; Yan, Q.; Liu, H.-B.; Zhou, X.-H.; Xiao, S.-J. Different EDC/NHS Activation Mechanisms between PAA and PMAA Brushes and the Following Amidation Reactions. *Langmuir* **2011**, *27*, 12058–12068, doi:10.1021/la202267p.
152. Liu, E.Y.; Jung, S.; Yi, H. Improved Protein Conjugation with Uniform, Macroporous Poly(acrylamide-co-acrylic acid) Hydrogel Microspheres via EDC/NHS Chemistry. *Langmuir* **2016**, *32*, 11043–11054, doi:10.1021/acs.langmuir.6b02591.

153. Kokubo, T.; Takadama, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* **2006**, *27*, 2907–2915, doi:<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>.
154. Ślósarczyk, A.; Paszkiewicz, Z.; Paluszkiwicz, C. FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods. *J. Mol. Struct.* **2005**, *744–747*, 657–661, doi:<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2004.11.078>.
155. Adamska, K.; Woźniak, M.; Voelkel, A. Surface modification of bioceramics by PEG grafting. *Ann. UMCS, Chem.* **2011**, *65*, doi:10.2478/v10063-010-0004-4.
156. Stagi, L.; Sini, M.; Carboni, D.; Anedda, R.; Siligardi, G.; Gianga, T.-M.; Hussain, R.; Innocenzi, P. Modulating the poly-l-lysine structure through the control of the protonation–deprotonation state of l-lysine. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 19719, doi:10.1038/s41598-022-24109-5.
157. Gaharwar, A.K.; Dammu, S.A.; Canter, J.M.; Wu, C.-J.; Schmidt, G. Highly Extensible, Tough, and Elastomeric Nanocomposite Hydrogels from Poly(ethylene glycol) and Hydroxyapatite Nanoparticles. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 1641–1650, doi:10.1021/bm200027z.
158. Thakur, A.; Ranote, S.; Kumar, D.; Bhardwaj, K.K.; Gupta, R.; Chauhan, G.S. Synthesis of a PEGylated Dopamine Ester with Enhanced Antibacterial and Antifungal Activity. *ACS Omega* **2018**, *3*, 7925–7933, doi:10.1021/acsomega.8b01099.
159. Batul, R.; Yu, A.; Bhave, M.; Khaliq, A. Synthesis of Polydopamine Nanoparticles for Drug Delivery Applications. *Microsc. Microanal.* **2018**, *24*, 1758–1759, doi:10.1017/s1431927618009273.
160. tutorial @ orgchemboulder.com. Dostęp z dnia 18.03.2023r.
161. Pop-Georgievski, O.; Popelka, Š.; Houska, M.; Chvostová, D.; Proks, V.; Rypáček, F. Poly(ethylene oxide) Layers Grafted to Dopamine-melanin Anchoring Layer: Stability and Resistance to Protein Adsorption. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3232–3242, doi:10.1021/bm2007086.
162. Zangmeister, R.A.; Morris, T.A.; Tarlov, M.J. Characterization of Polydopamine Thin Films Deposited at Short Times by Autoxidation of Dopamine. *Langmuir* **2013**, *29*, 8619–8628, doi:10.1021/la400587j.
163. Tan, L.; Lu, X.; Liu, N.; Yan, Q.-L. Further enhancing thermal stability of thermostable energetic derivatives of dibenzotetraazapentene by polydopamine/graphene oxide coating. *Appl. Surf. Sci.* **2021**, *543*, 148825, doi:<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.148825>.
164. Xiong, S.; Wang, Y.; Yu, J.; Chen, L.; Zhu, J.; Hu, Z. Polydopamine particles for next-generation multifunctional biocomposites. *J. Mater. Chem. A* **2014**, *2*, 7578–7587, doi:10.1039/C4TA00235K.
165. Tiwari, A.P.; Bhattarai, D.P.; Maharjan, B.; Ko, S.W.; Kim, H.Y.; Park, C.H.; Kim, C.S. Polydopamine-based Implantable Multifunctional Nanocarpets for Highly Efficient Photothermal-chemo Therapy. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 2943, doi:10.1038/s41598-019-39457-y.
166. Serra, J.; González, P.; Liste, S.; Chiussi, S.; León, B.; Pérez-Amor, M.; Ylänen, H.O.; Hupa, M. Influence of the non-bridging oxygen groups on the bioactivity of silicate glasses. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2002**, *13*, 1221–1225, doi:10.1023/A:1021174912802.
167. Zarghami, V.; Ghorbani, M.; Bagheri, K.P.; Shokrgozar, M.A. In vitro bactericidal and drug release properties of vancomycin-amino surface functionalized bioactive glass nanoparticles. *Mater. Chem. Phys.* **2020**, *241*, 122423, doi:<https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2019.122423>.
168. Aronov, D.; Rosen, R.; Ron, E.Z.; Rosenman, G. Tunable hydroxyapatite wettability:

- Effect on adhesion of biological molecules. *Process Biochem.* **2006**, *41*, 2367–2372, doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.06.006>.
169. Khan, M.A.; Hussain, Z.; Liaqat, U.; Liaqat, M.A.; Zahoor, M. Preparation of PBS/PLLA/HAP Composites by the Solution Casting Method: Mechanical Properties and Biocompatibility. *Nanomaterials* **2020**, *10*, doi:10.3390/nano10091778.
 170. Lactic, P.; Composites, A.; Tazibt, N.; Kaci, M.; Dehouche, N.; Ragoubi, M. Effect of Filler Content on the Morphology and Physical. **2023**.
 171. Kulinski, Z.; Piorkowska, E. Crystallization, structure and properties of plasticized poly(l-lactide). *Polymer (Guildf)*. **2005**, *46*, 10290–10300, doi:<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.07.101>.
 172. Wang, Y.; Funari, S.S.; Mano, J.F. Influence of semicrystalline morphology on the glass transition of poly(L-lactic acid). *Macromol. Chem. Phys.* **2006**, *207*, 1262–1271, doi:10.1002/macp.200600114.
 173. Lai, W.C.; Liao, W. Bin; Lin, T.T. The effect of end groups of PEG on the crystallization behaviors of binary crystalline polymer blends PEG/PLLA. *Polymer (Guildf)*. **2004**, *45*, 3073–3080, doi:10.1016/j.polymer.2004.03.003.
 174. Zhang, J.; Tashiro, K.; Tsuji, H.; Domb, A.J. Disorder-to-Order Phase Transition and Multiple Melting Behavior of Poly(l-lactide) Investigated by Simultaneous Measurements of WAXD and DSC. *Macromolecules* **2008**, *41*, 1352–1357, doi:10.1021/ma0706071.
 175. Saeidlou, S.; Huneault, M.A.; Li, H.; Park, C.B. Poly(lactic acid) crystallization. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 1657–1677, doi:10.1016/j.progpolymsci.2012.07.005.
 176. Mantovani, A.; Biswas, S.K.; Galdiero, M.R.; Sica, A.; Locati, M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J. Pathol.* **2013**, *229*, 176–185, doi:<https://doi.org/10.1002/path.4133>.
 177. Castillo-Cruz, O.; Avilés, F.; Vargas-Coronado, R.; Cauich-Rodríguez, J. V; Chan-Chan, L.H.; Sessini, V.; Peponi, L. Mechanical properties of l-lysine based segmented polyurethane vascular grafts and their shape memory potential. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *102*, 887–895, doi:<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.073>.
 178. Suga, T.; Osada, S.; Narita, T.; Oishi, Y.; Kodama, H. Promotion of cell adhesion by low-molecular-weight hydrogel by Lys based amphiphile. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *47*, 345–350, doi:<https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.11.032>.
 179. Li, G.; Liu, X.; Zhang, D.; He, M.; Qin, S.; Yu, J. Preparation and properties of polylactide/hydroxyapatite/polydopamine composites. *Polym. Eng. & Sci.* **2018**, *58*, 2256–2263, doi:<https://doi.org/10.1002/pen.24846>.
 180. Tawiah, B.; Yu, B.; Yuen, A.C.Y.; Fei, B. Facile preparation of uniform polydopamine particles and its application as an environmentally friendly flame retardant for biodegradable polylactic acid. *J. Fire Sci.* **2020**, *38*, 485–503, doi:10.1177/0734904120932479.
 181. Liu, R.; Wang, X.; Yu, J.; Wang, Y.; Zhu, J.; Hu, Z. Surface modification of UHMWPE/fabric composite membrane via self-polymerized polydopamine followed by mPEG-NH₂ immobilization. *J. Appl. Polym. Sci.* **2018**, *135*, 46428, doi:<https://doi.org/10.1002/app.46428>.
 182. Li, S.; Zhu, J.; Yu, J.; Wang, Y.; Hu, Z. Mussel-inspired polydopamine/polystyrene composites with 3D continuous structure and improved thermal, mechanical, and flame retarding properties. *J. Appl. Polym. Sci.* **2019**, *136*, 47740, doi:<https://doi.org/10.1002/app.47740>.
 183. Battin, C.; Hennig, A.; Mayrhofer, P.; Kunert, R.; Zlabinger, G.J.; Steinberger, P.; Paster, W. A human monocytic NF- κ B fluorescent reporter cell line for detection of microbial contaminants in biological samples. *PLoS One* **2017**, *12*, e0178220,

- doi:10.1371/journal.pone.0178220.
184. Massera, J.; Mishra, A.; Guastella, S.; Ferraris, S.; Verne, E. Surface functionalization of phosphate-based bioactive glasses with 3-aminopropyltriethoxysilane (APTS). *Biomed. Glas.* **2016**, *2*, 51–62, doi:10.1515/bglass-2016-0007.
 185. Canales, D.; Saavedra, M.; Flores, M.T.; Bejarano, J.; Ortiz, J.A.; Orihuela, P.; Alfaro, A.; Pabón, E.; Palza, H.; Zapata, P.A. Effect of bioglass nanoparticles on the properties and bioactivity of poly(lactic acid) films. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2020**, *108*, 2032–2043, doi:10.1002/jbm.a.36963.
 186. Schätzlein, E.; Kicker, C.; Söhling, N.; Ritz, U.; Neijhoft, J.; Henrich, D.; Frank, J.; Marzi, I.; Blaeser, A. 3D-Printed PLA-Bioglass Scaffolds with Controllable Calcium Release and MSC Adhesion for Bone Tissue Engineering. *Polymers (Basel)*. **2022**, *14*, doi:10.3390/polym14122389.
 187. Yan, W.; Zhang, C.Y.; Xia, L.L.; Zhang, T.; Fang, Q.F. In vitro investigation of nanohydroxyapatite/poly(l-lactic acid) spindle composites used for bone tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2016**, *27*, 130, doi:10.1007/s10856-016-5738-x.
 188. Krokos, A.; Gazińska, M.; Kryszak, B.; Dzienny, P.; Stępak, B.; Olejarczyk, M.; Gruber, P.; Kwiatkowski, R.; Bondyra, A.; Antończak, A. Comparison of thermal, structural and morphological properties of poly(l-lactide) and poly(l-lactide)/hydroxyapatite microspheres for laser sintering processes. *Polimery/Polymers* **2020**, *65*, 605–612, doi:10.14314/polimery.2020.9.2.
 189. Gazińska, M.; Krokos, A.; Kryszak, B.; Dzienny, P.; Olejarczyk, M.; Gruber, P.; Kwiatkowski, R.; Antończak, A. Influence of thermal annealing on the sinterability of different grades of polylactide microspheres dedicated for laser sintering. *Materials (Basel)*. **2021**, *14*, doi:10.3390/ma14112999.
 190. Tadier, S.; Galea, L.; Charbonnier, B.; Baroud, G.; Bohner, M. Phase and size separations occurring during the injection of model pastes composed of β -tricalcium phosphate powder, glass beads and aqueous solutions. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 2259–2268, doi:https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.018.
 191. Bercea, M. Rheology as a Tool for Fine-Tuning the Properties of Printable Bioinspired Gels. *Molecules* **2023**, *28*, doi:10.3390/molecules28062766.
 192. Wu, R.; Ma, B.; Zhou, Q.; Tang, C. Salmon calcitonin-loaded PLGA microspheres/calcium phosphate cement composites for osteoblast proliferation. *J. Appl. Polym. Sci.* **2017**, *134*, 45486, doi:https://doi.org/10.1002/app.45486.
 193. Ahlfeld, T.; Schuster, F.P.; Förster, Y.; Quade, M.; Akkineni, A.R.; Rentsch, C.; Rammelt, S.; Gelinsky, M.; Lode, A. 3D Plotted Biphasic Bone Scaffolds for Growth Factor Delivery: Biological Characterization In Vitro and In Vivo. *Adv. Healthc. Mater.* **2019**, *8*, 1801512, doi:https://doi.org/10.1002/adhm.201801512.
 194. Habraken, W.J.E.M.; Liao, H.B.; Zhang, Z.; Wolke, J.G.C.; Grijpma, D.W.; Mikos, A.G.; Feijen, J.; Jansen, J.A. In vivo degradation of calcium phosphate cement incorporated into biodegradable microspheres. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 2200–2211, doi:https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.12.028.
 195. Yang, F.; Niu, X.; Gu, X.; Xu, C.; Wang, W.; Fan, Y. Biodegradable Magnesium-Incorporated Poly(l-lactic acid) Microspheres for Manipulation of Drug Release and Alleviation of Inflammatory Response. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 23546–23557, doi:10.1021/acsami.9b03766.
 196. Arias, V.; Höglund, A.; Odelius, K.; Albertsson, A.-C. Tuning the Degradation Profiles of Poly(l-lactide)-Based Materials through Miscibility. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 391–402, doi:10.1021/bm401667b.
 197. Abbasi, N.; Hamlet, S.; Love, R.M.; Nguyen, N.-T. Porous scaffolds for bone

- regeneration. *J. Sci. Adv. Mater. Devices* **2020**, *5*, 1–9,
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2020.01.007>.
198. Wang, W.; Yeung, K.W.K. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact. Mater.* **2017**, *2*, 224–247,
doi:[10.1016/j.bioactmat.2017.05.007](https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.007).

VIII. DOROBEK NAUKOWY AUTORA

Publikacje

1. **Anna Krokos**, Małgorzata Gazińska, Bartłomiej Kryszak, Paulina K. Dzienny, Bogusz D. Stępak, Michał Olejarczyk, Piotr Gruber, Ryszard Kwiatkowski, Agnieszka Bondyra, Arkadiusz Antończak, *Comparison of thermal, structural and morphological properties of poly(l-lactide) and poly(l-lactide)/ hydroxyapatite microspheres for laser sintering processes*, Polimery, 2020, t. 65, nr 9, s. 605-612. DOI: 10.14314/polimery.2020.9.2 (MEiN: 70, IF₂₀₂₀:1.741)
2. Małgorzata Gazińska, **Anna Krokos**, Magdalena J. Kobielarz, Marcin Włodarczyk, Paulina Skibińska, Bogusz D. Stępak, Arkadiusz Antończak, Milena Morawiak, Przemysław Płociński, Karolina Rudnicka, *Influence of hydroxyapatite surface functionalization on thermal and biological properties of poly(L-Lactide)- and poly(L-Lactide-co-Glycolide)-based composites*, International Journal of Molecular Sciences, 2020, vol. 21, nr 18, art. 6711, s. 1-21. DOI: 10.3390/ijms21186711 (MEiN: 140, IF₂₀₂₀: 5.924)
3. Małgorzata Gazińska, **Anna Krokos**, Bartłomiej Kryszak, Paulina K. Dzienny, Michał Olejarczyk, Piotr Gruber, Ryszard Kwiatkowski, Arkadiusz Antończak, *Influence of thermal annealing on the sinterability of different grades of polylactide microspheres dedicated for laser sintering*, Materials. 2021, vol. 14, nr 11, art. 2999, s. 1-17. DOI: 10.3390/ma14112999 (MEiN: 140, IF₂₀₂₁: 3.748)
4. Bartłomiej Kryszak, Małgorzata Gazińska, Piotr Gruber, Mateusz J. Wieczorek, **Anna Krokos**, Paulina K. Dzienny, Patrycja Szymczyk-Ziółkowska, Michał Olejarczyk, Arkadiusz Antończak, *Mechanical properties and degradation of laser sintered structures of PLA microspheres obtained by dual beam laser sintering method*, International Journal of Advanced Manufacturing Technology. 2022, vol. 120, s. 7855-7872. DOI: 10.1007/s00170-022-09253-6 (MEiN: 100, IF₂₀₂₁: 3.563)
5. Arkadiusz Antończak, Mateusz J. Wieczorek, Paulina K. Dzienny, Bartłomiej Kryszak, **Anna Krokos**, Piotr Gruber, Michał Olejarczyk, Małgorzata Gazińska, *First, do not degrade - dual beam laser sintering of polymers*, Additive Manufacturing. 2022, vol. 53, art. 102715, s. 1-14. DOI: 10.1016/j.addma.2022.102715 (MEiN: 200, IF₂₀₂₁: 11.632)

6. Piotr Gruber, Grzegorz J. Ziółkowski, Małgorzata Gazińska, Bartłomiej Kryszak, **Anna Krokos**, Michał Olejarczyk, Patrycja Szymczyk-Ziółkowska, Paulina K. Dzienny, Arkadiusz Antończak, *High porosity composite structures produced from poly(lactic acid)/hydroxyapatite microspheres using novel Dual Beam Laser Sintering method: Analysis of structural, mechanical and thermal properties*, Journal of Manufacturing Processes. 2022, vol. 84, s. 1284-1297. DOI: 10.1016/j.jmapro.2022.11.010 (MEiN: 140, IF₂₀₂₁: 5.684)

Sumaryczna wartość współczynnika oddziaływania IF	Ogólna liczba cytowań*	Indeks Hirscha*
32.292	26	3

*dane z dnia 18.04.2023, Web of Science

Zgłoszenia patentowe

1. Małgorzata Gazińska, **Anna Krokos**, Milena Morawiak, Jacek Pięłowski, *Materiały ceramiczne w postaci powierzchniowo modyfikowanych cząstek oraz sposób ich wytwarzania*, Zgłoszenie patentowe nr P 427351 z 10.10.2018r.

2. Małgorzata Gazińska, **Anna Krokos**, Milena Morawiak, *Kompozyty polimerowo - ceramiczne oraz sposób ich wytwarzania*, Zgłoszenie patentowe nr P 432700 z 27.01.2020r.

3. **Anna Krokos**, Małgorzata Gazińska, Ewelina Ortyl, Michał K. Grzymajło, Konrad Szustakiewicz, Lidia Ciołek, *Modyfikowane bioszkle do wytwarzania bioaktywnych kompozytów polimerowych i sposób modyfikacji bioszkle do wytwarzania bioaktywnych kompozytów polimerowych*, Zgłoszenie patentowe nr P 440261 z 28.01.2022r.

4. Małgorzata Gazińska, **Anna Krokos**, Ewelina Ortyl, Michał Grzymajło, Konrad Szustakiewicz, Magdalena Kobielarz, Katarzyna Chyży, Agnieszka Kubiś, Natalia Karska, Justyna Sawicka, Sylwia Rodziewicz-Motowidło, Lidia Ciołek, Monika Biernat, Piotr Szterner, Anna Woźniak, Zbigniew Jaegermann, Milena Chraniuk, Beata Gromadzka, Mirosława Panasiuk, Piotr Bollin, *Biokompozyty polimerowo – ceramiczne zawierające peptyd o właściwościach przeciwzapalnych do wypełniania ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej oraz sposób otrzymywania biokompozytów*, Zgłoszenie patentowe nr P.442876 z 18.11.2022 r.

5. Małgorzata Gazińska, **Anna Krokos**, Ewelina Ortyl, Michał Grzymajło, Konrad Szustakiewicz, Magdalena Kobielarz, Katarzyna Chyży, Agnieszka Kubiś, Natalia Karska, Justyna Sawicka, Sylwia Rodziewicz-Motowidło, Lidia Ciołek, Monika Biernat, Piotr Szterner, Anna Woźniak, Zbigniew Jaegermann, Karolina Rudnicka, Przemysław Płociński, Aleksandra Szwed-Georgiou, Marcin Włodarczyk, *Biokompozyty polimerowo – ceramiczne o właściwościach przeciwbakteryjnych do wypełniania ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej oraz sposób ich otrzymywania*, Zgłoszenie patentowe nr P.442875 z 18.11.2022 r.

6. Małgorzata Gazińska, **Anna Krokos**, Ewelina Ortyl, Michał Grzymajło, Konrad Szustakiewicz, Magdalena Kobielarz, Katarzyna Chyży, Agnieszka Kubiś, Natalia Karska, Justyna Sawicka, Sylwia Rodziewicz-Motowidło, Lidia Ciołek, Monika Biernat, Piotr Szterner, Anna Woźniak, Zbigniew Jaegermann, Karolina Rudnicka, Przemysław Płociński, Aleksandra Szwed-Georgiou, Marcin Włodarczyk, *Biokompozyty polimerowo – ceramiczne o właściwościach proregeneracyjnych do wypełniania ubytków kostnych i regeneracji tkanki kostnej oraz sposób ich otrzymywania*, Zgłoszenie patentowe nr P.442877 z 18.11.2022 r.

Stáže krajowe i zagraniczne

1. **Staż krajowy w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej**, Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, sierpień 2021. Zakres stażu: wykonywanie badań biologicznych dla kompozytów: testy aktywności cytotoksycznej MTT i testy prozapalne THP1-Blue™.

2. **Staż zagraniczny w ramach stypendium DAAD w Centre for Translational Bone, Joint and Soft Tissue Research, Faculty of Medicine Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden**, Drezno, Niemcy, styczeń – luty 2022. Zakres stażu: druk 3D kompozytów CPC/PLLA, badania reologiczne, mechaniczne i biologiczne otrzymanych kompozytów.

3. **Staż zagraniczny w ramach projektu Erasmus+ w Centre for Translational Bone, Joint and Soft Tissue Research, Faculty of Medicine Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden**, Drezno, Niemcy, listopad – grudzień 2022. Zakres stażu: wysiewanie komórek mezenchymalnych hTERT na rusztowaniach CPC/PLLA oraz obserwacje komórek pod mikroskopem konfokalnym.

Szkolenia/kursy

1. Udział w certyfikowanym kursie „Biofabrication Lecture Week” Prof. Dr. Paula Daltona, Politechnika Wrocławska, 12-15.03.2018.
2. Udział w XVIII Ogólnopolskich Warsztatach Naukowych „Advances in controlled radical polymerization” prof. Krzysztofa Matyjaszewskiego, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi, 23.04.2018.
3. Udział w kursie „Thermal analysis – the innovative flash-DSC method and practical comparison of research techniques on the example of glass transition” organizowanym przez firmę Mettler Toledo w Polskim Ośrodku Rozwoju Technologii we Wrocławiu, 2018.
4. Udział w kursie „Reactor systems for chemical synthesis – EasyMax” organizowanym przez firmę Mettler Toledo na Politechnice Wrocławskiej, 2021.

Wykonawstwo w projektach naukowych:

1. Projekt pt. „Laser modification of bioresorbable polymeric materials in thermal processes of additive manufacturing” pod kierownictwem dr hab. inż. Arkadiusza Antończaka, prof. Uczelni w latach 2018 – 2021. Projekt finansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki NCN (UMO-2017/27/B/ST8/01780).
2. Projekt pt. „Multifunkcyjne materiały kompozytowe o właściwościach przeciwbakteryjnych i pro-regeneracyjnych do rekonstrukcji tkanki kostnej”, akronim: GlassPoPep, pod kierownictwem dr hab. inż. Konrada Szustakiewicza oraz dr inż. Małgorzaty Gazińskiej w latach 2020 – 2023. Projekt finansowany ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju NCBiR (Techmatstrateg 2/406384/7/NCBR/2019).
3. Projekt pt. „Novel method of polyamide powders reconditioning for re-use in selective laser sintering process”, akronim: PowderEUse pod kierownictwem dr hab. inż. Tomasza Kurzynowskiego, prof. Uczelni, w latach 2022 – obecnie. Projekt finansowany ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju NCBiR (M-ERA.NET3/2021/26/PowderEUse/2023).

Aktywne uczestnictwo w konferencjach naukowych:

1. Konferencja naukowa: **Modyfikacja polimerów, 2017**, Świeradów Zdrój, Polska
 - Małgorzata Gazińska, **Anna Krokos**, Jacek Pięłowski, *Influence of hydroxyapatite surface modification on poly(l-lactide) crystallization*, Modyfikacja polimerów: stan

i perspektywy w roku 2017: praca zbiorowa/pod red. Ryszarda Stellera i Danuty Żuchowskiej. Wrocław: Wydawnictwo TEMPO, 2017. s. 219-223.

2. Konferencja **Inżynierii Biomedycznej**, 26 – 27.10.2018r., Poznań, Polska

3. Konferencja **Sekcji Materiałów Polimerowych KNoM PAN** "Materiały polimerowe na bazie surowców odnawialnych", 5.11.2018 r., Wydział Inżynierii Materiałowej Politechniki Warszawskiej, Warszawa, Polska

- Referat ustny "Modyfikacja hydroksyapatytu do zastosowań w inżynierii tkanki kostnej"

4. Konferencja naukowa: **Modyfikacja polimerów, 2019**, Karpacz, Polska

- **Anna Krokos**, Małgorzata Gazińska, *Mussel-inspired coating of hydroxyapatite*, Modyfikacja polimerów: stan i perspektywy w roku 2019. Wrocław: Wydawnictwo TEMPO, 2019. s. 84-87.
- Małgorzata Gazińska, Agnieszka Bondyra, **Anna Krokos**, Agata Ściebura, Bartłomiej Kryszak, Paulina K. Dzienny, Bogusz D. Stępak, Arkadiusz Antończak, *Thermal and structural properties of polylactide microspheres*, Modyfikacja polimerów: stan i perspektywy w roku 2019. Wrocław : Wydawnictwo TEMPO, 2019. s. 32-36.

5. Konferencja naukowa: **Modyfikacja polimerów, 2021**, Szklarska Poręba, Polska

- **Anna Krokos**, Małgorzata Gazińska, *Dynamic mechanical analysis of the crosslinked poly(glycerol adipate)*, Modyfikacja polimerów: stan i perspektywy w roku 2021, Wrocław: Wydawnictwo TEMPO, 2021. s. 140-143.
- Małgorzata Gazińska, **Anna Krokos**, Bartłomiej Kryszak, Mateusz J. Wieczorek, Paulina K. Dzienny, Arkadiusz Antończak, *Dynamic thermomechanical and thermal properties of polylactide manufactured by dual beam laser sintering*, Modyfikacja polimerów: stan i perspektywy w roku 2021, Wrocław: Wydawnictwo TEMPO, 2021. s. 73-78.
- Małgorzata Gazińska, Konrad Szustakiewicz, Ewelina Ortyl, **Anna Krokos**, Michał K. Grzymajło, Magdalena J. Kobielarz, Monika A. Biernat, Lidia Ciołek, Zbigniew Jaegermann, *Poly(glycerol adipate) based composites for tissue reconstruction*,

Modyfikacja polimerów: stan i perspektywy w roku 2021, Wrocław: Wydawnictwo TEMPO, 2021. s. 71-72.

- Michał K. Grzymajło, Konrad Szustakiewicz, **Anna Krokos**, Małgorzata Gazińska, *Właściwości sieciowanych chemicznie, spienionych kompozytów na bazie PGA i bioszklą*, Modyfikacja polimerów: stan i perspektywy w roku 2021, Wrocław: Wydawnictwo TEMPO, 2021. s. 83-87.

6. Konferencja naukowa: **IMPLANTY 2022**, Gdańsk, Polska

- **Anna Krokos**, Katarzyna M. Chyży, Lidia Ciołek, Małgorzata Gazińska, *Wpływ modyfikacji bioszklą na zwilżalność i właściwości termiczne kompozytów z poli(L-laktydu) i poli(L-laktydu-co-glikolidu)*, IV Ogólnopolska Konferencja Naukowa IMPLANTY2022: Inżynieria, medycyna i nauka – w pogoni za implantem doskonałym: książka abstraktów/red. Marta Cecotka, Marcin Wekwejt, Gdańsk, 2022. s. 54-54.
- Magdalena J. Kobielarz, **Anna Krokos**, Katarzyna M. Chyży, Michał K. Grzymajło, Konrad Szustakiewicz, Małgorzata Gazińska, *Badania degradacji hydrolytycznej kompozytów polimerowych poliadypinianu glicerolu z bioszklą*, IV Ogólnopolska Konferencja Naukowa IMPLANTY2022: Inżynieria, medycyna i nauka – w pogoni za implantem doskonałym: książka abstraktów/red. Marta Cecotka, Marcin Wekwejt, Gdańsk, 2022. s. 52-52.
- Małgorzata Gazińska, **Anna Krokos**, Katarzyna M. Chyży, Magdalena J. Kobielarz, Aleksandra Szwed-Georgiou, Marcin Włodarczyk, Anton Komarov, Karolina Rudnicka, *Termiczne i chemiczne sieciowanie - kształtowanie właściwości elastomerów poli(adypinianu glicerolu)*, IV Ogólnopolska Konferencja Naukowa IMPLANTY2022: Inżynieria, medycyna i nauka – w pogoni za implantem doskonałym: książka abstraktów/red. Marta Cecotka, Marcin Wekwejt, Gdańsk, 2022. s. 48-48.

7. Konferencja naukowa „**Bioimplanty kości – innowacyjne rozwiązania dla medycyny regeneracyjnej**”, Warszawa 10.03.2023r.

- Referat ustny „Funkcjonalizacja cząstek bioszklą aminokwasem egzogennym”

8. Konferencja naukowa: **IMPLANTY 2023**, Gdańsk, Polska

- **Anna Krokos**, Małgorzata Gazińska, „Wpływ modyfikacji hydroksyapatytu polidopaminą na krystalizację PLLA w kompozytach” (streszczenie zaakceptowane 11.04.2023 r.)

Współautor streszczeń konferencyjnych bez aktywnego udziału:

1. Konferencja naukowa: **11th International Conference on X-Ray Investigations of Polymers Structure, 2019**, Bielsko-Biała, Polska

- Bartłomiej Kryszak, Małgorzata Gazińska, Agnieszka Bondyra, **Anna Krokos**, Agata Ściebura, Bogusz D. Stępak, Paulina K. Dzienny, Jacek Piękowski, Arkadiusz Antończak, *Characteristics of polymer biocomposite microspheres for additive manufacturing*, książka abstraktów ed. Monika Basiura-Cembala, Bielsko-Biała, 2019, s. 55-56, ISBN 978- 83-66249-28-8.

2. Konferencja naukowa: **21st International Symposium on Laser Precision Microfabrication, 2020**, Drezno, Niemcy

- Bogusz D. Stępak, Małgorzata Gazińska, **Anna Krokos**, Aleksander Budnicki, Konrad Szustakiewicz, Arkadiusz Antończak, *Modification of medical-grade poly(L-lactide) using femtosecond laser filamentation*, 21st International Symposium on Laser Precision Microfabrication, 23-26 czerwca 2020, Drezno, Niemcy: książka abstraktów, 259, 218-218, <https://lpm2020.inventum.de/fileadmin/Tagungen/2020/2020-06-LPM/LPM2020-Digital-Abstract-Booklet.pdf>

3. Konferencja naukowa: **XIII Sympozjum Techniki Laserowej, STL 2022**, Karpacz, Polska

- Arkadiusz Antończak, Małgorzata Gazińska, Piotr Gruber, Bartłomiej Kryszak, **Anna Krokos**, Michał Olejarczyk, Paulina K. Dzienny, Patrycja Szymczyk-Ziółkowska, *Dwuwiązkowe laserowe spiekanie polimerów (DBLS)*, XIII Sympozjum Techniki Laserowej, STL 2022, 19-22 września 2022, Karpacz: książka abstraktów/red. Grzegorz Soboń, Zbigniew Łaszczych, Jarosław Sotor, 2022. s. 39-39.

Nagrody:

- Nagroda w programie Secundus Politechniki Wrocławskiej 2023
- Wyróżnienie nagrodą specjalną Marszałka Województwa Świętokrzyskiego w konkursie Student – Wynalazca 2023
- Stypendium projakościowe – z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych w roku akademickim 2022/2023
- Stypendium Rektora Politechniki Wrocławskiej dla doktorantów 2020/2021
- Stypendium projakościowe – z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych w roku akademickim 2017/2018
- Stypendium Rektora Politechniki Wrocławskiej dla doktorantów 2017/2018

Ekspertyzy przemysłowe (współpraca z przemysłem):

1. Michał Barcikowski, Wojciech Błażejowski, Michał Stosiak, Paweł J. Bury, Rafał A. Cieśliski, Adrianna Filipiak-Kaczmarek, Aneta Niemiec, Marek Lubecki, Krzysztof Towarnicki, Małgorzata Gazińska, **Anna Krokos**, *Ocena stanu technicznego kompozytowych rurociągów wody chłodzącej na bloku nr 5 i 6 w Elektrowni Opole*. Raporty Wydziału Mechanicznego Politechniki Wrocławskiej. 2018, Ser. SPR nr 234, 53 s.
2. Małgorzata Gazińska, **Anna Krokos**, *Badania czasu indukcji utleniania OIT za pomocą DSC dla granulatów firmy PCC Rokita*, 2020
3. Małgorzata Gazińska, **Anna Krokos**, *Analiza termogravimetryczna zawartości sadzy w kompozytach firmy Pietrucha*, 2021
4. Małgorzata Gazińska, **Anna Krokos**, *Analiza termogravimetryczna próbek drewna dla Głównego Instytutu Górnictwa*, 2021
5. **Anna Krokos**, Małgorzata Gazińska, *Analiza porównawcza TGA, DSC, FTIR dla detali z poliamidu 6 i zwulkanizowanej gumy dla firmy GOTEC*, 2021
6. **Anna Krokos**, „*Badania czasu indukcji utleniania OIT za pomocą DSC dla granulatów polimerowych firmy S i a Pietrucha Sp. z o. o.*”, 2023
7. **Anna Krokos**, „*Analiza strukturalna FTIR – ATR folii polimerowych zawierających domieszki farby dla firmy Oben group*”, 2023
8. **Anna Krokos**, „*Analiza termogravimetryczna olejów typu PAG dla firmy PCC Rokita*”, 2023