Politechnika Krakowska
im. Tadeusza Kościuszki

Wydział Inżynierii
i Technologii Chemicznej

ROZPRAWA DOKTORSKA

Synteza i właściwości poliestrów z kwasu cytrynowego do zastosowań biomedycznych

mgr inż. Filip Koper

Promotor: prof. dr hab. inż. Dariusz Bogdał

Promotor pomocniczy: dr inż. Wiktor Kasprzyk

Kraków 2023

Niniejsza rozprawa doktorska powstała w wyniku realizacji projektu

NCN SONATINA

nr UMO-2018/28/C/ST5/00461

pt. „Nowe fluorescencyjne poliestry o właściwościach przeciwutleniających do zastosowań w inżynierii naczyń krwionośnych”

finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki

NARODOWE CENTRUM NAUKI

Pragnę serdecznie podziękować

Panu prof. dr hab. inż. Dariuszowi Bogdałowi

za opiekę promotorską, serdeczność, pomoc

i wsparcie udzielone przy powstawaniu niniejszej pracy

Składam najserdeczniejsze podziękowania

Panu dr inż. Wiktorowi Kasprzykowi

za opiekę merytoryczną, świetne pomysły, ogrom pomocy i dziesiątki godzin

spędzone ze mną nad powstawaniem niniejszej pracy

Dziękuję również

Pani mgr inż. Agacie Flis oraz Pani prof. dr hab. inż. Elżbiecie Pamuła

za pomoc w wykonaniu i analizie badań biologicznych,

niezbędnych do potwierdzenia efektów niniejszej pracy

Dziękuję również wszystkim studentom i dyplomantom z naszego koła naukowego i całej załodze lab 2 i 213, ***w szczególności Pani inż. Annie Żabie i Pani mgr inż. Dominice Szreder*** *za mnóstwo czasu poświęconego na pomoc w przygotowaniu materiałów i próbek do niniejszej pracy*

Serdecznie dziękuję także ***Panom dr hab. inż. Sławomirowi Wybrańcowi, prof. PK i dr inż. Sławomirowi Michałowskiemu*** *za udostępnienie aparatury badawczej oraz wsparcie merytoryczne w jej wykorzystaniu, a także* ***Panu dr Liborowi Koberze*** *z Instytutu Chemii Makromolekularnej Czeskiej Akademii Nauk w Pradze za nieodpłatne wykonanie analiz spektroskopowych ssNMR.*

Składam również podziękowania dla wszystkich

pracowników, studentów i doktorantów Wydziału Inżynierii i Technologii Chemicznej PK

za pomoc, wsparcie, dobre rady i fantastyczną atmosferę pracy

Niniejsza praca nie powstałaby, gdyby nie pomoc, wsparcie duchowe i analityczne oraz pogoda ducha,

Ś. P. mgr inż. Tomasza Świergosza

którego ogromny wkład i poświęcenie dla nauki zostanie na zawsze na kartach tej i dziesiątek innych naszych wspólnych prac. Dziękuję Tomku.

Niniejszą pracę dedykuję

mojej ukochanej Zuzannie

Dziękuję za bycie moim światełkiem w ciemnych tunelach życia i cierpliwe znoszenie wszystkich trudności, wzlotów i upadków, które towarzyszyły mi podczas powstawania niniejszej pracy.

Spis treści

Spis skrótów i oznaczeń 10

Część literaturowa 13

1. Choroby układu sercowo-naczyniowego 13

1.1. Choroby układu krwionośnego w Europie i na świecie 13

1.2. Metody leczenia 14

2. Inżynieria tkankowa 14

2.1. Kierunki rozwoju inżynierii tkankowej 15

2.2. Najważniejsze właściwości nowych materiałów 16

2.3. Rusztowania tkankowe 19

3. Inżynieria tkankowa naczyń krwionośnych 21

3.1. Materiały wykorzystywane w inżynierii tkankowej naczyń krwionośnych 23

3.1.1. Materiały syntetyczne 24

3.1.2. Materiały pochodzenia biologicznego 27

3.1.3. Materiały nowej generacji i ich perspektywy 30

4. Biozgodne i biodegradowalne materiały otrzymywane z kwasu cytrynowego 32

4.1. Kierunki zastosowań kwasu cytrynowego 32

4.1.1. Kwas cytrynowy w technologii żywności, przetwórstwie tworzyw sztucznych i przemyśle opakowaniowym 34

4.1.2. Kwas cytrynowy w medycynie i farmacji 35

4.1.3. Związki fluorescencyjne otrzymywane z kwasu cytrynowego 36

4.1.4. Kwas cytrynowy w inżynierii tkankowej – poli(cytryniany alkilenu) (PAC) 38

4.1.4.1. Otrzymywanie i właściwości PAC 39

4.1.5. Modyfikacje PAC 44

4.1.6. Zastosowanie PAC w medycynie regeneracyjnej 47

4.1.6.1. PAC w inżynierii tkanek nerwowych 47

4.1.6.2. PAC w inżynierii tkanek kostnych 48
4.1.6.3. PAC w inżynierii tkankowej naczyń krwionośnych 49
5. Podsumowanie części literaturowej 52
Cel i zakres pracy 55
Część doświadczalna 56
6. Odczynniki 56
7. Przepisy preparatywne i metody charakterystyki otrzymanych produktów 58
7.1. Nazewnictwo próbek 58
7.2. Materiały PAC kontrolne 59
7.2.1. Synteza prepolimerów 59
7.2.1.1. Reakcje przesiewowe syntezy prepolimerów 60
7.2.1.2. Synteza prepolimerów na skalę preparatywną 62
7.2.2. Charakterystyka prepolimerów 62
7.2.2.1. Analiza liczby kwasowej prepolimerów 62
7.2.2.2. Analiza GPC prepolimerów 63
7.2.2.3. Analiza FIA-ESI-MS prepolimerów 64
7.2.2.4. Analizy NMR prepolimerów w roztworze 64
7.2.3. Sieciowanie materiałów kontrolnych cPAC 65
7.2.4. Charakterystyka materiałów kontrolnych cPAC 66
7.2.4.1. Analiza materiałów kontrolnych cPAC za pomocą NMR dla próbek stałych 66
7.2.4.2. Badania właściwości mechanicznych materiałów kontrolnych cPAC 66
7.2.4.3. Pomiary twardości materiałów kontrolnych cPAC 67
7.2.4.4. Badania zgodności biologicznej materiałów kontrolnych cPAC 67
7.3. Materiały cPAC modyfikowane 70
7.3.1. Modyfikacja materiałów cPAC 70
7.3.1.1. Modyfikacja materiałów w masie 70

7.3.2. Charakterystyka materiałów modyfikowanych cPAC 71
7.3.2.1. Analiza materiałów modyfikowanych cPAC za pomocą NMR dla próbek stałych 71
7.3.2.2. Analiza właściwości spektroskopowych materiałów modyfikowanych cPAC 71
7.3.2.3. Analiza właściwości przeciwutleniających materiałów modyfikowanych cPAC 72
7.3.2.4. Badania mechaniczne materiałów modyfikowanych cPAC 73
7.3.2.5. Pomiary twardości materiałów modyfikowanych cPAC 73
7.3.2.6. Badania zgodności biologicznej materiałów modyfikowanych cPAC 73
8. Wyniki i dyskusja 75
8.1. Materiały PAC kontrolne 75
8.1.1. Synteza prepolimerów 75
8.1.1.1. Właściwości otrzymanych prepolimerów 75
8.1.1.2. Modyfikacje parametrów syntezy 77
8.1.2. Charakterystyka prepolimerów 81
8.1.2.1. Wyniki analizy liczby kwasowej prepolimerów 81
8.1.2.2. Wyniki analizy GPC prepolimerów 84
8.1.2.3. Wyniki analiz FIA-ESI-MS prepolimerów 86
8.1.2.4. Wyniki analizy NMR prepolimerów w roztworze 92
8.1.2.4.1. Omówienie analizy widm i struktury prepolimerów 93
8.1.2.4.2. Wyniki analizy stosunków molowych reszt cytrynianowych i segmentów alkilenowych w strukturze prepolimeru 98
8.1.2.4.3. Wyniki kalkulacji reaktywności grup karboksylowych w strukturze prepolimeru 99
8.1.2.4.4. Wyniki analizy stopnia konwersji grup karboksylowych w strukturze prepolimeru 101
8.1.2.5. Podsumowanie charakterystyki prepolimerów 103
8.1.3. Otrzymywanie materiałów kontrolnych cPAC 104

8.1.4. Charakterystyka materiałów kontrolnych cPAC 107

8.1.4.1. Wyniki analizy NMR dla próbek stałych materiałów kontrolnych cPAC 107

8.1.4.1.1. Omówienie analizy widm i określenie struktury materiału 107

8.1.4.1.2. Wyniki analizy stosunku molowego reszt cytrynianowych i alkilenowych w materiale kontrolnym cPAC 109

8.1.4.1.3. Wyniki analizy stopnia konwersji grup karboksylowych w materiale kontrolnym cPAC 110

8.1.4.1.4. Wyniki analizy reaktywności grup karboksylowych w materiale kontrolnym cPAC 111

8.1.4.2. Wyniki pomiarów właściwości mechanicznych materiałów kontrolnych cPAC .. 112

8.1.4.3. Wyniki pomiarów twardości materiałów kontrolnych cPAC 114

8.1.4.4. Wyniki analizy zgodności biologicznej materiałów kontrolnych cPAC 116

8.1.5. Podsumowanie charakterystyki materiałów kontrolnych cPAC 125

8.2. Materiały cPAC modyfikowane 126

8.2.1. Omówienie modyfikacji materiałów cPAC 126

8.2.2. Charakterystyka materiałów modyfikowanych cPAC 128

8.2.2.1. Wyniki analizy materiałów modyfikowanych cPAC za pomocą NMR dla próbek stałych 129

8.2.2.2. Właściwości spektroskopowe modyfikowanych materiałów cPAC 131

8.2.2.2.1. Źródło fluorescencji materiałów modyfikowanych cPAC 131

8.2.2.2.2. Wyniki analizy właściwości spektroskopowych materiałów modyfikowanych cPAC 133

8.2.2.3. Wyniki analizy właściwości przeciwutleniających materiałów modyfikowanych cPAC 138

8.2.2.4. Wyniki badań mechanicznych materiałów modyfikowanych cPAC 141

8.2.2.5. Wyniki pomiarów twardości materiałów modyfikowanych cPAC 144

8.2.2.6. Wyniki analizy zgodności biologicznej materiałów modyfikowanych cPAC 147

8.2.3. Podsumowanie otrzymywania i charakterystyki materiałów modyfikowanych cPAC 149

9. Podsumowanie części doświadczalnej i perspektywy 149

Wnioski 154

Streszczenie 156

Abstract 158

Spis rysunków 160

Spis tabel 168

Bibliografia 171

Dorobek naukowy 194

Spis skrótów i oznaczeń

W niniejszej pracy zastosowano następujące skróty i oznaczenia:

- **AlamarBlue** - niebieski barwnik fluorescencyjny (dł. fali emisji = 590 nm) służący do oznaczania aktywności metabolicznej komórek, 10% roztwór soli sodowej resazuryny
- **ASC** – komórki macierzyste wyizolowane z tkanki tłuszczowej, ang. *adipose-derived stem cells*
- **BPLP** – nowe biodegradowalne polimery fotoluminescencyjne, ang. *biodegradable photoluminecscent polymers*
- **COSY** – spektroskopia korelacyjna, ang. *correlation spectroscopy*
- **cPHC** – usieciowany poli(cytrynian heksametylenu)
- **cPOC** – usieciowany poli(cytrynian oktametylenu)
- **CTPC** – kwas 3-[(karboksymetylo)karbamoilo]-5-okso-2,3-dihydro-5*H*-[1,3]tiazolo[3,2-a]pirydyno-7-karboksylowy
- **CTR** – kwas cytrynowy
- **DMEM** – medium komórkowe używane w hodowli komórek tkanek ludzkich i zwierzęcych, ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- **DMSO-d6** – deuterowany dimetylosulfotlenek
- **DPPH** - 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl
- **EGM-2** – medium hodowlane stosowane do hodowli komórek śródbłonka naczyniowego, ang. *endothelial cell growth medium*
- **ePTFE** – ekspandowany poli(tetrafluoroetylen) (Teflon®)
- **ESI** – jonizacja z użyciem elektrorozpylania, ang. *electrospray ionisation*
- **FDA** – Agencja Żywności i Leków, ang. *Food and Drug Administration*
- **FGF-2** – podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów, ang. *basic fibroblasts growth factor*
- **FIA** – analiza próbki nastrzykniętej bezpośrednio na detektor masowy, z pominięciem rozdzielania chromatograficznego, ang. *flow injection analysis*
- **GPC** – chromatografia żelowa, ang. *gel permeation chromatography*
- **GSH** – L-glutation
- **HEX** – 1,6-heksanodiol

- **HMBC** – heterojądrowa korelacja (^{1}H-X) dalekiego zasięgu – eksperyment pozwalający na korelowanie sygnałów pochodzących od jąder różnych pierwiastków, oddalonych o wiele wiązań (najczęściej 3 lub 5), ang. *Heteronuclear Multiple Bond Coherence*
- **HSQC** – heterojądrowa korelacja z detekcją przejść jednokwantowych – eksperyment pozwalający na korelowanie sygnałów protonów z sygnałami jąder innego pierwiastka na jednym widmie 2D, oddalonych od siebie o jedno wiązanie, ang. *Heteronuclear Single Quantum Correlation*
- **HUVEC** – ludzkie komórki śródbłonka żyły pępowinowej, ang. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*
- **Kalceina-AM** – barwnik fluorescencyjny stosowany w analizie żywotności komórek, ester acetoksymetylowy *N,N'*-((3',6'-dihydroksy-3-oksospiro(izobenzofurano 1(3*H*),9'(9*H*) ksanteno)-2',7' -diylo)bis(metyleno))bis(*N*-(karboksymetylo)-glicyny
- **LC** – chromatografia cieczowa, ang. *liquid chromatography*
- **LK** – liczba kwasowa
- **MAS** – wirowanie pod tzw. „kątem magicznym", technika pomiaru widm próbek stosowana w spektroskopii ssNMR, ang. *magic angle spinning*
- **MS** – spektrometria mas, ang. *mass spectrometry*
- **NMR** – spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego, ang. *Nuclear Magnetic Resonance*
- **OCT** – 1,8-oktanodiol
- **PAC** – poli(cytryniany alkilenu), ang. *poly(alkylene citrates)*
- **PANT** – L,D-pantenol
- **PBS** – bufor o pH ok. 7,4, składający się z wodorofosforanu (V) sodu oraz chlorku sodu. Stosowany w badaniach biologicznych jako rozpuszczalnik i substancja zapewniająca odpowiednie pH środowiska, ang. *posphate-buffered saline*
- **PCL** – poli-ε-kaprolakton
- **PDA** – detektor polidiodowy, ang. *poly diode array detector*
- **PEG** – poli(glikol etylenowy)
- **PET** – poli(tereftalan etylenu)
- **PGA** – poli(kwas glikolowy)
- **PGS** – poli(sebacynian glicerolu)

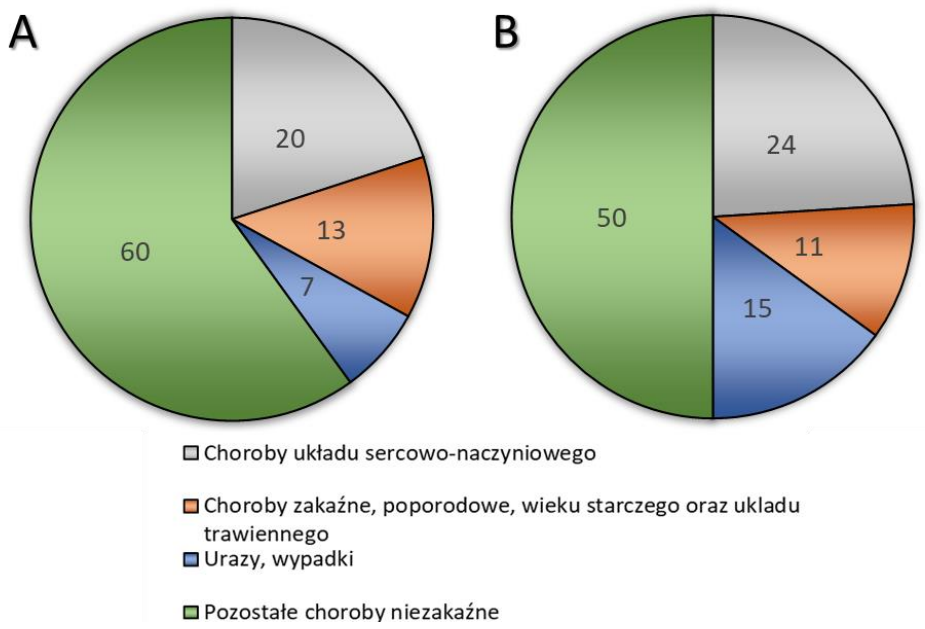
- **PHC** – prepolimer poli(cytrynianu heksametylenu)
- **PLA** – polilaktyd
- **PLGA** – kopolimer kwasu glikolowego i laktydu
- **PLLA** – poli(L-kwas mlekowy)
- **POC** – prepolimer poli(cytrynianu oktametylenu)
- **QY** – wydajność kwantowa fluorescencji, oznacza stosunek ilości fotonów wyemitowanych przez związek fluorescencyjny do ilości fotonów zaabsorbowanych, ang. *quantum yield*
- **RF** – detektor fluorescencyjny, ang. *relative fluorescence detector*
- **SEM** – elektronowa mikroskopia skaningowa, ang. *scanning electrone microscopy*
- **ssNMR** – spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego dla próbek stałych, ang. *solid state Nuclear Magnetic Resonance*
- **TCPS** – rodzaj kontrolnej hodowli komórek oraz materiału stosowanego do produkcji płytek hodowlanych. Hodowla taka polega na osadzeniu komórek w zawiesinie lub na powierzchni czystego dołka płytki hodowlanej, wykonanej z polistyrenu modyfikowanego za pomocą plazmy w celu polepszenia jego właściwości hodowlanych, ang. *tissue culture polystyrene*
- **THF** – tetrahydrofuran
- **TMS** – tetrametylosilan, wzorzec w spektroskopii NMR
- **VSMC** – komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych, ang. *vascular smooth muscle cells*

Część literaturowa

1. Choroby układu sercowo-naczyniowego

1.1. Choroby układu krwionośnego w Europie i na świecie

Chorobami układu sercowo-naczyniowego określany jest ogół schorzeń występujących w obrębie serca i naczyń krwionośnych człowieka [1]. Schorzenia te mogą stanowić zarówno choroby całego układu krążenia, jak miażdżyca czy nadciśnienie, mięśnia sercowego – zawały i zatory w obrębie naczyń włosowatych, uszkodzenia zastawek lub być wynikiem nieprawidłowego działania układu krwionośnego na inne narządy – zator płucny, udar mózgu [1], [2]. Choroby układu sercowo naczyniowego stanowią jeden z podstawowych problemów, z jakim zmaga się współczesna cywilizacja. Co drugi człowiek zmaga się lub będzie zmagał się w swoim życiu z problemami z układem krążenia. W Europie, w 2021 roku choroby układu krążenia były odpowiedzialne za ponad 37% zgonów wśród pacjentów [3], natomiast w skali globalnej stanowiły w 2016 roku odsetek 24% wszystkich zgonów spowodowanych chorobami wśród mężczyzn oraz 20% wśród kobiet (Rys. 1) [1].



Rys. 1. Statystyka głównych przyczyn zgonów na świecie w 2016 roku wśród kobiet (**A**) i mężczyzn (**B**) [1]

Etiologia chorób układu krążenia jest zróżnicowana, a wpływ na nią ma szereg czynników zarówno osobniczych, genetycznych, jak i środowiskowych [4]–[8]. Podstawowymi

przyczynami występowania tak znacznego udziału chorób układu sercowo-naczyniowego w statystykach zgonów są coraz bardziej postępujące choroby współistniejące takie, jak uzależnienie od nikotyny i alkoholu, otyłość kliniczna oraz stres i zanieczyszczenia środowiska[5], [7]–[10].

1.2. Metody leczenia

Najważniejszą rolę w zwalczaniu chorób układu krążenia odgrywa profilaktyka. Wczesne wykrywanie może pozwolić na zminimalizowanie ryzyka ciężkiego przebiegu schorzeń oraz w niektórych przypadkach wyeliminować często śmiertelne powikłania. W przypadku braku możliwości uniknięcia choroby zwykle stosowane jest leczenie farmakologiczne [11], [12]. W niektórych chorobach stosuje się leczenie inwazyjne z wykorzystaniem technik chirurgii naczyniowej, w skład której wchodzą takie zabiegi, jak angioplastyka, pomostowanie (ang. *bypass*), przeszczepy zastawek, naczyń czy serca [13].

Szczególnie dużą grupę schorzeń układu krążenia leczoną metodami inwazyjnymi stanowią zwężenia światła naczyń w przebiegu tzw. chorób niedokrwiennych. Dotyczą one zarówno dużych naczyń, jak i najmniejszych naczyń włosowatych, także tych w obrębie mięśnia sercowego. Metody chirurgiczne opierają się zarówno na technikach polegających na udrożnieniu zablokowanych naczyń za pomocą angioplastyki, jak i na wykonywaniu pomostowania naczyń, których udrożnienie, na skutek zbyt daleko posuniętych zmian chorobowych jest niemożliwe [14], [15].

W przypadku operacji pomostowania wykorzystywane są zarówno zdrowe naczynia krwionośne, pobrane z innych części ciała pacjenta – tzw. przeszczepy autogeniczne, naczynia pobrane od innych dawców, zwane przeszczepami allogeniczymi oraz syntetyczne materiały zastępcze, będące wszczepami ksenogenicznymi [14]. Te ostatnie materiały stanowią osiągnięcia multidyscyplinarnej dziedziny nauki, zwanej inżynierią tkankową.

2. Inżynieria tkankowa

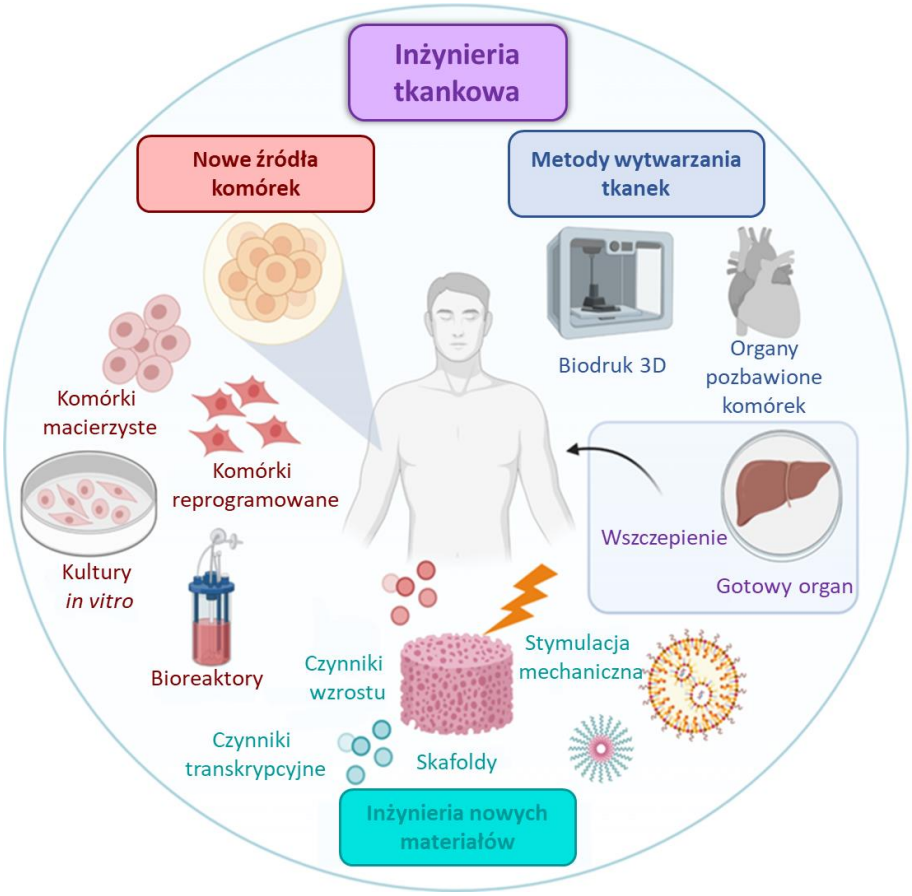
Inżynieria tkankowa to dziedzina nauki, w której stosowane są zasady inżynierii materiałowej i nauk przyrodniczych w celu opracowania biologicznych substytutów, przywracających, utrzymujących lub poprawiających funkcję tkanki lub całego

narządu [16], [17]. W zamyśle, inżynieria tkankowa stanowi makrodyscyplinę łączącą osiągnięcia z innych dziedzin w celu zapewnienia wszechstronnego podejścia do opracowywanych zagadnień. Osiągnięcia inżynierii tkankowej stanowią podstawę rozwoju współczesnej medycyny regeneracyjnej, dając fundament wszystkich pokrewnych jej dziedzin.

2.1. Kierunki rozwoju inżynierii tkankowej

W ramach inżynierii tkankowej prowadzone są badania nad wieloma aspektami, które wzajemnie się dopełniają. Można wyróżnić trzy podstawowe kierunki rozwoju inżynierii tkankowej (Rys. 2):

- Inżynieria nowych materiałów
- Pozyskiwanie nowych źródeł tkanek i komórek
- Techniki trójwymiarowego wytwarzania tkanek i organów



Rys. 2. Schemat przedstawiający główne kierunki rozwoju inżynierii tkankowej oraz szczegółowe parametry kluczowe w ich opracowywaniu [17], [18]

W ramach rozwoju nowych źródeł pozyskiwania komórek wypracowywane są metody oparte o wykorzystanie pluripotentnych[1] komórek macierzystych, oraz komórek prekursorowych[2], które poddane czynnikom różnicującym mogą być przekształcane w inne komórki somatyczne [19]. Dzięki takim zabiegom możliwe jest pozyskiwanie od pacjenta jego własnych komórek, które następnie modyfikowane są w komórki docelowo wszczepianej tkanki. Komórki takie mogą być hodowane i różnicowane *in vitro* na rusztowaniach tkankowych i następnie wszczepiane do organizmu biorcy [20], [21].

Osobno rozwijaną gałęzią inżynierii tkankowej są nowe technologie wytwarzania narządów i tkanek. Oprócz tradycyjnie stosowanych rusztowań naturalnych, w postaci białkowych konstruktów organów pozbawionych komórek, na których inkubowane są komórki pacjenta, coraz większą popularność zdobywa biodruk 3D. Za pomocą odpowiedniej żywicy hydrożelowej, zawierającej zawiesinę komórek możliwe stało się drukowanie funkcjonalnych tkanek oraz całych narządów [22]–[24].

2.2. Najważniejsze właściwości nowych materiałów

Najbardziej rozbudowaną gałęzią inżynierii tkankowej jest inżynieria nowych materiałów, która zajmuje się wytwarzaniem i charakterystyką nowych tworzyw i kompozytów stosowanych w pozostałych dziedzinach inżynierii tkankowej. Materiały mogące mieć zastosowanie w inżynierii tkankowej muszą charakteryzować się kilkoma podstawowymi cechami:

- **Biozgodność i brak toksyczności**

Zarówno tworzywa jak i produkty ich degradacji oraz substraty, z których powstały powinny być obojętne dla komórek lub wpływać pozytywnie na ich wzrost i proliferację [25]–[27]. Brak lub mała biozgodność materiałów z komórkami tkanki docelowej oraz tkanek przyległych skutkuje ich szkodliwym wpływem na komórki hodowane na rusztowaniach tkankowych wykonanych z takich materiałów. Może to prowadzić do ich nekrozy lub

[1] Pluripotentne komórki macierzyste – komórki zdolne do różnicowania się w dowolny typ komórek somatycznych poza komórkami tworzącymi łożysko. Mogą być różnicowane z wykorzystaniem czynników fizycznych, chemicznych oraz przy pomocy technik inżynierii genetycznej.

[2] Komórki prekursorowe (blasty) – komórki macierzyste częściowo zróżnicowane do komórek somatycznych budujących określony rodzaj tkanki. Z komórek prekursorowych w wyniku dalszego różnicowania powstają inne komórki danej tkanki, np. fibroblasty – komórki tkanki mięśniowej, osteoblasty – komórki tkanki kostnej.

powodować mutacje i zaburzenia wzrostu komórek, skutkujące przerostami tkanek i powstawaniem nowotworów [26], [28]. Materiały, które charakteryzują się biodegradowalnością muszą dodatkowo spełniać warunek degradacji do nietoksycznych produktów lub takich, których relatywnie mała toksyczność pozwala na ich usunięcie z organizmu bez powodowania uszkodzeń w tkankach i organach [26]. Dodatkowo, biozgodność opracowywanych materiałów musi być zachowana przez cały czas ekspozycji materiału na tkanki biorcy – ujawniające się z czasem cytotoksyczne właściwości materiałów mogą indukować odpowiedź immunologiczną i powodować występowanie lokalnych stanów zapalnych, co może skutkować odrzuceniem wszczepu oraz powikłaniami zdrowotnymi biorcy [29]–[31].

- **Czas degradacji w organizmie**

Materiały wykorzystywane w inżynierii tkankowej mogą być wszczepiane do organizmu biorcy na stałe lub na określony czas, po którym zostają wchłonięte przez komórki. Takie biodegradowalne materiały muszą cechować się określonym czasem degradacji, zależnym od szybkości i kierunku wzrostu komórek w tkance wzrastającej na rusztowaniu [32]. Dobór odpowiedniego czasu degradacji jest kluczowy dla prawidłowego funkcjonowania rusztowań w organizmie – właściwie dobrany czas degradacji powoduje wzrost komórek w obrębie rusztowania we właściwym kierunku, które jest stopniowo wchłaniane przez komórki odbudowujące daną tkankę. Zbyt krótki czas degradacji powoduje przedwczesny zanik rusztowania, przez co komórki, pozbawione punktu podparcia nie są w stanie odbudować tkanki. Z kolei zbyt szybka degradacja materiału skutkuje także szybszym uwalnianiem się produktów rozpadu do organizmu, które w większym stężeniu mogą być niekorzystne dla zdrowia pacjenta. Zbyt długi czas degradacji powoduje z kolei brak wystarczającej ilości miejsca dla prawidłowego wzrostu komórek, co skutkuje przerostami komórek oraz nadmiernym i niekontrolowanym wzrostem tkanki [33]–[36]. Monitorowanie postępu degradacji może odbywać się za pomocą technik inwazyjnych oraz nieinwazyjnych, z wykorzystaniem metod ultrasonograficznych i spektroskopowych [37]. Do materiałów wprowadzane są również dodatki, np. barwniki fluorescencyjne, które pozwalają monitorować w sposób nieinwazyjny postęp degradacji rusztowania w organizmie [38]–[40]. Takie barwniki jednak muszą charakteryzować się długościami fal emisji w zakresie światła

czerownego, w celu umożliwienia przeniknięcia emitowanego światła przez tkanki otaczające rusztowanie [39].

- **Właściwości mechaniczne**

Materiały stosowane w inżynierii tkankowej muszą charakteryzować się właściwościami mechanicznymi, które będą odpowiednio dopasowane do funkcji, jaką mają pełnić. Nowe materiały wykorzystywane są do zastępowania zarówno tkanek miękkich, jak i twardych, które charakteryzują się odmiennymi parametrami wytrzymałości na rozciąganie, skurcz czy podwyższone ciśnienie (Tab. 1) [41], [42].

Tab. 1. Właściwości mechaniczne niektórych tkanek zwierzęcych i ludzkich [41], [42]

Materiał	Moduł Younga [MPa]	Wytrzymałość na rozciąganie [MPa]	Wydłużenie przy zerwaniu [%]
Elastyna wołowa	1,1	2	-
Ludzkie włókna kolagenowe	100	-	50
Ludzka chrząstka stawowa kolana	2,1-11,8	-	-
Ludzkie mięśnie gładkie aorty	0,01	-	300
Ludzki pęcherz	0,25	0,27	0,69
Pęcherz wieprzowy	0,26	0,32	1,66
Wieprzowe mięśnie gładkie aorty	6,4-44,7	1,4-8,3	48,7-134,8

Opracowywanie materiałów mających stanowić zastępstwo określonych trójwymiarowych struktur w organizmie wymaga dopracowania warunków otrzymywania oraz funkcjonalizacji materiału w taki sposób, żeby jego właściwości mechaniczne mieściły się w zakresie parametrów zastępowanych tkanek lub organów. Jest to realizowane poprzez dobór odpowiedniej kompozycji substratów, warunków reakcji czy też dodatek modyfikatorów [43], [44].

- **Ekonomiczne względy produkcji**

Pomimo faktu istotności rozwoju nowych materiałów i ogromnych nakładów finansowych na technologie do tego celu przeznaczone, koszt jednostkowej produkcji

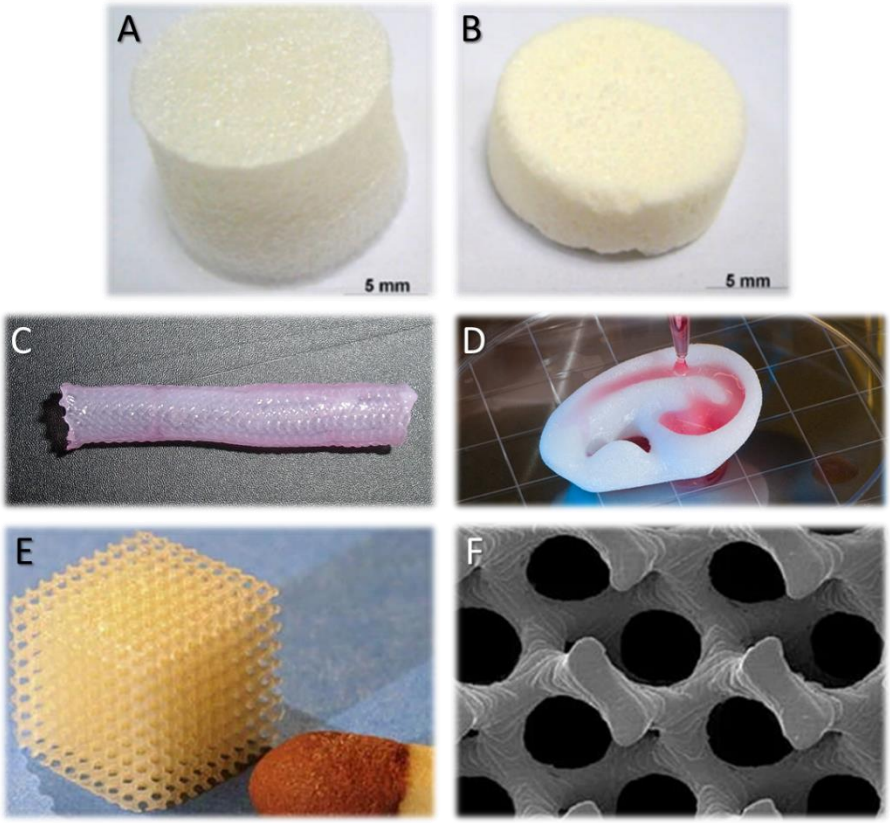
materiałów wciąż odgrywa kluczową rolę w rozwoju danego tworzywa [45], [46]. Wobec dużej liczby nowych materiałów, koszt wprowadzenia materiału na rynek musi być jak najniższy, przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej jakości substratów i produktu końcowego. Dlatego przy projektowaniu nowych materiałów poszukuje się surowców relatywnie tanich i łatwych do pozyskania. Optymalizowane są także metody produkcji w celu pozyskiwania materiałów przy możliwie najniższym zużyciu substancji pomocniczych i zmniejszaniu kosztochłonności procesu. Dużą innowacją pod względem redukcji kosztów było wprowadzenie druku 3D jako nowego sposobu wytwarzania materiałów [43], [47]. Rosnącą popularnością cieszy się także wykorzystanie substratów pochodzenia naturalnego oraz pochodzących z recyklingu [48], [49].

Każdy nowo projektowany materiał musi spełniać w jak największym stopniu powyższe założenia, jednak wciąż trwają poszukiwania materiałów o jak najlepszym dopasowaniu do wszystkich wymienionych cech. Nowo wytworzone materiały stosowane są w różnych gałęziach medycyny regeneracyjnej, najczęściej jednak są one stosowane do tworzenia syntetycznych zamienników części organów lub specjalnych rusztowań, umożliwiających ich odbudowę przez komórki.

2.3. Rusztowania tkankowe

Nowe materiały w inżynierii tkankowej służą przede wszystkim jako podłoża hodowlane dla komórek. Materiały te musza umożliwić ich proliferację i różnicowanie w docelowe komórki somatyczne, przy jednoczesnym zapewnieniu odpowiedniego przestrzennego zorganizowania powstającej tkanki. Takie trójwymiarowe konstrukcje nazywane są rusztowaniami tkankowymi. Rusztowania naśladują macierz pozakomórkową rodzimej tkanki, odtwarzając środowisko *in vivo* i pozwalając komórkom wpływać na ich własne mikrośrodowisko. Zazwyczaj służą one przynajmniej jednemu z następujących celów: umożliwiają przyłączanie się i migrację komórek, dostarczają i zatrzymują komórki i czynniki biochemiczne, umożliwiają dyfuzję ważnych dla komórek składników odżywczych i produktów ekspresji oraz wywierają określone wpływy mechaniczne i biologiczne w celu modyfikacji zachowania fazy komórkowej [33], [50].

Jak wcześniej wspomniano, rusztowania tkankowe z założenia charakteryzują się dużą biozgodnością oraz właściwościami strukturalnymi i mechanicznymi precyzyjnie dopasowanymi do tkanek, które odbudowują. Większość rusztowań tkankowych cechuje się właściwościami degradacyjnymi, a zasada ich działania oparta jest o indukowany enzymatycznie rozkład do nietoksycznych produktów często będących jednocześnie donorami substancji odżywczych lub stymulantami wzrostu dla komórek [34], [50]. Materiałami stosowanymi do wytwarzania rusztowań są w przeważającej większości polimery pochodzenia naturalnego i syntetycznego, gdzieniegdzie jednak, ze względu na potrzebę zachowania wysokiej odporności mechanicznej skafoldu stosowane są kompozyty metalowo – polimerowe i stopy metali [51]–[53].



Rys. 3. Zestawienie różnych postaci rusztowań tkankowych: **A, B** – rusztowania porowate z alginianów i owoalbuminy wytworzone techniką spieniania [54], **C** – tubularne rusztowanie naczynia krwionośnego, **D** – rusztowanie ucha zewnętrznego w trakcie nanoszenia zawiesiny komórkowej, **E** – porowate rusztowanie do regeneracji tkanki kostnej, wytworzone za pomocą stereolitografii oraz jego mikrofotografia SEM (**F**) [55]

Rusztowania tkankowe występują w postaci wielu zróżnicowanych kształtów o wielkiej różnorodności rozmiarów (Rys. 3). Są stosowane do regeneracji tkanek zarówno miękkich, jak i twardych, a także jako podłoża hodowlane w kulturach *in vitro* w badaniach

komórkowych. Do ich wytwarzania wykorzystywane są rozmaite metody syntezy, do których można zaliczyć samoorganizację nanowłókien w przypadku rusztowań nanomateriałowych, produkcję tkanin polimerowych, odlewanie rozpuszczalnikowe połączone z wymywaniem cząstek stałych (np. rusztowania porowate z PLA), spienianie z wykorzystaniem ditlenku węgla, liofilizację emulsyjną, separację faz, elektroprzędzenie oraz metody druku trójwymiarowego poprzedzone projektowaniem przestrzennym [54]–[63]. Użyteczność danej techniki jest podyktowana koniecznością dostosowania powstającego produktu do konkretnego zastosowania.

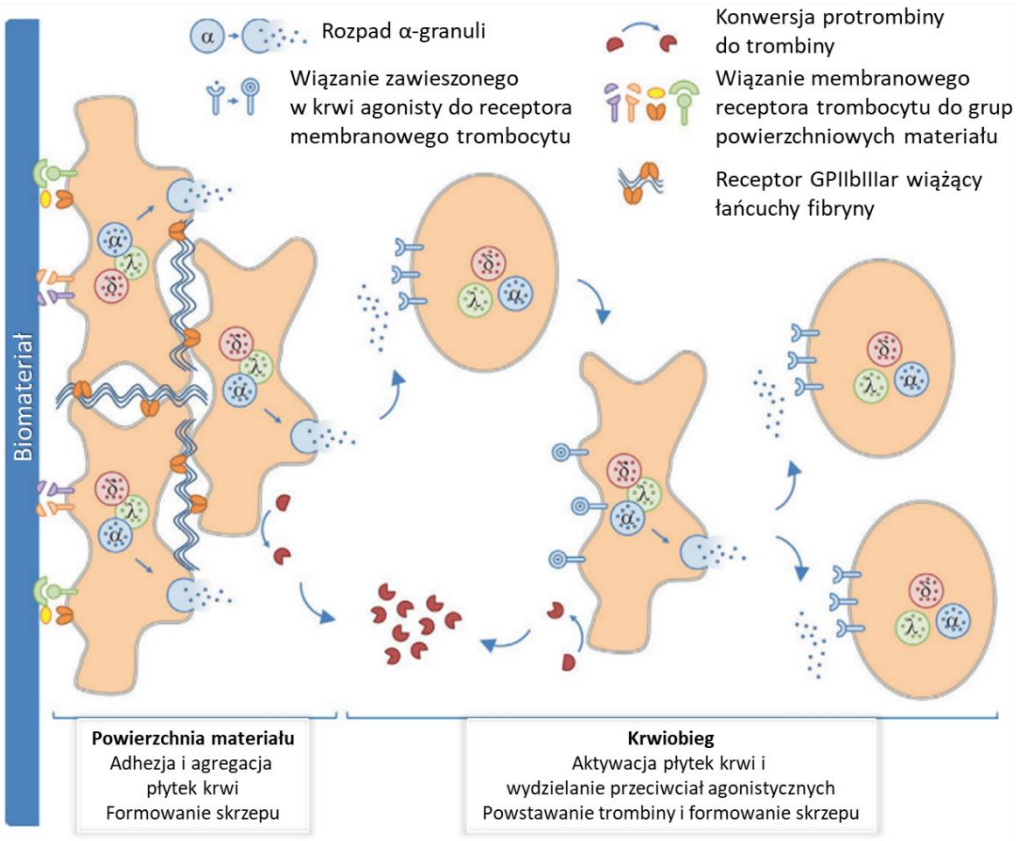
Rusztowania tkankowe stanowią podstawę w każdej gałęzi inżynierii tkankowej. Ze względu na charakter prac badawczych w niniejszej pracy skupiono się w szczególności na materiałach i technikach stosowanych w inżynierii tkankowej naczyń krwionośnych, opisanej w następnym rozdziale.

3. Inżynieria tkankowa naczyń krwionośnych

Inżynieria tkankowa naczyń krwionośnych skupia się przede wszystkim na opracowywaniu funkcjonalnych materiałów mogących zastępować lub pomagać w regeneracji uszkodzonych elementów układu krążenia. Krew jako ciekła tkanka posiada unikalne właściwości immunologiczne i mechaniczne, co implikuje potrzebę charakterystyki dodatkowych parametrów, które należy brać pod uwagę przy wytwarzaniu materiałów oraz gotowych konstruktów [64]. Obecność we krwi komórek odpornościowych takich, jak makrofagi oraz limfocyty powoduje, że materiały mające kontakt z krwią muszą wykazywać odpowiednią biozgodność której brak może wywołać ogólnoustrojową odpowiedź immunologiczną organizmu [29], [30], [64].

Drugim istotnym czynnikiem jest mechanizm krzepnięcia krwi oparty o aktywację trombocytów, które w przypadku wykrycia choćby najmniejszej przerwy w ciągłości naczyń, indukują enzymatyczne wytwarzanie fibryny i akumulację wewnątrz włókien płytek krwi, tworzących skrzep. Każda substancja, która nie wykazuje pełnej zgodności z komórkami krwi będzie rozpoznawana przez nie jako wspomniana przerwa, co skutkuje otaczaniem skrzepami wszczepionych implantów [65], [66]. Efekt ten nosi nazwę trombogeniczności (Rys. 4) i dotyczy przeważającej części syntetycznych implantów naczyń krwionośnych. Ma on kluczowe

znaczenie w przypadku projektowania materiałów zastępujących naczynia o małej średnicy. W przypadku naczyń większych efekt ten powoduje zmniejszenie światła naczyń, jednak wciąż mogą one spełniać swoją funkcję. Jednak w naczyniach włosowatych, gdzie nawet niewielki skrzep może całkowicie zablokować drożność arterii ich obecność jest czynnikiem limitującym. Dlatego też poszukiwane są materiały o właściwościach jak najbardziej neutralnych dla krwi, a także takie, które mają właściwości przeciwkrzepliwe. Stosowane są one do powlekania syntetycznych rusztowań, co zapewnia im względną poprawę hemokompatybilności [65], [66].

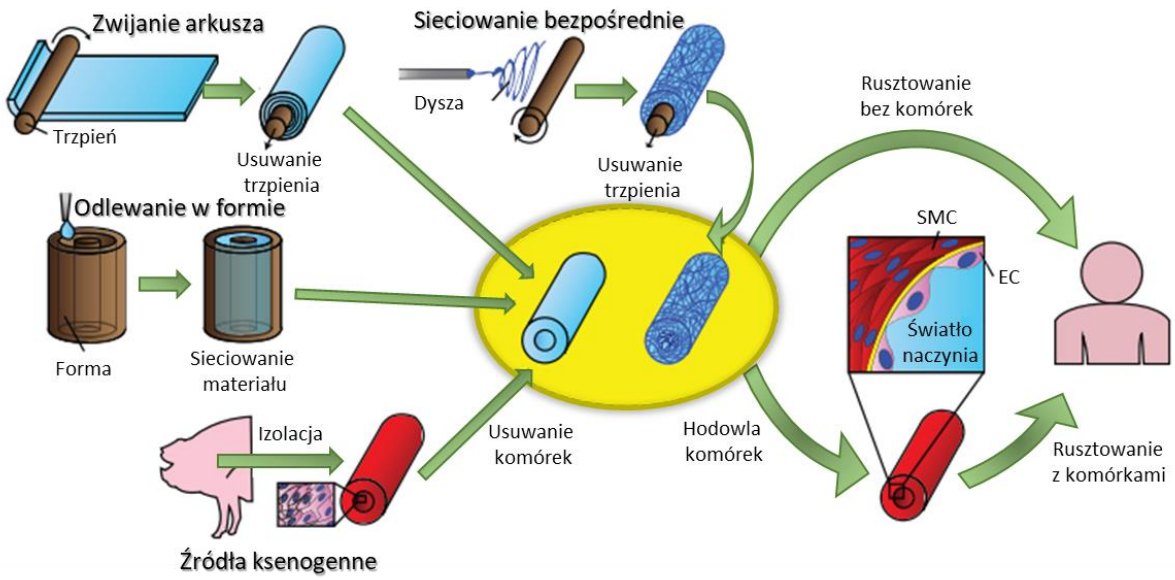


Rys. 4. Wizualizacja trombogeniczności biomateriału w kontakcie z krwią i powstawania skrzepu [66].

Inżynieria tkankowa układu krążenia obejmuje również wykonywanie urządzeń medycznych przystosowanych do kontaktu z krwią, syntetycznych elementów układu krążenia jak zastawki, stenty czy łaty naczyniowe, całych organów (tzw. „sztuczne serce") oraz nowe metody funkcjonalizacji komórek macierzystych w komórki śródbłonka naczyniowego i mięśni gładkich naczyń krwionośnych [15], [24], [67]–[70]. Ze względu na charakter niniejszej pracy w dalszej części omówiono jedynie stan wiedzy dotyczącej materiałów stosowanych w inżynierii tkankowej naczyń krwionośnych.

3.1. Materiały wykorzystywane w inżynierii tkankowej naczyń krwionośnych

Tworzywa używane w produkcji rusztowań naczyniowych, oprócz wspomnianej wcześniej hemo- i biozgodności, muszą charakteryzować się także odpowiednimi właściwościami mechanicznymi, zbliżonymi do właściwości naczyń, które zastępują. Materiały takie powinny posiadać dużą elastyczność, wytrzymałość na wysokie ciśnienie generowane przez przepływającą krew oraz wytrzymałość na powtarzające się odkształcania. Podstawowymi materiałami wykorzystywanymi w inżynierii naczyń krwionośnych są więc materiały polimerowe, najczęściej będące elastomerami [71]. Dzięki ich właściwościom mogą być one formowane i przekształcane w pożądane kształty, zarówno płaskie (łaty naczyniowe, służące do zastępowania częściowych ubytków w ścianach naczyń) jak i tubularne (Rys. 5).



Rys. 5. Różne metody wytwarzania rusztowań tkankowych naczyń krwionośnych z wykorzystaniem materiałów polimerowych naturalnych i syntetycznych. SMC – komórki mięśni gładkich, EC – komórki śródbłonka naczyniowego [9]

Do wytwarzania rusztowań tkankowych oprócz materiałów syntetycznych stosowane są także materiały pochodzenia biologicznego, głównie białka oraz polisacharydy [72], [73]. Jednak każda z powyżej opisanych grup posiada swoje wady i zalety (Tab. 2). Doprowadziło to do powstania rozmaitych materiałów kompozytowych oraz prób tworzenia materiałów syntetycznych w oparciu o surowce pochodzenia naturalnego. Przykłady najważniejszych

materiałów stosowanych w inżynierii tkankowej naczyń krwionośnych przedstawiono w podrozdziałach poniżej.

Tab. 2. Zestawienie najważniejszych wad i zalet materiałów pochodzenia naturalnego i materiałów syntetycznych, stosowanych w inżynierii naczyniowej

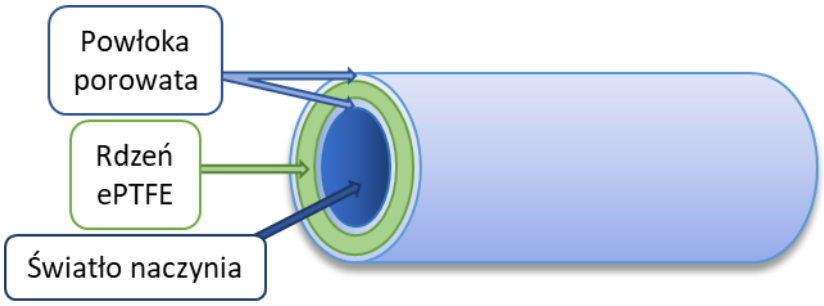
	Materiały pochodzenia naturalnego	**Materiały syntetyczne**
Zalety	• Duża biozgodność • Degradacja do produktów wchłanianych przez komórki • Niskie koszty wytwarzania • Możliwość funkcjonalizacji • Mała trombogeniczność	• Szeroki zakres modyfikacji właściwości mechanicznych • Duża wytrzymałość • Możliwość funkcjonalizacji • Znane i zoptymalizowane metody syntezy
Wady	• Niewielka wytrzymałość mechaniczna • Ograniczony zakres modyfikacji właściwości mechanicznych • Trudności w opracowywaniu metod przetwarzania	• Mała biozgodność • Wysoka cytotoksyczność • Degradacja do produktów szkodliwych dla komórek • Wysoka trombogeniczność

3.1.1. Materiały syntetyczne

Do materiałów syntetycznych stosowanych w inżynierii tkankowej naczyń krwionośnych należą przede wszystkim elastomery polimerowe, zarówno w postaci natywnej, jak i zmodyfikowanej. Pierwsze rusztowania tkankowe naczyń powstały w oparciu o polimery oparte na surowcach czysto organicznych – były to poli(tetrafluoroetylen) (Teflon®) poli(tereftalan etylenu) (PET), stosowany pod handlową nazwą Dacron® oraz rozmaite poliuretany [74], [75]. Polimerami syntetycznymi są także materiały biodegradowalne oparte na substancjach pochodzenia biologicznego, jednak nie będące z definicji biopolimerami. Do takich materiałów zaliczyć można polilaktyd (PLA), poli -ε-kaprolakton (PCL), poli(kwas glikolowy) (PGA), kopolimer poli(laktyd-kwas glikolowy) (PLGA), poli(L-kwas mlekowy) (PLLA) oraz inne materiały powstałe w oparciu o kwasy organiczne obecne w produktach naturalnych [76]–[80].

Pierwotnie wykorzystywane do produkcji rusztowań ePTFE oraz Dacron® okazały się mieć istotne wady. Pomimo bardzo dobrych właściwości mechanicznych i dużej wytrzymałości, powierzchnia rusztowań, ze względu na małą porowatość wykazywała

niewielkie powinowactwo do komórek mięśni gładkich i śródbłonka naczyniowego. Ponadto oba polimery indukowały efekt trombogeniczności, co spowodowało, że współcześnie wykorzystywane są w produkcji łat naczyniowych oraz implantów naczyń o dużej średnicy. Stosowane są również jako składniki rusztowań kompozytowych typu rdzeń – powłoka: rdzeń rusztowania zbudowany jest z ePTFE lub Dacronu ®, zapewniającego dostateczne właściwości mechaniczne, natomiast zewnętrzną warstwę stanowią porowate, biodegradowalne lub biozgodne substancje, ułatwiające adhezję i proliferację komórek [81]–[83] (Rys. 6).

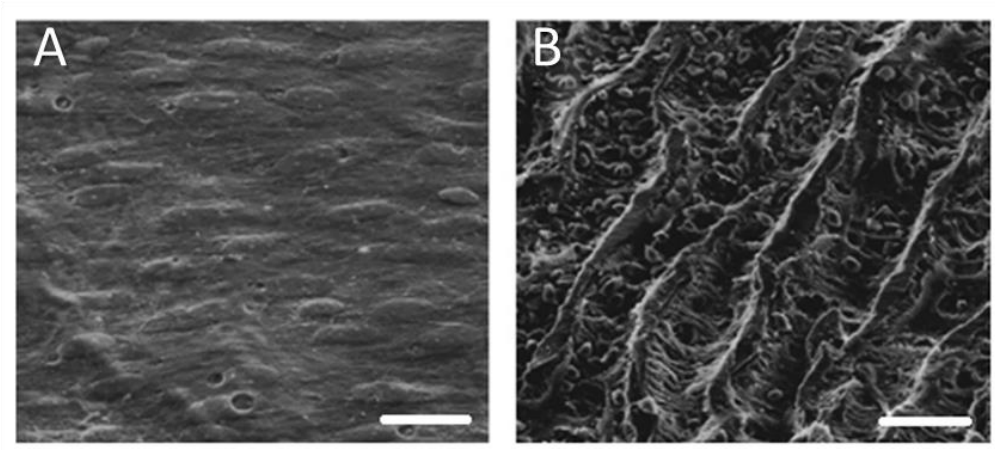


Rys. 6. Schemat trójwarstwowego rusztowania kompozytowego typu rdzeń-powłoka. Rdzeń wykonany z ePTFE pokryty jest z obu stron warstwą biozgodnego polimeru, np. PLLA

Syntetyczne polimery degradowalne wytworzone z biosurowców obecnie wypierają stosowanie rusztowań teflonowych i tereftalanowych. Wśród biodegradowalnych polimerów syntetycznych największe zastosowanie w inżynierii naczyń krwionośnych znalazł poli – ε – kaprolakton. Dzięki wysokiej stabilności i niskim kosztom produkcji oraz właściwościom mechanicznym zbliżonym do tkanek ludzkich może być stosowany w szerokiej gamie rusztowań tkankowych (Rys. 7) [84], [85]. Jednakże przez wysoką hydrofobowość powierzchni adhezja komórek do takich konstruktów jest utrudniona, dlatego jest on często stosowany w rusztowaniach kompozytowych, w których warstwę wierzchnią stanowią polimery o lepszych właściwościach biologicznych, np. PLGA [86], [87].

Rys. 7. Tubularne rusztowania tkankowe naczyń krwionośnych z PCL o różnej średnicy wewnętrznej, kolejno od lewej 1 mm, 2 mm oraz 3mm [88]

Obiecujące efekty zauważono także dla skafoldów wytworzonych metodą elektroprzędzenia z PGA. Polimer ten zachowuje wysoką krystaliczność i elastyczność przy jednoczesnym braku indukcji odpowiedzi immunologicznej oraz satysfakcjonujących właściwościach mechanicznych [89], [90]. Jednakże jego czas degradacji jest zbyt krótki, aby mógł być stosowany jako samodzielny surowiec do wytwarzania implantów naczyń [91]. Z tego powodu najczęściej stosowany jest on w połączeniu z polilaktydem, PLLA lub PCL, które odpowiadają za przedłużenie okresu degradacji rusztowania w organizmie biorcy wystarczająco długo, aby zapewnić odbudowę powłok komórkowych naczynia. Ponadto PGA może podlegać funkcjonalizacji, co rozszerza możliwości jego zastosowania [90], [92], [93]. Kompozytowe implanty z PGA i PLLA wykazywały znacznie wyższe powinowactwo do komórek śródbłonka naczyniowego oraz mięśni gładkich, niż takie same skafoldy z PLLA oraz kontrolne rusztowania z ePTFE (Rys. 8) [94]–[96].



Rys. 8. Mikrofotografia SEM przedstawiająca równomiernie zasiedlone komórkami śródbłonka naczyniowego rusztowanie PGA-PLLA (**A**) oraz pojedyncze komórki śródbłonka zasiedlające rusztowanie kontrolne z ePTFE (**B**) po 12 miesiącach inkubacji. Pasek skali 20 µm [94]

Polilaktyd (PLA) dzięki swojej powolnej degradacji do kwasu mlekowego oraz szerokiemu zakresowi modyfikacji właściwości mechanicznych również znalazł zastosowanie w inżynierii tkankowej naczyń krwionośnych [80]. Kwas mlekowy jest substancją obecną naturalnie w organizmie jako produkt cykli metabolicznych, co warunkuje całkowitą biozgodność PLA i zapewniło mu certyfikację Amerykańskiej Agencji ds. Żywności i Leków (FDA) jako materiałowi do zastosowań biomedycznych. Oprócz inżynierii tkankowej stosowany jest on także m. in. do wytwarzania rozpuszczalnych nici chirurgicznych czy jednorazowych narzędzi [97]. Rusztowania tkankowe naczyń krwionośnych wykonane

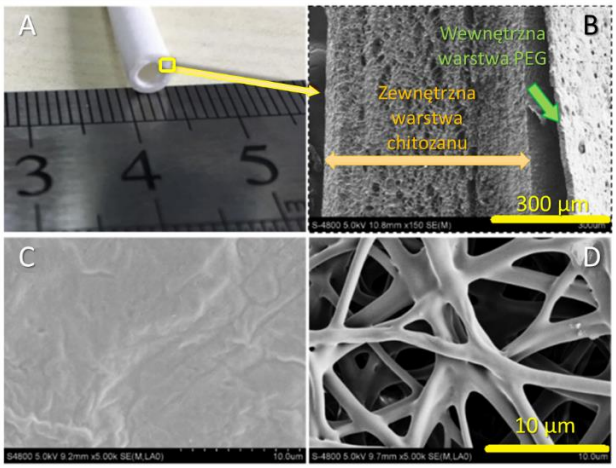
z czystego polilaktydu przez ich wysoką hydrofobowość nie stanowią jednak dobrego podłoża do adhezji komórek, przez co wymaga on powlekania, np. heparyną w celu zapewnienia odpowiedniej kompatybilności z komórkami biorcy [98], [99]. Kolejnym polimerem kwasu mlekowego o podobnych właściwościach degradacyjnych, lecz otrzymywanym na drodze innych reakcji chemicznych jest poli-L-kwas mlekowy (PLLA). Stosowany w systemach dostarczania leków był on także badany pod kątem wykorzystania w produkcji rusztowań naczyniowych z identycznymi rezultatami – dopiero materiał kompozytowy PCL – PLLA zwany PLCL wykazywał odpowiednie właściwości biologiczne i mechaniczne, a dalsza funkcjonalizacja przy użyciu heparyny pozwoliła na jego zastosowanie praktyczne [100]–[102].

3.1.2. Materiały pochodzenia biologicznego

Materiały pochodzenia biologicznego, ze względu na znacznie większą biozgodność, niż materiały syntetyczne, stały się obiektem zainteresowania inżynierii tkankowej kiedy tylko zdano sobie sprawę z ograniczeń materiałów syntetycznych. Rozpoczęto poszukiwania biopolimerów pochodzenia zwierzęcego i roślinnego, zdolnych stanowić zastępstwo bądź mogących poprawić funkcjonalność materiałów syntetycznych. W toku prowadzonych prac wytypowano kilka substancji naturalnych, które znalazły zastosowanie w inżynierii tkankowej naczyń krwionośnych. Należą do nich białka, np. kolagen, fibroina czy elastyna oraz polisacharydy, np. chitozan, celuloza czy alginiany [103]–[111].

Pierwsze modele wykorzystujące materiały pochodzenia naturalnego w inżynierii tkankowej naczyń krwionośnych powstawały w oparciu o włókna kolagenowe [107]. Kolagen jest białkiem fibrylarnym będącym głównym składnikiem substancji międzykomórkowej organizmów żywych [103]. Właściwości takie, jak dobra przyswajalność, biokompatybilność, biodegradowalność oraz wspomaganie adhezji komórek były głównymi czynnikami promującymi stosowanie kolagenu w produkcji rusztowań naczyniowych [112]. Jednakże kolagen, podobnie jak inne polimery naturalne, wykazuje słabe właściwości mechaniczne oraz szybkie tempo degradacji, co stanowi ograniczenia w zastosowaniu w inżynierii tkankowej naczyń krwionośnych. Dlatego też obecnie jest on stosowany jako substancja stanowiąca wierzchnią warstwę w rusztowaniach kompozytowych, odpowiedzialna za zwiększenie biokompatybilności rusztowań syntetycznych, np. z PLA [113].

Chitozan jest polisacharydem, otrzymywany jest z chityny w wyniku deacetylacji w środowisku zasadowym [114]. Po kolagenie jest drugim najczęściej wykorzystywanym materiałem naturalnym w inżynierii naczyniowej. Wykazano, że posiada on właściwości przeciwzapalne, zwiększające prawdopodobieństwo przyjęcia się implantu w organizmie biorcy [115]. Ponadto cechuje się niską trombogenicznością i cytotoksycznością oraz relatywnie długim czasem degradacji, czym warunkuje swoje zastosowanie w materiałach mających kontakt bezpośredni z krwią. Rusztowania wytworzone z chitozanu, pomimo właściwościom sprzyjającym adhezji komórek posiadają wąski zakres zmienności właściwości mechanicznych, co ogranicza ich zastosowanie praktyczne do produkcji uniwersalnych rusztowań tkankowych naczyń krwionośnych. Jest on często wykorzystywany w połączeniu z polimerami syntetycznymi, np. PLA, PLGA, PEG (Rys. 9) oraz naturalnymi, np. żelatyna jako substancja powłokowa poprawiająca biozgodność skafoldów i obniżająca odpowiedź immunologiczną przyległych tkanek [115]–[118].

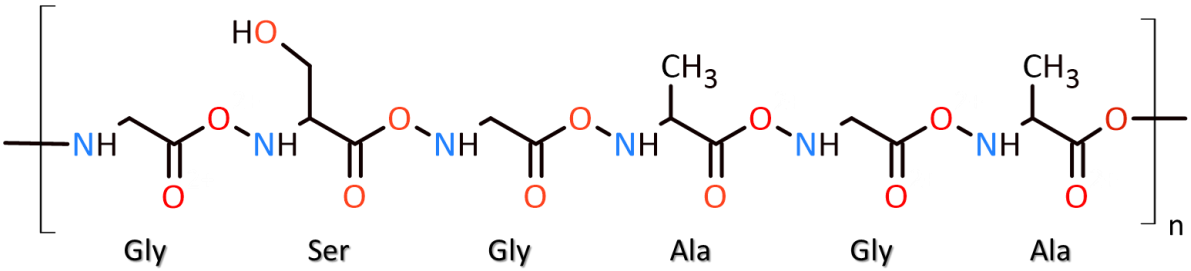


Rys. 9. Tubularne rusztowanie kompozytowe zbudowane z PEG i chitozanu (**A**), mikrofotografia SEM o niskim powiększeniu pokazująca obie warstwy materiałów (**B**) oraz mikrofotografie o dużym powiększeniu pokazujące gładką strukturę warstwy wewnętrznej PEG (**C**) oraz włóknistą i porowatą strukturę zewnętrznej warstwy chitozanu (**D**) [118]

Elastyna stanowi przykład hydrofilowej substancji białkowej naturalnie występującej w komórkach naczyń krwionośnych, gdzie odpowiada za elastyczność ścian żył i tętnic oraz zwiększa ich wytrzymałość na wysokie ciśnienie panujące wewnątrz [119]. Dzięki temu, posiada znakomite właściwości mechaniczne oraz hemokompatybilność. Zastosowanie elastyny w inżynierii naczyniowej jest wciąż relatywnie nowym podejściem, jednak pierwsze doniesienia mówią o funkcjonalnych materiałach stworzonych z elastyny i kolagenu oraz elastyny i PCL, które charakteryzują się zbliżonymi właściwościami mechanicznymi do tkanek

ludzkich oraz dużą biozgodnością w testach *in vivo* [105], [120]. Wadą elastyny może być jej natywna funkcja biologiczna – ze względu na fakt uczestnictwa w kształtowaniu i organizacji komórek budujących naczynia spełnia ona także rolę inhibitora proliferacji komórek, chroniąc naczynie przed nadmiernym rozrostem tkanki, prowadzącym do zablokowania jego światła [121]. Nie prowadzono natomiast badań nad określeniem wpływu tych właściwości na potencjalną inhibicję proliferacji komórek na powierzchni rusztowań wykonanych z elastyny.

Fibroina jest białkiem fibrylarnym zbudowanym z powtarzającej się sekwencji aminokwasów (Rys. 10). Jest naturalnym składnikiem jedwabiu oraz sieci pajęczej.



Rys. 10. Struktura chemiczna jednostki fibroiny. Gly – L-glicyna, Ser – L-seryna, Ala – L-alanina

Jest substancją całkowicie nietoksyczną i biokompatybilną. Dzięki swojej strukturze drugorzędowej w postaci antyrównoległej β-harmonijki cechuje się wysoką wytrzymałością mechaniczną oraz elastycznością [122]. Obecne doniesienia wskazują na duży potencjał zastosowania fibroiny w inżynierii tkankowej naczyń krwionośnych. Rusztowania wykonane z fibroiny wykazują właściwości stymulujące adhezję i proliferację komórek mięśniowych oraz śródbłonka naczyniowego przy jednoczesnej redukcji odpowiedzi zapalnej przyległych tkanek [123]. Badania degradacji wskazują na powolny rozpad implantów, wystarczający do prawidłowego namnażania się komórek na jego powierzchni [124], [125].

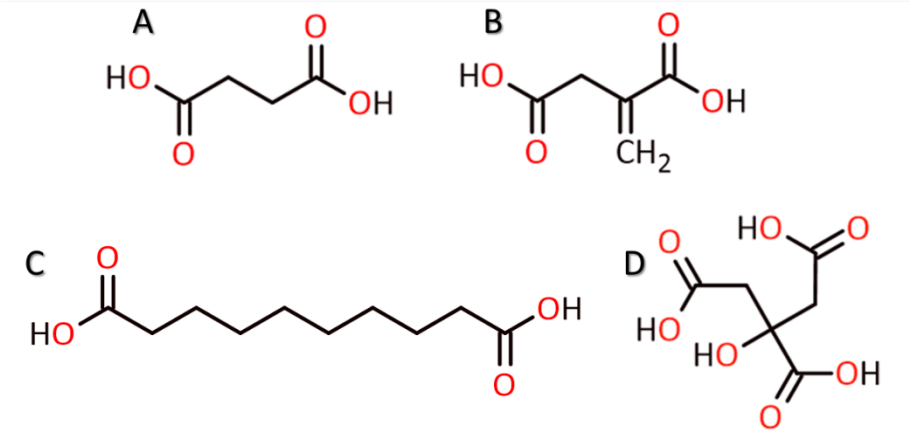
Oprócz wyżej wymienionych biomateriałów zastosowanie w inżynierii naczyniowej znalazła także celuloza, ze względu na wysoką krystaliczność, biozgodność i dobre właściwości mechaniczne, a także sole kwasu alginowego zwane alginianami. Obie te grupy materiałów w postaci hydrożeli stosowane są do produkcji rusztowań tkankowych zarówno samodzielnie, jak i w połączeniu z żelatyną oraz innymi polimerami syntetycznymi [126]–[130]. Hydrożele alginianowe wykorzystywane są także jako biotusze w druku 3D [131].

3.1.3. Materiały nowej generacji i ich perspektywy

Jak wcześniej wspomniano, w ostatnich latach rozwój nowych materiałów w inżynierii naczyniowej podąża w kierunku jak największej funkcjonalizacji przy zachowaniu możliwie dużej biozgodności. Coraz częściej wykorzystywane są nowe technologie przetwarzania materiału w oparciu o szybkie prototypowanie, jak również wykorzystanie osiągnięć nanotechnologii. Projektowane są także materiały w oparciu o tzw. *platform chemicals*, czyli biomonomery, które mogą być przetworzone w liczne półprodukty lub produkty będące analogami powszechnie stosowanych monomerów i polimerów syntetycznych [132].

Metody nanotechnologiczne pozwoliły na otrzymywanie rusztowań o precyzyjnie dobranych parametrach powierzchni oraz właściwościach mechanicznych. Zastosowanie elektroprzędzenia w skali nano pozwoliło otrzymać rusztowania zbudowane z nanowłókien PLLA, PLGA czy PCL [133]. Wykazano, że organizacja włókien w materiale ma istotny wpływ na kierunek wzrostu i adhezję komórek śródbłonka naczyniowego. Zastosowanie różnych układów nanowłókien, w zależności od tego, z jakim rodzajem komórek ma styczność powierzchnia rusztowania zredukowało występowanie przerostów tkanki w obrębie naczynia, ułatwiając regenerację tkanek pacjentów [133]. Wykorzystując materiały pochodzenia naturalnego, jak kolagen i elastyna udało się również stworzyć samoorganizujące się nanomateriały. Ich właściwości pozwoliły na zwiększenie jednorodności pokrycia implantu komórkami oraz wpłynęły na poprawę cyrkulacji substancji odżywczych między komórkami [134], [135]. Nanomateriały węglowe wykorzystywane są także jako funkcjonalizacje rusztowań, nadające im możliwość kontrolowania wzrostu komórek oraz sterowania sygnałami międzykomórkowymi w celu kontrolowania przyrostu tkanki na rusztowaniu [136].

Biomonomery platformowe stanowią obiecującą grupę nowych związków w inżynierii tkankowej naczyń krwionośnych. Wśród wielu opisanych dotychczas *platform chemicals*, największe nadzieje pokładane są w materiałach otrzymywanych z di- i trikarboksylowych kwasów organicznych, pochodzących z surowców naturalnych lub będących uczestnikami cykli biologicznych. Do najczęściej wykorzystywanych kwasów należą kwas bursztynowy, metylenobursztynowy (itakonowy), sebacynowy oraz cytrynowy (CTR) (Rys. 11).



Rys. 11. Kwasy di- i trikarboksylowe wykorzystywane jako biomonomery w produkcji rusztowań tkankowych naczyń krwionośnych. **A** – kwas bursztynowy, **B** – kwas itakonowy, **C** – kwas sebacynowy, **D** – kwas cytrynowy

Kwasy bursztynowy, będący produktem pośrednim cyklu Krebsa oraz kwas sebacynowy, otrzymywany z ziaren rącznika pospolitego znalazły zastosowanie w inżynierii materiałów biozgodnych. Wykorzystywane są jako komonomery w połączeniu z PLA, PCL i alkoholami polihydroksylowymi do otrzymywania elastomerów poliestrowych o bardzo wysokiej biozgodności i właściwościach mechanicznych o szerokim zakresie modyfikacji [137]–[142]. Kwas itakonowy, otrzymywany na drodze fermentacji cukrów przy użyciu *Aspergillus Terreus*, stanowi przykład monomeru, który może być przetwarzany na dwa sposoby. Może on ulegać reakcji polikondensacji do poliestrów, jak i polimeryzacji rodnikowej dzięki obecności podwójnego wiązania w strukturze [143]. Dzięki temu znalazł on zastosowanie w produkcji wysoce biokompatybilnych rusztowań poliestrowych oraz coraz częściej stosowany jest jako biotusz w druku trójwymiarowych skafoldów [144]–[147].

Wszystkie wymienione w powyższych podrozdziałach materiały, pomimo bezsprzecznych korzyści ich stosowania posiadają jednak wady. W wielu przypadkach polimery te nie posiadają wystarczającej wytrzymałości lub elastyczności, aby mogły być stosowane jako samodzielny budulec skafoldów, co implikuje potrzebę szukania dodatkowych materiałów powłokowych. Również ich hemokompatybilność zdaje się być relatywnie niska, a w niektórych przypadkach może ona stanowić istotną przeszkodę w zastosowaniu takiego materiału w inżynierii naczyniowej. Kwas cytrynowy i materiały z niego wytworzone wykazują odmienne tendencje, stanowiąc obiecującą alternatywę do podanych w podrozdziałach

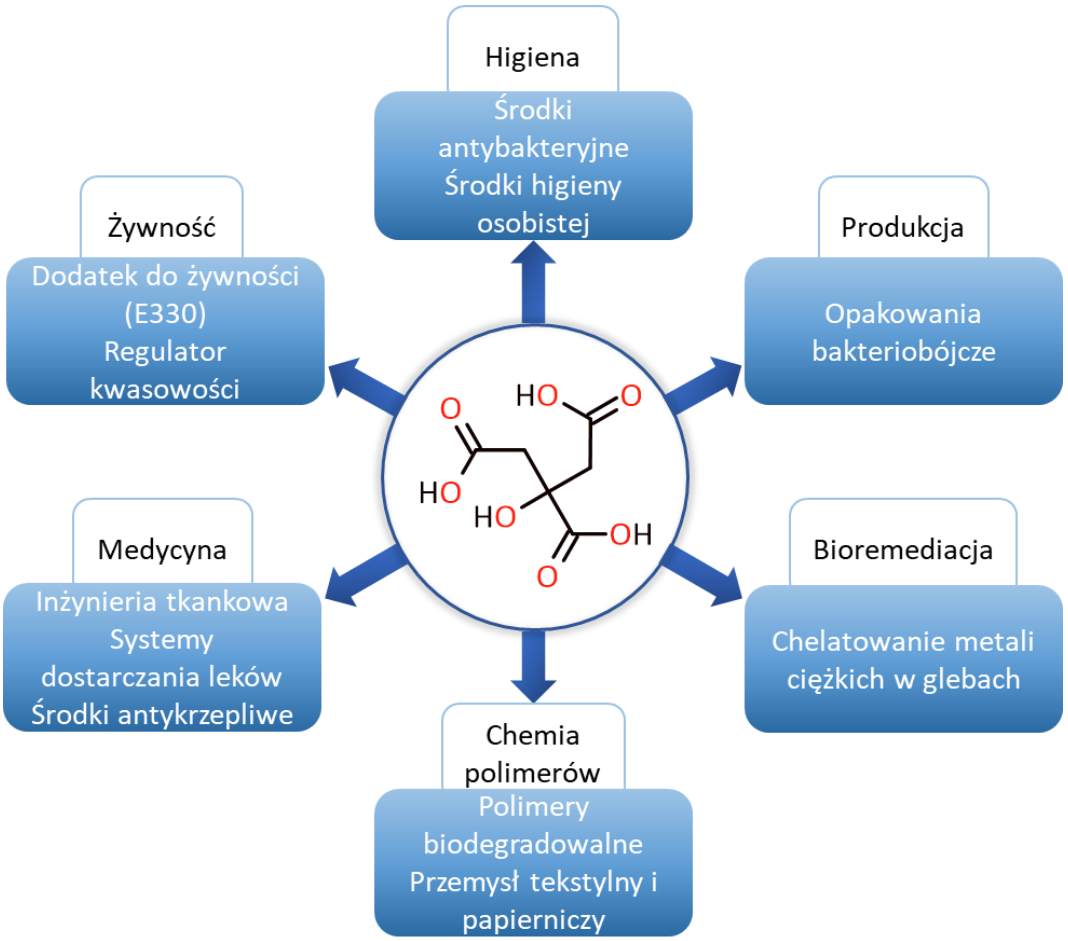
powyżej materiałów. Zastosowanie, właściwości i udział materiałów otrzymywanych z CTR w inżynierii tkankowej opisano szczegółowo w podrozdziałach poniżej.

4. Biozgodne i biodegradowalne materiały otrzymywane z kwasu cytrynowego

Kwas cytrynowy (CTR) jest trikarboksylowym kwasem organicznym występującym naturalnie w organizmach tlenowych. Uczestniczy w cyklu Krebsa, gdzie jako pierwszy z produktów pośrednich zostaje włączony w ciąg odwracalnych, enzymatycznych przemian służących do wygenerowania odpowiedniej ilości NADH wykorzystywanych następnie do zasilenia podjednostek łańcucha oddechowego i produkcji ATP. Dzięki swojej roli w organizmach cechuje się całkowitą biozgodnością i brakiem oddziaływań negatywnych na tkanki żywe. Produkowany jest obecnie metodami fermentacyjnymi z wykorzystaniem wielu mikroorganizmów (drożdży, grzybów i bakterii). Największe wydajności produkcyjne uzyskuje się w hodowli wgłębnej z wykorzystaniem *Aspergillus Niger* (kropidlak czarny), przy użyciu odpadów z przemysłu cukrowniczego jako pożywki. Opracowano także metody otrzymywania CTR przy użyciu *Yarrowia Lippolytica*, które to są zdolne do przekształcania w CTR tłuszczy zwierzęcych, n-alkanów czy gliceryny – dzięki temu produkcja CTR stanowi domknięcie ścieżek degradacji i recyklingu tych materiałów oraz powoduje zmniejszenie obciążenia środowiska. Dzięki dopracowaniu metod fermentacyjnych produkcja CTR jest procesem bardzo ekonomicznym i wielkoskalowym, przez co jego cena jednostkowa utrzymuje się na niskim poziomie [148]. Opisane powyżej właściwości sprawiły, że CTR stał się obiektem wielu badań oraz znalazł szeroką gamę zastosowań w przemyśle i medycynie.

4.1. Kierunki zastosowań kwasu cytrynowego

CTR, ze względu na swoją budowę, wysoką biozgodność i certyfikację FDA do zastosowań leczniczych i żywnościowych znalazł zastosowanie w wielu dziedzinach nauki i przemysłu (Rys. 12). Zarówno małocząsteczkowe pochodne, jak i materiały stworzone na bazie CTR są z powodzeniem stosowane w medycynie, rolnictwie, przemyśle tekstylnym, papierniczym oraz chemicznym jako alternatywy dla powszechnie stosowanych polimerów pochodzących z przetwórstwa ropy naftowej.



Rys. 12. Podstawowe kierunki zastosowania kwasu cytrynowego w rożnych gałęziach przemysłu i nauki

Materiały tworzone z CTR w ostatnich latach stały się przedmiotem badań wielu grup naukowców. CTR dzięki obecności w swojej cząsteczce trzech grup karboksylowych może reagować ze związkami wielofunkcyjnymi dając usieciowane poliestry i poliamidy. Znane są materiały otrzymane w reakcji CTR i polisacharydów – skrobi, celulozy i jej pochodnych oraz cyklodekstryn [149]–[151]. Kwas cytrynowy może również reagować z aminami i białkami, jak żelatyna, oraz materiałami bioceramicznymi, jak hydroksyapatyt. Wykorzystywany jest również jako komonomer w wytwarzaniu kompozytowych poliestrów wraz z innymi kwasami, np. kwasem sebacynowym, maleinowym [152]–[155]. Najliczniejszą grupą monomerów stosowaną w reakcjach otrzymywania materiałów polimerowych z CTR są alkohole polihydroksylowe, przede wszystkim diole, gliceryna czy sorbitol [156], [157].

4.1.1. Kwas cytrynowy w technologii żywności, przetwórstwie tworzyw sztucznych i przemyśle opakowaniowym

CTR i jego pochodne wykorzystywane są w technologii żywności m. in. do utrzymywania właściwego pH, konserwowania żywności oraz usuwania jonów metali ciężkich. Bakteriobójcze właściwości tworzyw z CTR wynikają z ich wysokiej kwasowości, która warunkuje nieprzyjazne dla bakterii środowisko na powierzchni materiałów. Jako dodatek pod nazwą kodową E330, CTR jest stosowany jako regulator kwasowości i stabilizator produktów żywnościowych [158]. Materiały polimerowe, otrzymane z kwasu cytrynowego i gliceryny lub skrobi są stosowane w instalacjach oczyszczających gleby i wody ściekowe. Wykazano, że kwas cytrynowy posiada właściwości chelatujące, co pozwoliło na zastosowanie go do oczyszczania gleby i wód powierzchniowych z jonów miedzi (Cu^{2+}), rtęci (Hg^{2+}), niklu (Ni^{2+}) czy ołowiu (Pb^{2+}) [159]–[163].

Materiały z CTR mogą być potencjalnie wykorzystane jako zamienniki powszechnie stosowanych syntetycznych polimerów w produkcji opakowań spożywczych. Mogą być stosowane jako materiały powłokowe dla folii wykonanych z polimerów pochodzenia organicznego, jednakże istnieją doniesienia o badaniach nad biodegradowalnymi foliami wykonanymi ze skrobi czy celulozy z dodatkiem CTR. Wykazano, że kwas cytrynowy poprawia właściwości antybakteryjne takich opakowań, przyczyniając się do wydłużenia okresu przydatności do spożycia badanych produktów [164]–[167].

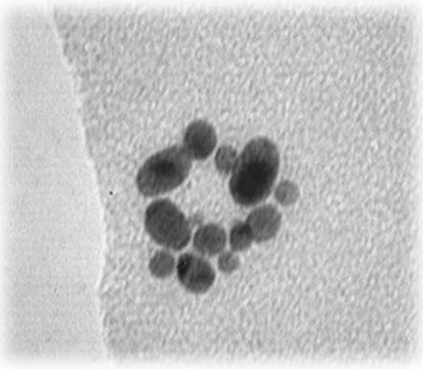
Znane są również próby wdrożenia materiałów z kwasu cytrynowego do produkcji biodegradowalnych tworzyw sztucznych. Redukcja ilości odpadów ropopochodnych pochodzących z elementów opakowań i elektroniki stanowi jedno z największych wyzwań współczesnej nauki. Jedną z zastosowanych strategii jest stosowanie w zamian surowców biodegradowalnych do wytwarzania materiałów używanych w elektronice i innych gałęziach przemysłu. Materiały z CTR mogą znaleźć zastosowanie jako dodatki do biotworzyw wytwarzanych ze skrobi czy celulozy, a także, w postaci kopolimerów z kwasem maleinowym, jako zamienniki polimerów stosowanych do wytwarzania płyt drukowanych do układów scalonych [168]–[171].

4.1.2. Kwas cytrynowy w medycynie i farmacji

Kwas cytrynowy stanowi jeden z powszechniejszych związków pochodzenia naturalnego stosowanych w medycynie. Sole CTR i metali alkalicznych wykazują właściwości hemostatyczne i przeciwkrzepliwe, dlatego wykorzystywany jest m.in. w stacjach krwiodawstwa i w laboratoriach analitycznych do zabezpieczania próbek krwi przed wykrzepianiem [172].

Postęp medycyny wymusza nieustanną potrzebę opracowywania nowych, biokompatybilnych i biodegradowalnych kompozytów do wytwarzania elementów aparatury, jednorazowych narzędzi czy bioresorbowalnych nici, opatrunków i implantów. Materiały otrzymywane z CTR wpisują się w ten trend – znalazły one szereg potencjalnych zastosowań w medycynie regeneracyjnej, farmacji i diagnostyce medycznej.

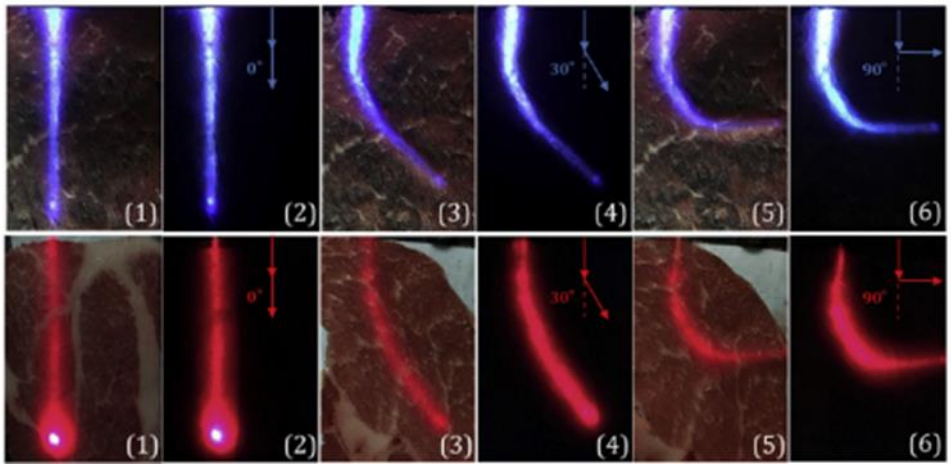
Poliestry CTR i alkoholi polihydroksylowych wykorzystywane są m. in jako matryce i polimery kapsułkujące w systemach celowanego dostarczania leków [173]. Polimery z CTR, dzięki usieciowanej, rozgałęzionej strukturze dobrze nadają się do zamykania w nich cząsteczek substancji aktywnych oraz związków modelowych. Ich zdolność do pęcznienia powoduje, że kapsułkowana substancja będzie wypłukiwana w odpowiednim tempie, warunkując stałe dawkowanie leku. Udało się z powodzeniem zamknąć wewnątrz polimerów z CTR między innymi fluoresceinę, lidokainę, tlenek azotu (II) czy nanocząstki złota (Rys. 13) [173]–[176].



Rys. 13. Mikrofotografia TEM skupiska nanocząstek złota, zagregowanych na kopolimerze kwasu cytrynowego i PEG

Jednym z nowszych zastosowań materiałów z CTR jest próba wykorzystania ich do wytworzenia degradowalnych elementów elektronicznych. Istnieją doniesienia o włóknach

światłowodowych zbudowanych z kopolimeru kwasu maleinowego i CTR z 1,8-oktanodiolem. Włókna takie mogą znaleźć zastosowanie w bioobrazowaniu tkanek oraz terapii fotodynamicznej, gdzie istnieje potrzeba dostarczenia światła do jam ciała przez dłuższy okres czasu – takie włókna zapewniałyby odpowiednie naświetlenie przy jednoczesnej pełnej biozgodności i hamowaniu odpowiedzi immunologicznej okalających tkanek (Rys. 14) [177].



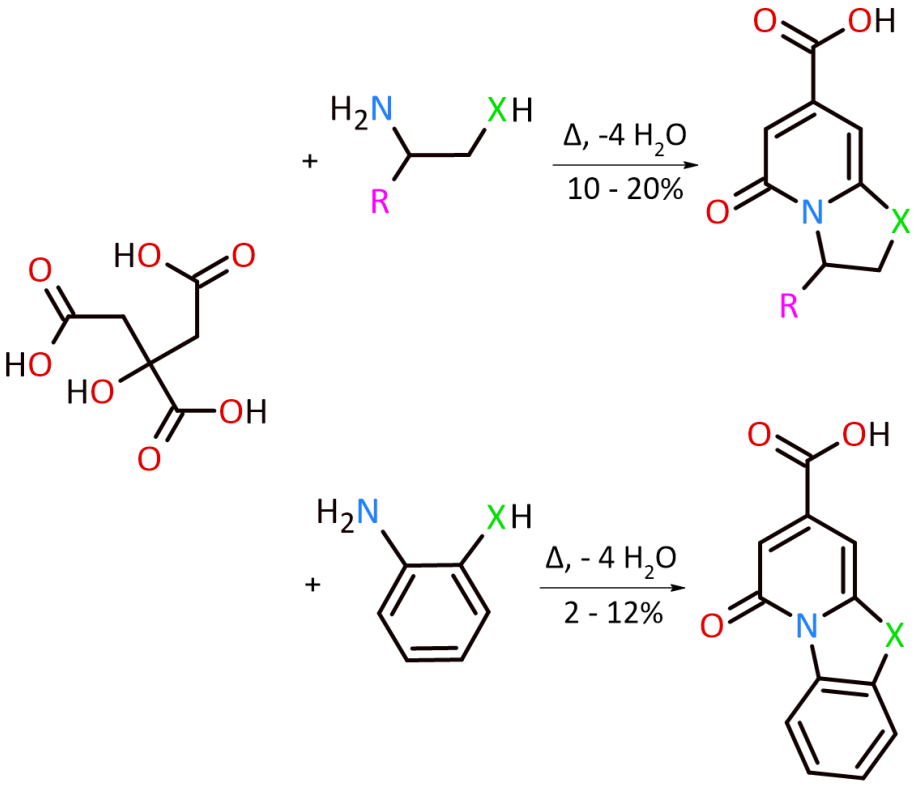
Rys. 14. Włókna światłowodowe wykonane z polimeru kwasu cytrynowego, maleinowego i 1,8-oktanodiolu naświetlane światłem niebieskim i czerwonym, testowane pod różnymi kątami ugięcia [177]

4.1.3. Związki fluorescencyjne otrzymywane z kwasu cytrynowego

Fluorescencja jako zjawisko znana jest od wieków, a jej zastosowanie w analityce, syntezie, znakowaniu biologicznym oraz kryminalistyce zostało potwierdzone w szeregu doniesień literaturowych. Związki fluorescencyjne są stosowane jako odczynniki derywatyzujące w analityce chemicznej, jako sondy molekularne do znakowania protein czy do oznaczania banknotów i papierów wartościowych.

CTR posiadający trzy grupy karboksylowe i jedną grupę hydroksylową może ulegać rozkładowi w podwyższonej temperaturze, dając m. in. kwas itakonowy, citrakonowy, mezakonowy i akonitowy [178]. Może on także ulegać reakcji kondensacji z mocznikiem oraz specyficznymi β- i γ-aminami, β- i γ-aminoalkoholami oraz β- i γ-aminotiolami. W wyniku takiej reakcji powstają cykliczne, fluorescencyjne pochodne 2-pirydonu (Rys 15). Związki te charakteryzują się wyraźną odpowiedzią fluorescencyjną, wysokimi wydajnościami kwantowymi oraz fotostabilnością [179]. Dotychczas otrzymano szereg pochodnych 2-pirydonu z CTR z wykorzystaniem między innymi L-cysteiny,

L-glutationu, mocznika czy L,D-pantenolu [179]–[182]. Dotychczas wyizolowano i scharakteryzowano fluorofory emitujące niebieską i zieloną fluorescencję.

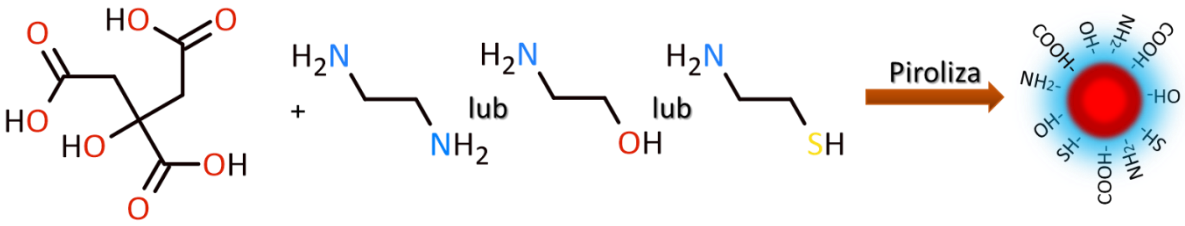


Rys. 15. Schemat syntezy pochodnych 2-pirydonu. X = O, NH, S [179]

Wybrane pochodne 2-pirydonu znajdują swoje zastosowanie w analityce. W zespole badawczym, w którym powstała niniejsza praca opracowane zostały metody oznaczania GSH oraz D-pantenolu w produktach kosmetycznych i leczniczych, które opierają się na derywatyzacji GSH i D-pantenolu z użyciem CTR jako odczynnika derywatyzującego. Powstałe w ten sposób fluorescencyjne pochodne są następnie oznaczane spektrofluorymetrycznie przy użyciu krzywych wzorcowych, pozwalając na jednoznaczną determinację zawartości badanych substancji w produktach komercyjnych [180], [181].

Pochodne 2-pirydonu są również źródłem wysokowydajnej fluorescencji kropek węglowych, otrzymywanych z kwasu cytrynowego (Rys. 16). Kropki węglowe są przedmiotem badań wielu zespołów badawczych, ponieważ mogą być wykorzystywane jako biosensory, sondy do oznaczania stężenia jonów metali i biomolekuł, a także jako barwniki fluorescencyjne stosowane w mikroskopii fluorescencyjnej i konfokalnej [183]. Pierwsze kropki węglowe otrzymane poprzez niskotemperaturową pirolizę CTR charakteryzowały się niską wydajnością kwantową, rzędu 10%. Wykorzystanie do ich syntezy wspomnianych wcześniej

β-podstawionych amin znacznie zwiększyło wydajności kwantowe fluorescencji, nawet do 90% [183], [184].



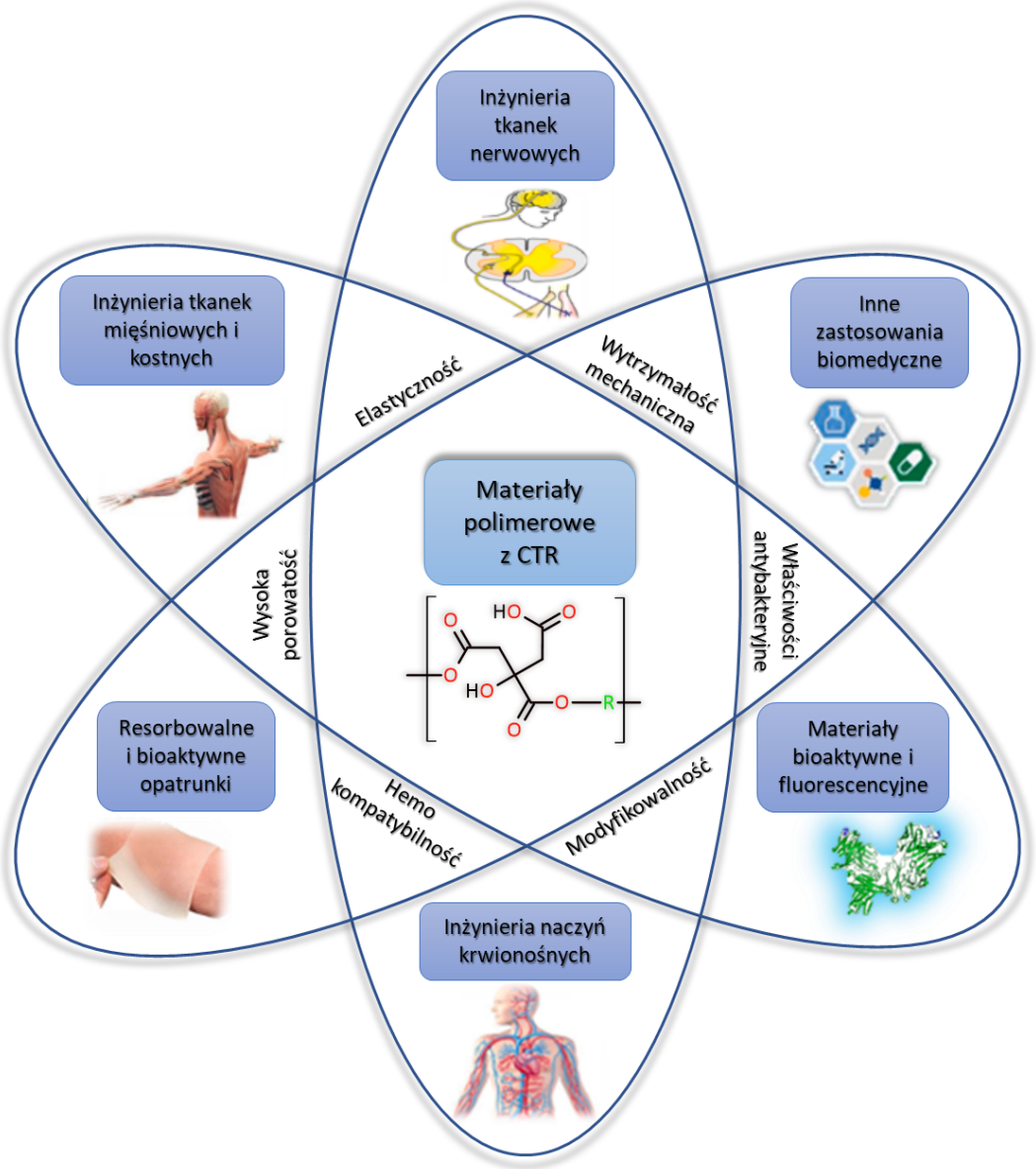
Rys. 16. Schemat syntezy wysokowydajnych kropek węglowych z kwasu cytrynowego

Małocząsteczkowe fluorofory mogą również być wprowadzane jako znaczniki do materiałów polimerowych, nadając im właściwości fluorescencyjne. Istnieją doniesienia literaturowe o wprowadzeniu pochodnych 2-pirydonu do materiałów silikonowych o powierzchni modyfikowanej grupami α,β-diaminowymi. Materiały te zyskały miejscowe właściwości fluorescencyjne, odporne na zmiany pH środowiska oraz rozpuszczalniki organiczne [185]. Wprowadzenie fluorescencji do materiałów polimerowych z kwasu cytrynowego również jest możliwe, co zostało opisane w literaturze oraz paragrafach poniżej i stanowiło istotną część badań przeprowadzonych w niniejszej pracy [186].

4.1.4. Kwas cytrynowy w inżynierii tkankowej – poli(cytryniany alkilenu) (PAC)

Poszukiwania nowych materiałów w inżynierii tkankowej opierają się w dużej mierze na kompromisach pomiędzy właściwościami mechanicznymi i biologicznymi materiałów. Opisane w paragrafach powyżej materiały naturalne i syntetyczne stosowane w inżynierii tkankowej ze szczególnym uwzględnieniem inżynierii naczyniowej cechują się mniej lub bardziej dopasowanymi do danego zastosowania właściwościami. Odpowiedzią na te problemy mogą być materiały polimerowe z CTR opracowane na początku XXI wieku [187]. Poli(cytryniany alkilenu) (PAC), mylnie zwane w literaturze poli(cytrynianami dioli) stanowią konkurencyjne rozwiązanie dla materiałów naturalnych, jak również dla innych polimerów syntetycznych opartych na biosurowcach. Dzięki ich biozgodności, możliwościom modyfikacji, właściwościom antybakteryjnym i hemokompatybilności znalazły one zastosowanie niemal w każdej gałęzi inżynierii tkankowej i medycyny regeneracyjnej (Rys. 17). Możliwości tak szerokiego zastosowania PAC są podyktowane także wysoką ekonomiką ich

wytwarzania – niska cena stosowanych substratów w połączeniu z nieskomplikowaną metodą syntezy czynią je atrakcyjną alternatywą dla współcześnie stosowanych rozwiązań.

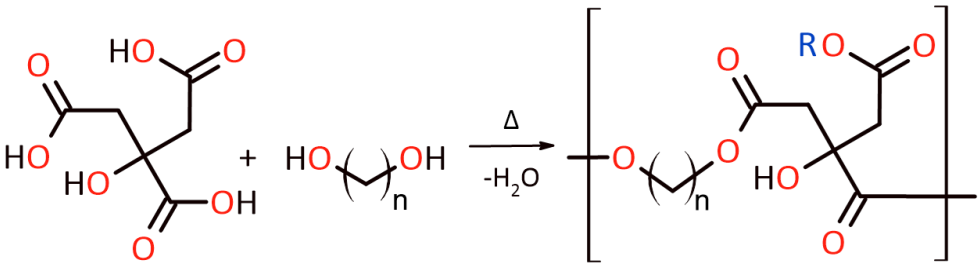


Rys. 17. Diagram obrazujący zastosowanie polimerów z CTR w różnych dziedzinach inżynierii tkankowej i medycyny regeneracyjnej

4.1.4.1. Otrzymywanie i właściwości PAC

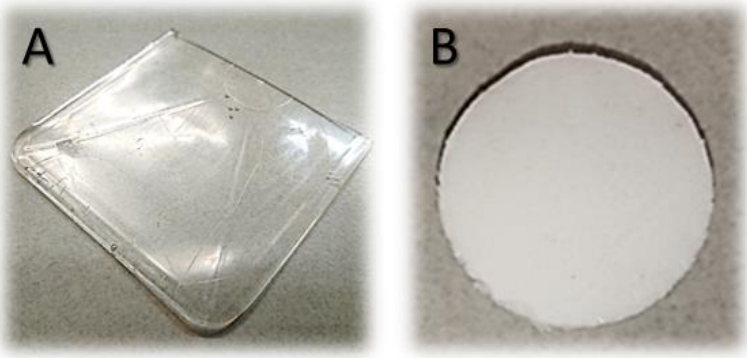
Poli(cytryniany alkilenu) są syntetycznymi elastomerami poliestrowymi otrzymywanymi w wyniku dwustopniowej reakcji CTR i wybranego diolu (Rys. 18). Według doniesień literaturowych reakcja otrzymywania prepolimeru prowadzona jest w kolbach okrągłodennych w atmosferze gazu obojętnego i przebiega w zakresie temperatur 160 - 140°C w czasie 1h. Wydajność reakcji syntezy prepolimeru mieści się zakresie 40 - 60%.

Następnie prepolimer oczyszczany jest poprzez rozpuszczenie w 96% etanolu, wytrącenie w wodzie, wirowanie, oddzielanie osadu, liofilizację i ponowne rozpuszczenie w etanolu lub dioksanie. Roztwory prepolimerów poddaje się sieciowaniu w temperaturze 80°C przez 3 – 6 dni w formach szklanych lub polistyrenowych. Łagodne warunki sieciowania podyktowane są koniecznością usuwania z materiału powstającej w wyniku reakcji wody – zbyt duża temperatura lub zbyt krótki czas sieciowania powodują powstawanie w materiale pęcherzy i zniekształceń [187], [188].



Rys. 18. Schemat reakcji syntezy poli(cytrynianów alkilenu). R – proton lub reszta alkilenowa, n = 3-16

Otrzymane usieciowane materiały są przezroczystymi, amorficznymi (temperatura zeszklenia = -10°C), elastycznymi ciałami stałymi o gładkiej strukturze. Wykazują się odpornością na rozpuszczalniki organiczne [187], [188]. Zastosowanie do ich wytworzenia trójfunkcyjnego związku, jakim jest kwas cytrynowy i dwufunkcyjnego diolu pozwoliło na otrzymanie rozgałęzionych materiałów usieciowanych. W literaturze jednak nie można znaleźć szczegółowych informacji o ich strukturze chemicznej. Pojedyncze doniesienia literaturowe przedstawiające wyniki eksperymentów NMR dla PAC są niekompletne, przez co ich dokładna struktura oraz jej wpływ na właściwości tych materiałów dotychczas nie został w pełni zbadany [177], [189], [190].



Rys. 19. Materiały lite PAC w postaci folii (**A**) i materiał porowaty wykonany techniką wymywania poroforu (**B**) – zdjęcia własne

Materiały PAC mogą być otrzymywane zarówno w formie folii i rurek o gładkiej strukturze, jak i w postaci porowatych gąbek (Rys 19). Folie są otrzymywane poprzez sieciowanie materiału w formach, natomiast technologia wykonywania rurek bazuje na nakładaniu i sieciowaniu cienkich warstw prepolimeru na pręt szklany [187]. Do wykonania materiałów porowatych stosowana jest technika wymywania poroforu z materiału, najczęściej stosowanym poroforem jest NaCl o odpowiednim rozdrobnieniu [191]. Opracowane są również materiały z pamięcią kształtu oraz rozmaite kompozyty PAC z innymi substancjami [192].

- **Biozgodność i biodegradowalność**

Materiały PAC są materiałami o wysokiej biozgodności, co potwierdziły liczne badania nad ich zastosowaniem w implantologii [193]–[195]. Obecność reszt cytrynianowych w strukturze materiałów, hydrofilowość oraz specyficzna struktura sieci polimerowej tworzą przyjazne środowisko dla wzrostu i proliferacji komórek. W literaturze najczęściej znaleźć można opisy badań biologicznych dla materiałów otrzymywanych w stosunku molowym 1:1 (CTR:diol) z których wynika, że powierzchnia materiału musi być odpowiednio przygotowana przed posiewem komórkowym. W innym przypadku niskie pH materiałów będące wynikiem obecności nadmiarowych reszt kwasowych może powodować śmierć komórek czyniąc materiał niezdatnym do pożądanych zastosowań [187], [188].

Materiały PAC są biodegradowalne – średni czas rozpadu wynosi od 6 do 18 miesięcy w symulowanym pH fizjologicznym [188]. Taki okres degradacji jest odpowiedni do zapewnienia komórkom wystarczającego czasu na odbudowę tkanki, jednocześnie wystarczająco krótki, by nie powodować nadmiernej proliferacji komórek i przerostów tkankowych. Na czas degradacji ma wpływ przede wszystkim długość zastosowanego diolu – im krótszy, tym degradacja materiału zachodzi szybciej. Szybkość degradacji materiałów PAC może być również regulowana do konkretnych zastosowań, np. poprzez dodatek dioli z grupami aminowymi – ich wprowadzenie powoduje skrócenie czasu degradacji z 6 miesięcy do kilku tygodni [187].

- **Właściwości antybakteryjne**

W implantologii ogromną rolę odgrywa sterylność materiałów i narzędzi – najmniejsze zanieczyszczenie patogenami może powodować odpowiedź immunologiczną pacjenta, skutkującą odrzuceniem przeszczepu a w skrajnych przypadkach zakażeniem ogólnoustrojowym i śmiercią. Materiały PAC, dzięki obecności reszt cytrynianowych posiadają naturalne właściwości antybakteryjne, potwierdzone wobec bakterii *E. Coli* i *S.Aureus* [196]. Dodatkowo dzięki możliwości ich modyfikacji udało się wprowadzić do materiałów inne substancje, jak sole amoniowe i fosfoniowe powodujące zmniejszenie powstawania biofilmu w rusztowaniach [197], [198].

- **Hemokompatybilność**

Badania nad hemokompatybilnością materiałów PAC potwierdziły możliwości ich zastosowania do produkcji biomateriałów pozostających w kontakcie z krwią. Materiały PAC cechują się niską trombogenicznością w porównaniu do ePTFE czy PLGA. Adhezja płytek krwi do materiałów PAC także jest niższa, niż w przypadku wspomnianych materiałów referencyjnych [199]. W połączeniu z ich wysoką biozgodnością oraz właściwościami mechanicznymi mogą one stanowić obiecującą alternatywę dla obecnie produkowanych materiałów zastępczych dla naczyń krwionośnych, zwłaszcza w produkcji implantów naczyń o małych średnicach, gdzie niska trombogeniczność ma kluczowe znaczenie. Możliwe jest także dalsze modyfikowanie materiałów PAC za pomocą m. in heparyny w celu wprowadzenia dodatkowych właściwości przeciwkrzepliwych [200].

- **Właściwości mechaniczne**

Właściwości mechaniczne PAC są zbliżone do tkanek ludzkich – wydłużenie względne wynosi od 150 do 260% w zależności od zastosowanego diolu, natomiast wytrzymałość na rozciąganie wynosiła około 6 MPa. Są to wartości zbliżone do wartości dla elastyny i ludzkich tętnic i żył [187]. Najważniejszą cechą materiałów usieciowanych PAC jest jednak możliwość modyfikowania właściwości mechanicznych do konkretnych zastosowań poprzez zmianę długości łańcucha węglowego użytego diolu oraz czasu sieciowania, a także dodatek modyfikatorów [194]. W myśl reguł reakcji polikondensacji, dłuższy czas sieciowania przekłada się na większą ilość przereagowanych grup -COOH i -OH, co skutkuje większą gęstością

usieciowania, objawiającą się zwiększeniem wytrzymałości materiałów kosztem ich elastyczności. Zastosowanie dłuższego łańcucha diolu zwiększa elastyczność materiałów poprzez zwiększenie odległości między wiązaniami, a tym samym zmniejszenie gęstości węzłów sieci, co przyczynia się do poprawy elastyczności, jednak kosztem wydłużenia czasu degradacji i zwiększenia hydrofobowości materiałów. Właściwości mechaniczne PAC można również zmieniać poprzez wprowadzanie innych monomerów np. kwasów maleinowego, itakonowego czy akrylanowych pochodnych glicerolu co pozwoliło na zmianę mechanizmu sieciowania materiałów, a tym samym na modyfikacje właściwości mechanicznych końcowych produktów [78], [144], [201]. Również tworzenie kompozytów poprzez domieszkowanie PAC np. poliuretanami, PLLA czy PLGA powoduje poprawę parametrów wytrzymałościowych przy zachowaniu wysokiej elastyczności materiałów [202], [203]. Porównanie właściwości mechanicznych materiałów PAC do niektórych tkanek ludzkich i wybranych polimerów stosowanych w inżynierii tkankowej przedstawiono w tabeli poniżej (Tab. 3).

Tab. 3. Porównanie właściwości mechanicznych niektórych tkanek ludzkich, polimerów syntetycznych oraz polimerów z kwasu cytrynowego stosowanych w inżynierii tkankowej [41], [42], [188], [204], [205]

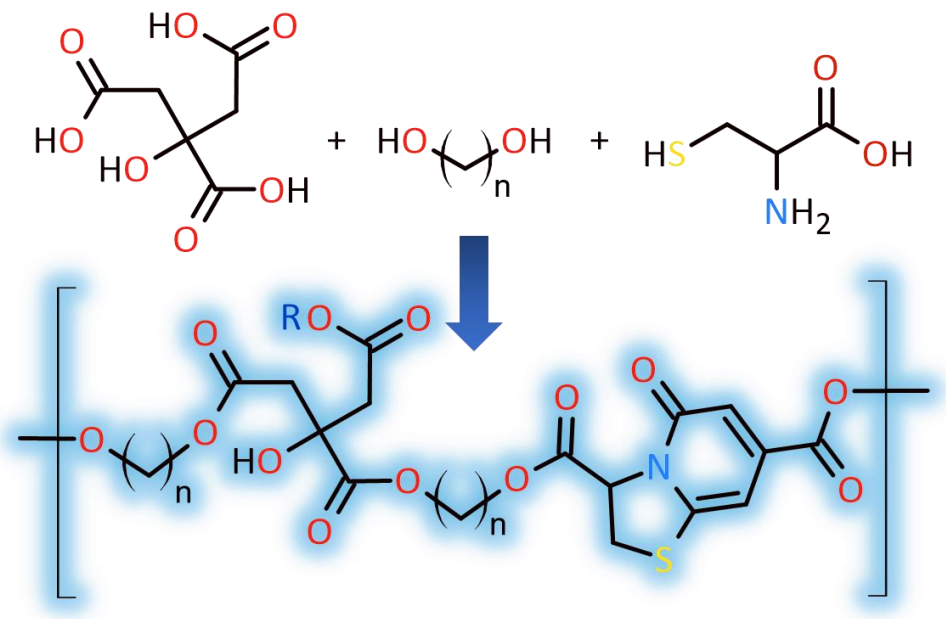
Materiał	**Wytrzymałość na rozciąganie [MPa]**	**Wydłużenie przy zerwaniu [%]**
Elastyna wołowa	2	150
Ludzkie włókna kolagenowe	-	50
Mięśnie gładkie aorty	1,4-8,3	48,7-134,8
PGA	70	<3
PLA	28-50	6
PCL	20,7	300-500
PAC	1,6-17	103-518
Poli(cytrynian alkoholu winylowego)	10,96-11,04	10,96-11,04
Kompozyt POC-ZnO	0,60-6,39	64-300

4.1.5. Modyfikacje PAC

Różnorodność zastosowań materiałów PAC w inżynierii tkankowej wymusiła możliwość wprowadzania do tych materiałów nowych funkcjonalności, rozszerzające wachlarz ich możliwych aplikacji. Kwas cytrynowy może reagować z różnymi modyfikatorami zarówno na etapie syntezy materiału, jak i poprzez dołączanie cząsteczek modyfikatora do aktywnych reszt cytrynianowych na powierzchni materiałów. Dzięki temu stało się możliwe wytworzenie tworzyw o właściwościach adhezyjnych, przeciwutleniających, fluorescencyjnych oraz wspomnianych wcześniej materiałów antybakteryjnych czy o zmodyfikowanych właściwościach mechanicznych.

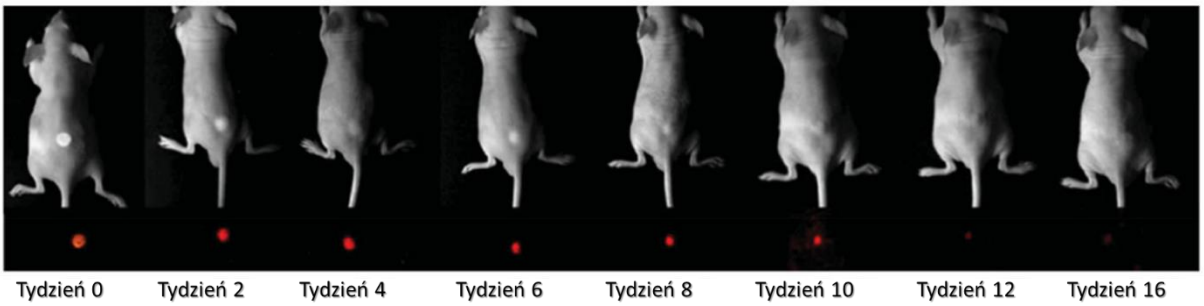
- **Materiały fluorescencyjne PAC**

Polimery biodegradowalne o właściwościach fluorescencyjnych cieszą się rosnącą popularnością w zastosowaniach biomedycznych. Ich zastosowania obejmują znakowanie biocząsteczek, kontrolowane systemy dostarczania leków, rusztowania tkankowe z kontrolowanym postępem degradacji czy systemy obrazowania komórkowego. Większość materiałów fluorescencyjnych otrzymywana jest na drodze fizycznego związania w sieci polimerowej małocząsteczkowego barwnika organicznego, kropek kwantowych bądź fluorescencyjnych białek, jak GFP [206], [207]. W nurt rozwoju materiałów fluorescencyjnych wpisują się także nowe fotoluminescencyjne polimery biodegradowalne (ang. *biodegradable photoluminescent polymers* - BPLP), które zbudowane są z kwasu cytrynowego, dioli oraz aminokwasów, stanowiących związki modyfikujące. Początkowo zakładano, że fluorescencja jest rezultatem tworzenia się w strukturze materiałów pierścieniowej struktury morfolino-2,5-dionu. Późniejsze badania wykazały jednak że wprowadzenie fluorescencji do materiałów PAC odbywa się na zasadzie innego mechanizmu – opisanej we wcześniejszych rozdziałach niniejszej pracy reakcji tworzenia pochodnych 2-pirydonu (Rys. 20) [186]. W wyniku tej reakcji w strukturze polimeru tworzą się cykliczne imidy, odpowiedzialne za wysoką wydajność kwantową fluorescencji materiałów. Oprócz tego istnieje możliwość wytworzenia materiałów modyfikowanych PAC poprzez kowalencyjne związanie wewnątrz sieci polimerowej uzyskanej wcześniej pochodnej 2-pirydonu z CTR [186].



Rys. 20. Uproszczony schemat syntezy BPLP z CTR, diolu i cysteiny. R – proton lub reszta alkilenowa, n = 6-8 [186]

Fluorescencyjne materiały BPLP zostały przebadane pod kątem stosowalności w inżynierii tkankowej. Dzięki zastosowanej modyfikacji fluorescencyjnej możliwe było bioobrazowanie wszczepionych implantów polimerowych i obserwacja regeneracji tkanki bez konieczności użycia metod inwazyjnych (Rys. 21) [208]. Obecnie BPLP produkowane są wieloma różnorodnymi metodami i znalazły z powodzeniem zastosowanie w wielu metodach bioobrazowania, znakowania biocząsteczek oraz w implantologii [207].



Rys. 21. Implant polimerowy z rodziny BPLP widoczny wewnątrz ciała myszy laboratoryjnej w systemie bioobrazowania fluorescencyjnego, obserwowany przez okres 16 tygodni. Widoczny jest postępujący zanik fluorescencji w marę postępu degradacji rusztowania przez odbudowującą się tkankę [208].

- **Materiały PAC o właściwościach przeciwutleniających**

Reaktywne formy tlenu są cząsteczkami niezbędnymi do prawidłowego funkcjonowania organizmu. W odpowiednim stężeniu regulują procesy życiowe komórek oraz są produktami ubocznymi reakcji metabolicznych. Regulacją ich stężenia w organizmie zajmują się wyspecjalizowane cząsteczki zwane przeciwutleniaczami – redukują one nadmiarowe reaktywne formy tlenu, zapewniając bezpieczne funkcjonowanie komórek. Ciała obce takie, jak rusztowania tkankowe wszczepione do organizmu indukują nadmierne wydzielanie reaktywnych form tlenu. Wówczas mogą one powodować lokalne zmiany zapalne, mogące prowadzić do zniszczenia tkanek okalających rusztowania i w konsekwencji do odrzucenia implantu – zjawisko to nosi nazwę stresu oksydacyjnego komórek. Stres oksydacyjny jest także przyczyną nadmiernego przyrostu komórek wewnątrz rusztowania – organizm próbuje zwalczyć potencjalny niekorzystny wpływ ciała obcego poprzez otoczenie go ochronną warstwą własnej tkanki [209]. Projektuje się więc materiały modyfikowane cząsteczkami przeciwutleniaczy, które mają za zadanie minimalizować stres oksydacyjny komórek otaczających rusztowanie, podnosząc prawdopodobieństwo przyjęcia się wszczepu.

Materiały PAC o właściwościach przeciwutleniających otrzymano poprzez chemiczne wprowadzenie do struktury materiałów kwasu askorbinowego [210]. CTR posiada właściwości przeciwutleniające, jednak są one zbyt małe, aby mogły skutecznie obniżać aktywność oksydacyjną w komórkach. Materiały modyfikowane kwasem askorbinowym wykazały się wysoką skutecznością w zwalczaniu reaktywnych form tlenu wytwarzanych w kontakcie z materiałem biologicznym. Wykazano synergiczne działanie reszt askorbinianowych i cytrynianowych – askorbiniany zwalczały reaktywne formy tlenu podczas, gdy reszty cytrynianowe chelatowały jony żelaza odpowiedzialne za indukowanie w szlakach metabolicznych powstawania wolnych rodników. Dzięki chemicznemu wbudowaniu kwasu askorbinowego w strukturę materiału PAC jego właściwości utrzymywały się przez cały czas degradacji rusztowania [210].

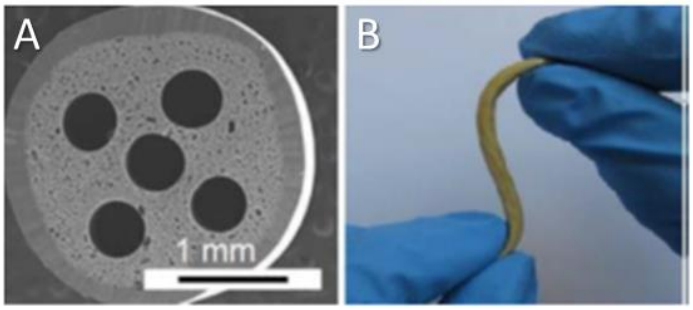
Otrzymano także materiały PAC modyfikowane za pomocą *N,N*-bis(2-hydroksyetylo) etylenodiaminy, która powoduje wprowadzenie do materiałów grup aminowych, zdolnych do wiązania tlenku azotu. Tlenek azotu hamuje aktywność oksydacyjną w komórkach śródbłonka naczyniowego, dzięki czemu ich proliferacja zostaje przyspieszona. Stopniowe uwalnianie się tlenku azotu z materiału pozwoliło na redukcję przerostów tkanki wokół rusztowań

tubularnych, promując wzrost komórek śródbłonka naczyniowego w stosunku do komórek mięśni gładkich, zapewniając korzystne właściwości przepływu krwi przez implant [211].

4.1.6. Zastosowanie PAC w medycynie regeneracyjnej

4.1.6.1. PAC w inżynierii tkanek nerwowych

Komórki nerwowe wykazują zróżnicowane mechanizmy regeneracji – nerwy obwodowego układu nerwowego mogą regenerować się w znacznym stopniu, natomiast komórki ośrodkowego układu nerwowego mają bardzo ograniczone możliwości regeneracyjne [212]. W przypadku uszkodzeń obejmujących ubytki dużych fragmentów nerwów lub uszkodzeń w obrębie ośrodkowego układu nerwowego stosowane są przeszczepy nerwów, które wykazują się mniejszą lub większą skutecznością. Osiągnięcia inżynierii tkankowej pozwalają na wytwarzanie rusztowań tkankowych nerwów, wstępnie zasiedlanych odpowiednio zróżnicowanymi komórkami pacjenta, a następnie wszczepianie ich w miejsce uszkodzonych regionów, co prowadzi do rekonstrukcji połączeń neuronalnych pomiędzy uszkodzonymi częściami ciała pacjenta [213]. Poli(cytryniany alkilenu), dzięki swojej wysokiej elastyczności i wytrzymałości mechanicznej oraz biozgodności stały się jednym z potencjalnych materiałów wykorzystywanych w odbudowie tkanki nerwowej. Znane są pierwsze doniesienia literaturowe o testowych skafoldach z materiałów PAC domieszkowanych diizocyjanianem 1,6-heksametylenu, zastosowanych w próbach laboratoryjnych do odbudowy tkanki nerwowej [214], [215]. Powstałe włókna nerwowe (Rys. 22) charakteryzowały się gładką strukturą zewnętrzną oraz porowatym wnętrzem, tworzącym kanały dogodne do namnażania komórek nerwowych.



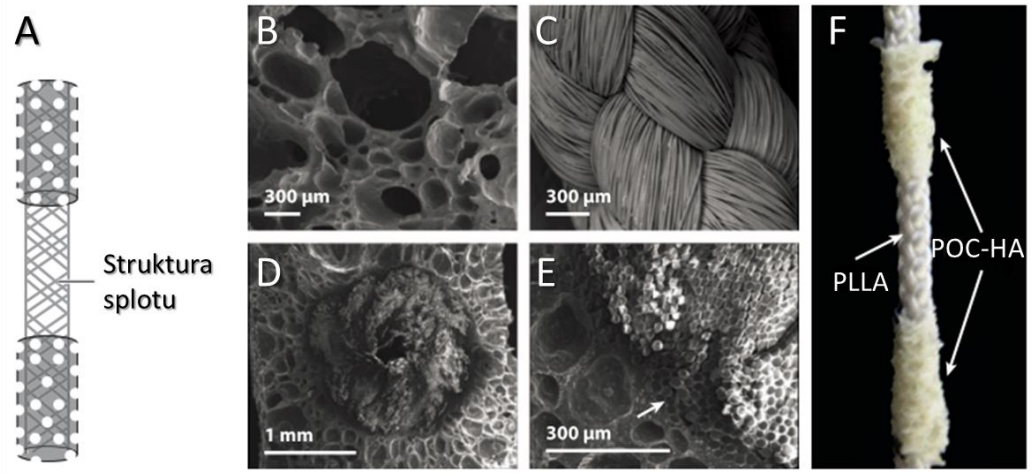
Rys. 22. Mikrofotografia SEM włókien nerwowych wykonanych z PAC domieszkowanych uretanami (**A**) oraz zdjęcie gotowego implantu (**B**) Zarówno nieporowata warstwa zewnętrzna, jak i porowaty rdzeń wytworzone są z tego samego, modyfikowanego materiału PAC. Różnice w morfologii wynikają z odmiennych metod wytwarzania obu warstw [215]

Również niemodyfikowane poli(cytryniany alkilenu) są brane pod uwagę jako potencjalne biotworzywa mające zastosowanie w regeneracji tkanki nerwowej [195].

4.1.6.2. PAC w inżynierii tkanek kostnych

Regeneracja tkanki kostnej stanowi obecnie jedną z najprężniej rozwijanych gałęzi inżynierii tkankowej. Uszkodzenia tkanki kostnej powstałe zwłaszcza w wyniku urazów obszarowych lub resekcji dużych fragmentów kości, np. na skutek choroby nowotworowej wymagają zastosowania materiałów podporowych niezbędnych do utrzymania kształtu odbudowywanej kości. W implantologii kości stosowane są powszechnie biomateriały ceramiczne i metaliczne, zapewniające stabilną platformę do rekonstrukcji tkanki. Jednak ich stosowanie niesie ze sobą ryzyko potencjalnego odrzucenia wszczepów. Na skutek braku zdolności degradacji materiałów ze stopów metali oraz ceramiki, niekiedy zachodzi potrzeba usunięcia ich z organizmu, co rodzi konieczność dodatkowej interwencji chirurgicznej. Aby temu zapobiec, coraz częściej wykorzystywane są biomateriały degradowalne na bazie surowców pochodzenia biologicznego.

Poliestry kwasu cytrynowego i dioli domieszkowane hydroksyapatytem (HA) znalazły zastosowanie w produkcji rusztowań do odbudowy kości. Hydroksyapatyt stanowiący naturalną substancję kościotwórczą zapewnia odpowiednie właściwości mechaniczne oraz porowatość stosowanych implantów, podczas, gdy obecność reszt cytrynianowych warunkuje ich odpowiednią biozgodność. W opisywanym przykładzie zaobserwowano zwiększoną adhezję komórek macierzystych szpiku kostnego do rusztowań zawierających PAC, która zwiększała się wraz ze wzrostem zawartości HA. Wykazano, że z materiałów PAC można wytworzyć kompozyty zawierające do 60% HA – tak wysoka zawartość hydroksyapatytu znacznie zwiększa adhezję komórek do rusztowań i bardzo przybliża właściwości mechaniczne i biologiczne otrzymanych kompozytowych skafoldów do właściwości tkanki kostnej [216]. Otrzymano również inne bardziej złożone materiały kompozytowe zawierające usieciowane PAC. Znane są doniesienia literaturowe opisujące materiały oparte na szkielecie z PMGA i PLLA, na który naniesiona jest warstwa polimeru PAC i hydroksyapatytu (Rys. 23) [201], [217], [218].



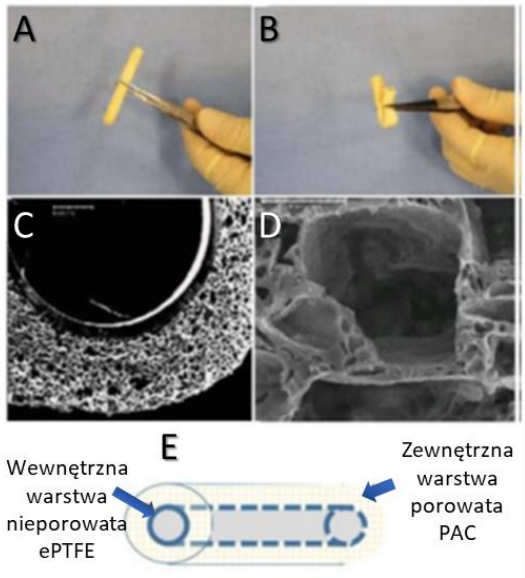
Rys. 23. Przykład trójskładnikowego rusztowania kompozytowego do regeneracji tkanki kostnej zbudowanego z rdzenia z PLLA i porowatych osnów z polimeru POC zawierającego hydroksyapatyt. **A** – schemat ideowy rusztowania, **B** – mikrofotografia SEM porowatej powierzchni fragmentu zbudowanego z POC-HA, **C** – mikrofotografia SEM splotu rdzenia PLLA, **D** – mikrofotografia SEM przekroju poprzecznego przez rdzeń i osnowę oraz mikrofotografii przedstawiająca granicę faz rdzenia PLLA i osnowy POC-HA (**E**). **F** – fotografia przedstawiająca gotowe rusztowanie przed wszczepieniem do organizmu modelowego [217]

Materiały takie mają potwierdzoną skuteczność w przyspieszaniu regeneracji tkanki kostnej i chrzęstnej. Stanowią one również dogodne środowisko do wzrostu komórek kości, zapewniając właściwą orientację odbudowywanej tkanki [217].

4.1.6.3. PAC w inżynierii tkankowej naczyń krwionośnych

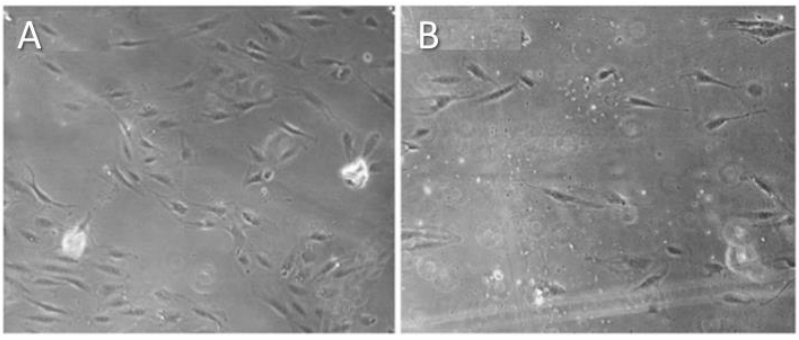
Materiały PAC zostały pierwotnie opracowane jako potencjalne biotworzywa do zastosowania w inżynierii tkankowej. Szybko zdano sobie sprawę, że dzięki ich wysokiej hemozgodności i szerokiemu zakresowi możliwych modyfikacji znajdą one zastosowanie do wytwarzania implantów naczyń krwionośnych. Przez niemal 20 lat od pierwszej publikacji dotyczącej PAC w toku wielu badań zaproponowano zróżnicowane projekty zarówno niemodyfikowanych, jak i modyfikowanych materiałów i rusztowań mogących znaleźć zastosowanie jako zamienniki naczyń krwionośnych o małych średnicach. Pierwotnie materiały PAC wykorzystywano jako materiały powłokowe dla rusztowań z ePTFE i Dacronu® (Rys. 24) [219]. Wykazano, że powlekanie polimerami PAC poprawiło właściwości biologiczne wykonanych rusztowań – komórki wykazywały większą cytozgodność przy znacznym obniżeniu trombogeniczności. Materiały kompozytowe ePTFE-PAC odznaczały się przy tym

wysoką wytrzymałością mechaniczną, wystarczającą do wytrzymania ciśnienia fizjologicznego krwi oraz odpornością na rozwarstwienie [219].



Rys. 24. Elastyczne rusztowania kompozytowe ePTFE-PAC. A, B – zdjęcia rusztowań tubularnych, C, D – mikrofotografie SEM przekroju poprzecznego oraz warstwy porowatej, E – schemat ideowy rusztowania [219]

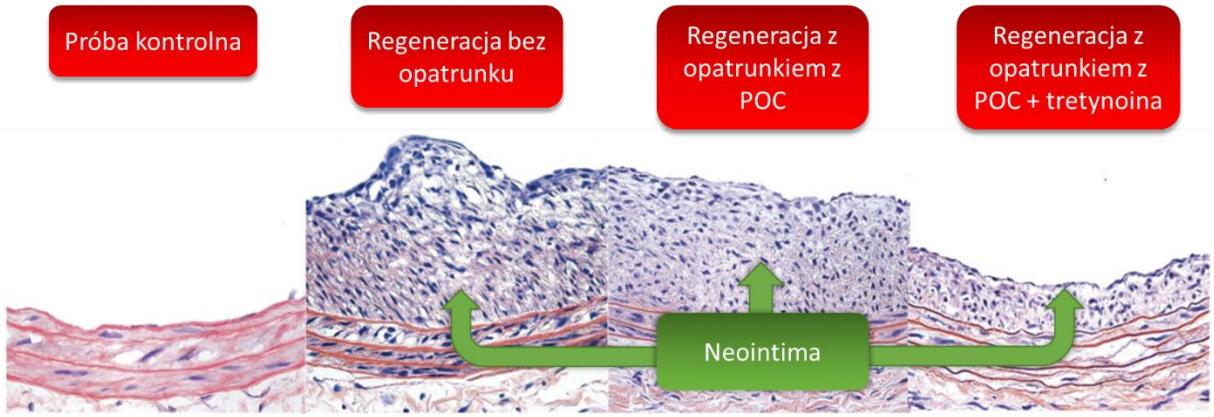
Poli(cytryniany alkilenu) stosowane są także jako składniki dwu- i trójwarstwowych biodegradowalnych rusztowań kompozytowych. Z materiałów PAC wykonywane są warstwy zewnętrzne mające kontakt z krwią i komórkami przyległych tkanek, natomiast drugi polimer o mniejszej biozgodności stanowi rdzeń warunkujący odpowiednie właściwości mechaniczne. Przykładowo, rusztowania otrzymane z kopolimerów POC-PLGA z domieszką czynnika wzrostu komórek śródbłonka naczyniowego odznaczały się wysokim stopniem pokrycia przez komórki oraz wyższą hemokompatybilnością, niż referencyjne rusztowania z PLLA (Rys. 25). Badania pokazały również, że rusztowania zawierające CTR cechowały się właściwościami przeciwzapalnymi [220].



Rys. 25. Porównanie stopnia pokrycia komórkami rusztowań z kompozytu POC-PLGA (**A**) z komórkami pokrywającymi referencyjne rusztowanie z PLLA (**B**) [220]

Prowadzono także badania nad rusztowaniami kompozytowymi PAC – kolagen, wytwarzanymi metodą elektroprzędzenia. Wykazano, że charakteryzowały się one wyższą biozgodnością i lepszą proliferacją komórek śródbłonka naczyniowego, niż rusztowania wykonane z czystego kolagenu oraz właściwościami mechanicznymi odpowiednimi dla potencjalnych materiałów do produkcji rusztowań naczyniowych. Badano również rusztowanie wytworzone w postaci dwuwarstwy złożonej z POC, kolagenu i elastyny, usieciowanej roztworem glutaraldehydu. Stwierdzono, że rusztowanie nie jest toksyczne dla komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych, a w kontakcie z krwią nie obserwowano znaczącej hemolizy. Pomimo, że wartości wytrzymałości na rozciąganie oraz wytrzymałości ciśnieniowej otrzymanych rusztowań wydają się być niższe niż te opisane dla tkanek ludzkich, mieszczą się one w zakresie wartości fizjologicznych [221], [222].

Materiały modyfikowane również mogą znaleźć zastosowanie w inżynierii naczyniowej. Wspomniane wcześniej materiały zdolne do uwalniania tlenku azotu mogą być wykorzystywane do wykonywania opatrunków naczyniowych zmniejszających niekontrolowane przerosty komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych [211]. Taki sam efekt zaobserwowano dla materiałów POC zawierających inny modyfikator – tretynoinę, pochodną retinolu o właściwościach przeciwzapalnych. Badania na modelu zwierzęcym wykazały znaczny wpływ zastosowania materiałów POC na kontrolę przerostu mięśniowej tkanki naczyniowej. Dodatkowo wykorzystanie tretynoiny spowodowało dalsze zmniejszenie proliferacji komórek mięśni gładkich aorty, zwiększając światło naczynia i umożliwiając lepszy przepływ krwi (Rys. 26) [223].



Rys. 26. Zdjęcia mikroskopowe przerostu nowopowstałej tkanki wewnętrznej aorty (neointimy) bez zastosowania opatrunku z modyfikowanego POC oraz przy zastosowaniu modyfikowanego POC z tretynoiną [223]

Opisane powyżej przykłady stanowią jedynie ilustrację możliwości modyfikacji i wielokierunkowego zastosowania materiałów polimerowych z CTR. Znalazły one zastosowanie także jako systemy celowanego uwalniania leków, w regeneracji uszkodzeń pęcherza moczowego czy też w produkcji opatrunków o właściwościach przyspieszających gojenie i regenerację tkanki [224].

5. Podsumowanie części literaturowej

Choroby układu sercowo – naczyniowego stanowią jeden z największych problemów cywilizacyjnych na świecie poprzez ich wysoką śmiertelność i często zbyt późne wykrycie. W leczeniu chorób układu krwionośnego stosowane są rozmaite środki farmakologiczne i zapobiegawcze, niejednokrotnie jednak jedyną drogą do uratowania pacjenta jest interwencja chirurgiczna. W leczeniu chirurgicznym stosuje się zwykle autogeniczne przeszczepy zdrowych naczyń pacjenta w miejsce chorych lub uszkodzonych struktur. Niekiedy jednak stan naczyń nie pozwala na ich wykorzystanie, co implikuje potrzebę zastosowania syntetycznych odpowiedników.

Materiały stosowane w chirurgii naczyniowej są wynikiem połączonych osiągnieć biologii, biotechnologii, inżynierii chemicznej i materiałowej, które razem stanowią makrodyscyplinę inżynierii tkankowej. Każdy otrzymany materiał musi spełnić szereg rygorystycznych wymogów, które pozwalają na jego precyzyjne dopasowanie do danych zastosowań, włączając w to wysoką biozgodność, odpowiednie właściwości mechaniczne i powierzchniowe z możliwością ich modyfikacji oraz w przypadku rusztowań naczyń krwionośnych także niską trombogeniczność. Stosowane są materiały czysto syntetyczne, pochodzenia naturalnego oraz rozmaite kompozyty, łączące struktury syntetyczne z tymi pochodzenia biologicznego. Podstawowym problemem inżynierii tkankowej jest znalezienie materiału, który spełniałby wszystkie stawiane przed nim wymagania przy jednoczesnym zachowaniu niskich kosztów wytwarzania oraz wszechstronności aplikacyjnej.

Do najczęściej stosowanych w inżynierii tkankowej naczyń krwionośnych materiałów syntetycznych można zaliczyć ePTFE, PCL, PGA, PET czy poliuretany, natomiast z materiałów pochodzenia naturalnego wykorzystywano kolagen, elastynę, fibroinę czy też chitozan. Wszystkie te materiały posiadają jednak ograniczenia – materiały syntetyczne

indukują odpowiedź immunologiczną, trombogeniczność oraz stres oksydacyjny komórek, przez co wymagają powlekania substancjami polepszającymi ich właściwości biologiczne. Z kolei materiały naturalne zachowują pełną biozgodność, jednak ich właściwości mechaniczne i wytrzymałość powodują duże ograniczenie ich stosowalności. Ponadto, wspomniane wyżej materiały znajdują zastosowanie głównie w regeneracji naczyń o dużych średnicach. W inżynierii tkankowej naczyń krwionośnych o małym przekroju wspomniane wyżej cechy bio- i hemozgodności odgrywają jeszcze większą rolę, skutecznie utrudniając zastosowanie tych materiałów.

Obiecującymi materiałami posiadającymi cechy wszechstronnego materiału do zastosowań w inżynierii tkankowej wydają się być poli(cytryniany alkilenu). Dzięki biozgodnym monomerom, stosowanym do ich produkcji oraz szerokiemu zakresowi modyfikacji właściwości mechanicznych łączą one w sobie cechy wytrzymałości i odporności materiałów syntetycznych z biokompatybilnością materiałów pochodzenia naturalnego. Posiadają one udokumentowaną wieloma badaniami *in* vitro biozgodność i hemokompatybilność, a także cechują się szerokimi możliwościami modyfikacji struktury w celu nadania im nowych funkcjonalności. Znalazły zastosowanie w regeneracji tkanek miękkich jak i twardych oraz są wciąż rozwijane w kierunku dalszej funkcjonalizacji.

W literaturze znaleźć można wiele doniesień odnośnie syntezy i prób modyfikacji materiałów PAC. Wszystkie one opierają się na skomplikowanych, wieloetapowych protokołach syntezy oraz charakterystyce opisanej dla pierwotnie opracowanych materiałów, bezkrytycznie powielanej przez lata. Brak jest także opisów literaturowych charakterystyki strukturalnej tych materiałów, a szczątkowe opisy wyników analiz NMR zawierają liczne nieścisłości. Dlatego też w ramach niniejszej pracy postanowiono o całkowitej rewizji metodyki syntezy materiałów PAC, jak również wykonaniu szczegółowej analizy struktury i właściwości otrzymanych poliestrów.

Mając na uwadze dostępne doniesienia literaturowe wskazujące na korzystny wpływ właściwości przeciwutleniających materiału na kontrolę wzrostu komórek tkanki naczyniowej, a także użyteczności zjawiska fluorescencji do potencjalnej kontroli degradacji rusztowań w ciele biorcy, podjęto postanowienie o wprowadzeniu tych modyfikacji do materiałów PAC. Istniejące prace opisują próby modyfikowania materiałów PAC za pomocą modyfikatorów

odpowiedzialnych za nadawanie jednej nowej funkcjonalności materiału. Postanowiono zatem przeprowadzić ich modyfikacje w taki sposób, aby za pomocą jednego modyfikatora wprowadzić do materiałów obie nowe cechy. Nadrzędnym celem było potwierdzenie przydatności tak otrzymanych materiałów do ich zastosowania w inżynierii tkankowej naczyń krwionośnych.

Cel i zakres pracy

Celem pracy było otrzymanie prepolimerów oraz usieciowanych poli(cytrynianów alkilenu), pełna charakterystyka ich właściwości fizykochemicznych, a także ich modyfikacja za pomocą dodatku przeciwutleniacza który miał nadać materiałom PAC dwie nowe funkcjonalności – fluorescencję i właściwości przeciwutleniające. Dodatkowy cel stanowiła ocena potencjalnego zastosowania takich materiałów w inżynierii tkankowej naczyń krwionośnych.

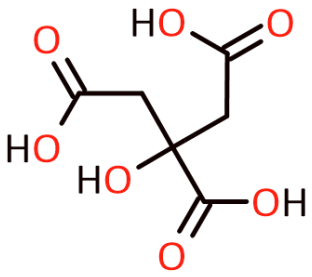
Zakres pracy obejmował przeprowadzenie licznych syntez, analiz i badań fizykochemicznych, mechanicznych i biologicznych dla prepolimerów, usieciowanych materiałów kontrolnych i modyfikowanych. Charakterystyka prepolimerów obejmowała eksperymenty jedno- i dwuwymiarowej spektroskopii NMR, uzupełnianej analizami chromatograficznymi sprzężonymi ze spektrometrią mas oraz oznaczanie liczby kwasowej i średnich ciężarów cząsteczkowych prepolimerów. Usieciowane materiały kontrolne oraz modyfikowane zbadano za pomocą spektroskopii NMR dla próbek stałych oraz poddano analizie właściwości mechanicznych. Wykonano również pełną charakterystykę właściwości spektroskopowych materiałów modyfikowanych, obejmującą widma UV-Vis oraz fluorescencji, a także analizę ich właściwości przeciwutleniających. W celu określenia stosowalności uzyskanych materiałów usieciowanych w inżynierii tkankowej, przeprowadzono podstawowe badania ich właściwości biologicznych oraz określono wpływ parametrów syntezy i właściwości materiałów na wzrost i proliferację komórek.

Część doświadczalna

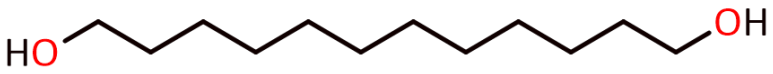
6. Odczynniki

Substraty do syntezy i modyfikacji PAC

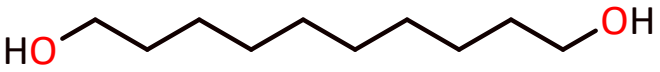
- **Kwas cytrynowy**
  - Masa = 192 g/mol
  - Wzór sumaryczny: $C_6H_8O_7$
  - Temperatura degradacji: 165°C
  - Temperatura topnienia: 153°C
  - Producent: Alfa Aesar



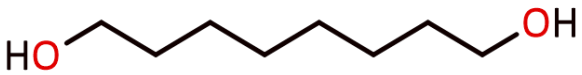
- **1,12-Dodekanodiol**
  - Masa = 202 g/mol
  - Wzór sumaryczny: $C_{12}H_{26}O_2$
  - Temperatura topnienia: 79°C
  - Producent: Tokyo Chemical Industries



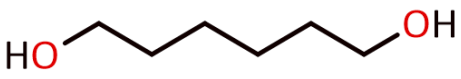
- **1,10-Dekanodiol**
  - Masa = 174 g/mol
  - Wzór sumaryczny: $C_{10}H_{22}O_2$
  - Temperatura topnienia: 72°C
  - Producent: Tokyo Chemical Industries



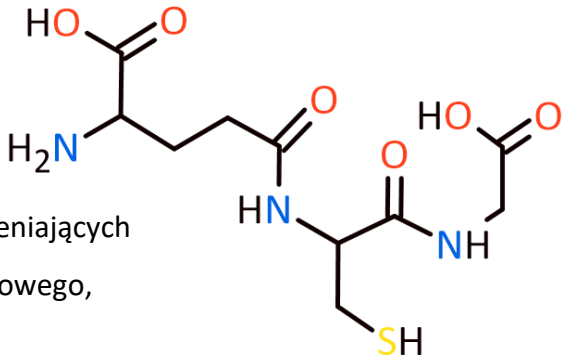
- **1,8-Oktanodiol**
  - Masa = 146 g/mol
  - Wzór sumaryczny: $C_8H_{18}O_2$
  - Temperatura topnienia: 61°C
  - Producent: Angene



- **1,6-Heksanodiol:**
  - Masa = 118 g/mol
  - Wzór sumaryczny: $C_6H_{14}O_2$
  - Temperatura topnienia: 42°C
  - Producent: Tokyo Chemical Industries



- **L-glutation (GSH)**
  - Masa = 307 g/mol
  - Wzór sumaryczny: $C_{10}H_{17}N_3O_6S$
  - Tripeptyd o właściwościach przeciwutleniających składający się z reszt L-kwasu glutaminowego, L-cysteiny i L-glicyny
  - Producent: Fluorochem



Pozostałe odczynniki

- **Odczynniki analityczne**
  - **10% roztwór soli sodowej resazuryny (AlamarBlue)** (Sigma-Aldrich) – barwnik fluorescencyjny stosowany w oznaczaniu aktywności metabolicznej komórek,
  - **2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (DPPH)** (Sigma-Aldrich) – rodnik używany w badaniu właściwości przeciwutleniających
  - **(6α*S*,11β*R*)-7,11β-dihydro-6*H*-indeno[2,1-c]chromeno-3,4,6α,9,10-pentaol (hematoksylina)** (Sigma Aldrich) - organiczny barwnik niebieski służący do trwałego barwienia struktur komórkowych
  - **Ester acetoksymetylowy *N,N'*-((3',6'-dihydroksy-3-oksospiro(izobenzofuran 1(3*H*),9'(9*H*) ksanteno)-2',7' -diylo)bis(metyleno))bis(*N*-(karboksymetylo)-glicyny (kalceina-AM)** (Sigma-Aldrich) – barwnik zielonej fluorescencji stosowany w barwieniu komórek typu live/dead
  - **Jodek propidyny** (Sigma-Aldrich) – barwnik czerwonej fluorescencji stosowany w barwieniu komórek typu live/dead
  - **Sól sodowa 2',4',5',7'-tetrabromofluoresceiny (eozyna)** (Sigma Aldrich) – barwnik czerwony służący do trwałego barwienia struktur komórkowych

- **Wzorce polistyrenowe do oznaczania ciężarów cząsteczkowych w GPC** – sporządzane poprzez rozpuszczenie 2 mg wzorca w 2 ml THF. Wykorzystano wzorce o masach 890 g/mol, 1820 g/mol, 6100 g/mol, 9730 g/mol i 130000 g/mol (PSS)

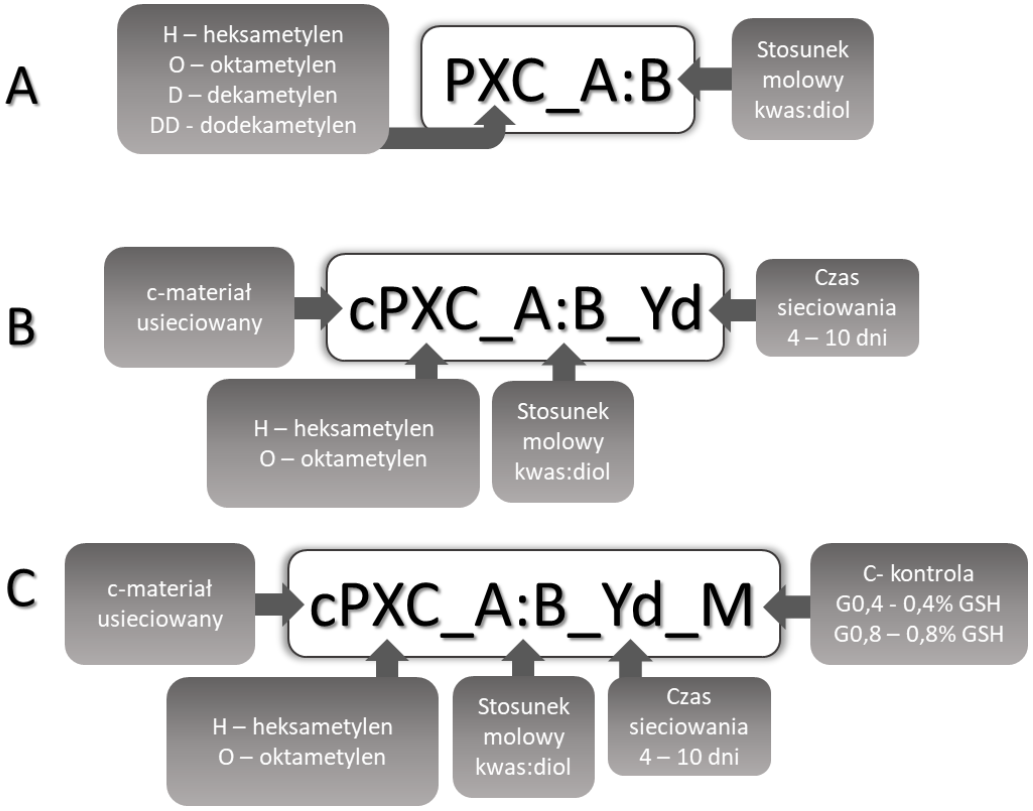
- **Odczynniki do hodowli komórkowych**
  - **0,1% roztwór aminokwasów podstawowych** (100x, PAA Laboratories GmbH)
  - **0,1% roztwór pirogronianu sodu** (PAA Laboratories GmbH),
  - **1% roztwór penicylina-streptomycyna** (PAN-Biotech)
  - **10% roztwór płodowej surowicy bydlęcej** (Biowest LLC)
  - ***Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM)** (PAN Biotech)
  - ***Endothelial cells growth medium 2* (EGM – 2)** (PromoCell)
  - **Roztwór 10 ng/ml podstawowego czynnika wzrostu fibroblastów FGF-2** (GenScript)
  - **Roztwór trypsyny/EDTA w PBS** (PAN-Biotech)
- **Rozpuszczalniki i eluenty**
  - **2% roztwór kwasu mrówkowego** – eluent stosowany w analizach LC-MS, sporządzany z 98% kwasu mrówkowego (Avantor)
  - **Deuterowany dimetylosulfotlenek 98% z domieszką tetrametylosilanu (DMSO-d6 + TMS)** (Sigma-Aldrich)– rozpuszczalnik używany w analizach NMR, zawierający standard wewnętrzny do kalibracji przesunięcia chemicznego
  - **Etanol cz. d. a.** (POCH, Chempur) – rozpuszczalnik prepolimerów
  - **Metanol cz. d. a.** (Chemsolve, Avantor) – rozpuszczalnik oraz eluent w analizach LC-MS
  - **Tetrahydrofuran (THF) cz. d. a.** (Supelco) – rozpuszczalnik oraz eluent stosowany w chromatografii GPC
  - **Woda destylowana**

7. Przepisy preparatywne i metody charakterystyki otrzymanych produktów

7.1. Nazewnictwo próbek

W wyniku przedstawionych poniżej licznych reakcji syntez prepolimerów oraz usieciowanych materiałów kontrolnych i modyfikowanych konieczne stało się wprowadzenie

systemu nazewnictwa próbek, pozwalającego na łatwe przyporządkowanie omawianych wyników do konkretnego typu materiału. Na rysunku poniżej przedstawiono sposób nazywania poszczególnych rodzajów próbek, stosowany konsekwentnie we wszystkich następnych podrozdziałach niniejszej pracy (Rys. 27).



Rys. 27. Schemat nazywania próbek wykorzystywany w niniejszej pracy. **A** – prepolimery, **B** – usieciowane materiały kontrolne, **C** – usieciowane materiały modyfikowane

7.2. Materiały PAC kontrolne

7.2.1. Synteza prepolimerów

Procedurę otrzymywania prepolimerów podzielono umownie na dwa etapy – pierwszym jest reakcja w podwyższonej temperaturze, a następnym proces oczyszczania otrzymanej mieszaniny poreakcyjnej. Wszystkie opisane w poniższych paragrafach syntezy zostały przeprowadzone według takiego podziału. Zmianom ulegały warunki reakcji oraz wykorzystywane diole, co szczegółowo opisano poniżej.

- **Reakcja otrzymywania prepolimerów**

Kwas cytrynowy i wybrany diol zmieszano w określonych dla danej reakcji stosunkach molowych (Tab. 4 i 5) w szklanych fiolkach o pojemności 50 ml. Każda z fiolek była zaopatrzona w mieszadełko magnetyczne o wymiarach 2,5 x 0,8 cm. Następnie, reagenty ogrzewano w temperaturze 140°C przez 40 min przy stałym mieszaniu (100 obr/min) w otwartych fiolkach aby umożliwić swobodne odparowywanie uwalniającej się pary wodnej. Fiolki ważono wraz z zawartością przed i po reakcji celem oszacowania stopnia konwersji reagentów. Szczegółowe dane odnośnie naważek i otrzymanych prepolimerów przedstawiono w tabelach dotyczących danej serii reakcji (Tab. 4 i 5).

- **Oczyszczanie mieszanin poreakcyjnych**

Otrzymane mieszaniny reakcyjne rozpuszczano w 40 ml 96% etanolu, przelewano butelek wirówkowych 250 ml i wytrącano w 150 ml wody destylowanej, a następnie odwirowano za pomocą wirówki laboratoryjnej MPW-350, przy 5000 obr/min przez 10 min. Każda butelka była ważona przed napełnieniem zawiesiną PAC, w celu umożliwienia oszacowania wydajności prowadzonych syntez. Po odwirowaniu, ciecz znad próbek zdekantowano, a następnie otrzymane materiały zamrożono i liofilizowano przez 24 godziny w aparacie CHRIST Alpha 2-4 LDplus (ciśnienie = 0,35 mbar, temperatura = - 85°C).

Po liofilizacji butelki zawierające oczyszczone prepolimery ponownie zważono. Część próbek pozostawiono nierozpuszczone do wykorzystania do celów analitycznych. Pozostałe prepolimery ponownie rozpuszczono w etanolu, uzyskując 30% roztwory wagowo-objętościowe – były one podstawą do otrzymania materiałów usieciowanych.

7.2.1.1. Reakcje przesiewowe syntezy prepolimerów

W pierwszych reakcjach syntez wykorzystano cztery diole alifatyczne: 1,6-heksanodiol, 1,8-oktanodiol, 1,10-dekanodiol oraz 1,12-dodekanodiol. Reakcje i oczyszczanie prowadzono według opisanej w pkt. 7.2.1 procedury w trzech stosunkach molowych CTR:diol. W celu określenia najbardziej optymalnych warunków syntezy oraz maksymalnego czasu prowadzenia reakcji otrzymywania prepolimerów dla PHC i POC przeprowadzono także syntezy w wydłużonych czasach, odpowiednio 60 i 90 minut (Tab. 4).

Tab. 4. Zestawienie otrzymanych próbek prepolimerów PAC oraz naważek substratów wykorzystanych do ich otrzymania, a także warunków reakcji dla przeprowadzanych reakcji przesiewowych

Nazwa	CTR [g]	Diol [g]	CTR [mol]	Diol [mol]	T [°C]	Czas reakcji [min]
			PHC			
PHC_1:1	12,38	7,62	0,065	0,065		
PHC_2:3	10,40	9,60	0,054	0,081		40
PHC_1:2	8,97	11,03	0,047	0,093	140	
PHC_1:1_60	12,38	7,62	0,065	0,065		60
PHC_2:3_90	10,40	9,60	0,054	0,081		90
			POC			
POC_1:1	11,36	8,64	0,059	0,059		
POC_2:3	9,34	10,66	0,049	0,073		40
POC_1:2	7,93	12,07	0,041	0,083	140	
POC_1:1_60	11,36	8,64	0,059	0,059		60
POC_2:3_90	9,34	10,66	0,049	0,073		90
			PDC			
PDC_1:1	10,49	9,51	0,055	0,055		
PDC_2:3	8,47	11,53	0,044	0,066	140	40
PDC_1:2	7,11	12,89	0,037	0,074		
			PDDC			
PDDC_1:1	9,74	10,26	0,051	0,051		
PDDC_2:3	7,75	12,25	0,040	0,061	140	40
PDDC_1:2	6,44	13,56	0,034	0,067		

Otrzymane w wyniku reakcji prepolimery poddano wstępnej charakterystyce oraz próbom sieciowania i ocenie cytotoksyczności otrzymanych usieciowanych poliestrów. Na podstawie uzyskanych wyników zadecydowano o odrzuceniu materiałów i prepolimerów otrzymanych z 1,10-dekanodiolu oraz 1,12-dodekanodiolu, a także o odrzuceniu stosunku molowego 1:2 (CTR:diol) w przypadku wszystkich otrzymanych materiałów. Do dalszych

syntez wykorzystywano 1,6-heksanodiol oraz 1,8-oktanodiol w stosunkach molowych (CTR;diol) 1:1 oraz 2:3.

7.2.1.2. Synteza prepolimerów na skalę preparatywną

W wyniku konieczności otrzymania dużych ilości prepolimerów przeprowadzono reakcje syntezy na większą skalę. Do reakcji wykorzystano 1,6-heksanodiol oraz 1,8-oktanodiol w stosunkach molowych (CTR;diol) 1:1 oraz 2:3. Reakcje oraz oczyszczanie otrzymanych prepolimerów przeprowadzono według procedury opisanej w pkt. 7.2.1. Ze względu na przeprowadzoną rewizję protokołu syntezy przedstawioną szczegółowo w pkt. 8.1.1.2 nie zmieniono objętości naczyń reakcyjnych lecz ich liczbę, a reakcje przeprowadzano w wielu powtórzeniach. Otrzymano prepolimery zarówno w formie 30% roztworów w etanolu, jak również w formie nierozpuszczonej. Szczegóły dotyczące ilości reagentów oraz warunków reakcji przedstawiono w tabeli poniżej (Tab. 5)

Tab. 5. Zestawienie otrzymanych próbek prepolimerów PAC oraz naważek substratów wykorzystanych do ich otrzymania, a także warunków reakcji dla przeprowadzanych reakcji na większą skalę

Nazwa	CTR [g]	Diol [g]	CTR [mol]	Diol [mol]	T [°C]	Czas reakcji [min]
			PHC			
PHC_1:1	12,38	7,62	0,065	0,065	140	40
PHC_2:3	10,40	9,60	0,054	0,081		
			POC			
POC_1:1	11,36	8,64	0,059	0,059	140	40
POC_2:3	9,34	10,66	0,049	0,073		

7.2.2. Charakterystyka prepolimerów

7.2.2.1. Analiza liczby kwasowej prepolimerów

Pomiary liczby kwasowej przeprowadzono zgodnie z normą ISO 660:2010. W tym celu rozpuszczono 150 mg badanego prepolimeru w 10 ml 96% etanolu, a następnie zmiareczkowano 0,0413 M etanolowym roztworem KOH z fenoloftaleiną jako wskaźnikiem.

Oznaczenie dla każdego prepolimeru przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Liczbę kwasową wyznaczono z następującego wzoru:

$$\boldsymbol{LK = \frac{(V_s - V_{bl}) * C_{KOH}}{M_s}\ [\frac{mg_{KOH}}{g_{próbki}}]}$$

Gdzie:

- V_s – objętość KOH użyta do zmiareczkowania próbki badanej [ml]
- V_{bl} – objętość KOH użyta do zmiareczkowania próbki ślepej [ml]
- C_{KOH} – stężenie użytego roztworu KOH [mol*dm^{-3}]
- M_s – masa próbki [g]

Wartości liczb kwasowych badanych prepolimerów zamieszczono w pkt. 8.1.2.1.

7.2.2.2. Analiza GPC prepolimerów

Wykonano analizy otrzymanych prepolimerów z wykorzystaniem chromatografii żelowej w celu określenia ich wagowo średnich mas cząsteczkowych (M_w) oraz liczbowo średnich mas cząsteczkowych (M_n). Analizy przeprowadzono korzystając z chromatografu wyposażonego w pompę LC-20AD, degazer DGU-20A3R, zawór manualny z pętlą 25 µl, termostat CTO-10AS VP oraz detektor refraktometryczny RID-10A (Shimadzu). Rozdzielanie przeprowadzono na dwóch połączonych szeregowo kolumnach Phenogel 5 µm Linear (Phenomenex). Kolumny były termostatowane (40°C). Aparat pracował pod kontrolą oprogramowania LabSolutions LC (Shimadzu). Jako eluent oraz rozpuszczalnik próbek badanych i wzorców zastosowano THF cz. d. a. stabilizowany inhibitorem. Analizy prowadzono w układzie izokratycznym. Prędkość przepływu wynosiła 1 ml/min. Próbki sporządzano poprzez rozpuszczenie 2 mg prepolimeru w 2 ml THF, otrzymując stężenie 1 mg/ml. Do opracowania wyników wykorzystano metodę krzywej wzorcowej, wzorce użyte w kalibracji metody to polistyren o masach cząsteczkowych odpowiednio: 890 g/mol, 1820 g/mol, 6100 g/mol, 9730 g/mol, 130000 g/mol. Roztwory wzorców sporządzano analogicznie do roztworów próbek badanych. Otrzymane wartości zostały wyliczone automatycznie w programie LabSolutions LC. Uzyskaną krzywą wzorcową oraz wyniki dla badanych próbek zamieszczono w pkt. 8.1.2.2.

7.2.2.3. Analiza FIA-ESI-MS prepolimerów

Wszystkie eksperymenty FIA-ESI-MS przeprowadzono z użyciem pomp LC-20ADXR Nexera i dozownika model SIL-20ACXR sprzężonego z systemem spektrometrii mas LCMS-8030 (Shimadzu) z użyciem elektrorozpylania (ESI). Urządzenie pracowało pod kontrolą oprogramowania LabSolutions w wersji 5.91 SP1 (Shimadzu). Przed analizą prepolimery rozpuszczano w metanolu, otrzymując roztwory o stężeniu 1 mg/ml, a następnie przefiltrowano za pomocą filtra strzykawkowego (0,22 µm). Roztwory były nastrzykiwane do aparatu ESI-MS z pominięciem kolumny chromatograficznej. Objętość nastrzyku wynosiła 5 µl, a szybkość przepływu 0,5 ml/min dla wszystkich analiz. Analizy metodą FIA przeprowadzono w układzie izokratycznym. Fazami ruchomymi były: A - 2% kwas mrówkowy w wodzie demineralizowanej, oraz B - czysty metanol. Profil izokratyczny wynosił: 1%-A:99%-B. Widma masowe z dodatnią, jak i ujemną jonizacją uzyskano w systemie LC-MS i zarejestrowano za pomocą oprogramowania LabSolutions. Źródło jonizatora pracowało w trybie dodatnim (ESI+) i ujemnym (ESI-), przy napięciu elektrorozpylania 5 kV i temperaturze kapilary 250°C, przy użyciu N_2 jako gazu do rozpylania (15 l/min). Zbierano chromatogramy jonów molekularnych i widma masowe bez użycia fragmentacji. Spektrometr masowy pracował w trybie skanowania od m/z 10 do 2000 Da. Do widm pełnoskanowych stosowano czasy zatrzymania 50 ms/Da. Otrzymane widma oraz chromatogramy wraz z analizą składu oligomerów opisano w pkt. 8.1.2.3.

7.2.2.4. Analizy NMR prepolimerów w roztworze

W celu przeprowadzenia analizy strukturalnej prepolimerów wykonano widma NMR za pomocą spektrometru JNM-ECZR500 RS1 500 MHz (Jeol). Około 60 mg każdej próbki rozpuszczano w DMSO-d6 i poddawano analizie. Eksperymenty ^{1}H i ^{13}C NMR, ^{1}H-^{1}H COSY NMR, ^{13}C-^{1}H HSQC NMR i ^{13}C-^{1}H HMBC NMR przeprowadzono dla prepolimerów otrzymanych w stosunku molowym reagentów 1:1, dla prepolimerów 2:3 przeprowadzono tylko eksperymenty ^{1}H NMR. Na podstawie otrzymanych widm NMR przeprowadzono szczegółowe kalkulacje właściwości strukturalnych otrzymanych materiałów. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów oraz struktury otrzymanych prepolimerów przedstawiono w pkt. 8.1.2.4.

7.2.3. Sieciowanie materiałów kontrolnych cPAC

Proces sieciowania prowadzono poprzez wylewanie 30% roztworów prepolimerów na formy polipropylenowe lub polistyrenowe i utwardzanie ich przez 4 lub 10 dni w temperaturze 80°C, przy czym przez pierwszy dzień pod ciśnieniem atmosferycznym, a pozostałe dni pod zmniejszonym ciśnieniem (200 mbar). W ramach wspomnianych w pkt. 7.2.1.1 badań przesiewowych przeprowadzono także postpolimeryzację materiałów z 1,10-dekanodiolu oraz 1,12-dodekanodiolu. Badania te wykazały, że materiały wytworzone z dioli o długości łańcucha powyżej ośmiu atomów węgla są zbyt hydrofobowe aby komórki były w stanie ulec adhezji do ich powierzchni. Ponadto stwierdzono, że próbki przygotowane z prepolimerów otrzymanych w stosunku molowym reagentów 1:2 (CTR:diol) nie nadają się do dalszej charakterystyki ze względu na ich spontaniczny rozkład i cytotoksyczność małocząsteczkowych substancji uwalnianych z nich podczas kontaktu z medium hodowlanym (tzw. ekstraktów). Prowadzono również próby sieciowania w temperaturze 70°C oraz w interwałach czasowych 6 i 8 dni. Wykazano, że obniżenie temperatury postpolimeryzacji nie powodowało istotnych zmian we właściwościach otrzymanych poliestrów, podobnie jak wprowadzenie dodatkowych czasów sieciowania. Materiały usieciowane w toku prowadzonych reakcji przedstawiono poniżej (Tab. 6). Zostały one wykorzystane do dalszych badań służących określeniu ich właściwości.

Tab. 6. Zestawienie otrzymanych materiałów usieciowanych cPAC otrzymanych w wyniku przeprowadzonych reakcji sieciowania

	PHC		**POC**	
Czas sieciowania	1:1	2:3	1:1	2:3
4 dni	cPHC_1:1_4d	cPHC_2:3_4d	cPOC_1:1_4d	cPOC_2:3_4d
10 dni	cPHC_1:1_10d	cPHC_2:3_10d	cPOC_1:1_10d	cPOC_2:3_10d

7.2.4. Charakterystyka materiałów kontrolnych cPAC

7.2.4.1. Analiza materiałów kontrolnych cPAC za pomocą NMR dla próbek stałych

Do zobrazowania struktury materiałów usieciowanych zastosowano spektroskopię ssNMR. Analizy przeprowadzono w pracowni NMR Instytutu Chemii Makromolekularnej Czeskiej Akademii Nauk w Pradze. Badane próbki materiałów analizowano za pomocą spektrometru Avance III HD 500 MHz (Bruker). Częstotliwość wirowania pod kątem magicznym (MAS) dla próbki wynosiła 15 kHz. Zastosowane opóźnienie kolejnego cyklu wynosiło 15 sekund. Skala przesunięć na widmie ^{13}C NMR była kalibrowana glicyną jako zewnętrznym wzorcem (176,03 ppm). Aby skompensować ogrzewanie spowodowane tarciem wirujących próbek, wszystkie eksperymenty NMR były rejestrowane przy aktywnym chłodzeniu. Temperatura próbki była utrzymywana na poziomie 298 K, a kalibrację temperatury przeprowadzono na $Pb(NO_3)_2$ przy użyciu procedury kalibracyjnej opisanej w literaturze. Wyniki przedstawiono w pkt. 8.1.4.1.

7.2.4.2. Badania właściwości mechanicznych materiałów kontrolnych cPAC

W celu określenia właściwości mechanicznych otrzymanych materiałów wykonano dla nich pomiary wydłużenia względnego i wytrzymałości na rozciąganie. Pomiary przeprowadzono z użyciem maszyny wytrzymałościowej Zwick model 1445 (Zwick) zgodnie z normą ASTM D412 dla materiałów elastomerowych. Próbki w kształcie wiosełek (po pięć z każdego materiału) wycięto z większych arkuszy usieciowanych materiałów za pomocą odpowiedniego stempla, oczyszczono za pomocą metanolu, a ich wymiary zmierzono za pomocą suwmiarki przed próbą rozciągania. Prędkość rozciągania wynosiła 500 mm/min i została dobrana na podstawie podobnych pomiarów opisanych w literaturze [188]. Otrzymane wykresy ilustrujące wyniki przedstawiono w pkt. 8.1.4.2.

7.2.4.3. Pomiary twardości materiałów kontrolnych cPAC

Twardość usieciowanych polimerów mierzono zgodnie ze skalą ASTM D2240 typu A dla materiałów elastomerowych i kauczuków, przy użyciu durometru Shore'a typu A (INSIZE). Próbki badano wciskając w materiał stopę durometru z płaskim nosem, a wynik odczytywano po 15 sekundach. Obie strony próbki (górna i dolna powierzchnia) były badane w dwóch powtórzeniach. Otrzymane wykresy ilustrujące wyniki przedstawiono w pkt. 8.1.4.3.

7.2.4.4. Badania zgodności biologicznej materiałów kontrolnych cPAC

W celu oszacowania możliwości zastosowania wykonanych materiałów w inżynierii tkankowej, niezbędne stało się przeprowadzenie testów zgodności biologicznej. Badania przeprowadzono w Katedrze Biomateriałów i Kompozytów Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki AGH. Wykonano dwa rodzaje takich testów dla materiałów kontrolnych – badania żywotności i aktywności metabolicznej komórek w kontakcie z ekstraktami z materiałów oraz hodowle komórkowe w bezpośrednim kontakcie z powierzchnią materiału.

- **Przygotowanie i hodowla linii komórkowych**

Do przeprowadzonych testów wykorzystano komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej (ASC) wyizolowane z lipoaspiratu na podstawie zgody etycznej wydanej przez Komisję Etyczną w Szpitalu Na Bulovce w Pradze oraz za świadomą zgodą uzyskaną od pacjenta. Komórki hodowano w DMEM uzupełnionym 10% roztworem płodowej surowicy bydlęcej, 1% roztworem penicyliny-streptomycyny, 0,1% roztworem pirogronianu sodu, 0,1% roztworem aminokwasów podstawowych i roztworem 10 ng/mL podstawowego czynnika wzrostu fibroblastów (FGF-2). Hodowlę prowadzono w butelkach w temperaturze 37°C w inkubatorze z kontrolowaną wilgotnością i stężeniem CO_2 (5%) (Eppendorf). Komórki były wykorzystywane do 5 pasażu. Zawiesinę komórek uzyskiwano przez dodanie roztworu trypsyny/EDTA w roztworze buforowym PBS, a następnie wirowanie. Oderwane komórki liczono w hemocytometrze Bürkera, umieszczano w 96-dołkowych płytkach hodowlanych w gęstości $5x10^3$ komórek na dołek i inkubowano przez 24 godziny.

- **Hodowla komórkowa i badanie żywotności komórek w kontakcie z ekstraktami z materiałów cPAC**

Dla potrzeb określenia żywotności komórek przeprowadzono ich hodowlę w 10% ekstraktach próbek cPHC i cPOC polimeryzowanych przez 10 dni (tj. cPHC_1:1_10d, cPOC_1:1_10d, cPHC_2:3_10d, cPOC_2:3_10d). W celu uzyskania 10% ekstraktów z próbek ważono je i zanurzano w DMEM uzupełnionym 10% roztworem płodowej surowicy bydlęcej w stosunku 1:10. Następnie inkubowano je przez 24 godziny w temperaturze 37°C w inkubatorze z kontrolowaną wilgotnością i stężeniem CO_2 (5%) (Eppendorf). Przygotowane ekstrakty sterylizowano przy użyciu filtrów strzykawkowych 0,22 µm i poddawano dalszemu rozcieńczeniu w podłożu hodowlanym. Dodatkowo mierzono pH ekstraktów przed dodaniem ich do dołków. Po 24 godzinach hodowli ASC, podłoże wzrostowe w każdym dołku zastępowano 200 µl nierozcieńczonego lub rozcieńczonego ekstraktu odpowiedniej próbki cPHC lub cPOC w stosunku 1:2, 1:4, 1:8 i 1:16, natomiast świeże podłoże umieszczano w próbkach kontrolnych (puste dołki w płytce polistyrenowej zasiedlone komórkami, tzw. kontrola TCPS). Po 1, 3 i 7 dniach hodowli przeprowadzono testy żywotności komórek i aktywności metabolicznej. Żywotność komórek oceniano za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej przy użyciu mikroskopu odwróconego Axiovert 40 (Carl Zeiss). Przed obserwacją przeprowadzano barwienie live-dead, a żywe komórki kontrbarwiono na zielono kalceiną-AM, natomiast jądra martwych komórek kontrbarwiono na czerwono jodkiem propidyny. Oba barwniki fluorescencyjne dodawano do PBS w stężeniu 1 µl na każdy 1 ml roztworu buforowego PBS. Następnie do każdego dołka z ASC dodawano 100 µl uzyskanego roztworu. Aktywność metaboliczną komórek, która jest kolejnym wskaźnikiem żywotności komórek, a także proliferacji komórek, oceniano za pomocą odczynnika AlamarBlue (10% w/v roztwór soli sodowej resazuryny w DMEM). Odczynnik AlamarBlue mieszano z DMEM uzyskując 5% roztwór, którym zastępowano ekstrakty (oraz czyste medium w przypadku próby kontrolnej) w dołkach i inkubowano przez 4 godziny w temperaturze 37 °C. Redukcję odczynnika Alamar Blue mierzono fluorescencyjnie za pomocą czytnika płytek FLUOstar Omega (BMG Labtech). Długość fali wzbudzenia i emisji wynosiła odpowiednio 544 i 590 nm. Procentową redukcję resazuryny obliczano według wzoru:

$$\%\ \boldsymbol{Redukcja\ Resazuryny} = \frac{\boldsymbol{f_x - f_0}}{\boldsymbol{f_{100} - f_0}} \cdot \mathbf{100}\%$$

Gdzie:

- f_x – intensywność fluorescencji próbek badanych
- f_0 – intensywność fluorescencji próbek kontrolnych (czysty DMEM)
- f_{100} – intensywność fluorescencji resazuryny zredukowanej w 100% (odczynnik rozpuszczony w medium hodowlanym ogrzewany w 121°C przez 4 godziny)

Test AlamarBlue wykonywano w trzech powtórzeniach, a wyniki przedstawiono jako średnie ± odchylenie standardowe. Analizy statystyczne przeprowadzono w oprogramowaniu OriginLab. W celu obliczenia różnic istotnych statystycznie na poziomie $p < 0,001$, $p < 0,01$ i $p < 0,05$ zastosowano jednokierunkowy test ANOVA z porównaniem średnich metodą „post hoc" Tukey'a. Wyniki przeprowadzonych badań w formie zdjęć i wykresów znajdują się w pkt. 8.1.4.4.

- **Badanie liczebności i morfologii komórek hodowanych w kontakcie bezpośrednim z materiałami cPAC**

Najbardziej obiecujące polimery, jak wykazały badania *in vitro* w ekstraktach, tj. cPHC_2:3_10d i cPOC_2:3_10d, wykorzystano do hodowli komórek w bezpośrednim kontakcie z ASC. Próbki przygotowano w sposób opisany wcześniej, porcje prepolimerów wlewano do dołków płytek 96-dołkowych (Nunclon) i sieciowano bezpośrednio w dołkach przez 10 dni. Przed eksperymentem hodowli komórkowej materiały sterylizowano 70% etanolem i światłem UV przez 30 min, a na koniec dokładnie przemywano kilkakrotnie DMEM. Następnie na próbki wylewano zawiesinę komórkową ($5x10^3$ komórek na dołek), a komórki hodowano w temperaturze 37°C w inkubatorze z kontrolowaną wilgotnością i stężeniem CO_2 (5%) (Eppendorf). Po 1, 3 i 7 dniach hodowli obserwowano natywne komórki pod epifluorescencyjnym mikroskopem optycznym Olympus IX 51 z kamerą cyfrową DP 70 (Olympus). Dodatkowo, komórki po 7 dniach hodowli utrwalano w 2% paraformaldehydzie i barwiono hematoksyliną i eozyną dla lepszej wizualizacji morfologii komórek. Średni obszar komórki, stosunek aspektu komórki (długość: szerokość) i średnia liczba komórek w dniu 1 i 3 zostały obliczone za pomocą oprogramowania ImageJ. Analiza statystyczna została przeprowadzona zgodnie z opisem powyżej. Wyniki przeprowadzonych badań w formie zdjęć i wykresów znajdują się w pkt. 8.1.4.4.

7.3. Materiały cPAC modyfikowane

7.3.1. Modyfikacja materiałów cPAC

7.3.1.1. Modyfikacja materiałów w masie

W celu otrzymania modyfikowanych materiałów cPAC wykorzystano wodne roztwory L-glutationu o różnych stężeniach (Tab. 7). Roztwory sporządzono poprzez odważenie na wadze analitycznej odpowiednich ilości GSH, przeniesienie do kolb miarowych, dolanie wody do kreski i rozpuszczenie w myjce ultradźwiękowej. Tak otrzymane roztwory przechowywano w lodówce i wykorzystywano do przygotowywania materiałów modyfikowanych.

Tab. 7. Oznaczenia i stężenia roztworów GSH używanych do modyfikacji materiałów cPAC

Oznaczenie roztworu	Stężenie roztworu [mg/ml]
G0,4	50
G0,8	100

Materiały modyfikowane przygotowano w formach polipropylenowych. Najpierw naniesiono 2,5 ml wodnego roztworu modyfikatora o odpowiednim stężeniu. Następnie do formy wlewano 100 ml 30% etanolowego roztworu danego prepolimeru, mieszano delikatnie i wstawiano do suszarki do usieciowania. Tak dobrane ilości roztworów prepolimerów i modyfikatora pozwalały na otrzymanie końcowego stężenia modyfikatora w materiale na poziomie odpowiednio 0,4 i 0,8%. Warunki oraz czasy sieciowania były identyczne, jak w przypadku materiałów kontrolnych (temperatura 80°C, czas sieciowania 4 i 10 dni, pierwszy dzień ciśnienie atmosferyczne, następne dni 200 mbar). Materiały sieciowane w płytkach hodowlanych przygotowywano analogicznie odpowiednio zmniejszając objętości modyfikatora i prepolimeru i sieciowano w takich samych warunkach, jak materiały w formach polistyrenowych. W tabeli 8 przedstawiono wszystkie otrzymane materiały usieciowane. Zostały one wykorzystane do przeprowadzenia ich pełnej charakterystyki opisanej poniżej.

Tab. 8. Zestawienie próbek materiałów modyfikowanych cPAC otrzymanych w wyniku przeprowadzonych reakcji

Modyfikator	PHC		POC	
	1:1	2:3	1:1	2:3
Czas sieciowania 4 dni				
G0,4	cPHC_1:1_4d_G0,4	cPHC_2:3_4d_G0,4	cPOC_1:1_4d_G0,4	cPOC_2:3_4d_G0,4
G0,8	cPHC_1:1_4d_G0,8	cPHC_2:3_4d_G0,8	cPOC_1:1_4d_G0,8	cPOC_2:3_4d_G0,8
Czas sieciowania 10 dni				
G0,4	cPHC_1:1_10d_G0,4	cPHC_2:3_10d_G0,4	cPOC_1:1_10d_G0,4	cPOC_2:3_10d_G0,4
G0,8	cPHC_1:1_10d_G0,8	cPHC_2:3_10d_G0,8	cPOC_1:1_10d_G0,8	cPOC_2:3_10d_G0,8

7.3.2. Charakterystyka materiałów modyfikowanych cPAC

7.3.2.1. Analiza materiałów modyfikowanych cPAC za pomocą NMR dla próbek stałych

Pomiary widm za pomocą spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego z ciała stałego zostały zarejestrowane w identyczny sposób i w identycznych warunkach, jak w przypadku widm dla materiałów kontrolnych. Procedurę szczegółowo opisano w punkcie 7.2.4.1. Wyniki przedstawiono w punkcie 8.2.2.1.

7.3.2.2. Analiza właściwości spektroskopowych materiałów modyfikowanych cPAC

- **Pomiary widm emisji**

Otrzymane materiały poddano charakterystyce spektroskopowej w celu potwierdzenia obecności cząsteczek fluoroforu w strukturze materiału, jak również, aby oszacować zależność intensywności fluorescencji od ilości dodanego modyfikatora. Badania przeprowadzono z użyciem spektrofluorymetru RF-6000 (Shimadzu) pod kontrolą oprogramowania LabSolutionsRF z zamontowaną przystawką do badania emisji próbek stałych. Z każdego materiału wybito za pomocą stempla fragment w kształcie koła o średnicy 12 mm. Pomiar

widm emisji przeprowadzono w zakresie długości fali emisji 400-600 nm przy długości fali wzbudzenia 355 nm. Szczeliny dla emisji i wzbudzenia ustawiono na 5 nm. Zarejestrowano również mapy 3D fluorescencji dla materiałów cPHC_1:1_10d. Zakres długości fali wzbudzenia ustawiono na 200-400 nm, zakres długości fali emisji wynosił 300-600 nm, natomiast szczeliny dla emisji i wzbudzenia ustawiono na 3 nm. Otrzymane widma w formie wykresów przedstawiono w pkt. 8.2.2.2.

7.3.2.3. Analiza właściwości przeciwutleniających materiałów modyfikowanych cPAC

W celu wykazania właściwości przeciwutleniających otrzymanych materiałów wykonano test z użyciem rodnika DPPH. W tym celu sporządzono jego roztwór przez rozpuszczenie 15,8 mg substancji w 100 ml 99,5% metanolu.

Tab. 9. Rozmieszczenie próbek materiałów kontrolnych i modyfikowanych cPAC na płytkach 24 dołkowych w trakcie inkubacji w badaniu właściwości przeciwutleniających

Dołki	1-3	4-6
	Płytka 1	
A	cPHC_1:1_4d	cPHC_1:1_4d_G0,4
B	cPHC_1:1_4d_G0,8	
C	cPHC_1:1_10d	cPHC_1:1_10d_G0,4
D	cPHC_1:1_10d_G0,8	
	Płytka 2	
A	cPHC_2:3_4d	cPHC_2:3_4d_G0,4
B	cPHC_2:3_4d_G0,8	
C	cPHC_2:3_10d	cPHC_2:3_10d_G0,4
D	cPHC_2:3_10d_G0,8	
	Płytka 3	
A	cPOC_1:1_4d	cPOC_1:1_4d_G0,4
B	cPOC_1:1_4d_G0,8	
C	cPOC_1:1_10d	cPOC_1:1_10d_G0,4
D	cPOC_1:1_10d_G0,8	
	Płytka 4	
A	cPOC_2:3_4d	cPOC_2:3_4d_G0,4
B	cPOC_2:3_4d_G0,8	
C	cPOC_2:3_10d	cPOC_2:3_10d_G0,4
D	cPOC_2:3_10d_G0,8	

Z każdego materiału wybito za pomocą stempla po 3 próbki w kształcie koła o średnicy 12 mm, które następnie umieszczono na przeźroczystej płytce 24-dołkowej (Thermo Scientific). Jako próbę kontrolną zastosowano próbki z materiałów niemodyfikowanych. Próbki materiałów zalano 500 µl roztworu DPPH i 100 µl metanolu. Tak przygotowane płytki (Tab. 9) inkubowano w ciemnym miejscu przez 2 godziny. Po zakończeniu inkubacji z każdego dołka pobrano po 200 µl roztworów na płytkę 96-dołkową (VWR) i wykonano analizę absorpcji przy długości fali 517 nm za pomocą czytnika płytek Infinite 200 PRO (Tecan). Otrzymane wyniki w formie wykresów przedstawiono w pkt. 8.2.2.3.

7.3.2.4. Badania mechaniczne materiałów modyfikowanych cPAC

Dla otrzymanych próbek materiałów modyfikowanych cPAC wykonano badania mechaniczne, polegające na pomiarze wartości wydłużenia względnego i pomiarze sił rozciągających. Badania wykonano według identycznego protokołu, jak dla materiałów kontrolnych. Sposób przeprowadzenia pomiarów opisano szczegółowo w pkt. 7.2.4.2. Wyniki zostały przedstawione w pkt. 8.2.2.3.

7.3.2.5. Pomiary twardości materiałów modyfikowanych cPAC

Dla materiałów modyfikowanych cPAC wykonano także pomiary twardości metodą Shore'a. Protokół przeprowadzania badań był taki sam, jak dla materiałów kontrolnych i został szczegółowo przedstawiony w pkt. 7.2.4.3. Wyniki zamieszczono w pkt. 8.2.2.4.

7.3.2.6. Badania zgodności biologicznej materiałów modyfikowanych cPAC

W celu potwierdzenia korzystnych parametrów biozgodności oraz eliminacji potencjalnej cytotoksyczności otrzymanych materiałów, przeprowadzono komórkowe testy biokompatybilności materiałów, polegające na inkubacji komórek w bezpośrednim kontakcie z poliestrem. Tak, jak w przypadku materiałów kontrolnych i fluoroforu, badania przeprowadzono w Katedrze Biomateriałów i Kompozytów Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki AGH.

- **Przygotowanie hodowli komórkowych stosowanych w analizach**

Do badań wykorzystano trzy linie komórek wywodzące się z tkanek ludzkich: ASC – ludzkie komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej, HUVEC – ludzkie komórki śródbłonka żyły pępowinowej i VSMC – komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Hodowle komórek prowadzono w mediach hodowlanych, specyficznych dla danych komórek. Komórki ASC oraz VSMC hodowano w DMEM (PAN Biotech) z dodatkiem 10% roztworu surowicy bydlęcej (Biowest LLC) oraz, w przypadku ASC z dodatkiem roztworu 10 ng/ml podstawowego czynnika wzrostu fibroblastów FGF-2 (GenScript). Dla HUVEC wykorzystano medium EGM-2 (PromoCell) wzbogacone suplementami FCS-10, hEGF-2.5, HC-100, VegF-0.25, hBFGF-5, R3 IGF-1, AA-500 oraz Hep-11.25 (PromoCell). Hodowlę prowadzono w butelkach hodowlanych w temperaturze 37°C w inkubatorze z kontrolowaną wilgotnością i stężeniem CO_2 (5%) (Eppendorf). Komórki były wykorzystywane do 5 pasażu. Zawiesinę komórek uzyskiwano przez dodanie roztworu trypsyny/EDTA w roztworze buforowym PBS, a następnie wirowanie.

- **Hodowla komórek w bezpośrednim kontakcie z materiałami modyfikowanymi PAC**

Materiały kontrolne i modyfikowane do badań komórkowych zostały przygotowane według protokołu opisanego powyżej w 96 dołkowych płytkach polistyrenowych (Nunclon). Badano tylko materiały sieciowane przez 10 dni w obu stosunkach molowych z zastosowaniem obu roztworów modyfikujących. Przygotowane materiały były dwukrotnie sterylizowane za pomocą 70% etanolu oraz przy użyciu lampy UV w cyklach 30 minutowych, następnie dwukrotnie przemyto je medium hodowlanym. Na tak przygotowane materiały naniesiono zawiesiny komórek w ilości 5000 komórek/dołek w 200 µl medium. W przypadku komórek ASC po 4 dniach wymieniono medium hodowlane na medium różnicujące. Inkubacje prowadzono przez 7 dni. W celu poprawienia właściwości wizualnych komórek, w 7 dniu wykonano barwienie komórek hematoksyliną i eozyną, następnie obserwowano komórki pod epifluorescencyjnym mikroskopem optycznym Olympus IX 51 z kamerą cyfrową DP 70 (Olympus). Wykonane zdjęcia preparatów zamieszczono i opisano w punkcie 8.2.2.6.

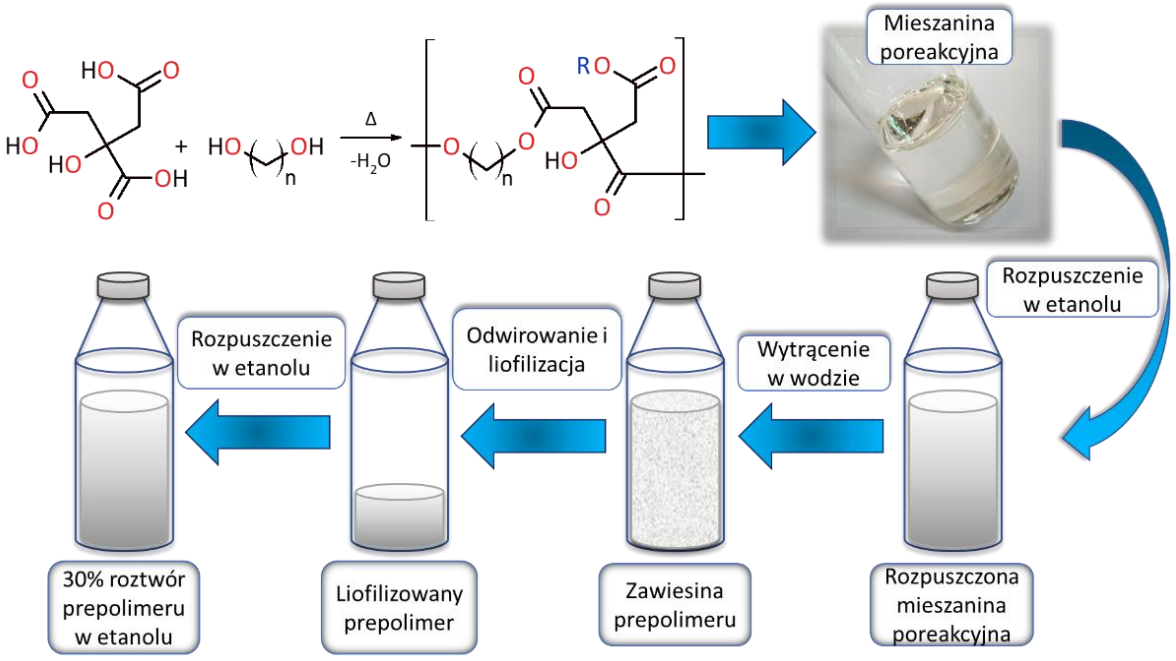
8. Wyniki i dyskusja

8.1. Materiały PAC kontrolne

8.1.1. Synteza prepolimerów

8.1.1.1. Właściwości otrzymanych prepolimerów

W wyniku przeprowadzonych badań otrzymano szereg różnych prepolimerów PAC. Na rysunku 28 przedstawiono szczegółowo sposób oczyszczania otrzymanej mieszaniny poreakcyjnej. Prepolimery PAC są produktem kondensacji CTR i odpowiedniego diolu, otrzymywanym zwykle w postaci przezroczystych, bezwonnych i bezbarwnych syropów (Rys. 28). Chociaż zarówno CTR, jak i diol stosowane w syntezie prepolimeru PAC są łatwo rozpuszczalne w wodzie, tak produkt końcowy wykazuje odmienne właściwości. Jest to spowodowane postępem wzrostu łańcucha prepolimeru w czasie reakcji, co prowadzi do zużycia grup hydrofilowych w obrębie substratów, a to z kolei powoduje wzrost hydrofobowości formułowanych makrocząsteczek. Z drugiej strony, otrzymane prepolimery są dobrze rozpuszczalne w alkoholu etylowym i innych polarnych rozpuszczalnikach organicznych, co wskazuje na małe średnie ciężary cząsteczkowe oraz mały udział rozgałęzionych oligomerów.



Rys. 28. Schemat syntezy i oczyszczania prepolimerów PAC

Po oczyszczeniu (Rys. 28) klarowne roztwory etanolowe mogą zostać poddane procesowi sieciowania. Niektóre oczyszczone próbki pozostawiono nierozpuszczone, prepolimery te zostały wykorzystane do dalszych badań przedstawionych poniżej. Podczas pierwszych prób otrzymywania prepolimerów zgodnie z protokołem opisanym w literaturze (kolba okrągłodenna z mieszadłem mechanicznym, dwie temperatury prowadzenia reakcji) zauważono jednak liczne problemy, które uniemożliwiały przeprowadzenie powtarzalnej reakcji syntezy, w której otrzymany produkt charakteryzował się takimi samymi właściwościami [188]. Postanowiono o całkowitej rewizji protokołu literaturowego i wprowadzeniu modyfikacji pozwalających na zniwelowanie zaobserwowanych niekorzystnych zjawisk.

W tym miejscu należy wspomnieć o badaniach wstępnych, służących doborowi odpowiedniego diolu do otrzymywania materiałów PAC. We wczesnych etapach pracy planowano opracowywanie materiałów na bazie czterech dioli – 1,6-heksanodiolu, 1,8-oktanodiolu, 1,10-dekanodiolu oraz 1,12-dodekanodiolu. Przeprowadzono syntezy prepolimerów z ww. dioli oraz wykonano wstępną charakterystykę w celu określenia ich dalszej stosowalności. Przygotowano także próbne materiały usieciowane, które również zbadano pod kątem ich wytrzymałości mechanicznej i charakterystyki biologicznej. Przeprowadzone analizy wykazały, że pomimo zadowalających właściwości prepolimerów z dioli o dłuższych niż 8 łańcuchach alkilenowych, usieciowane materiały stanowiły nieprzyjazne środowisko dla wzrostu i proliferacji komórek. Zdecydowano, że w toku dalszych badań będą wykorzystywane wyłącznie prepolimery i materiały otrzymywane z 1,6-heksanodiolu i 1,8-oktanodiolu (Rys. 29).

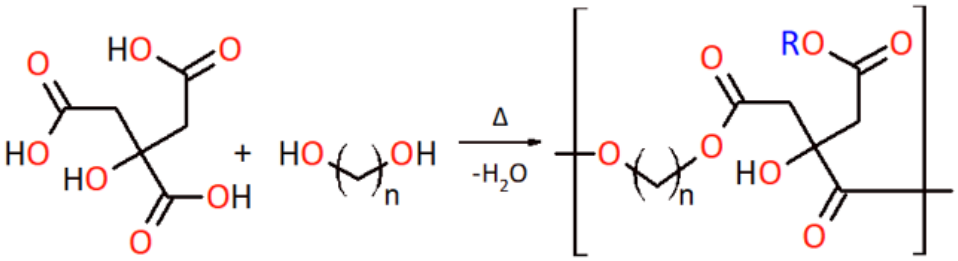
Wyjaśnienia wymaga również wybór stosunków molowych reagentów użytych do syntezy. Prepolimery otrzymywano w stosunkach molowych 1:1, 2:3 oraz 1:2 (CTR:diol). Dobór takich udziałów substratów podyktowany był chęcią przetestowania materiałów innych, niż powszechnie opisywane w literaturze materiały otrzymywane w stosunku molowym reagentów 1:1. Należy tu podkreślić, że stosunek ten odpowiada równomolowemu udziałowi grup funkcyjnych w materiale. CTR ma trzy grupy karboksylowe i jedną grupę hydroksylową. Grupa hydroksylowa w CTR, przez swoją bardzo niską reaktywność nie bierze jednak udziału w tworzeniu wiązań estrowych co powoduje, że w przypadku udziału substratów 1:1 w polimerze występuje nadmiar niezwiązanych grup -COOH. Może to przekładać się na wzrost

kwasowości, a więc także na właściwości biologiczne otrzymywanych materiałów. Skompensowanie wspomnianego nadmiaru grup karboksylowych zapewnia dopiero zastosowanie nadmiaru molowego diolu, a więc stosunku molowego reagentów 2:3 (CTR:diol). Przeprowadzono także wstępne badania dla prepolimerów zawierających znaczny nadmiar grup hydroksylowych (stosunek molowy reagentów 1:2), jednak zarówno prepolimery, jak i materiały usieciowane otrzymane w tym stosunku molowym ulegały spontanicznej dekompozycji niezależnie od użytego diolu. Zadecydowano więc o wykorzystaniu w toku dalszych badań dwóch stosunków molowych reagentów - 1:1 i 2:3 (CTR:diol).

8.1.1.2. Modyfikacje parametrów syntezy

Do głównych problemów zaobserwowanych podczas syntezy z użyciem metody literaturowej należą lokalne niedogrzania i przegrzania mieszaniny reakcyjnej. W wyniku tych zdarzeń może dojść zarówno do zmniejszenia wydajności reakcji, jak i do termicznego rozkładu CTR. Degradacja termiczna CTR skutkuje powstaniem w mieszaninie niejednorodnych makrocząsteczek, zawierających w swoich łańcuchach zarówno reszty cytrynianowe, jak i pochodzące od innych kwasów organicznych, powstających w wyniku rozkładu CTR, takie jak itakoniany, citrakoniany, akonitany czy mezakoniany, których obecność może znacząco wpływać na właściwości mechaniczne i fizykochemiczne materiałów usieciowanych otrzymywanych z takich prepolimerów [178]. Niedogrzania mieszaniny reakcyjnej skutkują z kolei nierównomiernym stopniem przereagowania substratów w mieszaninie, co przekłada się na zmniejszenie końcowej wydajności reakcji, a to z kolei powoduje konieczność przeprowadzenia większej ilości syntez i zwiększonego zużycia substratów. Do najbardziej prawdopodobnych źródeł powyższych problemów związanych z niedogrzaniem i przegrzaniem należą: niejednorodna dystrybucja ciepła, niedostateczne wymieszanie oraz wysoka temperatura stosowana w początkowych etapach reakcji otrzymywania prepolimeru PAC. Ponadto zastosowanie podwyższonej temperatury (160°C) do wstępnego topienia substratów wraz z niewłaściwym doborem naczyń reakcyjnych i urządzeń mieszających znacznie sprzyja termicznemu rozkładowi CTR. Zastosowano więc modyfikacje protokołu syntezy, zarówno pod względem wprowadzenia kontroli procesu, doboru temperatur reakcji, jak i stosowanych naczyń reakcyjnych i systemów mieszających.

- **Kontrola procesu syntezy prepolimerów PAC**



Rys. 29. Schemat reakcji syntezy prepolimerów PAC. n = 6 lub 8, R – atom wodoru lub łańcuch alkilenowy

Dla opracowania najbardziej efektywnych warunków syntezy prepolimerów PAC kluczowe znaczenie miał wybór prostego parametru reakcji, który mógłby być bezpośrednio skorelowany z jej przebiegiem. Mając na uwadze, że prepolimer PAC wytwarzany jest w reakcji polikondensacji, w której na jedno wiązanie kowalencyjne utworzone między grupą karboksylową CTR a grupą hydroksylową w diolu uwalniana jest jedna cząsteczka wody (Rys. 29). Uznano, że postęp reakcji można w przybliżeniu określić poprzez pomiar masy wody, która została usunięta z mieszaniny reakcyjnej. W tym celu często stosuje się łapacze pary wodnej, które jednak w przypadku protokołów syntezy opisanych w niniejszej pracy byłyby niepraktyczne ze względu na dużą liczbę małych naczyń używanych w syntezach. W związku z tym, zakładając, że para wodna jest jedynym produktem gazowym powstającym podczas syntezy prepolimerów PAC, zdecydowano się wykorzystać ubytek masy reakcji jako wskaźnik ilości wydzielanej wody. Dlatego też szacowany stopień konwersji (α) substratów do danego prepolimeru można było w prosty sposób obliczyć poprzez zważenie fiolek wypełnionych reagentami przed i po reakcji (Tab. 10), posługując się wzorem:

$$\alpha = \left(\frac{(m_{przed} - m_{po})}{M_{H_20}}\right) * \frac{1}{n_c} * 100$$

Gdzie:

- m_{przed} – masa fiolki wraz z substratami i elementem mieszającym przed reakcją
- m_{po} - masa fiolki wraz z substratami i elementem mieszającym po reakcji
- M_{H_2O} – masa molowa wody = 18 g/mol
- n_c – sumaryczna ilość moli substratów w fiolce
- 100 – mnożnik procentowy

Tab. 10. Tabela z masami fiolek „przed i po" jednej z reakcji syntezy prepolimeru wraz z wyliczonymi stopniami konwersji. Dla każdej serii wykonanych reakcji sporządzono analogiczne tabele, pozwalające na dokonanie obliczeń

Nazwa	M_{przed} [g]	M_{po} [g]	Ubytek wody [mol]	n_c [mol]	Stopień konwersji
PHC_1:1	45,4785	44,2023	0,0709	0,1289	52,38
PHC_2:3	50,0213	48,6990	0,0735	0,1354	54,27
POC_1:1	47,7886	46,5663	0,0679	0,1182	57,44
POC_2:3	45,6340	44,3920	0,0690	0,1215	56,78

- **Dobór naczyń reakcyjnych i sposobu mieszania**

Rys. 30. Naczynie reakcyjne stosowane do otrzymywania prepolimerów PAC z mieszaniną poreakcyjną

W literaturze prepolimery PAC wytwarza się poprzez ogrzewanie reagentów w kolbach okrągłodennych w łaźni z olejem mineralnym lub w kolbach Erlenmeyera przy użyciu gorącej płyty. Ze względu na dużą lepkość, której towarzyszy stosunkowo duża objętość mieszaniny reakcyjnej, efekty lokalnego przegrzania, jak i niedogrzania mieszaniny reakcyjnej są nieuniknione. W związku z tym, zamiast tego zdecydowano o zastosowaniu czterech mniejszych cylindrycznych naczyń reakcyjnych (25 ml każde) umieszczonych w dedykowanym bloku grzejnym, aby otrzymać jedną partię prepolimerów PAC (Rys. 30). W ten sposób, poprzez zmniejszenie objętości reakcji i zapewnienie bardziej jednorodnej dystrybucji ciepła możliwe było zminimalizowanie lokalnych wahań temperatury i niepożądanych efektów związanych z niedostatecznym wymieszaniem reagentów. Ponadto zaobserwowano wyraźny wpływ wydajności mieszania na stopień całkowitej wydajności reakcji. Dla reakcji

prowadzonych z użyciem mieszadeł o różnych wymiarach różnice w końcowej wydajności reakcji wynosiły do 40% (mieszadło cylindryczne 2,0 x 0,6 cm ~20%, mieszadło cylindryczne 2,5 x 0,8 cm ~60%). Dlatego też, aby móc zbadać inne parametry reakcji, wszystkie syntezy prowadzono z użyciem identycznych mieszadeł przy tej samej prędkości obrotowej 100 obr/min, kontrolowanej na płycie grzewczej wyposażonej w mieszadło. W rzadkich przypadkach, gdy ubytek masy danej reakcji znacznie odbiegał od pozostałych reakcji z badanej partii, możliwe było jej wyeliminowanie, nie wpływając na ogólną jakość końcowej partii zsyntetyzowanego prepolimeru PAC. Ostatecznie, po porównaniu szacowanej konwersji reagentów w każdym z naczyń reakcyjnych, możliwe było ich połączenie i oczyszczenie jako jednego produktu danej syntezy.

- **Dobór właściwej temperatury reakcji**

Wyeliminowanie problemu mieszania pozwoliło na określenie wpływu temperatury reakcji na wydajność procesu. W niniejszej pracy do syntezy prepolimerów PAC zastosowano tylko jedną temperaturę reakcji (140°C), co stoi w sprzeczności z dwiema temperaturami opisanymi w literaturze (160°C przez pierwsze minuty reakcji, a następnie schłodzenie do 140°C). Wynika to z faktu, że temperatury stosowane w opisach literaturowych nie poprawiają wydajności reakcji i utrudniają dokładną kontrolę procesu. Utrzymanie jednej, niższej temperatury przez cały czas prowadzenia reakcji nie tylko umożliwiło lepszą kontrolę, ale wpłynęło także na ograniczenie skutków lokalnych przegrzań.

Przedstawione w niniejszej pracy modyfikacje protokołu syntezy PAC pozwoliły rozwiązać opisane powyżej problemy i opracować optymalne warunki syntezy. Biorąc pod uwagę otrzymane wyniki stopni konwersji i wydajności (Tab. 11), wprowadzone modyfikacje protokołu syntezy są niezbędne do otrzymania homogenicznych prepolimerów o wyższych stopniach konwersji i wydajności reakcji, w porównaniu z prepolimerami otrzymanymi bez odpowiedniej kontroli temperatury i mieszania. Potwierdzają to również wartości wydajności i stopni konwersji otrzymane dla prepolimerów wykonanych w dłuższych czasach reakcji, dla których zaobserwowano brak istotnego wpływu wydłużenia czasu prowadzenia syntezy na poprawę stopnia konwersji i końcowej wydajności. W przypadku prepolimeru na bazie oktanodiolu zaobserwowano znacznie zwiększoną wydajność reakcji (~80%) w porównaniu z odpowiednikami na bazie heksanodiolu (~60%).

Można to tłumaczyć większą hydrofilowością krótszego łańcucha heksametylenowego, skutkującą zwiększoną rozpuszczalnością w wodzie małocząsteczkowych oligomerów PHC, przyczyniającą się do ich usuwania z końcowego prepolimeru w procesie oczyszczania. Co ciekawe, równomolowy stosunek reaktywnych grup karboksylowych i hydroksylowych w prepolimerach wytworzonych z reagentów zmieszanych w stosunku molowym 2:3 skutkował nieznacznie większą wydajnością reakcji niż w przypadku prepolimerów PAC w stosunku 1:1 ze względu na zwiększone prawdopodobieństwo tworzenia wiązań estrowych przez wszystkie grupy karboksylowe. Zaobserwowane na tym etapie prowadzenia badań korelacje pomiędzy stosunkami molowymi i zastosowanymi diolami w prepolimerach znalazły swoje odzwierciedlenie w trakcie charakterystyki prepolimerów, jak również będą miały istotne przełożenie na właściwości otrzymanych z nich usieciowanych poliestrów.

Tab. 11. Wpływ zastosowanych modyfikacji protokołu syntezy na otrzymywanie prepolimerów PAC

Prepolimer	Czas reakcji [min]	Stopień konwersji [%]	Wydajność końcowa [%]
PHC_1:1[a]	40	59,66	58,05
PHC_2:3[a]	40	56,40	61,45
POC_1:1[a]	40	60,54	77,75
POC_2:3[a]	40	55,51	79,73
POC_2:3[a]	60	68,32	81,83
POC_2:3[a]	90	76,60	82,09
PHC_1:1[b]	40	30,72	22,61
PHC_2:3[b]	40	28,16	15,47
POC_1:1[b]	40	31,60	20,43
POC_2:3[b]	40	22,68	17,03

a: Temperatura syntezy 140°C z kontrolą mieszania (100 obr/min)
b: Temperatura syntezy 140°C bez właściwego wymieszania

8.1.2. Charakterystyka prepolimerów

8.1.2.1. Wyniki analizy liczby kwasowej prepolimerów

Pierwszym krokiem na drodze charakterystyki prepolimerów PAC było oznaczenie ich liczby kwasowej. Kwasowość prepolimerów, która przekłada się wprost na ilość niezwiązanych grup karboksylowych w ich strukturze ma kluczowe znaczenie w kontekście określania

powtarzalności prowadzonych syntez, przewidywania sposobu sieciowania oraz rzuca pierwsze podejrzenia na możliwe różnice w biokompatybilności otrzymanych materiałów. Wyniki analizy liczby kwasowej przeprowadzonej dla prepolimerów PAC zamieszczono tabeli poniżej.

Tab. 12. Wartości wyników oznaczania liczby kwasowej dla badanych prepolimerów. **LK_{max}:** Maksymalna liczba kwasowa prepolimeru (zerowe wysycenie grup karboksylowych diolem), **LK_{min}:** Minimalna liczba kwasowa prepolimeru (100% wysycenia grup karboksylowych diolem)

Prepolimer	mmol COOH/ $g_{próbki}$	mg KOH/ $g_{próbki}$	LK_{max} [mg KOH /$g_{próbki}$]	LK_{min} [mg KOH /$g_{próbki}$]	Stopień konwersji (z LK) [%]
PHC_1:1[a]	3,34 ± 0,01	187 ± 0,36	548	183	99
PHC_2:3[a]	2,56 ± 0,02	144 ± 1,22	455	0	70
POC_1:1[a]	3,24 ± 0,01	181 ± 0,24	497	166	97
POC_2:3[a]	2,43 ± 0,01	137 ± 0,79	410	0	66
POC_2:3[a]	2,21 ± 0,08	124 ± 4,60	410	0	70
POC_2:3[a]	1,65 ± 0,05	93 ± 2,59	410	0	77
PHC_1:1[b]	7,24 ± 0,21	406 ± 11,50	548	183	59
PHC_2:3[b]	6,02 ± 0,04	338 ± 2,13	455	0	26
POC_1:1[b]	5,10 ± 0,02	286 ± 1,31	497	166	76
POC_2:3[b]	6,06 ± 0,02	340 ± 0,88	410	0	17

a: Temperatura syntezy 140°C z kontrolą mieszania (100 obr/min) **b:** Temperatura syntezy 140°C bez właściwego wymieszania

Na podstawie znajomości ilości moli składników w naważkach do syntez oraz stosunków molowych reagentów wyliczono maksymalne i minimalne wartości LK dla danych prepolimerów. Maksymalna wartość liczby kwasowej liczona była dla zerowego stopnia konwersji reagentów – odpowiada ona wartości LK czystego CTR w ilości użytej do reakcji. Natomiast minimalna wartość LK była liczona w oparciu o założenie 100% przereagowania diolu – w takiej sytuacji dla prepolimerów otrzymanych w ilościach substratów 2:3 wynosi ona zero, a dla prepolimerów otrzymanych w stosunkach molowych 1:1 (CTR:diol), gdzie niezwiązane grupy karboksylowe występują w przewadze, jest ona równa wartości kwasowości owego nadmiaru grup, który pozostałby po reakcji całości grup hydroksylowych

alkilenu z resztami cytrynianowymi. Stopnie konwersji obliczono na podstawie znajomości liczb kwasowych badanych próbek, oraz wartości LK_{max} i LK_{min}, zakładając, że LK_{max} odpowiada wartości zerowego stopnia konwersji, natomiast LK_{min} stanowi 100%:

$$\boldsymbol{\alpha_{LK} = \frac{1 - (LK_{próbki} - LK_{min})}{LK_{max}} * 100\%}$$

Gdzie:

- α_{LK} – stopień konwersji z LK
- $LK_{próbki}$ – wartość LK zmierzona dla badanej próbki
- LK_{max} – maksymalna LK odpowiadająca braku wysycenia grup -COOH
- LK_{min} – minimalna LK odpowiadająca całkowitemu wysyceniu grup -COOH
- 100% - mnożnik

Podobnie, jak to miało miejsce w przypadku analizy optymalnych warunków syntezy, podczas analizy wyników LK zauważono bardzo zbliżone zależności między prepolimerami. Zaobserwowano wyraźne zmiany wartości kwasowości pomiędzy prepolimerami otrzymanymi z różnych dioli i przy zastosowaniu różnych stosunków molowych reagentów. Wyższą kwasowość prepolimerów PHC w porównaniu z prepolimerami POC można przypisać obecności krótszych segmentów alkilenowych w strukturze chemicznej (segmenty heksametylenowe w PHC wobec oktametylenowych w POC). W związku z tym gęstość molowa wolnych grup karboksylowych w PHC w danej objętości powinna być większa niż w prepolimerach POC (przy założeniu równej reaktywności dioli użytych w syntezie), co ma miejsce w badanych próbkach. Natomiast prepolimery otrzymane w stosunku molowym 2:3 (CTR:diol) charakteryzowały się niższą wartością liczby kwasowej niż te zsyntetyzowane w równomolowych ilościach reagentów. Fakt ten jest bezpośrednio związany ze zwiększonym prawdopodobieństwem tworzenia się wiązania estrowego pomiędzy wszystkimi trzema grupami karboksylowymi pochodzącymi od cząsteczek cytrynianowych a grupami hydroksylowymi obecnymi w łańcuchach alkilenowych.

Obliczając minimalne i maksymalne wartości liczby kwasowej dla prepolimerów można było oszacować stopnie konwersji grupy karboksylowej w syntetyzowanych prepolimerach. Uzyskane wartości (~99% dla prepolimeru syntetyzowanego w stosunku molowym 1:1 (CTR:diol) oraz ~70% dla odpowiednich prepolimerów otrzymanych w stosunku molowym 2:3)

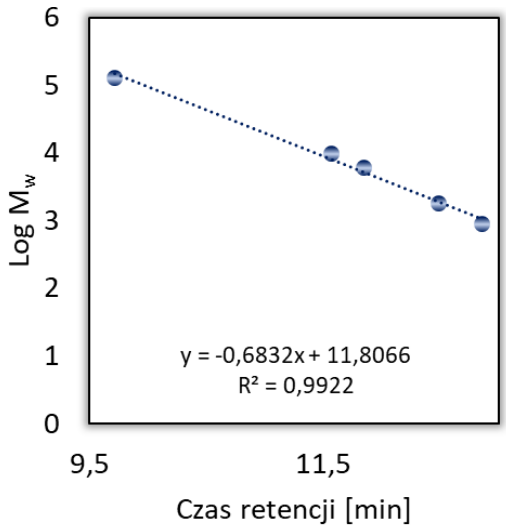
prezentują wyższe wartości przy zachowaniu podobnej tendencji jak stopnie konwersji obliczone z analizy NMR (opisane w pkt. 8.1.2.4.4). Zwiększone wartości stopni konwersji uzyskane metodą estymacji liczby kwasowej można tłumaczyć zmianą rzeczywistej masy próbki w trakcie wzrostu łańcucha polimeru (w wyniku eliminacji cząsteczek wody podczas tworzenia wiązań estrowych), a więc różnicą między masą próbki (1g) użytą w obliczeniach a rzeczywistą masą próbki rosnącą wraz ze wzrostem stopnia konwersji. Przy takim założeniu obliczone wartości stopni konwersji powinny być obniżone i tym samym przypominać stopnie konwersji obliczone na podstawie analizy NMR.

W tym miejscu należy zauważyć, że większość dotychczasowych badań nad zastosowaniami materiałów PAC w inżynierii tkankowej sugeruje stosowanie materiałów syntetyzowanych przy stosunku molowym reagentów 1:1 jako najbardziej sprzyjających proliferacji komórek. Jednakże materiały te nawet po usieciowaniu wykazują znaczną kwasowość powierzchniową, co prowadzi do poważnej cytotoksyczności (pkt. 8.1.4.4). Częstą praktyką, stosowaną w literaturze jest intensywne płukanie materiałów pożywką, w celu jak największego obniżenia ich kwasowości przed posiewami komórkowymi [188]. Jedną z najważniejszych przyczyn opracowania prepolimerów PAC w stosunku molowym 2:3 było zmniejszenie kwasowości powierzchniowej końcowych materiałów usieciowanych poprzez redukcję ilości wolnych grup karboksylowych w ich rozpuszczalnych prekursorach - prepolimerach PAC. Przyjęto, że zastosowanie stosunku molowego 2:3 może znacząco poprawić warunki hodowli tkankowej na powierzchni badanych materiałów poprzez całkowite wyeliminowanie lub skrócenie etapu płukania usieciowanych PAC przy zachowaniu pożądanych właściwości mechanicznych i chemicznych materiałów. Warto zauważyć, że jedną z najważniejszych cech polimerów PAC podawanych w literaturze jest łatwość modyfikacji wolnych grup karboksylowych na ich powierzchni, co pozwala na wprowadzenie szerokiego zakresu możliwych funkcjonalności [207], [225]. Dlatego też synteza prepolimerów PAC w stosunku molowym 2:3 miała na celu przede wszystkim zmniejszenie ilości tych grup nie wpływając na dalsze możliwe modyfikacje otrzymanych materiałów PAC.

8.1.2.2. Wyniki analizy GPC prepolimerów

Kolejnym krokiem charakterystyki otrzymanych prepolimerów było przeprowadzenie analizy za pomocą chromatografii żelowej. Masowo średnie i liczbowo średnie masy

cząsteczkowe są istotnymi parametrami, mającymi wpływ na stopień i mechanizm sieciowania prepolimerów, a, co za tym idzie, na właściwości mechaniczne i biologiczne uzyskiwanych materiałów usieciowanych. Do obliczenia liczbowo średnich mas cząsteczkowych i wagowo średnich mas cząsteczkowych (M_n i M_w) oraz stopnia dyspersyjności w programie LabSolutions wykorzystano wzorce polistyrenowe o masach cząsteczkowych: 890, 1820, 6100, 9730 i 130000 g/mol, za pomocą których wykreślono krzywą wzorcową (Rys. 31). Na podstawie równania krzywej przeanalizowano otrzymane chromatogramy badanych prepolimerów, obliczając M_n, M_w oraz ich dyspersyjność. Otrzymane wartości przedstawiono poniżej (Tab. 13).



Rys. 31. Krzywa wzorcowa sporządzona dla wzorców polistyrenowych, używana w analizie GPC prepolimerów PAC.

Tab. 13. Wartości liczbowo średnich oraz wagowo średnich mas cząsteczkowych oraz dyspersyjności uzyskane dla badanych prepolimerów PAC w analizie GPC

Prepolimer	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	Dyspersyjność
PHC_1:1	676	1692	2,50
PHC_2:3	508	1107	2,18
POC_1:1	912	3100	3,40
POC_2:3	1018	3992	3,92

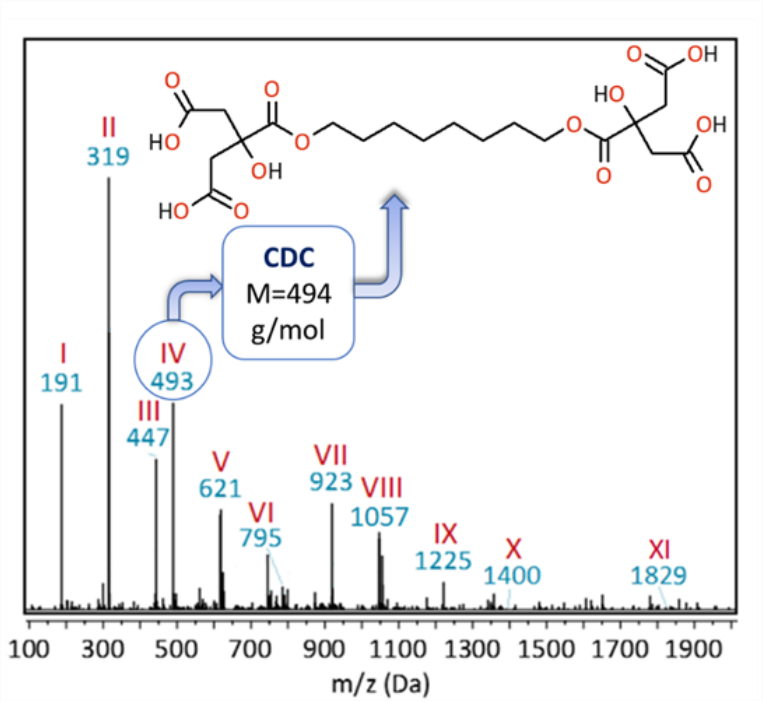
Na podstawie powyższej tabeli można stwierdzić, że zarówno wagowo średnie masy cząsteczkowe, jak i liczbowo średnie masy cząsteczkowe otrzymanych prepolimerów zawierają się w przedziale od 1100 do 3900 g/mol, stanowią one więc mieszaniny małocząsteczkowych oligomerów. Zauważono także zależności w obliczonych M_n i M_w od

zastosowanego diolu. Wyższe wartości M_n i M_w osiągnięto dla prepolimerów otrzymanych z 1,8-oktanodiolu, co można tłumaczyć różnicą długości łańcucha – pomimo faktu, że poszczególne oligomery mogą składać się z takiej samej ilości segmentów cytrynianowych i alkilenowych, dla prepolimerów POC będą one charakteryzować się większą masą, ze względu na obecność w każdym łańcuchu dwóch dodatkowych grup metylenowych na każdy segment alkilenu. Różnice zauważono również dla wskaźnika dyspersyjności prepolimerów – wyższe wartości uzyskano dla prepolimerów POC w porównaniu do prepolimerów PHC. Może to być spowodowane opisaną przy okazji omawiania procesu oczyszczania prepolimerów różnicą w rozpuszczalności małocząsteczkowych oligomerów otrzymanych z 1,6-heksanodiolu które zostają usunięte z materiału na etapie oczyszczania, w przeciwieństwie do oligomerów oktametylenowych, które pozostają w oczyszczonym prepolimerze. Może się to przekładać na większą jednorodność oligomerów stanowiących prepolimer PHC, co skutkuje mniejszym rozrzutem ich mas cząsteczkowych. W tym miejscu należy jednak zauważyć, że otrzymane wyniki analiz GPC są prawdopodobnie obarczone błędem ze względu na możliwe rozgałęzienia sieci polimerowej badanych oligomerów, jak również ze względu na fakt użycia do obliczeń średnich mas cząsteczkowych wzorców polistyrenowych, które, pomimo bardzo dużej dokładności i szerokiego zakresu stosowalności, powinny być wykorzystywane w analizie polimerów addycyjnych. Dlatego też powyższe omówienie wyników zostało przeprowadzone jedynie w obrębie serii badanych próbek, bez odnoszenia ich do wartości literaturowych. Otrzymane wyniki dały jednak podstawę do stwierdzenia, że badane prepolimery są mieszaninami krótkołańcuchowych oligomerów o średnich masach nie przekraczających 4000 g/mol. Postanowiono więc poddać je analizie za pomocą niskorozdzielczej chromatografii FIA-ESI-MS.

8.1.2.3. Wyniki analiz FIA-ESI-MS prepolimerów

Wyniki analizy GPC pozwoliły na przybliżone oszacowanie mas molowych oligomerów będących składnikami prepolimerów. Ze względu na fakt, że większość z nich mieści się poniżej 2000 g/mol, zdecydowano się na przeprowadzenie analizy FIA-ESI-MS. Analiza ta pozwala na identyfikację poszczególnych oligomerów za pomocą określenia ich stosunku m/z oraz przeprowadzenia wstępnej klasyfikacji oligomerów w kontekście stopnia ich rozgałęzienia, co przekłada się na możliwość poznania mechanizmu ich sieciowania i przewidywania

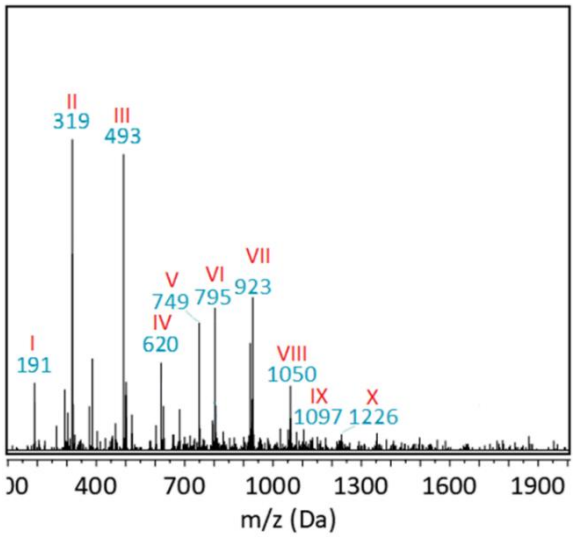
właściwości mechanicznych oraz biozgodności materiałów usieciowanych. W celu identyfikacji indywidualnych sygnałów na widmach masowych posłużono się sporządzoną wcześniej tabelą, zawierającą prawdopodobne struktury wszystkich możliwych oligomerów występujących w badanym zakresie oraz szacowane wartości m/z dla danych kombinacji segmentów cytrynianowych i alkilenowych, uwzględniające oprócz kombinacji liniowych również formy rozgałęzione i złożone formy trójwymiarowe, których nie można było przedstawić za pomocą zaproponowanej notacji. Na rysunku 32 i w tabeli 14 przedstawiono sposób analizy widma i przypisywanie obecnych na nim sygnałów do konkretnego oligomeru. Wykonano analizy dla wszystkich otrzymanych prepolimerów, ze względu jednak na ich dużą liczbę, w niniejszej pracy przedstawiono tylko najbardziej istotne wyniki.



Rys. 32. Schemat przedstawiający analizę widma masowego (tryb ujemnej jonizacji) na przykładzie widma dla prepolimeru POC_2:3. Identyfikowane sygnały były porównywane z tabelą wzorcową oligomerów, a następnie przypisywano im określoną masę i strukturę. Dla uproszczenia, w tabelach zawierających zidentyfikowane struktury zastosowano zamieszczone na rysunku oznaczenia w formie ciągów liter, gdzie **C** – segment cytrynianowy, **D** – segment alkilenowy

Tab. 14. Identyfikacja jonów molekularnych występujących w widmach masowych otrzymanych w wyniku analizy FIA-MS w trybie ujemnej jonizacji prepolimeru POC_2:3 i ich przyporządkowanie do możliwych struktur chemicznych poszczególnych oligomerów (etykiety jonów od I do XI na rysunku 32). **C** – pojedynczy segment cytrynianowy, **D** pojedyncza grupa alkilenowa. Najbardziej prawdopodobne struktury poszczególnych oligomerów, według analiz NMR, oznaczono pogrubieniem.

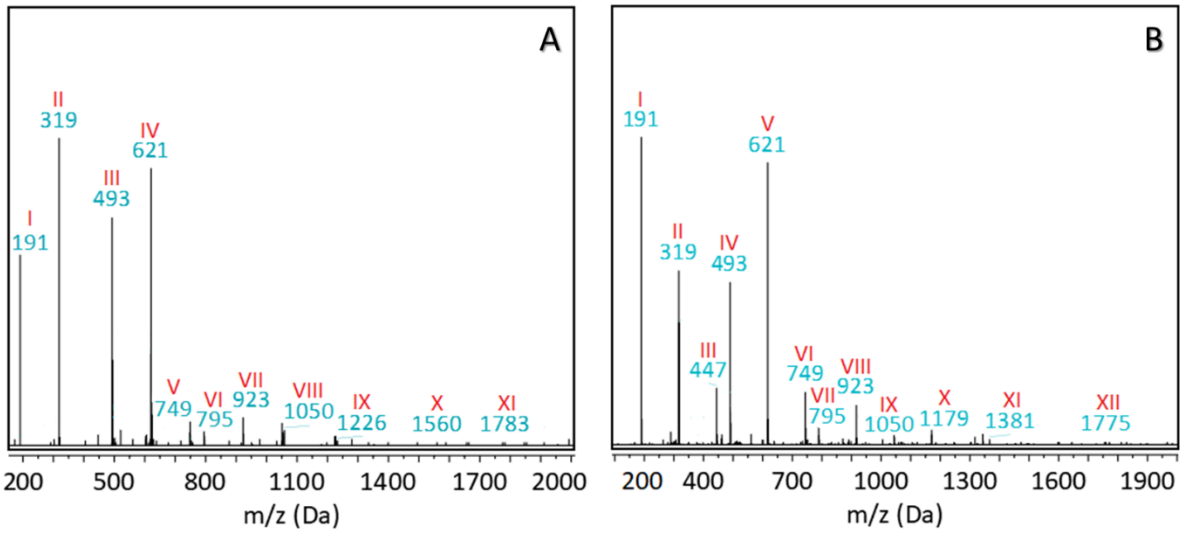
Stosunek m/z (-)	Etykieta jonu	Masa cząsteczkowa [Da]	Prawdopodobne struktury oligomerów
191	I	192	**C**
319	II	320	**CD**
447	III	448	**DCD**
493	IV	494	**CDC**
621	V	622	**a) CDCD** b) CD DC
795	VI	796	**a) CDCDC** b) CDCD C
923	VII	924	**a) CDCDCD** b) CDCDC D
1057	VIII	1058	**a) DCDCDCD** b) CDCDCD D c) CDCDCD D
1225	IX	1226	**a) CDCDCDCD** b) CDCDC D C D c) CDCDCDC D
1400	X	1400	**a) CDCDCDCDC** b) CDCDCDC D C
1829	XI	1830	**CDCDCDCDCDCD**



Rys. 33. Widmo masowe prepolimeru POC_1:1 uzyskane za pomocą analizy FIA-ESI-MS. Przypisania oznaczonych na widmie jonów podano w tabeli poniżej.

Tab. 15. Identyfikacja jonów molekularnych występujących w widmach masowych otrzymanych w wyniku analiz FIA-MS w trybie ujemnej jonizacji dla prepolimeru POC_1:1 i ich przyporządkowanie do możliwych struktur chemicznych poszczególnych oligomerów (etykiety jonów od I do X na rysunku 33). **C** – pojedynczy segment cytrynianowy, **D** pojedyncza grupa alkilenowa. Najbardziej prawdopodobne struktury poszczególnych oligomerów, według analiz NMR, oznaczono pogrubieniem.

Stosunek m/z (-)	Etykieta jonu	Masa cząsteczkowa [Da]	Prawdopodobne struktury oligomerów
191	I	192	**C**
319	II	320	**CD**
493	III	494	**CDC**
620	IV	622	**a) CDCD** b) CD DC
749	V	750	**a) DCDCD** b) CDCD D
794	VI	796	**a) CDCDC** b) CDCD C
923	VII	924	**a) CDCDCD** b) CDCDC D
1050	VIII	1051	**a) DCDCDCD** b) CDCDCD D c) CDCDCD D
1097	IX	1098	**a) CDCDCDC** b) CDCDC D C
1226	X	1226	**a) CDCDCDCD** b) CDCDC D c) CDCDCDC D C D



Rys. 34. A - Widmo masowe prepolimeru POC_2:3 po 60 minutach reakcji uzyskane za pomocą analizy FIA-ESI-MS, **B** - Widmo masowe prepolimeru POC_2:3 po 60 minutach reakcji uzyskane za pomocą analizy FIA-ESI-MS, Przypisania oznaczonych na widmie jonów podano w tabelach poniżej.

Tab. 16. Identyfikacja jonów molekularnych występujących w widmach masowych otrzymanych w wyniku analiz FIA-MS w trybie ujemnej jonizacji dla prepolimeru POC_2:3 po 60 minutach reakcji i ich przyporządkowanie do możliwych struktur chemicznych poszczególnych oligomerów (etykiety jonów od I do XI na rysunku 34A). **C** – pojedynczy segment cytrynianowy, **D** pojedyncza grupa alkilenowa. Najbardziej prawdopodobne struktury poszczególnych oligomerów, według analiz NMR, oznaczono pogrubieniem. Przypisania, dla których możliwe są wyłącznie struktury rozgałęzione oznaczono czerwoną ramką

Stosunek m/z (-)	**Etykieta jonu**	**Masa cząsteczkowa [Da]**	**Prawdopodobne struktury oligomerów**
191	I	192	**C**
319	II	320	**CD**
493	III	494	**CDC**
620	IV	622	**a) CDCD** b) CD DC
749	V	750	**a) DCDCD** b) CDCD D
794	VI	796	**a) CDCDC** b) CDCD C
923	VII	924	**a) CDCDCD** b) CDCDC D
1050	VIII	1051	**a) DCDCDCD** b) CDCDCD D c) CDCDCD D
1226	IX	1226	**a) CDCDCDCD** b) CDCDC D C D c) CDCDCDC D
1560	X	1563	Struktura przestrzenna – niemożliwa do przedstawienia za pomocą stosowanego formatu
1783	XI	1784	**a) DCDCDCDCDCD** **D** b) DCDCDCDCDC D D c) CDCDCDCDC D D D

Tab. 17. Identyfikacja jonów molekularnych występujących w widmach masowych otrzymanych w wyniku analiz FIA-MS w trybie ujemnej jonizacji dla prepolimeru POC_2:3 po 90minutach reakcji i ich przyporządkowanie do możliwych struktur chemicznych poszczególnych oligomerów (etykiety jonów od I do XII na rysunku 34B). **C** – pojedynczy segment cytrynianowy, **D** pojedyncza grupa alkilenowa. Najbardziej prawdopodobne struktury poszczególnych oligomerów, według analiz NMR, oznaczono pogrubieniem. Przypisania, dla których możliwe są wyłącznie struktury rozgałęzione oznaczono czerwoną ramką

Stosunek m/z (-)	Etykieta jonu	Masa cząsteczkowa [Da]	Prawdopodobne struktury oligomerów
191	I	192	**C**
319	II	320	**CD**
447	III	448	**DCD**
493	IV	494	**CDC**
621	V	622	**a) CDCD** b) CD DC
749	VI	750	**a) DCDCD** b) CDCD D
795	VII	796	**a) CDCDC** b) CDCD C
923	VIII	924	**a) CDCDCD** b) CDCDC D
1050	IX	1051	**a) DCDCDCD** b) CDCDCD D c) CDCDCD D
1179	X	1179	**a) DCDCDCD D** b) DCDCDCD D
1381	XI	1382	Struktura przestrzenna – niemożliwa do przedstawienia za pomocą stosowanego formatu
1775	XII	1776	Struktura przestrzenna – niemożliwa do przedstawienia za pomocą stosowanego formatu

Przedstawione powyżej widma masowe oraz tabele zawierające zidentyfikowane jony dla prepolimerów POC potwierdzają wstępne obserwacje z analiz GPC i wskazują na to, że otrzymane roztwory prepolimerów są mieszaninami małocząsteczkowych oligomerów o różnej długości. Największą jonizację obserwuje się w przypadku krótkich oligomerów, składających się z dwóch lub trzech cząsteczek monomeru (CD, CDC). Ponadto widoczne są słabiej jonizujące dłuższe oligomery o masach w zakresie pomiarowym aparatu (m/z < 2000

Da). Identyczne zależności zauważono dla prepolimerów otrzymanych z 1,6-heksanodiolu. Dla oligomerów wykazujących masy powyżej 566 Da dla PHC i 622 Da dla POC możliwe są trzy układy przestrzenne - liniowy, rozgałęziony i cykliczny. Oszacowanie prawdopodobieństwa tworzenia się określonych układów było możliwe dzięki przeprowadzonym szczegółowym eksperymentom NMR. Na podstawie analizy reaktywności skrajnych i środkowej grupy karboksylowej CTR stwierdzono, że preferowane wydaje się tworzenie liniowych oligomerów łańcuchowych w stosunku do cząsteczek zawierających całkowicie zestryfikowane reszty cytrynianowe. W tabelach opisujących widma masowe ESI zaznaczono najbardziej preferowane struktury przez ich pogrubienie. Biorąc pod uwagę te obserwacje postanowiono o wykonaniu takich samych analiz dla próbek prepolimerów otrzymanych w reakcjach o przedłużonym czasie (Rys 34 A i B, Tab. 16 i 17) w celu ostatecznego potwierdzenia mechanizmu sieciowania.

Analiza zarejestrowanych widm ujawniła piki związane z masami cząsteczkowymi reprezentującymi w większości rozgałęzione oligomery (m/z > 1000 Da). Dodatkowo można zaobserwować wyraźny przywilej tworzenia oligomerów o dłuższych łańcuchach, głównie w postaci cząsteczek rozgałęzionych. Wyniki badań FIA-ESI-MS sugerują zatem, że proces sieciowania cPAC przebiega dwuetapowo. W pierwszym etapie tworzą się liniowe oligomery w wyniku reakcji skrajnych grup karboksylowych CTR z grupami hydroksylowymi łańcuchów alkilenowych. Drugim etapem są reakcje krzyżowe pomiędzy centralnymi grupami karboksylowymi jednostek cytrynianowych a oligomerami lub makrocząsteczkami zakończonymi grupami hydroksylowymi.

8.1.2.4. Wyniki analizy NMR prepolimerów w roztworze

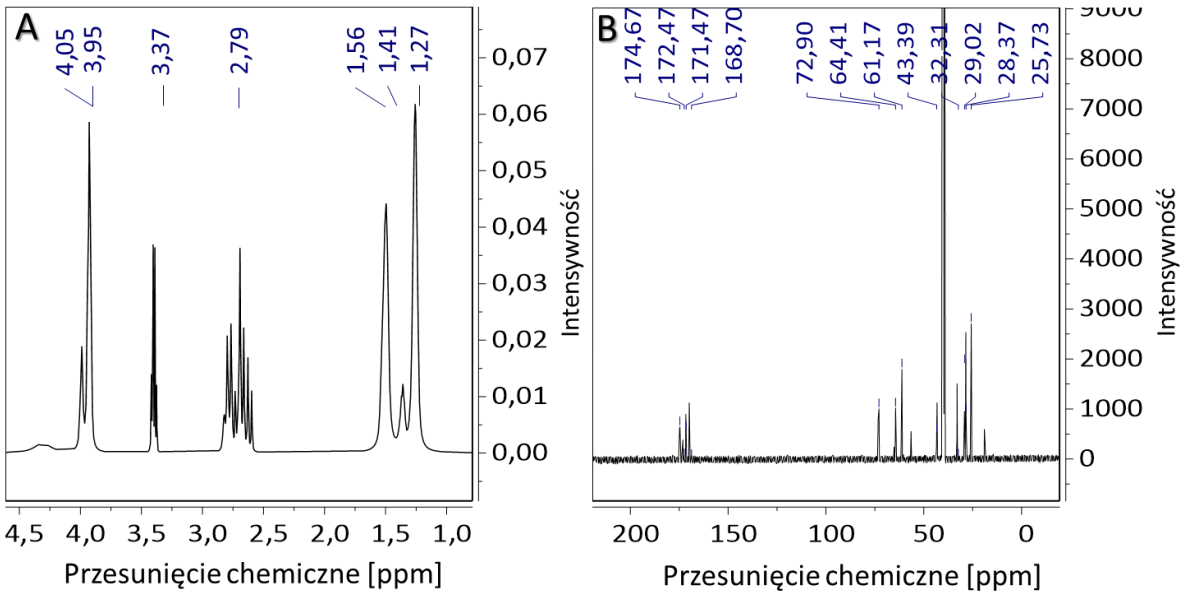
Dla otrzymanych prepolimerów przeprowadzono analizy struktury z wykorzystaniem spektroskopii NMR. Wykonano serię eksperymentów zarówno jedno- jak i dwuwymiarowych. Tak dokładne badania pozwoliły na szczegółowe poznanie struktury powstających oligomerów. Dzięki wykorzystaniu przeprowadzonych wcześniej analiz FIA-ESI-MS oraz wykorzystując ilościowy charakter widm protonowych, potwierdzono stosunki molowe reszt cytrynianowych i alkilenowych w prepolimerach, obliczono stopnie konwersji grup karboksylowych oraz opisano różnice w ich reaktywności w zależności od położenia w cząsteczce kwasu cytrynowego. Przedstawione poniżej wyniki stanowią dopełnienie

i najbardziej istotną część charakterystyki prepolimerów PAC, a ich interpretacja, wraz z wcześniej opisywanymi rezultatami oraz analizą wyników dla materiałów usieciowanych stanowi istotny wkład do kompleksowej charakterystyki biomateriałów z kwasu cytrynowego.

8.1.2.4.1. Omówienie analizy widm i struktury prepolimerów

Określenie struktury chemicznej prepolimerów uzyskano dzięki szczegółowym badaniom NMR. Mając na względzie dużą ilość uzyskanych widm, w niniejszej pracy omówiono przyporządkowanie przesunięć chemicznych dla widm zarejestrowanych dla prepolimeru POC_1:1. Analizy widm dla prepolimerów PHC_1:1 wykonano analogicznie, a niewielkie różnice w zaobserwowanych przesunięciach chemicznych przedstawiono na rysunku 38 i w tabeli 18. Strukturalną charakterystykę prepolimeru POC_1:1 przeprowadzono za pomocą analizy widm NMR pochodzących z eksperymentów jedno- i dwuwymiarowych. Poniżej przedstawiono poszczególne widma wraz z całościowym omówieniem zauważonych sygnałów.

- **Analiza widm jednowymiarowych**



Rys. 35. Widma ^{1}H NMR (**A**) oraz ^{13}C NMR (**B**) dla prepolimeru POC_1:1. Sygnały zaobserwowane na widmach zaznaczono na granatowo.

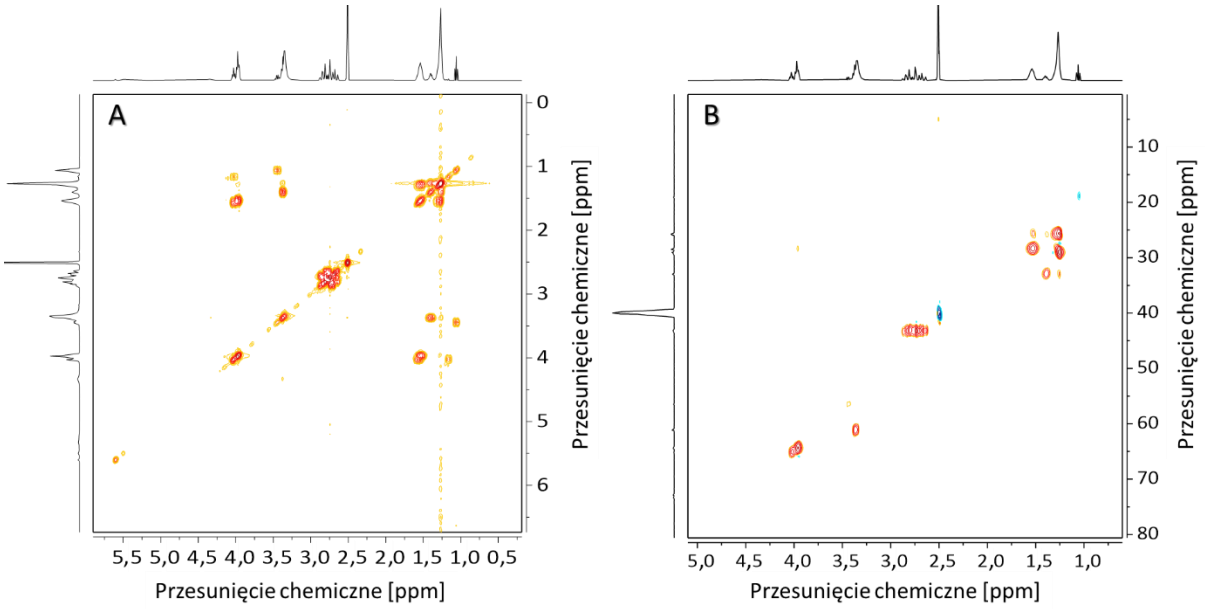
Widmo ^{1}H NMR prepolimeru POC_1:1 (Rys. 35A) pokazuje sygnały pochodzące od grup alifatycznych łańcucha oktametylenowego (trzy multiplety, δ 1,27 ppm, δ 1,41 ppm, δ 1,56 ppm). Multiplet przy δ 2,79 ppm pochodzi od protonów metylenowych jednostek

cytrynianowych. Dwa tryplety przy δ 3,95 i δ 4,05 ppm pochodzą odpowiednio od protonów grup -CH_2 jednostek alkilenowych sąsiadujących z wiązaniami estrowymi. Rozdzielenie tych sygnałów jest skutkiem różnicy w otoczeniu chemicznym skrajnych grup karboksylowych oraz grupy centralnej reszty cytrynianowej, co jest wynikiem tworzenia się estrów łańcuchowych i rozgałęzionych. Słabo widoczny multiplet δ 3,37 ppm pochodzi od protonów skrajnej grupy -CH_2 z łańcucha alkilenowego przyłączonej do grupy -OH niepodstawionej CTR. Niewyraźny sygnał δ 4,33 ppm (niezaznaczony na widmie) pochodzi od protonu hydroksylowego z segmentów oktametylenowych.

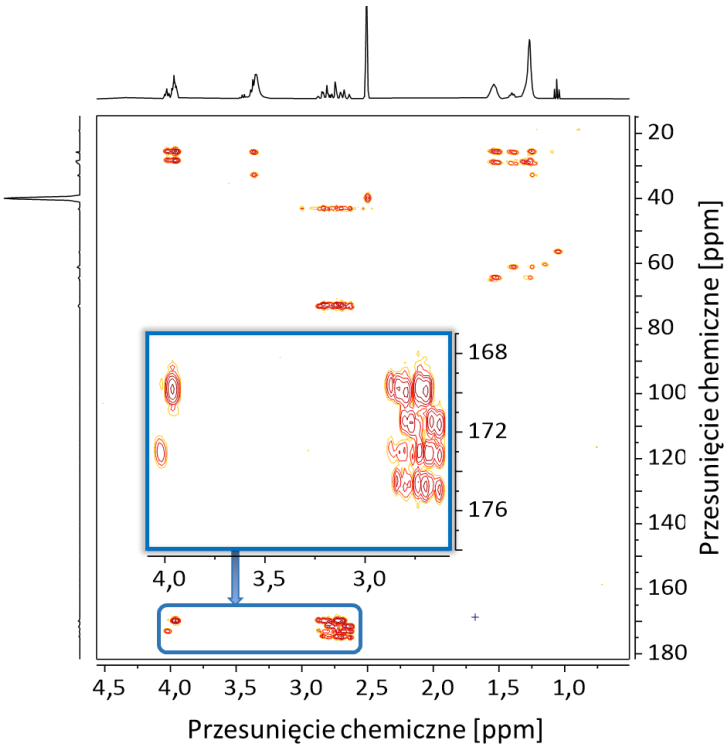
Widmo ^{13}C (Rys. 35B) pokazuje sygnały δ 25,73, δ 28,37, δ 29,02, δ 32,31 ppm pochodzące od węgli w łańcuchu oktametylenowym. Sygnały δ 61.17 i δ 64.41 pochodzą od skrajnych węgli grup alkilenowych -CH_2, odpowiednio w pobliżu niepodstawionej i podstawionej grupy hydroksylowej. Sygnały δ 43,39 i δ 72,90 ppm pochodzą od węgli cytrynianowych (odpowiednio od alifatycznych grup cytrynianowych i środkowego węgla czwartorzędowego). Sygnały δ 168,70, δ 171,47, δ 172,47 i δ 174,67 ppm pochodzą od węgli karboksylowych reszt cytrynianowych. Sygnały δ 168,70 i δ 171,47 ppm pochodzą od grup skrajnych, odpowiednio podstawionych i niepodstawionych alkilenem, natomiast sygnały δ 172,47 i δ 174,67 pochodzą od podstawionej i niepodstawionej centralnej grupy karboksylowej cytrynianu.

- **Analiza widm korelacyjnych**

Widmo spektroskopii korelacyjnej (COSY) (Rys. 36A) pokazuje zależności pomiędzy protonami w resztach alkilenowych i cytrynianowych. Stwierdzono występowanie następujących korelacji: 1,25-1,41; 1,52-1,27; 1,32-1,41; 3,36-1,41; 4,05-1,57; 3,95-1,54 ppm. Na widmie HSQC (Rys. 36B) zarejestrowano następujące korelacje bliskiego zasięgu pomiędzy protonami i węglami: 1,49-25,52; 1,27-25,77; 1,54-25,77; 1,27-29,13; 1,40-32,99; 3,94-28,40; 2,75-43,30; 3,45-56,64; 3,38-61,26; 4,03-65,19; 3,97-64,51 ppm. Na podstawie analizy wyżej wymienionych korelacji możliwe było potwierdzenie rozpoznania sygnałów od poszczególnych protonów i węgli zidentyfikowanych dla widm jednowymiarowych, jak również przypisanie odpowiednich protonów do właściwych im atomów węgla w cząsteczce prepolimeru. Następnie przeprowadzono analizę widma ^{1}H – ^{13}C HMBC, które ukazuje korelacje dalekozasięgowe pomiędzy protonami i węglami w cząsteczce.



Rys. 36. Widma korelacyjne $^{1}H - {}^{1}H$ COSY NMR (**A**) oraz $^{1}H - {}^{13}C$ HSQC NMR (**B**) dla prepolimeru POC_1:1



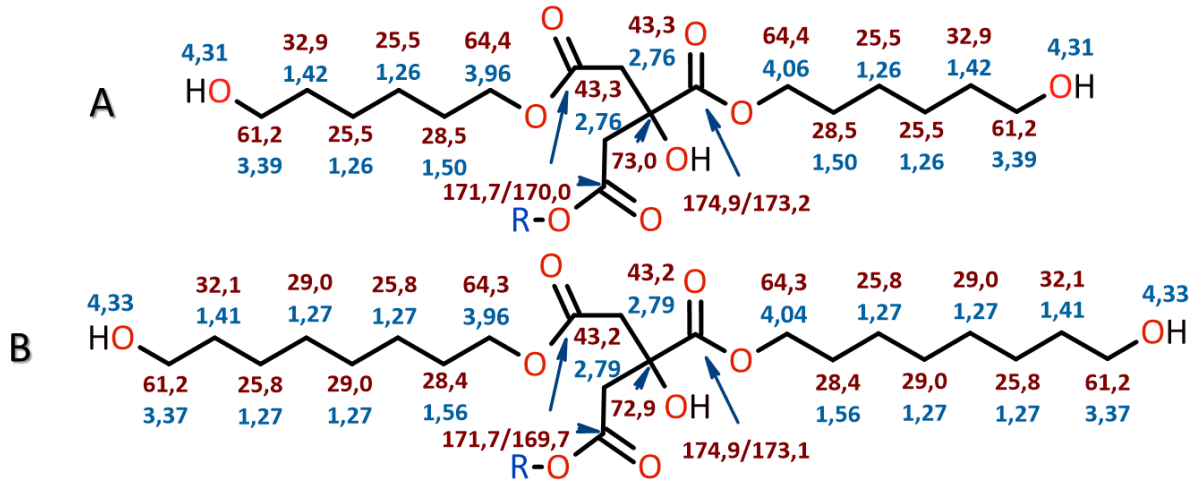
Rys. 37. Widmo $^{1}H - {}^{13}C$ HMBC dla prepolimeru POC_1:1. Na widmie wyeksponowano w powiększeniu sygnały korelacji pomiędzy protonami obecnymi w grupach metylenowych łańcucha alkilenowego sąsiadującymi z wiązaniem estrowym, a węglami grup karboksylowych reszt cytrynianowych.

Widmo HMBC (Rys. 37) pozwoliło zaobserwować następujące korelacje dalekiego zasięgu: 1,26-25,76; 1,29-29,04; 1,55-25,73; 1,28-29,13; 1,40-61,20; 3,97-25,75; 3,38-25,91;

4,03-25,73; 2,64-43,30; 2,64-72,74; 2,85-72,80; 2,75-72,66; 3,96-170,00; 2,64-171,66; 2,64-174,96 ppm.

Kompleksowa analiza jedno- i dwuwymiarowych widm NMR pozwoliła na jednoznaczne określenie sygnałów protonów i atomów węgla obecnych w cząsteczce prepolimeru. Multiplet przy δ 2,79 ppm przypisany został protonom metylenowym jednostek cytrynianowych, co zostało potwierdzone obecnością geminalnych sygnałów korelacyjnych w ^{1}H-^{1}H COSY (δ 2,84 - δ 2,72 ppm), bezpośrednim sprzężeniem z węglem przy około δ 43,3 ppm w ^{1}H-^{13}C HSQC, jak również wieloma dalekozasięgowymi sygnałami korelacyjnymi z węglem metylenowym, trzeciorzędowym i karbonylowym charakterystycznymi dla cytrynianów. Należy zaznaczyć, że po dokładnej analizie sygnałów sprzężenia powyższych protonów z karbonylowymi atomami węgla i porównaniu tych ostatnich ze specyficznymi przesunięciami chemicznymi węgli karboksylowych kwasu cytrynowego możliwe było nie tylko rozróżnienie sygnałów od atomów węgla należących do niepodstawionych grup karboksylowych w resztach cytrynianowych i w powstałych grupach estrowych, ale co ważniejsze odróżnienie estrów tworzonych poprzez podstawienie centralnej grupy karboksylowej cytrynianu od tych tworzących się przez estryfikację grup skrajnych (2,76 – 173,0 ppm i 2,76 – 169,8 ppm) Powyższa obserwacja ma kluczowe znaczenie dla lepszego zrozumienia mechanizmu procesu sieciowania PAC. Zgodnie z powyższymi rozważaniami, dwa tryplety (δ 3,95 i δ 4,05 ppm) znalezione w widmie ^{1}H NMR prepolimeru POC_1:1 zidentyfikowano jako sygnały pochodzące od grup -CH_2 w łańcuchach oktametylenu, przylegających do wiązań estrowych tworzonych z centralną (δ 4,05 ppm) i terminalną (δ 3,95 ppm) grupą karboksylową CTR. Odpowiednio w widmie ^{1}H-^{13}C HMBC wykryto specyficzne sygnały korelacyjne (3,95 – 169,8 ppm i 4,05 – 173,0 ppm, powiększone na rysunku 37). Warto zwrócić uwagę, że jednostki oktametylenowe, w których grupa hydroksylowa pozostała niezestryfikowana wykazują jeden multiplet przy δ 3,37 ppm. Wreszcie sygnały multipletowe w okolicach δ 1,40 i δ 1,54 ppm przypisano protonom oktametylenowym przyłączonym do węgli znajdujących się w pozycji β odpowiednio do grupy hydroksylowej i estrowej. Na podstawie opisanych powyżej sygnałów i ich korelacji, zaproponowano umowną strukturę cząsteczki prepolimeru (Rys. 38A). Jak już wspomniano, takie same analizy wykonano dla cząsteczki prepolimeru PHC_1:1, również otrzymując proponowaną strukturę (Rys. 38B). Ze względu na fakt krótszego łańcucha alkilenowego

w cząsteczce prepolimeru PHC_1:1, pomimo zaobserwowania takich samych korelacji pomiędzy protonami i węglami oraz wynikających z nich właściwości prepolimerów, w cząsteczce prepolimeru PHC_1:1 występują różnice w wartościach przesunięć chemicznych dla sygnałów pochodzących od tych samych atomów w cząsteczce prepolimeru POC_1:1. Zostały one przedstawione w tabeli 18.



Rys. 38. Proponowane struktury prepolimerów PHC_1:1 (**A**) oraz POC_1:1 (**B**) wraz z sygnałami z widm NMR przypisanymi do poszczególnych atomów węgla i wodoru.

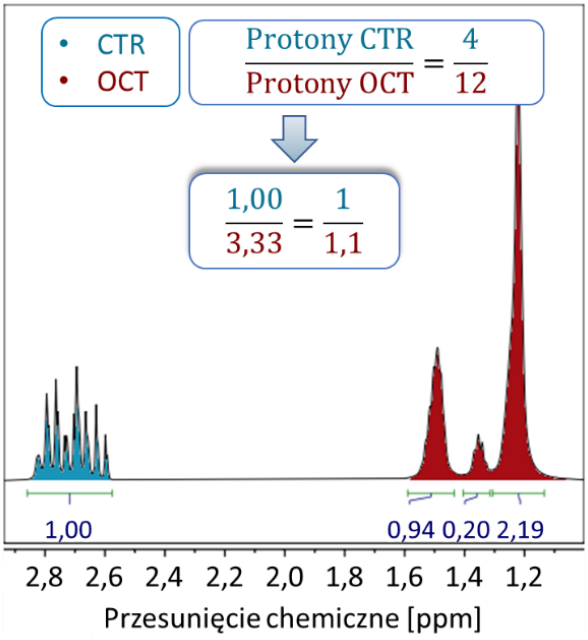
Tab. 18. Zestawienie szczegółowych różnic pomiędzy sygnałami występującymi na widmach ^{1}H-NMR dla prepolimerów PHC_1:1 oraz POC_1:1. W tabeli zawarto wartości sygnałów wraz z przypisaniem ich do konkretnej struktury w reszcie cytrynianowej lub alkilenowej

PHC_1:1			**POC_1:1**		
δ [ppm]	**cytrynian**	**heksametylen**	**δ [ppm]**	**cytrynian**	**oktametylen**
1,26	---	CA-O-$(CH_2)_2$-**CH_2-CH_2**-$(CH_2)_2$-OH	1,27	---	CA-O-$(CH_2)_2$-**CH_2-CH_2-CH_2-CH_2**-$(CH_2)_2$-OH
1,42		CA-O-$(CH_2)_4$-**CH_2**-CH_2-OH	1,41	---	CA-O-$(CH_2)_6$-**CH_2**-CH_2-OH
1,50	---	CA-O-CH_2-**CH_2**-$(CH_2)_4$-OH	1,56	---	CA-O-CH_2-**CH_2**-$(CH_2)_6$-OH
2,76	$COOR_1$-**CH_2**-C(OH)COOH	---	2,79	$COOR_1$-**CH_2**-C(OH)COOH	---
3,39	---	CA-O-$(CH_2)_5$-**CH_2**-OH	3,37	---	CA-O-$(CH_2)_7$-**CH_2**-OH
3,96/4,06	---	CA-O-**CH_2**-$(CH_2)_5$-OH	3,95/4,04	---	CA-O-**CH_2**-$(CH_2)_7$-OH
4,31	---	CA-O-$(CH_2)_5$-**OH**	4,33	---	CA-O-$(CH_2)_7$-**OH**

Dzięki bardzo wyraźnemu odseparowaniu na widmie protonowym sygnałów pochodzących od grup -CH_2 z łańcuchów alkilenowych, sąsiadujących z wiązaniami estrowymi, jak również precyzyjnemu ich skorelowaniu z określonym rodzajem formującego się estru, postanowiono o wykorzystaniu ilościowego charakteru widm protonowych do przeprowadzenia szczegółowych kalkulacji pozwalających określić reaktywność grup karboksylowych, stosunek molowy reszt cytrynianowych i alkilenowych oraz stopień konwersji grup karboksylowych w badanych prepolimerach. Do kalkulacji wspomnianych właściwości dla prepolimerów otrzymanych w innych stosunkach molowych wykorzystano wyłącznie zarejestrowane dla nich widma protonowe przy założeniu występowania w nich takich samych korelacji pomiędzy atomami, jak dla prepolimerów w stosunku 1:1 (CTR:diol). Sposoby wyznaczania tych właściwości, jak i opisy otrzymanych wyników przedstawiono poniżej.

8.1.2.4.2. Wyniki analizy stosunków molowych reszt cytrynianowych i segmentów alkilenowych w strukturze prepolimeru

Jednym z najważniejszych parametrów decydujących o właściwościach materiałów PAC jest odpowiedni stosunek molowy reagentów. W celu otrzymania prepolimerów, odpowiednie substraty zmieszano w ściśle określonych stosunkach molowych, jednak na etapie syntezy i oczyszczania, stosunki te mogły zostać w znacznym stopniu zaburzone. Wykorzystano ilościowy charakter widm ^{1}H NMR do określenia stosunku molowego reszt cytrynianowych do segmentów alkilenowych w otrzymanych prepolimerach. W tym celu obliczono za pomocą programu powierzchnie (całki) pod określonymi sygnałami na widmach prepolimerów, a następnie obliczono stosunek ich powierzchni w odniesieniu do ilości protonów (Rys. 39). Do obliczeń wybrano sygnały pochodzące od protonów metylenowych z reszt cytrynianowych oraz alkilenowych położonych w środku łańcuchów ze względu na ich wyraźne odseparowanie na widmie ^{1}H NMR. Możliwe jest wykorzystanie do obliczeń innych sygnałów, np. protonów grup -CH_2 położonych przy wiązaniu estrowym, jednak uzyskiwane wyniki będą identyczne jak te przedstawione poniżej.



Rys. 39. Graficzne przedstawienie sposobu obliczania stosunku molowego składników prepolimerów PAC na podstawie widm ^{1}H NMR

Tab. 19. Wartości stosunków molowych obliczonych na podstawie widm ^{1}H NMR dla badanych prepolimerów

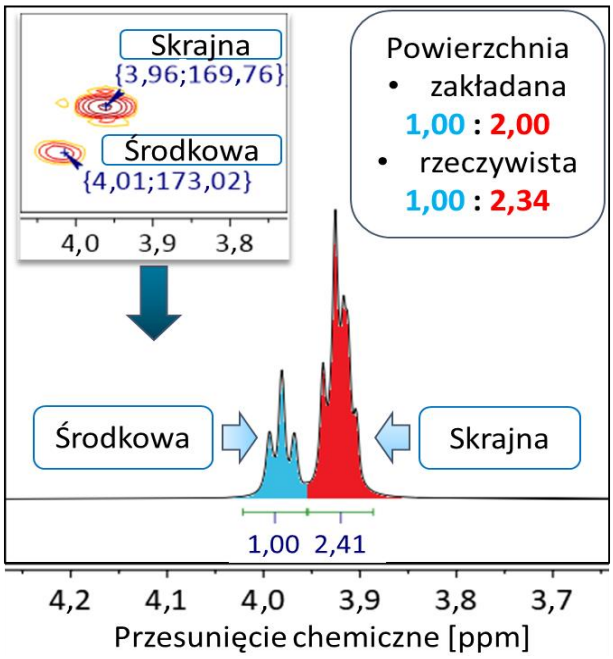
Prepolimer	Czas reakcji [min]	Obliczony stosunek molowy [CTR:Diol]
PHC_1:1	40	1:1,2
PHC_2:3	40	2:2,9
POC_1:1	40	1:1,1
POC_2:3	40	2:2,9
POC_2:3	60	2:2,9
POC_2:3	90	2:2,9

. Na podstawie obliczonych wartości stosunków molowych stwierdzono, że otrzymane prepolimery zachowały stosunek molowy substratów wykorzystanych w syntezie. Zróżnicowanie stosunków molowych ma kluczowe znaczenie przy otrzymywaniu i charakterystyce materiałów usieciowanych, których właściwości są wprost zależne od udziałów poszczególnych segmentów w materiale.

8.1.2.4.3. Wyniki kalkulacji reaktywności grup karboksylowych w strukturze prepolimeru

Komplementarna analiza danych uzyskanych z różnych eksperymentów NMR pozwoliła na jednoznaczne zróżnicowanie sygnałów związanych z tworzeniem wiązań

estrowych zarówno przez centralną, jak i skrajne grupy karboksylowe jednostek cytrynianowych, co z kolei dało możliwość porównania ich reaktywności. Na widmach ^{13}C NMR POC_1:1 widoczne są różnice w sygnałach pochodzących od podstawionych i niepodstawionych grup karboksylowych cytrynianów. Na podstawie informacji uzyskanych z widm HMBC i ^{1}H prepolimeru przeprowadzono analizę reaktywności cytrynianowych grup karboksylowych. W tym celu dokonano dogłębnej interpretacji widma HMBC w zakresie karbonylowym, która ujawniła korelacje karbonylowych grup cytrynianowych z protonami pochodzącymi od grup -CH_2 łańcuchów oktametylenowych, sąsiadujących z wiązaniami estrowymi (3,96-169,76 i 4,04-173,02 ppm). W szczególności zidentyfikowano sygnały sprzęgające dla centralnej grupy karbonylowej (4,04-173,02 ppm) oraz od grup terminalnych (3,96-169,76 ppm). Następnie obliczono pola powierzchni pod sygnałami pochodzącymi od protonów metylenowych z alkilenów i porównano je pod względem oczekiwanego udziału każdej z grup (Rys. 40).



Rys. 40. Graficzne przedstawienie sposobu analizy reaktywności grup karboksylowych reszt cytrynianowych w prepolimerach PAC.

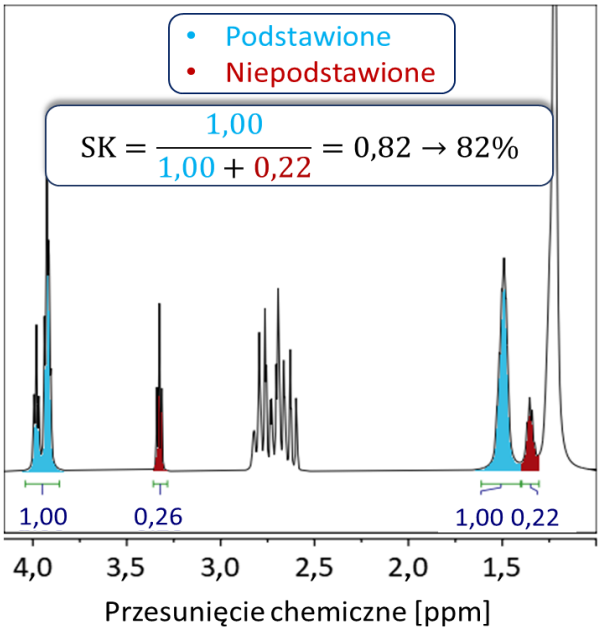
Otrzymane wyniki wskazują, że dla badanych próbek skrajne grupy karboksylowe CTR wykazują większą reaktywność niż grupa centralna (~20% dla POC i ~40% dla PHC) (Tab. 20). Powyższe obserwacje stanowią potwierdzenie i dopełnienie opisanych wcześniej analiz FIA-ESI-MS i wskazują jednoznacznie, że w początkowej fazie polikondensacji CTR z określonym diolem preferowane jest tworzenie oligomerów liniowych w stosunku do rozgałęzionych.

Tab. 20. Zestawienie obliczonej reaktywności grup karboksylowych dla badanych prepolimerów PAC, obliczonej na podstawie analizy widm NMR

Prepolimer	Czas reakcji [min]	Reaktywność [środkowa: skrajna]
PHC_1:1	40	1:1,45
PHC_2:3	40	1:1,36
POC_1:1	40	1:1,17
POC_2:3	40	1:1,25
POC_2:3	60	1:1,15
POC_2:3	90	1:1,20

8.1.2.4.4. Wyniki analizy stopnia konwersji grup karboksylowych w strukturze prepolimeru

Interpretacja specyficznych całek sygnałów w widmach ^{1}H NMR prepolimerów PAC umożliwiła obliczenie stopni konwersji grup karboksylowych przy wykorzystaniu wzoru z rysunku 41.



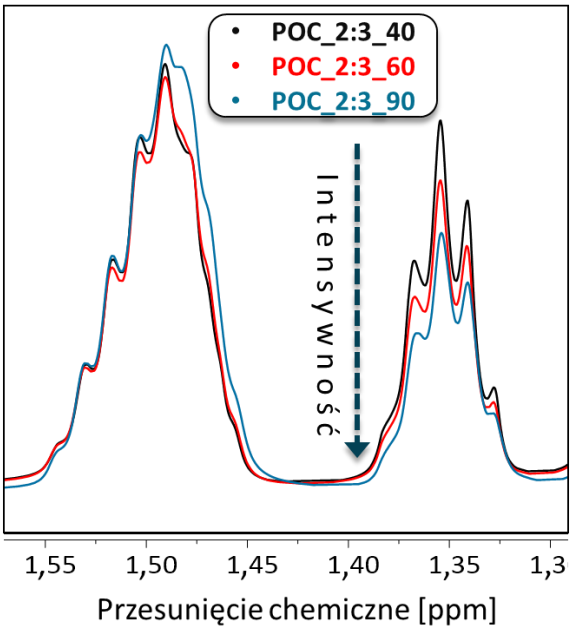
Rys. 41. Graficzne przedstawienie metody kalkulacji stopnia konwersji (SK) grup karboksylowych CTR za pomocą analiz widm ^{1}H NMR

Obliczone stopnie konwersji (Tab. 21) wskazują na wysoki stopień przereagowania grup karboksylowych (do 84% dla PHC_1:1), który jest niezależny od długości diolu, ale silnie zależy od stosunku molowego reagentów stosowanych podczas syntezy prepolimeru (około 82% dla POC_1:1 przy około 65% dla POC_2:3).

Tab. 21. Zestawienie obliczonych za pomocą analiz widm ^{1}H NMR stopni konwersji grup karboksylowych kwasu cytrynowego dla różnych prepolimerów PAC

Prepolimer	Czas reakcji [min]	Stopień konwersji grup -COOH [%]
PHC_1:1	40	84
PHC_2:3	40	65
POC_1:1	40	82
POC_2:3	40	65
POC_2:3	60	69
POC_2:3	90	76

W celu ustalenia maksymalnego stopnia przereagowania, przy którym zachodzi pełne sieciowanie materiałów, wykonano analizy postępu reakcji dla prepolimerów POC_2:3, wykorzystując do tego, oprócz widm dla standardowych prepolimerów, widma protonowe zarejestrowane dla próbek otrzymanych w wydłużonych czasach reakcji. (Rys. 42).



Rys. 42. Widma ^{1}H NMR prepolimerów POC_2:3 otrzymanych w różnych czasach wskazują na zmniejszanie się sygnału jednego z niepodstawionych protonów w miarę zwiększania czasu reakcji

Zaobserwowano, że maksymalny czas prowadzenia reakcji wynosił 90 minut, gdyż dłuższe ogrzewanie próbek powodowało głębokie i raptowne usieciowanie prepolimerów dając w efekcie materiały nierozpuszczalne w etanolu. Ciekawostką jest że, porównując materiały przygotowane w różnych stosunkach molowych, ale wykazujące podobne stopnie konwersji grup funkcyjnych (POC_1:1 vs. POC_2:3_90) można stwierdzić, że te otrzymane

w stosunku molowym 2:3 (CTR:diol) wykazują mniejszą rozpuszczalność w etanolu niż te otrzymane w stosunku molowym 1:1 (CTR:diol). Powyższy fakt związany jest prawdopodobnie z większą ilością hydrofobowych jednostek oktametylenowych w POC_2:3 niż w odpowiedniku 1:1, na co wskazują rozważania opisane przy kalkulacji stosunku molowego z wykorzystaniem NMR. Otrzymane wyniki odnoszą się bezpośrednio do modyfikacji wprowadzonych w protokole syntezy, jednoznacznie potwierdzając istotność ich wprowadzenia oraz wskazując na fakt, że dalsze wydłużanie czasu reakcji oraz kolejne zmiany parametrów nie spowodowałyby poprawy wydajności ani jakości otrzymanych prepolimerów. Powyższe rezultaty ugruntowują więc dobrane warunki i parametry syntezy prepolimerów jako bardziej optymalne do otrzymywania prepolimerów PAC od tych opisanych w literaturze.

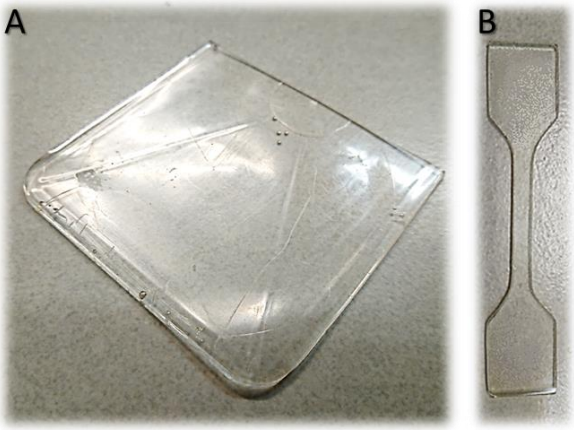
8.1.2.5. Podsumowanie charakterystyki prepolimerów

W powyższych paragrafach opisano wyniki zróżnicowanych analiz przeprowadzonych dla prepolimerów PAC. Wprowadzone w protokole syntezy zmiany i usprawnienia polegające na wieloetapowej kontroli parametrów procesu oraz mieszania poskutkowały zwiększeniem wydajności reakcji oraz pozwoliły na otrzymanie prepolimerów o jednolitych właściwościach. Wyniki pomiarów liczby kwasowej prepolimerów wskazują na niższą kwasowość materiałów otrzymanych w stosunku molowym reagentów 2:3 (CTR:diol), co może mieć wpływ na właściwości biologiczne materiałów usieciowanych. W niniejszej pracy przedstawiono szczegółowe badania wyników NMR, za pomocą których określono szeroką gamę właściwości prepolimerów PAC. Kalkulacje reaktywności grup karboksylowych CTR, poparte przez wyniki analiz FIA-ESI-MS wskazały na zwiększoną reaktywność grup skrajnych wobec reaktywności środkowej grupy karboksylowej. Wskazuje to na priorytet tworzenia się liniowych oligomerów, co bezpośrednio wpływa na gęstość usieciowania oraz właściwości mechaniczne i biologiczne otrzymanych materiałów usieciowanych. Potwierdzono także za pomocą NMR, że stosunki molowe reszt cytrynianowych i alkilenowych w prepolimerach są takie same jak odpowiednich prekursorów oraz określono stopnie konwersji grup karboksylowych. Wyniki analiz prepolimerów otrzymanych w reakcjach o wydłużonym czasie wyjaśniły różnice w rozpuszczalności prepolimerów i doprowadziły do odpowiedniego oszacowania warunków prowadzenia polikondensacji. Wykazano także, że opisane w powyższych paragrafach

właściwości prepolimerów rzutują na charakterystykę materiałów usieciowanych, co opisano szczegółowo w dalszej części pracy.

8.1.3. Otrzymywanie materiałów kontrolnych cPAC

W wyniku przeprowadzonych reakcji postpolimeryzacji uzyskano szereg usieciowanych materiałów cPAC, opisanych w tabeli 6 (pkt. 7.2.3). Sieciowaniu poddawano 30% roztwory prepolimerów w etanolu, a całość procesu zachodziła w dedykowanej suszarce próżniowej. Materiały usieciowane wytwarzane były w postaci folii o grubości między 1 a 2 mm (Rys. 43A). Z otrzymanych folii wycinane były fragmenty o określonym kształcie (Rys. 43B).



Rys. 43. Fragment folii z materiału cPAC usieciowanej w formie polipropylenowej (**A**) oraz wycięta z niej kształtka w formie wiosła, stosowana do badań mechanicznych (**B**)

Materiały w ocenie organoleptycznej i wizualnej były gładkimi, bezbarwnymi elastomerami o zróżnicowanej odporności na rozerwanie, zależnej od zastosowanego diolu, czasu sieciowania i stosunku molowego reagentów. Materiały otrzymane z 1,6-heksanodiolu były bardziej sztywne od materiałów cPOC w tych samych stosunkach molowych (CTR:diol) i czasach sieciowania, natomiast w obrębie materiałów z tej samej grupy można było zauważyć większą rozciągliwość materiałów otrzymanych w stosunku molowym 1:1 (CTR:diol) niż 2:3. Otrzymane materiały wykazywały się brakiem rozpuszczalności w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych, w tym w etanolu, który był podstawowym rozpuszczalnikiem prepolimerów. Podczas serii wstępnych reakcji sieciowania według metod i warunków opisanych w literaturze, napotkano na liczne nieścisłości i problemy, które skutkowały otrzymywaniem materiałów o zróżnicowanych właściwościach w obrębie jednej

partii. Zdecydowano się, podobnie, jak w przypadku protokołu syntezy prepolimerów, na reewaluację protokołu reakcji sieciowania.

- **Dobór czasu sieciowania**

Czas sieciowania ma znaczący wpływ na różnice we właściwościach otrzymanych materiałów. Wraz ze zwiększaniem czasu sieciowania zwiększa się gęstość usieciowania materiału, co przekłada się na różnice we właściwościach mechanicznych, a więc także i biologicznych otrzymanych polimerów. W istniejących doniesieniach literaturowych [188] materiały cPAC uzyskiwane były po 4 dniach sieciowania w temperaturze 80°C. Zdecydowano o wydłużeniu tego okresu do 10 dni z dwudniowymi interwałami w celu precyzyjnego doboru czasu postpolimeryzacji w taki sposób, aby końcowy materiał posiadał jak najlepsze właściwości mechaniczne i biologiczne przy jednoczesnym zachowaniu właściwości elastomeru. Po serii reakcji wstępnych sieciowania przez 4, 6, 8 i 10 dni i analizie otrzymanych materiałów, zadecydowano o wykluczeniu pośrednich czasów postpolimeryzacji (6 i 8 dni), a końcowe materiały przygotowano w czasie sieciowania 4 dni, jako odniesienie otrzymanych wyników do literatury i w czasie 10 dni. Wstępne analizy cytotoksyczności badanych materiałów wykazały bowiem, że dopiero materiały sieciowane przez 10 dni nie stanowią zagrożenia dla komórek. Materiały otrzymane w czasie 4 dni postpolimeryzacji wykazywały się również znacznie większą podatnością na odkształcenie i elastycznością, niż materiały otrzymane w czasie 10 dni postpolimeryzacji, co jest związane ze wzrostem gęstości usieciowania wraz z czasem prowadzenia reakcji.

- **Dobór odpowiednich form do sieciowania**

Osobnym problemem napotkanym podczas wstępnych reakcji sieciowania był dobór odpowiedniego materiału form, w których prowadzono proces sieciowania. W założeniu otrzymany materiał cPAC powinien być łatwo oddzielany od powierzchni formy bez naruszenia ciągłości struktury przy zachowaniu odpowiedniej hydrofilowości formy, umożliwiającej swobodne dopasowanie się materiału do kształtu formy i usieciowanie bez powstawania defektów takich, jak skurcz polimeru czy pęcherze. Jednocześnie, formy te musiały być odporne na ekspozycję w temperaturze ok 80°C przez długi czas. Zbadano możliwości sieciowania na formach szklanych, teflonowych, polistyrenowych i polipropylenowych. Najlepsze wyniki uzyskano dla form wykonanych z polipropylenu – otrzymano materiały

usieciowane równomiernie w całej objętości i bez defektów struktury (Rys. 43). Materiały otrzymywane w takich formach można było stosunkowo łatwo odseparować od powierzchni formy bez obawy o ich uszkodzenie, a same formy nadawały się do ponownego wykorzystania. Do sporządzania próbek do badań biologicznych wykorzystano wielodołkowe płytki polistyrenowe – choć cienkościenne formy polistyrenowe nie nadawały się do otrzymywania folii cPAC przez ich niską odporność temperaturową i bardzo mocne przywieranie materiałów cPAC do ich powierzchni, grubość ścianek i ukształtowanie płytek hodowlanych były wystarczające, aby zrekompensować te mankamenty. W konsekwencji, materiały do badań biologicznych sieciowano bezpośrednio w dołkach, z których nie były one wyjmowane, a komórki hodowano bezpośrednio na ich górnej powierzchni.

- **Dobór odpowiednich warunków sieciowania**

Kolejnym istotnym parametrem był dobór warunków sieciowania. Początkowe reakcje prowadzono w standardowej suszarce laboratoryjnej, bez nawiewu i z otwartymi przewietrznikami. Okazało się jednak, że tak przygotowane materiały zawierały szereg negatywnych cech, które wzbudziły konieczność dopracowania protokołu sieciowania. Materiały te charakteryzowały się nierównomiernym usieciowaniem, tym większym, im bliżej przewietrzników się znajdowały. Wskazywało to na nierówny stopień odparowania etanolu z próbek, który powinien zostać usunięty w pierwszym etapie reakcji sieciowania. Ponadto, badania cytotoksyczności wykazały liczne zanieczyszczenia obecne w materiałach, które stanowiły czynniki powodujące śmierć komórek. Z tego powodu zadecydowano o prowadzeniu reakcji sieciowania w dedykowanej suszarce próżniowej – przez pierwszy dzień pod ciśnieniem atmosferycznym, w celu umożliwienia swobodnego odparowania większości etanolu, a przez następne dni pod obniżonym ciśnieniem (200 mbar). Zastosowanie takiej wartości próżni umożliwiło równomierne wyciągnięcie etanolu z prepolimerów przy zachowaniu umiarkowanego tempa jego uwalniania, co zapobiegło tworzeniu się pęcherzy w strukturze materiału. Prowadzenie sieciowania w obiegu zamkniętym zapewniło także materiałom izolację od zanieczyszczeń obecnych w powietrzu.

Powyższe usprawnienia wprowadzone do protokołu reakcji sieciowania poskutkowały otrzymaniem materiałów o jednakowych i powtarzalnych właściwościach w obrębie danej partii. Wstępne obserwacje uzyskanych poliestrów zdają się potwierdzać

wnioski i przewidywane na podstawie analiz prepolimerów założenia odnośnie właściwości materiałów usieciowanych. Szczegółowe badania strukturalne, mechaniczne, biologiczne i pomiary twardości opisane poniżej dokładnie ukazują różnice pomiędzy otrzymanymi materiałami oraz wskazują na materiał o potencjalnie najlepszych właściwościach do ich proponowanego zastosowania.

8.1.4. Charakterystyka materiałów kontrolnych cPAC

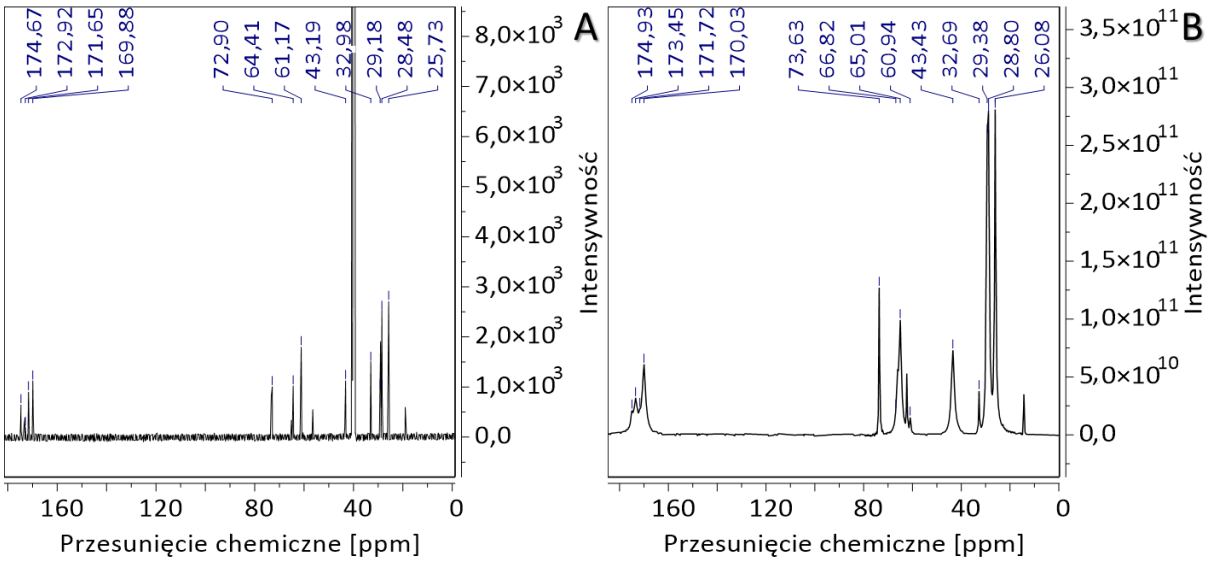
8.1.4.1. Wyniki analizy NMR dla próbek stałych materiałów kontrolnych cPAC

8.1.4.1.1. Omówienie analizy widm i określenie struktury materiału

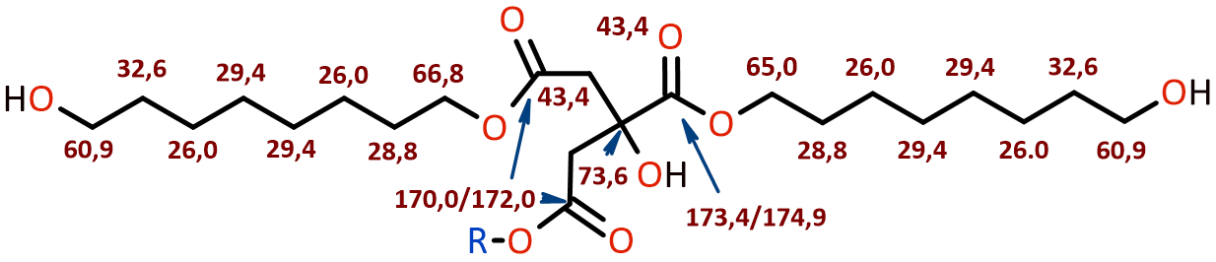
Spektroskopia NMR dla próbek stałych niesie wiele korzyści w kontekście analizy struktury materiałów usieciowanych PAC. Za pomocą widm ssNMR można ocenić czy otrzymany materiał usieciowany jest zgodny strukturalnie z prepolimerem, z którego powstał. Dodatkowo, ilościowy charakter widm ^{13}C MAS NMR pozwala, podobnie jak w przypadku analiz widm protonowych w roztworze, na wykonanie kalkulacji stosunków molowych oraz stopnia konwersji. Opisanie powyższych zależności pozwala jednoznacznie powiązać właściwości mechaniczne i biologiczne materiałów usieciowanych z cechami opisanymi wcześniej dla ich prekursorów. Wykonano jednowymiarowy eksperyment ^{13}C MAS NMR dla próbki materiału cPOC_2:3, a jego wyniki przedstawiono poniżej.

Przedstawione poniżej widmo (Rys. 44B) analizowane było w oparciu o widmo ^{13}C NMR uzyskane dla prepolimeru (Rys. 44A), z którego otrzymano materiał usieciowany. Zidentyfikowano sygnały o przesunięciach chemicznych δ 26,08, δ 28,83 δ 29,38 oraz δ 32,69 ppm, pochodzące od atomów węgla w łańcuchu oktametylenowym, sygnał δ 60,94 ppm pochodzący od atomów węgla z grupy $-CH_2$ połączonej z niepodstawioną grupą hydroksylową, szeroki sygnał δ 65,01 – 66,82 ppm pochodzący od skrajnych atomów węgla grup alkilenowych $-CH_2$ w pobliżu wiązania estrowego, a także sygnały δ 43,43 i δ 73,28 ppm pochodzące od atomów węgla cytrynianowych (odpowiednio od alifatycznych grup cytrynianowych i środkowego węgla czwartorzędowego) oraz nałożone sygnały od podstawionych i niepodstawionych węgli karbonylowych w zakresie δ 170,03 - δ 174,93 ppm. Sygnały te

znajdują swoje odzwierciedlenie na widmie ^{13}C NMR prepolimeru, co wskazuje, że otrzymane materiały usieciowane cechują się identyczną strukturą chemiczną, jak prepolimery służące do ich wytworzenia. Możliwe więc było narysowanie fragmentu struktury materiału usieciowanego wraz z przypisanymi sygnałami (Rys. 45).



Rys. 44. Porównanie widma ^{13}C NMR prepolimeru cPOC_1:1(**A**) oraz ^{13}C MAS NMR materiału usieciowanego cPOC_2:3_4d (**B**)

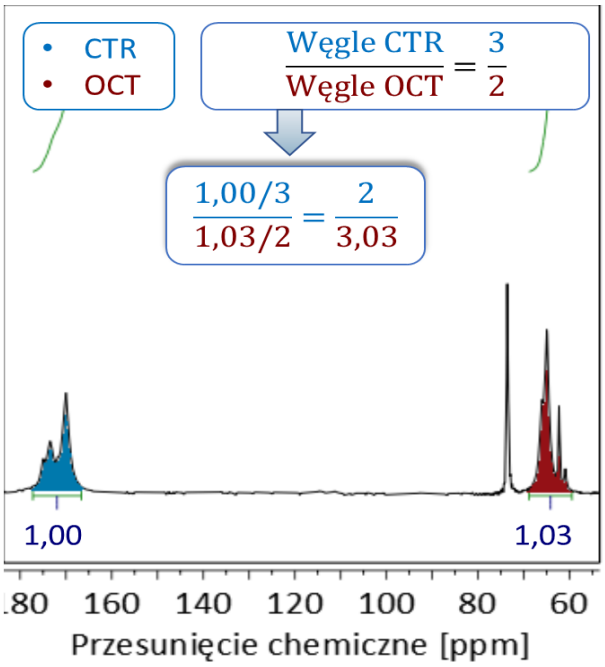


Rys. 45. Fragment struktury materiału usieciowanego cPOC_2:3 wraz z przypisaniami sygnałów z widma ^{13}C MAS NMR do poszczególnych węgli. R – proton lub łańcuch alkilenu

W odróżnieniu od spektroskopii NMR w roztworze, w spektroskopii ssNMR nie ma możliwości ilościowej analizy widm protonowych. Taką rolę pełnią tutaj widma ^{13}C MAS NMR [226], [227]. Biorąc to pod uwagę postanowiono o przeprowadzeniu dla opisanej powyżej próbki takich samych analiz, jak dla widm protonowych prepolimerów, a więc kalkulacji stosunku molowego reszt cytrynianowych i alkilenowych, reaktywności grup karboksylowych oraz stopnia konwersji reagentów. Wyniki wraz z opisami analiz zamieszczono poniżej.

8.1.4.1.2. Wyniki analizy stosunku molowego reszt cytrynianowych i alkilenowych w materiale kontrolnym cPAC

Pierwszym analizowanym parametrem był stosunek molowy reszt cytrynianowych i segmentów alkilenowych w usieciowanym materiale. Do jego obliczenia wykorzystano metodę analogiczną, jak w przypadków prepolimerów. W programie obliczono powierzchnie pod sygnałami pochodzącymi od karbonylowych atomów węgla reszty cytrynianowej (δ 170.03 - 174.93 ppm) oraz łańcucha alkilenu (δ 65,01 - 66,82 ppm), a następnie odniesiono je do liczby węgli odpowiadającej danemu segmentowi w badanym stosunku molowym. Wybór tych konkretnych sygnałów podyktowany był ich dobrym odseparowaniem na widmie i możliwości jednoznacznego określenia ilości atomów węgla odpowiadającym wybranym przesunięciom. Obliczenie polegało na porównaniu sygnałów, a następnie podzieleniu otrzymanych wartości przez ilość atomów węgla danego segmentu. Schemat kalkulacji przedstawiono na rysunku poniżej (Rys. 46).



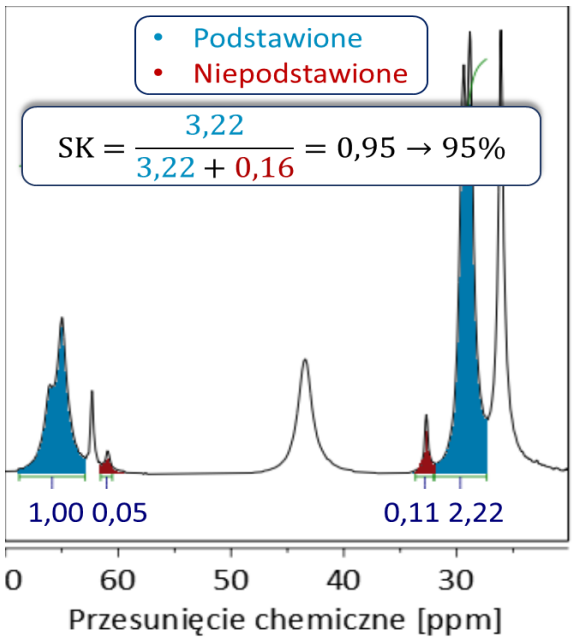
Rys. 46. Schemat analizy stosunku molowego reszt cytrynianowych do alkilenowych w materiale usieciowanym cPAC w oparciu o widmo ^{13}C MAS NMR

Analiza stosunków pól powierzchni wybranych sygnałów pozwoliła na potwierdzenie, że materiał usieciowany zachowuje stosunek molowy reagentów stosowanych do syntezy. wynoszący 2:3 (CTR:diol). Uzyskana wartość jest zbliżona do wartości wyliczonej dla prepolimeru POC_2:3 w punkcie 8.1.2.4.2. Otrzymane wyniki potwierdzają, że wypracowany

w toku badań protokół syntezy nie wpływa na zmiany stosunku molowego użytych reagentów, a otrzymane materiały usieciowane zachowują zadany stosunek molowy, tak, jak miało to miejsce w prepolimerach.

8.1.4.1.3. Wyniki analizy stopnia konwersji grup karboksylowych w materiale kontrolnym cPAC

Stopień konwersji obliczono analogicznie, jak w przypadku kalkulacji dla prepolimerów, korzystając z całek sygnałów od węgli z segmentów oktametylenowych połączonych z protonem oraz całek sygnałów od węgli przyłączonych do cytrynianów (Rys. 47).

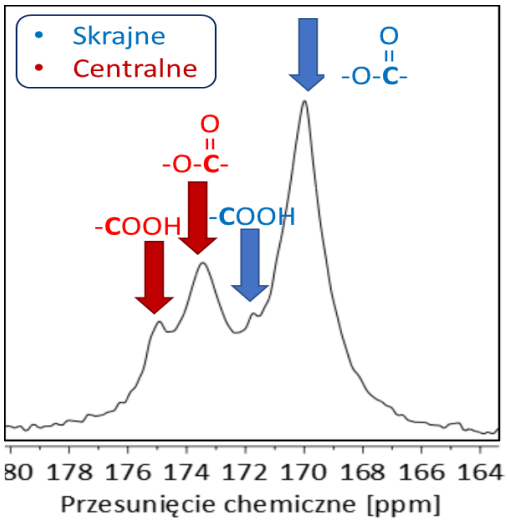


Rys. 47. Schemat kalkulacji stopnia konwersji (SK) grup karboksylowych w usieciowanym materiale cPOC_2:3 na podstawie widma ^{13}C MAS NMR

Otrzymane wyniki wskazują na wysoki stopień konwersji grup karboksylowych rzędu 95%, co wskazuje na prawie całkowite przereagowanie obecnych w materiale grup karboksylowych. Niewielka ilość pozostałych nieprzereagowanych grup stoi w zgodzie z zasadami polikondensacji. Reakcja ta jest reakcją równowagową, w której osiągnięcie 100% przereagowania grup funkcyjnych w przypadku ich równomolowego udziału jest niemożliwe ze względów na warunek stanu równowagi. Prawdopodobnie rzeczywisty stopień przereagowania jest nieznacznie wyższy, na co wskazują dwa sygnały niezaznaczone na rysunku 44B, o przesunięciach δ 14,30 i 62,38 ppm. Odpowiadają one przesunięciom charakterystycznym dla małocząsteczkowych estrów – cytrynianów trietylu. Ich obecność

w materiale świadczy o częściowej reakcji etanolu stosowanego do rozpuszczania prepolimerów z CTR w czasie sieciowania. Powstający ester również konsumuje część niezwiązanych grup karboksylowych reszt cytrynianowych, podwyższając ich stopień konwersji.

8.1.4.1.4. Wyniki analizy reaktywności grup karboksylowych w materiale kontrolnym cPAC



Rys. 48. Poglądowa analiza reaktywności grup karboksylowych w materiale cPOC_2:3_10d na podstawie analizy intensywności sygnałów na widmie ^{13}C MAS NMR materiału cPOC_2:3_10d

W odróżnieniu od analiz widm protonowych w roztworze dla prepolimerów, w przypadku widm ^{13}C MAS NMR dla materiałów usieciowanych nie było możliwości przeprowadzenia dokładnej analizy reaktywności grup karboksylowych. Analiza ta opierała się na sygnałach protonów pochodzących od grup metylenowych usytuowanych w bezpośrednim sąsiedztwie wiązania estrowego. W przypadku otrzymanych widm dla materiałów usieciowanych, sygnały pochodzące od węgli z wspomnianych grup metylenowych są widoczne przy δ 65,01 - 66,10 ppm w formie szerokiego sygnału, uniemożliwiającego rozróżnienie węgli przy wiązaniu estrowym wytworzonym przez grupę centralną od węgli przy wiązaniu estrowym utworzonym z grupy środkowej. Niemniej jednak, na podstawie analizy sygnałów pochodzących od grup karboksylowych i wiązań estrowych (Rys. 48) można wnioskować, że reaktywność grup skrajnych w materiale usieciowanym przewyższa reaktywność grupy centralnej. Świadczy o tym stosunek wielkości sygnałów od podstawionych i niepodstawionych grup na widmie ^{13}C MAS NMR. Sygnał od niepodstawionych grup skrajnych

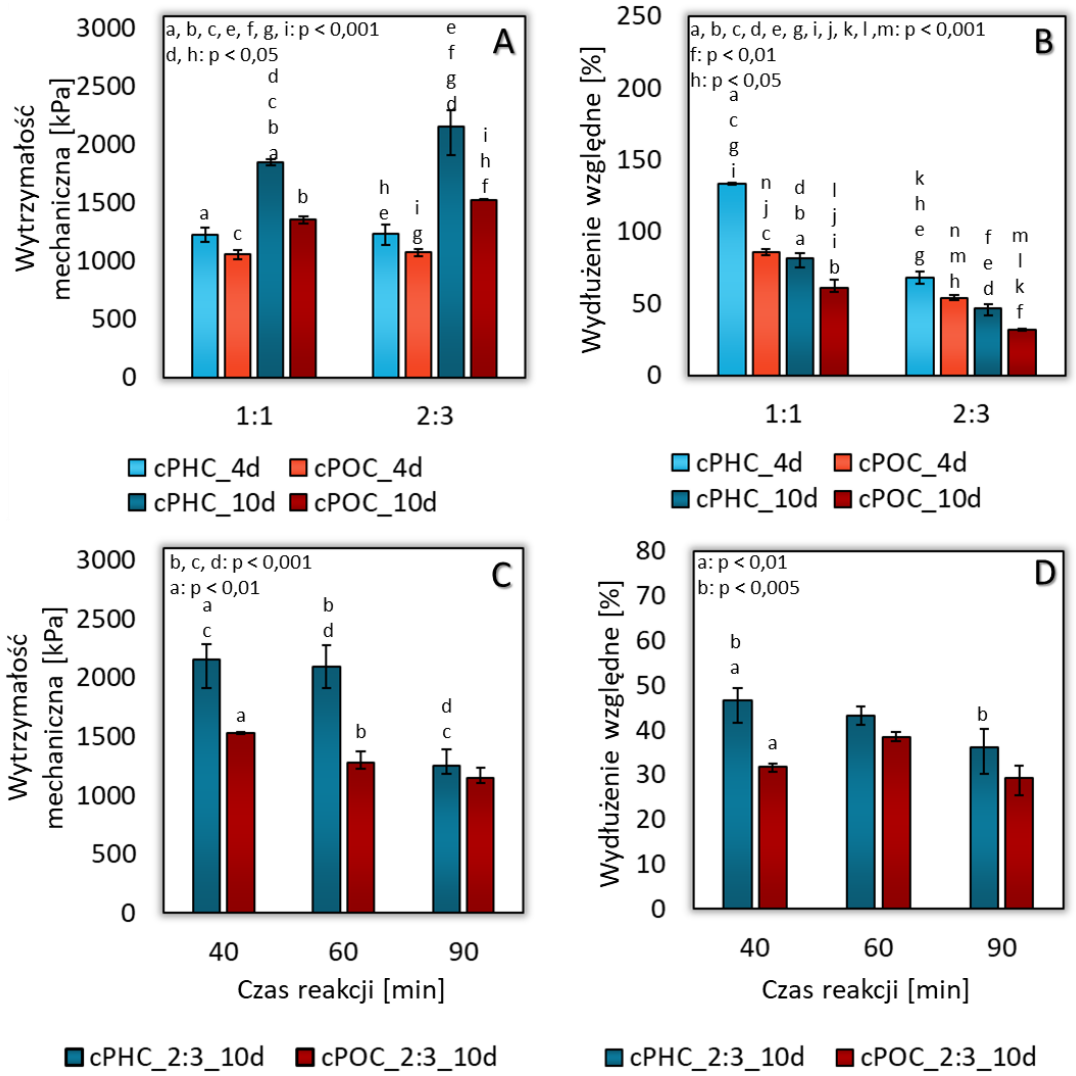
jest bardzo niewielki w porównaniu do sygnału od grup podstawionych (niebieskie strzałki), natomiast w przypadku sygnałów od grupy centralnej (czerwone strzałki) udział sygnału od grup niepodstawionych jest zauważalnie większy w stosunku do grup wysyconych resztami alkilenu. Nie przeprowadzono dokładnej kalkulacji reaktywności, ze względu na nakładanie się sygnałów, co skutkowałoby znaczącym błędem wykonanych obliczeń.

8.1.4.2. Wyniki pomiarów właściwości mechanicznych materiałów kontrolnych cPAC

Właściwości mechaniczne materiałów stanowią jeden z kluczowych parametrów oceny ich przydatności w inżynierii tkankowej naczyń krwionośnych. Precyzyjne dostosowanie odpowiedniej wytrzymałości przy zachowaniu elastyczności materiału skutkuje możliwością jego dopasowania do właściwości konkretnej tkanki, którą zastępuje. Dla otrzymanych materiałów cPAC wykonano serię takich badań, polegających na zmierzeniu ich wytrzymałości na rozciąganie oraz wydłużenia względnego, które jest wskaźnikiem elastyczności materiału. Wartości te mierzono w czasie rozciągania, jak i w punkcie krytycznym – momencie pęknięcia badanej próbki. Wyniki dla wybranych próbek przedstawiono poniżej (Rys. 49). Ze względu na bardzo zbliżone wartości wyników zarejestrowanych w momencie zerwania próbki, postanowiono, ze względów praktycznych, nie zamieszczać ich w tekście niniejszej pracy w formie graficznej.

Zauważono wyraźne zmiany właściwości mechanicznych dla materiałów sieciowanych przez różne okresy czasu (4 i 10 dni). Wartości wytrzymałości na rozciąganie i maksymalnej wytrzymałości na rozciąganie przy zerwaniu wzrastają znacząco wraz ze wzrostem czasu sieciowania, natomiast odwrotną tendencję zaobserwowano dla wydłużenia względnego i wydłużenia przy zerwaniu (Rys. 49 A i B). Można więc wnioskować, że wydłużenie czasu sieciowania do 10 dni spowodowało powstanie bardziej wytrzymałych materiałów, co stanowi dodatkową zaletę w ich przyszłym zastosowaniu jako rusztowań do inżynierii tkankowej naczyń krwionośnych i jest zgodne z charakterystyką materiałów stosowanych w tej dziedzinie [188]. Z drugiej strony, poliestry cPAC otrzymane z 1,8-oktanodiolu wykazują mniejsze wartości wytrzymałości na rozciąganie i wyższą elastyczność niż materiały wytworzone z 1,6-heksanodiolu (Rys. 49 A i B). Rozbieżności te można wytłumaczyć różnicami w długości łańcucha diolu użytego do syntezy poliestrów - krótszy łańcuch 1,6-heksanodiolu

zapewnia gęstszą sieć sieciującą niż w przypadku materiałów otrzymanych z 1,8-oktanodiolu, co przekłada się na większe wartości siły potrzebne do zerwania próbek i mniejszą ich podatność na odkształcenia.



Rys. 49. Wykresy właściwości mechanicznych dla materiałów cPAC. **A** - wytrzymałość na rozciąganie, **B** - wydłużenie względne i ich odpowiednie wartości (**C i D**) dla materiałów cPAC otrzymanych z prepolimerów syntetyzowanych w wydłużonym czasie reakcji. Istotność statystyczną zmierzonych wartości określono według jednokierunkowego testu ANOVA przy $p < 0,001$, $p < 0,01$ i $p < 0,05$. Prezentowane wyniki porównywano ze sobą dla tego samego rodzaju materiału w różnych stosunkach molowych oraz osobno dla materiałów w jednym stosunku molowym. Kolumny oznaczone tą samą literą różnią się istotnie.

Uzyskane wyniki wskazują na różnice we właściwościach pomiędzy materiałami wytworzonymi w stosunku molowym 1:1 i 2:3 (CTR:diol). Materiały otrzymane w stosunku molowym 2:3 wykazują większe wartości wytrzymałości na rozciąganie i mniejsze wartości wydłużenia. Należy to tłumaczyć równomolowym stosunkiem grup funkcyjnych substratów, co przełożyło się na większe prawdopodobieństwo uzyskania struktur

rozgałęzionych, a w konsekwencji skutkowało większą gęstością usieciowania w cPAC_2:3.

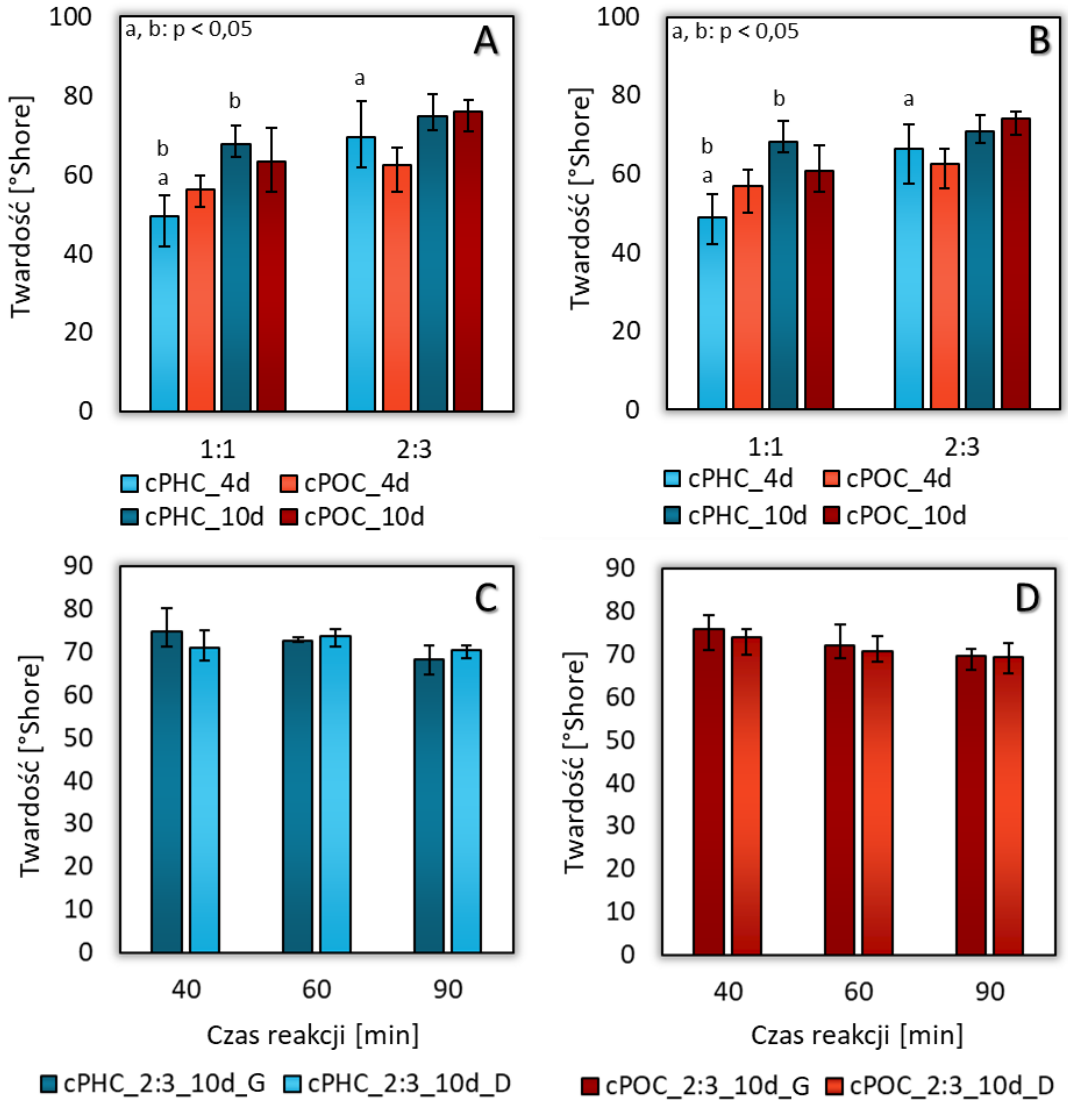
Powyższe rozważania należy odnieść do wcześniej wspomnianych różnic w liczbach kwasowych prepolimerów oraz do wyników analizy NMR reaktywności grup karboksylowych CTR, przeprowadzonej dla prepolimerów przygotowanych przy różnych stosunkach molowych substratów. Wskazują one na wyraźne korelacje pomiędzy właściwościami mechanicznymi materiałów usieciowanych a właściwościami fizykochemicznymi prepolimerów i pozwalają na częściowe przewidywanie i projektowanie właściwości materiałów usieciowanych już na etapie syntezy prepolimerów.

W tym miejscu warto zauważyć, że wszystkie obserwowane rozbieżności we właściwościach mechanicznych badanych materiałów można wyeliminować poprzez precyzyjne sterowanie czasem polikondensacji i sieciowania, uzyskując materiały o precyzyjnie dobranych do danego zastosowania właściwościach mechanicznych. Znaczenie precyzyjnego dostosowania i oszacowania optymalnego czasu i warunków reakcji sieciowania wykazała dokładna analiza właściwości mechanicznych materiałów PAC otrzymanych z prepolimerów syntetyzowanych w wydłużonym czasie reakcji (Rys. 48C i 48D). W miarę wydłużania czasu reakcji syntezy prepolimeru znacząco maleje wydłużenie względne, co zaobserwowano w przypadku wspomnianych materiałów, a także zmniejszają się wartości wytrzymałości na rozciąganie, co jest tendencją odwrotną niż w przypadku materiałów cPAC wytworzonych z prepolimerów syntetyzowanych w warunkach standardowych. Porównując otrzymane wartości z wartościami właściwości mechanicznych materiałów referencyjnych można wykazać, że wydłużenie czasu reakcji syntezy prepolimerów skutkuje zmianą elastomerowego charakteru wytworzonych materiałów w kierunku sztywnych żywic poliestrowych, eliminując tym samym takie materiały z potencjalnych zastosowań w inżynierii tkanek miękkich.

8.1.4.3. Wyniki pomiarów twardości materiałów kontrolnych cPAC

Twardość materiałów jest istotnym wskaźnikiem określającym stopień usieciowania materiału. Dzięki analizie twardości możliwe jest wykrycie defektów sieci polimerowej oraz wskazanie, czy dany materiał jest usieciowany równomiernie w całej objętości. Twardość ma

też znaczący wpływ na właściwości biologiczne usieciowanego materiału, poprzez obrazowanie gęstości usieciowania, co z kolei warunkuje możliwość penetracji materiału przez komórki. Dla otrzymanych materiałów cPAC wykonano pomiary twardości metodą Shore'a A, stosując skalę dla materiałów elastomerowych. Wyniki zamieszczono na rysunku 50.



Rys. 50. Wykresy przedstawiające wyniki pomiarów twardości dla różnych badanych materiałów PAC (**A** - powierzchnia górna, **B** - powierzchnia dolna) oraz porównanie twardości materiałów uzyskanych z prepolimerów przygotowanych w wydłużonych czasach reakcji (**C i D**). Indeksy G i D w nazwach próbek oznaczają odpowiednio górną i dolną powierzchnię materiału. Istotność statystyczną zmierzonych wartości określono według jednokierunkowego testu ANOVA przy $p < 0,001$, $p < 0,01$ i $p < 0,05$. Prezentowane wyniki porównywano ze sobą dla tego samego rodzaju materiału przy różnych stosunkach molowych oraz osobno dla materiałów w jednym stosunku molowym. Kolumny oznaczone tą samą literą różnią się statystycznie.

Wyniki pomiarów twardości stanowi komplementarne dopełnienie charakterystyki mechanicznej polimerów. Twardość materiałów zwiększa się wraz z wydłużaniem czasu sieciowania. Najmniejsze wartości twardości zaobserwowano dla materiałów sieciowanych przez 4 dni (57 do 60°Shore dla cPOC i 51 do 68°Shore dla cPHC), natomiast największe wyznaczono dla materiałów sieciowanych przez 10 dni (63 do 72°Shore dla cPOC i 67 do 71°Shore dla cPHC) (Rys. 50). Najważniejszą obserwacją jest jednak fakt, że zarówno górne, jak i dolne powierzchnie wytworzonych materiałów wykazują podobne wartości twardości. Sugeruje to, że stopień usieciowania materiałów jest jednakowy w całej objętości próbek, co przekłada się na identyczne właściwości fizykochemiczne materiałów w każdym miejscu sieci polimerowej. Jest to istotny parametr w kontekście zastosowania materiałów cPAC w inżynierii tkankowej, gdzie jednorodność struktury jest jednym z kluczowych wymogów. Ponadto próbki cPHC i cPOC otrzymane w tym samym czasie sieciowania i w tym samym stosunku molowym reagentów wykazują podobną twardość. Zauważono, że dla materiałów cPHC_2:3 otrzymanych w obu czasach sieciowania twardość przyjmuje wyższe wartości, niż dla materiału cPHC_1:1, co dotyczy również materiałów cPOC. Różnice te są tożsame z rozbieżnościami opisanymi wcześniej dla badań mechanicznych i podyktowane są równomolowym stosunkiem grup karboksylowych i hydroksylowych, co wpływa na gęstość usieciowania materiałów, gdzie większa ilość użytego diolu powoduje gęstszą sieć wewnątrz materiału.

Otrzymane wyniki twardości stoją w zgodzie z wynikami badań mechanicznych, stanowiąc ich komplementarne dopełnienie. Podobnie, jak w przypadku badań mechanicznych, jednakowa twardość materiałów w całej ich objętości jest wynikiem przeprowadzonej kontroli i modyfikacji sposobu sieciowania materiałów. Poszczególne różnice twardości pomiędzy materiałami można łatwo zniwelować stosując odpowiednio dostosowane warunki sieciowania.

8.1.4.4. Wyniki analizy zgodności biologicznej materiałów kontrolnych cPAC

Badania biologiczne stanowią jeden z najbardziej znaczących kroków w charakterystyce materiałów PAC. Nieodpowiednia biokompatybilność materiałów lub wręcz ich cytotoksyczność jest czynnikiem całkowicie negującym ich zastosowanie

w inżynierii tkankowej naczyń krwionośnych. Aby wykluczyć taki scenariusz i potwierdzić całkowitą zgodność materiałów z tkankami człowieka przeprowadzono dokładne i wieloetapowe badania otrzymanych polimerów zarówno na ekstraktach uzyskanych z materiałów, jak i w bezpośrednim kontakcie komórek z powierzchnią poliestrów. Do badań wykorzystano ludzkie komórki macierzyste ASC które w procesie różnicowania w organizmie przekształcane są w komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych oraz komórki śródbłonka naczyniowego, które będą stanowić naturalne otoczenie materiału w tkankach biorcy. Badania właściwości biologicznych obejmowały pomiar pH przygotowanych 10% ekstraktów z poliestrów cPAC_10 d, barwienie fluorescencyjne live/dead oraz określenie aktywności metabolicznej komórek na podstawie szybkości redukcji resazuryny. Szczegółowe omówienie wyników zamieszczono poniżej.

- **Wpływ kwasowości materiału na żywotność komórek**

Przeprowadzono pomiary pH ekstraktów materiałów cPAC w medium DMEM. Pożywka zawierała w sobie barwny wskaźnik, reagujący na obniżenie pH zmianą koloru z czerwonego na coraz bardziej żółty. Ponadto, wykonane ekstrakty zbadano przy użyciu pH-metru. W tabeli 22 przedstawiono wartości pH ekstraktów przed dodaniem ich do hodowli komórkowej.

Tab. 22. Wartości pH 10% ekstraktów z materiałów cPAC w porównaniu z wartością pH dla czystej pożywki

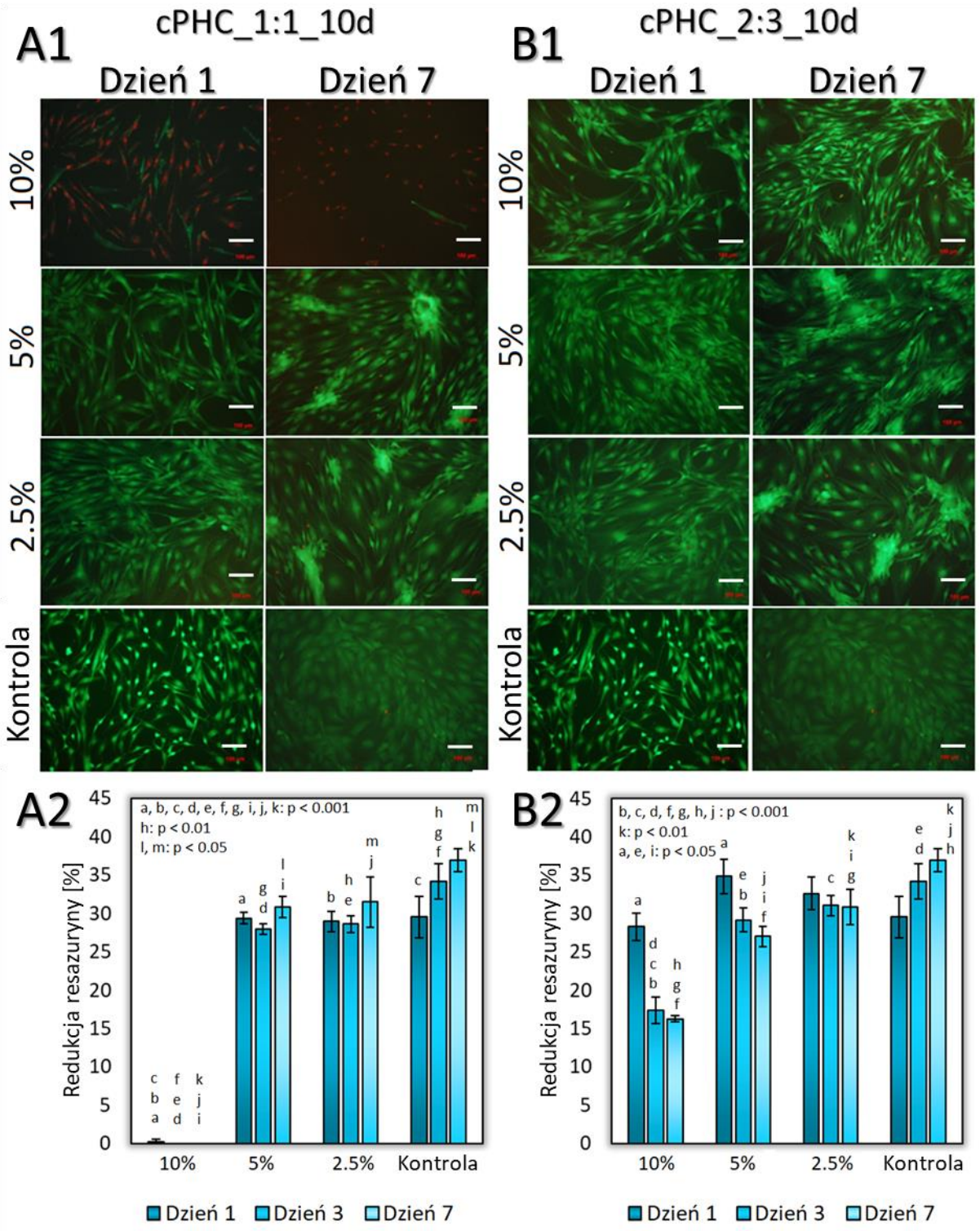
Ekstrakt	cPHC_1:1_10d	cPHC_2:3_10d	cPOC_1:1_10d	cPOC_2:3_10d	DMEM
pH	5.31	6.50	5.61	6.91	7.50

Wszystkie wartości pH wykazują wartości mniejsze w odniesieniu do pH czystego DMEM, co klasyfikuje ekstrakty jako substancje o charakterze kwasowym. Najbardziej znaczący spadek nastąpił w przypadku ekstraktów materiałów otrzymanych w stosunku molowym 1:1 (CTR:diol). Najniższą wartość pH posiadał ekstrakt cPHC_1:1_10d (5,31), nieco wyższą wartością charakteryzował się cPOC_1:1_10d (5,61). Ekstrakty z poliestrów o stosunku molowym 2:3 (CTR:diol) charakteryzowały się wyższymi wartościami pH, które były znacznie bliższe pH obojętnemu. Warto nadmienić, że wartość pH cPOC_2:3_10d na poziomie 6,91 plasowała się niemalże na poziomie pH fizjologicznego, gdyż prawidłowa wartość pH płynów ustrojowych, takich jak płyn wewnątrznaczyniowy czy śródmiąższowy, mieści się w przedziale 7,35-7,45.

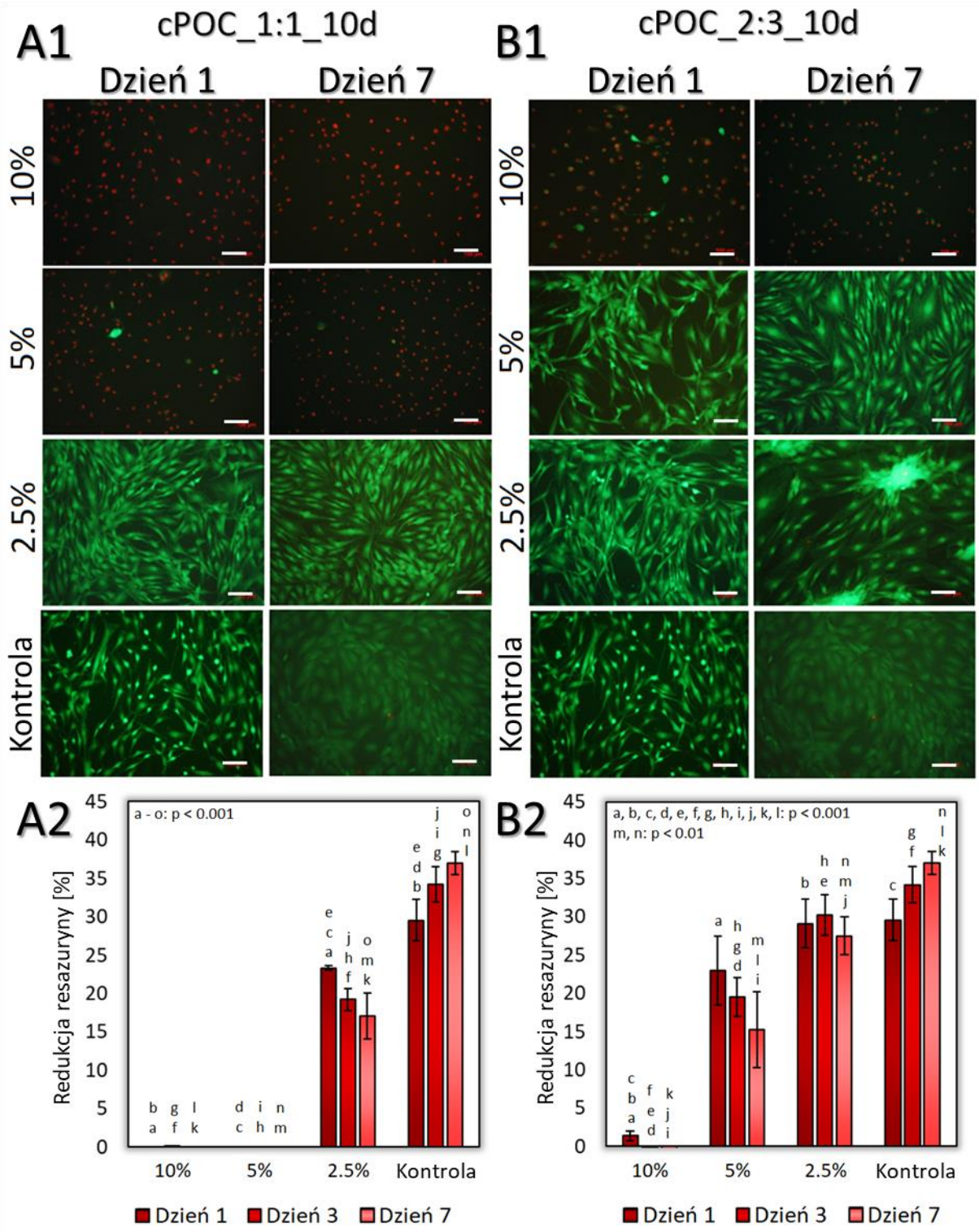
Otrzymane wyniki są ściśle powiązane z wartościami liczb kwasowych prepolimerów. Poliestry oparte na 1,6-heksanodiolu, które powodują największy spadek pH podłoża hodowlanego, mają wyższe wartości liczby kwasowej niż poliestry oparte na 1,8-oktanodiolu, co można wprost odnieść do stwierdzenia, że krótszy diol powoduje większą gęstość molową jednostek cytrynianowych w obrębie określonej makrocząsteczki prepolimeru. Krótszy łańcuch alkilenowy jest również wyjaśnieniem większej hydrofilowości poliestrów PHC w porównaniu z POC, co może prowadzić do ich szybszej hydrolizy w organizmie człowieka. Ponadto, jak wspomniano wcześniej, w materiałach występują wciąż niezwiązane grupy karboksylowe, których zawartość można obniżyć poprzez wprowadzenie modyfikatorów wysycających nadmiar grup karboksylowych w niemodyfikowanym materiale. Zbyt niskie pH środowiska w pobliżu implantowanych rusztowań może mieć negatywny wpływ na komórki, co skutkuje spowolnieniem ich wzrostu oraz upośledzeniem zdolności proliferacyjnych i różnicowania. Płukanie poliestrów w (PBS) lub w medium hodowlanym przed posiewem komórek może zapobiec obniżeniu pH poprzez wypłukiwanie nieprzereagowanych małocząsteczkowych prekursorów i oligomerów. Należy tu zaznaczyć, że prowadzone badania wykonywano w warunkach statycznych podczas gdy w organizmie człowieka występuje stały przepływ płynów, co może skutkować dynamiczną regulacją pH, dzięki ciągłemu wypłukiwaniu uwalniających się z materiału produktów jego degradacji. Pomimo to wyższe wartości pH poliestrów o stosunku molowym 2:3 sugerują ich lepszą biokompatybilność w porównaniu z powszechnie opisywanymi w literaturze polimerami o stosunku 1:1.

- **Analiza proliferacji i metabolizmu komórek inkubowanych w ekstraktach z materiałów cPAC**

Pierwsze podejście do oceny zachowania komórek w pośrednim kontakcie z poliestrami PAC przeprowadzono z wykorzystaniem komórek ASC. Po okresie inkubacji ASC były kontrbarwione kalceiną-AM i jodkiem propidyny (odpowiednio zielonym i czerwonym) w celu określenia ich żywotności i były obserwowane pod mikroskopem fluorescencyjnym. Wyniki w formie zdjęć i wykresów zamieszczono poniżej (Rys. 51 i 52 A1 i B1).



Rys. 51. Wyniki analizy żywotności i proliferacji komórek ASCs oceniane za pomocą barwienia live-dead (komórki zielone - żywe, czerwone - martwe, pasek skali =100 µm; **A1, B1**) oraz testu redukcji resazuryny (**A2, B2**). Komórki hodowano w 10%, 5% i 2,5% ekstraktach z cPHC_1:1_10d i cPHC_2:3_10d oraz na kontroli (TCPS) przez 1, 3 i 7 dni. Istotność statystyczną redukcji resazuryny obliczono według jednokierunkowego testu ANOVA przy $p < 0,001$, $p < 0,01$ i $p < 0,05$. Konkretne rozcieńczenia ekstraktów były porównywane ze sobą w dniach 1, 3 i 7 oddzielnie. Kolumny określone tą samą literą są znacząco różne.



Rys. 52. Wyniki analizy żywotności i proliferacji komórek ASCs oceniane za pomocą barwienia live-dead (komórki zielone - żywe, czerwone - martwe, pasek skali =100 µm; **A1, B1**) oraz testu redukcji resazuryny (**A2, B2**). Komórki hodowano w 10%, 5% i 2,5% ekstraktach z cPOC_1:1_10d i cPOC_2:3_10d oraz na kontroli (TCPS) przez 1, 3 i 7 dni. Istotność statystyczną redukcji resazuryny obliczono według jednokierunkowego testu ANOVA przy $p < 0,001$, $p < 0,01$ i $p < 0,05$. Konkretne rozcieńczenia ekstraktów były porównywane ze sobą w dniach 1, 3 i 7 oddzielnie. Kolumny określone tą samą literą są znacząco różne.

Barwienie żywych komórek za pomocą kalceiny-AM opiera się na wewnątrzkomórkowej reakcji hydrolizy estru. Niefluorescencyjna kalceina-AM, będąca z chemicznego punktu widzenia estrem acetoksymetylowym, po wejściu do wnętrza komórek ulega hydrolizie przez wewnątrzkomórkowe esterazy. Odtwarzany jest kwas karboksylowy, który wykazuje zieloną fluorescencję. Dzięki swojemu niskiemu pH nie może być on wydalony przez komórki, przez co akumuluje się w ich strukturach, nadając żywym komórkom właściwości zielonej fluorescencji. Z kolei jodek propidyny jest używany do wykrywania martwych komórek, ponieważ nie wnika do komórek przez nienaruszoną błonę komórkową ze względu na posiadany ładunek elektryczny. Jednak błony komórkowe komórek w stanie nekrozy lub apoptozy ulegają uszkodzeniu, przez co jodek propidyny może przenikać do wnętrza takich komórek, nadając im czerwoną fluorescencję.

Komórki hodowane w nierozcieńczonych ekstraktach okazały się martwe lub na początku śmierci komórkowej, za wyjątkiem cPHC_2:3_10d. 5% ekstrakt z cPOC_1:1_10d również okazał się śmiertelny dla ASC. Poza tym dużą liczbę żywych komórek stwierdzono zarówno w 5%, jak i 2,5% ekstraktach z cPHC_1:1_10d, cPHC_2:3_10d i cPOC_2:3_10d. Ich morfologia i rozmieszczenie w dołkach w pierwszym dniu nie różniły się od komórek hodowanych w warunkach kontrolnych. Po 7 dniach, w przeciwieństwie do hodowli kontrolnej, komórki układały się w skupiska, zwłaszcza w próbkach ekstraktów z poliestrów cPHC, co wskazuje na większe ilości komórek w próbkach hodowanych na ekstraktach z materiałów cPHC w porównaniu do kontroli TCPS.

Zachowanie ASC w kontakcie z 10% ekstraktami poliestrów badano również za pomocą testu AlamarBlue, w którym intensywność fluorescencji przeliczano na procent redukcji resazuryny, wprost proporcjonalny do aktywności metabolicznej komórek. Test AlamarBlue jest jednostopniowym badaniem aktywności metabolicznej komórek. Do zawiesiny komórek wprowadza się roztwór niefluorescencyjnego, niebieskiego barwnika (soli sodowej resazuryny), która po wniknięciu do komórek żywych ulega redukcji przy wykorzystaniu NADH do rezorufiny. Rezorufina wykazuje właściwości fluorescencyjne (dł. fali emisji = 590 nm), dzięki czemu możliwe jest zobrazowanie komórek żywych i obliczenie procentowej zawartości tych komórek w hodowli, wykorzystując taką samą ilość barwnika, jakiej użyto do barwienia hodowli, zredukowaną w 100% jako próbkę odniesienia.

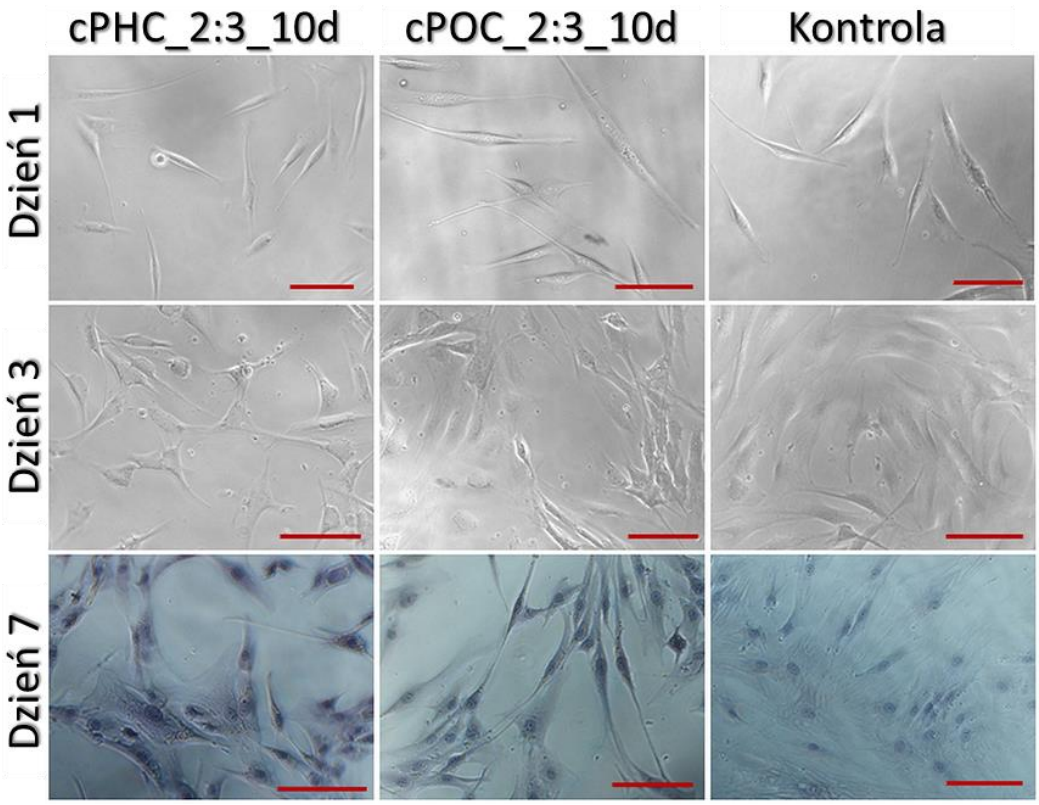
Uzyskane rezultaty (Rys. 51 i 52 A2 i B2) są analogiczne do wyników uzyskanych z barwienia metodą live-dead. Nierozcieńczone ekstrakty (10%) okazały się być cytotoksyczne w każdym przypadku z wyjątkiem cPHC_2:3_10d. Redukcja resazuryny w 5% i 2,5% ekstraktach z poliestrów cPHC była znacznie wyższa niż w ekstraktach z cPOC, osiągając wartości zbliżone do wartości próbki kontrolnej. Aktywność metaboliczna komórek hodowanych w 5% ekstrakcie z cPOC_1:1_10d była bliska 0%, co sugeruje całkowitą śmierć komórek. Większa cytotoksyczność ekstraktów z cPAC_1:1 może być powodowana przez ich wysoką kwasowość w porównaniu do ekstraktów z materiałów cPAC_2:3 (Tab. 22), co powoduje korzystniejsze warunki wzrostu komórek ASC w ekstraktach z tych ostatnich. Jest to najbardziej widoczne w przypadku ekstraktu z cPHC_2:3, który ma pH najbliższe fizjologicznemu, co przekłada się na najwyższą żywotność komórek w ekstraktach z tego materiału. Redukcja resazuryny przez 1,25% i 0,63% ekstrakty ze wszystkich poliestrów (nie przedstawione na wykresach) była prawie taka sama jak w hodowli kontrolnej i nie było między nimi istotnych różnic.

- **Badanie *in vitro* wzrostu i proliferacji komórek ASC hodowanych w bezpośrednim kontakcie z materiałami cPAC**

Ostatnim z przeprowadzonych testów biologicznych były próby hodowli komórek ASC w bezpośrednim kontakcie z powierzchnią materiałów cPAC. Na podstawie analizy wyników z hodowli w ekstraktach oraz biorąc pod uwagę uzyskane wartości pH zdecydowano, że do testów inkubacji bezpośredniej zostaną zastosowane materiały cPHC_2:3_10d i cPOC_2:3_10d. Komórki hodowano przez 1, 3 i 7 dni, a morfologię komórek, ich liczbę, powierzchnię dystrybucji, jak również współczynnik proporcji (długość:szerokość) porównywano z odpowiednimi parametrami komórek hodowanych na kontroli TCPS. Wyniki przedstawiono na zdjęciach i wykresach poniżej (Rys. 53 i 54).

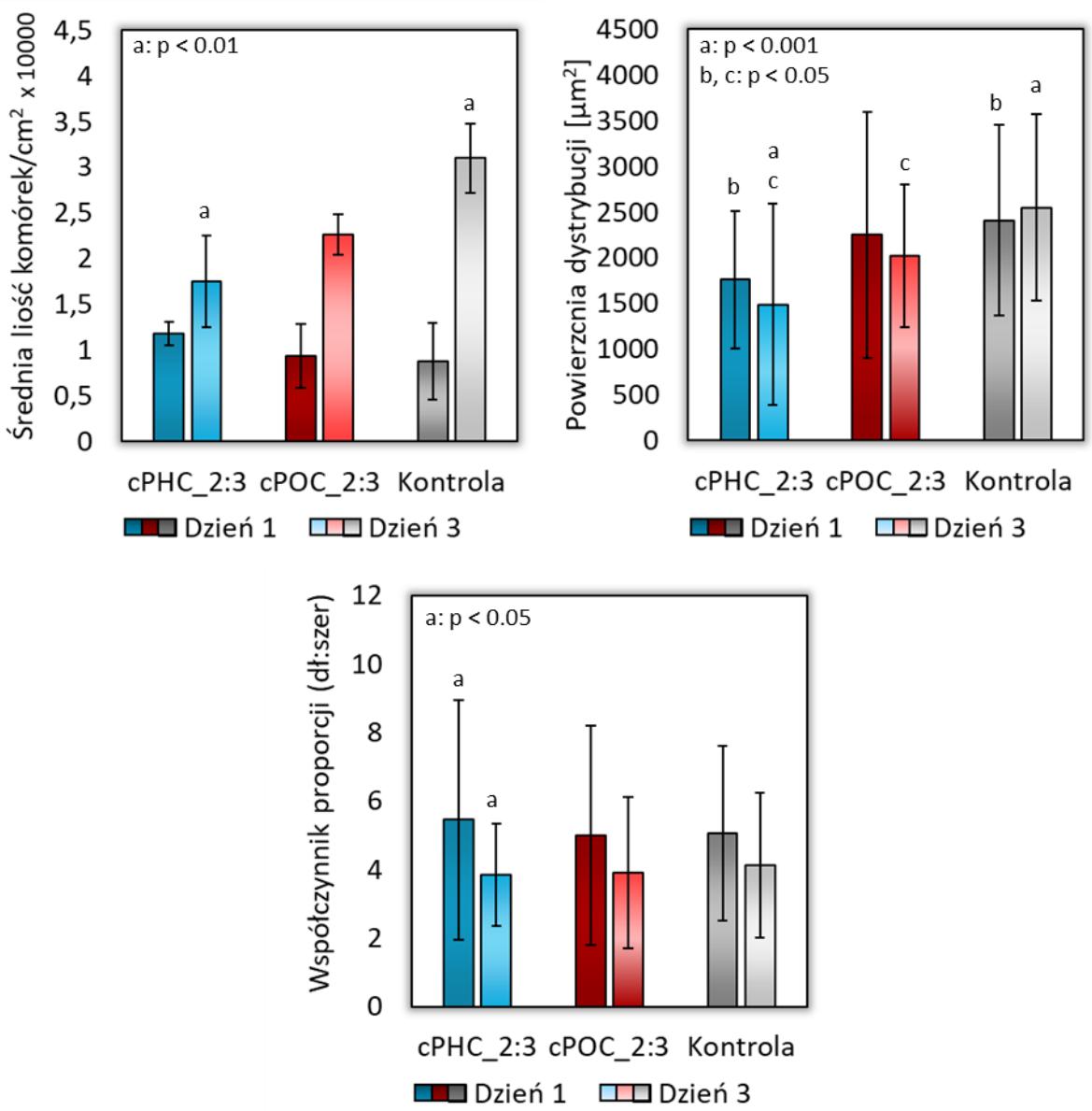
W pierwszym dniu liczba komórek oraz ich morfologia były podobne na obu badanych polimerach oraz na TCPS. Komórki miały kształt wrzecionowaty o współczynniku kształtu ok. 5; jedynie powierzchnia dystrybucji komórek była istotnie mniejsza ($p<0,05$) w przypadku hodowli na cPHC_2:3_10d w porównaniu z TCPS. W trzecim dniu prowadzenia inkubacji powyższe badane parametry dla komórek hodowanych na cPOC_2:3_10d były

podobne jak na TCPS, co może wskazywać na najlepsze spośród badanych materiałów właściwości konieczne do wspierania adhezji i wzrostu ASC.



Rys. 53. Obraz mikroskopowy komórek ASC hodowanych na różnych materiałach cPAC oraz jego porównanie z hodowlami kontrolnymi na TCPS w 1, 3 i 7 dniu hodowli. Do obserwacji w mikroskopii optycznej wykorzystano komórki natywne (dzień 1 i 3) lub komórki barwione hematoksyliną i eozyną (dzień 7). Pasek skali = 100 µm.

Z drugiej strony, na cPHC_2:3_10d zaobserwowano zmniejszenie liczby komórek i powierzchni ich dystrybucji. Różnice w zachowaniu komórek na obu polimerach mogą wynikać z krótszego łańcucha heksametylenowego obecnego w cPHC_2:3_10d, a tym samym ze stosunkowo większej zawartości grup karboksylowych, estrowych i hydroksylowych w cPHC_2:3_10d niż w cPOC_2:3_10d. Jak wcześniej zauważono, cecha ta ma wpływ na pH otaczającego je medium (Tab. 22), co rzutować może na zachowanie się komórek w kontakcie z powierzchnią materiału. Warto jednak zauważyć, że komórki na cPHC_2:3_10d również wykazywały się wysoką przeżywalnością i żywotnością, co ukazały próbki barwione hematoksyliną-eozyną w 7. dniu (Rys. 53).



Rys. 54. Wykresy przedstawiające różnice w średniej gęstości populacji, powierzchni dystrybucji i współczynniku proporcji komórek ASC po 1 i 3 dniach hodowli, hodowanych bezpośrednio na cPHC_2:3_10d, cPOC_2:3_10d, w odniesieniu do próbek kontrolnych na TCPS. Istotność statystyczną otrzymanych wyników obliczono według jednokierunkowego testu ANOVA przy $p < 0,001$, $p < 0,01$ i $p < 0,05$. Konkretne próbki materiałów oraz kontrole były porównywane ze sobą oddzielnie. Kolumny określone tą samą literą są znacząco różne.

Ze względu na silny rozrost komórek, powodujący wielowarstwowe nakładanie się komórek na siebie po 7 dniach inkubacji, obliczenie wartości parametrów przedstawionych na rysunku 54 dla próbek 7 dniowych okazało się niemożliwe.

Na podstawie powyższych wyników badań biologicznych można stwierdzić, że aby zapewnić optymalne warunki do hodowli komórek, konieczne jest odpowiednie dostosowanie

właściwości badanych poliestrów. Uzasadnione jest wprowadzenie dłuższego czasu sieciowania ze względu na większą gęstość sieci polimerowej tak otrzymanego materiału, a w konsekwencji wolniejsze uwalnianie produktów ubocznych jego degradacji. Należy również rozważyć odejście od szeroko opisywanego stosunku molowego 1:1(CTR:diol) na rzecz stosunku molowego 2:3, co zapewnia lepszą neutralizację grup karboksylowych, dzięki czemu środowisko hodowli komórkowej staje się mniej kwaśne i bardziej przyjazne dla komórek. Zachowanie polimerów cPAC w środowisku biologicznym może być również regulowane poprzez zastosowanie dioli o różnej długości łańcucha węglowego, co potwierdzono badaniami *in vitro* w bezpośrednim kontakcie z ASC.

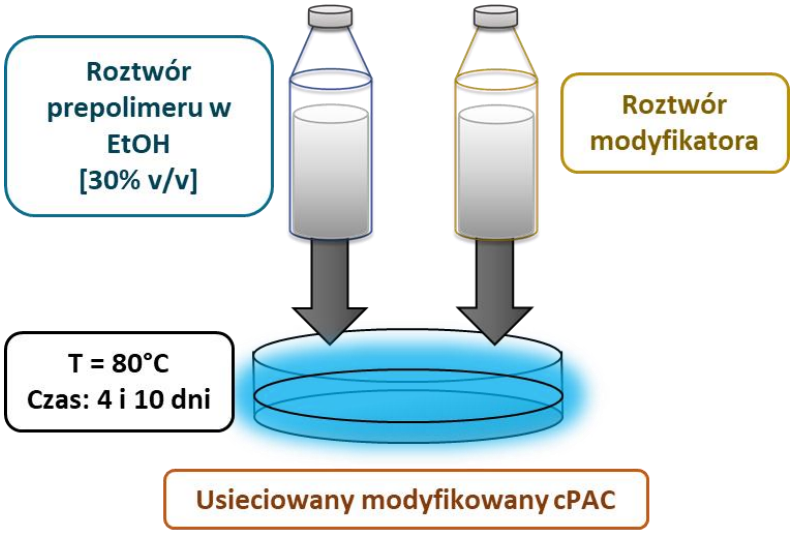
8.1.5. Podsumowanie charakterystyki materiałów kontrolnych cPAC

Przedstawione powyżej wyniki analiz strukturalnych, mechanicznych, fizykochemicznych i biologicznych stanowią całościowy obraz charakterystyki usieciowanych materiałów kontrolnych cPAC. Dzięki zastosowaniu spektroskopii ssNMR potwierdzono stosunek molowy reagentów w końcowym produkcie, który jest zbieżny ze stosunkiem molowym reagentów podczas syntezy oraz w prepolimerze. Stanowi to dowód właściwie dopasowanych parametrów syntezy, oczyszczania i sieciowania poliestrów. Dzięki wynikom spektroskopii ssNMR oszacowano także stopień konwersji grup karboksylowych oraz wykazano, że w warunkach sieciowania etanol w niewielkim stopniu reaguje z resztami cytrynianowymi, tworząc estry. Wyniki analiz wytrzymałościowych oraz powierzchniowych materiałów wskazują na ich prawidłowe właściwości mechaniczne oraz uwydatniają możliwości szerokiej modyfikacji właściwości materiałów do konkretnego zastosowania poprzez prostą manipulację parametrami syntezy. Dzięki szczegółowej analizie właściwości biologicznych, skorelowanych z charakterystyką fizykochemiczną i strukturalną usieciowanych poliestrów, jak i prepolimerów PAC udało się wyeksponować najbardziej obiecujący aspekt badanych materiałów pod względem ich zastosowania – powszechnie opisywany w literaturze stosunek molowy 1:1 (CTR:diol) pod każdym względem ustępuje miejsca materiałom otrzymanym w stosunku molowym 2:3. Oba te materiały wykazują potencjał dalszej funkcjonalizacji, możliwej do zrealizowania przez wprowadzenie cząsteczki modyfikującej do struktury materiału, która może potencjalnie zniwelować część zaobserwowanych różnic. Dlatego też następny etap prac obejmował wytworzenie materiałów modyfikowanych cPAC.

8.2. Materiały cPAC modyfikowane

8.2.1. Omówienie modyfikacji materiałów cPAC

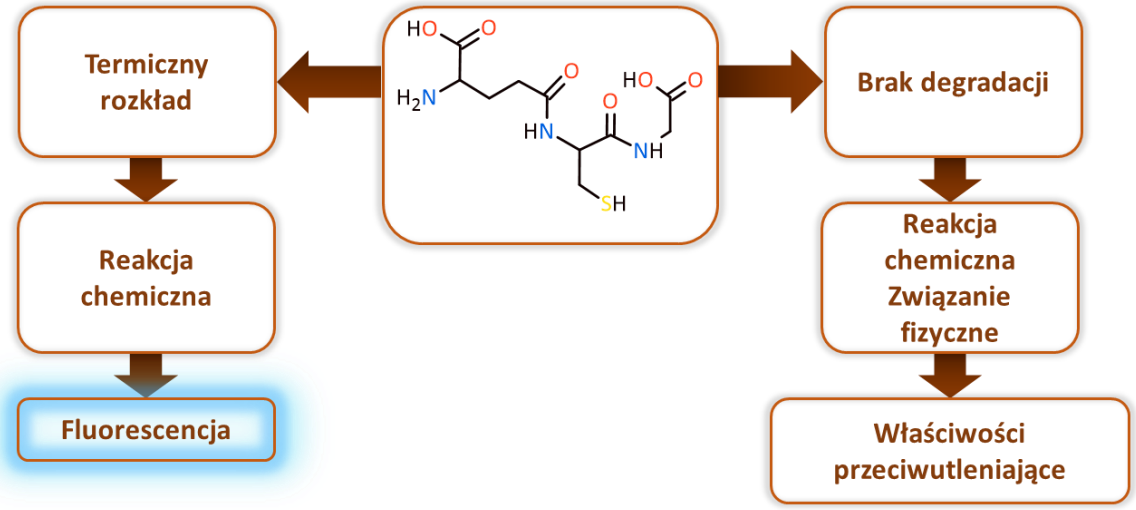
Drugim etapem prowadzonych prac badawczych było przygotowanie i scharakteryzowanie materiałów modyfikowanych PAC. Do ich przygotowania wykorzystano wodne roztwory GSH, sporządzone według opisu zamieszczonego w punkcie 7.3.1.1 które dodawano do etanolowych roztworów prepolimerów, tych samych które służyły do przygotowywania materiałów kontrolnych. Modyfikacje początkowo planowano przeprowadzić na dwa sposoby – powierzchniowo, poprzez wygrzewanie w temperaturze sieciowania przez godzinę już usieciowanych materiałów PAC w roztworach modyfikatora oraz w masie, poprzez dodanie roztworu modyfikatora do prepolimeru przed etapem sieciowania. Ostatecznie na potrzeby niniejszej pracy omawiana będzie tylko modyfikacja w masie (Rys. 55).



Rys. 55. Schemat modyfikacji materiałów PAC w masie. Roztwór niemodyfikowanego prepolimeru jest łączony z roztworem modyfikatora bezpośrednio w formie, a następnie sieciowany w takich samych warunkach, jak materiały kontrolne

Wybór modyfikatora podyktowany był chęcią wprowadzenia dwóch modyfikacji, fluorescencji i właściwości przeciwutleniających w wyniku jednej operacji. Założono, że GSH będzie odpowiednim związkiem modyfikującym ze względu na jego budowę i właściwości, dzięki czemu możliwe jest jego związanie w strukturze materiału na dwa sposoby (Rys. 56). Obecność w strukturze GSH reszt cysteinylowych powoduje możliwość reakcji z CTR po wcześniejszej termicznej dekompozycji cząsteczki GSH do dipeptydu, w wyniku której

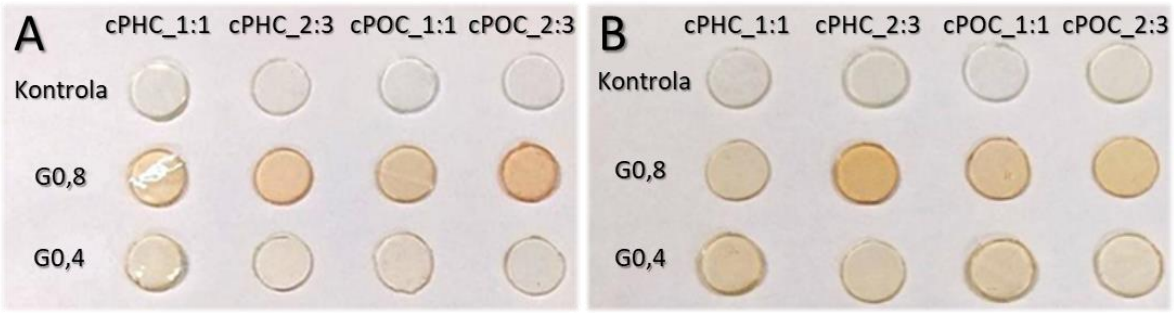
powstaje pochodna 2-pirydonu, [180]. Wywnioskowano więc, że dodatek GSH do prepolimeru przed sieciowaniem powinien skutkować powstawaniem takiej pochodnej wewnątrz sieci materiału. Potencjalne właściwości przeciwutleniające są skutkiem fizycznego i kowalencyjnego związania cząsteczek nieprzereagowanego GSH wewnątrz sieci polimerowej i na powierzchni materiału. Taki sposób związania modyfikatora zapewniłby zdolność materiałom do wygaszania reaktywnych form tlenu przez dłuższy czas, dzięki stopniowemu uwalnianiu GSH w miarę postępu degradacji rusztowania.



Rys. 56. Schemat idei podwójnej modyfikacji materiałów PAC za pomocą GSH

W celu określenia najlepszej ilości modyfikatora w materiale przeprowadzono wstępne próby modyfikacji za pomocą GSH przy użyciu roztworów i w proporcjach opisanych w punkcie 7.3.1.1, a także za pomocą tych samych roztworów w dziesięciokrotnie większej ilości (stężenie GSH w materiałach odpowiednio 4 i 8%). Badania biologiczne tak przygotowanych materiałów wykazały jednak ich wysoką cytotoksyczność, dlatego do dalszych badań wytworzono wyłącznie materiały zawierające 0,4 i 0,8% GSH.

Otrzymano w ten sposób szereg materiałów modyfikowanych, opisanych w tabeli 8 w punkcie 7.3.1.1. Materiały te, podobnie jak materiały PAC kontrolne były przezroczystymi elastomerami o gładkiej powierzchni. Nie różniły się znacząco wizualnie od materiałów kontrolnych, jedyną różnicą była pomarańczowa barwa, której intensywność wzrastała wraz z ilością dodanego GSH (Rys. 57). Prawdopodobnie za powstały kolor odpowiedzialne są małocząsteczkowe produkty powstające w wyniku rozkładu termicznego GSH.



Rys. 57. Wygląd materiałów modyfikowanych PAC otrzymanych po 4 (**A**) i 10 (**B**) dniach sieciowania

Materiały modyfikowane otrzymywano w tych samych formach polipropylenowych, których używano do syntezy materiałów kontrolnych. Modyfikowane PAC były wytwarzane głównie w formie folii o grubości 1-2 mm, z których były następnie docinane do odpowiednich kształtów.

Otrzymane próbki materiałów modyfikowanych posłużyły do przeprowadzenia pełnej charakterystyki fizykochemicznej, mechanicznej i biologicznej. Dzięki jej przeprowadzeniu określono wspomniane właściwości materiałów, a także oszacowano przydatność wytworzonych poliestrów do ich zastosowania w inżynierii tkankowej naczyń krwionośnych.

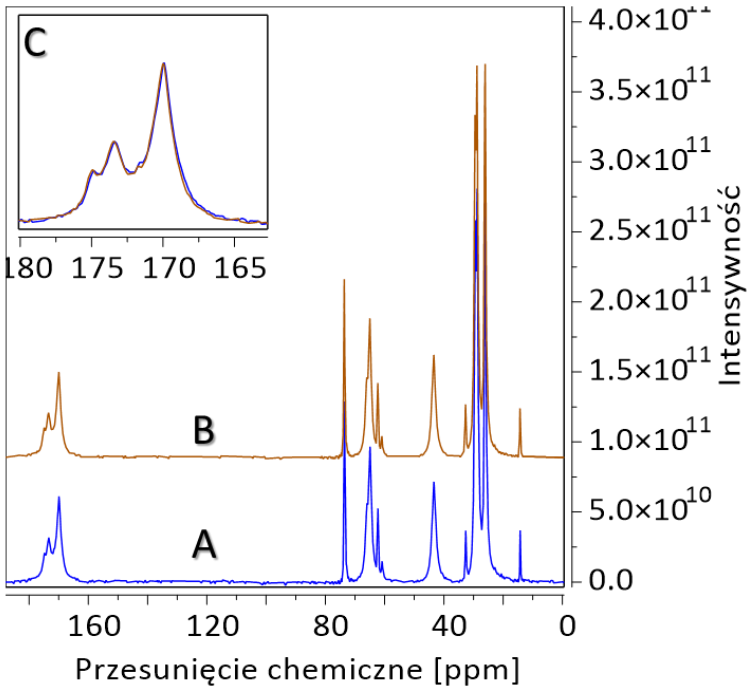
8.2.2. Charakterystyka materiałów modyfikowanych cPAC

Materiały modyfikowane PAC pod wieloma względami charakteryzują się podobnymi właściwościami do ich kontrolnych odpowiedników, dlatego opisane poniżej metody charakterystyki są w większości przypadków tożsame. Niemniej jednak, na skutek wprowadzenia modyfikatora materiały te zyskały nowe funkcjonalności takie, jak fluorescencja czy potencjalne właściwości przeciwutleniające, co wymusiło przeprowadzenie dodatkowych badań potwierdzających wyżej wymienione cechy. Wyniki przeprowadzonych analiz zamieszczono poniżej. Ze względu na dużą ilość otrzymanych materiałów a, co za tym idzie znaczącą ilość powiązanych z nimi wyników, w niektórych punktach przedstawione zostaną jedynie wyniki najbardziej istotne z zaznaczeniem, że dla pozostałych materiałów wyniki te są analogiczne.

8.2.2.1. Wyniki analizy materiałów modyfikowanych cPAC za pomocą NMR dla próbek stałych

Pierwszym krokiem na drodze charakterystyki materiałów modyfikowanych była analiza za pomocą spektroskopii NMR dla próbek stałych. Celem prowadzonych analiz było określenie obecności modyfikatora wewnątrz struktury materiału oraz jego wpływu na obserwowane przesunięcia chemiczne. Analizy otrzymanych widm dokonano w oparciu o różnice pomiędzy widmem materiału kontrolnego, a tym zarejestrowanym dla modyfikowanego cPAC. Widma i ich interpretację zamieszczono poniżej (Rys. 58).

Analiza porównawcza widm ^{13}C MAS NMR zamieszczonych poniżej (Rys. 58 A i B) wykazała brak jakichkolwiek różnic pomiędzy próbkami kontrolnymi i modyfikowanymi. Na widmie ^{13}C MAS NMR dla materiału modyfikowanego cPAC_2:3_4d_G0,8 (Rys. 58B) nie zaobserwowano innych sygnałów, niż te, które opisano dla materiału kontrolnego w punkcie 8.1.4.1. Powyższe obserwacje wskazują na brak wpływu dodatku modyfikatora na strukturę materiału. GSH obecny jest w materiale w zbyt małym stężeniu, aby mógł on zostać zidentyfikowany za pomocą spektroskopii ssNMR, podobnie jak powstający z niego związek fluorescencyjny.



Rys. 58. Widma ^{13}C MAS NMR zarejestrowane dla próbek cPOC_2:3_4d_C (**A**) oraz cPOC_2:3-4d_G0,8 (**B**) oraz zbliżenie nałożonych całek regionu karboksylowego obu widm (**C**)

Analogicznie, jak w przypadku widm dla materiału kontrolnego (pkt. 8.4.1.1.1 i 8.4.1.1.2) przeprowadzono porównanie całek poszczególnych sygnałów w celu potwierdzenia stosunku molowego reszt cytrynianowych i segmentów alkilenowych w materiale oraz określenia stopnia konwersji grup karboksylowych. Otrzymane wartości są identyczne, jak dla materiałów kontrolnych (Tab. 23).

Tab. 23. Porównanie wartości stosunku molowego oraz stopnia konwersji grup karboksylowych w materiałach cPOC_2:3 kontrolnym i modyfikowanym na podstawie analizy widm ^{13}C MAS NMR

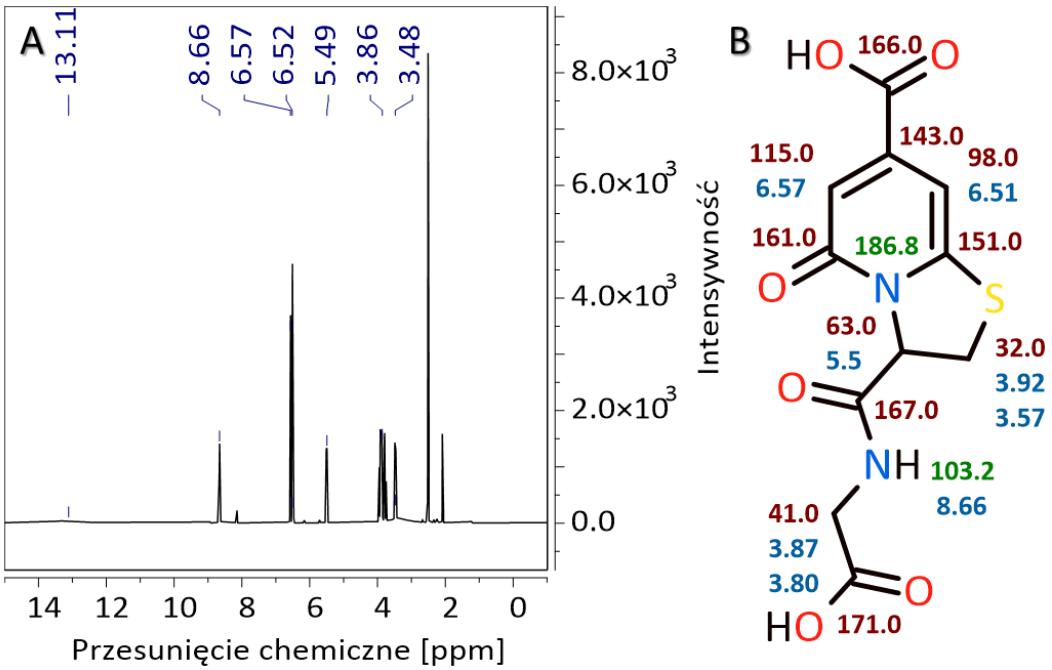
	cPOC_2:3_4d_C	**cPOC_2:3_4d_G0,8**
Stosunek molowy [CTR:diol]	2:3,0	2:3,0
Stopień konwersji	95%	95%

Zaobserwowane podobieństwa między widmami pozwalają wnioskować, że dodatek modyfikatora w stężeniach opisanych w niniejszej pracy nie ma wpływu na strukturę usieciowanych materiałów cPAC. Pomimo powstawania w materiale związku fluorescencyjnego, stosunek reszt cytrynianowych i alkilenowych pozostaje niezmieniony podobnie, jak stopień konwersji grup -COOH (Rys. 58 C). Można więc założyć, że ilość niezwiązanych grup karboksylowych, pomimo zachodzącej reakcji nie uległa istotnej zmianie. Ma to znaczenie z punktu widzenia właściwości biologicznych – zwiększenie liczności grup karboksylowych w materiale powodowałoby jego niższe pH, a w konsekwencji, pogorszenie właściwości biologicznych. Brak obserwowanych zmian w stopniu konwersji można także tłumaczyć mechanizmem powstawania samego fluoroforu (Rys. 61 na s. 135). W reakcji biorą udział dwie grupy -COOH z reszty cytrynianowej. Powstający fluorofor, zgodnie z przedstawionym mechanizmem reakcji posiada dwie grupy -COOH, jednak za pomocą jednej z nich połączony jest z łańcuchem polimeru. Wychodzi więc na to, że na każdą powstającą cząsteczkę fluoroforu zużywane są dwie grupy karboksylowe, ale w wyniku reakcji w łańcuch zostaje wbudowana dodatkowa jedna grupa karboksylowa na końcu reszty fluoroforu. Tak niewielka zmiana jest niemożliwa do zaobserwowania za pomocą spektroskopii ssNMR.

8.2.2.2. Właściwości spektroskopowe modyfikowanych materiałów cPAC

8.2.2.2.1. Źródło fluorescencji materiałów modyfikowanych cPAC

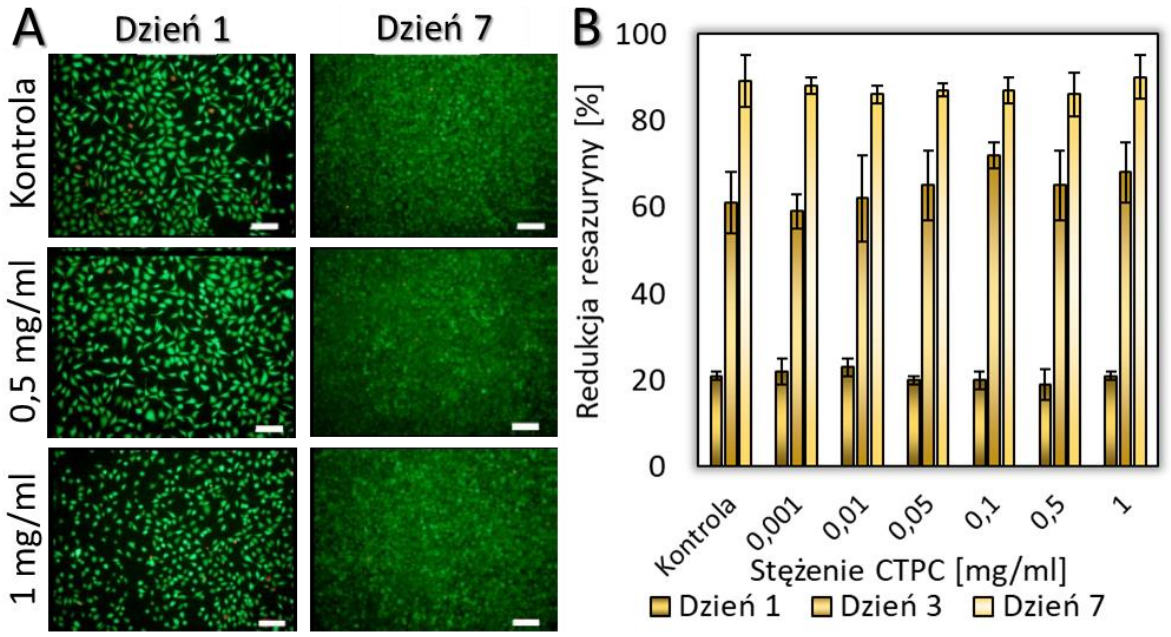
Kolejnym krokiem opisywanej charakterystyki było określenie właściwości optycznych otrzymanych materiałów. Fluorescencja materiałów modyfikowanych cPAC jest spowodowana tworzeniem się związku fluorescencyjnego z GSH i CTR, znanego jako CTPC. Związek ten został otrzymany i scharakteryzowany w zespole badawczym, w którym powstała niniejsza praca i znalazł zastosowanie analityczne w oznaczaniu GSH w suplementach diety. W wyniku prowadzonych badań opracowano mechanizm syntezy, właściwości spektroskopowe oraz pełną strukturę otrzymanego związku (Rys. 59 A i B), a także przeanalizowano jego właściwości biologiczne [180].



Rys. 59. A – Widmo ^{1}H NMR CTPC oraz przedstawienie struktury wraz z przypisaniami przesunięć chemicznych do atomów węgla, wodoru i azotu **(B)** [180]

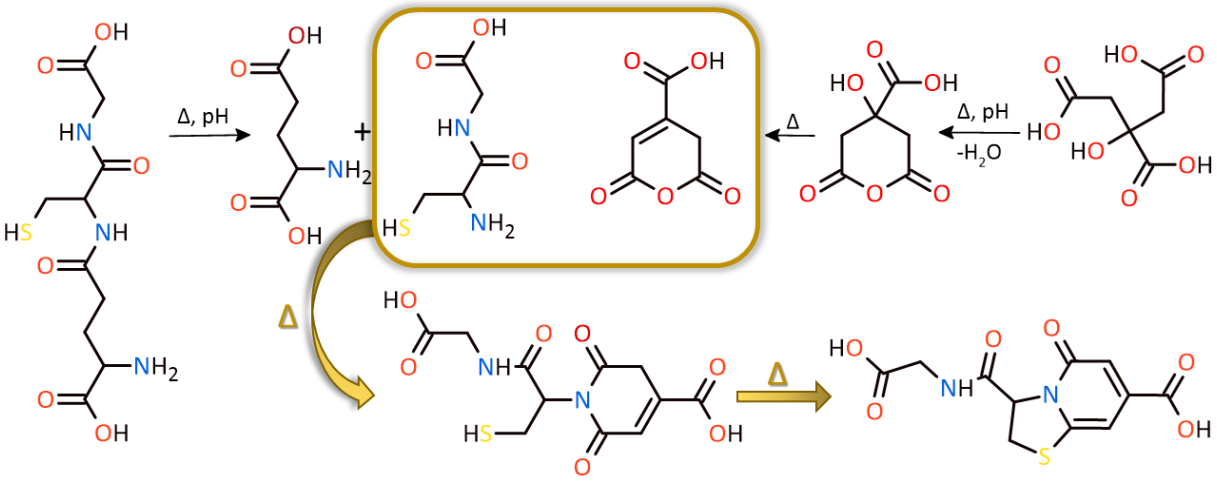
CTPC jest fluoroforem o wyraźnej, niebieskiej fluorescencji o maksimum emisji przy 444 nm przy wzbudzeniu światłem o długości fali 365 nm. Względna wydajność kwantowa wynosi 50% (w odniesieniu do kumaryny I). Związek ten, oprócz zdefiniowanych właściwości spektroskopowych charakteryzuje się również brakiem cytotoksyczności, co potwierdzono

badaniami biologicznymi (Rys. 60 A i B). Pozwala to sądzić, że powstający w materiale fluorofor także nie będzie powodować zaburzeń we wzroście i proliferacji komórek.



Rys. 60. A – zdjęcia mikroskopii fluorescencyjnej z barwienia live/dead za pomocą kalceiny AM i jodku propidyny komórek L929 hodowanych w obecności roztworów CTPC w DMEM o stężeniach 1 mg/ml oraz 0,5 mg/ml wobec próby kontrolnej (czysty DMEM) po 1 i 7 dniach inkubacji, **B** – wyniki aktywności metabolicznej zmierzonej testem Alamar Blue dla komórek L929 dla wszystkich badanych stężeń CTPC po 1, 3 i 7 dniach inkubacji wobec próby kontrolnej. Istotność statystyczną zmierzono przy wykorzystaniu jednokierunkowego testu ANOVA przy $p<0,1$, $p<0,05$ i $p<0,001$. Nie znaleziono istotnych różnic w obrębie tych samych dni inkubacji

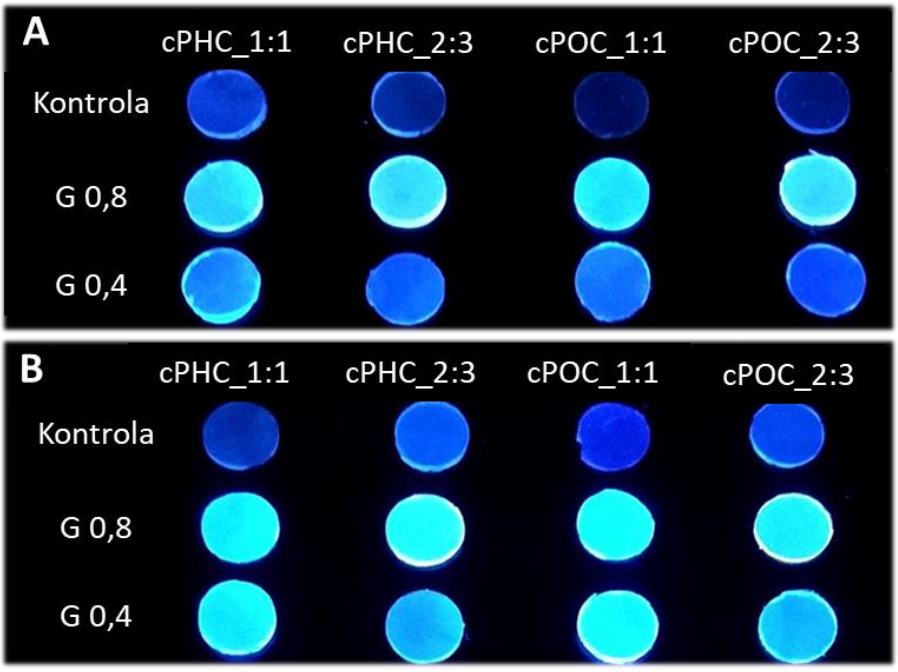
CTPC otrzymywany jest w reakcji CTR z GSH w podwyższonej temperaturze (Rys. 61). Wykazano, że reakcja zachodzi nie pomiędzy cząsteczkami CTR i GSH, ale pomiędzy dipeptydem glicylo-cysteinylowym, tworzącym się po rozerwaniu wiązania w cząsteczce GSH i oddzieleniu cząsteczki kwasu L-glutaminowego. Reakcja ta zachodzi także w materiałach, pomiędzy resztami cytrynianowymi oraz powstającymi w warunkach reakcji produktami rozkładu GSH. Powstające na końcach łańcuchów polimerowych cząsteczki fluoroforu nadają materiałom właściwości fluorescencyjne.



Rys. 61. Prawdopodobny mechanizm powstawania CTPC [180]

8.2.2.2.2. Wyniki analizy właściwości spektroskopowych materiałów modyfikowanych cPAC

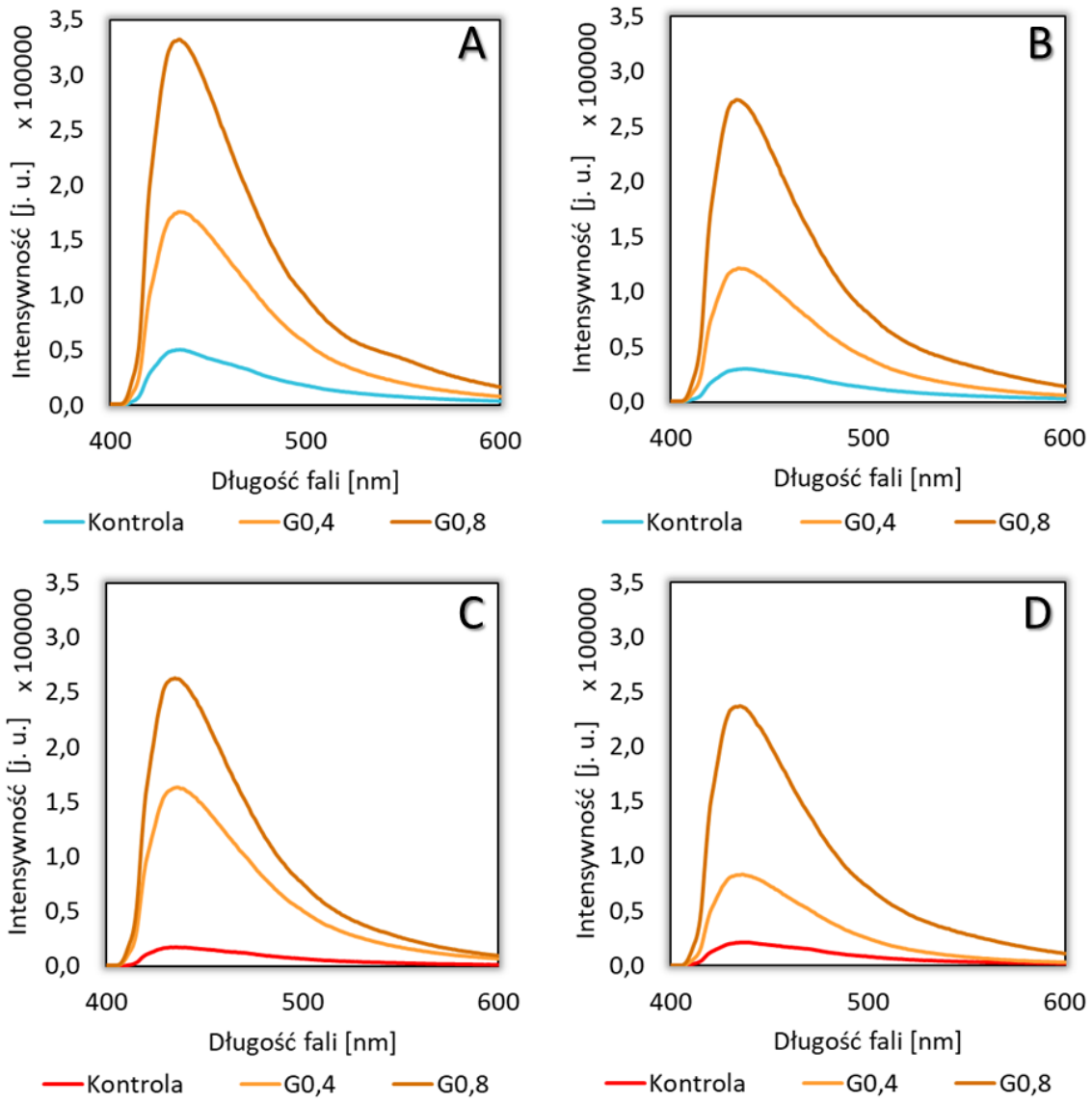
Pierwszym badaniem było przeprowadzenie obserwacji materiałów w świetle lampy UV o długości fali wzbudzenia 365 nm. (Rys. 62).



Rys. 62. Modyfikowane materiały PAC pod lampą UV o długości fali wzbudzenia 365 nm. **A** – materiały otrzymane po 4 dniach sieciowania, **B** – materiały otrzymane po 10 dniach sieciowania

Badane materiały odznaczają się niebieską fluorescencją. zależną od stężenia zastosowanego modyfikatora, natomiast sam materiał kontrolny również wykazuje niewielką

autofluorescencję. Wykonano więc szczegółowe analizy materiałów z użyciem spektrofluorymetru. Wyniki zamieszczone zostały poniżej (Rys. 63).



Rys. 63. Widma emisji fluorescencji dla materiałów modyfikowanych oraz materiałów kontrolnych otrzymanych po 4 dniach sieciowania. **A** – cPHC_1:1, **B** – cPHC_2:3, **C** – cPOC:1:1, **D** – cPOC_2:3. Długość fali wzbudzenia wynosiła 355 nm.

Na przedstawionych widmach można zauważyć charakterystyczne pasma emisji z wyraźnym maksimum przy długości fali 444 nm i charakterystycznym ogonowaniem w kierunku fal dłuższych. Identyczne pasma były obserwowane na widmach emisji czystego CTPC, co potwierdza jego powstawanie *in situ* w warunkach prowadzenia sieciowania [180]. Należy jednak zauważyć, że obserwowane ogonowanie może być efektem zastosowanego w trakcie pomiarów filtra, odcinającego widmo lampy wzbudzającej.

Intensywność obserwowanej fluorescencji zwiększa się wraz ze wzrostem ilości dodanego modyfikatora, nie jest to jednak zależność liniowa, co może świadczyć o nierównomiernym przereagowaniu GSH do fluoroforu. Należy mieć jednak na uwadze kilka czynników. Po pierwsze, duże rozproszenie modyfikatora, poniżej 1% zawartości w materiale, przekłada się na znacznie obniżone prawdopodobieństwo zajścia reakcji kondensacji pomiędzy resztami cysteinylowymi a resztami cytrynianowymi. Cząsteczki GSH muszą spotkać się z odpowiednio usytuowaną resztą cytrynianową, która będzie nie tylko posiadać zablokowaną maksymalnie jedną grupę karboksylową, ale też znajdzie się w odpowiednim otoczeniu sterycznym, umożliwiającym zajście reakcji. Co więcej, zablokowana nie może być jedna z grup skrajnych reszty cytrynianowej, lecz grupa centralna, co, jak wykazano w analizach NMR prepolimerów i materiałów usieciowanych jest sytuacją bardzo rzadką. Kolejnym istotnym parametrem jest fakt, że, zgodnie z przedstawioną powyżej reakcją tworzenia się fluoroforu, cząsteczka GSH musi ulec termicznemu rozkładowi do dipeptydu glicylo-cysteinylowego, który reaguje z resztami cytrynianowymi. Temperatura reakcji sieciowania (80°C) pozwala na rozkład tylko części cząsteczek GSH, co potwierdzają opisane w punkcie 8.2.2.3 właściwości przeciwutleniające zaobserwowane dla badanych materiałów, wynikające z obecności nieprzereagowanego GSH w materiale. Kolejnym czynnikiem zaburzającym odbiór fluorescencji materiału są mechanizmy wygaszania fluorescencji oraz efekt filtra wewnętrznego. Gęsta sieć polimeru może powodować rozpraszanie się wiązki światła wzbudzającego, co w przypadku poliestrów o mniejszej zawartości fluoroforu może powodować mniejsze prawdopodobieństwo wzbudzenia cząsteczek i w konsekwencji osłabienie odpowiedzi fluorescencyjnej materiału. Wszystkie powyższe czynniki mogą przełożyć się na obserwowane wahania w intensywności fluorescencji.

Powyższe rozważania nie zmieniają jednak faktu obserwowanej zależności intensywności fluorescencji od rodzaju diolu i stosunku molowego reagentów. Na widmach wyraźnie widoczne jest zmniejszanie się pasm emisji dla materiałów otrzymanych w stosunku 2:3 (CTR:diol), w porównaniu do materiałów w stosunku 1:1, co jest skutkiem występowania nadmiaru molowego reszt cytrynianowych w tych ostatnich, który przekłada się na większe prawdopodobieństwo zajścia reakcji. Materiały otrzymane w stosunku molowym 1:1 są bardziej kwasowe, co wpływa korzystnie na zapewnienie odpowiedniego

środowiska do rozerwania wiązań peptydowych w cząsteczce GSH. Fluorescencja materiałów zależna jest również od zastosowanego diolu – materiały otrzymane z 1,6-heksanodiolu wykazują wyższą fluorescencję od swoich oktametylenowych analogów. Może być to wynikiem opisywanej wcześniej większej gęstości molowej reszt cytrynianowych w tych materiałach ze względu na krótszy łańcuch alkilenowy w polimerach cPHC.

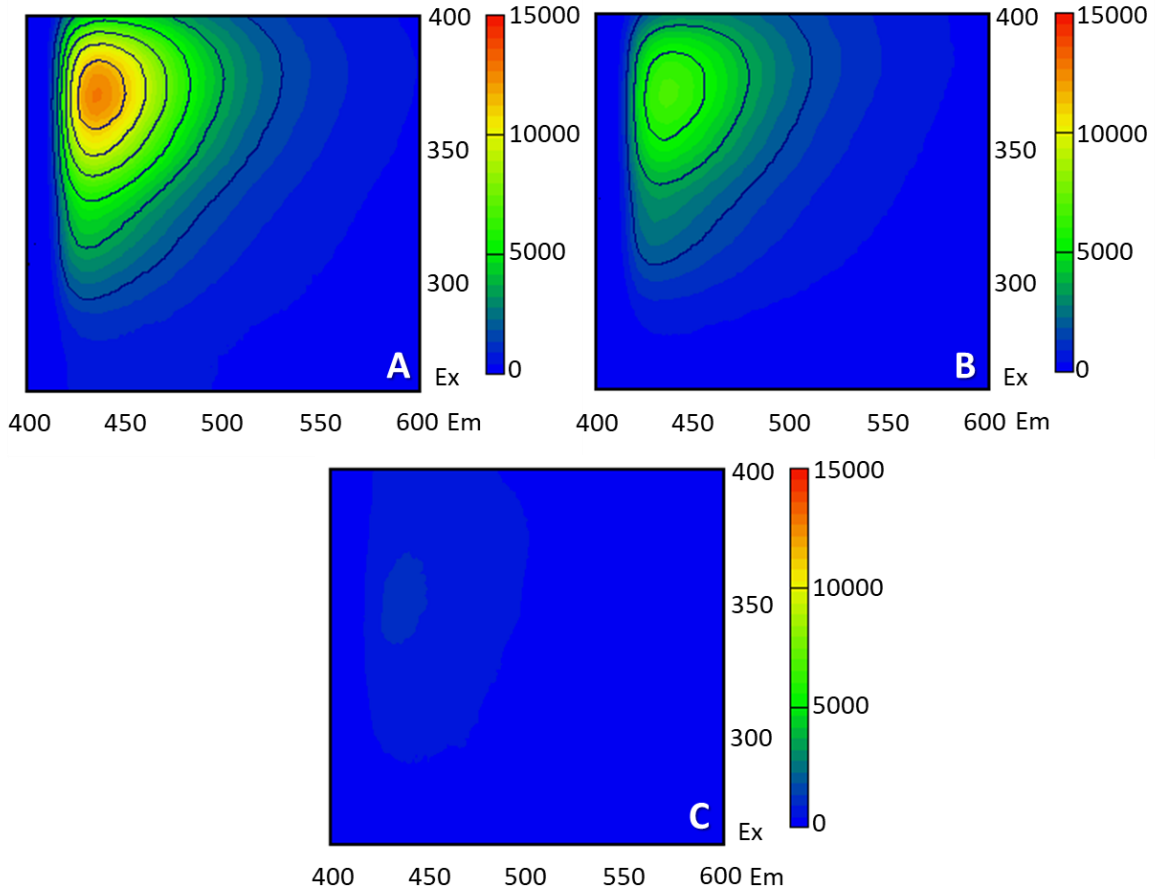
Zauważono również wpływ czasu sieciowania na intensywność fluorescencji. Dla polimerów sieciowanych przez 10 dni zaobserwowano wszystkie powyżej opisane zależności, jednak zarówno wpływ stosunku molowego, jak i użytego diolu odznaczają się jeszcze wyraźniej. Dłuższy czas reakcji powoduje zwiększenie intensywności fluorescencji w materiale o najwyższym prawdopodobieństwie zajścia reakcji (cPHC_1:1), natomiast wyższa gęstość usieciowania, wzrastająca w miarę wydłużania sieciowania powoduje zablokowanie większej ilości grup karboksylowych, co skutkuje zmniejszeniem fluorescencji materiałów w stosunku molowym 2:3. Największy spadek intensywności emisji jest zauważalny dla cPOC_2:3_10d, który dzięki obecności w strukturze dłuższego łańcucha oktametylenowego posiada najmniejszy udział molowy reszt cytrynianowych spośród badanych materiałów (Tab. 24).

Tab. 24. Porównanie maksimów emisji fluorescencji materiałów kontrolnych i modyfikowanych PAC uzyskanych po 4 i 10 dniach sieciowania. Odczytu dokonano dla wartości przy długości fali 444 nm

cPHC		**cPOC**	
Próbka	**Maksimum emisji [j. u.]**	**Próbka**	**Maksimum emisji [j. u.]**
1:1_4d_G0,8	331786	1:1_4d_G0,8	263361
1:1_4d_G0,4	175889	1:1_4d_G0,4	163040
1:1_4d	50611	1:1_4d	17132
1:1_10d_G0,8	357542	1:1_10d_G0,8	265244
1:1_10d_G0,4	228481	1:1_10d_G0,4	146406
1:1_10d	28578	1:1_10d	65080
2:3_4d_G0,8	274319	2:3_4d_G0,8	236774
2:3_4d_G0,4	121708	2:3_4d_G0,4	82664
2:3_4d	30431	2:3_4d	21235
2:3_10d_G0,8	268288	2:3_10d_G0,8	150158
2:3_10d_G0,4	132495	2:3_10d_G0,4	124337
2:3_10d	54279	2:3_10d	45731

Zauważono także, że materiały kontrolne wykazują niewielką autofluorescencję, która jest niezależna od parametrów wskazanych powyżej. Jest ona najprawdopodobniej rezultatem reakcji indukowanej temperaturą cyklizacji reszt cytrynianowych do pięcio- i sześcioczłonowych form pierścieniowych, które również wykazują właściwości fluorescencyjne [228]. Udział autofluorescencji materiałów jest jednak bardzo niewielki i nie zaburza on odczytu odpowiedzi fluorescencyjnej modyfikowanych PAC.

Wykonano także trójwymiarowe mapy fluorescencji materiałów modyfikowanych zamieszczone poniżej (Rys. 64). Widać na nich wyraźną zależność intensywności fluorescencji od ilości zastosowanego modyfikatora. Można także zauważyć brak dodatkowych pasm wzbudzenia czy emisji, co świadczy o powstawaniu w materiale jednego typu fluoroforu odznaczającego się intensywną emisją. Wykonano mapy dla wszystkich badanych poliestrów, jednak w celu zachowania przejrzystości pracy, w niniejszym tekście zamieszczono jedynie widma 3D dla cPHC_1:1_4d.

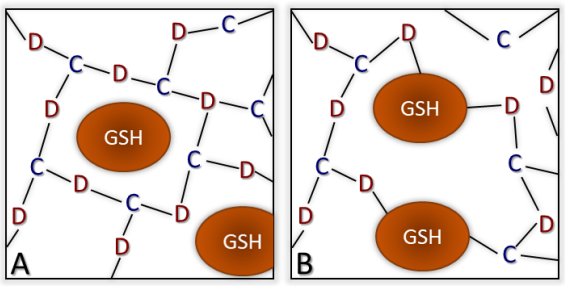


Rys. 64. Mapy fluorescencji dla materiałów cPHC_1:1_4d_G0,8 (**A**), cPHC_1:1_4d_G0,4 (**B**) oraz cPHC_1:1_4d kontrolnego (**C**). Mapy wykonano przy długości fali wzbudzenia w zakresie 250 – 400 nm, oraz dla długości fal emisji w zakresie 400 – 600 nm

Wszystkie opisane powyżej wyniki pozwalają zakwalifikować otrzymane materiały modyfikowane PAC jako materiały fluorescencyjne. Opisane powyżej właściwości emisyjne materiałów jednoznacznie potwierdzają skuteczne wprowadzenie zamierzonej modyfikacji, jaką była fluorescencja. Z punktu widzenia aplikacyjnego, wskazuje to na możliwość wprowadzenia w strukturę materiałów cPAC również innych związków na drodze tej samej procedury w celu przesunięcia maksimum emisji w kierunku fal dłuższych. Następnym krokiem w charakterystyce otrzymanych materiałów stało się opisanie ich właściwości przeciwutleniających.

8.2.2.3. Wyniki analizy właściwości przeciwutleniających materiałów modyfikowanych cPAC

Nadanie właściwości przeciwutleniających poliestrom z CTR za pomocą GSH stanowi nowatorską modyfikację materiałów PAC. Wprowadzenie tripeptydu, jakim jest GSH do struktury poliestru odbywa się dwoma drogami. Pierwszą jest opisana powyżej reakcja tworzenia się pochodnej fluorescencyjnej, której fragment pochodzi z rozkładu cząsteczki GSH. Drugą możliwością jest związanie nieprzereagowanego GSH w sieci polimerowej materiału. Cząsteczki GSH mogą ulegać unieruchomieniu wewnątrz sieci polimerowej na dwa sposoby. Mogą one zostać fizycznie zamknięte pomiędzy węzłami sieci podczas procesu sieciowania, a także, dzięki obecności grup karboksylowych i aminowych w resztach glicylowych i glutamylowych, cząsteczki GSH mogą w warunkach sieciowania ulegać przemianie do estrów i amidów i łączyć się kowalencyjnie z resztami alkilenowymi i cytrynianowymi na końcach łańcuchów polimerów (Rys. 65). Tak związany przeciwutleniacz nadal zachowywałby swoje właściwości, a materiał zyskiwał nową funkcjonalność w postaci możliwości neutralizacji wolnych rodników.

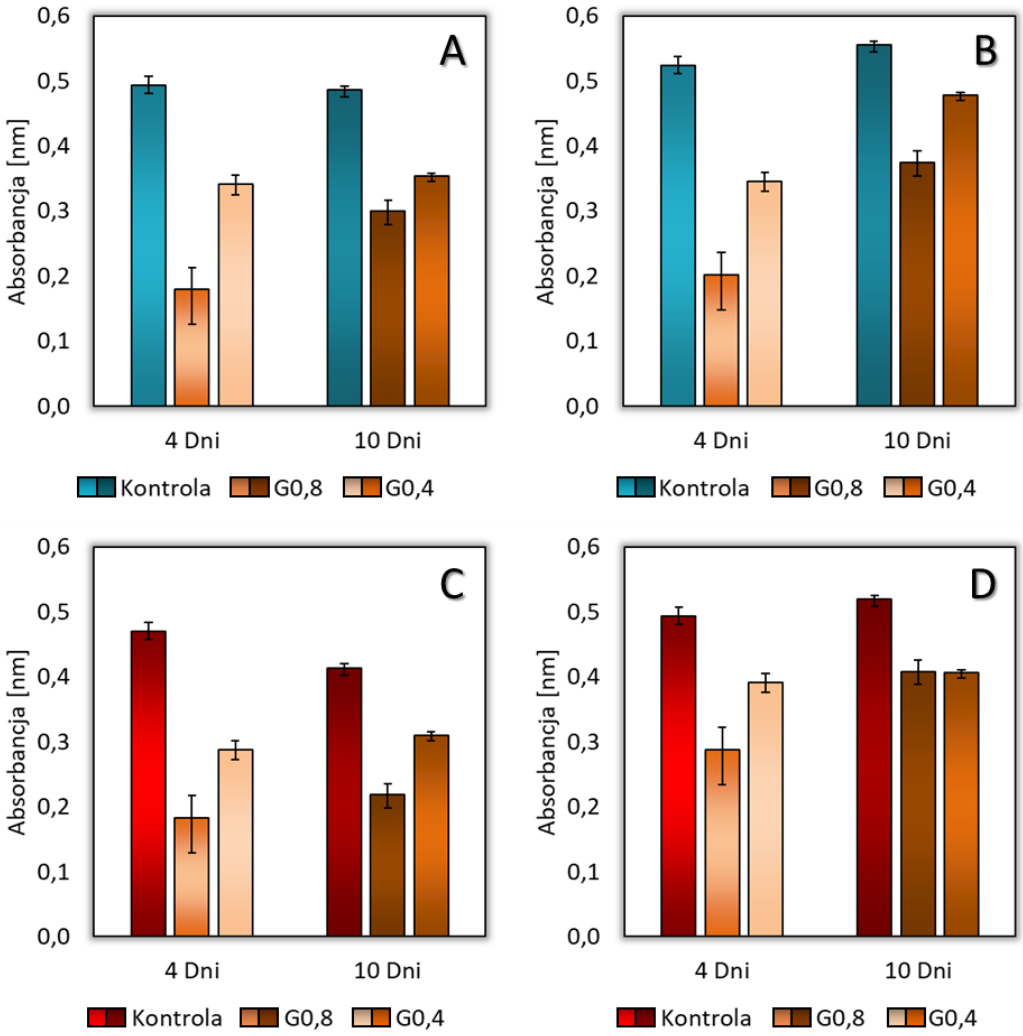


Rys. 65. Sposób wiązania cząsteczek GSH w materiale. **A** – fizyczne zamknięcie wewnątrz węzłów sieci polimeru, **B** – kowalencyjne połączenie z resztami alkilenowymi i cytrynianowymi. **C** – cytrynian, **D** - alkilen

Modyfikacja ta jest szczególnie istotna z punktu widzenia stosowania materiału w kontakcie z komórkami. Wprowadzany do organizmu syntetyczny polimer będzie rozpoznawany przez komórki jako substancja obca i potencjalnie niebezpieczna, w wyniku czego komórki doświadczą zjawiska stresu oksydacyjnego, opisanego we wstępie literaturowym niniejszej pracy. Obecność w materiale cząsteczek przeciwutleniacza może w znaczący sposób ograniczyć ten efekt, tym samym prowadząc do zmniejszenia ryzyka odrzucenia rusztowania i powstawania stanów zapalnych. Materiały modyfikowane PAC poddano testom na obecność takich właściwości poprzez reakcję z rodnikiem DPPH. Metoda polega na spektrofotometrycznym oznaczaniu zmiany barwy roztworu DPPH przy długości fali absorpcji = 517 nm. Silnie purpurowy roztwór DPPH w kontakcie z przeciwutleniaczem na skutek wygaszenia rodnika ulega stopniowemu odbarwieniu do barwy jasnożółtej. Wyniki zamieszczono poniżej (Rys. 66).

Na zamieszczonych wykresach wyraźnie widać obniżenie wartości absorbancji wraz ze wzrostem ilości użytego GSH. Obserwowane obniżenie jest zależne od stosunku molowego reagentów, a także od czasu sieciowania materiałów. Materiały otrzymane w stosunku molowym 1:1 (CTR:diol) wykazują lepsze właściwości przeciwutleniające w stosunku do materiałów otrzymanych w stosunku molowym 2:3. Wiąże się to ze wspomnianą wcześniej mniejszą gęstością usieciowania tych materiałów, co pozwala na łatwiejszą desorpcje cząsteczek GSH do otoczenia, co skutkuje lepszymi właściwościami przeciwutleniającymi materiałów otrzymanych w stosunku molowym reagentów 1:1 (CTR:diol).

Różnice są widoczne również dla materiałów sieciowanych przez 4 i 10 dni. Wartości absorbancji rosną wraz ze zwiększaniem długości sieciowania, co wskazuje na osłabienie właściwości przeciwutleniających. Analogicznie jak wyżej, w miarę postępu czasu postpolimeryzacji wzrasta gęstość usieciowania, co utrudnia możliwość wydostania się cząsteczek GSH z materiałów, skutkując obniżeniem ich potencjału redukcyjnego. Nie zauważono natomiast wpływu zastosowanego diolu na wartości absorbancji badanych próbek. Wskazuje to na fakt, że jedynym czynnikiem ograniczającym właściwości przeciwutleniające materiałów jest jego gęstość usieciowania.



Rys. 66. Porównanie właściwości przeciwutleniających modyfikowanych materiałów PAC w zależności od długości czasu sieciowania. **A** – cPHC_1:1, **B** – cPHC_2:3, **C** – cPOC_1:1, **D** – cPOC_2:3. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 517 nm.

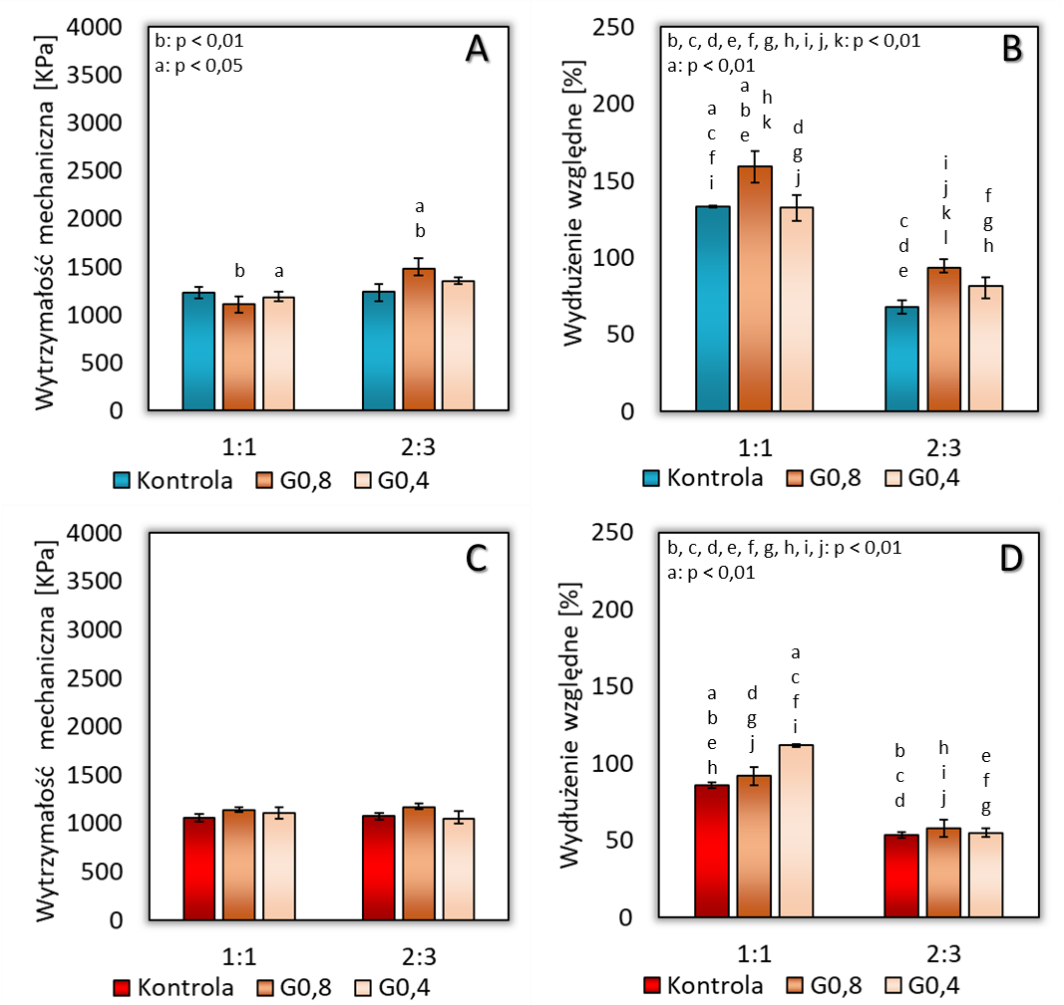
Omówione powyżej wyniki wskazują na powodzenie zastosowanej modyfikacji i wprowadzenia nowej funkcjonalności, jaką są właściwości przeciwutleniające do materiałów PAC. Otrzymane wyniki zdają się potwierdzać fakt wbudowania się cząsteczek GSH w sieć polimerową na dwa sposoby opisane we wstępie do niniejszego paragrafu. Reakcja pomiędzy resztami cytrynianowymi i cysteinylowymi skutkuje powstawaniem produktu fluorescencyjnego, natomiast zamykanie fizyczne i kowalencyjne cząsteczek GSH wewnątrz sieci polimerowej powoduje nadanie materiałom właściwości redukujących reaktywne formy tlenu. Na potwierdzenie tej tezy należy przywołać mechanizm aktywności biologicznej GSH. Polega on na reakcji cząsteczek GSH z reaktywnymi formami tlenu przy ich jednoczesnej przemianie w tzw. formę utlenioną (GSSG). Forma ta przyjmuje postać dimeru, w której

cząsteczki GSH łączą się ze sobą poprzez wytworzenie mostków disiarczkowych pomiędzy grupami -SH reszt cysteinylowych [229]–[231]. W reakcji GSH z CTR reszty te zostają zablokowane, a tym samym powstały fluorofor nie może wykazywać właściwości przeciwutleniających, co jednoznacznie potwierdza obecność natywnych cząsteczek GSH wewnątrz sieci materiałów PAC. Ta wiedza pozwala sądzić, że każdy materiał będzie posiadał identyczne właściwości przeciwutleniające w całej objętości, co stanowi obiecujący wniosek w kontekście ich zastosowania w bioinżynierii tkanek miękkich. Rusztowania z takiego materiału będą uwalniać cząsteczki GSH stopniowo, w miarę postępu degradacji, zapewniając otaczającym je komórkom dogodne warunki do proliferacji przez dłuższy czas. Otrzymane wyniki wskazują również na relatywnie wysoką skuteczność GSH w redukcji rodników DPPH pomimo niewielkiej zawartości modyfikatora w materiale. Przekłada się to na fakt braku wpływu modyfikatora na właściwości mechaniczne materiałów. Na potwierdzenie tych słów wykonano pełną charakterystykę wytrzymałościową badanych materiałów, którą opisano w następnych paragrafach.

8.2.2.4. Wyniki badań mechanicznych materiałów modyfikowanych cPAC

Każda modyfikacja materiałów polimerowych niesie ryzyko zaburzenia właściwości mechanicznych takiego polimeru. W opisywanych w niniejszej pracy materiałach modyfikator stanowi mniej, niż 1% zawartości materiału, niemniej jednak nawet tak niewielka ilość mogła mieć wpływ na wytrzymałość materiałów cPAC. W celu oszacowania tego wpływu przeprowadzono pełną charakterystykę wytrzymałościową badanych materiałów, a jej wyniki opisano poniżej.

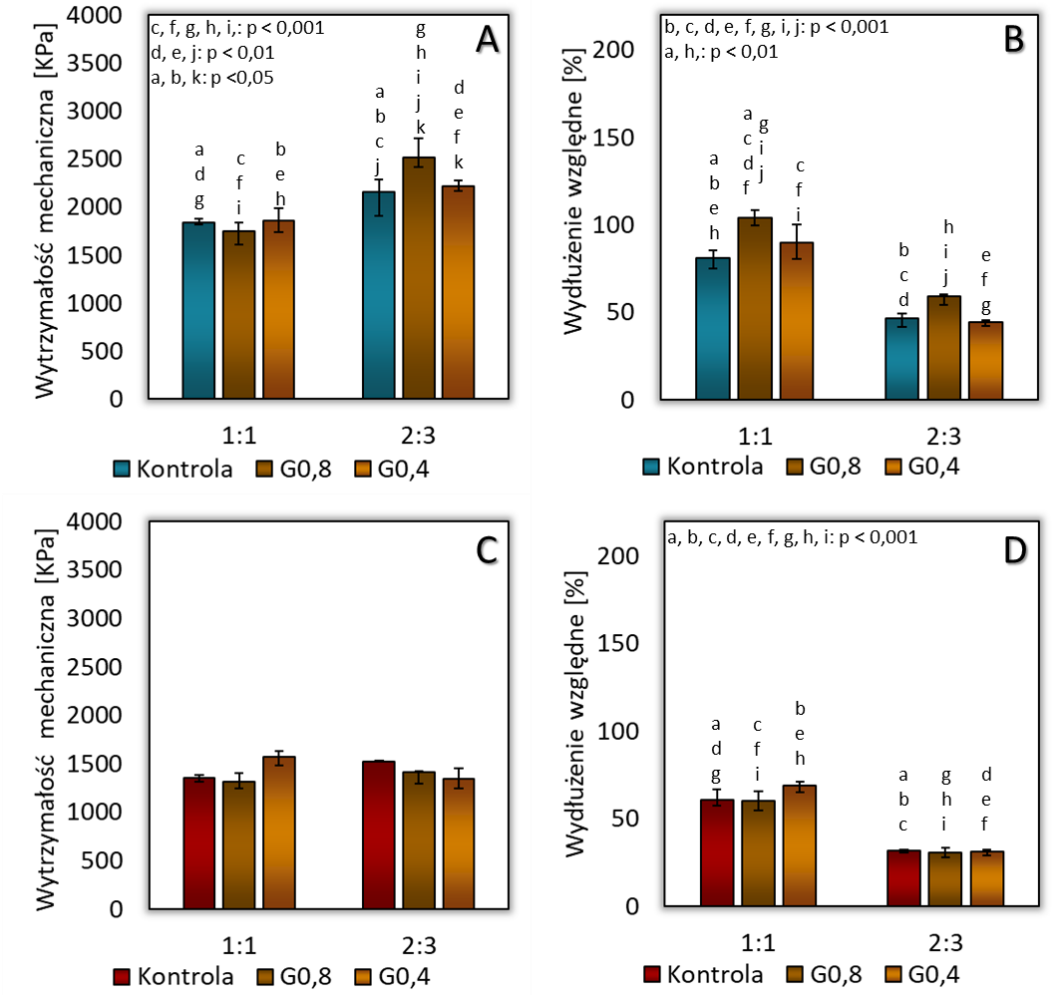
Podobnie, jak dla materiałów kontrolnych, dla modyfikowanych cPAC zmierzono wartości wytrzymałości mechanicznej na rozciąganie oraz wydłużenia względnego zarówno w czasie rozciągania, jak i w punkcie przerwania ciągłości materiału. Ze względu na obszerność uzyskanych wyników w niniejszej pracy zamieszczono tylko rezultaty pomiarów w czasie rozciągania – wyniki uzyskane dla punktu przerwania były porównywalne.



Rys. 67. Wyniki pomiarów wytrzymałości na rozciąganie (wykresy **A** i **C**) oraz wydłużenia względnego (wykresy **B** i **D**) dla materiałów modyfikowanych i kontrolnych PAC sieciowanych przez 4 dni. **A, B** – cPHC, **C, D** – cPOC. Istotność statystyczną zmierzonych wartości określono według jednokierunkowego testu ANOVA przy $p < 0,001$, $p < 0,01$ i $p < 0,05$. Prezentowane wyniki porównywano ze sobą dla tego samego rodzaju materiału w różnych stosunkach molowych oraz osobno dla materiałów w jednym stosunku molowym. Kolumny oznaczone tą samą literą różnią się istotnie.

Wykresy dla badanych próbek (Rys. 67 i 68) prezentują zależność we właściwościach badanych materiałów modyfikowanych analogiczne, jak dla materiałów kontrolnych PAC, opisanych w punkcie 8.1.4.2. Zauważono wyraźny wpływ zastosowanego diolu oraz stosunku molowego reagentów na wartości wytrzymałości na rozciąganie oraz wydłużenie względne. Materiały modyfikowane otrzymane w stosunku molowym 2:3 (CTR:diol) charakteryzują się większą wytrzymałością mechaniczną i mniejszym wydłużeniem względnym, niż materiały otrzymane w stosunku molowym 1:1. Analogicznie jak dla materiałów kontrolnych, w skutek wydłużania czasu reakcji sieciowania gęstość usieciowania materiałów wzrasta, przez co

zwiększa się ich wytrzymałość mechaniczna przy jednoczesnym zmniejszeniu podatności na odkształcenie.



Rys. 68. Wyniki pomiarów wytrzymałości na rozciąganie (wykresy **A** i **C**) oraz wydłużenia względnego (wykresy **B** i **D**) dla materiałów modyfikowanych i kontrolnych PAC sieciowanych przez 10 dni. **A, B** – cPHC, **C, D** – cPOC. Istotność statystyczną zmierzonych wartości określono według jednokierunkowego testu ANOVA przy $p < 0,001$, $p < 0,01$ i $p < 0,05$. Prezentowane wyniki porównywano ze sobą dla tego samego rodzaju materiału w różnych stosunkach molowych oraz osobno dla materiałów w jednym stosunku molowym. Kolumny oznaczone tą samą literą różnią się istotnie.

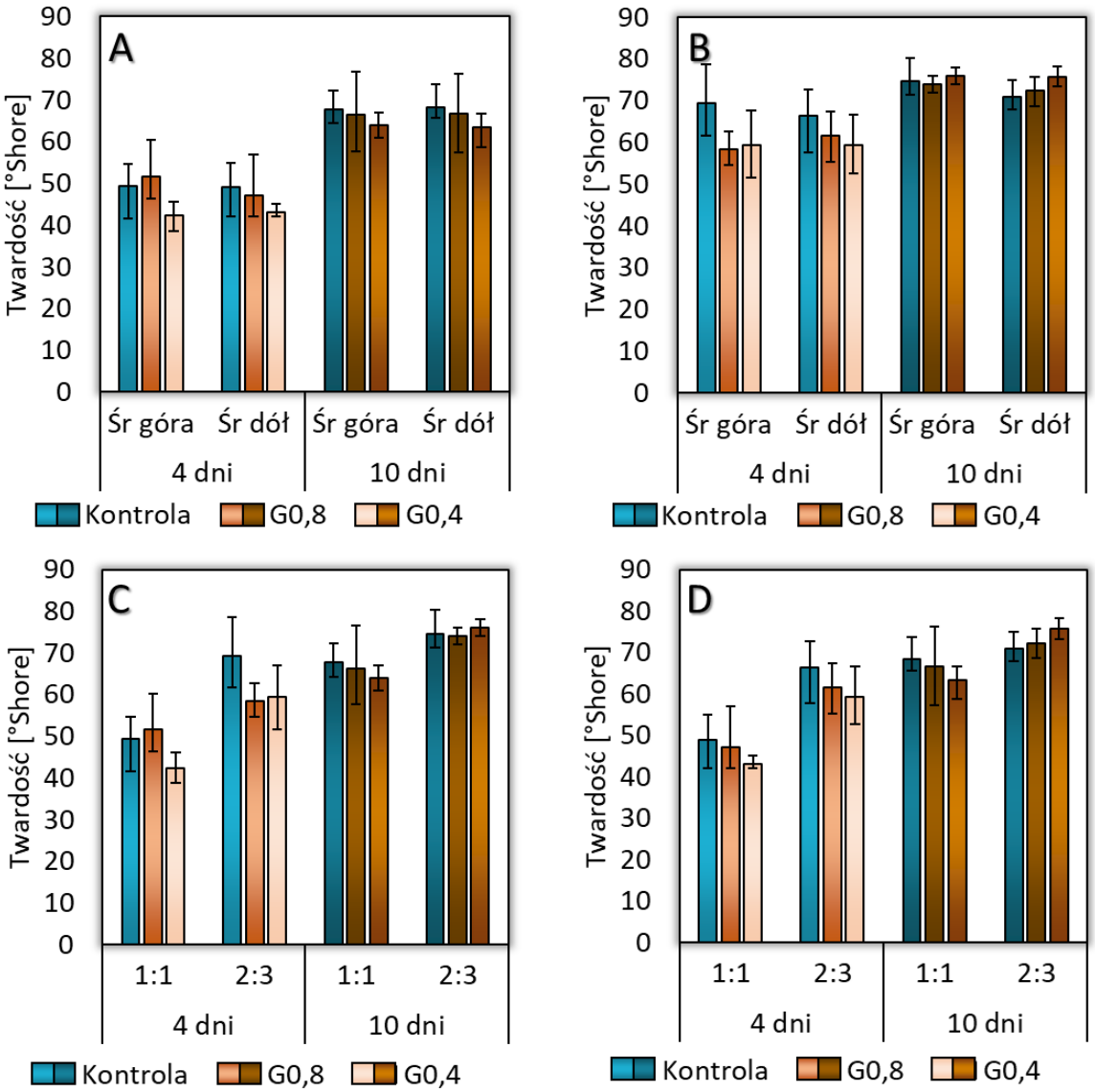
Powyższe badania mechaniczne miały na celu potwierdzenie braku wpływu modyfikatora na właściwości mechaniczne otrzymanych materiałów modyfikowanych. Na wykresach mierzone wartości odniesiono do analogicznych wartości dla materiałów kontrolnych, które przygotowano specjalnie do tych pomiarów w obrębie jednej partii syntez. Zaprezentowane wykresy pokazują, że wartości wytrzymałości mechanicznej i wydłużenia względnego modyfikowanych cPAC nie odbiegają zbytnio od wartości uzyskanych dla

materiałów kontrolnych, a powstałe różnice mogą być wynikiem dużego rozrzutu wartości uzyskanych dla poszczególnych próbek, co ilustrują słupki błędu pokazane na wykresach. Na podstawie uzyskanych wyników nie dało się jednoznacznie określić wpływu dodatku GSH na właściwości mechaniczne materiałów. Jednakże, biorąc pod uwagę fakt bardzo niewielkich odchyleń otrzymanych wartości w odniesieniu do materiałów kontrolnych założono brak istotnego wpływu dodatku GSH na właściwości mechaniczne materiałów modyfikowanych.

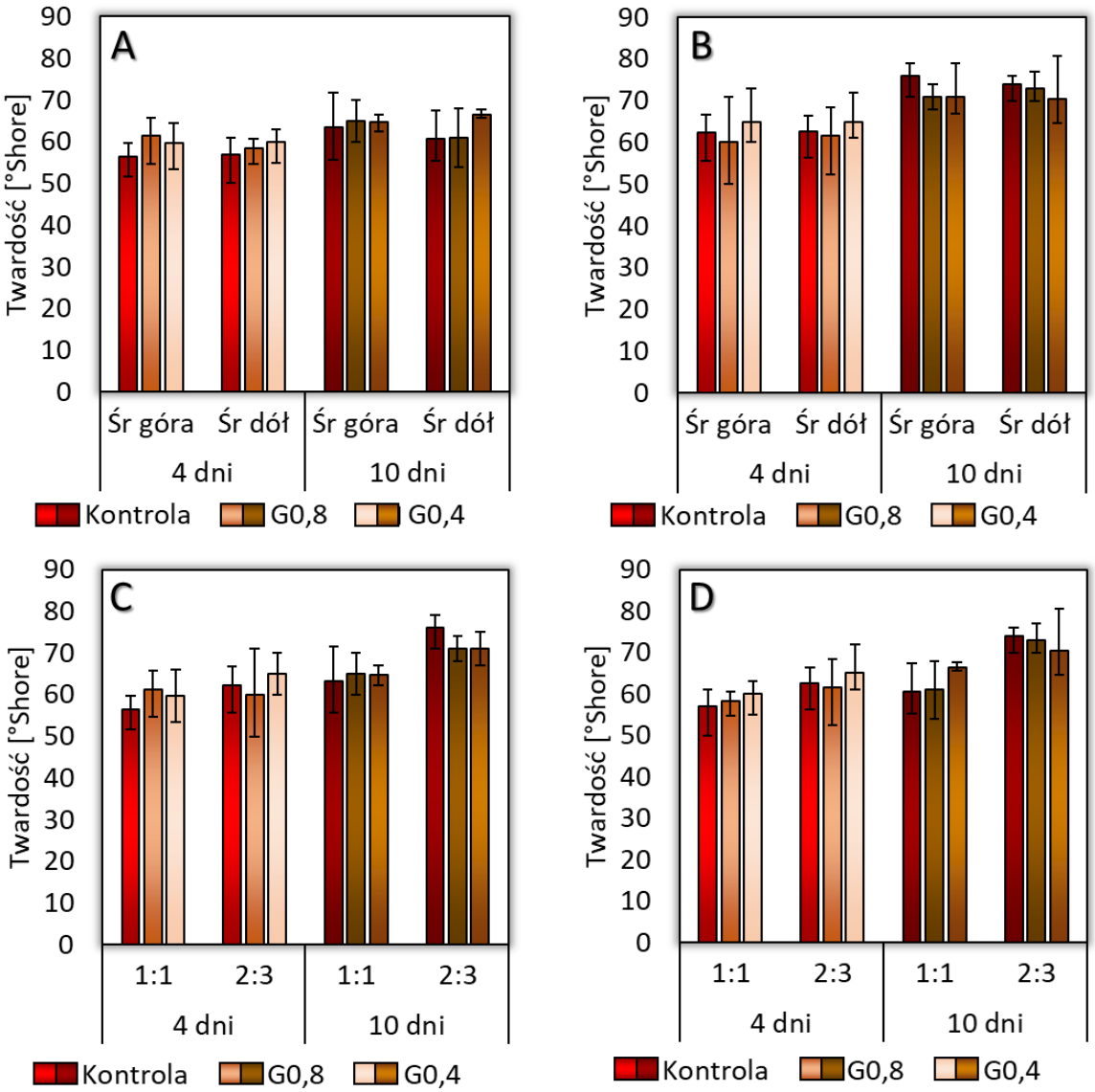
8.2.2.5. Wyniki pomiarów twardości materiałów modyfikowanych cPAC

Podobnie, jak to miało miejsce dla pomiarów parametrów mechanicznych, dla materiałów modyfikowanych przeprowadzono pełną charakterystykę twardości powierzchni. Celem prowadzonych badań było określenie wpływu dodatku GSH na właściwości powierzchni badanych materiałów modyfikowanych. Pomiary przeprowadzono z wykorzystaniem skali twardości Shore'a typu A, a eksperymentom poddano obie strony badanej próbki. Wyniki przedstawiono poniżej (Rys. 69 i 70).

Wartości twardości badanych materiałów modyfikowanych zawierały się w granicach 55-80°Shore, co mieści się w zakresie obserwowanym dla materiałów kontrolnych cPAC i podobnych elastomerów. Wartości twardości dla powierzchni górnych (mających kontakt z powietrzem) oraz dolnych (od strony formy) były bardzo zbliżone do siebie w obrębie badanego materiału. Niewielkie różnice, które zaobserwowano mogą być wynikiem różnic w grubościach badanej próbki, co może przekładać się na głębokość penetracji igły durometru. Na podstawie otrzymanych danych stwierdzono, że powierzchnie zarówno materiałów modyfikowanych, jak i kontrolnych charakteryzują się porównywalną twardością w obrębie próbek tych samych materiałów. Twardości zarówno dolnych, jak i górnych powierzchni są niemal identyczne, co świadczy o równomiernej gęstości usieciowania. Zauważono, podobnie jak miało to miejsce dla materiałów kontrolnych cPAC, wpływ czasu sieciowania i użytego stosunku molowego reagentów na wartości twardości otrzymanych materiałów. Obserwowane trendy są analogiczne do tych opisanych dla materiałów kontrolnych w punkcie 8.1.4.3. Materiały sieciowane przez 10 dni charakteryzują się większą twardością, niż materiały otrzymane po 4 dniach sieciowania. Analogicznie, materiały otrzymane w stosunku molowym 2:3 (CTR:diol) charakteryzują się większą gęstością usieciowania, co skutkuje zwiększeniem ich twardości w porównaniu do materiałów otrzymanych w stosunku molowym 1:1 (CTR:diol).



Rys. 69. Wyniki pomiarów twardości dla materiałów cPHC. **A** – porównanie twardości górnych i dolnych powierzchni materiałów otrzymanych w stosunku 1:1 (CTR:diol) w różnych czasach sieciowania, **B** - porównanie twardości górnych i dolnych powierzchni materiałów otrzymanych w stosunku 2:3 (CTR:diol) w różnych czasach sieciowania, **C** – porównanie twardości górnych powierzchni materiału w zależności od stosunku molowego i czasu sieciowania, **D** - porównanie twardości dolnych powierzchni materiału w zależności od stosunku molowego i czasu sieciowania. Istotność statystyczną zmierzonych wartości określono według jednokierunkowego testu ANOVA przy $p < 0,001$, $p < 0,01$ i $p < 0,05$. Prezentowane wyniki porównywano ze sobą dla tego samego rodzaju materiału w różnych stosunkach molowych oraz osobno w różnych czasach sieciowania. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic



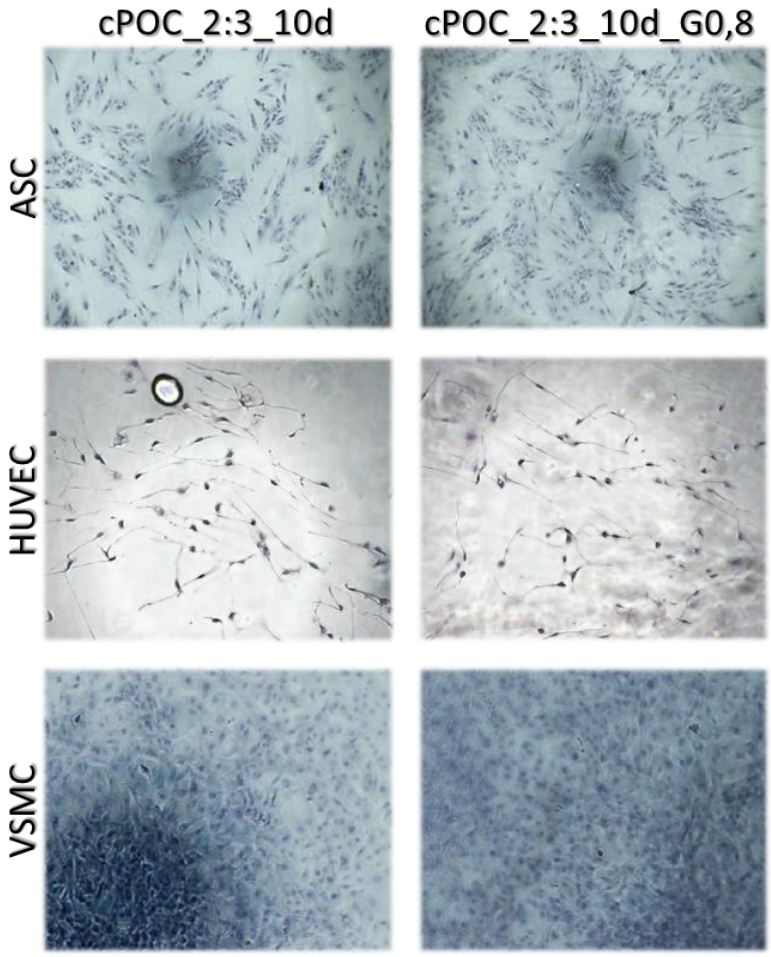
Rys. 70. Wyniki pomiarów twardości dla materiałów cPOC. **A** – porównanie twardości górnych i dolnych powierzchni materiałów otrzymanych w stosunku 1:1 (CTR:diol) w różnych czasach sieciowania, **B** - porównanie twardości górnych i dolnych powierzchni materiałów otrzymanych w stosunku 2:3 (CTR:diol) w różnych czasach sieciowania, **C** – porównanie twardości górnych powierzchni materiału w zależności od stosunku molowego i czasu sieciowania, **D** - porównanie twardości dolnych powierzchni materiału w zależności od stosunku molowego i czasu sieciowania. Istotność statystyczną zmierzonych wartości określono według jednokierunkowego testu ANOVA przy $p < 0,001$, $p < 0,01$ i $p < 0,05$. Prezentowane wyniki porównywano ze sobą dla tego samego rodzaju materiału w różnych stosunkach molowych oraz osobno w różnych czasach sieciowania. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic

Na podstawie otrzymanych wyników nie można określić jednoznacznie wpływu dodatku modyfikatora na twardość końcowych materiałów. W otrzymanych wynikach nie zaobserwowano żadnego widocznego trendu, a materiały modyfikowane posiadały twardości

bardzo zbliżone do próbek kontrolnych. Biorąc pod uwagę powyższe stwierdzenia można wnioskować, że dodatek GSH do materiałów nie ma istotnego wpływu na twardość otrzymanych modyfikowanych poliestrów cPAC.

8.2.2.6. Wyniki analizy zgodności biologicznej materiałów modyfikowanych cPAC

Ostatnią część charakterystyki materiałów modyfikowanych stanowiła ocena ich biozgodności oraz potencjalnej cytotoksyczności. Pomimo, że materiały kontrolne ani modyfikator i powstający z niego fluorofor nie wykazują właściwości cytotoksycznych, należało ostatecznie wykluczyć także toksyczność materiałów modyfikowanych wobec komórek. W tym celu przeprowadzono inkubacje trzech linii komórkowych – ASC, VSMC oraz HUVEC na powierzchni materiałów modyfikowanych.



Rys. 71. Zdjęcia mikroskopowe z inkubacji komórek na materiale kontrolnym i modyfikowanym cPOC_2:3 po 7 dniach prowadzenia eksperymentu. Komórki wybarwiono hematoksyliną/eozyną w celu zwiększenia ich widoczności

Do badań wykorzystano materiały cPHC i cPOC otrzymane wyłącznie po 10 dniach sieciowania. W niniejszej pracy zaprezentowane zostały wyniki dla materiału cPOC_2:3 10d, zarówno kontrolnego, jak i modyfikowanego (Rys. 71). Przeprowadzona analiza zdjęć hodowli trzech linii komórkowych na materiałach modyfikowanych oraz próbkach kontrolnych wskazuje na wysoką żywotność komórek na powierzchni materiału. Selektywność kolonizacji komórek zależała od typu wybranej linii komórkowej. Otrzymane wyniki badania pokazały, że materiały cPOC_2:3 sprzyjają wzrostowi komórek ASC, HUVEC i VSMC, jednak komórki HUVEC namnażały się w wolniejszym tempie w porównaniu do komórek ASC i VSMC. Jest to związane z charakterem sposobu ich adhezji – komórki HUVEC są komórkami powierzchniowo zależnymi, których adhezja jest wprost związana z sygnałowymi białkami powierzchniowymi – integrynami, których ilość na powierzchni materiału jest zależna od liczby miejsc wiążących, do których mogą się przyłączyć [232]. Wydłużony wygląd komórek wskazuje na duże oddalenie punktów wiązania integryn na powierzchni materiału, co wymusiło rozciągnięcie się komórek w celu ich zaadsorbowania i w konsekwencji obniżyło sumaryczną ilość zaadherowanych komórek.

Należy w tym miejscu zaznaczyć, że przedstawione powyżej rezultaty są wynikami wstępnych badań hodowli komórkowych na materiałach modyfikowanych PAC. Na ich podstawie nie można było wyciągnąć wniosku ani o wpływie modyfikatorów na żywotność hodowli, ani o rzeczywistej żywotności komórek. Obecnie prowadzone są zaawansowane badania komórkowe modyfikowanych materiałów cPAC z wykorzystaniem testów przyżyciowych i barwienia fluorescencyjnego w celu określenia powyższych właściwości. Wyniki tych badań nie zostały zamieszczone w niniejszej pracy ze względu na wciąż trwające prace eksperymentalne jednak wskazują one na znaczną przewagę materiałów otrzymanych w stosunku molowym 2:3 nad materiałami 1:1, co pokrywa się z obserwacjami poczynionymi dla materiałów kontrolnych. Według wstępnych testów, materiały te cechuje kwasowość bardzo zbliżona do pH fizjologicznego, co eliminuje konieczność stosowania etapu przemywania i pozwala na hodowanie komórek bez specjalnego przygotowania materiałów. Wstępne badania wskazują też na przewagę materiałów otrzymanych z 1,6-heksanodiolu nad ich oktametylenowym analogami.

8.2.3. Podsumowanie otrzymywania i charakterystyki materiałów modyfikowanych cPAC

W wyniku przeprowadzonych reakcji syntezy otrzymano usieciowane materiały modyfikowane cPAC. Otrzymane poliestry wykazywały się niebieską fluorescencją, a wykonane badania właściwości optycznych i przeciwutleniających potwierdziły powodzenie wprowadzenia modyfikacji do struktury materiałów cPAC. Istotną innowację stanowi tutaj opracowana metoda modyfikacji w masie, która za pomocą jednej operacji umożliwia wdrożenie do materiałów dwóch modyfikacji. Takie rozwiązanie jest nie tylko ekonomicznie korzystne, ale również ogranicza możliwość zachodzenia niepożądanych reakcji w końcowym polimerze. Co istotne, przeprowadzone badania za pomocą ssNMR oraz pomiary mechaniczne i pomiary twardości potwierdziły ten fakt, wskazując na brak istotnego wpływu na właściwości otrzymanych materiałów dodawanego doń GSH. Rezultaty badań biologicznych wskazują na korzystne właściwości materiałów modyfikowanych na wzrost i proliferację komórek, jednak ze względu na ich pilotażowy charakter nie udało się oszacować wpływu dodatku modyfikatora na wzrost i żywotność komórek. Potencjalnie takie potwierdzenie będzie możliwe do uzyskania w toku obecnie prowadzonych zaawansowanych badań biologicznych. Całość powyższych obserwacji pozwala sądzić, że modyfikacja materiałów cPAC za pomocą GSH stanowi nowatorskie podejście do funkcjonalizacji tych poliestrów i może pozwolić w przyszłości na wdrożenie ich jako nowych funkcjonalnych materiałów w inżynierii tkankowej naczyń krwionośnych.

9. Podsumowanie części doświadczalnej i perspektywy

W części doświadczalnej niniejszej pracy opisano kompleksowe badania nad kontrolnymi oraz modyfikowanymi materiałami z poli(cytrynianu alkilenu), które mogą znaleźć zastosowane w inżynierii tkankowej naczyń krwionośnych. Prowadzone badania zaplanowano w taki sposób, żeby poszczególne etapy badawcze (dotyczące syntezy, charakterystyki oraz możliwości zastosowania) w sposób naturalny były dla siebie komplementarne. W części dotyczącej syntezy skupiono się na sformułowaniu szczegółowego protokołu otrzymywania zarówno prepolimerów, jak i materiałów usieciowanych, i opracowaniu sposobu modyfikacji materiałów PAC. W części badawczej dotyczącej charakterystyki właściwości otrzymywanych

materiałów opisano wyniki otrzymane za pomocą metod analitycznych ukierunkowanych na dopracowanie protokołu syntezy oraz oszacowanie potencjalnej aplikacyjności cPAC w inżynierii tkanek miękkich.

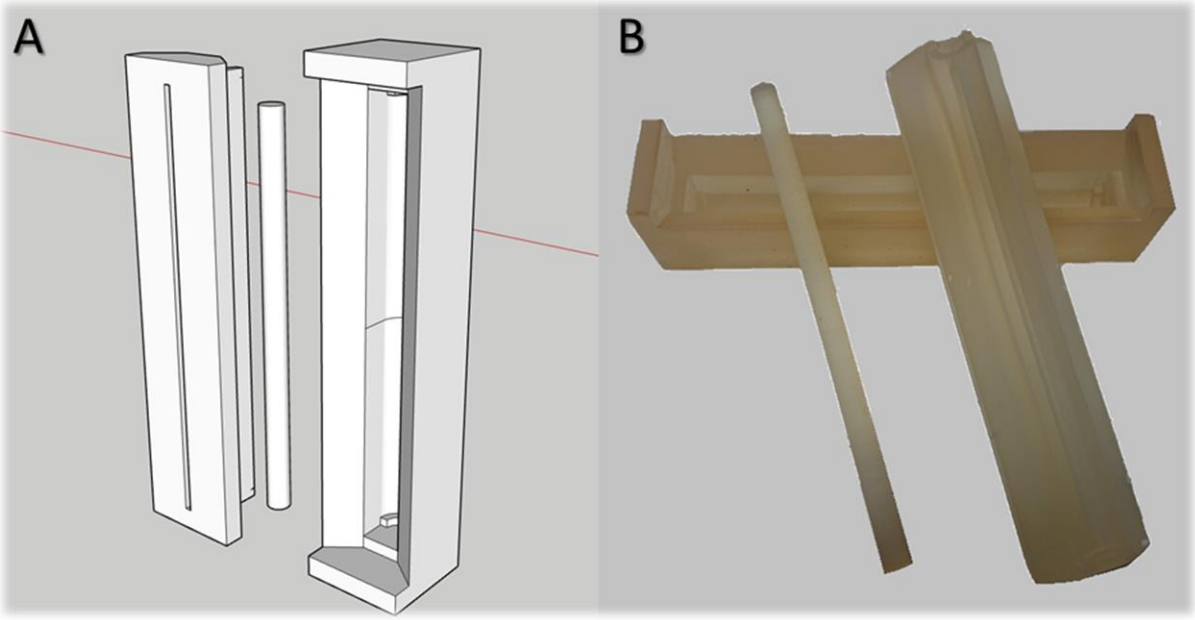
Badania w niniejszej pracy podzielono na dwa etapy. Pierwszym z nich była synteza i charakterystyka materiałów kontrolnych PAC. W etapie tym wydzielono dwie części, dotyczące osobnego opracowania prepolimerów oraz materiałów usieciowanych. W rezultacie dopracowano opisany w literaturze protokół syntezy, co poskutkowało zwiększeniem wydajności reakcji o około 15-20% oraz możliwością otrzymywania bardziej jednorodnych prepolimerów, dzięki ścisłej kontroli każdego z etapów. Szczegółowa charakterystyka strukturalna prepolimerów pozwoliła natomiast na dokładniejsze poznanie i opisanie procesu sieciowania badanych materiałów oraz dała podstawy do przewidywania niektórych cech usieciowanych poliestrów na podstawie właściwości prepolimeru. Warto w tym miejscu wspomnieć, że tak szczegółowa analiza nie została dotychczas przeprowadzona dla tych materiałów. Charakterystyka właściwości materiałów usieciowanych ujawniła natomiast istotne czynniki, które rzucają nowe światło na obecne w doniesieniach literaturowych opisy materiałów PAC stosowanych w kontakcie z tkankami ludzkimi. Dzięki szczegółowym badaniom fizykochemicznym i biologicznym ustalono, że powszechnie opisywane PAC otrzymywane w stosunku molowym 1:1 (CTR:diol) ustępują miejsca materiałom otrzymanym w stosunku molowym 2:3– te ostatnie pod każdym względem zdają się stanowić lepsze podłoże do wzrostu i proliferacji komórek. Warto dodać, że wszystkie opisane rezultaty badań materiałów usieciowanych stały w zgodzie z charakterystyką właściwości prepolimerów.

Finalnym etapem pracy było przeprowadzenie modyfikacji materiałów, polegające na wprowadzeniu cząsteczki GSH w strukturę PAC. Otrzymano modyfikowane materiały usieciowane, które charakteryzują się fluorescencją zależną od ilości modyfikatora, oraz, dzięki wbudowaniu się cząsteczek GSH w formie natywnej pomiędzy łańcuchy polimerowe, również posiadają właściwości przeciwutleniające. Wartym odnotowania jest tutaj fakt, że obie funkcjonalizacje uzyskano z użyciem tego samego modyfikatora w obrębie jednej operacji – tego typu modyfikacja materiałów PAC nie była dotąd opisana. Fluorescencja materiałów jest kluczową właściwością umożliwiającą kontrolę degradacji materiału w czasie rzeczywistym po implantacji w organizmie biorcy. Właściwości fluorescencyjne nie umożliwiają jednak takich

obserwacji ze względu na zbyt krótką długość fali emitowanego światła, która nie jest w stanie przeniknąć przez tkanki miękkie. Istnieje jednak inna potencjalna możliwość kontroli degradacji - materiał fluorescencyjny trawiony przez komórki będzie stopniowo uwalniał fluorofor do krwiobiegu, dzięki czemu możliwe będzie kontrolowanie poziomu degradacji rusztowania poprzez analizę intensywności fluorescencji pobranej krwi. Przeprowadzone badania stanowią podwalinę pod przyszłe modyfikacje tych materiałów innymi fluoroforami o właściwościach spektroskopowych umożliwiających obrazowanie fluorescencyjne poprzez tkanki organizmu. Właściwości przeciwutleniające odpowiadają z kolei za lepszą przyswajalność rusztowania w organizmie biorcy przez obniżenie stresu oksydacyjnego komórek otaczających implant i ograniczenie ich apoptozy oraz stanów zapalnych. Wprowadzone modyfikacje wskazują na możliwość nadania materiałom cPAC takich właściwości również z wykorzystaniem innych substancji, co korzystnie wpływa na ich ewentualne zastosowanie w inżynierii tkankowej naczyń krwionośnych. Warty podkreślenia jest fakt wysokiej biozgodności otrzymanych materiałów, potwierdzony badaniami komórkowymi. Bardzo ważnym wnioskiem jest również potwierdzenie tezy sformułowanej podczas charakterystyki materiałów kontrolnych o przewadze materiałów otrzymywanych w stosunku molowym 2:3 (CTR:diol) nad powszechnie opisywanymi materiałami 1:1.

Należy w tym miejscu zauważyć, że w opisanych badaniach na żadnym etapie nie otrzymano materiałów cPAC w formie struktur tubularnych. Formy rurek będą prawdopodobnie docelowymi kształtami, w których cPAC znajdą swoje zastosowanie w inżynierii tkankowej naczyń krwionośnych. Podjęto próby wytworzenia takich struktur, jednak napotkano po drodze na kilka istotnych przeszkód. Najważniejszą przeszkodę stanowi specyfika ich sieciowania – wysoka lepkość prepolimerów wymusza konieczność stosowania 30% roztworów etanolowych, co przekłada się na potrzebę stosowania nadmiaru prepolimeru w celu uzyskania kształtu o pożądanym rozmiarze. Również obecność rozpuszczalnika sprawia, że ograniczenie materiału ścianami formy powoduje ograniczenie powierzchni parowania, co przekłada się na formowanie się pęcherzy wewnątrz struktury materiału przez etanol, który nie zdążył się wydostać z polimeru przed usieciowaniem. Podczas sieciowania materiały cPAC charakteryzują się również zróżnicowanymi właściwościami adhezyjnymi do rozmaitych powierzchni – materiałów usieciowanych na szkle czy powierzchniach metalowych nie da się oddzielić od formy bez zniszczenia polimeru. Z kolei formy teflonowe, przez swoją wysoką

hydrofobowość, powodują skurcz materiałów cPAC, które nie przywierają do powierzchni z PTFE i sieciują w sposób niekontrolowany. Wymaga to stosowania form polimerowych, głownie z polipropylenu i polistyrenu. Powyższe ograniczenia poskutkowały rozwojem badań w kierunku dwóch ścieżek otrzymania funkcjonalnych rusztowań z wykorzystaniem druku 3D. Pierwsza z nich zakłada wykonanie specjalnie zaprojektowanych form w technologii druku 3D-DLP (ang. *digital light processing*, technologia cyfrowego przetwarzania światła), dzięki czemu uzyskane z żywicy o odpowiednich parametrach formy będą miały cechy pozwalające na zapewnienie optymalnych warunków sieciowania poprzez odpowiednie odprowadzanie lotnych produktów polikondensacji oraz, dzięki zastosowaniu odpowiedniego środka powierzchniowo czynnego, pozwolą na bezproblemowe oddzielenie powstałego rusztowania od powierzchni formy. Pierwsze projekty takich rozwiązań (Rys. 72) będą testowane w najbliższym czasie.



Rys. 72. Projekt graficzny formy do sieciowania struktur tubularnych z materiałów PAC (**A**) oraz testowy wydruk formy w technologii druku 3D-DLP (**B**)

Druga ścieżka zakłada modyfikację materiałów PAC dodatkowym komonomerem o właściwościach fotopolimeryzacyjnych, który spowoduje uwrażliwienie PAC na polimeryzację z użyciem światła. Daje to możliwość potencjalnego wykorzystania takich materiałów jako biozgodnych żywic w druku 3D-DLP. Jako dodatkowy komonomer planuje się wykorzystać kwas itakonowy – organiczny kwas dikarboksylowy będący produktem termicznej

degradacji kwasu cytrynowego. Jego właściwości fizykochemiczne i wysoka biozgodność zostały potwierdzone w wielu doniesieniach literaturowych.

Obie powyżej opisane ścieżki są przedmiotem projektu badawczego NCN PRELUDIUM nr UMO-2021/41/N/ST4/03362, który stanowi naturalną kontynuację niniejszej pracy doktorskiej, kierując badania nad poli(cytrynianami alkilenów) w kierunku ich dalszej funkcjonalizacji w perspektywie zastosowania ich jako nowych biozgodnych rusztowań w inżynierii tkankowej.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych reakcji syntezy, a także analiz wyników i obserwacji dotyczących badań poliestrów z kwasu cytrynowego do zastosowań biomedycznych sformułowano następujące wnioski:

1. Dokładne zaprojektowanie i reewaluacja protokołu syntezy mają wpływ na właściwości mechaniczne i biologiczne otrzymywanych materiałów. Odpowiednie ustalenie warunków prowadzenia syntezy prepolimerów i postpolimeryzacji pozwala przewidywać i odpowiednio kierunkować właściwości końcowych materiałów pod kątem ich specyficznego zastosowania.
2. Poliestry cPAC kontrolne i modyfikowane otrzymywane w stosunku molowym 2:3 (CTR:diol) stanowią lepsze materiały do zastosowań biomedycznych, niż powszechnie opisywane materiały otrzymywane w stosunku molowym 1:1. Charakteryzują się one podobnymi właściwościami fizykochemicznymi i mechanicznymi do materiałów otrzymanych w stosunku molowym 1:1, a obserwowane niewielkie różnice mogą być łatwo zniwelowanie przez modyfikacje czasu i warunków sieciowania. Dzięki swojej niższej kwasowości w porównaniu do materiałów otrzymanych w stosunku molowym 1:1 stanowią one bardziej dogodne środowisko dla komórek tkanek ludzkich.
3. Dodatek modyfikatora, jakim był L-glutation powoduje wprowadzenie do materiałów dwóch nowych funkcjonalności – właściwości przeciwutleniających i fluorescencji. Wprowadzenie odbywa się za pomocą jednej operacji przy jednoczesnym braku wpływu na właściwości fizykochemiczne, mechaniczne i biologiczne badanych materiałów, co potwierdzają otrzymane rezultaty. Wprowadzone modyfikacje dają podwaliny pod dalsze badania nad funkcjonalizacją materiałów PAC w kierunku ich zastosowania w inżynierii tkanek miękkich.
4. Fluorescencja w materiałach modyfikowanych pochodzi od tworzącego się w strukturze materiału fluoroforu – kwasu 3-[(karboksymetylo)karbamoilo]-5-okso-2,3-dihydro-5*H*-[1,3]tiazolo[3,2-a]pirydyno-7-karboksylowego (CTPC), powstającego w reakcji dipeptydu pochodzącego z rozkładu GSH i niezwiązanych grup karboksylowych reszt cytrynianowych obecnych na końcach makrocząsteczek polimeru. Jej intensywność zwiększa się wraz ze zwiększaniem ilości dodawanego GSH,

co pozwala na kontrolowanie właściwości fluorescencyjnych materiału poprzez zmianę ilości dodawanego modyfikatora.

5. Właściwości przeciwutleniające obecne w materiale są wynikiem fizycznego i kowalencyjnego związania cząsteczek GSH wewnątrz sieci polimerowej i zwiększają się wraz ze zwiększaniem ilości dodanego modyfikatora. Aktywność materiału wobec wolnych rodników może być dopasowywana poprzez zmniejszanie lub zwiększanie ilości dodanego modyfikatora bez wpływu na właściwości mechaniczne i fizykochemiczne materiału. Na podstawie otrzymanych wyników nie można określić wpływu dodatku GSH na właściwości biologiczne materiałów PAC.
6. Otrzymane materiały kontrolne oraz modyfikowane spełniają wszystkie kryteria pozwalające na ich potencjalne zastosowanie jako rusztowania w inżynierii tkankowej. Potwierdzają to wyniki charakterystyki mechanicznej, fizykochemicznej oraz biologicznej wykonane dla badanych materiałów.

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było otrzymanie oraz pełna charakterystyka właściwości prepolimerów oraz usieciowanych poliestrów z kwasu cytrynowego (CTR) i dioli - poli(cytrynianów alkilenu) (PAC), a także wytworzenie i charakterystyka materiałów PAC modyfikowanych z wykorzystaniem L-glutationu (GSH). Dodatek GSH w wyniku jednej reakcji wprowadza do materiału dwie modyfikacje – fluorescencję oraz właściwości przeciwutleniające.

W inżynierii tkankowej naczyń krwionośnych istnieje potrzeba poszukiwania coraz bardziej biozgodnych i hemozgodnych zaawansowanych materiałów o jednocześnie jak najlepszych właściwościach mechanicznych. Obecnie stosowane materiały i kompozyty stanowią kompromis pomiędzy odpowiednimi właściwościami mechanicznymi i biologicznymi. Obiecującą alternatywą na tym polu są materiały PAC, których wysoka bio- i hemozgodność oraz możliwość modyfikacji i zmienne właściwości mechaniczne determinują możliwość ich zastosowania w inżynierii tkanek miękkich.

W pierwszym etapie badań otrzymano prepolimery i usieciowane materiały kontrolne PAC oraz opisano ich właściwości. Przeprowadzono całkowitą rewizję protokołu syntezy prepolimerów opisanego w literaturze, co przełożyło się na zwiększenie wydajności reakcji i otrzymanie prepolimerów o powtarzalnych właściwościach. Wyniki badania liczby kwasowej wskazują na wyższą kwasowość prepolimerów otrzymanych w stosunku molowym reagentów 1:1 (CTR:diol) niż prepolimerów otrzymanych w stosunku 2:3, co przekłada się na lepsze właściwości biologiczne usieciowanych cPAC_2:3. Przeprowadzone szczegółowe analizy NMR wraz z wynikami analiz FIA-ESI-MS oraz GPC pozwoliły na poznanie struktury chemicznej prepolimerów, potwierdzenie stosunku molowego reszt cytrynianowych i alkilenowych, a także poznanie mechanizmu sieciowania PAC, zależnego od różnej reaktywności skrajnych i centralnie położonej grupy karboksylowej w CTR. Badania strukturalne, mechaniczne oraz pomiary twardości materiałów usieciowanych potwierdziły zależność właściwości materiałów od czasu sieciowania i wykorzystanego diolu. Badania cytotoksyczności wykazały, że materiały otrzymane w stosunku molowym reagentów 2:3 (CTR:diol) stanowią lepsze podłoże do wzrostu i proliferacji komórek niż powszechnie opisywane materiały otrzymane w stosunku 1:1.

Drugi etap pracy obejmował modyfikacje materiałów za pomocą GSH oraz zbadanie struktury, właściwości spektroskopowych, przeciwutleniających, mechanicznych oraz biologicznych. Wyniki analizy struktury oraz badań mechanicznych i biologicznych potwierdziły brak wpływu dodatku modyfikatora na właściwości fizykochemiczne oraz biologiczne otrzymanych materiałów. Materiały modyfikowane cechują się wyraźną fluorescencją oraz właściwościami przeciwutleniającymi zwiększającymi się wraz ze zwiększeniem dodatku modyfikatora. Otrzymane wyniki dają podstawy do dalszego rozwoju i funkcjonalizacji materiałów PAC jako funkcjonalnych materiałów w inżynierii tkankowej naczyń krwionośnych.

Abstract

The aim of this study was to obtain and fully characterize prepolymers and cross-linked polyesters from citric acid (CTR) and diols - poly(alkylene citrate) (PAC), as well as the fabrication and characterization of PAC materials modified using L-glutathione (GSH). Addition of GSH molecules introduces two modifications - fluorescence and antioxidant properties - into the material through a single reaction.

In tissue engineering of blood vessels, there is a need to search for increasingly biocompatible and hemocompatible advanced materials with the best possible mechanical properties at the same time. Current materials and composites represent a compromise between adequate mechanical and biological properties. A promising alternative in this field are PAC materials, whose high biocompatibility and hemocompatibility, as well as their modifiability and variable mechanical properties, determine their applicability in soft tissue engineering.

In the first stage of the study, prepolymers and cross-linked PAC control materials were obtained and their properties were described. A complete revision of the prepolymer synthesis protocol described in the literature was carried out, which translated into an increase in reaction efficiency and obtaining prepolymers with reproducible properties. The results of the acid number study indicate a higher acidity of the prepolymers obtained at a molar ratio of reactants of 1:1 (CTR:diol) than the prepolymers obtained at a ratio of 2:3, which translates into better biological properties of the cross-linked cPAC_2:3. The detailed NMR analyses carried out, together with the results of FIA-ESI-MS and GPC analyses, allowed us to understand the chemical structure of the prepolymers, confirm the molar ratio of citrate and alkylene residues, as well as understanding the mechanism of PAC crosslinking, which depends on the different reactivity of the terminal and central carboxyl group in CTR. Structural and mechanical studies and hardness measurements of cross-linked materials confirmed the dependence of material properties on cross-linking time and the diol used. Cytotoxicity studies showed that materials obtained at a molar ratio of reactants of 2:3 (CTR:diol) provide a better substrate for cell growth and proliferation than commonly described materials obtained at a ratio of 1:1.

The second stage of the work involved modifying the materials with GSH and investigating the structure, spectroscopic, antioxidant, mechanical and biological properties. The results of the structure analysis and mechanical and biological tests confirmed the lack of effect of the modifier addition on the physicochemical and biological properties of the materials obtained. The modified materials exhibit pronounced fluorescence and antioxidant properties increasing with increasing modifier addition. The obtained results provide a basis for further development and functionalization of PAC materials as functional materials in tissue engineering of blood vessels.

Spis rysunków

Rys. 1. Statystyka głównych przyczyn zgonów na świecie w 2016 roku wśród kobiet (**A**) i mężczyzn (**B**) [1] 13

Rys. 2. Schemat przedstawiający główne kierunki rozwoju inżynierii tkankowej oraz szczegółowe parametry kluczowe w ich opracowywaniu [17], [18] 15

Rys. 3. Zestawienie różnych postaci rusztowań tkankowych: **A, B** – rusztowania porowate z alginianów i owoalbuminy wytworzone techniką spieniania [54], **C** – tubularne rusztowanie naczynia krwionośnego, **D** – rusztowanie ucha zewnętrznego w trakcie nanoszenia zawiesiny komórkowej, **E** – porowate rusztowanie do regeneracji tkanki kostnej, wytworzone za pomocą stereolitografii oraz jego mikrofotografia SEM (**F**) [55] 20

Rys. 4. Wizualizacja trombogeniczności biomateriału w kontakcie z krwią i powstawania skrzepu [66]. 22

Rys. 5. Różne metody wytwarzania rusztowań tkankowych naczyń krwionośnych z wykorzystaniem materiałów polimerowych naturalnych i syntetycznych. SMC – komórki mięśni gładkich, EC – komórki śródbłonka naczyniowego [9] 23

Rys. 6. Schemat trójwarstwowego rusztowania kompozytowego typu rdzeń-powłoka. Rdzeń wykonany z ePTFE pokryty jest z obu stron warstwą biozgodnego polimeru, np. PLLA 25

Rys. 7. Tubularne rusztowania tkankowe naczyń krwionośnych z PCL o różnej średnicy wewnętrznej, kolejno od lewej 1 mm, 2 mm oraz 3mm [88] 25

Rys. 8. Mikrofotografia SEM przedstawiająca równomiernie zasiedlone komórkami śródbłonka naczyniowego rusztowanie PGA-PLLA (**A**) oraz pojedyncze komórki śródbłonka zasiedlające rusztowanie kontrolne z ePTFE (**B**) po 12 miesiącach inkubacji. Pasek skali 20 µm [94] 26

Rys. 9. Tubularne rusztowanie kompozytowe zbudowane z PEG i chitozanu (**A**), mikrofotografia SEM o niskim powiększeniu pokazująca obie warstwy materiałów (**B**) oraz mikrofotografie o dużym powiększeniu pokazujące gładką strukturę warstwy wewnętrznej PEG (**C**) oraz włóknistą i porowatą strukturę zewnętrznej warstwy chitozanu (**D**) [118]..... 28

Rys. 10. Struktura chemiczna jednostki fibroiny. Gly – L-glicyna, Ser – L-seryna, Ala – L-alanina 29

Rys. 11. Kwasy di- i trikarboksylowe wykorzystywane jako biomonomery w produkcji rusztowań tkankowych naczyń krwionośnych. **A** – kwas bursztynowy, **B** – kwas itakonowy, **C** – kwas sebacynowy, **D** – kwas cytrynowy 31

Rys. 12. Podstawowe kierunki zastosowania kwasu cytrynowego w rożnych gałęziach przemysłu i nauki 33

Rys. 13. Mikrofotografia TEM skupiska nanocząstek złota, zagregowanych na kopolimerze kwasu cytrynowego i PEG 35

Rys. 14. Włókna światłowodowe wykonane z polimeru kwasu cytrynowego, maleinowego i 1,8-oktanodiolu naświetlane światłem niebieskim i czerwonym, testowane pod różnymi kątami ugięcia [177] 36

Rys. 15. Schemat syntezy pochodnych 2-pirydonu. X = O, NH, S [179] 37

Rys. 16. Schemat syntezy wysokowydajnych kropek węglowych z kwasu cytrynowego 38

Rys. 17. Diagram obrazujący zastosowanie polimerów z CTR w różnych dziedzinach inżynierii tkankowej i medycyny regeneracyjnej 39

Rys. 18. Schemat reakcji syntezy poli(cytrynianów alkilenu). R – proton lub reszta alkilenowa, n = 3-16 40

Rys. 19. Materiały lite PAC w postaci folii (**A**) i materiał porowaty wykonany techniką wymywania poroforu (**B**) – zdjęcia własne 40

Rys. 20. Uproszczony schemat syntezy BPLP z CTR, diolu i cysteiny. R – proton lub reszta alkilenowa, n = 6-8 [186] 45

Rys. 21. Implant polimerowy z rodziny BPLP widoczny wewnątrz ciała myszy laboratoryjnej w systemie bioobrazowania fluorescencyjnego, obserwowany przez okres 16 tygodni. Widoczny jest postępujący zanik fluorescencji w marę postępu degradacji rusztowania przez odbudowującą się tkankę [208]. 45

Rys. 22. Mikrofotografia SEM włókien nerwowych wykonanych z PAC domieszkowanych uretanami (**A**) oraz zdjęcie gotowego implantu (**B**) Zarówno nieporowata warstwa zewnętrzna, jak i porowaty rdzeń wytworzone są z tego samego, modyfikowanego materiału PAC. Różnice w morfologii wynikają z odmiennych metod wytwarzania obu warstw [215] 47

Rys. 23. Przykład trójskładnikowego rusztowania kompozytowego do regeneracji tkanki kostnej zbudowanego z rdzenia z PLLA i porowatych osnów z polimeru POC zawierającego hydroksyapatyt. **A** – schemat ideowy rusztowania, **B** – mikrofotografia SEM porowatej

powierzchni fragmentu zbudowanego z POC-HA, **C** – mikrofotografia SEM splotu rdzenia PLLA, **D** – mikrofotografia SEM przekroju poprzecznego przez rdzeń i osnowę oraz mikrofotografii przedstawiająca granicę faz rdzenia PLLA i osnowy POC-HA (**E**). **F** – fotografia przedstawiająca gotowe rusztowanie przed wszczepieniem do organizmu modelowego [217]..... 49

Rys. 24. Elastyczne rusztowania kompozytowe ePTFE-PAC. A, B – zdjęcia rusztowań tubularnych, C, D – mikrofotografie SEM przekroju poprzecznego oraz warstwy porowatej, E – schemat ideowy rusztowania [219] 50

Rys. 25. Porównanie stopnia pokrycia komórkami rusztowań z kompozytu POC-PLGA (**A**) z komórkami pokrywającymi referencyjne rusztowanie z PLLA (**B**) [220]..... 50

Rys. 26. Zdjęcia mikroskopowe przerostu nowopowstałej tkanki wewnętrznej aorty (neointimy) bez zastosowania opatrunku z modyfikowanego POC oraz przy zastosowaniu modyfikowanego POC z tretynoiną [223] 51

Rys. 27. Schemat nazywania próbek wykorzystywany w niniejszej pracy. **A** – prepolimery, **B** – usieciowane materiały kontrolne, **C** – usieciowane materiały modyfikowane 59

Rys. 28. Schemat syntezy i oczyszczania prepolimerów PAC 75

Rys. 29. Schemat reakcji syntezy prepolimerów PAC. n = 6 lub 8, R – atom wodoru lub łańcuch alkilenowy..... 78

Rys. 30. Naczynie reakcyjne stosowane do otrzymywania prepolimerów PAC z mieszaniną poreakcyjną 79

Rys. 31. Krzywa wzorcowa sporządzona dla wzorców polistyrenowych, używana w analizie GPC prepolimerów PAC. 85

Rys. 32. Schemat przedstawiający analizę widma masowego (tryb ujemnej jonizacji) na przykładzie widma dla prepolimeru POC_2:3. Identyfikowane sygnały były porównywane z tabelą wzorcową oligomerów, a następnie przypisywano im określoną masę i strukturę. Dla uproszczenia, w tabelach zawierających zidentyfikowane struktury zastosowano zamieszczone na rysunku oznaczenia w formie ciągów liter, gdzie **C** – segment cytrynianowy, **D** – segment alkilenowy 87

Rys. 33. Widmo masowe prepolimeru POC_1:1 uzyskane za pomocą analizy FIA-ESI-MS. Przypisania oznaczonych na widmie jonów podano w tabeli poniżej. 88

Rys. 34. A - Widmo masowe prepolimeru POC_2:3 po 60 minutach reakcji uzyskane za pomocą analizy FIA-ESI-MS, **B** - Widmo masowe prepolimeru POC_2:3 po 60 minutach reakcji uzyskane

za pomocą analizy FIA-ESI-MS, Przypisania oznaczonych na widmie jonów podano w tabelach poniżej. 89

Rys. 35. Widma ^{1}H NMR (**A**) oraz ^{13}C NMR (**B**) dla prepolimeru POC_1:1. Sygnały zaobserwowane na widmach zaznaczono na granatowo. 93

Rys. 36. Widma korelacyjne ^{1}H – ^{1}H COSY NMR (**A**) oraz ^{1}H – ^{13}C HSQC NMR (**B**) dla prepolimeru POC_1:1 95

Rys. 37. Widmo ^{1}H – ^{13}C HMBC dla prepolimeru POC_1:1. Na widmie wyeksponowano w powiększeniu sygnały korelacji pomiędzy protonami obecnymi w grupach metylenowych łańcucha alkilenowego sąsiadującymi z wiązaniem estrowym, a węglami grup karboksylowych reszt cytrynianowych. 95

Rys. 38. Proponowane struktury prepolimerów PHC_1:1 (**A**) oraz POC_1:1 (**B**) wraz z sygnałami z widm NMR przypisanymi do poszczególnych atomów węgla i wodoru. 97

Rys. 39. Graficzne przedstawienie sposobu obliczania stosunku molowego składników prepolimerów PAC na podstawie widm ^{1}H NMR 99

Rys. 40. Graficzne przedstawienie sposobu analizy reaktywności grup karboksylowych reszt cytrynianowych w prepolimerach PAC. 100

Rys. 41. Graficzne przedstawienie metody kalkulacji stopnia konwersji (SK) grup karboksylowych CTR za pomocą analiz widm ^{1}H NMR 101

Rys. 42. Widma ^{1}H NMR prepolimerów POC_2:3 otrzymanych w różnych czasach wskazują na zmniejszanie się sygnału jednego z niepodstawionych protonów w miarę zwiększania czasu reakcji 102

Rys. 43. Fragment folii z materiału cPAC usieciowanej w formie polipropylenowej (**A**) oraz wycięta z niej kształtka w formie wiosła, stosowana do badań mechanicznych (**B**) 104

Rys. 44. Porównanie widma ^{13}C NMR prepolimeru cPOC_1:1(**A**) oraz ^{13}C MAS NMR materiału usieciowanego cPOC_2:3_4d (**B**) 108

Rys. 45. Fragment struktury materiału usieciowanego cPOC_2:3 wraz z przypisaniami sygnałów z widma ^{13}C MAS NMR do poszczególnych węgli. R – proton lub łańcuch alkilenu 108

Rys. 46. Schemat analizy stosunku molowego reszt cytrynianowych do alkilenowych w materiale usieciowanym cPAC w oparciu o widmo ^{13}C MAS NMR 109

Rys. 47. Schemat kalkulacji stopnia konwersji (SK) grup karboksylowych w usieciowanym materiale cPOC_2:3 na podstawie widma ^{13}C MAS NMR 110
Rys. 48. Poglądowa analiza reaktywności grup karboksylowych w materiale cPOC_2:3_10d na podstawie analizy intensywności sygnałów na widmie ^{13}C MAS NMR materiału cPOC_2:3_10d 111
Rys. 49. Wykresy właściwości mechanicznych dla materiałów cPAC. **A** - wytrzymałość na rozciąganie, **B** - wydłużenie względne i ich odpowiednie wartości (**C i D**) dla materiałów cPAC otrzymanych z prepolimerów syntetyzowanych w wydłużonym czasie reakcji. Istotność statystyczną zmierzonych wartości określono według jednokierunkowego testu ANOVA przy $p < 0,001$, $p < 0,01$ i $p < 0,05$. Prezentowane wyniki porównywano ze sobą dla tego samego rodzaju materiału w różnych stosunkach molowych oraz osobno dla materiałów w jednym stosunku molowym. Kolumny oznaczone tą samą literą różnią się istotnie. 113
Rys. 50. Wykresy przedstawiające wyniki pomiarów twardości dla różnych badanych materiałów PAC (**A** - powierzchnia górna, **B** - powierzchnia dolna) oraz porównanie twardości materiałów uzyskanych z prepolimerów przygotowanych w wydłużonych czasach reakcji (**C i D**). Indeksy G i D w nazwach próbek oznaczają odpowiednio górną i dolną powierzchnię materiału. Istotność statystyczną zmierzonych wartości określono według jednokierunkowego testu ANOVA przy $p < 0,001$, $p < 0,01$ i $p < 0,05$. Prezentowane wyniki porównywano ze sobą dla tego samego rodzaju materiału przy różnych stosunkach molowych oraz osobno dla materiałów w jednym stosunku molowym. Kolumny oznaczone tą samą literą różnią się statystycznie. 115
Rys. 51. Wyniki analizy żywotności i proliferacji komórek ASCs oceniane za pomocą barwienia live-dead (komórki zielone - żywe, czerwone - martwe, pasek skali =100 µm; **A1, B1**) oraz testu redukcji resazuryny (**A2, B2**). Komórki hodowano w 10%, 5% i 2,5% ekstraktach z cPHC_1:1_10d i cPHC_2:3_10d oraz na kontroli (TCPS) przez 1, 3 i 7 dni. Istotność statystyczną redukcji resazuryny obliczono według jednokierunkowego testu ANOVA przy $p < 0,001$, $p < 0,01$ i $p < 0,05$. Konkretne rozcieńczenia ekstraktów były porównywane ze sobą w dniach 1, 3 i 7 oddzielnie. Kolumny określone tą samą literą są znacząco różne. 119
Rys. 52. Wyniki analizy żywotności i proliferacji komórek ASCs oceniane za pomocą barwienia live-dead (komórki zielone - żywe, czerwone - martwe, pasek skali =100 µm; **A1, B1**) oraz testu redukcji resazuryny (**A2, B2**). Komórki hodowano w 10%, 5% i 2,5% ekstraktach z

cPOC_1:1_10d i cPOC_2:3_10d oraz na kontroli (TCPS) przez 1, 3 i 7 dni. Istotność statystyczną redukcji resazuryny obliczono według jednokierunkowego testu ANOVA przy $p < 0,001$, $p < 0,01$ i $p < 0,05$. Konkretne rozcieńczenia ekstraktów były porównywane ze sobą w dniach 1, 3 i 7 oddzielnie. Kolumny określone tą samą literą są znacząco różne. 120

Rys. 53. Obraz mikroskopowy komórek ASC hodowanych na różnych materiałach cPAC oraz jego porównanie z hodowlami kontrolnymi na TCPS w 1, 3 i 7 dniu hodowli. Do obserwacji w mikroskopii optycznej wykorzystano komórki natywne (dzień 1 i 3) lub komórki barwione hematoksyliną i eozyną (dzień 7). Pasek skali = 100 µm..... 123

Rys. 54. Wykresy przedstawiające różnice w średniej gęstości populacji, powierzchni dystrybucji i współczynniku proporcji komórek ASC po 1 i 3 dniach hodowli, hodowanych bezpośrednio na cPHC_2:3_10d, cPOC_2:3_10d, w odniesieniu do próbek kontrolnych na TCPS. Istotność statystyczną otrzymanych wyników obliczono według jednokierunkowego testu ANOVA przy $p < 0,001$, $p < 0,01$ i $p < 0,05$. Konkretne próbki materiałów oraz kontrole były porównywane ze sobą oddzielnie. Kolumny określone tą samą literą są znacząco różne. 124

Rys. 55. Schemat modyfikacji materiałów PAC w masie. Roztwór niemodyfikowanego prepolimeru jest łączony z roztworem modyfikatora bezpośrednio w formie, a następnie sieciowany w takich samych warunkach, jak materiały kontrolne..... 126

Rys. 56. Schemat idei podwójnej modyfikacji materiałów PAC za pomocą GSH 127

Rys. 57. Wygląd materiałów modyfikowanych PAC otrzymanych po 4 (**A**) i 10 (**B**) dniach sieciowania..... 128

Rys. 58. Widma ^{13}C MAS NMR zarejestrowane dla próbek cPOC_2:3_4d_C (**A**) oraz cPOC_2:3-4d_G0,8 (**B**) oraz zbliżenie nałożonych całek regionu karboksylowego obu widm (**C**)..... 129

Rys. 59. A – Widmo ^{1}H NMR CTPC oraz przedstawienie struktury wraz z przypisaniami przesunięć chemicznych do atomów węgla, wodoru i azotu **(B)** [180] 131

Rys. 60. A – zdjęcia mikroskopii fluorescencyjnej z barwienia live/dead za pomocą kalceiny AM i jodku propidyny komórek L929 hodowanych w obecności roztworów CTPC w DMEM o stężeniach 1 mg/ml oraz 0,5 mg/ml wobec próby kontrolnej (czysty DMEM) po 1 i 7 dniach inkubacji, **B** – wyniki aktywności metabolicznej zmierzonej testem Alamar Blue dla komórek L929 dla wszystkich badanych stężeń CTPC po 1, 3 i 7 dniach inkubacji wobec próby kontrolnej. Istotność statystyczną zmierzono przy wykorzystaniu jednokierunkowego testu ANOVA przy

p<0,1, p<0,05 i p<0,001. Nie znaleziono istotnych różnic w obrębie tych samych dni inkubacji 132
Rys. 61. Prawdopodobny mechanizm powstawania CTPC [180]..... 133
Rys. 62. Modyfikowane materiały PAC pod lampą UV o długości fali wzbudzenia 365 nm. **A** – materiały otrzymane po 4 dniach sieciowania, **B** – materiały otrzymane po 10 dniach sieciowania 133
Rys. 63. Widma emisji fluorescencji dla materiałów modyfikowanych oraz materiałów kontrolnych otrzymanych po 4 dniach sieciowania. **A** – cPHC_1:1, **B** – cPHC_2:3, **C** – cPOC:1:1, **D** – cPOC_2:3. Długość fali wzbudzenia wynosiła 355 nm. 134
Rys. 64. Mapy fluorescencji dla materiałów cPHC_1:1_4d_G0,8 (**A**), cPHC_1:1_4d_G0,4 (**B**) oraz cPHC_1:1_4d kontrolnego (**C**). Mapy wykonano przy długości fali wzbudzenia w zakresie 250 – 400 nm, oraz dla długości fal emisji w zakresie 400 – 600 nm 137
Rys. 65. Sposób wiązania cząsteczek GSH w materiale. **A** – fizyczne zamknięcie wewnątrz węzłów sieci polimeru, **B** – kowalencyjne połączenie z resztami alkilenowymi i cytrynianowymi. **C** – cytrynian, **D** - alkilen 138
Rys. 66. Porównanie właściwości przeciwutleniających modyfikowanych materiałów PAC w zależności od długości czasu sieciowania. **A** – cPHC_1:1, **B** – cPHC_2:3, **C** – cPOC_1:1, **D** – cPOC_2:3. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 517 nm..... 140
Rys. 67. Wyniki pomiarów wytrzymałości na rozciąganie (wykresy **A** i **C**) oraz wydłużenia względnego (wykresy **B** i **D**) dla materiałów modyfikowanych i kontrolnych PAC sieciowanych przez 4 dni. **A, B** – cPHC, **C, D** – cPOC. Istotność statystyczną zmierzonych wartości określono według jednokierunkowego testu ANOVA przy p < 0,001, p < 0,01 i p < 0,05. Prezentowane wyniki porównywano ze sobą dla tego samego rodzaju materiału w różnych stosunkach molowych oraz osobno dla materiałów w jednym stosunku molowym. Kolumny oznaczone tą samą literą różnią się istotnie. 142
Rys. 68. Wyniki pomiarów wytrzymałości na rozciąganie (wykresy **A** i **C**) oraz wydłużenia względnego (wykresy **B** i **D**) dla materiałów modyfikowanych i kontrolnych PAC sieciowanych przez 10 dni. **A, B** – cPHC, **C, D** – cPOC. Istotność statystyczną zmierzonych wartości określono według jednokierunkowego testu ANOVA przy p < 0,001, p < 0,01 i p < 0,05. Prezentowane wyniki porównywano ze sobą dla tego samego rodzaju materiału w różnych stosunkach

molowych oraz osobno dla materiałów w jednym stosunku molowym. Kolumny oznaczone tą samą literą różnią się istotnie. 143
Rys. 69. Wyniki pomiarów twardości dla materiałów cPHC. **A** – porównanie twardości górnych i dolnych powierzchni materiałów otrzymanych w stosunku 1:1 (CTR:diol) w różnych czasach sieciowania, **B** - porównanie twardości górnych i dolnych powierzchni materiałów otrzymanych w stosunku 2:3 (CTR:diol) w różnych czasach sieciowania, **C** – porównanie twardości górnych powierzchni materiału w zależności od stosunku molowego i czasu sieciowania, **D** - porównanie twardości dolnych powierzchni materiału w zależności od stosunku molowego i czasu sieciowania. Istotność statystyczną zmierzonych wartości określono według jednokierunkowego testu ANOVA przy $p < 0,001$, $p < 0,01$ i $p < 0,05$. Prezentowane wyniki porównywano ze sobą dla tego samego rodzaju materiału w różnych stosunkach molowych oraz osobno w różnych czasach sieciowania. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic 145
Rys. 70. Wyniki pomiarów twardości dla materiałów cPOC. **A** – porównanie twardości górnych i dolnych powierzchni materiałów otrzymanych w stosunku 1:1 (CTR:diol) w różnych czasach sieciowania, **B** - porównanie twardości górnych i dolnych powierzchni materiałów otrzymanych w stosunku 2:3 (CTR:diol) w różnych czasach sieciowania, **C** – porównanie twardości górnych powierzchni materiału w zależności od stosunku molowego i czasu sieciowania, **D** - porównanie twardości dolnych powierzchni materiału w zależności od stosunku molowego i czasu sieciowania. Istotność statystyczną zmierzonych wartości określono według jednokierunkowego testu ANOVA przy $p < 0,001$, $p < 0,01$ i $p < 0,05$. Prezentowane wyniki porównywano ze sobą dla tego samego rodzaju materiału w różnych stosunkach molowych oraz osobno w różnych czasach sieciowania. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic 146
Rys. 71. Zdjęcia mikroskopowe z inkubacji komórek na materiale kontrolnym i modyfikowanym cPOC_2:3 po 7 dniach prowadzenia eksperymentu. Komórki wybarwiono hematoksyliną/eozyną w celu zwiększenia ich widoczności 147
Rys. 72. Projekt graficzny formy do sieciowania struktur tubularnych z materiałów PAC (**A**) oraz testowy wydruk formy w technologii druku 3D-DLP (**B**)..... 152

Spis tabel

Tab. 1. Właściwości mechaniczne niektórych tkanek zwierzęcych i ludzkich [41], [42] 18

Tab. 2. Zestawienie najważniejszych wad i zalet materiałów pochodzenia naturalnego i materiałów syntetycznych, stosowanych w inżynierii naczyniowej 24

Tab. 3. Porównanie właściwości mechanicznych niektórych tkanek ludzkich, polimerów syntetycznych oraz polimerów z kwasu cytrynowego stosowanych w inżynierii tkankowej [41], [42], [188], [204], [205] 43

Tab. 4. Zestawienie otrzymanych próbek prepolimerów PAC oraz naważek substratów wykorzystanych do ich otrzymania, a także warunków reakcji dla przeprowadzanych reakcji przesiewowych 61

Tab. 5. Zestawienie otrzymanych próbek prepolimerów PAC oraz naważek substratów wykorzystanych do ich otrzymania, a także warunków reakcji dla przeprowadzanych reakcji na większą skalę 62

Tab. 6. Zestawienie otrzymanych materiałów usieciowanych cPAC otrzymanych w wyniku przeprowadzonych reakcji sieciowania 65

Tab. 7. Oznaczenia i stężenia roztworów GSH używanych do modyfikacji materiałów cPAC. 70

Tab. 8. Zestawienie próbek materiałów modyfikowanych cPAC otrzymanych w wyniku przeprowadzonych reakcji 71

Tab. 9. Rozmieszczenie próbek materiałów kontrolnych i modyfikowanych cPAC na płytkach 24 dołkowych w trakcie inkubacji w badaniu właściwości przeciwutleniających 72

Tab. 10. Tabela z masami fiolek „przed i po" jednej z reakcji syntezy prepolimeru wraz z wyliczonymi stopniami konwersji. Dla każdej serii wykonanych reakcji sporządzono analogiczne tabele, pozwalające na dokonanie obliczeń 79

Tab. 11. Wpływ zastosowanych modyfikacji protokołu syntezy na otrzymywanie prepolimerów PAC 81

Tab. 12. Wartości wyników oznaczania liczby kwasowej dla badanych prepolimerów. **LK_{max}:** Maksymalna liczba kwasowa prepolimeru (zerowe wysycenie grup karboksylowych diolem), **LK_{min}:** Minimalna liczba kwasowa prepolimeru (100% wysycenia grup karboksylowych diolem) 82

Tab. 13. Wartości liczbowo średnich oraz wagowo średnich mas cząsteczkowych oraz dyspersyjności uzyskane dla badanych prepolimerów PAC w analizie GPC 85

Tab. 14. Identyfikacja jonów molekularnych występujących w widmach masowych otrzymanych w wyniku analizy FIA-MS w trybie ujemnej jonizacji prepolimeru POC_2:3 i ich przyporządkowanie do możliwych struktur chemicznych poszczególnych oligomerów (etykiety jonów od I do XI na rysunku 32). **C** – pojedynczy segment cytrynianowy, **D** pojedyncza grupa alkilenowa. Najbardziej prawdopodobne struktury poszczególnych oligomerów, według analiz NMR, oznaczono pogrubieniem. 88

Tab. 15. Identyfikacja jonów molekularnych występujących w widmach masowych otrzymanych w wyniku analiz FIA-MS w trybie ujemnej jonizacji dla prepolimeru POC_1:1 i ich przyporządkowanie do możliwych struktur chemicznych poszczególnych oligomerów (etykiety jonów od I do X na rysunku 33). **C** – pojedynczy segment cytrynianowy, **D** pojedyncza grupa alkilenowa. Najbardziej prawdopodobne struktury poszczególnych oligomerów, według analiz NMR, oznaczono pogrubieniem. 89

Tab. 16. Identyfikacja jonów molekularnych występujących w widmach masowych otrzymanych w wyniku analiz FIA-MS w trybie ujemnej jonizacji dla prepolimeru POC_2:3 po 60 minutach reakcji i ich przyporządkowanie do możliwych struktur chemicznych poszczególnych oligomerów (etykiety jonów od I do XI na rysunku 34A). **C** – pojedynczy segment cytrynianowy, **D** pojedyncza grupa alkilenowa. Najbardziej prawdopodobne struktury poszczególnych oligomerów, według analiz NMR, oznaczono pogrubieniem. Przypisania, dla których możliwe są wyłącznie struktury rozgałęzione oznaczono czerwoną ramką 90

Tab. 17. Identyfikacja jonów molekularnych występujących w widmach masowych otrzymanych w wyniku analiz FIA-MS w trybie ujemnej jonizacji dla prepolimeru POC_2:3 po 90minutach reakcji i ich przyporządkowanie do możliwych struktur chemicznych poszczególnych oligomerów (etykiety jonów od I do XII na rysunku 34B). **C** – pojedynczy segment cytrynianowy, **D** pojedyncza grupa alkilenowa. Najbardziej prawdopodobne struktury poszczególnych oligomerów, według analiz NMR, oznaczono pogrubieniem. Przypisania, dla których możliwe są wyłącznie struktury rozgałęzione oznaczono czerwoną ramką 91

Tab. 18. Zestawienie szczegółowych różnic pomiędzy sygnałami występującymi na widmach ^{1}H-NMR dla prepolimerów PHC_1:1 oraz POC_1:1. W tabeli zawarto wartości sygnałów wraz z przypisaniem ich do konkretnej struktury w reszcie cytrynianowej lub alkilenowej 97

Tab. 19. Wartości stosunków molowych obliczonych na podstawie widm ^{1}H NMR dla badanych prepolimerów 99

Tab. 20. Zestawienie obliczonej reaktywności grup karboksylowych dla badanych prepolimerów PAC, obliczonej na podstawie analizy widm NMR 101

Tab. 21. Zestawienie obliczonych za pomocą analiz widm ^{1}H NMR stopni konwersji grup karboksylowych kwasu cytrynowego dla różnych prepolimerów PAC 102

Tab. 22. Wartości pH 10% ekstraktów z materiałów cPAC w porównaniu z wartością pH dla czystej pożywki 117

Tab. 23. Porównanie wartości stosunku molowego oraz stopnia konwersji grup karboksylowych w materiałach cPOC_2:3 kontrolnym i modyfikowanym na podstawie analizy widm ^{13}C MAS NMR 130

Tab. 24. Porównanie maksimów emisji fluorescencji materiałów kontrolnych i modyfikowanych PAC uzyskanych po 4 i 10 dniach sieciowania. Odczytu dokonano dla wartości przy długości fali 444 nm 136

Bibliografia

[1] H. Thomas *i in.*, „Global atlas of cardiovascular disease 2000-2016: The path to prevention and control", *Glob. Heart*, t. 13, nr 3, s. 143, 2018, doi: 10.1016/j.gheart.2018.09.511.

[2] E. J. Benjamin *i in.*, „Heart disease and stroke statistics - 2018 update: A report from the American Heart Association", *Circulation*, t. 137, nr 12, s. E67, 2018, doi: 10.1161/CIR.0000000000000558.

[3] A. Timmis *i in.*, „European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021: Executive Summary", *Eur. Hear. J. - Qual. Care Clin. Outcomes*, t. 8, nr 4, s. 377, 2022, doi: 10.1093/ehjqcco/qcac014.

[4] S. W. Finks *i in.*, „Key articles of dietary interventions that influence cardiovascular mortality.", *Pharmacotherapy*, t. 32, nr 4, s. e54, 2012. doi: 10.1002/j.1875-9114.2011.01087.x.

[5] R. H. Eckel, „Obesity and heart disease: A statement for healthcare professionals from the nutrition committee, American Heart Association", *Circulation*, t. 96, nr 9, s. 3248, 1997. doi: 10.1161/01.CIR.96.9.3248.

[6] S. Kathiresan *i in.*, „Genetics of human cardiovascular disease", *Cell*, t. 148, nr 6, s. 1242, 2012. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.001.

[7] H. Tunstall-Pedoe, „Cardiovascular risk and risk scores: ASSIGN, Framingham, QRISK and others: How to choose", *Heart*, t. 97, nr 6, s. 442, 2011. doi: 10.1136/hrt.2010.214858.

[8] A. Steptoe *i in.*, „Stress and cardiovascular disease", *Nature Reviews Cardiology*, t. 9, nr 6, s. 360, 2012. doi: 10.1038/nrcardio.2012.45.

[9] H. H. G. Song *i in.*, „Vascular tissue engineering: Progress, challenges, and clinical promise", *Cell Stem Cell*, t. 22, nr 3, s. 340, 2018. doi: 10.1016/j.stem.2018.02.009.

[10] I. S. Okwuosa *i in.*, „Worldwide disparities in cardiovascular disease: Challenges and solutions", *Int. J. Cardiol.*, t. 202, s. 433, 2016, doi: 10.1016/j.ijcard.2015.08.172.

[11] J. S. Berger *i in.*, „Aspirin for the prevention of cardiovascular events in patients without

clinical cardiovascular disease: A meta-analysis of randomized trials", *Am. Heart J.*, t. 162, nr 1, s. 115, 2011, doi: 10.1016/j.ahj.2011.04.006.

[12] J. Gutierrez *i in.*, „Statin therapy in the prevention of recurrent cardiovascular events", *Arch. Intern. Med.*, t. 172, nr 12, s. 909, 2012, doi: 10.1001/archinternmed.2012.2145.

[13] G. D. Flora *i in.*, „A brief review of cardiovascular diseases, associated risk factors and current treatment regimes", *Curr. Pharm. Des.*, t. 25, nr 38, s. 4063, 2019, doi: 10.2174/1381612825666190925163827.

[14] A. W. Zia *i in.*, „Structural design and mechanical performance of composite vascular grafts", *Bio-Design Manuf.*, t. 5, nr 4, s. 757, 2022, doi: 10.1007/s42242-022-00201-7.

[15] D. Karnabatidis *i in.*, „Stent-grafts versus angioplasty and/or bare metal stents for failing arteriovenous grafts: A cross-over longitudinal study", *J. Nephrol.*, t. 26, nr 2, s. 389, 2013, doi: 10.5301/jn.5000161.

[16] R. Langer *i in.*, „Tissue engineering", *Science*, t. 260, nr 5110, s. 920, 1993, doi: 10.1126/science.8493529.

[17] R. Langer *i in.*, „Advances in tissue engineering", *J. Pediatr. Surg.*, t. 51, nr 1, s. 8, 2016, doi: 10.1016/j.jpedsurg.2015.10.022.

[18] L. J. Suggs, *Tissue engineering*, t. 3, nr 1, s. 1, 2012. doi: 10.1201/b13978.

[19] C. A. Heath, „Cells for tissue engineering", *Trends in Biotechnology*, t. 18, nr 1, s. 17, 2000. doi: 10.1016/S0167-7799(99)01396-7.

[20] S. Perez-Lopez *i in.*, „Stem cell and tissue engineering approaches in pressure ulcer treatment", *J. Spinal Cord Med.*, t. 46, nr 2, s. 194, 2023, doi: 10.1080/10790268.2021.1916155.

[21] H. Li *i in.*, „Immunomodulatory functions of mesenchymal stem cells in tissue engineering", *Stem Cells Int.*, t. 2019, s. 1, 2019, doi: 10.1155/2019/9671206.

[22] H. Savoji *i in.*, „3D printing of vascular tubes using bioelastomer prepolymers by freeform reversible embedding", *ACS Biomater. Sci. Eng.*, t. 6, nr 3, s. 1333, 2020, doi: 10.1021/acsbiomaterials.9b00676.

[23] J. Gopinathan *i in.*, „Recent trends in bioinks for 3D printing”, *Biomaterials Research*, t. 22, nr 1, s. 1, 2018. doi: 10.1186/s40824-018-0122-1.

[24] X. Wang, „Bioartificial Organ Manufacturing Technologies”, *Cell Transplant.*, t. 28, nr 1, s. 5, 2019, doi: 10.1177/0963689718809918.

[25] J. M. Anderson *i in.*, „Foreign body reaction to biomaterials”, *Seminars in Immunology*, t. 20, nr 2. s. 86, 2008. doi: 10.1016/j.smim.2007.11.004.

[26] J. M. Anderson, „Biological responses to materials”, *Annu. Rev. Mater. Sci.*, t. 31, s. 81, 2001, doi: 10.1146/annurev.matsci.31.1.81.

[27] D. Ozdil *i in.*, „Polymers for medical and tissue engineering applications”, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, t. 89, nr 12, s. 1793, 2014. doi: 10.1002/jctb.4505.

[28] J. M. Anderson *i in.*, „Biomaterial biocompatibility and the macrophage”, w *The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium*, s. 21, Elsevier 1984. doi: 10.1016/B978-008045154-1.50004-6.

[29] G. Zhou *i in.*, „Host responses to biomaterials and anti-inflammatory design-a brief review”, *Macromol. Biosci.*, t. 18, nr 8, s. 1800112, 2018, doi: 10.1002/mabi.201800112.

[30] C. E. Witherel *i in.*, „Macrophage and fibroblast interactions in biomaterial-mediated fibrosis”, *Adv. Healthc. Mater.*, t. 8, nr 4, s. 1801451, 2019, doi: 10.1002/adhm.201801451.

[31] D. Zhang *i in.*, „Dealing with the foreign-body response to implanted biomaterials: strategies and applications of new materials”, *Adv. Funct. Mater.*, t. 31, nr 6, s. 2007226, 2021, doi: 10.1002/adfm.202007226.

[32] H. Zhang *i in.*, „Control of scaffold degradation in tissue engineering: A review”, *Tissue Eng. Part B Rev.*, t. 20, nr 5, s. 492, 2014, doi: 10.1089/ten.teb.2013.0452.

[33] O. Vesvoranan *i in.*, „Current concepts and methods in tissue interface scaffold fabrication”, *Biomimetics*, t. 7, nr 4, s. 151, 2022, doi: 10.3390/biomimetics7040151.

[34] S. Chaudhary *i in.*, „Cellular metabolism: a link connecting cellular behaviour with the

physiochemical properties of biomaterials for bone tissue engineering", *Biomater. Sci.*, t. 11, nr 7, s. 2277, 2023, doi: 10.1039/D2BM01410F.

[35] C. J. Agnes *i in.*, „A 6-bromoindirubin-3'-oxime incorporated chitosan-based hydrogel scaffold for potential osteogenic differentiation: Investigation of material properties in vitro", *Int. J. Biol. Macromol.*, t. 227, s. 71, 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.12.130.

[36] Y. Li *i in.*, „Injectable biomimetic hydrogel guided functional bone regeneration by adapting material degradation to tissue healing", *Adv. Funct. Mater.*, s. 2213047, 2023, doi: 10.1002/adfm.202213047.

[37] K. Kim *i in.*, „Non-invasive monitoring of tissue scaffold degradation using ultrasound elasticity imaging", *Acta Biomater.*, t. 4, nr 4, s. 783, 2008, doi: 10.1016/j.actbio.2008.02.010.

[38] S. H. Kim *i in.*, „Near-infrared fluorescence imaging for noninvasive trafficking of scaffold degradation", *Sci. Rep.*, t. 3, s. 1, 2013, doi: 10.1038/srep01198.

[39] S. H. Kim *i in.*, „NIR fluorescence for monitoring in vivo scaffold degradation along with stem cell tracking in bone tissue engineering", *Biomaterials*, t. 258, s. 120267, 2020, doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.120267.

[40] C. Cunha-Reis *i in.*, „Fluorescent labeling of chitosan for use in non-invasive monitoring of degradation in tissue engineering", *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, t. 7, nr 1, s. 39, 2013, doi: 10.1002/term.494.

[41] D. G. Barrett *i in.*, „Thermosets synthesized by thermal polyesterification for tissue engineering applications", *Soft Matter*, t. 6, nr 20, s. 5026, 2010, doi: 10.1039/C0SM00476F.

[42] D. G. Barrett *i in.*, „Design and applications of biodegradable polyester tissue scaffolds based on endogenous monomers found in human metabolism", *Molecules*, t. 14, nr 10, s. 4022, 2009, doi: 10.3390/molecules14104022.

[43] K. Martyniak *i in.*, „Biomaterial composition and stiffness as decisive properties of 3D bioprinted constructs for type II collagen stimulation", *Acta Biomater.*, t. 152, s. 221, 2022, doi: 10.1016/j.actbio.2022.08.058.

[44] B. Yi *i in.*, „An overview of substrate stiffness guided cellular response and its applications in tissue regeneration”, *Bioact. Mater.*, t. 15, s. 82, 2022, doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.12.005.

[45] Y. S. Kim *i in.*, „An overview of the tissue engineering market in the United States from 2011 to 2018”, *Tissue Eng. Part A*, t. 25, nr 1–2, s. 1, 2019, doi: 10.1089/ten.tea.2018.0138.

[46] M. J. Lysaght, „Product development in tissue engineering”, *Tissue Eng.*, t. 1, nr 2, s. 221, 1995, doi: 10.1089/ten.1995.1.221.

[47] J. Bai *i in.*, „Additive manufacturing of ceramics: Materials, characterization and applications”, w *Additive Manufacturing*, Cham: Springer International Publishing, 2023, s. 245. doi: 10.1007/978-3-031-04721-3_7.

[48] A. Indurkar *i in.*, „Plant-based biomaterials in tissue engineering”, *Bioprinting*, t. 21, s. e00127, 2021, doi: 10.1016/j.bprint.2020.e00127.

[49] M. F. M. A. Zamri *i in.*, „Waste to health: A review of waste derived materials for tissue engineering”, *J. Clean. Prod.*, t. 290, s. 125792, 2021, doi: 10.1016/j.jclepro.2021.125792.

[50] F. Wang *i in.*, „Cell–scaffold interactions in tissue engineering for oral and craniofacial reconstruction”, *Bioact. Mater.*, t. 23, s. 16, 2023, doi: 10.1016/j.bioactmat.2022.10.029.

[51] W. Dang *i in.*, „3D printing of metal-organic framework nanosheets-structured scaffolds with tumor therapy and bone construction”, *Biofabrication*, t. 12, nr 2, s. 025005, 2020, doi: 10.1088/1758-5090/ab5ae3.

[52] L. Zhong *i in.*, „3D printing of metal-organic framework incorporated porous scaffolds to promote osteogenic differentiation and bone regeneration”, *Nanoscale*, t. 12, nr 48, s. 24437, 2020, doi: 10.1039/d0nr06297a.

[53] M. Mohammadi Zerankeshi *i in.*, „Polymer/metal composite 3D porous bone tissue engineering scaffolds fabricated by additive manufacturing techniques: A review”, *Bioprinting*, t. 25, s. e00191, 2022, doi: 10.1016/j.bprint.2022.e00191.

[54] Q. L. Loh *i in.*, „Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size”, *Tissue Eng. Part B Rev.*, t. 19, nr 6, s. 485, 2013, doi: 10.1089/ten.teb.2012.0437.

[55] B. Thavornyutikarn *i in.*, „Bone tissue engineering scaffolding: computer-aided scaffolding techniques”, *Prog. Biomater.*, t. 3, nr 2–4, s. 61, 2014, doi: 10.1007/s40204-014-0026-7.

[56] A. Sola *i in.*, „Development of solvent-casting particulate leaching (SCPL) polymer scaffolds as improved three-dimensional supports to mimic the bone marrow niche”, *Mater. Sci. Eng. C*, t. 96, s. 153, 2019, doi: 10.1016/j.msec.2018.10.086.

[57] A. R. D. V. Morais *i in.*, „Freeze-drying of emulsified systems: A review”, *Int. J. Pharm.*, t. 503, nr 1–2, s. 102, 2016, doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.02.047.

[58] Y. Tang *i in.*, „In situ gas foaming based on magnesium particle degradation: A novel approach to fabricate injectable macroporous hydrogels”, *Biomaterials*, t. 232, s. 119727, 2020, doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119727.

[59] L. Depeigne *i in.*, „Electrospun biomaterials’ applications and processing”, *J. Biomimetics, Biomater. Biomed. Eng.*, t. 49, s. 91, 2021, doi: 10.4028/www.scientific.net/JBBBE.49.91.

[60] Y. S. Nam *i in.*, „Biodegradable polymeric microcellular foams by modified thermally induced phase separation method”, *Biomaterials*, t. 20, nr 19, s. 1783, 1999, doi: 10.1016/S0142-9612(99)00073-3.

[61] J. W. Cassidy, „Nanotechnology in the regeneration of complex tissues”, *Bone Tissue Regen. Insights*, t. 5, s. 25, 2014, doi: 10.4137/BTRI.S12331.

[62] D. G. Barrett *i in.*, „One-step syntheses of photocurable polyesters based on a renewable resource”, *Macromolecules*, t. 43, nr 23, s. 9660, 2010, doi: 10.1021/ma1015424.

[63] A. Awad *i in.*, „3D printing: Principles and pharmaceutical applications of selective laser sintering”, *Int. J. Pharm.*, t. 586, s. 119594, 2020, doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119594.

[64] J. C. Hargrove, „Review of medical physiology”, *Anesthesiology*, t. 52, nr 2, s. 197, 1980,

doi: 10.1097/00000542-198002000-00041.

[65] M. Hedayati *i in.*, „The quest for blood-compatible materials: Recent advances and future technologies”, *Mater. Sci. Eng. R Reports*, t. 138, s. 118, 2019, doi: 10.1016/j.mser.2019.06.002.

[66] S. Braune *i in.*, „Developing standards and test protocols for testing the hemocompatibility of biomaterials”, w *Hemocompatibility of Biomaterials for Clinical Applications: Blood-Biomaterials Interactions*, s. 51, Woodhead Publishing, 2017, doi: 10.1016/B978-0-08-100497-5.00004-5.

[67] Y. Wang *i in.*, „The combination of stem cells and tissue engineering: An advanced strategy for blood vessels regeneration and vascular disease treatment”, *Stem Cell Res. Ther.*, t. 8, nr 1, s. 1, 2017, doi: 10.1186/s13287-017-0642-y.

[68] T. Flanagan *i in.*, „Living artificial heart valve alternatives: A review”, *Eur. Cells Mater.*, t. 6, s. 28, 2003, doi: 10.22203/eCM.v006a04.

[69] H. M. Nugent *i in.*, „Tissue engineering therapy for cardiovascular disease”, *Circ. Res.*, t. 92, nr 10, s. 1068, 2003, doi: 10.1161/01.RES.0000073844.41372.38.

[70] S. Khan *i in.*, „Evolution of artificial hearts: An overview and history”, *Cardiol. Res.*, t. 5, nr 5, s. 121, 2014, doi: 10.14740/cr354w.

[71] D. G. Seifu *i in.*, „Small-diameter vascular tissue engineering”, *Nat. Rev. Cardiol.*, t. 10, nr 7, s. 410, 2013, doi: 10.1038/nrcardio.2013.77.

[72] D. Miranda-Nieves *i in.*, „Collagen and elastin biomaterials for the fabrication of engineered living tissues”, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, t. 3, nr 5, s. 694, 2017, doi: 10.1021/acsbiomaterials.6b00250.

[73] Y. D. Nokoorani *i in.*, „Fabrication and characterization of scaffolds containing different amounts of allantoin for skin tissue engineering”, *Sci. Rep.*, t. 11, nr 1, s. 16164, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-95763-4.

[74] J. W. Boretos *i in.*, „Segmented polyurethane: A new elastomer for biomedical applications”, *Science*, t. 158, nr 3807, s. 1481, 1967, doi: 10.1126/science.158.3807.1481.

[75] M. E. D. Bakey *i in.*, „Successful resection of aneurysm of distal aortic arch and replacement by graft”, *J. Am. Med. Assoc.*, t. 155, nr 16, s. 1398, 1954, doi: 10.1001/jama.1954.03690340020007.

[76] H. I. Lee *i in.*, „Multifunctional biodegradable vascular PLLA scaffold with improved X-ray opacity, anti-inflammation, and re-endothelization”, *Polymers*, t. 13, nr 12, s. 1979, 2021, doi: 10.3390/polym13121979.

[77] D. C. Miller *i in.*, „PLGA nanometer surface features manipulate fibronectin interactions for improved vascular cell adhesion”, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, t. 81, nr 3, s. 678, 2007, doi: 10.1002/jbm.a.31093.

[78] B. Guo *i in.*, „Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: A brief review”, *Sci. China Chem.*, t. 57, nr 4, s. 490, 2014, doi: 10.1007/s11426-014-5086-y.

[79] B. Zavan *i in.*, „Electrospun PCL-based vascular grafts: In vitro tests”, *Nanomaterials*, t. 11, nr 3, s. 1, 2021, doi: 10.3390/nano11030751.

[80] D. Gugutkov *i in.*, „Electrospun fibrinogen–PLA nanofibres for vascular tissue engineering”, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, t. 11, nr 10, s. 2774, 2017, doi: 10.1002/term.2172.

[81] L. Yu *i in.*, „Coating small-diameter ePTFE vascular grafts with tunable poly(diol-co-citrate-co-ascorbate) elastomers to reduce neointimal hyperplasia”, *Biomater. Sci.*, t. 9, nr 15, s. 5160, 2021, doi: 10.1039/D1BM00101A.

[82] J. P. Mazzucotelli *i in.*, „Human vascular endothelial cells on expanded PTFE precoated with an engineered protein adhesion factor”, *Int. J. Artif. Organs*, t. 17, nr 2, s. 112, 1994, doi: 10.1177/039139889401700209.

[83] K. S. Lee *i in.*, „A comparative study of an anti-thrombotic small-diameter vascular graft with commercially available e-PTFE graft in a porcine carotid model”, *Tissue Eng. Regen. Med.*, t. 19, nr 3, s. 537, 2022, doi: 10.1007/s13770-021-00422-4.

[84] D. I. Braghirolli *i in.*, „Electrospun scaffolds functionalized with heparin and vascular endothelial growth factor increase the proliferation of endothelial progenitor cells”, *Biomed. Mater.*, t. 12, nr 2, s. 025003, 2017, doi: 10.1088/1748-605X/aa5bbc.

[85] J. Gao *i in.*, „The grafts modified by heparinization and catalytic nitric oxide generation used for vascular implantation in rats”, *Regen. Biomater.*, t. 5, nr 2, s. 105, 2018, doi: 10.1093/rb/rby003.

[86] N. Wang *i in.*, „In vitro evaluation of essential mechanical properties and cell behaviors of a novel polylactic-co-glycolic acid (PLGA)-based tubular scaffold for small-diameter vascular tissue Engineering”, *Polymers*, t. 9, nr 8, s. 318, 2017, doi: 10.3390/polym9080318.

[87] U. Bertram *i in.*, „Vascular tissue engineering: effects of integrating collagen into a PCL based nanofiber Material”, *Biomed Res. Int.*, t. 2017, s. 1, 2017, doi: 10.1155/2017/9616939.

[88] B. B. J. Leal *i in.*, „Vascular tissue engineering: Polymers and methodologies for small caliber vascular grafts”, *Front. Cardiovasc. Med.*, t. 7, s. 376, 2021, doi: 10.3389/fcvm.2020.592361.

[89] N. Maurmann *i in.*, „Electrospun and electrosprayed scaffolds for tissue engineering”, w *Advances in Experimental Medicine and Biology*, s. 79, Springer New York LLC, 2018, doi: 10.1007/978-981-13-0950-2_5.

[90] A. J. Melchiorri *i in.*, „Development and assessment of a biodegradable solvent cast polyester fabric small-diameter vascular graft”, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, t. 102, nr 6, s. 1972, 2014, doi: 10.1002/jbm.a.34872.

[91] F. J. O’Brien, „Biomaterials & scaffolds for tissue engineering”, *Mater. Today*, t. 14, nr 3, s. 88, 2011, doi: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X.

[92] O. C. Tysoe *i in.*, „Isolation and propagation of primary human cholangiocyte organoids for the generation of bioengineered biliary tissue”, *Nat. Protoc.*, t. 14, nr 6, s. 1884, 2019, doi: 10.1038/s41596-019-0168-0.

[93] T. Fukunishi *i in.*, „Preclinical study of patient-specific cell-free nanofiber tissue-engineered vascular grafts using 3-dimensional printing in a sheep model”, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, t. 153, nr 4, s. 924, 2017, doi: 10.1016/j.jtcvs.2016.10.066.

[94] K. Torikai *i in.*, „A self-renewing, tissue-engineered vascular graft for arterial

reconstruction", *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, t. 136, nr 1, s. 37, 2008, doi: 10.1016/j.jtcvs.2007.06.039.

[95] T. Yokota *i in.*, „In situ tissue regeneration using a novel tissue-engineered, small-caliber vascular graft without cell seeding", *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, t. 136, nr 4, s. 900, 2008, doi: 10.1016/j.jtcvs.2008.02.058.

[96] J. D. Roh *i in.*, „Small-diameter biodegradable scaffolds for functional vascular tissue engineering in the mouse model", *Biomaterials*, t. 29, nr 10, s. 1454, 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.11.041.

[97] V. DeStefano *i in.*, „Applications of PLA in modern medicine", *Eng. Regen.*, t. 1, s. 76, 2020, doi: 10.1016/j.engreg.2020.08.002.

[98] C. Lin *i in.*, „Interaction of iPSC-derived neural stem cells on poly(L-lactic acid) nanofibrous scaffolds for possible use in neural tissue engineering", *Int. J. Mol. Med.*, t. 41, nr 2, s. 697, 2018, doi: 10.3892/ijmm.2017.3299.

[99] P. C. Caracciolo *i in.*, „Surface-modified bioresorbable electrospun scaffolds for improving hemocompatibility of vascular grafts", *Mater. Sci. Eng. C*, t. 75, s. 1115, 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.02.151.

[100] C. K. Hashi *i in.*, „Antithrombogenic property of bone marrow mesenchymal stem cells in nanofibrous vascular grafts", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, t. 104, nr 29, s. 11915, 2007, doi: 10.1073/pnas.0704581104.

[101] T. Sugiura *i in.*, „Novel bioresorbable vascular graft with sponge-type scaffold as a small-diameter arterial graft", *Ann. Thorac. Surg.*, t. 102, nr 3, s. 720, 2016, doi: 10.1016/j.athoracsur.2016.01.110.

[102] K. A. Athanasiou *i in.*, „Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers", *Biomaterials*, t. 17, nr 2, s. 93, 1996, doi: 10.1016/0142-9612(96)85754-1.

[103] W. Jia *i in.*, „Design and comprehensive assessment of a biomimetic tri-layer tubular scaffold via biodegradable polymers for vascular tissue engineering applications", *Mater. Sci. Eng. C*, t. 110, s. 110717, 2020, doi: 10.1016/j.msec.2020.110717.

[104] E. Rosellini *i in.*, „Development of biomimetic alginate/gelatin/elastin sponges with recognition properties toward bioactive peptides for cardiac tissue engineering”, *Biomimetics*, t. 5, nr 4, s. 1, 2020, doi: 10.3390/biomimetics5040067.

[105] T. U. Nguyen *i in.*, „Electrochemical fabrication of a biomimetic elastin-containing bi-layered scaffold for vascular tissue engineering”, *Biofabrication*, t. 11, nr 1, s. 015007, 2019, doi: 10.1088/1758-5090/aaeab0.

[106] P. Gupta *i in.*, „Bioresorbable silk grafts for small diameter vascular tissue engineering applications: In vitro and in vivo functional analysis”, *Acta Biomater.*, t. 105, s. 146, 2020, doi: 10.1016/j.actbio.2020.01.020.

[107] C. B. Weinberg *i in.*, „A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells”, *Science*, t. 231, nr 4736, s. 397, 1986, doi: 10.1126/science.2934816.

[108] T. Fukayama *i in.*, „Effect of fibroin sponge coating on in vivo performance of knitted silk small diameter vascular grafts”, *Organogenesis*, t. 11, nr 3, s. 137, 2015, doi: 10.1080/15476278.2015.1093268.

[109] M. Lovett *i in.*, „Tubular silk scaffolds for small diameter vascular grafts”, *Organogenesis*, t. 6, nr 4, s. 217, 2010, doi: 10.4161/org.6.4.13407.

[110] I. C. P. Rodrigues *i in.*, „A novel technique to produce tubular scaffolds based on collagen and elastin”, *Artif. Organs*, t. 45, nr 5, s. E113, 2021, doi: 10.1111/aor.13857.

[111] I. Gonzalez de Torre *i in.*, „Elastin-based materials: Promising candidates for cardiac tissue regeneration”, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, t. 8, s. 657, 2020, doi: 10.3389/fbioe.2020.00657.

[112] N. Duan *i in.*, „A vascular tissue engineering scaffold with core-shell structured nano-fibers formed by coaxial electrospinning and its biocompatibility evaluation”, *Biomed. Mater.*, t. 11, nr 3, s. 035007, 2016, doi: 10.1088/1748-6041/11/3/035007.

[113] F. Zhang *i in.*, „Engineering small-caliber vascular grafts from collagen filaments and nanofibers with comparable mechanical properties to native vessels”, *Biofabrication*, t. 11, nr 3, s. 035020, 2019, doi: 10.1088/1758-5090/ab15ce.

[114] T. Sannan *i in.*, „Studies on chitin. V. Kinetics of deacetylation reaction”, *Polym. J.*, t. 9,

nr 6, s. 649, 1977, doi: 10.1295/polymj.9.649.

[115] T. Sultana *i in.*, „Preparation and characterization of polycaprolactone–polyethylene glycol methyl ether and polycaprolactone–chitosan electrospun mats potential for vascular tissue engineering”, *J. Biomater. Appl.*, t. 32, nr 5, s. 648, 2017, doi: 10.1177/0885328217733849.

[116] C. Zhu *i in.*, „Initial investigation of novel human-like collagen/chitosan scaffold for vascular tissue engineering”, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, t. 89, nr 3, s. 829, 2009, doi: 10.1002/jbm.a.32256.

[117] L. Li *i in.*, „LBL deposition of chitosan/heparin bilayers for improving biological ability and reducing infection of nanofibers”, *Int. J. Biol. Macromol.*, t. 154, s. 999, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.03.152.

[118] A. Yin *i in.*, „Performance of PEGylated chitosan and poly (L-lactic acid-co-ε-caprolactone) bilayer vascular grafts in a canine femoral artery model”, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, t. 188, s. 110806, 2020, doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.110806.

[119] Y. T. Hu *i in.*, „In vitro and in vivo evaluation of a small-caliber coaxial electrospun vascular graft loaded with heparin and VEGF”, *Int. J. Surg.*, t. 44, s. 244, 2017, doi: 10.1016/j.ijsu.2017.06.077.

[120] S. G. Wise *i in.*, „A multilayered synthetic human elastin/polycaprolactone hybrid vascular graft with tailored mechanical properties”, *Acta Biomater.*, t. 7, nr 1, s. 295, 2011, doi: 10.1016/j.actbio.2010.07.022.

[121] D. Y. Li *i in.*, „Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis”, *Nature*, t. 393, nr 6682, s. 276, 1998, doi: 10.1038/30522.

[122] O. Hakimi *i in.*, „Spider and mulberry silkworm silks as compatible biomaterials”, *Compos. Part B Eng.*, t. 38, nr 3, s. 324, 2007, doi: 10.1016/j.compositesb.2006.06.012.

[123] E. C. Filipe *i in.*, „Rapid endothelialization of off-the-shelf small diameter silk vascular grafts”, *JACC Basic to Transl. Sci.*, t. 3, nr 1, s. 38, 2018, doi: 10.1016/j.jacbts.2017.12.003.

[124] I. Cattaneo *i in.*, „In vivo regeneration of elastic lamina on fibroin biodegradable vascular

scaffold", *Int. J. Artif. Organs*, t. 36, nr 3, s. 166, 2013, doi: 10.5301/ijao.5000185.

[125] S. Enomoto *i in.*, „Long-term patency of small-diameter vascular graft made from fibroin, a silk-based biodegradable material", *J. Vasc. Surg.*, t. 51, nr 1, s. 155, 2010, doi: 10.1016/j.jvs.2009.09.005.

[126] M. Antunes *i in.*, „Development of alginate-based hydrogels for blood vessel engineering", *Mater. Sci. Eng. C*, t. 134, s. 112588, 2021, doi: 10.1016/j.msec.2021.112588.

[127] D. R. Sahoo *i in.*, „Alginate and its application to tissue engineering", *SN Appl. Sci.*, t. 3, nr 1, s. 30, 2021, doi: 10.1007/s42452-020-04096-w.

[128] J. Du *i in.*, „Gelatin/sodium alginate hydrogel-coated decellularized porcine coronary artery to construct bilayer tissue engineered blood vessels", *Int. J. Biol. Macromol.*, t. 209, s. 2070, 2022, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.04.188.

[129] S. Zang *i in.*, „Investigation on artificial blood vessels prepared from bacterial cellulose", *Mater. Sci. Eng. C*, t. 46, s. 111, 2015, doi: 10.1016/j.msec.2014.10.023.

[130] S. D. Dutta *i in.*, „Functional cellulose-based hydrogels as extracellular matrices for tissue engineering", *J. Biol. Eng.*, t. 13, nr 1, s. 55, 2019, doi: 10.1186/s13036-019-0177-0.

[131] K. Varaprasad *i in.*, „The significance of biomacromolecule alginate for the 3D printing of hydrogels for biomedical applications", *Int. J. Biol. Macromol.*, t. 212, s. 561, 2022, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.05.157.

[132] V. L. Pachapur *i in.*, „Platform Chemicals", w *Platform Chemical Biorefinery*, s. 1, Elsevier, 2016, doi: 10.1016/B978-0-12-802980-0.00001-8.

[133] D. C. Miller *i in.*, „Endothelial and vascular smooth muscle cell function on poly(lactic-co-glycolic acid) with nano-structured surface features", *Biomaterials*, t. 25, nr 1, s. 53, 2004, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00471-X.

[134] C. M. Bellingham *i in.*, „Recombinant human elastin polypeptides self-assemble into biomaterials with elastin-like properties", *Biopolymers*, t. 70, nr 4, s. 445, 2003, doi: 10.1002/bip.10512.

[135] S. E. Paramonov *i in.*, „Self-assembly of peptide-amphiphile nanofibers: The roles of hydrogen bonding and amphiphilic packing”, *J. Am. Chem. Soc.*, t. 128, nr 22, s. 7291, 2006, doi: 10.1021/ja060573x.

[136] Y. Zhang *i in.*, „Effects of carbon-based nanomaterials on vascular endothelia under physiological and pathological conditions: interactions, mechanisms and potential therapeutic applications”, *J. Control. Release*, t. 330, s. 945, 2021, doi: 10.1016/j.jconrel.2020.10.067.

[137] D. Motlagh *i in.*, „Hemocompatibility evaluation of poly(glycerol-sebacate) in vitro for vascular tissue engineering”, *Biomaterials*, t. 27, nr 24, s. 4315, 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.04.010.

[138] P. Karimi *i in.*, „Versatile biodegradable poly(ester amide)s derived from α-Amino acids for vascular tissue engineering”, *Materials*, t. 3, nr 4, s. 2346, 2010, doi: 10.3390/ma3042346.

[139] L. Gui *i in.*, „Development of novel biodegradable polymer scaffolds for vascular tissue engineering”, *Tissue Eng. - Part A*, t. 17, nr 9–10, s. 1191, 2011, doi: 10.1089/ten.tea.2010.0508.

[140] S. Farjaminejad *i in.*, „Tuning properties of bio-rubbers and its nanocomposites with addition of succinic acid and ε-caprolactone monomers to poly(glycerol sebacic acid) as main platform for application in tissue engineering”, *Eur. Polym. J.*, t. 159, s. 110711, 2021, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2021.110711.

[141] T. Abudula *i in.*, „Electrospun cellulose nano fibril reinforced PLA/PBS composite scaffold for vascular tissue engineering”, *J. Polym. Res.*, t. 26, nr 5, s. 1, 2019, doi: 10.1007/s10965-019-1772-y.

[142] B. Davoodi *i in.*, „Design and manufacturing a tubular structures based on poly(ε-caprolactone)/poly(glycerol-sebacic acid) biodegradable nanocomposite blends: suggested for applications in the nervous, vascular and renal tissue engineering”, *J. Polym. Res.*, t. 29, nr 2, s. 54, 2022, doi: 10.1007/s10965-021-02881-8.

[143] S. Chanda *i in.*, „Poly(alkylene itaconate)s - An interesting class of polyesters with

periodically located exo-chain double bonds susceptible to Michael addition", *Polym. Chem.*, t. 6, nr 11, s. 2108, 2015, doi: 10.1039/c4py01613k.

[144] U. Veerabagu *i in.*, „A facile synthesis of itaconic acid based biodegradable co-polyesters: An in-vitro anticancer evaluation and controlled drug delivery system", *J. Polym. Environ.*, t. 27, nr 12, s. 2756, 2019, doi: 10.1007/s10924-019-01562-4.

[145] R. Prabakaran *i in.*, „Biobased unsaturated polyesters containing castor oil-derived ricinoleic acid and itaconic acid: Synthesis, in vitro antibacterial, and cytocompatibility studies", *ACS Appl. Bio Mater.*, t. 3, nr 9, s. 5708, 2020, doi: 10.1021/acsabm.0c00480.

[146] S. Brännström *i in.*, „Biobased UV-curable coatings based on itaconic acid", *J. Coatings Technol. Res.*, t. 14, nr 4, s. 851, 2017, doi: 10.1007/s11998-017-9949-y.

[147] T. Robert *i in.*, „Itaconic acid-a versatile building block for renewable polyesters with enhanced functionality", *Green Chem.*, t. 18, nr 10, s. 2922, 2016, doi: 10.1039/c6gc00605a.

[148] A. Apelblat, „Citric Acid", w *Industrial & Engineering Chemistry*, s. 253, Springer International Publishing, 2014, doi: 10.1007/978-3-319-11233-6.

[149] Y.-H. Percival Zhang *i in.*, „Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies", *Biotechnol. Adv.*, t. 24, nr 5, s. 452, 2006, doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.03.003.

[150] B. Martel *i in.*, „Water-soluble polymers and gels from the polycondensation between cyclodextrins and poly(carboxylic acid)s: A study of the preparation parameters", *J. Appl. Polym. Sci.*, t. 97, nr 2, s. 433, 2005, doi: 10.1002/app.21391.

[151] W. Kasprzyk *i in.*, „Cyclodextrin-modified poly(octamethylene citrate) polymers towards enhanced sorption properties", *Soft Matter*, t. 16, nr 13, s. 3311, 2020, doi: 10.1039/c9sm02075f.

[152] H. Qiu *i in.*, „A citric acid-based hydroxyapatite composite for orthopedic implants", *Biomaterials*, t. 27, nr 34, s. 5845, 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.07.042.

[153] M. Jiang *i in.*, „Solvent-free polymerization of citric acid and hexamethylenediamine for novel carboxylated polyamides", *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, t. 50, nr 18, s. 3819,

2012, doi: 10.1002/pola.26170.

[154] H. R. Park *i in.*, „Properties of starch/PVA blend films containing citric acid as additive", *J. Polym. Environ.*, t. 13, nr 4, s. 375, 2005, doi: 10.1007/s10924-005-5532-1.

[155] D. J. Wales *i in.*, „3D printability assessment of poly(octamethylene maleate (anhydride) citrate) and poly(ethylene glycol) diacrylate copolymers for biomedical applications", *ACS Appl. Polym. Mater.*, t. 4, nr 8, s. 5457, 2022, doi: 10.1021/acsapm.2c00531.

[156] K. M. Doll *i in.*, „Solvent-free polymerization of citric acid and D-sorbitol", *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, t. 44, nr 14, s. 4259, 2006, doi: 10.1002/pola.21535.

[157] R. Shi *i in.*, „Characterization of citric acid/glycerol co-plasticized thermoplastic starch prepared by melt blending", *Carbohydr. Polym.*, t. 69, nr 4, s. 748, 2007, doi: 10.1016/j.carbpol.2007.02.010.

[158] C. R. Soccol *i in.*, „New perspectives for citric acid production and application", *Food Technol. Biotechnol.*, t. 44, nr 2, s. 141, 2006.

[159] L. Guo *i in.*, „Biosorption of Pb^{2+} from aqueous solution by rice straw modified with citric acid", *Environ. Prog. Sustain. Energy*, t. 35, nr 2, s. 359, 2016, doi: 10.1002/ep.12225.

[160] G. Z. Kyzas *i in.*, „Low-cost hemp biomaterials for nickel ions removal from aqueous solutions", *J. Mol. Liq.*, t. 209, nr 1, s. 209, 2015, doi: 10.1016/j.molliq.2015.05.060.

[161] G. S. Dhillon *i in.*, „Novel biomaterials from citric acid fermentation as biosorbents for removal of metals from waste chromated copper arsenate wood leachates", *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, t. 119, s. 147, 2017, doi: 10.1016/j.ibiod.2016.09.014.

[162] C. Tejada *i in.*, „Kinetic and isotherms of biosorption of Hg(II) using citric acid treated residual materials", *Ing. y Compet.*, t. 18, nr 1, s. 113, 2016, doi: 10.25100/iyc.v18i1.2182.

[163] C. T. Tovar *i in.*, „Kinetics of adsorption in mercury removal using cassava (Manhiot esculenta) and lemon (Citrus limonum) wastes modified with citric acid", *Ing. y Univ.*, t. 19, nr 2, s. 283, 2015, doi: 10.11144/Javeriana.iyu19-2.kamr.

[164] W. Zhang *i in.*, „Cross-linked biopolymeric films by citric acid for food packaging and

preservation", *Adv. Colloid Interface Sci.*, t. 314, s. 102886, 2023, doi: 10.1016/j.cis.2023.102886.

[165] M. Chiumarelli *i in.*, „Cassava starch coating and citric acid to preserve quality parameters of fresh-cut „Tommy atkins" mango", *J. Food Sci.*, t. 75, nr 5, s. E297, 2010, doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01636.x.

[166] K. Drabik *i in.*, „Citric acid as a factor limiting changes in the quality of table eggs during their storage", *Poult. Sci.*, t. 100, nr 4, s. 100995, 2021, doi: 10.1016/j.psj.2021.01.018.

[167] M. D. De'Nobili *i in.*, „Stability of L-(+)-ascorbic acid in alginate edible films loaded with citric acid for antioxidant food preservation", *J. Food Eng.*, t. 175, s. 1, 2016, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2015.11.015.

[168] Y. Jiugao *i in.*, „The effects of citric acid on the properties of thermoplastic starch plasticized by glycerol", *Starch/Staerke*, t. 57, nr 10, s. 494, 2005, doi: 10.1002/star.200500423.

[169] B. Ramaraj, „Crosslinked poly(vinyl alcohol) and starch composite films: Study of their physicomechanical, thermal, and swelling properties", *J. Appl. Polym. Sci.*, t. 103, nr 2, s. 1127, 2007, doi: 10.1002/app.24612.

[170] J. Li *i in.*, „Preparation of thermoplastic starch with comprehensive performance plasticized by citric acid", *J. Appl. Polym. Sci.*, t. 139, nr 25, 2022, doi: 10.1002/app.52401.

[171] M. Daniele *i in.*, „Biodegradable elastomeric circuit boards from citric acid-based polyesters", 2022, doi: 10.21203/RS.3.RS-1945950/V1.

[172] T. M. Getz *i in.*, „Sodium citrate contributes to the platelet storage lesion", *Transfusion*, t. 59, nr 6, s. 2103, 2019, doi: 10.1111/trf.15213.

[173] M. C. Serrano *i in.*, „Synthesis of novel lidocaine-releasing poly(diol-co-citrate) elastomers by using deep eutectic solvents", *Chem. Commun.*, t. 48, nr 4, s. 579, 2012, doi: 10.1039/c1cc15284j.

[174] A. T. Naeini *i in.*, „Poly(citric acid)-block-poly(ethylene glycol) copolymers—new biocompatible hybrid materials for nanomedicine", *Nanomedicine Nanotechnology,*

Biol. Med., t. 6, nr 4, s. 556, 2010, doi: 10.1016/j.nano.2009.11.008.

[175] A. T. Naeini *i in.*, „Synthesis of gold nanoparticle necklaces using linear–dendritic copolymers”, *Eur. Polym. J.*, t. 46, nr 2, s. 165, 2010, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2009.10.017.

[176] H. Zhao *i in.*, „Biodegradable nitric oxide-releasing poly(diol citrate) elastomers”, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, t. 93, nr 1, s. 356, 2010, doi: 10.1002/jbm.a.32536.

[177] D. Shan *i in.*, „Flexible biodegradable citrate-based polymeric step-index optical fiber”, *Biomaterials*, t. 143, s. 142, 2017, doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.08.003.

[178] D. Bogdal *i in.*, „Intensification of oxidation and epoxidation reactions—Microwave vs. conventional heating”, *Chem. Eng. Process. - Process Intensif.*, t. 132, s. 208, 2018, doi: 10.1016/j.cep.2018.09.003.

[179] W. Kasprzyk *i in.*, „Novel efficient fluorophores synthesized from citric acid”, *RSC Adv.*, t. 5, nr 44, s. 34795, 2015, doi: 10.1039/C5RA03226A.

[180] W. Kasprzyk *i in.*, „Fluorescence assay for the determination of glutathione based on a ring-fused 2-pyridone derivative in dietary supplements”, *Analyst*, t. 146, nr 6, s. 1897, 2021, doi: 10.1039/D0AN02245D.

[181] W. Kasprzyk *i in.*, „Fluorescence assay for the determination of D-panthenol based on novel ring-fused 2-pyridone derivative”, *Int. J. Mol. Sci.*, t. 21, nr 21, s. 8386, 2020, doi: 10.3390/ijms21218386.

[182] W. Kasprzyk *i in.*, „Luminescence phenomena of carbon dots derived from citric acid and urea-a molecular insight”, *Nanoscale*, t. 10, nr 29, s. 13889, 2018, doi: 10.1039/c8nr03602k.

[183] W. Kasprzyk *i in.*, „The role of molecular fluorophores in the photoluminescence of carbon dots derived from citric acid: current state-of-the-art and future perspectives”, *Nanoscale*, t. 14, nr 39, s. 14368, 2022, doi: 10.1039/D2NR03176K.

[184] W. Tomal *i in.*, „New horizons for carbon dots: Quantum nano-photoinitiating catalysts for cationic photopolymerization and three-dimensional (3D) printing under visible light”, *Polym. Chem.*, t. 12, nr 25, s. 3661, 2021, doi: 10.1039/d1py00228g.

[185] W. Kasprzyk *i in.*, „Fluorescent citric acid-modified silicone materials”, *RSC Adv.*, t. 5, nr 110, s. 90473, 2015, doi: 10.1039/C5RA18100C.

[186] W. Kasprzyk *i in.*, „Luminescence phenomena of biodegradable photoluminescent poly(diol citrates)”, *Chem. Commun.*, t. 49, nr 57, s. 6445, 2013, doi: 10.1039/c3cc42661k.

[187] J. Yang *i in.*, „Novel citric acid-based biodegradable elastomers for tissue engineering”, *Adv. Mater.*, t. 16, nr 6, s. 511, 2004, doi: 10.1002/adma.200306264.

[188] J. Yang *i in.*, „Synthesis and evaluation of poly(diol citrate) biodegradable elastomers”, *Biomaterials*, t. 27, nr 9, s. 1889, 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.106.

[189] A. M. Tatara *i in.*, „Synthesis and characterization of diol-based unsaturated polyesters: poly(diol fumarate) and poly(diol fumarate-co-succinate)”, *Biomacromolecules*, t. 18, nr 6, s. 1724, 2017, doi: 10.1021/acs.biomac.7b00044.

[190] S. García-Argüelles *i in.*, „Deep eutectic solvent-assisted synthesis of biodegradable polyesters with antibacterial properties”, *Langmuir*, t. 29, nr 30, s. 9525, 2013, doi: 10.1021/la401353r.

[191] R. T. Tran *i in.*, „A new generation of sodium chloride porogen for tissue engineering”, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, t. 58, nr 5, s. 335, 2011, doi: 10.1002/bab.44.

[192] M. Montgomery *i in.*, „Flexible shape-memory scaffold for minimally invasive delivery of functional tissues”, *Nat. Mater.*, t. 16, nr 10, s. 1038, 2017, doi: 10.1038/nmat4956.

[193] C. Ma *i in.*, „In vitro cytocompatibility evaluation of poly(octamethylene citrate) monomers toward their use in orthopedic regenerative engineering”, *Bioact. Mater.*, t. 3, nr 1, s. 19, 2018, doi: 10.1016/j.bioactmat.2018.01.002.

[194] R. T. Tran *i in.*, „Citrate-based biomaterials and their applications in regenerative engineering”, *Annu. Rev. Mater. Res.*, t. 45, nr 1, s. 277, 2015, doi: 10.1146/annurev-matsci-070214-020815.

[195] M. Wang *i in.*, „Engineering multifunctional bioactive citrate-based biomaterials for tissue engineering”, *Bioact. Mater.*, t. 19, s. 511, 2023, doi: 10.1016/j.bioactmat.2022.04.027.

[196] L.-C. Su *i in.*, „Study on the antimicrobial properties of citrate-based biodegradable polymers”, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, t. 2, s. 23, 2014, doi: 10.3389/fbioe.2014.00023.

[197] S. García-Argüelles *i in.*, „Deep eutectic solvent-assisted synthesis of biodegradable polyesters with antibacterial properties”, *Langmuir*, t. 29, nr 30, s. 9525, 2013, doi: 10.1021/la401353r.

[198] P. N. Coneski *i in.*, „Thermal polycondensation of poly(diol citrate)s with tethered quaternary ammonium biocides”, *RSC Adv.*, t. 2, nr 33, s. 12824, 2012, doi: 10.1039/c2ra21286b.

[199] D. Motlagh *i in.*, „Hemocompatibility evaluation of poly(diol citrate) in vitro for vascular tissue engineering”, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, t. 82, nr 4, s. 907, 2007, doi: 10.1002/jbm.a.31211.

[200] R. A. Hoshi *i in.*, „The blood and vascular cell compatibility of heparin-modified ePTFE vascular grafts”, *Biomaterials*, t. 34, nr 1, s. 30, 2013, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.09.046.

[201] D. Gyawali *i in.*, „Citrate-based biodegradable injectable hydrogel composites for orthopedic applications”, *Biomater. Sci.*, t. 1, nr 1, s. 52, 2013, doi: 10.1039/c2bm00026a.

[202] L. Lei *i in.*, „Structure and performance of nano-hydroxyapatite filled biodegradable poly((1,2-propanediol-sebacate)-citrate) elastomers”, *Polym. Degrad. Stab.*, t. 94, nr 9, s. 1494, 2009, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2009.04.034.

[203] Y. He *i in.*, „Development of osteopromotive poly(octamethylene citrate glycerophosphate) for enhanced bone regeneration”, *Acta Biomater.*, t. 93, s. 180, 2019, doi: 10.1016/j.actbio.2019.03.050.

[204] K. Kompany *i in.*, „Polyoctanediol citrate-ZnO composite films: Preparation, characterization and release kinetics of nanoparticles from polymer matrix”, *Mater. Lett.*, t. 126, s. 165, 2014, doi: 10.1016/j.matlet.2014.04.031.

[205] L. V. Thomas *i in.*, „A biodegradable and biocompatible PVA–citric acid polyester with potential applications as matrix for vascular tissue engineering”, *J. Mater. Sci. Mater.*

Med., t. 20, nr S1, s. 259, 2009, doi: 10.1007/s10856-008-3599-7.

[206] R. Heim *i in.*, „Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer", *Curr. Biol.*, t. 6, nr 2, s. 178, 1996, doi: 10.1016/S0960-9822(02)00450-5.

[207] D. Shan *i in.*, „Citrate-based fluorescent biomaterials", *Adv. Healthc. Mater.*, t. 7, nr 18, s. 1800532, 2018, doi: 10.1002/adhm.201800532.

[208] Z. Xie *i in.*, „Development of intrinsically photoluminescent and photostable polylactones", *Adv. Mater.*, t. 26, nr 26, s. 4491, 2014, doi: 10.1002/adma.201306070.

[209] G. Pizzino *i in.*, „Oxidative stress: Harms and benefits for human health", *Oxid. Med. Cell. Longev.*, t. 2017, s. 1, 2017, doi: 10.1155/2017/8416763.

[210] R. van Lith *i in.*, „Engineering biodegradable polyester elastomers with antioxidant properties to attenuate oxidative stress in tissues", *Biomaterials*, t. 35, nr 28, s. 8113, 2014, doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.06.004.

[211] Y. Wang *i in.*, „Photo-crosslinked biodegradable elastomers for controlled nitric oxide delivery", *Biomater. Sci.*, t. 1, nr 6, s. 625, 2013, doi: 10.1039/c3bm00169e.

[212] M. Mahar *i in.*, „Intrinsic mechanisms of neuronal axon regeneration", *Nat. Rev. Neurosci.*, t. 19, nr 6, s. 323, 2018, doi: 10.1038/s41583-018-0001-8.

[213] K. Belanger *i in.*, „Recent strategies in tissue engineering for guided peripheral nerve regeneration", *Macromol. Biosci.*, t. 16, nr 4, s. 472, 2016, doi: 10.1002/mabi.201500367.

[214] D. Bennet *i in.*, „Implantable microdevice for peripheral nerve regeneration: materials and fabrications", *J. Mater. Sci.*, t. 46, nr 14, s. 4723, 2011, doi: 10.1007/s10853-011-5510-z.

[215] R. T. Tran *i in.*, „Fabrication and characterization of biomimetic multichanneled crosslinked-urethane-doped polyester tissue engineered nerve guides", *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, t. 102, nr 8, s. 2793, 2014, doi: 10.1002/jbm.a.34952.

[216] E. J. Chung *i in.*, „The role of hydroxyapatite in citric acid-based nanocomposites:

Surface characteristics, degradation, and osteogenicity in vitro", *Acta Biomater.*, t. 7, nr 11, s. 4057, 2011, doi: 10.1016/j.actbio.2011.07.001.

[217] E. J. Chung *i in.*, „A biodegradable tri-component graft for anterior cruciate ligament reconstruction", *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, t. 11, nr 3, s. 704, 2017, doi: 10.1002/term.1966.

[218] Y. Guo *i in.*, „Citrate-based biphasic scaffolds for the repair of large segmental bone defects", *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, t. 103, nr 2, s. 772, 2015, doi: 10.1002/jbm.a.35228.

[219] J. Yang *i in.*, „Novel biphasic elastomeric scaffold for small-diameter blood vessel tissue engineering", *Tissue Eng. Part A*, t. 11, nr 11, s. 1876, 2005, doi: 10.1089/ten.2005.11.1876.

[220] H. Xu *i in.*, „Enhanced endothelialization of a new stent polymer through surface enhancement and incorporation of growth factor-delivering microparticles", *J. Cardiovasc. Transl. Res.*, t. 5, nr 4, s. 519, 2012, doi: 10.1007/s12265-012-9381-8.

[221] J. Liu *i in.*, „Properties of single electrospun poly(diol citrate)-collagen-proteoglycan nanofibers for arterial repair and in applications requiring viscoelasticity", *J. Biomater. Appl.*, t. 28, nr 5, s. 729, 2014, doi: 10.1177/0885328213477893.

[222] A. Goins *i in.*, „Fabrication of a bilayer scaffold for small diameter vascular applications", *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, t. 106, nr 11, s. 2850, 2018, doi: 10.1002/jbm.a.36473.

[223] E. K. Gregory *i in.*, „Periadventitial atRA citrate-based polyester membranes reduce neointimal hyperplasia and restenosis after carotid injury in rats", *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, t. 307, nr 10, s. H1419, 2014, doi: 10.1152/ajpheart.00914.2013.

[224] R. Salihu *i in.*, „Citric acid: A green cross-linker of biomaterials for biomedical applications", *Eur. Polym. J.*, t. 146, s. 110271, 2021, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2021.110271.

[225] Y. Zhang *i in.*, „Design strategies for fluorescent biodegradable polymeric biomaterials", *J. Mater. Chem. B*, t. 1, nr 2, s. 132, 2013, doi: 10.1039/C2TB00071G.

[226] F. Ziarelli *i in.*, „Solid-state NMR as an analytical tool: Quantitative aspects", *Solid State*

Nucl. Magn. Reson., t. 29, nr 1–3, s. 214, 2006, doi: 10.1016/j.ssnmr.2005.08.013.

[227] M. Li *i in.*, „Solid-state NMR spectroscopy in pharmaceutical sciences”, *TrAC Trends Anal. Chem.*, t. 135, s. 116152, 2021, doi: 10.1016/j.trac.2020.116152.

[228] R. Ludmerczki *i in.*, „Carbon dots from citric acid and its Intermediates formed by thermal decomposition”, *Chem. - A Eur. J.*, t. 25, nr 51, s. 11963, 2019, doi: 10.1002/chem.201902497.

[229] S. C. Lu, „Glutathione synthesis”, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, t. 1830, nr 5, s. 3143, 2013, doi: 10.1016/j.bbagen.2012.09.008.

[230] L. Flohé, „The fairytale of the GSSG/GSH redox potential”, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, t. 1830, nr 5, s. 3139, 2013, doi: 10.1016/j.bbagen.2012.10.020.

[231] I. Y. Iskusnykh *i in.*, „Glutathione in brain disorders and aging”, *Molecules*, t. 27, nr 1, s. 324, 2022. doi: 10.3390/molecules27010324.

[232] O. Dormond *i in.*, „Prostaglandin E2 promotes integrin αvβ3-dependent endothelial cell adhesion, Rac-activation, and spreading through cAMP/PKA-dependent signaling”, *J. Biol. Chem.*, t. 277, nr 48, s. 45838, 2002, doi: 10.1074/jbc.M209213200.

Dorobek naukowy

- **Publikacje w czasopismach naukowych:**
  - Flis, A.; Trávníčková, M.; Koper, F.; Knap, K.; Kasprzyk, W.; Bačáková, L.; Pamuła, E.; „Poly(octamethylene citrate) modified with glutathione as a promising material for vascular tissue engineering", Polymers 2023, 15, 1322
  - Koper, F.; Świergosz, T.; Żaba, A.; Flis, A.; Trávníčková, M.; Bačáková, L.; Pamuła, E.; Bogdał, D.; Kasprzyk, W. P.; „Advancements in structure-property correlation studies of cross-linked citric acid-based elastomers from the perspective of medical application", Journal of Materials Chemistry B 2021, 9, 6425
  - Kasprzyk, W.; Koper, F.; Flis, A.; Szreder, D.; Pamuła, E.; Bogdał, D.; Wybraniec, S.; Ortyl, J.; Świergosz, T.; „Fluorescence assay for the determination of glutathione based on a ring-fused 2-pyridone derivative in dietary supplements", The Analyst 2021, 146, 1897
  - Kasprzyk, W.; Świergosz, T.; Koper, F.; „Fluorescence assay for the determination of d-panthenol based on novel ring-fused 2-pyridone derivative", International Journal of Molecular Sciences 2020, 21, 8386
- **Wystąpienia na konferencjach krajowych i międzynarodowych**
  - XLVI Seminarium Naukowo Techniczne "Chemistry for Agriculture", Karpacz 2022– poster
    - Temat posteru – "Thorough structural examination of citric acid-derived polyesters towards the structure-property relationship estimation in the field of application in biomedicine"
  - EPF European Polymer Congress, Praga 2022– wystąpienie i poster
    - Temat wystąpienia oraz posteru – "In-depth structural examination of poly(alkylene citrates) towards the structure-property relationship estimation in the perspective of biomedical applicability"
  - X Kongres Technologii Chemicznej, Wrocław 2022– wystąpienie
    - Temat wystąpienia – „Fluorescencyjne biomateriały o właściwościach przeciwutleniających na bazie kwasu cytrynowego"
  - XLV Seminarium Naukowo Techniczne "Chemistry for Agriculture", Karpacz 2021– wystąpienie i postery

- Temat wystąpienia – “Determination of structure-property correlations in citrate-based elastomer”
- Temat posteru – “Spectroscopy analysis of the correlations between structure and properties in citric acid-based elastomeric biomaterials”
- Temat posteru – “Citric acid with the potential role in the development of innovative fluorophores”

- 30th Anniversary Conference on Biomaterials in Medicine and Veterinary, Rytro 2021- poster
  - Temat posteru – “Spectroscopy analyses of structure-property correlations in citrate-based elastomeric biomaterials”
- 11th World Biomaterials Congress, Glasgow (Online) 2020– wystąpienie
  - Temat wystąpienia – “Novel citric acid-based biomaterials for vascular tissue engineering – development and characterization”
- UK-Poland Bioinspired Materials Conference (Online) 2020– poster
  - Temat posteru – “Development and characterization of novel citric acid-based biomaterials for tissue engineering”
- XLIV Seminarium Naukowo Techniczne “Chemistry for Agriculture”, Karpacz 2019– wystąpienie i postery
  - Temat wystąpienia – “Development and characterization of new citric acid-based biomaterials for vascular tissue engineering”
  - Temat posteru – “Fabrication of fluorophores obtained from citric acid and antioxidant”
  - Temat posteru – “Fluorescent surface modification of citric acid-based biomaterials with selected antioxidative compounds”
  - Temat posteru – “Fluorescent citric acid based biomaterials modified with selected antioxidants for tissue engineering”
- 17 th International Conference on Microwave and High Frequency Heating AMPERE, Valencia 2019 – wystąpienie
  - Temat wystąpienia – “Microwave synthesis of novel fluorophores derived from citric acid and antioxidants”
- Uczelniana Sesja Kół Naukowych WIiTCh PK, Kraków 2018

- Temat wystąpienia – „Novel fluorescent method for glutathione detection”

- Zjazd Zimowy SSPTchem, Warszawa 2018– poster
  - Temat posteru – „Otrzymywanie fluoroforów z kwasu cytrynowego i związków o właściwościach przeciwutleniających”

- **Granty i projekty badawcze**
  - Wykonawca w projekcie nr 0277/L-12/2020 (LIDER XII) finansowanym ze środków NCBiR
  - Kierownik w projekcie nr 2021/41/N/ST4/00362 (Preludium) finansowanym ze środków NCN
  - Wykonawca w projekcie nr 2018/28/C/ST5/00461 (Sonatina) finansowanym ze środków NCN