

AUTOREFERAT W JĘZYKU POLSKIM

Załącznik nr 2 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

Dr inż. Justyna Kucińska-Lipka

Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

Gdańsk, 2018

Politechnika Gdańska
Wydział Chemiczny
Katedra Technologii Polimerów
Ul. Narutowicza 11/12
80-233 Gdańsk
Dr inż. Justyna Kucińska-Lipka

Autoreferat

**„Synteza, charakterystyka i modyfikacja alifatycznych poliuretanów
przeznaczonych do wytwarzania rusztowań tkankowych”**

Obszar wiedzy: Nauki Ścisłe
Dziedzina: Nauki Techniczne
Dyscyplina: Technologia Chemiczna

Załącznik nr 2

Gdańsk, 2018

Autoreferat

I. Imię i nazwisko:

Justyna Kucińska-Lipka

II. Posiadany stopień naukowy

Doktor nauk technicznych w zakresie technologii chemicznej nadany uchwałą Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej z dnia 12 grudnia 2007.

III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2008- Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Katedra Technologii Polimerów, asystent

2008 - Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Katedra Technologii Polimerów, adiunkt

2014-2015- urlop macierzyński (20 miesięcy)

Osiągnięcia wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

IV. a. Tytuł osiągnięcia naukowego

Jako osiągnięcie naukowe do oceny przedstawiam załączony cykl monotematycznych publikacji na temat: „**Synteza, charakterystyka i modyfikacja alifatycznych poliuretanów przeznaczonych do wytwarzania rusztowań tkankowych**” wraz z tematycznie spójnymi przyznanymi patentami. Całość osiągnięcia została zrealizowana w latach 2010-2018 po uzyskaniu stopnia doktora.

IV. b. Wykaz publikacji naukowych stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego

H.1. Kucińska-Lipka J. "Polyurethanes Crosslinked with Poly(vinyl alcohol) as a Slowly-Degradable and Hydrophilic Materials of Potential Use in Regenerative Medicine" *Materials* 11(3) (2018), 352 DOI: 10.3390/ma11030352

Punktacja MNiSW 35, IF₂₀₁₈= 2,654 (Q₂)

H.2. Kucińska-Lipka J., Gubańska I., Korchynskyi O., Malysheva K, Kostrzewa M., Włodarczyk D., Karczewski J., Janik H."The influence of calcium glycerophosphate (GPCa)

modifier on physicochemical, mechanical and biological performance of polyurethanes applicable as biomaterials for bone tissue scaffolds fabrication”

Polymers (2017)9(8), 329 DOI:10.3390/polym9080329

Punktacja MNiSW 40, IF₂₀₁₇= 3,364 (Q₁)

H.3. Kucińska-Lipka J., Sienkiewicz M., Gubańska I., Zalewski S. “Microwave radiation in the synthesis of urethane prepolymers” European Polymer Journal 88(2017)126-135 DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2017.01.0170014-3057

Punktacja MNiSW 35, IF₂₀₁₇= 3,531 (Q₁)

H.4. Kucińska-Lipka J., Gubańska I., Sienkiewicz M. “Thermal and mechanical properties of polyurethanes modified with L-ascorbic acid” Journal of Thermal Analysis and Calorimetry 127(2) (2017) 1631-1638 DOI: 10.1007/s10973-016-5743-9

Punktacja MNiSW 20, IF₂₀₁₇= 1,953 (Q₂)

H.5. Kucińska-Lipka J., Gubańska I., Skwarska A. „Microporous Polyurethane Thin Layer as a Promising Scaffold for Tissue Engineering” Polymers 9(7) (2017) 277 DOI:10.3390/polym9070277

Punktacja MNiSW 40, IF₂₀₁₇= 3,364 (Q₁)

H.6. Kucińska-Lipka J., Marzec M., Gubańska I., Janik H. „Porosity and swelling properties of novel polyurethane–ascorbic acid scaffolds prepared by different procedures for potential use in bone tissue engineering” Journal of Elastomers and Plastics 49(5) (2017) 440-456 DOI:10.1177/0095244316672093

Punktacja MNiSW 20, IF₂₀₁₇= 0,787 (Q₄)

H.7. Kucińska-Lipka J., Gubańska I., Pokrywczyńska M., Cieśliński H., Filipowicz N., Drewna T., Janik H. „Polyurethane porous scaffolds (PPS) for soft tissue regenerative medicine applications” Polymer Bulletin (2017),1-23 DOI: 10.1007/s00289-017-2124-x

Punktacja MNiSW 25, IF₂₀₁₇= 1,430 (Q₃)

H.8. Kucińska-Lipka J., Gubańska I., Strankowski M., Cieśliński H., Filipowicz N., Janik H. „Synthesis and characterization of cycloaliphatic hydrophilic polyurethanes, modified with l-ascorbic acid, as materials for soft tissue regeneration” Materials Science and Engineering C, Materials for biological applications 75 (2017) 671-681 DOI: 10.1016/j.msec.2017.02.0520928-4931

Punktacja MNiSW 30, IF₂₀₁₇= 4,164 (Q₂)

H.9. Kucińska-Lipka J., Gubańska I., Janik H., Pokrywczyńska M., Drewna T. „L-ascorbic acid modified poly(ester urethane)s as a suitable candidates for soft tissue engineering

applications” *Reactive and Functional Polymers* 97 (2015) 105-115 DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2015.10.008

Punktacja MNiSW 35, IF₂₀₁₅= 2,725 (Q₁)

H.10. Kucińska-Lipka J., Gubańska I., Janik H. „, Gelatin-modified polyurethanes for soft tissue scaffold.” *TheScientificWorldJournal* (2013) 1-12 DOI: 10.1155/2013/450132

Punktacja MNiSW 30, IF₂₀₁₃= 1,453 (Q₁)

H.11. Kucińska-Lipka J., Janik H., Stelmasik A., Janowicz M. “Sposób wytwarzania segmentowych poliuretanów” PL 223226 B1 (patent przyznany w 2016r)

H.12. Janik H., Gibas I., Kucińska-Lipka J. “Sposób wytwarzania segmentowych poliuretanów” PL 217650 B1 (patent przyznany w 2014r)

H.13. Kucińska-Lipka J., Stelmasik A., Janik H., Formela K., Sienkiewicz M. ”Sposób otrzymywania pianek poliuretanowych” PL 219172 B1 (patent przyznany w 2015r)

IV.c. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

W latach 2008-2018 zajmowałam się syntezą, modyfikacją i charakterystyką poliuretanów oraz porowatych materiałów poliuretanowych technicznych mających zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu. Od 2010 roku rozpoczęłam pracę nad poliuretanami do zastosowań biomedycznych (z przerwą w latach 2014-2015 -przebywałam na zwolnieniu lekarskim i na urlopie macierzyńskim łącznie 20 miesięcy). Wraz z nowo nabytym doświadczeniem i postępami w badaniach nad poliuretanami do celów medycznych, zainicjowałam w Katedrze Technologii Polimerów nową tematykę, związaną z syntezą, charakterystyką i modyfikacjami poliuretanów alifatycznych podatnych na degradację w przewidywanym czasie, o potencjalnym zastosowaniu w inżynierii tkankowej.

Cel

Celem przeprowadzonych badań było zaprojektowanie, otrzymanie i scharakteryzowanie właściwości nowych alifatycznych segmentowych poliuretanów, o potencjalnym zastosowaniu w inżynierii tkankowej i pełniących funkcję wspomagającą regenerację uszkodzonych tkanek (zarówno tkanek miękkich jak i kostnych), odznaczających się wysoką biogodnością i odpowiednimi właściwościami fizyko-mechanicznymi wynikającymi z użycia do ich syntezy odpowiednich rodzajów substratów kształtujących strukturę

wchodzących w ich skład segmentów giętkich (elastyczność, degradowalność) oraz segmentów sztywnych (wytrzymałość mechaniczna, termiczna), a następnie optymalizacja tych właściwości poprzez modyfikacje za pomocą napełniaczy pochodzenia naturalnego lub syntetycznego.

Wstęp

Poliuretany (PUR) o odpowiednio zaprojektowanej strukturze charakteryzują się odpowiednimi właściwościami mechanicznymi, mogą być biokompatybilne oraz wykazywać zgodność z krwią, przez co są atrakcyjnymi materiałami do ich zastosowania w roli rusztowań tkankowych; jednakże, jak wszystkie materiały syntetyczne, nie są bioaktywne. Aby nadać kompozycją poliuretanowym bioaktywność można modyfikować je chemicznie np. za pomocą 1,4:3,6-dianhydro-D-sorbitolu [1,2], kwasu L-askorbinowego (AA) [3,4] oraz czynnikami wzrostu [5,6,7,8], poprzez szczepienie białkami, immobilizację kolagenem lub kwasem hialuronowym, pokrywanie żelatyną, lub fizycznie w wyniku modyfikacji plazmą [9,10]). Znane też są sposoby modyfikacji poprzez wprowadzanie do poliuretanu napełniaczy ceramicznych: hydroksyapatytu, β -trójfosforanu wapnia, bioszklą lub soli fosforanu wapnia np. bruszytu, co wynika z faktu, że część mineralna kości jest zbudowana w 90% z fosforanu wapnia i w 10% z węglanu wapnia, a w/w związki przyspieszają kalcyfikację otrzymanych materiałów poliuretanowych [11].

W procesach regeneracji tkanek miękkich, twardych oraz układu naczyniowego [12,13] coraz częściej wykorzystuje się rusztowania tkankowe – trójwymiarowe, porowate struktury, które są biologicznymi substytutami pozwalającymi na odtworzenie, utrzymanie lub poprawę funkcjonowania tkanki [14] o właściwościach mechanicznych odpowiednich do zapewnienia wsparcia dla odbudowującej się tkanki [15]. Dodatkowo, w określonych zastosowaniach, wymaga się, aby takie rusztowanie tkankowe po wszczępieniu do organizmu człowieka, stopniowo ulegało degradacji, z szybkością proporcjonalną do wzrostu odbudowywanej tkanki [16], a produkty degradacji nie są szkodliwe i toksyczne. Stopień degradacji rusztowań tkankowych, według danych literaturowych, musi być kontrolowany w taki sposób, aby rusztowanie zachowywało właściwości fizykochemiczne i mechaniczne przez okres co najmniej 3 do 6 miesięcy. Podczas pierwszych 1 do 3 miesięcy komórki proliferują, natomiast między 3-6 miesiącem tkanki nabierają właściwości mechanicznych porównywalnych do tkanki natywnej, dlatego też dopiero po tym czasie rusztowanie może zacząć ulegać stopniowej i kontrolowanej w czasie degradacji. Po okresie 12 do 18 miesięcy

rusztowanie powinno ulec całkowitej degradacji, a produkty jego rozpadu powinny zostać usunięte z organizmu [17,18,19,20].

Poszukując materiałów o wymienionych właściwościach podjęłam próbę opracowania nowych tworzyw poliuretanowych, które będą materiałami podatnymi na degradację, biokompatybilnymi (o wysokiej przeżywalności komórek w testach MTT i XTT) i o właściwościach fizyko-chemicznych, mechanicznych i termicznych odpowiednich dla materiałów stosowanych w medycynie regeneracyjnej.

W literaturze [21,22,23] opisano użycie aromatycznych diizocyjanianów do syntezy PUR, z których wytwarzane są rusztowania tkankowe. Jednak takie materiały po długotrwałym oddziaływaniu *in vivo* ulegają degradacji do szkodliwych dla organizmu aromatycznych diamin. W swoich pracach badawczych do otrzymania poliuretanów zastosowałam więc alifatyczne i cykloalifatyczne diizocyjaniany (1,6-diizocyjanian heksametylenu (HDI) i 4,4'-diizocyjanian dicykloheksametylenu (HMDI)), których produkty degradacji (w środowisku organizmu) to nietoksyczne aminy usuwane z organizmu w naturalnym cyklu życiowym [24].

W latach 2010-2015 w literaturze opisano alifatyczne poliuretany stosowane w inżynierii tkankowej otrzymywane z semikrystalicznych oligomerów [25,26,27,28]. W moich pracach zastosowałam amorficzny oligomerol (α,ω -dihydroksy oligo(adypinian etylenowo-butylenowy) (PEBA) w celu przyspieszenia i zapewnienia bardziej równomiernej degradacji [29] poliuretanów, jak i rusztowań tkankowych z nich wytworzonych oraz zaproponowałam zastosowanie nowych modyfikatorów ich właściwości biologicznych.

Wybór kwasu L-askorbinowego (AA) jako modyfikatora badanych poliuretanów był podyktowany szeroko opisywanemu wpływowi AA na regenerację tkanek [30,31] i jego właściwościami przeciwutleniającymi. Ponadto AA może wspomóc regenerację tkanek przez zmuszanie komórek do produkcji większej ilości tlenu azotu, który jest konieczny do powstawania włókien kolagenu, będących podstawą odbudowujących się tkanek. [32, 33]

Żelatynę (Ż), kolagen (K) i chitozan (C) wybrałam do swoich badań z uwagi na to, że są one materiałami naturalnymi, biokompatybilnymi, mają bardzo niską antygenowość, oraz podobieństwo do matrycy pozakomórkowej. Ponadto stymulują one proliferację komórek i proces angiogenezy, aktywują makrofagi i neutrofile w celu zainicjowania procesu gojenia ran [34]. Ponadto kolagen, żelatyna i chitozan to grupa związków przeciwutleniających [35].

Do modyfikacji poliuretanów zastosowałam również poli(alkohol winylowy) (PVA) z uwagi na to, że jest to materiał hydrofilowy i może zmniejszyć kąt zwilżania powierzchni uzyskanych kompozycji, czyli wpłynąć na poprawę hydrofilowości powierzchni materiału, co stwarza możliwość hydrofilowym materiałom na zwiększenia stopnia oddziaływania z kompozycją poliuretanową za pośrednictwem wiązań wodorowych, a to z kolei poprawia biokompatybilność materiałów polimerowych poprzez solwatowanie cząsteczek wody, które tworzą na ich powierzchni neutralny biologicznie cienki film wodny [36].

Glicerofosforan wapnia (GCPa) wykorzystałam w swoich badaniach z uwagi na fakt iż jego budowa chemiczna i właściwości predysponują go jako środek bioaktywny mogący wywoływać mineralizację materiałów poliuretanowych z wytworzeniem fosforanu wapnia [37,38] i który jest materiałem dopuszczonym do stosowania biomedycznego przez FDA. W roku 2003 opublikowano pracę, w której do syntezy poliuretanu w roli makrodiolu wykorzystano semikrystaliczny polikaprolakton (PCL), a GPCa został użyty jako nieorganiczny napełniacz PUR [39]. Brak jest jednak doniesień literaturowych na temat wpływu tego związku na bioaktywność materiałów polimerowych, w tym poliuretanowych. Nie istnieją także patenty w tej tematyce.

Modyfikacja alifatycznych segmentowych poliuretanów do zastosowań w inżynierii tkankowej biopolimerami (żelatyną i kolagenem) oraz innymi związkami wprowadzanymi celem zwiększenia funkcjonalności poliuretanów np. kwasem L-askorbinowym w chwili rozpoczęcia badań i zgłoszenia patentowego nie była przez nikogo opisana; dopiero podczas prowadzenia prac pojawiła się publikacja o zastosowaniu AA w przedłużaniu PUR [3,4], jednakże sposób wprowadzenia i substraty użyte do syntezy poliuretanu były inne od zastosowanych w moich pracach, przez co otrzymany materiał charakteryzował się odmiennymi właściwościami.

Moje prace badawcze i publikacje naukowe, stanowiące podstawę wyżej wymienionego osiągnięcia naukowego, posiadają charakter poznawczy i użytkowy przy równoczesnym uwzględnieniu aspektów zdrowotnych i ekologicznych. Przeprowadzone badania dowodzą, że zastosowanie odpowiednich surowców, modyfikatorów oraz technik syntezy poliuretanów prowadzi do otrzymania nowej gamy materiałów poliuretanowych na rusztowania tkankowe, jak również produktów poliuretanowych o innych możliwościach aplikacyjnych.

Wyniki badań własnych

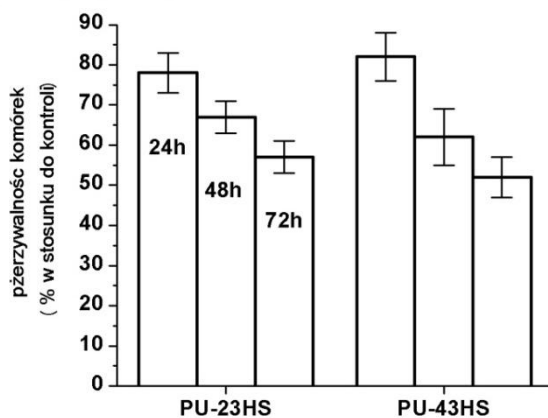
Symbole otrzymanych typów PUR, z oznaczeniem najważniejszych komponentów różnicujących poszczególne serie:

Seria I	Gdzie :
PUR/HDI/PCL	PUR - poliuretan,
PUR/HDI/PCL/K	HDI - 1,6-diizocyjanian heksametylenu,
PUR/HDI/PCL/C	HMDI - 4,4'- diizocyjanian dicykloheksametylenu,
PUR/HDI/PCL/AA	PCL - polikaprolakton,
Seria II	PEBA - oligomerol (α,ω -dihydroksy oligo(adypinian etylenowo-butylenowy),
PUR/HDI/PEBA	PEG -poli(glikol etylenowy),
PUR/HDI/PEBA/AA	O -olej rycynowy,
Seria III	BDO -1,4-butanodiol,
PUR/HMDI/PEBA	EHEE - 1-etoksy-2-(2-hydroksyetoksy)etanol,
PUR/HMDI/PEBA/AA	AA - kwas L-askorbinowy,
Seria IV	PVA -poli(alkohol winylowy),
PUR/HDI/PEG/PEBA	Ż -żelatyna,
PUR/HDI/PEG/PEBA/GPCa	K -kolagen,
Seria V	C -chitozan,
PUR/HDI/PEBA/O/BDO	GPCa - Glicerofosforan wapnia
PUR/HDI/PEBA/O/EHEE	

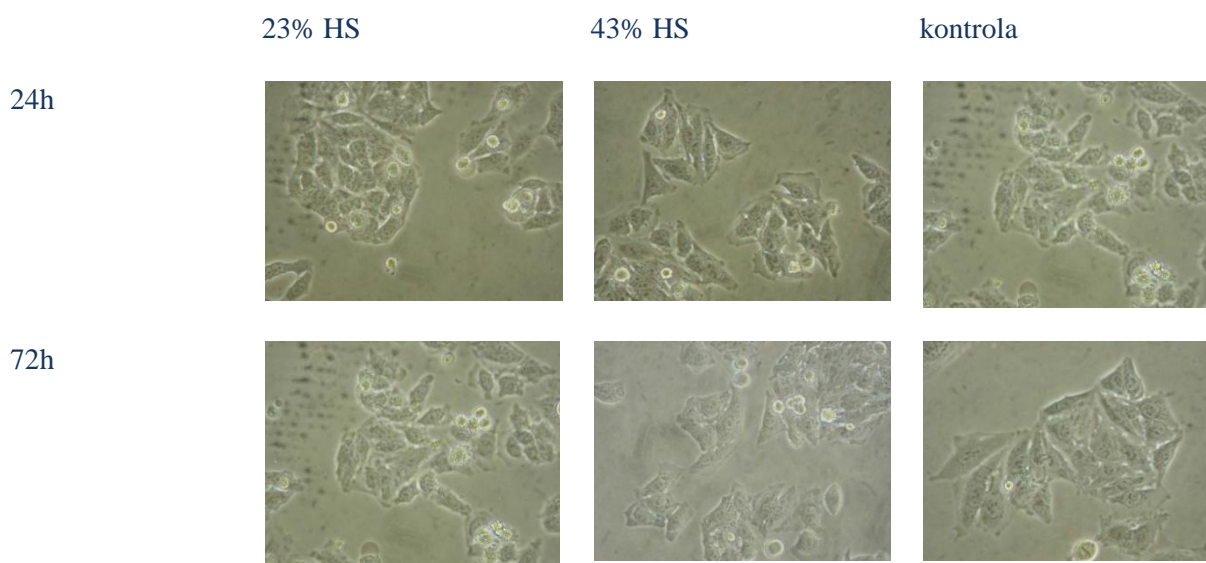
Materiały do regeneracji tkanek twardych-kości syntezowane z użyciem semikrystalicznego poliolu

W 2010 roku opracowałam pierwszy nowy alifatyczny termoplastyczny poliuretan serii I typu PUR/HDI/PCL zsyntezowany z PCL, HDI, BDO wobec katalizatora DBTDL [H12]. W odróżnieniu od opublikowanych wówczas prac skupiających się na syntezie PUR z użyciem cykloalifatycznego diizocyjanianu [40,41,42,43,44] opracowałam poliuretany otrzymane z użyciem liniowego alifatycznego HDI nadającego wyższe wskaźniki wytrzymałościowe PUR, niż ich analogów otrzymanych z HMDI. Ponadto w odróżnieniu od pracy [45] wyeliminowałam stosowanie rozpuszczalnika do syntezy poliuretanów i przeprowadziłam syntezę PUR w masie w różnych temperaturach (60-90°C). Otrzymałam w ten sposób poliuretany o różnej zawartości segmentów sztywnych (HS) mieszczącej się w zakresie od 23% do 43% mas.. Analiza pasm na widmach FTIR oraz zmian ich intensywności pozwoliła na potwierdzenie obecności w strukturze otrzymanych poliuretanów m.in. grup uretanowych. Końcowe średnie wagowe masy cząsteczkowe otrzymanych PUR, określone z użyciem chromatografii selektywnego wykluczania (SEC), mieściły się

w zakresie od 80000 do 160000 Da. Wytrzymałość na rozciąganie (T_{sb}) materiałów zawierała się w przedziale 14-26 MPa, wydłużenie przy zerwaniu (E_b) mieściło się w zakresie 230-460%, a twardość wynosiła od 80 do 95 °ShA. Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC), dowiodła, iż otrzymane materiały mają temperaturę zeszklenia (T_g) segmentów giętkich wynoszącą -33°C a ich temperatura topnienia (T_m) mieści w zakresie $150-160^\circ\text{C}$. Stwierdziłam, że ze wzrostem udziału procentowego segmentów sztywnych w opracowanych PUR wzrasta zawartość fazy krystalicznej (wzrost entalpii procesów topnienia (H_m) z 6,6 J/g do 36,8 J/g). Chłonność badanych PUR w temperaturze 37°C przez 24h C w różnych rozpuszczalnikach, symulujących środowisko organizmu człowieka tj. w wodzie, soli fizjologicznej i buforze fosforanowym (płyny standardowe) nie przekraczał 2% mas. Zwiększenie zawartości segmentów sztywnych w otrzymanych materiałach znacząco wpływało na parametry powierzchni PUR, które są jednym z kluczowych parametrów decydujących o adhezji komórek do powierzchni materiałów i ich proliferacji. Średnia szorstkość powierzchni (R_{md}) wynosiła od $4,9\ \mu\text{m}$ do $5,2\ \mu\text{m}$, a kąt zwilżania otrzymanych PUR, zbadany z użyciem wody destylowanej, wynosił od 50° do 74° . Testy oddziaływań otrzymanych PUR z buforem fosforanowym (PBS) wykazały, że po 3 miesięcznej inkubacji w PBS (37°C) otrzymane PUR są stabilne (ubytek masy $<1\%$), a procesom degradacji w nieznacznym stopniu ulegają po czasie 9 miesięcy (ubytek masy 5-12%) i jest to niezależne od ilości HS zawartych w PUR. Testy suchej pozostałości (testy migracji nieprzereagowanych substratów z PUR do organizmu np. mięśni, organów, płynów ustrojowych i metodą wyciągów farmakopealnych) wg wytycznych Farmakopei Polskiej [46] wykazały, że wyciągi wodne, jak i ich odczyn oraz stopień zmętnienia mieściły się w normach niezależnie od zawartości HS w PUR. Test krótkoterminowej biokompatybilności otrzymanych PUR z krwią wykazał, iż materiały te nie wpływają na badane parametry krwi w jej podstawowej morfologii. Test MTT z użyciem komórek Hela wykazał, że otrzymane systemy PUR nie wykazują toksycznego działania na komórki z tej linii (Rys. 1) oraz nie zmieniają ich morfologii (Rys. 2), co wskazuje na biokompatybilność otrzymanych materiałów PUR [H12].



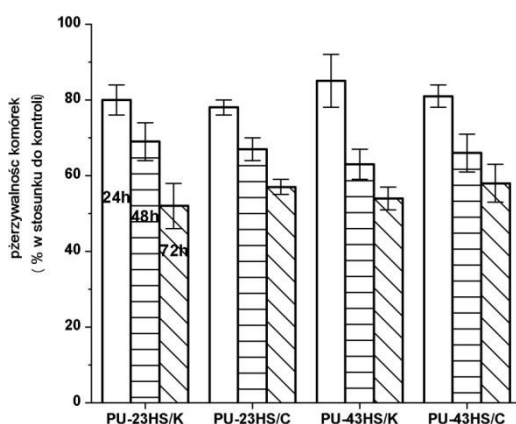
Rys. 1 Przeżywalność komórek Hela w zależności od zawartości HS w systemie PUR/HDI/PCL



Rys. 2 Morfologia komórek Hela po 24h i 72h inkubacji z ekstraktami PUR/HDI/PCL (23% lub 43% HS).

Nowo opracowany poliuretan serii I, otrzymany z PCL,HDI,BDO,DBTDL w masie, jest odpowiedni do zastosowania jako implanty stabilne długoterminowo [H12], jednak w porównaniu do polimerów naturalnych wykazuje nieco niższą biokompatybilność. Wyżej opracowane PUR zmodyfikowałam *in situ* z użyciem kolagenu i chitozanu (0,5% mas.). Analiza widm FTIR otrzymanych materiałów wykazała w przypadku PUR modyfikowanych kolagenem i chitozanem wzrost intensywności pasm z zakresu wiązań rozciągających ν_{NH} oraz rozszczepienie pasma pochodzącego od wiązań karbonylowych przy 1700 cm^{-1} i 1729 cm^{-1} , co świadczy o obecności nowo powstałych wiązań wodorowych między segmentami sztywnymi PUR, a cząsteczkami kolagenu lub chitozanu. Modyfikacja PUR kolagenem i chitozanem wykazała istotny wpływ na chropowatość jego powierzchni w pomiarze z wykorzystaniem profilometru; zaobserwowałam wzrost średniej szorstkości powierzchni

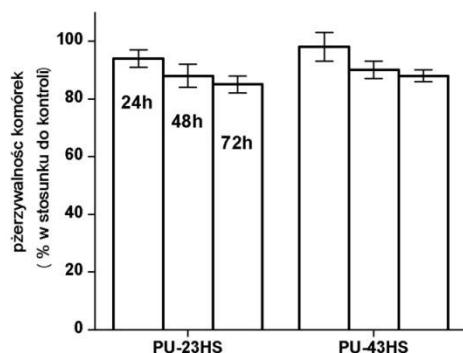
R_{md} od ok. 51% w przypadku PUR zawierających 23%HS, a w przypadku PUR zawierających 43% HS o ok. 60%, w stosunku do ich analogów niemodyfikowanych. Wstępna charakterystyka przydatności przeprowadzonej modyfikacji z użyciem kolagenu lub chitozanu, zweryfikowana na podstawie wytycznych z Farmakopei (podobnie jak w przypadku PUR niemodyfikowanych) wykazała, że ilość suchej pozostałości, odczyn jak i zmętnienie roztworu jest porównywalne z wynikami otrzymanymi dla PUR niemodyfikowanych. Niestety, przeprowadzony test cytotoksyczności (test MTT) modyfikowanych PUR wykazał, iż ani kolagen ani chitozan nie wpływają w sposób istotny na przeżywalność komórek z linii Hela. Wyniki biokompatybilności PUR modyfikowanych były nieznacznie wyższe niż dla PUR niemodyfikowanych, ale nadal niezadowalające (Rys. 3) [H12].



Rys. 3 Przeżywalność komórek Hela w zależności od zawartości HS (23% i 43%) w systemie PUR/HDI/PCL oraz rodzaju modyfikatora (K-kolagen lub C-chitozan (0,5% mas.))

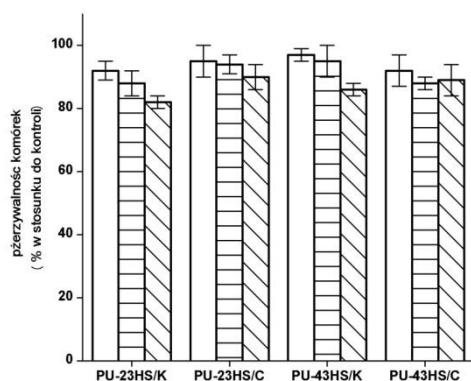
Analizując otrzymane wyniki badań oraz przesłanki z doniesień literaturowych w kolejnym etapie przeprowadziłam syntezę analogicznych PUR jednak nie stosując katalizatora DBTDL. Takie podejście wynikało z faktu, iż katalizatory, a w tym DBTDL najpowszechniej wykorzystywane do syntezy biomedycznych PUR, mogą mieć wpływ na wyniki testów cytotoksyczności [47] i zmniejszać biokompatybilność materiałów PUR [H12]. W związku z powyższym zaprojektowałam, przeprowadziłam i zoptymalizowałam syntezę nowych niekatalizowanych PUR z użyciem PCL, HDI i BDO. Materiały te charakteryzowały się T_{Sb} w zakresie 12-24 MPa w zależności od zawartości segmentów sztywnych (nieco niższą niż ich analogi syntezowane z użyciem katalizatora DBTDL). Stopień spęcznienia tych materiałów PUR, ich hemokompatybilność i sucha pozostałość po wyciągach wodnych i heksanowych miały wartości analogiczne jak materiały PUR, których syntezę katalizowano przy użyciu DBTDL, jednakże charakteryzowały się wyższą biogodnością. Analiza

właściwości fizykochemicznych, mechanicznych i biologicznych (Rys. 4) niekatalizowanych systemów PUR pozwala stwierdzić, iż materiały te spełniają kryteria stawiane materiałom wykorzystywanym do regeneracji tkanki kostnej i mogłyby zostać wykorzystane do tego celu [H1, H12].

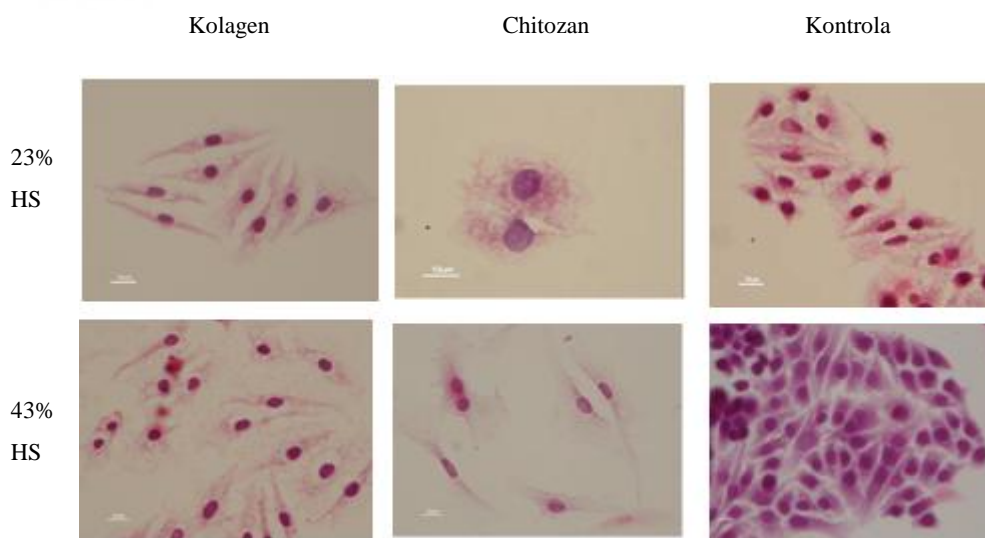


Rys. 4 Przeżywalność komórek Hela w zależności od zawartości HS w systemie niekatalizowanych PUR/HDI/PCL

Ze względu na istotną poprawę chropowatości katalizowanych systemów PUR, modyfikowanych kolagenem lub chitozaniem, oraz uzasadnioną potrzebę poprawy biokompatybilności syntetycznych polimerów przeprowadziłam analogiczną modyfikację kolagenem i chitozaniem niekatalizowanych PUR. Przeprowadzona modyfikacja *in situ* w tym przypadku pozwoliła uzyskać zadowalający rezultat, w którym biokompatybilność otrzymanych PUR nieznacznie wzrosła, a obserwacja komórek nie wykazała postępujących zmian morfologicznych w czasie prowadzonego testu MTT (Rys. 5, Rys. 6).



Rys. 5 Przeżywalność komórek Hela w zależności od zawartości HS w systemie niekatalizowanych PUR/HDI/PCL oraz od rodzaju modyfikatora (K-kolagenu lub C-chitozanu (0,5% mas.))



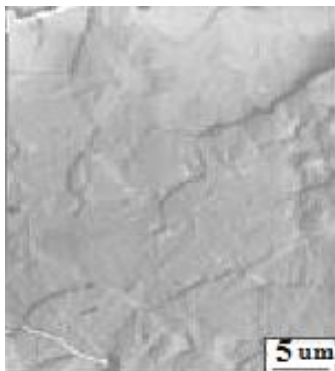
Rys. 6 Przykładowe zdjęcia morfologii komórek Hela po przeprowadzonym barwieniu hematoksyliną po 72h inkubacji niekatalizowanych PUR/HDI/PCL modyfikowanych kolagenem lub chitozanem o zawartości HS 23% lub 43%

Przeprowadzona modyfikacja przyczyniła się również do zwiększenia chropowatości modyfikowanych niekatalizowanych PUR, co przyczyniło się do poprawy adhezji i wzrostu komórek. Wyniki przedstawionych badań stanowiły podstawę do zgłoszenia patentowego z dnia 4.05.2010 r. i w 2014 roku przyznano na nie patent (wyniki badań stanowią załącznik do zgłoszenia patentowego), w którym zastrzeżono sposób wytwarzania segmentowych poliuretanów z PCL, HDI i BDO przez polimeryzację w masie i przedłużanie prepolimeru polimerami naturalnymi (chitozanem lub kolagenem) [H12].

Opracowane przeze mnie inne typy PUR/HDI/PCL/PVA opisane w pracach [H1 i H11], charakteryzują się wyższą hydrofilowością (umożliwiającą absorpcję białek oraz przyleganie komórek) i wyższymi wartościami właściwości mechanicznych niż ich analogi otrzymane z: PCL, HDI, przedłużane BDO, co jest istotne w zastosowaniu takich materiałów jako rusztowania tkankowe służące do regeneracji kości np. udowej [H1, H11]. PVA został zastosowany nowatorsko jako związek wielofunkcyjny zawierający aktywne atomy wodoru w grupach hydroksylowych umożliwiającą sieciowanie PUR poprzez przeniesienie aktywnego atomu wodoru z grupy hydroksylowej do izocyjanianowej.

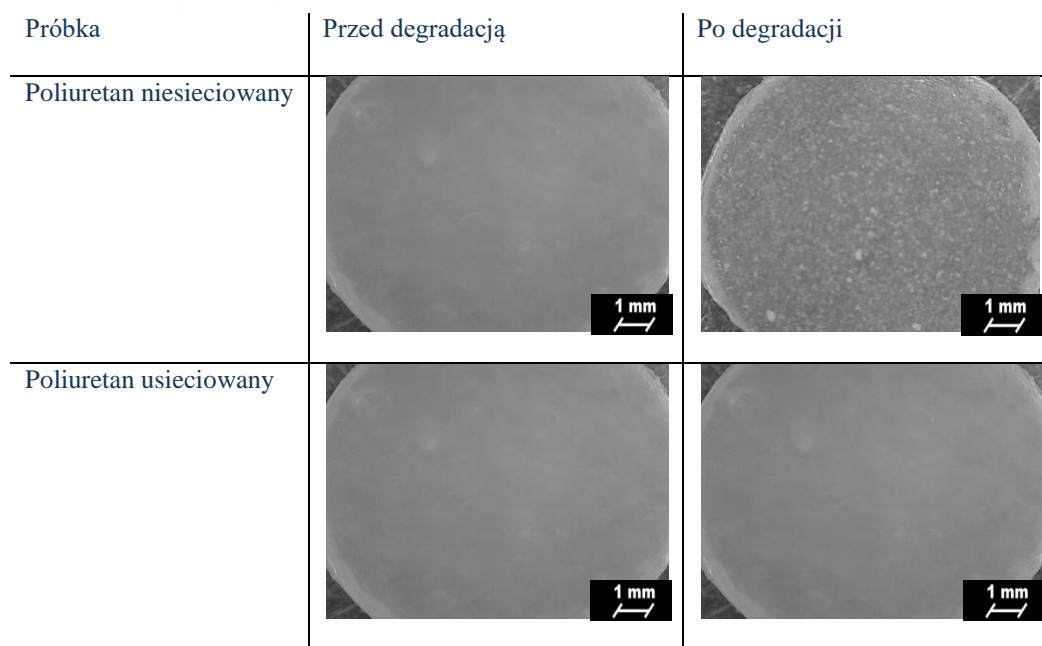
Przeprowadzone badania metodami FTIR oraz spektroskopii Ramana wykazały, iż zachodzi sieciowanie PUR z zastosowaniem PVA. W badaniach elektronmikroskopowych zaobserwowałam obecność struktur promienistych na powierzchni kruchej przelomu tych

poliuretanów (Rys 7), co wg literatury [48] jest charakterystyczne są dla przełomów poliuretanów usieciowanych.



Rys 7. Obraz TEM kruchego przełomu PUR/HDI/PCL sieciowanego PVA.

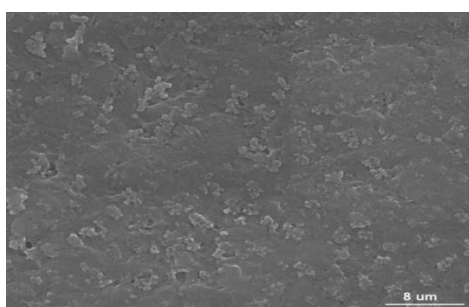
Kat zwilżania usieciowanych PUR wynosił od 38° do 47° czyli ok. 20% mniej niż ich analogów nieusieciowanych. Z badań tych wynika, że osiągnęłam korzystny efekt polepszenia hydrofilowości otrzymanych PUR, co jest zjawiskiem pożądanym, ze względu na to, że umożliwia adhezję komórek do powierzchni materiałów syntetycznych. Efekt ten można wytłumaczyć zwiększeniem ilości atomów tlenu wprowadzonych dodatkowo do łańcucha przez zastosowanie PVA. Obecność wiązań sieciujących przyczyniła się do poprawy właściwości mechanicznych PUR. Usieciowane PUR (poli(alkoholem winylowym) w ilości 1% mas. charakteryzowały się T_{Sb} równym 41 ± 3 MPa i E_b o wartości 460 ± 8 %, a usieciowane 2% mas. PVA miały T_{Sb} o wartości 52 ± 1 MPa i E_b równe 512 ± 6 %. PUR nieusieciowane wykazały T_{Sb} o wartości 31 ± 1 MPa i E_b równe 320 ± 5 %. Twardość usieciowanych PUR niezależnie od ilości PVA była porównywalna ($60-64$ °ShD), przy czym twardość nieusieciowanych PUR wynosiła 39 °ShD. Badania degradacji przeprowadzone w PBS (37°C) po 3 miesiącach nie wykazały znaczącego spadku masy sieciowanych PUR, który zawierał się w zakresie 1-3%, podobnie jak dla nieusieciowanych PUR, a badania mikroskopowe wykazały zmiany na powierzchni badanych materiałów (Rys.8) mogące wskazywać na pewne oznaki degradacji PUR nieusieciowanych, podczas gdy powierzchnia usieciowanych PUR pozostaje niezmienną [H1].



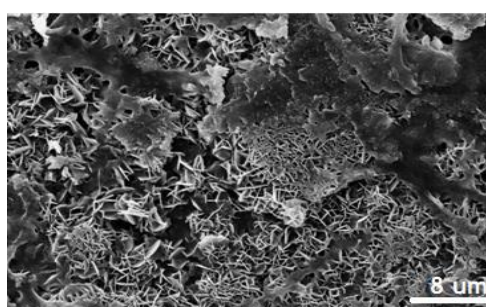
Rys. 8 Mikroskopia optyczna przed i po procesie degradacji niesieciowanych, jak i PUR - usieciowanych za pomocą PVA

Przeprowadzone badania kalcyfikacji otrzymanych PUR wykazały, że sieciowanie PUR za pomocą PVA w znaczny sposób przyczynia się do kalcyfikacji powierzchni tych materiałów, w porównaniu do PUR niesieciowanych (Rys. 9). Po 21 dniach badania można zauważyć wyraźnie że związki wapnia pokryły równomierną warstwą powierzchnie modyfikowanych PUR.

Przed kalcyfikacją

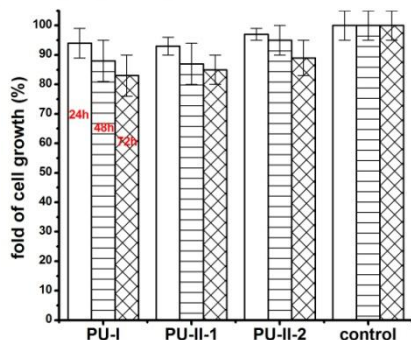


Po 21 dniach kalcyfikacji



Rys. 9 Przykładowe zdjęcia (SEM) PUR usieciowanych PVA przed i po badaniu kalcyfikacji powierzchni po 21 dniach.

PUR usieciowane PVA, wykazały krótkoterminową kompatybilność z ludzką krwią, a testy MTT (komórki MG 86) wykazały ich wyższą biokompatybilność, niż ich analogów niesieciowanych (Rys. 10)



Rys. 10 Przeżywalność komórek MG 86 w kontakcie z nieusieciowanymi i usieciowanymi PUR po 24h, 48h i 72h prowadzenia testu MTT

Od strony technologicznej w wyżej wymienionych systemach PUR zoptymalizowałam czas i temperaturę reakcji oraz dobór właściwego stężenia PVA zapewniającego oczekiwane właściwości mechaniczne, stopień hydrofilowości otrzymanych materiałów PUR, a także ich biokompatybilność.

Materiały do regeneracji tkanek miękkich-chrząstki syntezowane z użyciem semikrystalicznego poliolu

Liczne doniesienia literaturowe w latach 2005-2010 [49,50,51] wskazywały, iż istnieje ogromne zapotrzebowanie na nowe rozwiązania, które umożliwiłyby regenerację tkanek miękkich np. naczyń krwionośnych lub chrząstki. Te doniesienia ukierunkowały moje dalsze badania w stronę zaprojektowania i otrzymania nowych systemów PUR, które byłyby przydatne do otrzymywania rusztowań tkankowych, wykorzystywanych przez inżynierię regeneracyjną do formowania funkcjonalnych rusztowań do odbudowy tkanek miękkich. Zaproponowany przeze mnie nowy typ PUR był zaprojektowany w taki sposób, aby posiadał nie tylko wyższą biokompatybilność, ale również zawierał modyfikator, który stopniowo ulegałby wydzieleniu podczas degradacji rusztowania i tym samym przyczyniał się do przyspieszenia regeneracji tkanek. Aby osiągnąć ten cel zaproponowałam innowacyjną modyfikację systemu PUR/HDI/PCL z użyciem kwasu L-askorbinowego (AA). Na tym etapie prowadzonych przeze mnie badań nie istniały doniesienia literaturowe wskazujące na użycie AA jako modyfikatora prepolimeru uretanowego. Aby udowodnić możliwość zastosowania AA w otrzymaniu nowych odmian PUR zaprojektowałam, przeprowadziłam i zoptymalizowałam parametry syntezy z różną ilością tego modyfikatora. Przeprowadzone badania PUR za pomocą FTIR pozwoliły stwierdzić, iż reakcja zachodzi pomiędzy modyfikatorem i diizocyjanianem użytym do jego syntezy (HDI). Otrzymałam tym samym nowe typy PUR mające zdolność do degradacji w środowisku imitującym płyny ustrojowe

człowieka, w czasie odpowiadającym materiałom stosowanym do regeneracji tkanek kostnych (do 6 miesięcy), w tym tkanek chrzęstnych (do 30 dni) [H11]. Analizując wpływ ilości modyfikatora, na czas degradacji, stwierdziłam, że zaproponowany modyfikator (AA) pozwala ponadto sterować stopniem degradacji materiału podczas inkubacji w płynach imitujących płyny ustrojowe człowieka, co jest bardzo istotne przy projektowaniu rusztowań do różnych zastosowań. Nie trzeba będzie wówczas zmieniać całego systemu PUR, a jedynie ilość modyfikatora.

Równolegle postanowiłam wykorzystać do modyfikacji PUR inne materiały naturalne, takie jak białko pochodzenia zwierzęcego - żelatyna. Wpływ żelatyny na zdolność do regeneracji stawów jest szeroko opisywany w literaturze [52], jednak brakowało informacji o zastosowaniu żelatyny w modyfikacji PUR do celów medycznych [H11].

Wyżej opisany PUR/HDI/PCL zmodyfikowałam białkiem zwierzęcym- żelatyną, w którym nowością jest możliwość sterowania czasem jego degradacji poprzez dobór ilości dodanego modyfikatora. W wyniku tych badań zaobserwowałam, że ubytek masy podczas 30 dniowej degradacji w buforze fosforanowym wynosił poniżej 5% dla próbek o zawartości 5% żelatyny, a 15% dla próbek modyfikowanych żelatyną w ilości 30% , co może świadczyć o powolnym czasie ich degradacji w zależności od ilości modyfikatora (po czasie 12 miesięcy próbki modyfikowane 5% żelatyny uległy degradacji na poziomie 92%). Wytrzymałość na rozciąganie nowych systemów PUR modyfikowanych żelatyną zawierała się w zakresie od 8 MPa do 19 MPa, a wydłużenie w chwili zerwania wynosiło od 57 % do 310 % w zależności od ilości modyfikatora. Oceeniłam także ich krótkoterminowe oddziaływanie z ludzką krwią, które jest jednym z parametrów weryfikujących możliwość ich biomedycznego zastosowania [53]. Badania te wykazały, że modyfikowane żelatyną PUR nie wpływają na wartości parametrów krwi. Testy cytotoksyczności przeprowadzone w warunkach *in vitro* z użyciem linii komórkowej mysich fibroblastów NIH-3T3 pokazały, że modyfikowane żelatyną PUR posiadają wyższy stopień przeżywalności komórek, niż niemodyfikowane PUR, co predysponuje je jako materiały posiadające biokompatybilność właściwą do realizacji celów inżynierii tkankowej.

Możliwość kontrolowania degradacji systemu PUR modyfikowanego żelatyną pozwala zastosować te materiały do regeneracji różnych typów tkanek kostnych [H11]. W stosunku do modyfikacji PUR kwasem askorbinowym ten system wykazuje szerszy zakres degradacji. To innowacyjne podejście do sterowania czasami degradacji materiałów PUR, poprzez wykorzystanie żelatyny lub AA, dedykowanych do celów biomedycznych stało się podstawą

zgłoszenia patentowego przedłożonego w Urzędzie Patentowym w 2011 r., a na które patent przyznano w 2016 roku jednoznacznie uznając proponowane przeze mnie rozwiązanie, jako nowość, w którym zastrzeżono sposób wytwarzania segmentowych poliuretanów w masie z PCL, HDI, BDO i modyfikowanych PVA i/lub AA i/lub żelatyną [H11].

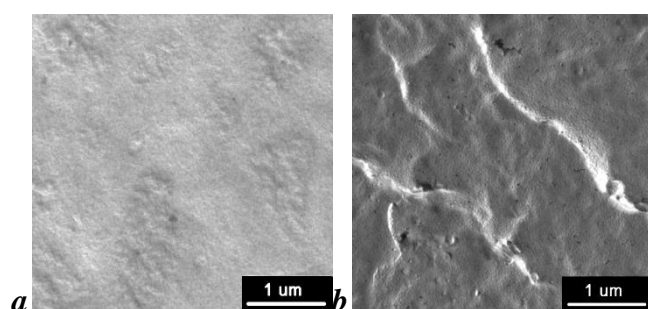
Z badań wyżej opisanych wynika, że najlepszym rozwiązaniem problemu trombogenności, degradacji i zdolności regeneracji będzie użycie hybrydowych modyfikatorów PUR, a mianowicie zastosowanie w odpowiednich proporcjach zarówno AA jak i żelatyny.

Materiały do regeneracji tkanek miękkich-układ sercowo-naczyniowy, naczynia krwionośne syntezowane z użyciem amorficznego poliolu

Materiały stosowane w inżynierii tkanek miękkich powinny charakteryzować się stosunkowo krótszym czasem degradacji, niż opisane wcześniej systemy PUR zaprojektowane z myślą o regeneracji tkanki kostnej i chrzęstnej. W kolejnym etapie badań opracowałam nowy typ PUR, a następnie zoptymalizowałam ilości poszczególnych surowców, czas syntezy oraz temperaturę reakcji. W proponowanych nowych PUR zastosowałam amorficzny polioliol (α,ω -dihydroksy oligo(adypinian etylenowo-butylenowy) (PEBA), gdyż pozwoliłoby to na przyspieszenie czasu degradacji oraz jej bardziej równomierny przebieg w różnych miejscach rusztowania, a także byłoby korzystniejsze od strony technologicznej, gdyż PEBA w temp. pokojowej nie jest ciałem stałym. Dotychczas, w doniesieniach literaturowych cytowano wykorzystanie jedynie semikrystalicznego PCL do syntezy PUR mających zastosowanie w inżynierii tkankowej [54]. Otrzymałam zatem alifatyczne PUR/HDI/PEBA z wykorzystaniem PEBA, HDI, BDO wobec katalizatora DBTDL [H9]. PUR otrzymano w trzech stosunkach molowych NCO:OH=0,1:1, 1:1, 1,05:1 na etapie przedłużania łańcucha. Wytrzymałość na rozciąganie nowych systemów PUR zawierała się w zakresie od 4 MPa do 9 MPa, a wydłużenie w chwili zerwania wynosiło od 27 % do 351 %. Analiza widm FTIR oraz analiza widm ¹HNMR pozwoliła określić, iż AA wbudowuje się w łańcuch główny i potwierdziła zajście reakcji otrzymywania PUR. Wspomniana przeze mnie AA została także wykorzystana w przypadku tych PUR, jako modyfikator, który mógłby podnieść ich biokompatybilność. W tym samym czasie pojawiła się publikacja zespołu Cetina-Diaz, w której opisano zastosowanie AA jako przedłużacza łańcucha prepolimeru otrzymanego z PCL, HMDI i L-glutamininu [55] i publikacja zespołu Zhanga, gdzie AA wykorzystano w syntezie PUR z diizocyjanianu typu LDI (temp. pokojowa). Zhang użył do syntezy PUR także glicerol oraz wodę i otrzymał materiał

porowaty, w którym stwierdził obecność charakterystycznych pasm pochodzących od grup karbonylowych i niezwiązanych grup izocyjanianowych. Jednak, nie wykazał występowania charakterystycznych pasm dla ugrupowań uretanowych. Ponadto autor wykazał, iż zastosowanie AA w syntezie przyczyniło się do wzrostu przeżywalności komórek nie uwzględniając, iż autorzy wzbogacili pożywkę hodowlaną AA [56].

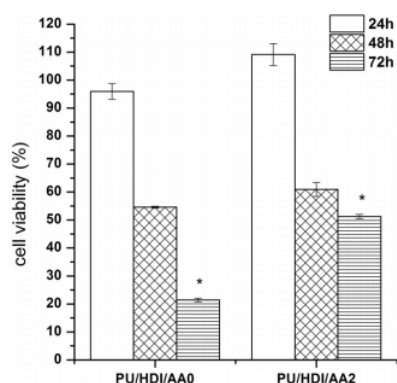
W celu określenia struktury AA-modyfikowanych PUR z amorficznym poliolem, przeprowadziłam analizę widm FTIR, która wykazała obecność charakterystycznych pasm ugrupowań uretanowych. Ponadto, analiza widm $^1\text{H NMR}$ [57] dowiodła, że kwas L-askorbinowy wbudowany jest w łańcuch PUR przynajmniej jednostronnie. W przypadku modyfikowanych PUR za pomocą AA, badania TEM wykazały obecność nowych obszarów o wielkości rzędu 1-2,5 μm (Rys.11a) w porównaniu do niemodyfikowanych PUR (Rys. 11b). Obecność tych nowo utworzonych struktur wskazuje na powstanie układu mikroheterogenicznego, a fazę rozproszoną można przypisać łańcuchom PUR z wbudowanym AA [H9].



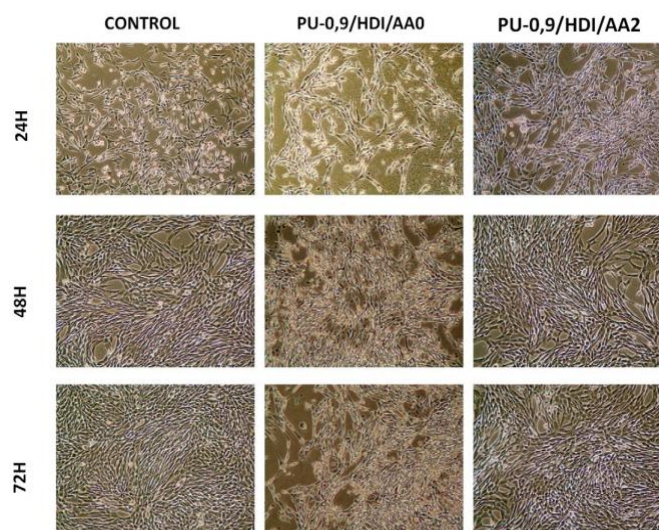
Rys. 11 Zdjęcia TEM otrzymane z użyciem techniki replik powierzchni a) modyfikowanych AA i b) niemodyfikowanych PUR

W celu określenia, w jaki sposób materiały te mogą potencjalnie zachowywać się po implantacji w tkance, oszacowałam ubytek masy otrzymanych PUR w standardowych dla tych badań środowiskach (olej rzepakowy, roztwór soli fizjologicznej, woda destylowana i PBS). Zauważyłam, że niezależnie od środowiska inkubacji ubytek masy obu typów PUR mieścił się w przedziale 1-2%. Krótkoterminowe oddziaływanie z ludzką krwią wykazało, że zarówno niemodyfikowane jak i modyfikowane AA- PUR nie wpływają istotnie na wartości parametrów krwi. Testy cytotoksyczności przeprowadzone w warunkach *in vitro* z użyciem linii komórkowej mysich fibroblastów NIH-3T3 pokazały, że % przeżywalności tych komórek w kontakcie z modyfikowanym AA-PUR jest wyższy niż niemodyfikowanych PUR, co determinuje je jako materiały posiadające biokompatybilność właściwą do realizacji celów inżynierii tkankowej (Rys. 12). Zaobserwowany stymulujący wpływ modyfikowanych AA-

PUR na przeżywalność komórek 3T3 mógł być spowodowany tym, iż podczas otrzymywania ekstraktów AA wydzielal się z materiałów do medium hodowlanego, które podane na komórki zapewniło im podwyższoną zdolność przeżycia, w porównaniu do niemodyfikowanych PUR. Pozytywny wpływ modyfikowanych AA-PUR zaobserwowano badając również morfologię komórek 3T3 podczas inkubacji z ekstraktami (Rys. 13). Takie wnioski płynące z przeprowadzonych przeze mnie badań są spójne z doniesieniami literaturowymi [58].

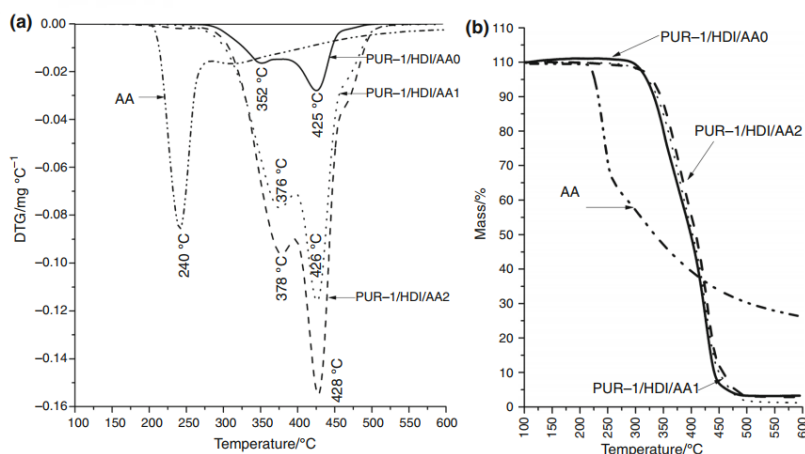


Rys. 12 Przeżywalność komórek mysich fibroblastów NIH-3T3 w kontakcie z PUR/HDI/PEBA i PUR/HDI/PEBA/AA po 24h, 48h i 72h prowadzenia testu MTT



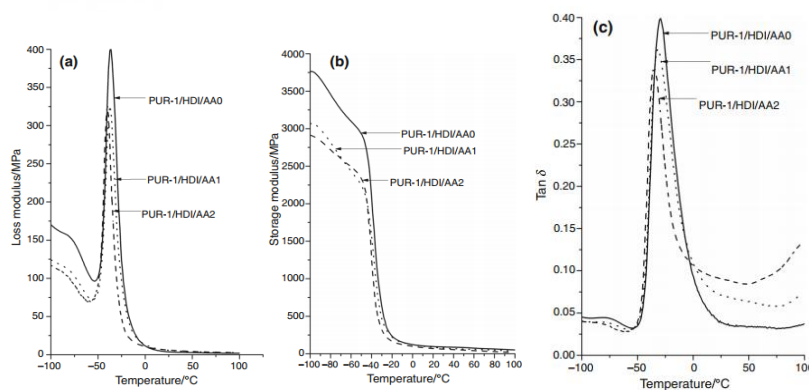
Rys. 13 Przykładowe zdjęcia morfologii komórek 3T3 po 24,48 i 72h inkubacji PUR/HDI/PEBA i PUR/HDI/PEBA/AA

Z uwagi na to, iż elastomery PUR są wykorzystywane do otrzymywania porowatych rusztowań tkankowych różnymi technikami, a często ich przetwarzanie zachodzi w wysokich temperaturach i przy udziale rozpuszczalników organicznych otrzymane PUR niemodyfikowane i modyfikowane AA, w kolejnym etapie zostały zbadane pod kątem właściwości termicznych (termogravimetria, TGA) i termomechanicznych (dynamiczno-mechaniczna analiza termiczna, DMA), w celu ustalenia wpływu AA na te właściwości oraz zakres przetwórstwa tych polimerów w podwyższonych temperaturach [H4].



Rys. 14 DTG (a) i ubytek masy (b) kwasu *L*-askorbinowego (AA), niemodyfikowanego i modyfikowanego PUR/HDI/PEBA

Przeprowadzone badania TGA z użyciem otrzymanych modyfikowanych AA-PUR wykazały, iż degradacja termiczna tych systemów następuje w dwóch etapach, czyli odmiennie niż w przypadku AA. Analiza danych DTG (Rys. 14) wykazała, że ten typ PUR jest termicznie trwały do temperatury około 250°C. Można również zauważyć, że modyfikowane AA poliuretany wykazywały nieznacznie podwyższoną temperaturę rozkładu (zarówno w pierwszym jak i drugim stopniu degradacji), w porównaniu z niemodyfikowanymi PUR. Ta zmiana może być spowodowana częściowym włączeniem AA w łańcuchu PUR, przez co zmienia się struktura chemiczna i właściwości termiczne PUR [59]. Analiza wyników DMA (Rys. 15) pozwala zauważyć, że wartość tangensa kąta δ zmniejsza się wraz ze wzrostem zawartości AA w matrycy PUR. W tym przypadku AA wykazuje dobre interakcje z osnową PUR, ponieważ wraz ze wzrostem ilości AA w osnowie współczynnik tłumienia zmniejsza swoją wartość, co potwierdza działanie AA jako nieaktywnego napełniacza, który nie powoduje fizycznego sieciowania PUR. Z drugiej strony, zaobserwowany spadek wartości modułu zachowawczego i modułu stratności potwierdza, że uzyskane modyfikowane AA-PUR nie wykazują struktury o charakterze usieciowanym (potwierdzenie braku usieciowania zaobserwowano również w testach rozpuszczalności i badaniach mikroskopii elektronowej powierzchni kruchych przełomów). Niewielki spadek T_g został zaobserwowany wraz ze wzrostem zawartości AA w osnowie PUR, co może być bezpośrednio związane z tym, iż część nieprzereagowanego AA zachowuje się jak nieaktywny napełniacz w tym systemie.



Rys.15 Moduł zachowawczy (a), moduł stratności (b) i tangens kąta δ (c) dla niemodyfikowanych i modyfikowanych PUR/HDI/PEBA

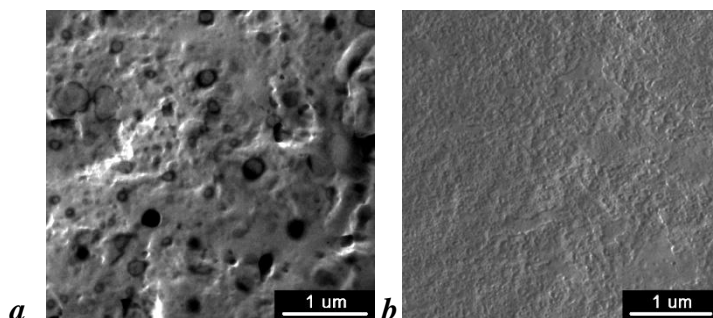
Zaobserwowany niewielki spadek parametrów wytrzymałościowych w przypadku modyfikowanych AA-PUR może wynikać z faktu, że AA była tylko częściowo wbudowana w łańcuch PUR (potwierdzono to badaniami $^1\text{H NMR}$), a jego nieprzereagowana część pozostała zamknięta w osnowie PUR i działa jako nieaktywny napełniacz [60, 61], który powoduje obniżenie wytrzymałości mechanicznej [62]. Właściwości mechaniczne otrzymanych systemów PUR były porównywalne z tymi podanymi w literaturze opisującej PUR do celów biomedycznych [63,64] co wskazuje, iż zsyntetyzowane PUR mogą znaleźć zastosowanie w inżynierii tkanek układu sercowo-naczyniowego [65,66]. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że syntetyzowane materiały poliuretanowe mogą być przetwarzane wieloma technikami z zastosowaniem podwyższonych temperatur, np. metodą druku 3D [H4,H9].

Ze względu na niską reaktywność diizocyanianów alifatycznych (np. HDI, HMDI) w niskich temperaturach, oraz dużą ich lotność, a co za tym idzie i podwyższoną toksyczność w podwyższonych temperaturach ich użycie w syntezie poliuretanów wymaga zastosowania katalizatorów metaloorganicznych lub aminowych, bądź podwyższenia temperatury reakcji. Jednak w przypadku użycia degradowanych poliuretanów do zastosowań biomedycznych, pozostałości katalizatorów mogą mieć istotny wpływ na zmniejszanie stopnia ich biokompatybilności [67]. Dlatego dostrzegłam tutaj duży potencjał wykorzystania w syntezie poliuretanów promieniowania mikrofalowego. W zawiązku z tym przeprowadziłam [H3] innowacyjne badania, determinujące możliwość przyspieszenia reakcji prepolimeryzacji w masie (bez użycia rozpuszczalników organicznych) alifatycznego HDI z semikrystalicznym PCL za pomocą promieniowania mikrofalowego bez zastosowania katalizatorów. Udowodniłam, że ogrzewanie mieszaniny reakcyjnej za pomocą promieniowania mikrofalowego przyspiesza przebieg reakcji prepolimeryzacji w zakresie temperatur 60-80°C.

W tych temperaturach całkowity stopień przereagowania grup hydroksylowych PCL z grupami izocyjanianowymi HDI zostaje osiągnięty w czasie o 50% krótszym, w porównaniu do syntezy prowadzonej w standardowym reaktorze, ogrzewanym za pomocą łaźni olejowej. Badania spektroskopowe w podczerwieni (FTIR) otrzymanych materiałów potwierdziły występowanie w ich strukturze charakterystycznych dla prepolimerów uretanowych ugrupowań. Ponadto nie wykazano różnic w strukturze otrzymanych prepolimerów w zależności od zastosowanego źródła ogrzewania mieszaniny reakcyjnej oraz czasu prowadzenia reakcji syntezy. Badania chromatograficzne (PC/SEC) potwierdziły wpływ promieniowania mikrofalowego na przyspieszenie reakcji syntezy prepolimerów uretanowych, otrzymywanych z HDI i PCL. Natomiast końcowe rozkłady mas cząsteczkowych prepolimerów uretanowych zsyntezowanych zarówno w reaktorze mikrofalowym jaki i reaktorze standardowym są porównywalne. Końcowa średnia wagowa masa cząsteczkowa oligomerów uretanowych otrzymanych w reaktorze mikrofalowym jest tylko o 400 Da większa od masy cząsteczkowej prepolimerów zsyntezowanych w reaktorze standardowym. Udowodniłam, że przy użyciu promieniowania mikrofalowego można prowadzić reakcje otrzymywania prepolimerów w niższych temperaturach, niż przy ogrzewaniu konwencjonalnym (np. łaźnia olejowa), co pozwala zaoszczędzić energię elektryczną, a to prowadzi do zwiększenia efektu ekologicznego tej metody. Reaktor mikrofalowy daje także możliwość bardziej precyzyjnej kontroli parametrów procesu syntezy, niż ogrzewanie konwencjonalne. Ponadto promieniowanie mikrofalowe zapewnia podgrzewanie mieszaniny reakcyjnej w całej objętości, co pozwala uniknąć niekontrolowanego wzrostu temperatury mieszaniny reakcyjnej przy ścianie reaktora ogrzewanego np. w łaźni olejowej [H3].

W kolejnych latach prowadzonych przeze mnie badań przeprowadziłam syntezy i scharakteryzowałam PUR serii III (PUR/HMDI/PEBA/AA) do celów medycznych otrzymane z użyciem amorficznego PEBA i BDO, z zastosowaniem cykloalifatycznego HMDI [H8]. Posiada on wyższą temperaturę zapłonu i jest mniej lotny niż HDI [68,69,70]. Ponadto w literaturze nie omawiano do tej pory takiego systemu PUR. Badania FTIR i ¹HNMR potwierdziły, że reakcja pomiędzy wszystkimi substratami zaszła całkowicie, a zaobserwowane zmiany w intensywności sygnałów oraz ich przesunięcia (¹HNMR) świadczą o częściowym wbudowaniu AA do łańcucha głównego podobnie do PUR/HDI/PEBA/AA. Wykazałam, iż PUR syntezowane przy użyciu HMDI i modyfikowane za pomocą AA są układem mikroheterogenicznym (badania elektronomikroskopowe) (Rys.

16a), w odróżnieniu od niemodyfikowanych PUR (Rys. 16b). Z porównania wyników badań TEM systemów otrzymanych z użyciem HDI i HMDI wynika, że PUR/HMDI/PEBA/AA są bardziej niejednorodne, a przyczyną tego zjawiska może być fakt niższej reaktywności AA z HMDI w porównaniu do HDI. Zaobserwowano obecność obszarów, które mogą być zinterpretowane jako niezwiązany AA zamknięty w matrycy PUR. W takim przypadku AA może zostać uwolniony podczas degradacji do otaczających implant tkanek i stanowić dodatkową ochronę przeciw stanom zapalnym.



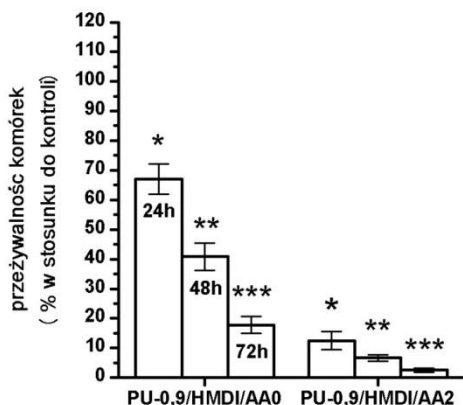
Rys. 16 Zdjęcia TEM otrzymane z użyciem techniki replik z powierzchni przełamów a) modyfikowanych AA i b) niemodyfikowanych PUR/HMDI/PEBA

Badania oddziaływania materiałów PUR/HMDI/PEBA/AA z wybranymi standardowymi mediami wykazały, że są one stabilne do 3 miesięcy i mogą mieć zastosowanie w inżynierii tkankowej tkanek miękkich, a modyfikacja AA spowodowała wzrost szybkości degradacji PUR w stosunku do analogów niemodyfikowanych. Analiza powierzchni wykazała, że modyfikacja AA spowodowała spadek wartości kąta zwilżania z $74 \pm 12^\circ$ do $58 \pm 3^\circ$ i jest to wartość odpowiednia dla polimerów przeznaczonych do zastosowań biomedycznych (taka wartość kąta zwilżania powierzchni umożliwia adhezję komórek ssaków oraz dalszy ich wzrost i proliferację [71]).

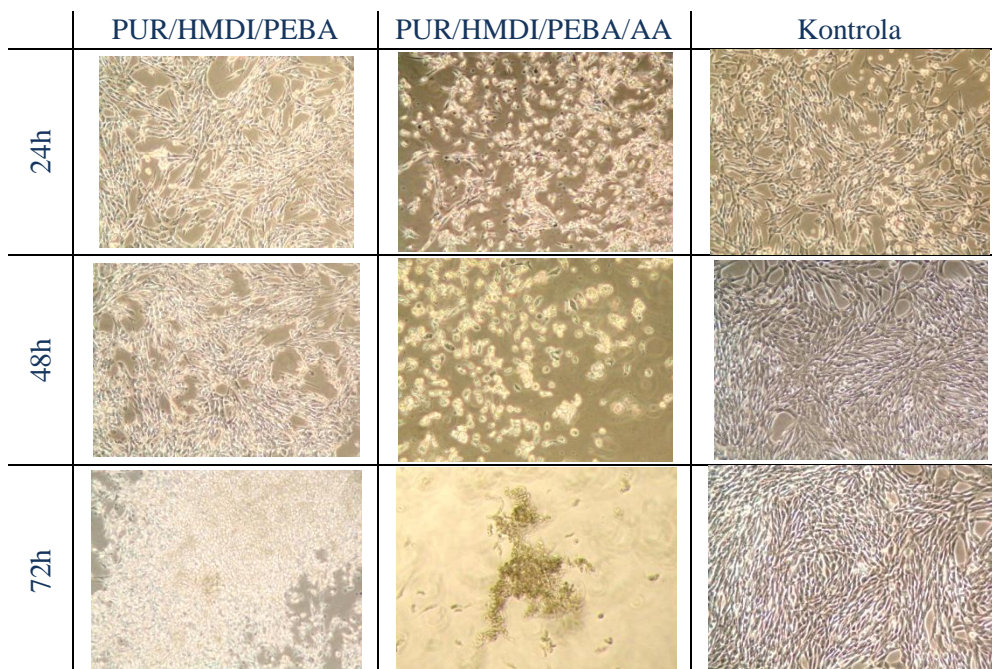
Otrzymane niemodyfikowane i modyfikowane AA-PUR charakteryzowały się zadowalającą krótkoterminową hemokompatybilnością z ludzką krwią i nie wpływały w niekorzystny sposób na składowe krwi ludzkiej [H8].

Przeprowadzone badania mikrobiologiczne, takie jak test krążkowo-dyfuzyjny nie wykazały strefy zahamowania wzrostu wybranych mikroorganizmów (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia Coli*). Zaobserwowano, że modyfikacja AA przyczynia się do kolonizacji szczepów bakteryjnych nie tylko na powierzchni PUR/HMDI/PEBA/AA, ale również umożliwia penetrację mikroorganizmów w głąb materiału po 8 dniach prowadzonych obserwacji. Przyczyną tego zjawiska jest obecność AA, który w swej budowie jest bardzo zbliżony do budowy węglowodanów, będących substancja

odżywczą dla mikroorganizmów. Wyniki testów cytotoksyczności (test MTT z użyciem mysich fibroblastów NIH-3T3), jednoznacznie wskazały na ostrą toksyczność zarówno PUR/HMDI/PEBA jak i PUR/HMDI/PEBA/AA w warunkach *in vitro*. Przeżywalności komórek w kontakcie z niemodyfikowanymi PUR po 72h cytotoksyczności była na poziomie ok. 10%, natomiast po kontakcie z modyfikowane AA- PUR nawet poniżej <5% (Rys. 17). Przy czym warto zwrócić uwagę na niemal całkowicie zaburzoną morfologię komórek 3T3 po 72h testu (Rys. 18) [H8].



Rys. 17 Cytotoksyczność PUR/HMDI/PEBA i PUR/HMDI/PEBA/AA zbadana w warunkach *in vitro* z użyciem testu MTT

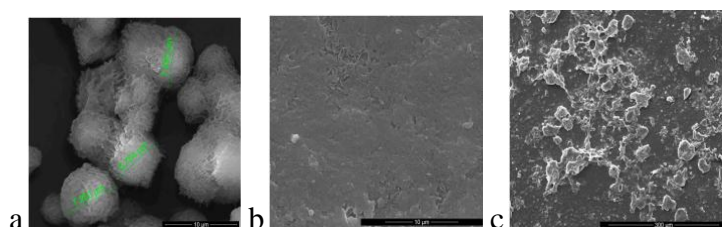


Rys. 18 Morfologia komórek 3T3 po 24h, 48h i 72h prowadzonego testu MTT

Materiały do regeneracji tkanek kości syntezowane z użyciem amorficznego poliolu

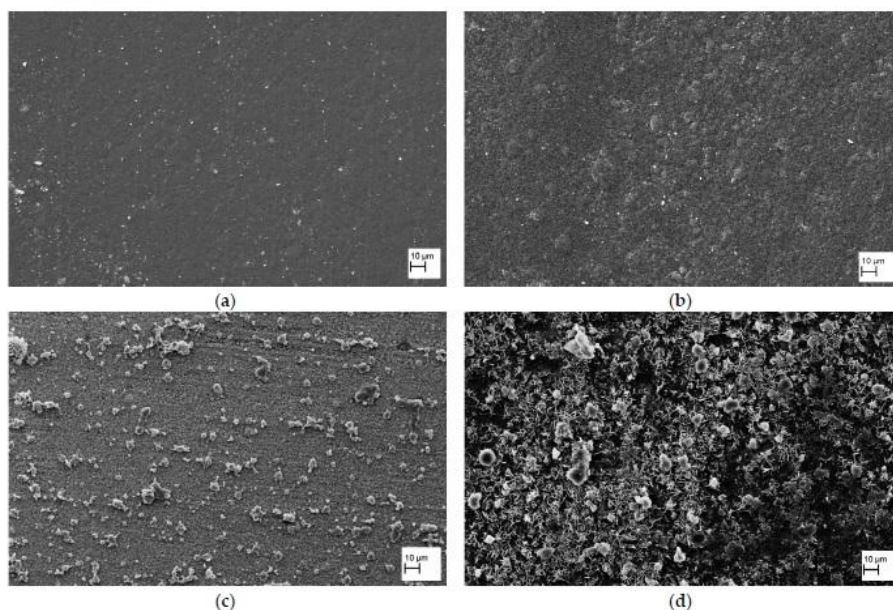
W pracy [H2] zaprojektowałam, przeprowadziłam i zoptymalizowałam syntezę nowych systemów PUR przez wprowadzenie GPCa do łańcucha PUR, otrzymanego z użyciem alifatycznego HDI, amorficznego PEBA i BDO oraz PEG (PUR/HDI/PEG/PEBA/GPCa). Przeprowadzona analiza widm FTIR i Ramana wykazała, że GPCa częściowo wbudowuje się w łańcuch PUR poprzez tworzenie wiązań kowalencyjnych. Ponadto, obecność GPCa zwiększa zdolność materiału do tworzenia się wiązań wodorowych, w porównaniu do niemodyfikowanych PUR.

W GPCa-PUR zaobserwowano (Rys. 19), że ok. 20% jego powierzchni zajmowane jest przez GPCa, który nie przereagował w reakcji z grupami izocyjanianowymi obecnymi w prepolimerze uretanowym i został częściowo zamknięty w osnowie PUR w postaci napelnacza, co może być korzystnym zjawiskiem w procesie kalcyfikacji.



Rys. 19 Zdjęcia SEM a) GPCa, b) powierzchni PUR/HDI/PEG/PEBA oraz c) PUR/HDI/PEG/PEBA/GPCa

Badania powierzchni z użyciem SEM (Rys. 20) i EDX przed i po procesie kalcyfikacji wykazały, iż PUR/HDI/PEG/PEBA/GPCa miały znacznie większą (o 60%) zdolność do procesu kalcyfikacji, niż PUR niemodyfikowane. Wykazałam, że ilość jonów wapnia na powierzchni badanych materiałów wzrosła dwukrotnie w stosunku do PUR/HDI/PEG/PEBA. Udowodniłam, iż podczas procesu kalcyfikacji na powierzchni materiałów PUR/HDI/PEG/PEBA/GPCa tworzy się zmineralizowana warstwa zawierająca jony wapnia, które są niezbędne do poprawnej odbudowy tkanki kostnej a obecność niezwiązanego GPCa w osnowie PUR może stanowić bioaktywny stymulant, który poprawi procesy regeneracji tkanki kostnej.

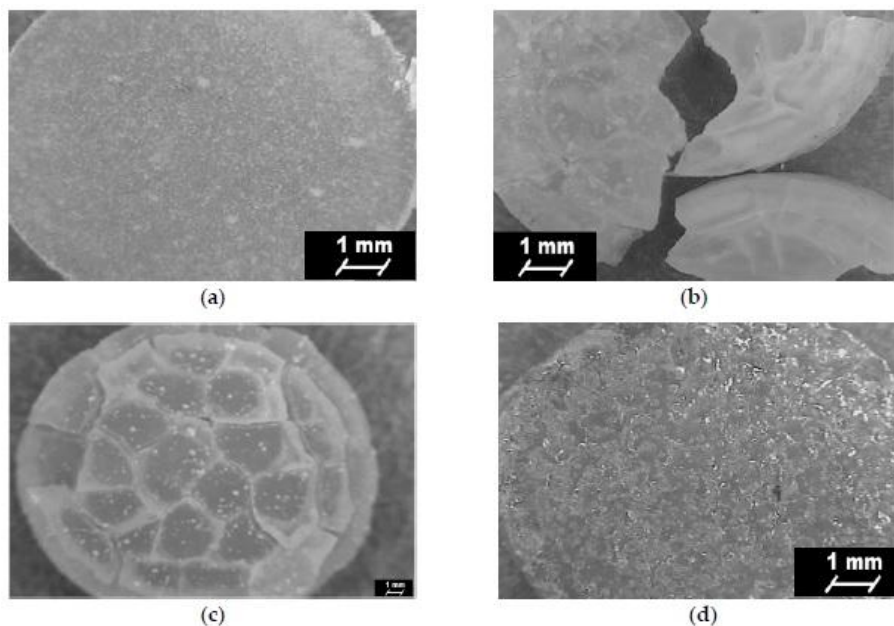


Rys. 20 Obrazy SEM PUR/HDI/PEG/PEBA (a) i PUR/HDI/PEG/PEBA/GPCa (b) przed badaniem kalcyfikacji oraz obrazy PUR/HDI/PEG/PEBA (c) i PUR/HDI/PEG/PEBA/GPCa (d) po badaniu kalcyfikacji

Modyfikacja GPCa nie tylko poprawiła proces kalcyfikacji, niezbędny w regeneracji kości, ale także zmniejszyła kąt zwilżania powierzchni otrzymanych PUR/HDI/PEG/PEBA/GPCa (57°) w porównaniu z PUR niemodyfikowanymi (72°). Co za tym idzie zwiększona została hydrofilowość powierzchni otrzymanych materiałów, co może mieć pozytywny wpływ na adhezję komórek do powierzchni tych materiałów. Zastosowanie GPCa do modyfikacji PUR przyczyniło się do zmiany całkowitej energii powierzchniowej otrzymanych materiałów (dla niemodyfikowanych PUR 59 mN/m a dla modyfikowanych GPCa-PUR 32 mN/m) i zgodnie z danymi literaturowymi tylko w przypadku GPCa-PUR modyfikowanych była właściwa do adhezji i wzrostu komórek.

Właściwości mechaniczne modyfikowanych PUR ($T_{sb} = 18 \text{ MPa}$, $E_b = 280 \pm 15\%$) były odpowiednie dla inżynierii tkanki kostnej (materiały stosowane w regeneracji kości muszą posiadać T_{sb} w zakresie $1,5\text{-}38 \text{ MPa}$ do regeneracji ludzkiej kości gąbczastej lub $35\text{-}283 \text{ MPa}$ do regeneracji ludzkiej kości korowej [72]). Badanie krótkoterminowego oddziaływania (15 dni) otrzymanych modyfikowanych PUR/HDI/PEG/PEBA/GPCa z wybranymi mediami: środowisko kwasowe (2N HCl), zasadowe (5M KOH) oraz oksydacyjne ($0,1\text{M CoCl}_2$ w $20\% \text{ H}_2\text{O}_2$) wykazało, iż PUR te są wrażliwe w szczególności na środowisko zasadowe (ubytek masy powyżej 50%) jak i środowisko kwasowe (ubytek masy ponad 30%). Z przeanalizowanych wyników badań krótkoterminowych oddziaływań otrzymanych PUR z wybranymi mediami można stwierdzić, że zachodzi pierwszy etap

degradacji materiału PUR. Potwierdzają to przeprowadzone przeze mnie badania mikroskopowe (Rys. 21) [H2].



Rys. 21 Wybrane zdjęcia wykonane z użyciem mikroskopu optycznego PUR/HDI/PEG/PEBA/GPCa przed badaniem oddziaływań (a) oraz po oddziaływaniu z wybranymi mediami: b) 2N HCl, c) 5M KOH oraz d) 0,1M CoCl₂ w 20% roztworze H₂O₂.

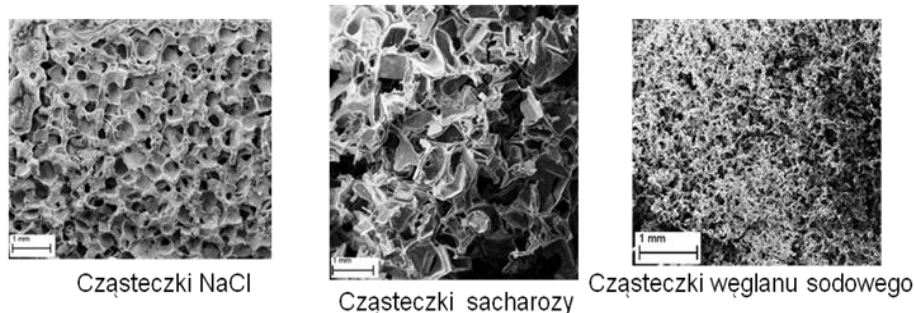
PUR/HDI/PEG/PEBA/GPCa w badaniach cytotoksyczności *in vitro* z użyciem linii komórek ludzkiej osteosarcomy kości MG-86 są materiałami o wysokiej cytokompatybilności po 72h testu MTT [H2].

Rusztowania tkankowe

Z nowo opracowanych przeze mnie poliuretanów o odpowiednich właściwościach fizyko-chemicznych, mechanicznych i biologicznych otrzymałam porowate materiały na rusztowania tkankowe. Porowatość i wielkość porów rusztowania tkankowego to jeden z kluczowych parametrów determinujących przydatność rusztowań do regeneracji odpowiednich tkanek. Innym stopniem porowatości i wielkością porów powinny charakteryzować się rusztowania do regeneracji tkanek miękkich np. naczyń krwionośnych, a innym do regeneracji tkanek twardych, jak kości. W związku z tym przeprowadziłam badania mające na celu określenie optymalnych warunków wytwarzania porowatych rusztowań tkankowych w wykorzystaniem nowych biokompatybilnych systemów PUR. W przypadku PUR/HDI/PEBA/AA, wytworzyłam rusztowania tkankowe dwiema technikami (separacji fazowej połączonej z ługowaniem cząstek soli - PS/PL oraz odlewu z rozpuszczalnika połączonego z ługowaniem cząstek soli - SC/PL) [H6]. Podczas

przetwarzania PUR w materiały porowate, zaobserwowałam, że na wartość porowatości wpływa stężenie roztworu PUR użytego do otrzymywania rusztowań jak i rodzaj użytego rozpuszczalnika (N,N'-dimetyloformamid -DMF oraz mieszania DMF z tetrahydrofuranem - THF) i porogenu (Rys. 22)

Obrazy SEM rusztowań tkankowych otrzymanych z użyciem różnych poroforów

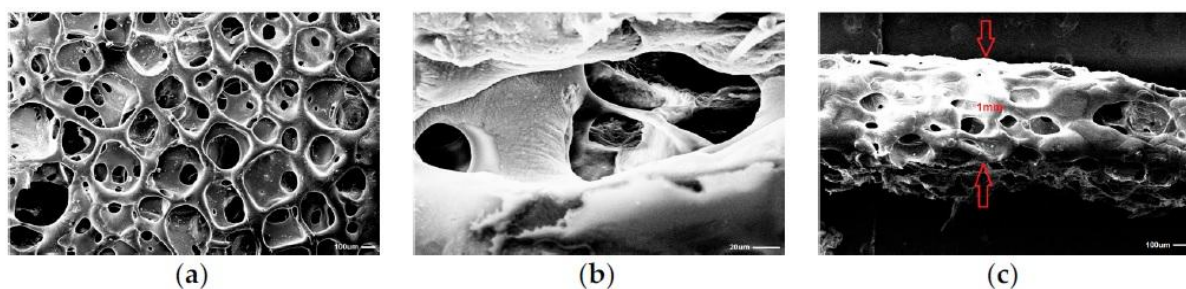


Rys. 22 Wpływ użytego porogenu na porowatość otrzymanych rusztowań tkankowych

Zaobserwowałam również, że wzrost stężenia roztworu PUR i równocześnie wzrost jego lepkości sprzyja tworzeniu się zamkniętych porów w otrzymywanych rusztowaniach. Porowatość rusztowań otrzymanych z systemu PUR/HDI/PEBA/AA techniką PS/PL, była wyższa (76-86%) niż w przypadku SC/PL (66-82%). Analiza mikroskopowa otrzymanych rusztowań wykazała, iż największym stopniem regularności porów charakteryzowały się rusztowania wytworzone techniką SC/PL z roztworu DMF i techniką PS/PL z mieszaniny roztworu DMF/THF. Porównałam także dla obu typów rusztowań sorpcję w standardowych mediach. Największym stopniem sorpcji charakteryzowały się rusztowania tkankowe otrzymane techniką PS/PL. Zatem modyfikowany PUR/HDI/PEBA/AA powinien być przetwarzany techniką PS/PL przy użyciu 15% roztworu PUR w mieszaninie rozpuszczalników DMF/THF, aby spełnić wymogi stawiane materiałom do zastosowania w inżynierii tkanki kostnej [H6].

Osobnym zagadnieniem w inżynierii tkankowej jest otrzymywanie rusztowań tkankowych o grubości poniżej <1 mm. Wynika to z faktu, że przy większych grubościach rusztowania komórki obumierają w głębszych jego warstwach, co spowodowane jest niewystarczającą możliwością przenikania w głąb rusztowania substancji odżywczych umożliwiających wzrost i proliferację komórek, a z drugiej strony, utrudnione jest usuwanie metabolitów. W dotychczasowych doniesieniach literaturowych autorzy prac proponują cięcie materiałów porowatych w różnych warunkach (temperatura pokojowa z użyciem skalpela, mrożenie w ciekłym azocie i krojenie mechaniczne), co może niekorzystnie wpływać na

morfologię rusztowań i zaburzać ich strukturę komórkową. W związku z tym zaproponowałam zupełnie nowe, dotychczas nieopisane dla PUR otrzymanie mikroporowatych poliuretanowych cienkich warstw (MPTL) o grubości do 1 mm z zastosowaniem zmodyfikowanej techniki odlewu z rozpuszczalnika i ługowania cząstek soli (SC/PL) połączonej z termicznie indukowaną separacją fazową (TIPS) [H5]. Taka modyfikacja techniki pozwoliła na otrzymanie rusztowań tkankowych o wysokiej porowatości (82%), wielkości porów od 65 do 426 μm (Rys. 23) i średniej wielkości porów $154 \pm 3 \mu\text{m}$. Wyznaczone parametry porów są jak najbardziej właściwe do regeneracji tkanek miękkich. Kąt zwilżania MPTL wynosił $56^\circ \pm 6^\circ$, a właściwości mechaniczne MPTL osiągnęły odpowiednie wartości dla rusztowań tkanek miękkich ($T_{Sb} = 0,32 \pm 0,01 \text{ MPa}$, $E_b = 78 \pm 6\%$ i $E = 0,254 \pm 0,15 \text{ MPa}$). Na przykład aorta posiada T_{Sb} w zakresie 0,3-0,8 MPa, E_b od 50% do 100%, a moduł Younga w zakresie 0,3-1 MPa [73,74]. Ponadto moduł Younga tkanek miękkich zwykle nie przekracza 1 MPa [75].



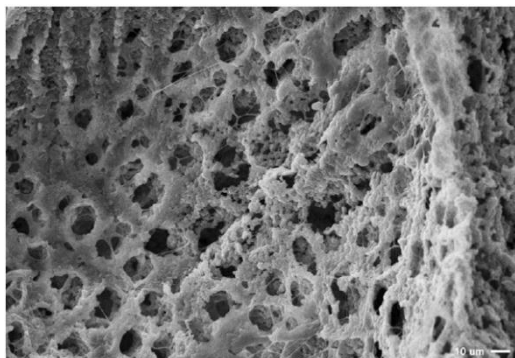
Rys. 23 Obrazy SEM rusztowań MPTL: (a) powierzchnia (powiększenie $\times 100$), (b) wewnątrz rusztowania (powiększenie $\times 10\,000$), (c) grubość rusztowania (powiększenie $\times 100$)

Test MTT wykazał, że większość komórek fibroblastów NIH 3T3 ulega proliferacji podczas kontaktu z MPTL, a morfologia tych komórek badana przy użyciu odwróconego mikroskopu w jasnym polu nie wykazała znaczących różnic w porównaniu z kontrolą po 72 godzinach ekspozycji.

Analiza za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej po barwieniu Hoechst 33342 wykazała, że większość komórek (ponad 85%) pozostawała żywotna (negatywna ocena w aneksie V-FITC, PI) niezależnie od stężenia ekstraktów MTPL lub czasu ekspozycji. Obserwacje mikroskopowe wyraźnie wskazały, że 100% skoncentrowany ekstrakt MTPL nie jest toksyczny wobec fibroblastów NIH 3T3 [H5].

Otrzymałam także rusztowania tkankowe (PPS) techniką SC/PL/TIPS z systemu PUR/HMDI/PEBA bez katalizatora [H7], otrzymanego z użyciem promieniowania

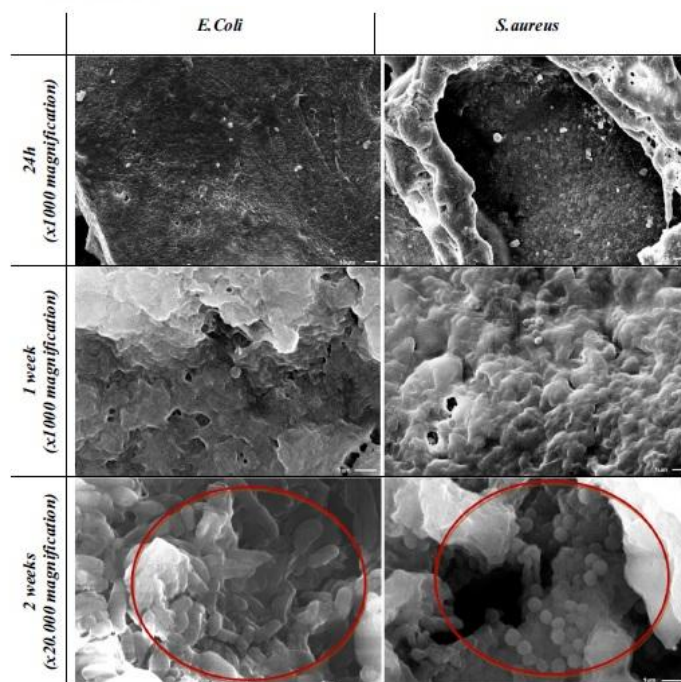
mikrofalowego. Porowatość PPS wynosiła 87%, a wielkość porów zawierała się w zakresie 98-492 μm . (Rys. 24).



Rys. 24 Obraz SEM otrzymanych PPS z użyciem kombinacji technik SC/PL oraz TIPS

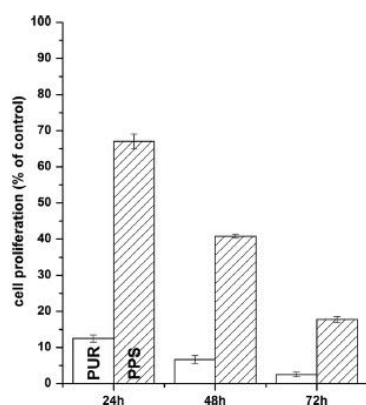
Badania interakcji PPS ze standardowymi mediami wykazały, że materiały te są stabilne do 3 miesięcy inkubacji.

PPS otrzymane z PUR/HMDI/PEBA były hydrofilowe a ich kat zwilżania wynosił 54° . Właściwości mechaniczne otrzymanych PPS ($T_{\text{sb}} \sim 1 \text{ MPa}$ i $E_b \sim 95\%$), są porównywalne do wartości właściwości mechanicznych natywnych tkanek ludzkich układu sercowo-naczyniowego np. aorty ($T_{\text{sb}} \sim 0,3-0,8 \text{ MPa}$ i $E_b \sim 50-100\%$), co wskazuje, iż otrzymane PPS z PUR/HMDI/PEBA pod kątem właściwości mechanicznych są odpowiednie do celów regeneracji tkanek miękkich np. naczyń krwionośnych. Badania mikrobiologiczne wykazały, że otrzymane PPS są wrażliwe na działanie mikroorganizmów takich jak *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *E. coli*. W przeprowadzonym teście dyfuzji krążka nie zaobserwowano strefy zahamowania wzrostu mikroorganizmów, natomiast przeprowadzone badania SEM wykazały, że wybrane szczepy bakteryjne zagnieżdżają się na powierzchni otrzymanych rusztowań i kolonizują porowate rusztowanie (Rys. 25).



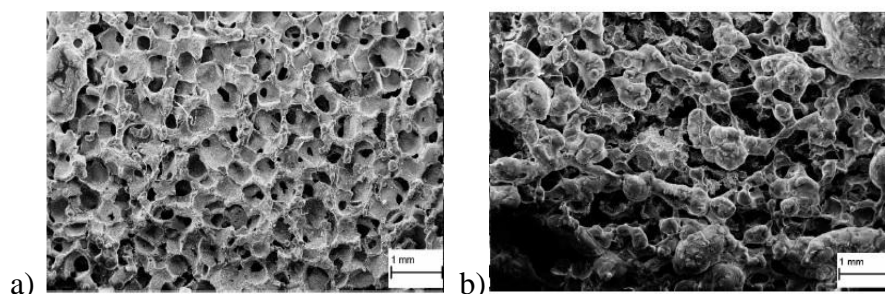
Rys. 25 Adhezja wybranych szczepów bakteryjnych (*E. coli* oraz *S.aureus*) do powierzchni PPS po 24h, 1 tygodniu i 2 tygodniach hodowli.

Przeprowadzone testy cytotoksyczności (test MTT) otrzymanych PPS z użyciem linii komórkowej mysich fibroblastów NIH-3T3 wykazały dobrą biokompatybilność otrzymanych materiałów po 24h inkubacji, które zmniejszyła się do 20% przeżywalności komórek (w porównaniu do kontroli) po 72h inkubacji (Rys. 26). Morfologia komórek po 24h i 48h pozostaje nieznacznie zmieniona i porównywalna do kontroli, natomiast po 72h testu morfologia zostaje zaburzona, a komórki odklejają się od dołka hodowlanego i wykluczają je, z dalszych badań w kierunku wykorzystania ich, jako materiałów biomedycznych [H7].



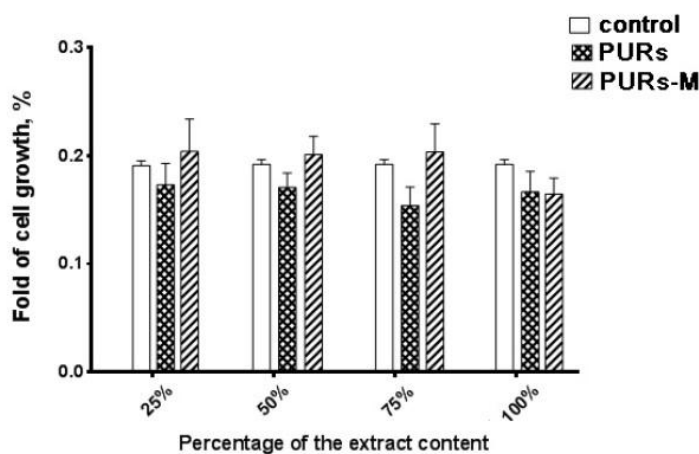
Rys. 26 Wpływ wyjściowego PUR oraz otrzymanych PPS na wzrost komórek NIH-3T3 w warunkach *in vitro* badany z zastosowaniem testu MTT

Techniką SC/PL/TIPS otrzymałam także PPS, z systemu PUR/HDI/PEG/PEBA/GPCa, które miały wielkości porów w zakresie 50-100 μm i porowatość około 82% (Rys. 27), a na ich powierzchni widoczne były cząstki GPCa, które mogą wspomóc dodatkowo odbudowę tkanki kostnej [H2].



Rys. 27 Morfologia niemodyfikowanych a) i modyfikowanych b) GPCa-rusztowań tkankowych otrzymanych techniką SC/PL w kombinacji z TIPS

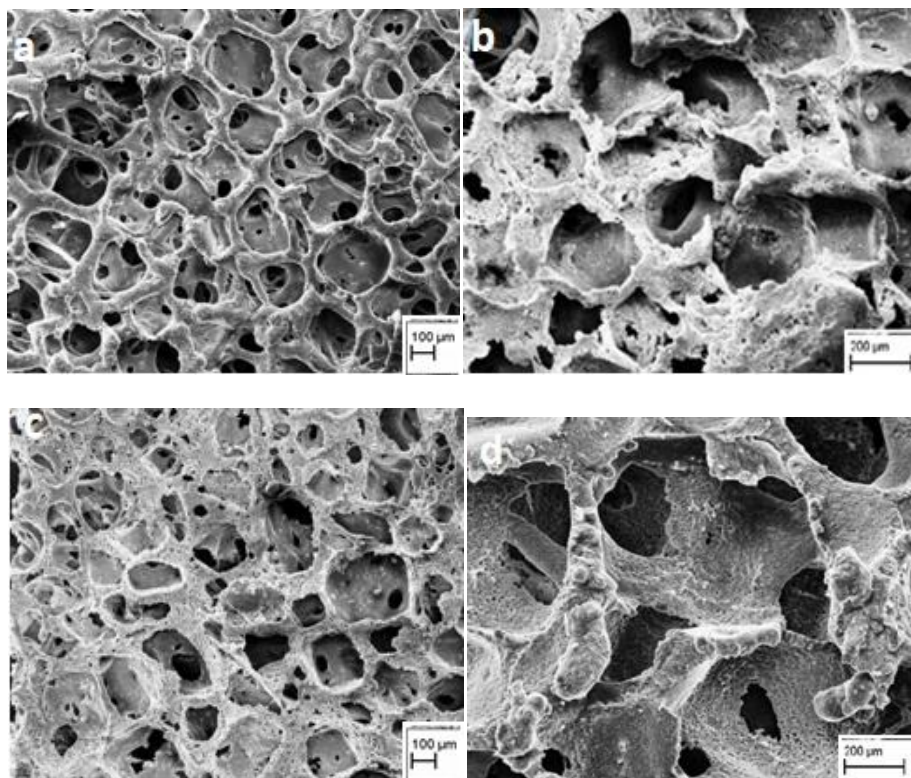
Przeprowadzone testy MTT wykazały że w/w rusztowania mają wyższą biokompatybilność oraz pozytywnie wpływają na proliferację komórek mysich mioblastów C2C12w stosunku do PUR niemodyfikowanych za pomocą GPCa (Rys. 28) .



Rys. 28 Test MTT niemodyfikowanych (PUR/HDI/PEG/PEBA) i modyfikowanych GPCa (PUR/HDI/PEG/PEBA/GPCa) -rusztowań tkankowych.

W pracy [H13] wykazałam, że możliwe jest otrzymanie PPS inną metodą, niż wyżej opisaną, a mianowicie z użyciem PEBA i oleju rycynowego, HDI, 1,4-butanodiolu oraz żelatyny zastosowanej jako porofor, bądź mieszaniny żelatyny i wody. Badania SEM morfologii otrzymanych rusztowań tkankowych wykazały, że ich porowatość wynosiła 82%, a wielkość porów zawierała się w zakresie 56-450 μm . Po 3 miesiącach degradacji porowatość i wielkości porów nie zmieniły się, jednak pory stały się mniej regularne w swej

budowie o postrzępionych krawędziach, co mogłoby wskazywać na zachodzące procesy defragmentacji otrzymanych rusztowań (Rys. 29)

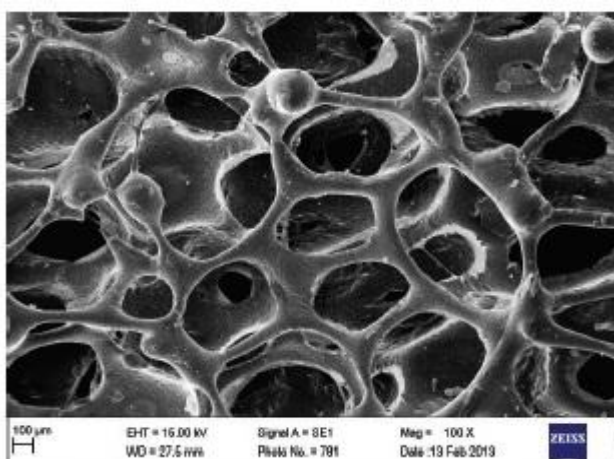


Rys. 29. Obrazy SEM rusztowań tkankowych a) przed degradacją i b) po degradacji

Ubytek masy w środowisku wodnym po 3 miesiącach degradacji w temperaturze 37°C w zależności od ilości białka zwierzęcego wynosił od 9 do 13,4% [H13]. Wykazałam, że zmieniając ilość białka zwierzęcego, które jest modyfikatorem gęstości pianek i równocześnie poroforem, zmieniam też czas degradacji materiału, co jest korzystne przy szerokim spektrum zastosowań w inżynierii tkankowej. Zmieniając ilość białka zwierzęcego w systemie opracowałam sposób otrzymywania pianek poliuretanowych elastycznych, sztywnych półsztywnych i lepko-sprężystych, a zastosowanie żelatyny, jako alternatywnego poroforu pozwoliło całkowicie wyeliminować stosowanie obecnie do tych celów niskowrzących rozpuszczalników szkodliwych dla środowiska i komórek ludzkich. Wyniki tych prac zostały zgłoszone do Urzędu Patentowego Rzeczypospolitej Polskiej i w 2011 roku został objęte ochroną patentową [H13].

W pracy [H10] wykorzystałam również białko zwierzęce jako porofor systemów PUR otrzymanych z PEBA, HDI, BDO lub PEBA, HDI, 1-etoksy-2-(2-hydroksyetoksy)etanolu (EHEE) oraz DBTDL jako katalizatora. PUR otrzymałam przy czterech stosunkach molowych grup NCO: OH (0,8: 1-1,1: 1). Wartości właściwości mechanicznych otrzymanych PPS były porównywalne, niezależnie od rodzaju przedłużacza łańcucha i zawartości żelatyny.

Natomiast decydującym parametrem kwalifikującym próbki PPS do dalszych badań była morfologia (wielkość i kształt porów). W przeprowadzonych badaniach wykazałam, że morfologia rusztowań tkankowych zależy od rodzaju przedłużacza łańcucha (PPS przedłużane BDO wykazują większą regularność porów niż ich analogi przedłużane EHEE), oraz od ilości dodanej żelatyny (optymalna ilość białka zwierzęcego to 20% mas. gdyż wówczas próbka ma quasi regularne pory). Żelatyna działa jak spoiwo, które utrzymuje strukturę PPS. Wynikać to może z obecności grup funkcyjnych w strukturze żelatyny (NH_2 , COOH , OH), które mogą częściowo reagować z grupami NCO i wzmacniać tym samym strukturę PPS. Dodatek większych ilości żelatyny (30% mas.) spowodował, iż częściowo zakleja ona pory otrzymanych PPS co może utrudniać nie tylko proliferację komórek ale i transport substancji odżywczych i metabolitów komórkowych. Optymalną morfologią charakteryzowały się PPS otrzymane z użyciem BDO jako przedłużacza łańcucha i w stosunku $[\text{NCO}:\text{OH}=1:1]$ (Rys. 30).



(1A)

Rys. 30 Morfologia PPS otrzymanych z użyciem BDO w stosunku $[\text{NCO}:\text{OH}=1:1]$

PPS modyfikowane żelatyną, w których jako przedłużacza łańcucha użyto BDO, miały ponad dwukrotnie zwiększoną sorpcję oleju roślinnego, wody destylowanej i soli fizjologicznej, niż ich analogi otrzymane z użyciem EHEE. Również szybkość degradacji badanych materiałów zależy od rodzaju przedłużacza użytego do syntezy i ilości białka zwierzęcego. Podczas degradacji zaobserwowałam, iż żelatyna, która została częściowo zamknięta w osnowie PPS pęcznieje, co powoduje otwieranie porów zamkniętych PPS i wpływa korzystnie na postęp degradacji. W wyniku przeprowadzonych wyżej badań system PUR/HDI/PEBA/BDO-20% żelatyny- stosunek $[\text{NCO}:\text{OH}=1:1]$, wytypowałam jako korzystny na rusztowania tkankowe [H10].

Następujące systemy PUR zostały wytypowane do badań *in vivo*, które obecnie są w trakcie przeprowadzania:

PUR/HDI/PEBA/AA

PUR/HDI/PEG/PEBA/GPCa

PUR/HDI/PEBA/O/BDO/-żelatyna-stosunek [NCO/OH=1:1]

Podsumowanie

Moje osiągnięcia naukowe przedstawione wyżej na temat „**Syntezy, charakterystyki i modyfikacji alifatycznych poliuretanów przeznaczonych do wytwarzania rusztowań tkankowych**” zawierają elementy nowości zarówno od strony projektowania struktury nowych systemów poliuretanowych, sposobu przeprowadzenia syntez jak i technologii otrzymywania z tych materiałów rusztowań tkankowych wraz z ich testowaniem *in vitro*. Badania fizyko-chemiczne, biologiczne i mechaniczne przyczyniły się do poznania zależności między strukturą chemiczną, morfologią i innymi parametrami fizyko-mechanicznymi, a przydatnością nowych systemów PUR w inżynierii tkankowej, zarówno do regeneracji tkanek miękkich jak i kości.

Do najważniejszych osiągnięć mojej pracy można zaliczyć:

1. Zaprojektowanie struktury, zoptymalizowanie parametrów syntezy oraz scharakteryzowanie nowych alifatycznych PUR do zastosowań biomedycznych [H1- H13].
2. Poznanie wpływu kolagenu, chitozanu, poli(alkoholu winylowego) i kwasu L-askorbinowego na właściwości fizyko-chemiczne, mechaniczne i biologiczne nowych typów PUR, w których segment giętki jest semikrystaliczny, przeznaczonych do inżynierii tkankowej do hodowli tkanek kostnych [H1,H11,H12].
3. Poznanie wpływu poli(alkoholu winylowego) i kwasu L-askorbinowego na właściwości fizyko-chemiczne, mechaniczne i biologiczne nowych typów PUR, w których segment giętki jest amorficzny, przeznaczonych do inżynierii tkankowej do hodowli tkanek kostnych i miękkich. Stwierdzono przynajmniej jednostronne wbudowanie kwasu L-askorbinowego w łańcuch PUR [H4,H9,H13].
4. Scharakteryzowanie wpływu białka zwierzęcego, użytego jako porofora PUR, na szybkość degradacji PUR o potencjalnym zastosowaniu w regeneracji chrząstki [H10,H13].

5. Wykazanie możliwości otrzymywania metodą dwustopniową w masie niekatalizowanych systemów PUR dla inżynierii tkankowej o wyższej biogodności w testach MTT, niż ich analogi katalizowane [H12].
6. Otrzymanie alifatycznych prepolimerów uretanowych metodą bezrozpuszczalnikową, do syntezy, których po raz pierwszy zastosowano promieniowanie mikrofalowe, umożliwiające przeprowadzenie reakcji prepolimeryzacji w niższej temperaturze, krótszym czasie i bez użycia katalizatora, w porównaniu z dotychczas prowadzonymi reakcjami z zastosowanym konwencjonalnym systemem grzejnym- łaźnią olejową [H3].
7. Wykazanie korzystnego wpływu GPCa, na proces kalcyfikacji nowych systemów PUR przeznaczonych na rusztowania tkanek kostnych. GPCa częściowo wbudowuje się w łańcuch PUR, a częściowo pełni rolę napełniacza [H2].
8. Poznanie wpływu rodzaju modyfikatorów (PVA, AA, żelatyna, chitozan, kolagen, GPCa) na cytotoksyczność nowych systemów PUR w testach MTT i XTT [H1- H13].
9. Poznanie wpływu rodzaju diizocyjanianu użytego do syntezy PUR na cytotoksyczność nowych systemów PUR w testach MTT i XTT. PUR otrzymane z użyciem HDI nie wykazuje toksycznego wpływu na komórki mysich fibroblastów NIH-3T3, w odróżnieniu od PUR otrzymanych z użyciem HMDI [H8].
10. Opracowanie nowej technologii wytwarzania cienkich warstw poliuretanowych metodą SC/PL/TIPS, umożliwiających proliferację komórek na całej głębokości rusztowania, oraz charakteryzujących się wysoką biokompatybilnością [H5].

I. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

W grudniu 2007 roku obroniłam pracę doktorską dotyczącą syntezy nienasyconych poli(estro-eterouretanów) z nienasyconych oligo(alkilenoestro-etero)dioli i 4,4'-diizocyjanianu difenylometanu, sieciowanych styrenem, akrylanem butylu lub 2,4,6-triallyloksy-1,3,5-triazyną, której promotorami byli prof. dr hab. inż. Adolf Balas oraz prof. dr hab. inż. Helena Janik, a w kwietniu 2008 roku rozpoczęłam pracę jako asystent w Katedrze Technologii Polimerów. Praca w doświadczonym zespole zajmującym się syntezą i charakterystyką poliuretanów uzmysłowiła mi jak wiele możliwości otwiera dobrze przemyślane, innowacyjne podejście do tych materiałów.

Swoje badania rozpoczęłam od opracowania aplikacyjności materiałów, które otrzymałam w ramach pracy doktorskiej, wykorzystałam je jako składnik powłoki antyporostowej, która

może być stosowana na powłoki stacji badawczych czy łodzi, interesującym pozostawał fakt czy czynniki antyporostowe (tlenek miedzi (I) i pirytonian cynku) wschodzące w skład powłok będą oddziaływały na wzrost populacji okrzemki *Phaeodactylum tricornutum* i sinicy *Nodularia spumigena* zawartych we wzbogaconej wodzie morskiej. Badania te przeprowadziłam w ramach grantu NCN N N305 0659 37, którego byłam kierownikiem, przy współpracy z Instytutem Oceanologii PAN w Sopocie oraz Centrum Techniki Okrętowej w Gdańsku. Badania te były interdyscyplinarne obejmujące nauki chemiczne, biologiczne i techniczne.

Byłam również wykonawcą Projektu Eureka E!3614 (akronim CORET), SPUB 016805 (2005 – 2008) w ramach którego zostały opracowane elastyczne powłoki ochronne w zbiornikach tankowców, jako alternatywna metoda dostosowywania zbiornikowców do wymagań ochrony środowiska. Możliwości aplikacyjne wytwarzanych materiałów zaczęły stanowić w tamtym czasie mój główny punkt zainteresowań, dlatego też podjęłam się współpracy w projekcie badawczym MNiSzW R 05015 01. realizowany w Katedrze Technologii Polimerów, Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej dotyczącego opracowania nowych materiałów poliuretanowo-gumowych z elastomerów uretanowych i recyklatów gumowych przydatnych do praktycznych zastosowań, uzyskane wyniki badań zostały przedstawione Firmie Lotos Asphalt s.a. i w 2012 r w ramach projektu badawczego Nr 110/ASF-PR/2012, którego kierownikiem był dr inż. M. Sienkiewicz, a który dotyczył modyfikacji asfaltu drogowego za pomocą kompozytów poliuretanowo-gumowych, uzyskanych z elastomerów uretanowych i recyklatów gumowych lub regeneratów gumowych, kontynuowałam swoje badania.

Prowadziłam również badania dla Firmy Lotos SA w ramach pracy magisterskiej, której byłam promotorem dotyczące zastosowania odpadowych hydroksywosków jako plastyfikatorów mieszanek gumowych. Badania wykonane w ramach tej pracy zostały docenione przez Kapitułę Konkursu na Najlepszą Pracę Dyplomową zorganizowanego przez grupę Lotos SA.

Po odbyciu szkolenia w ramach projektu „Pomorski Świat Innowacji”- w 2013 roku odbyłam 6-cio miesięczny staż dla pracowników naukowych w przedsiębiorstwach realizowany w Firmie R. Fijało-Poland Romuald Fijało, gdzie zastosowałam polimery jako środki smarne do ekologicznych olejów używanych do maszyn przepływowych, doświadczenie zdobyte podczas stażu, utwierdziło mnie w przekonaniu, iż należy dążyć do otrzymywania materiałów

o potencjale wdrożeniowym w przemyśle, gdyż połączenie nauki z przemysłem pozwala dopiero tak naprawdę na wykazanie przydatności prowadzonych prac badawczych.

Dlatego też w latach 2013-2014 podjęłam współpracę z Pomorską Fabryką Mebli w ramach której opracowałam system elastomerów uretanowych zastosowany jako okładziny kół stosowanych w przemyśle meblarskim.

Ponadto rozpoczęłam pracę nad nowymi kompozytami poliuretanowo-gumowymi, które były powiązane z tematem mojej pracy doktorskiej i prowadzone w ramach umowy badawczo wdrożeniowej, której kierownikiem był dr inż. Sienkiewicz. Wyniki przeprowadzonych prac dowiodły, iż nasz zespół jako pierwszy opracował wynalazek w postaci kompozytów poliuretanowo-gumowych sieciowanych związkami nienasyconymi, na który został w roku 2014 przyznany patent, a firmie Gumeko Sp. z o.o. w 2015 udzielono licencji wyłącznej na korzystanie z praw do tego wynalazku, na mocy której opracowane kompozyty zostały wdrożone do produkcji przez Firmę Gumeko Sp. z o.o.

Uczestniczyłam w licznych badaniach, dotyczących np. opracowania nowego uszczelnacza butylowego, których to wyniki okazały się nowością i doprowadziły do otrzymania patentu (PL212561-B1).

Zamiłowanie do ochrony środowiska i moje zainteresowania dotyczące ekologii zaowocowały współpracą nad degradowanymi kompozycjami, które mogą mieć zastosowanie w opakowalnictwie i przemyśle spożywczo-kosmetycznym. Prace realizowałam w ramach projektu badawczego MNiSzW 2306/B/P01/2008/35, opracowane materiały zostały wielokrotnie nagrodzone, za innowacyjność m.in. Złotym Medalem w konkursie Innowacje 2015 na Targach Techniki Przemysłowej, Nauki i Innowacji (Międzynarodowe Targi Gdańskie) oraz Złotym medalem na Międzynarodowych Targach Wynalazczości Concours Lepine w Paryżu w 2015. Wyniki tych prac zostały zgłoszone w konwencji międzynarodowej PCT i w 2016 roku zostały objęte ochroną patentową (EP3064542-B1). W tematyce ekologii środowiska ponadto prowadziłam badania opracowania metody badawczej identyfikacji pyłów atmosferycznych pobranych w województwie pomorskim przy użyciu mikroskopii elektronowej ramach projektu badawczego MNiSzW 3663/B/P01/2010/39.

Mimo rozległych zainteresowań dotyczących poliuretanów, kompozytów poliuretanowych i mieszanin poliuretanowych cały czas pracowałam nad znalezieniem swojej drogi naukowej, w której mogłabym połączyć zarówno syntezę, charakterystyką jak i aplikacyjność materiałów, w tym czasie dokonałam obszernego przeglądu literaturowego, który zaowocował napisaniem sześciu publikacji z zakresu poliuretanów biomedycznych, ich

sposobu modyfikacji, jak i wytwarzania z nich rusztowań tkankowych różnymi technikami. Te prace doprowadziły mnie do wniosku, iż mimo tak licznych doniesień literaturowych nadal istnieje potrzeba wytworzenia nowej grupy materiałów o konkretnych cechach i właściwościach, które można stosować w dziedzinie inżynierii regeneracyjnej. Zainspirowałam w Katedrze Technologii Polimerów badania dotyczące degradowanych rusztowań poliuretanowych mających potencjalne zastosowanie w regeneracji tkanki miękkiej i kości.

Wymieniając kierunki badań jakimi się zajmuję oraz zapoczątkowane w ostatnim czasie prace realizowane we współpracy z innymi jednostkami naukowo-badawczymi nie można pominąć moich działań rozpoczętych nad polimerowymi powłokami podatnymi na degradację, jako systemy uwalniania substancji aktywnych stosowanych na igły biopsyjne używane przy zabiegach oceny nowotworowej gruczołu krokowego, nowością tej powłoki jest uwalnianie przy każdym wkłuciu porcji antybiotyków, które mają zapobiec stanom zapalnym występującym często po zabiegu, obecne badania są w fazie badań przedklinicznych prowadzonych przez Firmę DEBN i uzyskały finansowanie NCBiR .

II. Dalsze plany badawcze

Moje dalsze prace badawcze dotyczą sposobu wytwarzania rusztowań tkankowych metodą elektrospiningu i ich oceny *in vivo* w ramach współpracy z prof. Nandakumar Kalarikkal z Mahatma Gandhi University Kottayam, Indie. Ponadto rozpoczęłam już współpracę z dr Catalin Daniel z Chargé de recherche, Laboratoire SPCTS / UMR CNRS 7315; Centre Européen de la Céramique, Francja odnośnie nanoszenia warstw hydroksyapatytu i glicerofosforanu wapnia na powierzchnię poliuretanowych rusztowań tkankowych techniką MAPLE (matrix-assisted pulsed laser evaporation). W ramach współpracy z Firmą Viva Dental pracuję nad materiałami stymulującymi regenerację kości szczękowej. Ponadto planuję nadal kontynuować współpracę z dr Oleksander Korchynskyi z Department of Regulation of Cell Proliferation and Apoptosis, Institute of Cell Biology of the National Academy of Sciences of Ukraine (NASU), Lviv, w zakresie badań *in vivo* nowych poliestroeterouretanowych rusztowań tkankowych mogących mieć zastosowanie jako matryce do systemów mających zastosowanie w chorobie reumatoidalnego zapalenia stawów. W ramach projektu „Nowe filamenty elastyczne i ekopodporowe do druku 3D”, wspieranego przez Centrum Transferu Wiedzy i Technologii (Inkubator Innowacyjności+), przyznanego i

finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego opracowuje nowe materiały degradowane oraz funkcjonalne do druku 3D, w tym rusztowań tkankowych.

Maciejko Lipka

Bibliografia:

- ¹ K. Gorna, S. Gogolewski, *J Biomed Mater Res* 79A (2006) 128-138.
- ² S. Gogolewski, K. Gorna, E. Zaczynska, A. Czarny, *J Biomed Mater Res A* 85 (2008) 456-465.
- ³ J.Y. Zhang, B.A. Doll, E.J. Beckman, J.O. Hollinger, *J Biomed Mater Res* 67A (2003) 389-400.
- ⁴ S.M. Cetina-Diaz, L.H. Chan-Chan, R.F. Vargas-Coronado, J.M. Cervantes-Uc, P. Quintana-Owen et al., *J Mater Chem B* 2 (2014) 1966-1975.
- ⁵ B. Li, T. Yoshii, A. E. Hafeman, J.S. Nyman, J.C. Wenke, S.A. Guelcher, *Biomater* 30 (2009) 6768-6779.
- ⁶ J. Kim, J.O. Hollinger, *Biomed Mater* 7, (2012), 4
- ⁷ Barikani M., Honarkar H., Barikani M.: 141 (2010) 653-659
- ⁸ El-Sayed A.A., Gabry L.K., Allam O.G. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 21 (2010) 507-514
- ⁹ J.M. Goddard, J.H. Hotchkiss, *Prog Polym Sci* 32 (2007) 698-725.
- ¹⁰ L. Yan-Hui, H. Yu-Dong, *Surf Coat Technol* 201 (2007) 5124-5127.
- ¹¹ M., Marzec J.Kucinska-Lipka, I., Gubanska I., Kalaszczynska H., Janik *Materials Science and Engineering C-Materials For Biological Applications* (2017) : 80, 736-747,
- ¹² J. Brzeska, Dacko.P., H. Janeczek, H. Janik, W. Sikorska, M. Rutkowska i M. Kowalczyk, *Polimery*.(2014);LIX(5):363-448.
- ¹³ G. BaoLin i P. MA., *Sci China Chem*.(2014);57(4):490-500.
- ¹⁴ M. El Fray, A. Pilaszkiwicz, W. Swieszkowski, K. J. Kurzydowski, *European Polymer Journal* 43 (2007) 2035-2040
- ¹⁵ Janik H., Marzec M. *Przemysł Chemiczny* 94 (2015) 182-185.
- ¹⁶ T.E.L. Douglas, A.Piegat, H. A. Declercq, D. Schaubroeck *Materials Letters* 137 (2014) 62-67
- ¹⁷ Hutmacher DW (2008) Scaffold-based bone engineering by using rapid prototyping technologies in Virtual and Rapid manufacturing. In: Bartolo JB (ed) *Advanced research in virtual and rapid prototyping*. Taylor & Francis Group, New York, p 65
- ¹⁸ J.C. Middleton, AJ. Tipton *Biomaterials*(2000), 21(23):2335-2346
- ¹⁹ S. Bose, M. Roy, A. Bandyopadhyay *Trend Biotechnol* (2012).30(10):546-554
- ²⁰ X. Liu, W. Chen, CT. Gustafson, AL. Miller, BE. Waletzki. *RSC Adv* (2015) 5:100824
- ²¹ P. C. Caracciolo, V.Thomas, Y. K. Vohra, F. Buffa, G.A. Abraham *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 20 (2009) 2129-2137
- ²² B. Bogdanov, V.Toncheva, E.Schacht, *Macromolecular Symposia* 152 (2000) 117-126
- ²³ S.Gogolewski *Colloid and Polymer Science* 267 (1989) 757-785
- ²⁴ S.A.Guelcher, K.M Gallagher., J.E Didier., D.B Klinedinst., J.S Doctor, et al. *Acta Biomater.* 2005: 1(4); 471-484.
- ²⁵ P.Petrini, M.C. Tanzi, C.R.Moran, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 10 (1999) 635-639
- ²⁶ P.Petrini, S.Fare, A.Piva, M.C.Tanzi *Journal of Materials Science: Materials In Medicine* 14 (2003)683-686
- ²⁷ M.Bil, J.Ryszowska, K.J.L Kurzydowski. *Journal of Materials Science* 44 (2009) 1469- 1476
- ²⁸ P. C., Caracciolo, V.Thomas, Y. K. Vohra F.Buffa, G.A Abraham. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 20 (2009) 2129-2137
- ²⁹ B.R.Barrioni, S.M., Carvalho, at all. *Materials Science and Engineering: C*. 2015: 52; 22-30.
- ³⁰ S.J.S. Flora, , *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2 (4) (2009)191-206.
- ³¹ J. Szymańska-Pasternak, A. Janicka, J. Bober, , *Onkol. Prak. Klin* 7 (1) (2011) 9-23.
- ³² U.R. Heinrich, I. Fisher, J. Brieger, A. Rumelin, I. Schmidtmann, H. Li, W.J. Mann, K.Helling, *Laryngoscope* 118 (5) (2008) 837-842.
- ³³ V.L. Jakovljevic, D.Z. Djordjevic, D.M. Djuric, *Gen. Physiol. Biophys.* 30 (3) (2011) 293-300.
- ³⁴ J.Glowacki, S.Mizuno, *Biopolymers* 89(5) (2007):. 338-344
- ³⁵ B.Li, F.Chen, X.Wang, B.Ji, Y.Wu., *Food Chem.* 102: 1135-1143 (2007).
- ³⁶ DK Han, KD Park, GH Ryu, UY Kim, BG Min, YH Kim *J Biomed Mater Res* (1996). 30:23-30
- ³⁷ T. E. L. Douglas et al., *Mater. Lett.*, vol. 137, pp. 62-67, 2014;
- ³⁸ V. Gassling et al., *Biomed. Mater.*, vol. 8, no. 5, p. 55001, 2013;
- ³⁹ K. Gorna, S. Gogolewski *Journal of Biomedical Materials Research Part A* Volume67A,(2003) Issue3 813-827
- ⁴⁰ K. Gorna, S. Gogolewski.: *Polymer Degradation and Stability* 75 (2002) 113-122
- ⁴¹ K. Gorna, S. Gogolewski *Polymer Degradation and Stability* 79 (2003) 465-474
- ⁴² S.Grad, L. Kupcsik, K.Gorna, S.Gogolewski, M.Alini; *Biomaterials* 24 (2003) 5163-5171
- ⁴³ K. Gorna, S. Gogolewski *Polymer Degradation and Stability* 79 (2003) 475-485
- ⁴⁴ K.Walinska, A.Iwan, K.Gorna, S.Gogolewski *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 19 (2008) 129-135
- ⁴⁵ P. C.Caracciolo, V.Thomas, Y. K.Vohra, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 20 (2009) 2129-2137
- ⁴⁶ *Farmakopea Europejska (European Pharmacopoeia 6th Edition); European Directorate for the Quality of Medicines; 2007*
- ⁴⁷ W.N.Sivak, F.Pollack Ian, S.Petoud, W.C.Zamboni, J.Zhang, E.J. Beckman *Acta Biomaterialia* 4 (2008) 1263-1274
- ⁴⁸ Janik H.: *Macromol. Sci. Phys.* 1999, B38, 981.
- ⁴⁹ D. Eyrich, H. Wiese, *Tissue Engineering* Vol. 13, No. 9 (2007)
- ⁵⁰ J.A.Werkmeister^aR.Adhikari^{ab}J.F.White^aT.A.Tebb^aT.P.T.Le^a *Acta Biomaterialia* 6, (9), (2010), 3471-3481
- ⁵¹ J. Raghunath J. Rollo K. M. Sales P. E. Butler, *Biotechnology and Applied Biochemistry* 46,(2), (2007), 73-84,
- ⁵² H. Fan Y. Hu L. Qin X. Li H. Wu R. Lv, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*77A, (4), 15 (2006), 785-794
- ⁵³ T. Chandy, B. Kumar, C. Sharma, *J.Appl. Biomater.* 5 (3) (1994) 245-254.
- ⁵⁴ B.R.Barrioni, S.M., Carvalho, at all. *Materials Science and Engineering: C*. 2015: 52; 22-30.

- ⁵⁵ S. Cetina-Diaz, L. Chan-Chan, R. Vargas-Coronado, J. Cervantes-Uc, P. Quintana-Owen, K. Paakinaho, *J Mater Chem B*, (2014);2:1966-1976.
- ⁵⁶ J. Zhang, B. Doll, E. Beckman i J. Hollinger, *J Biomed Mater Res A*. 2003;67(2):389-400.
- ⁵⁷ S.M. Cetina-Diaz, L.H. Chan-Chan, R.F. Vargas-Coronado, J.M. Cervantes-Uc, *J. Mater. Chem. B* 2 (2014) 1966.
- ⁵⁸ S.M. Cetina-Diaz, L.H. Chan-Chan, R.F. Vargas-Coronado, J.M. Cervantes-Uc, *J. Mater. Chem. B* 2 (2014) 1966.
- ⁵⁹ J. Guan, J.J. Stankus, W.R. Wagner, *Cell Transplant.* 15 (1) (2006) 17–27.
- ⁶⁰ Z Ma, Y Hong, DM Nelson, JE Pichamuthu, *Biomacromol.*(2011);12:3265–74.
- ⁶¹ B Bogdanov, V Toncheva, E. Schacht *J Therm Anal Calorim.* 1999;56:1115–21.
- ⁶² J. Guan, J.J. Stankus, W.R. Wagner, *Cell Transplant.* 15 (1)(2006) 17–27.
- ⁶³ Y. Zhang, T.T. Richard, G. Dipendra, J. Yang, *Int. J. Biomater. Res. Eng.* 1 (2011) 18–31.
- ⁶⁴ J.M. Caves, W. Cui, J. Wen, V.A. Kumar, C.A. Haller, E.L. Chaikof, *Biomaterials* 32 (23) (2011) 5372–5379.
- ⁶⁵ A. Gugerell, J. Kober, T. Laube, T. Walter, S. Nurnberger, et al., *PLoS One* 9 (3) (2014) e90676.
- ⁶⁶ B. Rihnova, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 21 (1996) 157–176.
- ⁶⁷ M.C. Tanzi, P. Verderio, M.G. Lampugnani, M. Resnati, E. Dejana *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, (1994), 6 (5), 393-396
- ⁶⁸ C Huang, R Chen, Q Ke, Y Morsi, K Zhang, X Mo. *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces.* (2011); 82: 307-315
- ⁶⁹ R Chen, C Huang, Q Ke, C He, H Wang, X Mo. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces.* (2010); 79(2): 315-325.
- ⁷⁰ E Yu, J Zhang, JA Thomson, LS Turng. *Intern Polymer Processing.* 2016; 5.
- ⁷¹ D. Punnakitkashem, J.U. Truong, K.T. Menon, Y. Nguyen, Y. Hong, *Acta Biomater.* 10 (2014) 4618–4628.
- ⁷² Z. Sheikh,; S. Najeeb,; Z. Khurshid,; V. Verma,; H. Rashid,; M. Glogauer, *Materials* (2015), 8, 5744–5794.
- ⁷³ J.E. Wagenseil,; R.P. Mecham, *Physiol. Rev.* (2009), 89, 957–989.
- ⁷⁴ G.A. Holzapfel, *Comput. Biomech.* (2000), 7, 228–253.
- ⁷⁵ R. Akhtar,; M.J.; Sherratt, J.K.; Cruickshank, B Derby, *Materialstoday* (2011), 14, 96–105.