



**DZIEDZINA nauk ścisłych i przyrodniczych**

DYSCYPLINA WIODĄCA: nauki fizyczne

DYSCYPLINA DODATKOWA: nauki chemiczne

## **ROZPRAWA DOKTORSKA**

### **Bioaktywne nanokompozyty dla potrzeb inżynierii tkankowej**

Autor: Adriana Małgorzata Gilarska

Promotorzy rozprawy: prof. dr hab. Czesław Kapusta, prof. dr hab. Maria Nowakowska

Promotor pomocniczy: dr hab. Joanna Lewandowska-Łańcucka, prof. UJ

Praca wykonana: Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie,

Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej, Katedra Fizyki Ciała Stałego

oraz

Uniwersytet Jagielloński, Wydział Chemii, Zakład Chemii Fizycznej i Elektrochemii

Kraków, 2022



**Oświadczenie autora rozprawy:**

Oświadczam, świadoma odpowiedzialności karnej za poświadczenie nieprawdy, że niniejszą pracę doktorską wykonałam osobiście i samodzielnie i nie korzystałam ze źródeł innych niż wymienione w pracy.

*data, podpis autora*

**Oświadczenie promotorów rozprawy:**

Niniejsza rozprawa jest gotowa do oceny przez recenzentów.

*data, podpis pierwszego promotora rozprawy*

*data, podpis drugiego promotora rozprawy*

Niniejsza rozprawa doktorska została wykonana w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój, nr projektu POWR.03.02.00-00-I004/16, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej.

Badania zostały częściowo sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach grantów SONATA 11 (UMO-2016/21/D/ST5/01635) oraz SONATA 12 (UMO-2016/23/D/ST8/00669), a także ze środków Centrum Transferu Technologii CITTRU (Dec: 30.621.8.2020).

Autorka rozprawy uzyskała także stypendium doktorskie w ramach grantu ETIUDA 8, nr umowy UMO-2020/36/T/ST5/00184, finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.



**Unia Europejska**  
Europejski Fundusz Społeczny



**Fundusze Europejskie**  
Wiedza Edukacja Rozwój



N A R O D O W E C E N T R U M N A U K I



**C I T T R U**  
Centrum Transferu Technologii

*Składam serdeczne podziękowania*

**Promotorom – prof. dr hab. Marii Nowakowskiej oraz prof. dr hab. Czesławowi Kapuście**  
*za umożliwienie mi realizowania interdyscyplinarnych badań naukowych  
na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH oraz Wydziale Chemii UJ,  
dzielenie się swoją ogromną wiedzą, wspólne dyskusje wskazujące kierunek dalszej pracy  
oraz pomoc przy rozwiązywaniu problemów badawczych*

**Promotorowi pomocniczemu - dr hab. Joannie Lewandowskiej-Łańcuckiej, prof. UJ**  
*za opiekę naukową i współpracę trwającą nieprzerwanie od moich studiów licencjackich,  
wprowadzenie mnie w świat badań naukowych,  
nieocenione wsparcie zarówno w dążeniu do celu, jak i radzeniu sobie w trudnych chwilach,  
nieograniczony optymizm oraz niezliczone rozmowy o nauce i nie tylko*

**dr inż. Sylwii Fiejdasz**  
*za współpracę przy opracowaniu hydrożeli magnetycznych,  
długie godziny spędzone w laboratorium  
oraz niezwykle żywe dyskusje o otaczającym nas świecie*

**dr Monice Bzowskiej oraz mgr Alicji Hinz**  
*za współpracę przy badaniach in vivo dla materiałów z lekiem przeciwosteoporotycznym*

**prof. Michaelowi Gelinsky'emu oraz dr Tilmanowi Ahlfeldowi**  
*za opiekę naukową podczas mojego stażu na Uniwersytecie Technicznym w Dreźnie  
i wprowadzenie mnie w technologię druku 3D*

*Realizacja interdyscyplinarnej pracy doktorskiej nie byłaby również możliwa  
bez zaangażowania naukowców, którzy udostępniali aparaturę do badań  
czy wykonywali pomiary, a byli to:*

**dr hab. inż. Agnieszka Radziszewska, dr hab. inż. Artur Krzyżak,  
dr inż. Iwona Habina-Skrzyniarz, dr inż. Tomasz Strączek oraz mgr Anna Łatkiewicz**

*Dziękuję również*

**Członkom Katedry Fizyki Ciała Stałego WFiIS AGH**, w szczególności koleżance i kolegom  
z pokoju 215 – mgr Eli Gumieniczek-Chłopek, dr inż. Kamilowi Gocowi i dr inż. Witkowi Prendocie  
oraz

**Członkom Zespołu Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów WCh UJ**, w szczególności  
koleżankom z pokoju D1-01 – dr Kasi Kłysik-Trzciańskiej, dr Anecie Pietraszek,  
dr Łucji Rodzik-Czałce, mgr Asi Klarze, mgr Oli Krajcer oraz mgr Adzie Machowskiej  
za miło spędzony czas na uczelni, a także poza nią ☺

**Mojej Rodzinie oraz Przyjaciółom**  
*za to, że są ♥*

## Spis treści

Streszczenie .....	11
Streszczenie w języku angielskim .....	14
Wykaz skrótów .....	17
Spis rysunków .....	20
Spis tabel .....	24
Wstęp .....	25
<b>WPROWADZENIE .....</b>	<b>28</b>
1. Inżynieria tkankowa w medycynie regeneracyjnej .....	28
1.1. Inżynieria tkankowa kości .....	30
2. Macierz zewnątrzkomórkowa .....	32
3. Rusztowania komórkowe .....	33
3.1. Wymagania stawiane materiałom do zastosowań w inżynierii tkankowej .....	33
3.2. Biomateriały stosowane do otrzymywania rusztowań komórkowych .....	35
3.2.1. Ceramika .....	36
3.2.2. Polimery .....	36
4. Hydrożele .....	38
4.1. Polimery użyte do otrzymywania hydrożeli .....	41
4.1.1. Kolagen .....	41
4.1.2. Chitozan .....	43
4.1.3. Kwas hialuronowy .....	44
4.2. Genipina – czynnik sieciujący .....	46
5. Nanokompozyty .....	48
5.1. Cząstki krzemionki jako komponent nieorganiczny nanokompozytów .....	50
5.2. Wielofunkcyjne nanokompozyty przydatne w leczeniu osteoporozy .....	52
5.2.1. Osteoporoza .....	52
5.2.2. Alendronian – lek przeciwosteoporotyczny z grupy bisfosfonianów .....	53
5.2.3. Systemy dostarczania alendronianu .....	55
5.3. Nanokompozyty oparte na matrycy hydrożelowej i nanocząstkach magnetycznych .....	57
5.3.1. Wpływ pola magnetycznego na regenerację tkanki kostnej .....	57
5.3.2. Nanocząstki magnetyczne .....	58
5.3.3. Hydrożele magnetyczne .....	61
6. Druk 3D jako metoda otrzymywania rusztowań komórkowych .....	64
6.1. Materiały użyte do dostosowania właściwości nanokompozytów do warunków drukowania .....	66
6.1.1. Metyloceluloza .....	66
6.1.2. Tripolifosforan sodu .....	68
<b>CZEŚĆ EKSPERYMENTALNA .....</b>	<b>70</b>
I. Nanokompozyty oparte na hydrożelowej matrycy i cząstkach krzemionki .....	70
Wprowadzenie .....	70

7. Otrzymywanie i scharakteryzowanie hydrożeli opartych na kolagenie, chitozanie i kwasie hialuronowym.....	71
7.1. Materiały i metody .....	71
7.1.1. Materiały .....	71
7.1.2. Otrzymywanie hydrożeli .....	72
7.1.3. Badanie właściwości fizykochemicznych hydrożeli .....	72
7.1.4. Badanie adhezji i morfologii komórek .....	73
7.2. Wyniki i dyskusja .....	74
7.2.1. Otrzymywanie hydrożeli .....	74
7.2.2. Właściwości fizykochemiczne hydrożeli .....	75
7.2.3. Adhezja i morfologia komórek .....	79
7.3. Podsumowanie.....	81
8. Otrzymywanie i scharakteryzowanie materiałów hybrydowych opartych na matrycy hydrożelowej i cząstkach krzemionki .....	82
8.1. Materiały i metody .....	82
8.1.1. Materiały .....	82
8.1.2. Otrzymywanie cząstek krzemionki funkcjonalizowanych powierzchniowo grupami aminowymi ...	83
8.1.3. Scharakteryzowanie cząstek krzemionki .....	83
8.1.4. Otrzymywanie materiałów hybrydowych .....	84
8.1.5. Badania właściwości fizykochemicznych materiałów hybrydowych .....	85
8.1.6. Badanie biomineralizacji <i>in vitro</i> .....	86
8.1.7. Badania właściwości biologicznych <i>in vitro</i> .....	87
8.2. Wyniki i dyskusja .....	89
8.2.1. Otrzymywanie cząstek krzemionki funkcjonalizowanych powierzchniowo grupami aminowymi ...	89
8.2.2. Właściwości fizykochemiczne cząstek krzemionki .....	90
8.2.3. Otrzymywanie materiałów hybrydowych .....	93
8.2.4. Właściwości fizykochemiczne materiałów hybrydowych .....	94
8.2.5. Biomineralizacja <i>in vitro</i> .....	99
8.2.6. Właściwości biologiczne <i>in vitro</i> .....	102
8.3. Podsumowanie.....	104
II. Wielofunkcyjne nanokompozyty przydatne w leczeniu osteoporozy .....	106
Wprowadzenie.....	106
9. Otrzymywanie i scharakteryzowanie hydrożeli opartych na kolagenie, chitozanie i modyfikowanym kwasie hialuronowym .....	108
9.1. Materiały i metody .....	108
9.1.1. Materiały .....	108
9.1.2. Modyfikacja kwasu hialuronowego lizyną .....	108
9.1.3. Scharakteryzowanie modyfikowanego kwasu hialuronowego .....	108
9.1.4. Otrzymywanie hydrożeli .....	109
9.1.5. Badanie właściwości fizykochemicznych hydrożeli .....	109
9.1.6. Badania właściwości biologicznych <i>in vitro</i> .....	110
9.2. Wyniki i dyskusja .....	111

9.2.1. Efektywność modyfikacji kwasu hialuronowego lizyną.....	111
9.2.2. Otrzymywanie hydrożeli.....	113
9.2.3. Właściwości fizykochemiczne hydrożeli.....	114
9.2.4. Właściwości biologiczne <i>in vitro</i> .....	121
9.3. Podsumowanie.....	126
10. Otrzymywanie i scharakteryzowanie wielofunkcyjnych materiałów hybrydowych opartych na matrycy hydrożelowej i nośniku leku przeciwosteoporotycznego.....	127
10.1. Materiały i metody.....	127
10.1.1. Materiały.....	127
10.1.2. Otrzymywanie nośnika leku przeciwosteoporotycznego.....	127
10.1.3. Scharakteryzowanie cząstek SiO <sub>2</sub> -Ap oraz SiO <sub>2</sub> -Ap-ALN.....	128
10.1.4. Otrzymywanie materiałów hybrydowych.....	129
10.1.5. Badania właściwości fizykochemicznych materiałów hybrydowych.....	130
10.1.6. Badanie uwalniania leku z materiałów hybrydowych.....	130
10.1.7. Badanie biomineralizacji <i>in vitro</i> .....	131
10.1.8. Badania właściwości biologicznych <i>in vitro</i> .....	131
10.1.9. Badania właściwości biologicznych <i>in vivo</i> .....	132
10.2. Wyniki i dyskusja.....	135
10.2.1. Otrzymywanie cząstek krzemionkowo-apatytowych z przyłączonym lekiem przeciwosteoporotycznym (SiO <sub>2</sub> -Ap-ALN).....	135
10.2.2. Właściwości fizykochemiczne układu SiO <sub>2</sub> -Ap oraz SiO <sub>2</sub> -Ap-ALN.....	135
10.2.3. Otrzymywanie materiałów hybrydowych.....	138
10.2.4. Właściwości fizykochemiczne materiałów hybrydowych.....	139
10.2.5. Uwalnianie leku z materiałów hybrydowych.....	144
10.2.6. Biomineralizacja <i>in vitro</i> .....	145
10.2.7. Właściwości biologiczne <i>in vitro</i> .....	147
10.2.8. Właściwości biologiczne <i>in vivo</i> .....	151
10.3. Podsumowanie.....	156
III. Nanokompozyty oparte na hydrożelowej matrycy i nanocząstkach magnetycznych.....	158
Wprowadzenie.....	158
11. Otrzymywanie i scharakteryzowanie hydrożeli magnetycznych.....	159
11.1. Materiały i metody.....	159
11.1.1. Materiały.....	159
11.1.2. Otrzymywanie superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza powlekanych kationową pochodną chitozanu (SPION-CCh).....	159
11.1.3. Scharakteryzowanie nanocząstek SPION-CCh.....	159
11.1.4. Otrzymywanie hydrożeli magnetycznych.....	160
11.1.5. Badania właściwości fizykochemicznych hydrożeli.....	160
11.1.6. Badania właściwości biologicznych <i>in vitro</i> .....	163
11.2. Wyniki i dyskusja.....	164
11.2.1. Właściwości fizykochemiczne nanocząstek SPION-CCh.....	164
11.2.2. Otrzymywanie hydrożeli magnetycznych.....	167



11.2.3. Właściwości fizykochemiczne hydrożeli.....	168
11.2.4. Właściwości biologiczne <i>in vitro</i> .....	185
11.3. Podsumowanie.....	189
IV. Nanokompozyty otrzymywane metodą druku 3D .....	191
Wprowadzenie.....	191
12. Otrzymywanie i scharakteryzowanie rusztowań 3D na bazie wybranych polimerów i komponentów nieorganicznych .....	192
12.1. Materiały i metody .....	192
12.1.1. Materiały.....	192
12.1.2. Otrzymywanie rusztowań 3D .....	192
12.1.3. Scharakteryzowanie rusztowań 3D.....	193
12.2. Wyniki i dyskusja.....	195
12.2.1. Otrzymywanie rusztowań 3D .....	195
12.2.2. Scharakteryzowanie rusztowań 3D.....	197
12.3. Podsumowanie.....	206
Podsumowanie rozprawy i wnioski.....	209
Dorobek naukowy Autorki rozprawy .....	212
Bibliografia.....	219



## Streszczenie

Niezdrowy styl życia, starzejące się społeczeństwo czy szybki rozwój cywilizacyjny mogą prowadzić do różnego rodzaju schorzeń i urazów, co wzmaga zapotrzebowanie na przeszczepy i uzupełnienia powstałych ubytków tkanek. W szczególności, ograniczona aktywność fizyczna, otyłość oraz procesy starzenia powodują wzrost występowania urazów układu kostnego. Zbyt duże uszkodzenie tkanki kostnej spowodowane przez urazy bądź choroby przewlekłe może uniemożliwić organizmowi podjęcie procesu regeneracji. Dlatego też rozwijane są różnorakie podejścia, które mogłyby ułatwić odbudowę tkanek. W ostatnich latach obserwuje się rosnące zainteresowanie inżynierią tkankową jako alternatywą dla standardowo stosowanych metod leczenia. Oczekuje się, że podejście to pozwoli na wyeliminowanie powszechnie występujących problemów z przeszczepami narządów (odrzucenie przez organizm przeszczepu czy brak dawcy), jak również wykluczy stosowanie materiałów o stosunkowo niskiej biogodności, co jest przyczyną częstych powikłań pooperacyjnych. Inżynieria tkankowa jest dziedziną medycyny regeneracyjnej, a jej założeniem jest zastępowanie brakujących bądź uszkodzonych tkanek właściwie zaprojektowanym biomateriałem, stymulującym odbudowę odpowiednich struktur organizmu. W przypadku poważnego uszkodzenia tkanki, zniszczone zostają nie tylko komórki, ale także macierz zewnątrzkomórkowa (ECM - *extracellular matrix*). Macierz zewnątrzkomórkowa stanowi naturalne rusztowanie dla komórek, z którymi tworzy tkankę. Dlatego też nową tkankę tworzy się na bazie komórek, które są osadzone na odpowiednim substytucie ECM, co pozwala na wspomaganie rozwoju tkanki. Trójwymiarowymi substytutami ECM są tzw. skafoldy, czyli sztuczne rusztowania komórkowe. Dobrze zaprojektowane, powinny być korzystną konstrukcją dla adhezji, namnażania oraz różnicowania się komórek, przez co mogą spełniać równocześnie wiele istotnych funkcji. Z tego względu niezwykle istotną rolę odgrywa materiał wykorzystany do wytworzenia skafoldów. Stosuje się w tym celu takie materiały jak metale, bioceramikę, polimery czy kompozyty, które muszą się charakteryzować odpowiednią biogodnością. Jednymi z najczęściej badanych materiałów, które można zastosować do wytworzenia sztucznych rusztowań są polimerowe hydrożele. Dzięki swoim fizycznym właściwościom, upodabniającymi je do naturalnych tkanek, biogodności i możliwości dyfuzji różnych substancji, hydrożele tworzą wydajne środowisko do wzrostu komórek. Obecnie powszechnie rozwijanym podejściem jest projektowanie materiałów nowej generacji, jakimi są funkcjonalne nanokompozyty. Ich interesująca struktura i właściwości sprawiają, że mogą

być one użyte jako sztuczne rusztowania komórkowe do odbudowy tkanek, w tym tkanki kostnej. Mając na uwadze fakt, iż do tej pory nie udało się uzyskać materiału, który byłby całkowicie obojętny dla organizmu i posiadał właściwości takie jak żywa tkanka, **przedmiotem badań realizowanych w ramach interdyscyplinarnej pracy doktorskiej było zaprojektowanie, otrzymanie i scharakteryzowanie bioaktywnych nanokompozytów, potencjalnie przydatnych jako rusztowania (skafoldy) do hodowli komórkowych dla potrzeb inżynierii tkankowej, w szczególności do regeneracji tkanki kostnej.** Opracowywane nanokompozyty bazowały na matrycy hydrożelowej, w której rozpraszane były dodatkowe komponenty nieorganiczne, tworząc stabilne strukturalnie materiały o pożądanych właściwościach, zależnych od składu nanokompozytów.

Niniejsza rozprawa zawiera przegląd literatury (**rozdziały 1-6**), dotyczący istotnych aspektów i osiągnięć inżynierii tkankowej, z wyszczególnieniem inżynierii tkankowej kości, projektowania rusztowań komórkowych, polimerowych hydrożeli i funkcjonalnych nanokompozytów jako atrakcyjnych materiałów przydatnych do otrzymywania skafoldów oraz metody druku 3D, zyskującej coraz większe zainteresowanie w obszarze medycyny regeneracyjnej. W rozdziałach odnoszących się do hydrożeli i nanokompozytów skupiono się na opisie komponentów, które wykorzystano do otrzymywania nanokompozytów w ramach pracy doktorskiej. Były nimi biopolimery – kolagen, chitozan i kwas hialuronowy oraz komponenty nieorganiczne – cząstki krzemionki i nanocząstki magnetyczne, przedstawione w kontekście tworzenia wielofunkcyjnych bioaktywnych nanokompozytów przydatnych w regeneracji tkanki kostnej z wykorzystaniem leku przeciwosteoporotycznego alendronianu sodu czy właściwości magnetycznych.

Część eksperymentalna rozprawy składa się z czterech głównych części (**I-IV**), każda z nich zawiera wprowadzenie, opis stosowanych materiałów i metod, wyniki badań i ich dyskusję oraz podsumowanie. Część I (**rozdziały 7 i 8**) dotyczy otrzymania i scharakteryzowania właściwości fizykochemicznych i biologicznych nanokompozytów opartych na hydrożelowej matrycy i cząstkach krzemionki, potencjalnie przydatnych jako wstrzykiwalne bioaktywne rusztowania do regeneracji tkanki kostnej. Matryca hydrożelowa na bazie kolagenu, chitozanu i kwasu hialuronowego została zoptymalizowana pod kątem zawartości biopolimerów oraz stężenia czynnika sieciującego (genipiny). Następnie do wybranej matrycy wprowadzono cząstki krzemionki funkcjonalizowane grupami aminowymi, tworząc stabilny bioaktywny materiał hybrydowy. Grupy funkcyjne na powierzchni cząstek krzemionki zapewniły wbudowanie się ich w strukturę hydrożelu (grupy aminowe) oraz indukowanie

fazy mineralnej na materiałach w obecności symulowanego sztucznego osocza (grupy silanolowe). Część II (**rozdziały 9 i 10**) dotyczy otrzymania i scharakteryzowania właściwości fizykochemicznych i biologicznych nanokompozytów opartych na hydrożelowej matrycy i cząstkach krzemionkowo-apatytowych z przyłączonym lekiem przeciwosteoporotycznym, potencjalnie przydatnych jako wstrzykiwalne rusztowania do odbudowy tkanki kostnej, w szczególności niewielkich ubytków kostnych spowodowanych osteoporozą. Matryca hydrożelowa została udoskonalona poprzez wykorzystanie funkcjonalizowanego grupami aminowymi kwasu hialuronowego, który dzięki modyfikacji mógł być chemicznie sieciowany genipiną razem z kolagenem i chitozaniem. Następnie do wybranej matrycy wprowadzono cząstki krzemionkowo-apatytowe z przyłączonym alendronianem sodu - lekiem przeciwosteoporotycznym, otrzymując układ mogący wspierać regenerację tkanki kostnej i posiadający potencjał terapeutyczny w leczeniu osteoporozy. Materiał przetestowano zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Część III (**rozdział 11**) dotyczy otrzymania i scharakteryzowania właściwości fizykochemicznych i biologicznych nanokompozytów opartych na hydrożelowej matrycy i nanocząstkach magnetycznych, określanych jako hydrożele magnetyczne, potencjalnie przydatnych do zastosowań w inżynierii tkankowej kości z możliwością wspomaganie regeneracji zewnętrznym polem magnetycznym. Fazę magnetyczną stanowiły superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza (SPION), które opłaszczano kationową pochodną chitozanu. Następnie wprowadzano je do matrycy hydrożelowej na bazie kolagenu i chitozanu sieciowanej genipiną, uzyskując stabilny strukturalnie hydrożel o właściwościach superparamagnetycznych. Polimerowe otoczki nanocząstek umożliwiły ich kowalencyjne związanie z matrycą hydrożelową, zapobiegając separacji faz i agregacji. Ostatnia część – IV (**rozdział 12**) dotyczy opracowania i wstępnego scharakteryzowania właściwości fizykochemicznych i biologicznych rusztowań 3D, wytwarzanych techniką druku 3D z zastosowaniem metody ekstruzji. Optymalizowano skład i sposób sieciowania lepkich past biopolimerowych jako atramentów do drukowania, wykorzystując biopolimery stosowane we wcześniejszych etapach badań w ramach niniejszej pracy doktorskiej. Wybraną pastę biopolimerową wzbogacano o komponenty nieorganiczne opracowane także we wcześniejszych etapach badań – cząstki krzemionki oraz nanocząstki magnetyczne i badano ich wpływ na efektywność procesu drukowania oraz stabilność otrzymanych rusztowań 3D.

Rozprawę kończą podsumowanie i wnioski z całości badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej oraz dorobek naukowy Autorki rozprawy.

## Streszczenie w języku angielskim

Unhealthy lifestyles, population ageing and the rapid development of civilization may lead to various types of diseases and injuries, which increase the need for transplantation and filling of existing tissue defects. In particular, limited physical activity, obesity and ageing processes cause a continuous growth in the incidences of skeletal injuries. Excessive damage of the bone tissue resulting from injuries or chronic diseases may prevent the body from initiating the regeneration process. That is why various approaches are being developed to facilitate tissue repair. In recent years, there has been a growing interest in tissue engineering as an alternative to conventional treatments. It is expected that this approach will eliminate common problems with organ transplantation (transplant rejection or lack of organ donors) as well as exclude the use of materials with relatively low biocompatibility, which is the cause of frequent postoperative complications. Tissue engineering is a field of regenerative medicine aiming at replacement of missing or damaged tissue with properly designed biomaterials, stimulating the reconstruction of body structures. In a case of serious tissue damage not only cells, but also the extracellular matrix (ECM) can be destroyed. The ECM is a natural scaffold for the cells and forms the tissues with the cells. Therefore, a new tissue can be created with cells that are seeded on appropriate ECM substitutes. Well-designed scaffolds should be structures favourable for cell adhesion, proliferation and differentiation, being able to fulfill many important functions at the same time. In this regard, materials used for scaffold fabrication play an essential role. The highly biocompatible metals, bioceramics, polymers or composites are tested as such materials. Among them, the hydrogels are the most commonly used class of polymeric materials for scaffold preparation. They can create environment suitable for fast cell growth due to their biocompatibility, high content of water and possibility of diffusion for various substances. Nowadays the design of next-generation materials such as functional nanocomposites is a promising way - interesting structure and properties make them attractive candidates as scaffolds for bone tissue engineering. Until now, none of the materials developed was able to completely mimic the properties of living tissue. Keeping this in mind, **the aim of this thesis was to design, synthesise and characterize bioactive nanocomposites, potentially useful as scaffolds for tissue engineering applications, particularly for bone tissue regeneration.** The developed nanocomposites consisted of hydrogel matrix supplemented with selected inorganic components, forming structurally stable materials with the desired properties dependent on the composition of the nanocomposites.

This thesis provides an overview of the literature (**chapters 1-6**) on important aspects and achievements of tissue engineering, bone tissue engineering, design of scaffolds, polymeric hydrogels and functional nanocomposites as materials suitable for the fabrication of scaffolds as well as 3D printing, the procedure gaining more and more interest in the field of regenerative medicine. The chapters relating to hydrogels and nanocomposites focus on the description of the components that were used to prepare bioactive nanocomposites. They were biopolymers – collagen, chitosan, hyaluronic acid and inorganic components – silica particles and magnetic nanoparticles, presented within the context of creating multifunctional bioactive nanocomposites useful in bone tissue regeneration assisted by sodium alendronate (anti-osteoporosis drug) or effected by the magnetic properties of the nanoparticles studied.

The experimental part of this thesis consists of four main parts (**I-IV**), each of them contains an introduction, description of the materials and methods used, results, discussion and summary. Part I (**chapters 7 and 8**) concerns the preparation and characterization of the physicochemical and biological properties of nanocomposites based on a hydrogel matrix and silica particles, potentially useful as injectable bioactive scaffolds for bone tissue regeneration. The hydrogel matrix composed of collagen, chitosan and hyaluronic acid was optimized in terms of the content of biopolymers and the concentration of the crosslinking agent (genipin). Then amino-functionalized silica particles were dispersed in the selected matrix to form a stable bioactive hybrid material. Functional groups present on the surface of the silica particles ensured their incorporation into hydrogel structure (amino groups) and deposition of the mineral phase in the environment of simulated body fluid (silanol groups). Part II (**chapters 9 and 10**) presents the preparation and characterization of the physicochemical and biological properties of nanocomposites based on a hydrogel matrix and sodium alendronate carrier in the form of silica-apatite-sodium alendronate system, potentially useful as injectable scaffolds for the reconstruction of bone tissue, in particular small bone defects caused by osteoporosis. The hydrogel matrix was improved by the use of amino-functionalized hyaluronic acid, so that not only collagen and chitosan, but also modified hyaluronic acid could be chemically crosslinked with genipin. Then sodium alendronate carriers were incorporated into the selected matrix, producing a system that can support bone tissue regeneration and has therapeutic potential in the treatment of osteoporosis. The material was tested using both *in vitro* and *in vivo* assays. Part III (**chapter 11**) concerns the preparation and characterization of the physicochemical and biological properties of nanocomposites based on a hydrogel matrix and magnetic nanoparticles (magnetic

hydrogels), potentially useful for bone tissue engineering applications with the possibility of supporting regeneration enhanced with external magnetic field. The magnetic phase consisted of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) that were coated with a cationic derivative of chitosan. Then they were immobilized into the hydrogel matrix composed of collagen and chitosan crosslinked with genipin, obtaining structurally stable hydrogels with superparamagnetic properties. Polymeric coatings of nanoparticles allowed them to covalently bind to the hydrogel network preventing phase separation and aggregation. The last part – IV (**chapter 12**) concerns the development and initial characterization of the physicochemical and biological properties of 3D scaffolds fabricated by 3D printing using the extrusion method. The composition and crosslinking method of biopolymeric inks were optimized using biopolymers applied in earlier parts of the thesis. The selected biopolymeric inks were enriched with silica particles and magnetic nanoparticles (also developed at the earlier stages of the studies). Effect of inorganic components on the efficiency of the printing process and stability of the 3D scaffolds obtained was also investigated.

The thesis is closed with summary and conclusions. Additionally, the list of scientific achievements of the author is added.



## Wykaz skrótów

- AFM** – mikroskopia sił atomowych (ang. *atomic force microscopy*)
- ALN** – alendronian sodu
- ALP** – fosfataza alkaliczna
- AM** – wytwarzanie addytywne (ang. *additive manufacturing*)
- APTES** – 3-aminopropylotrietoksylian
- ATR** – technika osłabionego całkowitego odbicia wewnętrznego (ang. *attenuated total reflectance*)
- BCP** – ceramika dwufazowa
- BET** – model Brunauera, Emmetta i Tellera dotyczący adsorpcji wielowarstwowej z fazy gazowej
- BJH** – metoda Barreta, Joynera i Halendy dotycząca badania struktury ciał mikroporowatych
- BMP** – białko morfogenetyczne kości
- CAD** – projektowanie wspomagane komputerowo (ang. *computer aided design*)
- CCh** – kationowa pochodna chitozanu
- Ch** – chitozan
- Col** – kolagen
- ColCh** – hydrożele oparte na kolagenie i chitozanie
- ColChHA** – hydrożele oparte na kolagenie, chitozanie i kwasie hialuronowym
- ColChHA<sub>mod</sub>** – hydrożele oparte na kolagenie, chitozanie i modyfikowanym lizyną kwasie hialuronowym
- CPMG** – sekwencja Carr-Purcell-Meiboom-Gill'a wykorzystywana do pomiaru czasu T<sub>2</sub>
- DLS** – dynamiczne rozpraszanie światła (ang. *dynamic light scattering*)
- DMEM** – medium do hodowli komórek (ang. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)
- DNA** – kwas deoksyrybonukleinowy
- ECM** – macierz zewnątrzkomórkowa (ang. *extracellular matrix*)
- EDC** – 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl) karbodiimid
- EDS** – rentgenowska spektroskopia energodispersyjna (ang. *energy dispersive X-ray spectroscopy*)
- ESCA** – spektroskopia elektronowa do celów analizy chemicznej (ang. *electron spectroscopy for chemical analysis*)
- FACITs** – grupa kolagenów niefibrylarnych (ang. *Fibril-associated Collagens with Interrupted Triple helices*)
- FBS** – płodowa surowica bydlęca (ang. *fetal bovine serum*)
- FTIR** – spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. *Fourier transform infrared spectroscopy*)
- GAG** – glikozaminoglikany
- HA** – kwas hialuronowy
- HA<sub>mod</sub>** – modyfikowany lizyną kwas hialuronowy
- HAp** – hydroksyapatyt
- HBSS** – zbalansowany roztwór soli Hank'a (ang. *Hank's Balanced Salt Solution*)
- HMDS** – heksametylodisilazan
- HPLM** – symulowane sztuczne osocze (ang. *Human Plasma-Like Medium*)
- hTERT-MSC** – unieśmiertelnione mezenchymalne komórki macierzyste z reekspresją ludzkiej telomerazy

**IACUC** – Institutional Animal Care and Use Committee

**ILT** – odwrotna transformata Laplace’a (ang. *inverse Laplace transform*)

**IPN** - przenikająca się sieć polimerowa (ang. *interpenetrating polymer network*)

**IR** – sekwencja Inversion Recovery wykorzystywana do pomiaru czasu  $T_1$

**J774A.1** – mysie makrofagi

**LDV** – technika laserowego pomiaru prędkości metodą Dopplera (ang. *laser Doppler velocimetry*)

**MC** – metyloceluloza

**MES** – kwas 2-morfolinoetylosulfonowy

**MFM** – mikroskopia sił magnetycznych (ang. *magnetic force microscopy*)

**MG-63** – komórki ludzkiego mięsaka kościopochodnego

**MIT** – Massachusetts Institute of Technology

**MRI** – obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (ang. *magnetic resonance imaging*)

**MTT** – test do analizy aktywności metabolicznej komórki

**NHS** – N-Hydroksysukcynimid

**NMR** – magnetyczny rezonans jądrowy (ang. *nuclear magnetic resonance*)

**PBS** – buforowana fosforanem sól fizjologiczna (ang. *Phosphate-Buffered Saline*)

**PCL** – polikaprolakton

**PEG** – poli(tlenek etylenu)

**PEMF** – impulsowe pole elektromagnetyczne (ang. *pulse electromagnetic field*)

**PGA** – poliglikolid

**pHEMA** – 2-hydroksyetylo-metakrylan

**PLA** – polilaktyd

**PLGA** – kopolimer polilaktyd-glikolid

**PNIPAM** – poli(N-izopropylakryloamid)

**pNP** – paranitrofenol

**pNPP** – fosforan paranitrofenolu

**SBF** – symulowane sztuczne osocze (ang. *simulated body fluid*)

**SEM** – skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. *scanning electron microscopy*)

**SiO<sub>2</sub>-Ap** – cząstki krzemionkowo-apatytowe

**SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN** – cząstki krzemionkowo-apatytowe z przyłączonym lekiem alendronianem sodu

**SLA** – stereolitografia (ang. *stereolithography*)

**SLS** – selektywne spiekanie laserowe (ang. *selective laser sintering*)

**SMF** – statyczne pole magnetyczne (ang. *static magnetic field*)

**SPION** – superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza (ang. *superparamagnetic iron oxide nanoparticles*)

**SPION-CCh** – superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza pokryte kationową pochodną chitozanu

**SR** – stopień pęcznienia

**STEM** – skaningowo-transmisyjny mikroskop elektronowy (ang. *scanning transmission electron microscopy*)

**TCP** – ortofosforan (V) wapnia

**TEOS** – tetraetoksylian

**TG** – termograwimetria (ang. *thermogravimetry*)

**TPP** – tripolifosforan sodu

**UE** – Unia Europejska

**VSM** – magnetometr z wibrującą próbką (ang. *vibrating sample magnetometer*)

**WHO** – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)

**XPS** – rentgenowska spektroskopia fotoelektronów (ang. *X-ray photoelectron spectroscopy*)

**XRD** – dyfrakcja rentgenowska (ang. *X-ray diffraction*)

**ZFC/FC** – tryb po schłodzeniu próbki w zerowym polu magnetycznym (**ZFC**, ang. *zero field cooled*) oraz po schłodzeniu próbki w polu (**FC**, ang. *field cooled*)

## Spis rysunków

**Rysunek 1.** Etapy inżynierii tkankowej.

**Rysunek 2.** Hierarchiczna struktura kości.

**Rysunek 3.** Struktura macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM).

**Rysunek 4.** Skafoldy z kolagenu pozyskiwanego z meduz, przydatne do regeneracji chrząstki.

**Rysunek 5.** Model 3D (**A**) oraz skafoldy na bazie PLA (**B**, **C**) przydatne dla inżynierii tkankowej kości.

**Rysunek 6.** Schemat dwóch głównych mechanizmów sieciowania hydrożeli – fizyczny i chemiczny.

**Rysunek 7.** Struktura kolagenu.

**Rysunek 8.** Struktura chityny i chitozanu.

**Rysunek 9.** Struktura kwasu hialuronowego.

**Rysunek 10.** Schemat sieciowania chitozanu genipiną.

**Rysunek 11.** Struktura kości beczkowej w zdrowym szkielecie (**A**) i dotkniętym osteoporozą (**B**).

**Rysunek 12.** Struktura alendronianu sodu (trihydrat).

**Rysunek 13.** Zależność koercji/remanencji od rozmiaru nanocząstek (**A**) i fluktuacje wektora magnetyzacji (**B**).

**Rysunek 14.** Trzy różne rodzaje druku 3D stosowanego do otrzymywania skafoldów.

**Rysunek 15.** Struktura celulozy (**A**) i metylocelulozy (**B**).

**Rysunek 16.** Struktura tripolifosforanu sodu (TPP).

**Rysunek 17.** Próbkki hydrożeli w stanie zolu (**A**) i po zajściu procesu sieciowania (**B**).

**Rysunek 18.** Widma FTIR dla hydrożeli ColCh i ColChHA, sieciowanych genipiną o stężeniu 10 mM.

**Rysunek 19.** Wartości modułu zachowawczego  $G'$  dla hydrożeli ColCh i ColChHA, osiągnięte po 10, 30 i 60 minutach od rozpoczęcia pomiaru.

**Rysunek 20.** Zmiany masy hydrożeli ColCh i ColChHA sieciowanych genipiną o stężeniach 10 i 20 mM w obecności kolagenazy.

**Rysunek 21.** Mikrofotografie SEM przedstawiające morfologie komórek MG-63 hodowanych przez 3 dni na powierzchni hydrożeli ColCh oraz ColChHA, sieciowanych genipiną o stężeniu 10 i 20 mM (**A**) oraz średnia powierzchnia rozplaszczania komórek MG-63 hodowanych przez 3 dni na powierzchni hydrożeli ColCh oraz ColChHA, sieciowanych genipiną o stężeniu 10 i 20 mM (**B**).

**Rysunek 22.** Schemat otrzymywania sfunkcjonalizowanych grupami aminowymi cząstek krzemionkowych.

**Rysunek 23.** Widmo FTIR (**A**) oraz widmo XPS (**B**) dla cząstek krzemionki funkcjonalizowanych grupami aminowymi.

**Rysunek 24.** Mikrofotografie SEM dla sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionki.

**Rysunek 25.** Schemat otrzymywania materiału hybrydowego.

**Rysunek 26.** Próbkki hydrożeli w stanie zolu (jasne zabarwienie) i po zajściu procesu sieciowania (ciemne zabarwienie).

**Rysunek 27.** Stopień pęcznienia w warunkach fizjologicznych dla otrzymanych materiałów.

**Rysunek 28.** Wartości modułu zachowawczego  $G'$  dla materiałów, osiągnięte po 10, 30 i 60 minutach od rozpoczęcia pomiaru.

**Rysunek 29.** (**A**) Zmiany masy materiałów podczas inkubacji w PBS. (**B**) Zmiany masy materiałów w obecności kolagenazy.

**Rysunek 30.** Mikrofotografie SEM materiałów przed i po 7 dniach inkubacji w SBF.

**Rysunek 31.** (**A**) Proliferacja komórek MG-63 po 1, 3 i 7 dniu hodowli na powierzchni badanych materiałów. (**B**) Aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) komórek MG-63 po 3 i 7 dniu hodowli na powierzchni badanych materiałów.

**Rysunek 32.** Mikrofotografie SEM przedstawiające morfologie komórek MG-63 hodowanych przez 3 dni na powierzchni badanych materiałów (**A**), wykres przedstawiający średnią powierzchnię komórek po 3 dniach hodowli na materiałach (**B**).

- Rysunek 33.** Schematyczna prezentacja zastosowania hydrożelowego materiału hybrydowego z lekiem przeciwosteoporotycznym.
- Rysunek 34.** Widma  $^1\text{H}$  NMR dla kwasu hialuronowego HA (A) oraz modyfikowanego kwasu hialuronowego HA<sub>mod</sub> (B).
- Rysunek 35.** Materiały HA oraz HA<sub>mod</sub> z dodatkiem genipiny o stężeniach 10 i 20 mM po inkubacji w 37 °C.
- Rysunek 36.** Próbkki hydrożeli ColChHA<sub>mod</sub> w stanie zolu i po zajściu procesu sieciowania.
- Rysunek 37.** Mikrofotografie SEM otrzymanych hydrożeli.
- Rysunek 38.** Stopień pęcznienia w warunkach fizjologicznych dla otrzymanych materiałów.
- Rysunek 39.** Wartości kąta zwilżania [°] mierzonych na powierzchni otrzymanych materiałów.
- Rysunek 40.** Wartości modułu zachowawczego G' dla materiałów, osiągnięte po 10, 40 i 65 minutach od rozpoczęcia pomiaru.
- Rysunek 41.** Zmiany masy hydrożeli ColChHA<sub>mod</sub> w obecności kolagenazy.
- Rysunek 42.** (A) Proliferacja komórek MG-63 po 1, 3 i 7 dniu hodowli na powierzchni badanych materiałów. (B) Aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) komórek MG-63 po 3 i 7 dniu hodowli na powierzchni badanych materiałów.
- Rysunek 43.** Mikrofotografie SEM przedstawiające morfologie komórek MG-63 hodowanych przez 3 dni na powierzchni badanych materiałów (A), wykres przedstawiający średnią powierzchnię komórek po 3 dniach hodowli na materiałach (B).
- Rysunek 44.** Schemat otrzymywania nośnika alendronianu w postaci układu SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN.
- Rysunek 45.** Mikrofotografie SEM cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap oraz SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN.
- Rysunek 46.** Dyfraktogramy (A), widma FTIR (B), widma XPS (C) oraz profile TG (D) dla cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap oraz SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN.
- Rysunek 47.** Schemat otrzymywania materiału hybrydowego z lekiem.
- Rysunek 48.** Mikrofotografie SEM otrzymanych materiałów.
- Rysunek 49.** Stopień pęcznienia w warunkach fizjologicznych dla otrzymanych materiałów.
- Rysunek 50.** Wartości kąta zwilżania [°] mierzonych na powierzchni otrzymanych materiałów.
- Rysunek 51.** Wartości modułu zachowawczego G' dla materiałów, osiągnięte po 10, 35 i 70 minutach od rozpoczęcia pomiaru.
- Rysunek 52.** Zmiany masy materiałów w obecności kolagenazy.
- Rysunek 53.** Profil uwalniania alendronianu (kumulatywnie) z materiału hybrydowego ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1.
- Rysunek 54.** Mikrofotografie SEM materiałów po 3 i 5 dniach inkubacji w SBF.
- Rysunek 55.** (A) Proliferacja komórek MG-63 po 1, 3 i 7 dniu hodowli na powierzchni badanych materiałów. (B) Aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) komórek MG-63 po 3 i 7 dniu hodowli na powierzchni badanych materiałów.
- Rysunek 56.** (A) Mikrofotografie SEM przedstawiające morfologie komórek MG-63 hodowanych przez 3 dni na powierzchni badanych materiałów. (B) Wykres przedstawiający średnią powierzchnię komórek po 3 dniach hodowli na materiałach.
- Rysunek 57.** Proliferacja komórek osteoklastopodobnych J774A.1 po 1, 3 i 7 dniu hodowli na powierzchni badanych materiałów.
- Rysunek 58.** (A) Zmiany objętości materiału ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1 po wstrzyknięciu pod skórę myszy (n = 5). (B) Fragmenty wyizolowanej skóry z pozostałościami wstrzykniętych materiałów po 1, 7, 30 i 60 dniach od podania pod skórę. (C) Mikrofotografia SEM materiału ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1 wyizolowanego ze skóry po 60 dniach od podania. Białymi okręgami zaznaczono apatyt zidentyfikowany za pomocą analizy EDS, białą strzałką wskazano naczynie krwionośne w materiale.
- Rysunek 59.** Zdjęcia materiału ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1 barwionego czerwieńią alizarynową. Ciemnopomarańczowe kropki oznaczają apatyt w materiale.
- Rysunek 60.** Analizy hematologiczne krwi myszy po podaniu materiałów – oznaczenie liczby białych i czerwonych krwinek, płytek krwi, granulocytów, limfocytów i monocytów, wartości hematokrytu, średnich objętości krwinki i stężenia hemoglobiny (n = 7). Myszom w grupie kontrolnej podano PBS.
- Rysunek 61.** (A) Analiza parametrów biochemii krwi myszy po podskórnym podaniu preparatów materiałów - stężenie azotu mocznika, fosfatazy alkalicznej, białka całkowitego, transaminazy alaninowej oraz kreatyniny (n = 7). Myszom w grupie

kontrolnej podano PBS. **(B)** Poziom cytokin w surowicy myszy po podaniu materiałów (n = 2-10). Mysiom w grupie kontrolnej podano PBS.

**Rysunek 62.** Materiały ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 **(A)** i ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1 **(B)** wybarwione trichromem Massona. Białe i ciemnoniebieskie strzałki wskazują na komórki odpornościowe – odpowiednio neutrofile i makrofagi.

**Rysunek 63.** Schemat przedstawiający układ eksperymentalny do prowadzenia badań dotyczących wpływu pola magnetycznego na hodowlę komórek.

**Rysunek 64.** Schemat otrzymywania SPION-CCh metodą współstrącania.

**Rysunek 65.** Mikrofotografia STEM nanocząstek SPION-CCh **(A)**, dyfraktogram XRD magnetytu oraz nanocząstek SPION-CCh **(B)**, widma Mössbauera w 80 K oraz 300 K dla SPION-CCh **(C, D)**.

**Rysunek 66.** Hydrożel ColCh z możliwością dopasowania się do kształtu ubytku.

**Rysunek 67.** Schemat otrzymywania hydrożeli magnetycznych.

**Rysunek 68.** Rozkłady czasów relaksacji T<sub>2</sub> dla hydrożeli Ch **(A)**, ColCh 25:75 **(B)** i ColCh 50:50 **(C)** uzyskane w dniu 0, 3, 7 oraz 14 od przygotowania próbek oraz rozkłady czasów relaksacji T<sub>2</sub> dla próbki ColCh 25:75 z genipiną oraz bez zmierzone w dniu przygotowania **(D)**.

**Rysunek 69.** Rozkłady współczynników dyfuzji wody D dla wszystkich otrzymywanych hydrożeli oraz próbki ColCh 25:75 bez genipiny zmierzone w dniu przygotowania próbek **(A)** oraz wartości D dla badanych hydrożeli w dniu przygotowania **(B)**, w 3 dniu **(C)** oraz w 14 dniu **(D)** od przygotowania.

**Rysunek 70.** Zmiany transmitancji w czasie (7 dni) względem wysokości próbki ColCh 25:75 **(A)**, ColCh 25:75 S1 **(B)** oraz ColCh 25:75 zawierającej sedymentujące agregaty nanocząstek **(C)**.

**Rysunek 71.** Usieciowane próbki hydrożeli ColCh 25:75 **(A)**, ColCh 25:75 S1 **(B)** oraz ColCh 25:75 zawierającej sedymentujące agregaty nanocząstek **(C)**.

**Rysunek 72.** Zmiany transmitancji w czasie (7 dni) dla wszystkich badanych hydrożeli.

**Rysunek 73.** Mikrofotografie SEM **(A)** i STEM **(B)** otrzymywanych hydrożeli magnetycznych. W niebieskich elipsach zaznaczone łańcuchy SPION-CCh, niebieskie strzałki wskazują włóknistą strukturę kolagenu.

**Rysunek 74.** Obrazy AFM/MFM dla badanych hydrożeli – topografia (3D po lewej), obraz fazowy (środkowe prostokąty) oraz faza magnetyczna (dolne prostokąty).

**Rysunek 75.** Zdjęcia prezentujące przyciągnięty hydrożel do magnesu stałego.

**Rysunek 76.** Pętla histerezy magnetycznej dla SPION-CCh **(A)** oraz hydrożeli magnetycznych Ch S1 **(B)**, ColCh 25:75 S1 **(C)** i ColCh 50:50 S1 **(D)**.

**Rysunek 77.** Pole koercji w zależności od temperatury dla badanych nanocząstek i hydrożeli magnetycznych.

**Rysunek 78.** Znormalizowana pochodna magnetyzacji (różniczkowa podatność) w funkcji pola magnetycznego w 300 K **(A)**, 200 K **(B)**, 100 K **(C)** i 4 K **(D)** dla nanocząstek i hydrożeli magnetycznych.

**Rysunek 79.** Krzywe ZFC/FC dla nanocząstek SPION-CCh **(A)** i dla hydrożeli magnetycznych **(B)**.

**Rysunek 80.** **(A)** Stopień pęcznienia (SR) hydrożeli po 24 godzinach inkubacji. **(B)** Zmiany masy pomiędzy hydrożelem spęczniałym (24 godziny w PBS) i suchym. **(C)** Zmiany masy hydrożeli podczas 30 dni inkubacji w PBS.

**Rysunek 81.** Wartości modułu zachowawczego G' dla materiałów, osiągnięte po 3 dniach od rozpoczęcia procesu sieciowania.

**Rysunek 82.** Prolifercja komórek MG-63 po 1 i 3 dniu hodowli na powierzchni badanych materiałów.

**Rysunek 83.** Mikrofotografie SEM powierzchni hydrożeli z komórkami MG-63 po 3 dniach hodowli.

**Rysunek 84.** **(A)** Prolifercja komórek MG-63 hodowanych na powierzchni hydrożeli ColCh 25:75 po 1, 3 i 7 dniu hodowli bez pola magnetycznego oraz w obecności pola o wartościach 500 Oe oraz 2000 Oe. **(B)** Prolifercja komórek MG-63 hodowanych na powierzchni hydrożeli magnetycznych ColCh 25:75 S1 po 1, 3 i 7 dniu hodowli bez pola magnetycznego oraz w obecności pola o wartościach 500 Oe oraz 2000 Oe.

**Rysunek 85.** Zdjęcia wydrukowanych rusztowań po sieciowaniu końcowym z użyciem genipiny oraz TPP.

**Rysunek 86.** Schemat otrzymywania rusztowań 3D.

**Rysunek 87.** Struktura rusztowań ColCh 25:75 MC9 **(A)** oraz ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 MC9 **(B)** zaraz po wydrukowaniu i po 1 dniu inkubacji w PBS.

**Rysunek 88.** Krzywe lepkości w zależności od szybkości ścinania dla past na bazie materiałów ColCh 25:75 MC9 z dodatkiem SPION-CCh (A) oraz z dodatkiem SiO<sub>2</sub> i SiO<sub>2</sub>-Ap w stężeniach C1 i C2 (B).

**Rysunek 89.** Wartości modułu Younga dla rusztowania ColCh 25:75 MC9 po 20 minutach i 24 godzinach sieciowania końcowego z użyciem 10% TPP.

**Rysunek 90.** Fotografie struktury rusztowań 3D (A) oraz zmiany szerokości pasm rusztowań (B) w trakcie inkubacji HPLM przez 21 dni.

**Rysunek 91.** Rusztowanie ColCh 25:75 MC9 S1 składające się z 30 warstw.

**Rysunek 92.** Zmiany masy rusztowań 3D bazie materiałów ColCh 25:75 MC9 z dodatkiem SPION-CCh (A) oraz z dodatkiem SiO<sub>2</sub> i SiO<sub>2</sub>-Ap w stężeniach C1 i C2 (B) podczas inkubacji w HPLM przez 21 dni.

**Rysunek 93.** Mikrofotografie SEM otrzymanych rusztowań 3D.

**Rysunek 94.** Obrazy z mikroskopu konfokalnego rusztowań ColCh 25:75 MC9 S1 z komórkami hTERT-MSK –14 dzień hodowli komórkowej na rusztowaniu, które powstało przez drukowanie mieszaniny komórek z biopolimerową pastą (A), 3 dzień hodowli komórek wysianych na gotowe rusztowanie (B). Kanał zielony – komórki żywe, kanał czerwony – komórki martwe.

## Spis tabel

**Tabela 1.** Zestawienie wszystkich otrzymywanych hydrożeli.

**Tabela 2.** Reagenty użyte do otrzymania SBF.

**Tabela 3.** Wyniki XPS pierwiastkowego składu powierzchni (%) dla sfunkcjonalizowanych grupami aminowymi cząstek krzemionkowych.

**Tabela 4.** Wartości średnicy hydrodynamicznej ( $d_z$ ), współczynnika dyspersji ( $DI$ ), potencjału zeta ( $\zeta$ ) oraz parametrów porozymetrycznych: powierzchnia całkowita ( $S_{BET}$ ), objętość ( $V_{mes}$ ) i średnica ( $D_{mes}$ ) mezoporów dla sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionki.

**Tabela 5.** Zestawienie otrzymywanych materiałów.

**Tabela 6.** Wartości kątów zwilżania mierzonych na powierzchni otrzymanych materiałów.

**Tabela 7.** Stosunek Ca/P wyznaczony techniką EDS dla fazy mineralnej utworzonej na powierzchni materiałów po 7-dniowej inkubacji w SBF.

**Tabela 8.** Zestawienie otrzymywanych hydrożeli.

**Tabela 9.** Objętość porów i porowatość procentowa hydrożeli.

**Tabela 10.** Wartości modułu zachowawczego  $G'$  dla materiałów, osiągnięte po 10, 40 i 65 minutach od rozpoczęcia pomiaru.

**Tabela 11.** Ilość komórek bakteryjnych (*S. aureus* i *E. coli*) obecnych na powierzchni hydrożeli po 4 godzinach inkubacji.

**Tabela 12.** Wyniki analizy XPS dla cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap oraz SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN.

**Tabela 13.** Zestawienie otrzymywanych materiałów.

**Tabela 14.** Wartości parametrów uzyskanych z dopasowania danych eksperymentalnych uwalniania ALN z ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1 dla trzech zastosowanych modeli matematycznych: Higuchiego, Ritgera-Peppasa i Weibulla.  $Q_t$  – ilość uwolnionego leku w czasie  $t$ ,  $K_H$ ,  $K_{RP}$  – stałe szybkości uwalniania,  $n$  – wykładnik dyfuzyjny,  $a$ ,  $b$  – stałe równania Weibulla,  $R^2$  – współczynnik determinacji.

**Tabela 15.** Wartości średnicy hydrodynamicznej ( $d_z$ ) i potencjału zeta ( $\zeta$ ) dla nanocząstek SPION-CCh.

**Tabela 16.** Zestawienie otrzymywanych hydrożeli.

**Tabela 17.** Wartości kątów zwilżania dla powierzchni badanych hydrożeli.

**Tabela 18.** Zestawienie otrzymywanych rusztowań biopolimerowych oraz parametry drukowania.

**Tabela 19.** Stabilność wydrukowanych i usieciowanych rusztowań przez pierwsze dni po wydrukowaniu w różnych mediach - PBS, DMEM i HPLM, – oznacza niestabilność, + oznacza stabilność.



## Wstęp

Celem niniejszej interdyscyplinarnej pracy doktorskiej było zaprojektowanie, otrzymanie i scharakteryzowanie bioaktywnych nanokompozytów, potencjalnie przydatnych jako rusztowania (skafoldy) do hodowli komórkowych dla potrzeb inżynierii tkankowej, w szczególności do regeneracji tkanki kostnej. Rosnące zapotrzebowanie na uzupełnianie ubytków kostnych, będących wynikiem postępujących procesów starzenia, chorób przewlekłych czy wypadków sprawia, że tematyka przeprowadzonych badań dobrze wpisuje się w obecny trend poszukiwania alternatywy dla tradycyjnych przeszczepów, które wiążą się z wieloma ograniczeniami. Ograniczenia te mogą zostać wyeliminowane dzięki postępującemu rozwojowi inżynierii tkankowej kości oraz badań dotyczących preparatyki rusztowań komórkowych. Opracowane w ramach pracy doktorskiej nanokompozyty składały się z hydrożelowej matrycy otrzymywanej z polimerów pochodzenia naturalnego, w której rozpraszone były wyselekcjonowane komponenty nieorganiczne, tworząc stabilne strukturalnie materiały o pożądanym właściwościach, zależnych od składu i wpływających korzystnie na efektywność regeneracji tkanki kostnej. Chemicznie sieciowana hydrożelowa matryca stanowiła podstawową organiczną część nanokompozytów, pełniącą funkcję substytutu naturalnego rusztowania komórkowego, czyli macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM – *extracellular matrix*). Do jej otrzymywania zastosowano kolagen, kwas hialuronowy i chitozan, które są powszechnie wykorzystywane w inżynierii tkankowej ze względu na to, że są elementami budulcowymi macierzy zewnątrzkomórkowej (kolagen, kwas hialuronowy) oraz wykazują strukturalne podobieństwo do naturalnych składowych tejże macierzy (chitozan). Czynnikiem sieciującym używanym w tych układach była genipina, nietoksyczna substancja pochodzenia naturalnego. Skład matryc hydrożelowych był optymalizowany poprzez testowanie różnych zawartości poszczególnych biopolimerów, jak i stężeń genipiny. W kolejnych etapach prowadzonych badań do wybranych matryc hydrożelowych wprowadzono komponenty nieorganiczne w celu otrzymania funkcjonalnych nanokompozytów. Rozwijane były dwie główne koncepcje: (1) hybrydowy materiał hydrożelowy bazujący na matrycy hydrożelowej z rozproszonymi cząstkami krzemionki do zastosowań w formie wstrzykiwalnej oraz (2) hybrydowy magnetyczny materiał hydrożelowy bazujący na matrycy hydrożelowej z rozproszonymi nanocząstkami magnetycznymi do zastosowań w formie gotowej usieciowanej struktury. Pierwszy wariant zakładał rozproszenie w matrycy hydrożelowej cząstek krzemionki jako fazy bioaktywnej stymulującej odbudowę tkanki kostnej. Bioaktywność jako zdolność do tworzenia bezpośredniego wiązania z tkanką

gospodarza należy do jednej z najważniejszych właściwości, jakie powinny spełniać materiały stosowane w inżynierii tkankowej. Cząstki krzemionki mogą nadać lub poprawić właściwości bioaktywne materiałów ze względu na możliwość formowania się na jej powierzchni apatytu, co można zweryfikować w środowisku symulującym ludzkie osocze (SBF – *simulated body fluid*). Co więcej, w ramach pracy doktorskiej cząstki krzemionki były funkcjonalizowane powierzchniowo grupami aminowymi w celu ich kowalencyjnego przyłączenia do hydrożelowej sieci polimerowej, wykorzystując fakt, że genipina posiada zdolność do sieciowania w obecności pierwszorzędowych grup aminowych. Podejście to jest niezwykle istotne z aplikacyjnego punktu widzenia, gdyż „unieruchomienie” cząstek w matrycy polimerowej pozwoli wyeliminować separację fazową i niekontrolowaną migrację cząstek w warunkach *in vivo*. Kolejnym etapem prowadzonych badań było wykorzystanie cząstek krzemionki z wytworzoną na ich powierzchni fazą apatytową jako nośnik alendronianu sodu – leku stosowanego m.in. w leczeniu osteoporozy. Tworzenie nośnika było możliwe dzięki silnemu powinowactwu alendronianu sodu do apatytu, a jego dodatek do polimerowej matrycy miał na celu wzmocnić właściwości terapeutyczne opracowywanego rusztowania w kierunku leczenia osteoporozy. Drugim wariantem rozwijanym w ramach pracy doktorskiej było rozproszenie w matrycy hydrożelowej nanocząstek magnetycznych, co nadaje rusztowaniom właściwości magnetyczne, potencjalnie umożliwiając wykorzystanie pozytywnego wpływu zewnętrznego pola magnetycznego, wzmocnionego obecnością nanocząstek, na regenerację tkanki kostnej. Fazę magnetyczną stanowiły w tym podejściu superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza (SPION) otrzymywane metodą współstrącania. Nanocząstki były pokrywane kationową pochodną chitozanu, która miała pełnić funkcję ochronną przed zjawiskiem agregacji nanocząstek i pozwalać na kowalencyjne przyłączenie do polimerowej matrycy. Dzięki temu możliwe jest otrzymanie biozgodnego i stabilnego strukturalnie hydrożelu magnetycznego, co jest ważne w kontekście wpływu czynników zewnętrznych, a w szczególności pola magnetycznego. Zarówno materiały hydrożelowe z cząstkami na bazie krzemionki, jak i hydrożele magnetyczne były poddawane badaniom mającym na celu określenie ich właściwości fizykochemicznych oraz biologicznych, które są istotne z punktu widzenia potencjalnego zastosowania w inżynierii tkankowej. Finalnym etapem badań w ramach pracy doktorskiej było wykorzystanie techniki druku przestrzennego (3D) do otrzymania rusztowań o dobrze zdefiniowanej i stabilnej trójwymiarowej strukturze. W tym celu opracowano biopolimerowe pasty, które mogły pełnić rolę atramentów w procesie drukowania 3D metodą ekstruzji. Do wybranych past wprowadzano wcześniej opracowane cząstki krzemionkowe i nanocząstki magnetyczne,

a następnie przetestowano takie materiały pod kątem możliwości wytworzenia stabilnego konstruktów 3D. Podejście to jest odpowiedzią na rosnące obecnie zainteresowanie i znaczenie druku 3D w inżynierii tkankowej i umożliwia zwiększenie potencjału aplikacyjnego otrzymywanych materiałów.

Powyższe założenia badawcze pracy doktorskiej zostały sformułowane na podstawie dostępnej literatury oraz wieloletnich doświadczeń i prowadzonych badań w tematyce biomateriałów i nanostruktur przez członków Zespołu Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów Wydziału Chemii UJ, Katedry Fizyki Ciała Stałego Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH oraz The Centre for Translational Bone, Joint and Soft Tissue Research, należącego do Uniwersytetu Technicznego w Dreźnie. Autorka rozprawy wykorzystowała także doświadczenie w otrzymywaniu materiałów hydrożelowych zdobyte podczas realizacji swojej pracy magisterskiej w Zespole Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów Wydziału Chemii UJ pod kierunkiem dr hab. Joanny Lewandowskiej-Łańcuckiej, prof. UJ. **W oparciu o aktualny stan badań i doświadczenia zdobyte w trakcie własnej pracy badawczej Autorka sformułowała hipotezę, że możliwym jest zaprojektowanie i otrzymanie bioaktywnych nanokompozytów przydatnych jako rusztowania do hodowli komórkowych dla potrzeb inżynierii tkankowej kości.**

# WPROWADZENIE

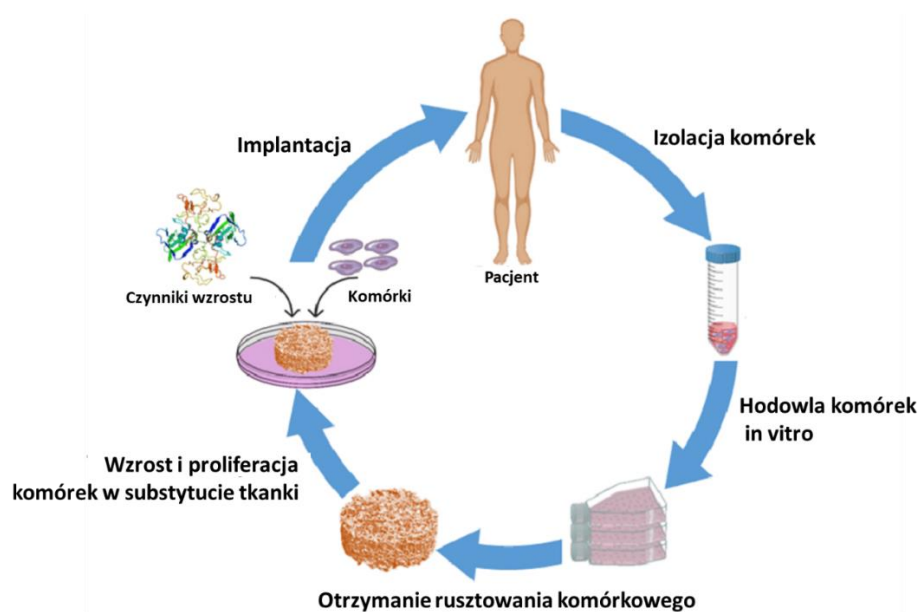
## 1. Inżynieria tkankowa w medycynie regeneracyjnej

Rozwój medycyny regeneracyjnej oraz badania nad nowoczesnymi metodami wspomagającymi procesy naprawcze w organizmie są motywowane rosnącą zapadalnością na choroby przewlekłe w globalnie starzejącym się społeczeństwie. Według raportu Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) z 2020 roku, choroby przewlekłe są przyczyną ponad 70% wszystkich zgonów na świecie, a czynnikami wpływającymi na zachorowalność są m.in. palenie tytoniu, brak aktywności fizycznej i niezdrowa dieta [1]. Dodatkowo jednym z najważniejszych problemów z punktu widzenia współczesnej medycyny jest postępujące starzenie się społeczeństwa. Na początku 2019 roku w krajach Unii Europejskiej (UE) żyło 90,5 miliona osób starszych (w wieku 65 lat i więcej), co stanowiło około jedną piątą ogółu ludności (20,3%). Przewiduje się, że w najbliższych dekadach ich udział w całej populacji mieszkańców UE będzie stopniowo wzrastał i osiągnie 29,4% w 2050 roku [2]. Dane te pokazują, jak istotne jest poszukiwanie i wdrażanie skutecznych rozwiązań w dziedzinie medycyny regeneracyjnej, zapewniających lepszy komfort życia i poprawiających obecną opiekę zdrowotną. Zdolność do regeneracji organizmu jest możliwa, jednakże dla większości tkanek potencjał regeneracyjny jest ograniczony do wczesnych etapów życia [3]. Medycyna regeneracyjna koncentruje się na naprawie, wymianie bądź regeneracji komórek, tkanek lub narządów w celu przywrócenia zaburzonej funkcji, wynikającej z choroby bądź urazu. Termin medycyny regeneracyjnej został wprowadzony w 1999 roku przez Williama Haseltine na podstawie badań nad komórkami macierzystymi oraz pojawienia się inżynierii tkankowej. W literaturze można spotkać wymienne używanie terminów medycyny regeneracyjnej i inżynierii tkankowej, jednakże medycyna regeneracyjna jest szerszym pojęciem, w którym zawierają się różne podejścia i ich kombinacje wykraczające poza tradycyjną transplantologię, takie jak terapia genowa, terapia przy użyciu komórek macierzystych i progenitorowych czy właśnie inżynieria tkankowa [4].

Pierwsze udane eksperymenty, które przyczyniły się do powstania inżynierii tkankowej, były prowadzone od lat 70. XX wieku i dotyczyły przeszczepów skóry [5]. W 1979 roku Howard Green izolował keranocyty z materiału pochodzącego z biopsji skóry pacjenta i opracował technikę ich hodowli, która pozwalała na tworzenie się struktury mającej potencjał do uzupełniania ubytków naskórka. Badania te doprowadziły do opracowania produktu o nazwie

Epicel, który stosuje się w leczeniu oparzeń skóry [5][6]. Innym przykładem był materiał do regeneracji skóry opracowany w 1981 roku przez Eugene Bella. Produkt ten opierał się na żelu kolagenowym z wysianymi fibroblastami, który następnie był podłożem do hodowli keranocytów. Materiał ten z powodzeniem był przeszczepiany pacjentom, wypełniając ubytek i utrzymując się w obrębie ran [7]. Za kluczowy moment narodzin inżynierii tkankowej uważa się współpracę chirurga Josepha Vacantiego oraz profesora MIT Roberta S. Langer. W 1988 roku opublikowane zostały ich przełomowe badania dotyczące projektowania rusztowań dla komórek. Różne rodzaje komórek zostały wysiane na biodegradowalne polimery – poliglaktynę 910 (kopolimer poliglikolidu i polilaktydu, 9:1), polibezwodniki i poliortoester. Po kilku dniach hodowli matryce polimerowe z komórkami były wszczepiane zwierzętom [8]. Pięć lat później, w 1993 roku ukazał się artykuł w *Science*, w którym Langer i Vacanti przedstawili definicję nowej dziedziny, jaką jest inżynieria tkankowa. Definicja ta jest nadal stosowana i według niej inżynierię tkankową określa się jako interdyscyplinarną dziedzinę łączącą inżynierię z naukami przyrodniczymi, której głównym celem jest otrzymanie materiału biologicznego, umożliwiającego zastąpienie, przywrócenie lub podtrzymanie podstawowych funkcji uszkodzonych tkanek bądź całych narządów [9]. Taki materiał biologiczny powinien naśladować naturalne środowisko komórek, a regeneracja czy wzrost nowej funkcjonalnej tkanki może odbywać się w warunkach *in vitro* lub *in vivo*. Naturalna tkanka składa się z komórek oraz otaczającej je macierzy zewnątrzkomórkowej ECM (ang. *extracellular matrix*), w której działają mechanizmy sygnalizacji międzykomórkowej. Technologie inżynierii tkankowej odwzorowują strukturę naturalnej tkanki poprzez zastosowanie trzech zależnych od siebie elementów, nazywanych triadą inżynierii tkankowej. Są to odpowiednio zaprojektowane rusztowanie będące wsparciem dla komórek, komórki integrujące się z tym rusztowaniem oraz różnego rodzaju czynniki wzrostu czy bioreaktory pozwalające na pożądane zachowanie komórek [10]. Połączenie komórek z rusztowaniem może odbywać się poprzez wysianie komórek *in vitro* na rusztowaniu lub implantację samego rusztowania jako systemu dostarczającego czynniki wzrostu bądź leki i zasiedlenia go przez komórki organizmu. Podejścia te można z powodzeniem łączyć [11]. Cały proces regeneracji tkanek w inżynierii tkankowej przebiega w kilku etapach (**Rysunek 1**). Na początek pobiera się poprzez biopsję fragment zdrowej tkanki pacjenta, z której izolowane są komórki. Komórki są namnażane w warunkach *in vitro*, a następnie wysiewane na wcześniej otrzymanych rusztowaniach. Wzrost i proliferacja komórek na materiale są wspierane poprzez zapewnienie odpowiednich warunków hodowli oraz

obecności różnych czynników wzrostu. Ostatnim etapem jest implantacja gotowego substytutu tkanki w miejsce ubytku [12].

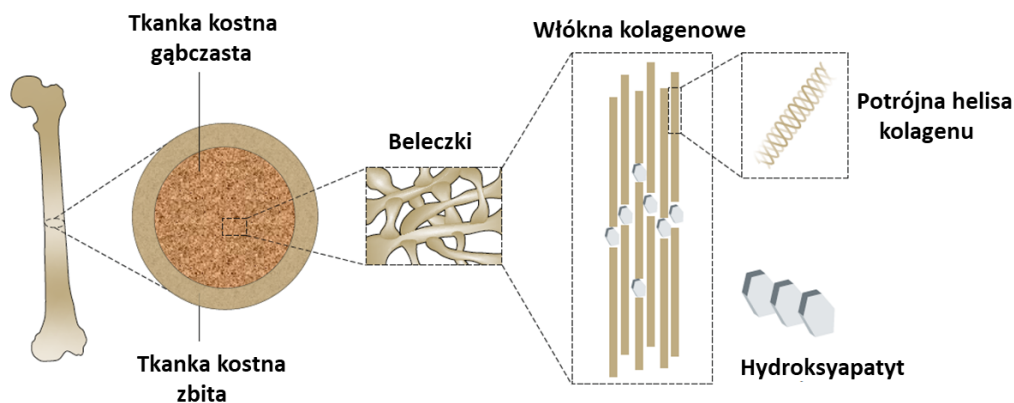


Rysunek 1. Etapy inżynierii tkankowej [12].

### 1.1. Inżynieria tkankowa kości

Wydłużająca się średnia długość życia i starzejące się społeczeństwo przyczyniają się do szybkiego wzrostu zaburzeń i chorób układu mięśniowo-szkieletowego takich jak złamania, skolioza, osteoporoza, nowotwory kości czy choroba zwyrodnieniowa stawów, co jest ogromnym wyzwaniem dla opieki zdrowotnej i współczesnej ortopedii. Tkanka kostna jest drugą po krwi najczęściej przeszczepianą tkanką na świecie [13]. Złotym standardem stały się autologiczne przeszczepy kostne, które polegają na uzupełnianiu ubytku tkanką pobraną z innego miejsca w obrębie tego samego organizmu. Na skuteczność tego rodzaju przeszczepu wpływa niskie ryzyko odrzucenia i biokompatybilność, jednak poważnym ograniczeniem tej metody jest możliwość leczenia tylko niewielkich ubytków. Istnieje także ryzyko wystąpienia dolegliwości w miejscu pobrania, które często musi zostać poddane dodatkowym zabiegom chirurgicznym. Innym rodzajem stosowanych przeszczepów są przeszczepy allogeniczne, w ramach których przeszczepiany materiał pochodzi od innych dawców, co jest szansą dla pacjentów niekwalifikujących się do przeszczepu autologicznego. Zagrożeniem, jakie niesie ze sobą to rozwiązanie jest możliwość przeniesienia patogenów od dawcy oraz odrzucenie immunologiczne [14]. W przypadku kości długich stosowane są też implanty metalowe w formie płytek i śrub, kiedy kluczowe jest podparcie mechaniczne

i zapewnienie stabilności. Problemem w zastosowaniach implantów metalowych może być ich tendencja do tworzenia niedostatecznie silnych wiązań z tkanką gospodarza [15]. Alternatywą dla obecnych metod leczenia, które są obarczone wieloma ograniczeniami, jest inżynieria tkankowa kości. Ważnym aspektem dla projektowania rusztowań komórkowych dla tkanki kostnej jest jej hierarchiczna struktura (**Rysunek 2**). Tkanka kostna jest naturalnym nanokompozytem, który składa się z części organicznej (głównie kolagen typu I), części nieorganicznej (głównie hydroksyapatyt) oraz komórek kostnych. Kolagen zapewnia tkance wytrzymałość na rozciąganie, a hydroksyapatyt sztywność przy ściskaniu. Komórkami kostnymi są osteoblasty (komórki kościotwórcze), osteocyty (komórki dojrzałej tkanki kostnej), osteoklasty (komórki kościogubne) oraz komórki osteoprogenitorowe (preosteoblasty) [16].



**Rysunek 2.** Hierarchiczna struktura kości [17].

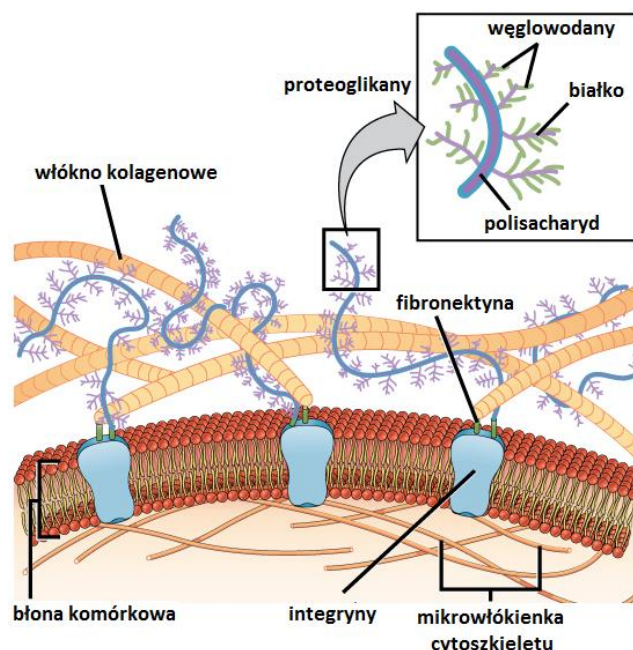
Głównym celem inżynierii tkankowej kości jest opracowanie rusztowań, które uwzględniają fizyczną strukturę oraz funkcje białkowych, mineralnych i komórkowych składników kości tak, aby ułatwić i wspomóc wzrost nowej tkanki kostnej oraz przywrócić jej funkcjonalność. Podczas projektowania materiału należy również wziąć pod uwagę miejsce ubytku, stan zdrowia pacjenta i sposób dostarczenia substytutu tkanki dla optymalnego dostosowania właściwości strukturalnych i funkcjonalnych [17]. Biorąc pod uwagę rozwój inżynierii tkankowej kości na przestrzeni ostatnich lat, można wyróżnić podejścia kładące większy nacisk na aspekt biologiczny oraz te, które skupiają się głównie na inżynierii. W podejściach opartych na biologii najważniejsze jest zrozumienie aktywności komórkowej i zachodzących procesów biochemicznych, które mają wpływ na regenerację tkanki. Przykładem mogą być badania dotyczące wpływu białek morfogenetycznych BMP na procesy regeneracji tkanki

kostnej. Obserwowano przyspieszone formowanie się tkanki w rusztowaniach na bazie polikaprolaktonu oraz fosforanu wapnia z obecnym białkiem BMP-2, ale nowo utworzona kość wykazywała podobne właściwości strukturalne w porównaniu do rusztowań bez BMP-2 [18]. W przypadku podejść opartych na inżynierii, działania koncentrują się na strukturalnych i mechanicznych właściwościach rusztowań. Przykładem są badania nad poprawą wytrzymałości materiałów ceramicznych poprzez stosowanie powłok polimerowych bądź tworzenie wzajemnie przenikających się struktur polimerowych i ceramicznych. Takie rozwiązania pozwalają na zachowanie porowatości i bioaktywności z jednoczesnym wzmocnieniem właściwości mechanicznych i możliwością dostarczania leków lub czynników wzrostu [19]. Obecnie coraz więcej uwagi poświęca się na rozwój metod łączących wiedzę z obszarów biologii i inżynierii, co poprawia szanse otrzymania optymalnego rusztowania, które może reagować na bodźce środowiskowe, naśladować żywą tkankę i jednocześnie być wytrzymałe na obciążenia [20].

## 2. Macierz zewnątrzkomórkowa

Macierz zewnątrzkomórkowa (ECM) jest niekomórkową strukturą obecną we wszystkich tkankach i narządach, stanowiąc naturalne rusztowanie dla komórek. Odpowiada nie tylko za wsparcie mechaniczne i strukturalne, ale bierze również udział w wielu procesach komórkowych. Obecne w ECM czynniki wzrostu, cytokiny czy enzymy rozkładające macierz mają znaczący wpływ na regulację funkcji i fenotypu komórek. Komórki natomiast przebudowują i przekształcają strukturę ECM, dzięki czemu możliwa jest ich migracja, proliferacja i różnicowanie [21]. Skład ECM jest zróżnicowany i zależy od rodzaju tkanki, jednakże zasadniczymi jej składnikami są glikozaminoglikany (GAG) oraz białka włókniste, takie jak kolagen, elastyna, fibronektyna i laminina (**Rysunek 3**). Glikozaminoglikany są nierozgałęzionymi polisacharydami zbudowanymi z powtarzających się jednostek disacharydów. Są kowalencyjnie związane z białkami, tworząc proteoglikany, które uważa się za istotne w chemicznej sygnalizacji komórkowej. Najprostszym glikozaminoglikanem jest kwas hialuronowy [22]. Dominującą formą białek włóknistych w ECM jest kolagen, a w szczególności kolagen typu I. Włókna kolagenu zapewniają integralność strukturalną tkanki, ale odgrywają też rolę w procesach migracji i adhezji komórek. Z kolagenem związane jest inne białko włókniste – elastyna, która umożliwia rozciągliwość. Fibronektyna oraz laminina biorą udział m.in. w procesie adhezji komórka-ECM, za co odpowiedzialne jest wiązanie się z integrynami, które są kluczowymi białkami adhezyjnymi [23].





**Rysunek 3.** Struktura macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM). Źródło: *khanacademy.org*

W zdrowej tkance ECM jest niezbędna dla prawidłowego funkcjonowania komórek, dlatego też naukowcy starają się wykorzystać ten fakt do projektowania sztucznych rusztowań w ramach inżynierii tkankowej, dążąc do jak najwierniejszego naśladowania struktury oraz funkcji naturalnej macierzy.

### 3. Rusztowania komórkowe

#### 3.1. Wymagania stawiane materiałom do zastosowań w inżynierii tkankowej

Rusztowania komórkowe (skafoldy) są jednym z kluczowych elementów triady inżynierii tkankowej, a ich projektowanie i otrzymywanie należy do głównych kierunków badawczych w obszarze biomateriałów. Optymalne rusztowanie powinno opierać się na materiale, który byłby idealnym zamiennikiem naturalnej macierzy ECM, tak więc ma ono spełniać funkcje analogiczne jak ECM. Należy jednak podkreślić, że złożony skład i funkcje ECM są niezwykle trudne do całkowitego odtworzenia [24]. W ciągu ostatnich trzech dekad ukazało się wiele prac dotyczących materiałów naśladowujących (przynajmniej częściowo) naturalną macierz zewnątrzkomórkową. Materiały przydatne dla inżynierii tkankowej mają z założenia być wprowadzane do żywego organizmu i łączyć się z otaczającą tkanką gospodarza. Aby mogły one z powodzeniem przejąć funkcje ECM, muszą spełnić szereg wymagań, jakie są powszechnie stawiane materiałom implantacyjnym:

- 1) biogodność - podstawowa cecha, jaką powinny się charakteryzować biomateriały, rusztowanie nie może być cytotoksyczne, komórki muszą adherować i migrować w obrębie rusztowania oraz mieć możliwość wzrostu i różnicowania zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Po implantacji rusztowania oczekuje się znikomej reakcji immunologicznej, co minimalizuje ryzyko odrzucenia.
- 2) architektura – kluczowy parametr dla inżynierii tkankowej, rusztowanie musi zapewnić wolną przestrzeń dla unaczynienia i tworzenia się nowej tkanki w trakcie przebudowy. Materiał powinien charakteryzować się wysoką porowatością i systemem wzajemnie połączonych porów, co umożliwia penetrację komórkową oraz dyfuzję składników odżywczych w obrębie rusztowania, jak i dyfuzję zbędnych produktów na zewnątrz. Jednocześnie porowatość determinuje właściwości mechaniczne rusztowania, które są osłabiane wraz z rosnącym rozmiarem porów, dlatego też na etapie projektowania rusztowania powinno się dążyć do zachowania balansu pomiędzy zdolnościami transportowymi, aktywnością komórkową i strukturalną stabilnością [25].
- 3) bioaktywność – materiał ma oddziaływać z otaczającą tkanką gospodarza i posiadać zdolność do bezpośredniego wiązania się z nią. W przypadku inżynierii tkankowej kości rusztowanie powinno posiadać właściwości osteokondukcyjne czy też osteoindukcyjne. Rusztowania osteokondukcyjne są korzystnymi podłożami do formowania się tkanki kostnej, zapewniając powierzchnię dla adhezji, migrowania i wzrostu komórek. Właściwości osteokondukcyjne są zależne od trójwymiarowej struktury oraz porowatości rusztowania [26]. W przypadku rusztowań osteoindukcyjnych kluczowe jest występowanie procesów na poziomie komórkowym, obejmujących różnicowanie się mezenchymalnych komórek macierzystych lub osteoprogenitorowych w kierunku osteoblastów, czyli tworzenia się kości. Istotną rolę w tym mechanizmie odgrywa obecność białek morfogenetycznych kości (BMP) [27].
- 4) biodegradowalność – rusztowanie powinno ulegać degradacji, umożliwiając komórkom syntezę nowej tkanki, która docelowo całkowicie wypełni przestrzeń po zdegradowanym rusztowaniu. Szybkość degradacji powinna być dostosowana do szybkości procesu regeneracji. Dodatkowo istotnym jest, aby produkty pochodzące z degradacji nie były szkodliwe dla organizmu i mogły zostać z niego wydalone.
- 5) właściwości mechaniczne – rusztowanie powinno zapewniać mechaniczną stabilność i kształt dostosowany do rodzaju tkanki. Jak wspomniano już w podpunkcie dotyczącym architektury, uzyskanie pożądaných właściwości mechanicznych może

wiązać się z pogorszeniem stopnia porowatości, co jest problemem w szczególności rusztowań dla tkanki kostnej. Potrzebny jest zatem balans pomiędzy tymi dwiema właściwościami.

- 6) technologia produkcji – otrzymywanie rusztowań komórkowych powinno być możliwe na większą skalę w zależności od potrzeb, z jednoczesnym zachowaniem wszystkich niezbędnych standardów gwarantujących jakość produktu. Zoptymalizowane powinny być także koszty produkcji oraz sposób dostarczania rusztowań lekarzom i jednostkom zajmującym się implantacją. Powyższe kwestie mają kluczowe znaczenie w komercjalizacji i w zastosowaniach klinicznych [28].

### **3.2. Biomateriały stosowane do otrzymywania rusztowań komórkowych**

Rozwój i otrzymywanie nowych typów biomateriałów jest niezbędne dla postępu inżynierii tkankowej i medycyny regeneracyjnej. Definicja biomateriałów zmieniała się i ewoluowała na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat. Pierwsza powszechnie akceptowana definicja zaprezentowana w 1982 roku podczas Consensus Development Conference mówiła, że biomateriał to „każda inna substancja niż lek albo kombinacja substancji syntetycznych lub naturalnych, która może być użyta w dowolnym czasie, a której zadaniem jest uzupełnianie lub zastąpienie tkanek, narządu lub jego części w celu spełnienia ich funkcji” [29]. Początkowo skupiano się na tym, aby biomateriały miały właściwości fizyczne dopasowane do miejsca implantacji i nie były toksyczne dla organizmu. Należą one do pierwszej generacji biomateriałów, czyli materiałów bioinertnych. Druga generacja biomateriałów obejmuje materiały bioaktywne, które są zdolne do oddziaływania z tkanką gospodarza i ulegają biodegradacji w trakcie procesu regeneracji. Współczesna inżynieria tkankowa dąży do tego, aby biomateriały były nie tylko bioaktywne, ale także stymulowały regenerację tkanki na poziomie molekularnym i wywoływały określone reakcje komórkowe. Takie materiały należą do trzeciej generacji biomateriałów [30]. Na podstawie dotychczasowych osiągnięć w obszarze trzeciej generacji biomateriałów oraz ciągłego poszerzania wiedzy na temat sygnalizacji bioelektrycznej między komórkami postuluje się rozwój kolejnych generacji biomateriałów [31].

Do otrzymywania skafoldów przydatnych w inżynierii tkankowej powszechnie wykorzystuje się różne rodzaje biomateriałów, takie jak metale, ceramika, polimery czy kompozyty. Metale i ich stopy są typowymi przedstawicielami biomateriałów pierwszej generacji, cechującymi się dobrymi właściwościami mechanicznymi, ale słabą integracją z tkanką gospodarza.

Wraz z rozwojem następnych generacji biomateriałów, stawiających na bioaktywność, bioresorbowalność i wsparcie dla regeneracji, materiały ceramiczne oraz polimery stały się typowymi materiałami badanymi pod kątem wykorzystania w inżynierii tkankowej [32].

### 3.2.1. Ceramika

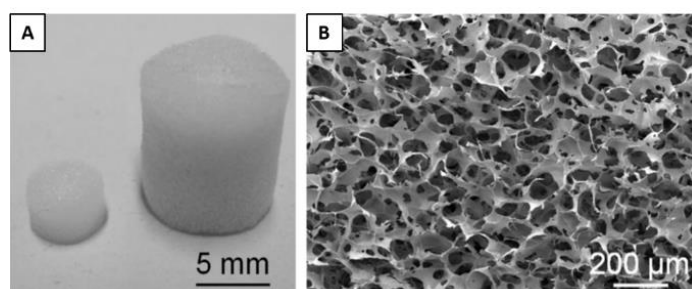
Materiały ceramiczne są znane i stosowane w medycynie od wielu lat jako materiały implantacyjne, powszechnie wykorzystuje się je do badań w inżynierii tkankowej kości. Największą popularnością cieszy się bioceramika fosforanowo-wapniowa, a zwłaszcza hydroksyapatyt (HAp), ortofosforan (V) wapnia (TCP) oraz ceramika dwufazowa (BCP). Jest to spowodowane ich podobieństwem pod względem struktury i składu chemicznego do fazy mineralnej kości. Materiały te są wysoce biozgodne i bioaktywne, dzięki czemu tworzą bezpośrednie wiązanie z tkanką gospodarza, dodatkowo posiadają właściwości osteokondukcyjne i możliwość osiągnięcia osteoindukcyjności [33]. Syntetyczny HAp ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) charakteryzuje się stosunkiem molowym wapnia do fosforu równym 1,67 i jest najbardziej zbliżoną fazą fosforanu wapnia do naturalnego apatyty kostnego. Z powodzeniem jest stosowany jako wypełniacz kostny oraz w formie powłok na metalowych protezach. Wykazano, że porowate rusztowania na bazie HAp wspierają tworzenie się kości w warunkach *in vivo* [34]. Jednak wykorzystanie HAp, a także pozostałych fosforanów wapnia do otrzymywania rusztowań komórkowych jest ograniczone ze względu na ich niedostateczne właściwości mechaniczne i związane z tym kruchość i sztywność. Dodatkowo w przypadku HAp występują problemy z kontrolą jego resorpcji [35].

Inną grupą materiałów, która zyskuje na znaczeniu w inżynierii tkankowej są bioaktywne szkła. Posiadają zdolność do wiązania się z kością i tworzenia jej integralnej części, dzięki czemu możliwa jest regeneracja. Rusztowania na bazie bioaktywnych szkieł mogą wspierać odkładanie się warstwy apatytowej, aktywność osteoblastów w warunkach *in vitro*, jak i tworzenie się kości w warunkach *in vivo* [36]. Podobnie jak w przypadku bioceramiki fosforanowo-wapniowej, główną wadą bioaktywnych szkieł są kruchość i niska odporność na pękanie [37].

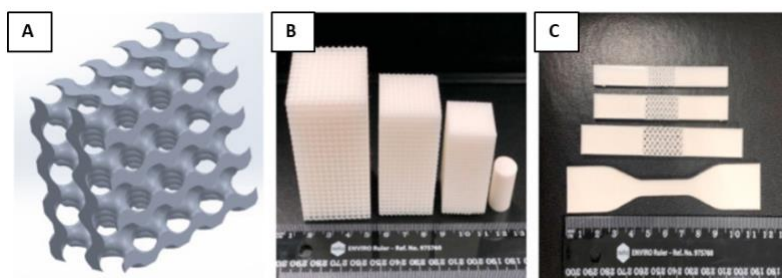
### 3.2.2. Polimery

Postęp współczesnej medycyny jest istotnie związany z zastosowaniem polimerów jako biomateriałów. Materiały polimerowe są wykorzystywane do produkcji narzędzi i aparatury medycznej, ale także mogą stanowić budulec elementów, które łączą się bezpośrednio

z organizmem, zarówno z jego wewnętrznymi, jak i zewnętrznymi strukturami. Z powodzeniem można stosować je do projektowania systemów dostarczania leków oraz skafoldów na potrzeby inżynierii tkankowej. Różnorodna i możliwa do modyfikacji struktura chemiczna wpływa na ich szeroki zakres użyteczności. Szczególnie dużym zainteresowaniem w zastosowaniach biomedycznych cieszą się polimery biodegradowalne ze względu na to, że mogą być usunięte z organizmu po spełnieniu swojej funkcji bez dodatkowych zabiegów chirurgicznych [38]. Dzieli się one na polimery pochodzenia naturalnego oraz syntetycznego. Polimery naturalne, pozyskiwane z mikroorganizmów, roślin i zwierząt, są powszechnie używane do projektowania rusztowań komórkowych, a do najczęściej stosowanych należą białka, takie jak kolagen (**Rysunek 4**) i żelatyna oraz polisacharydy, do których zalicza się chitozan, kwas hialuronowy czy alginian. Ich głównymi zaletami są nietoksyczność, biologiczna aktywność i możliwość degradacji przez enzymy. Czynnikiem, które stanowią problem w aspekcie ich wykorzystania w inżynierii tkankowej są ograniczona kontrola nad wytwarzaniem, wrażliwość na temperaturę czy też ryzyko przeniesienia chorób na organizm ludzki z innych gatunków [39]. Alternatywnym rozwiązaniem, które umożliwia wyeliminowanie tych problemów jest użycie polimerów syntetycznych. W tym przypadku można w łatwy sposób kontrolować właściwości fizykochemiczne, a uzyskane materiały mogą być stosunkowo niedrogo w produkcji. Najczęściej stosowanymi polimerami syntetycznymi są poliglikolid (PGA), polilaktyd (PLA, **Rysunek 5**), polikaprolakton (PCL) i ich kopolimery. Poważnym ograniczeniem w wykorzystaniu tego typu polimerów jest często niedostateczna interakcja z komórkami i utrudnienie dla ich adhezji, spowodowane hydrofobowymi właściwościami polimerów [40].



**Rysunek 4.** Skafoldy z kolagenu pozyskiwanego z meduz, przydatne do regeneracji chrząstki [41].



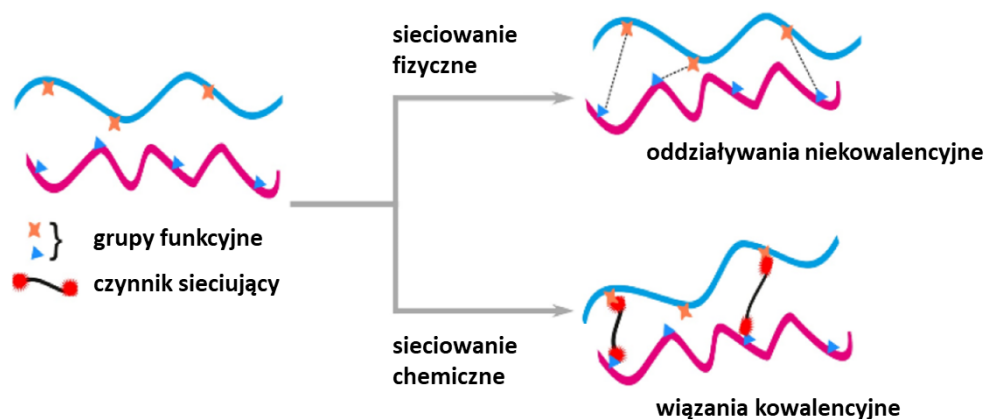
**Rysunek 5.** Model 3D (A) oraz skafoldy na bazie PLA (B, C) przydatne dla inżynierii tkankowej kości [42].

Biorąc pod uwagę, że wiele polimerowych biomateriałów charakteryzuje się niedostatecznymi właściwościami dla zastosowań medycznych, ciągle trwają prace nad udoskonaleniem metod otrzymywania. Jedną z metod zapewniających poprawę jakości i odgrywającą znaczącą rolę w dziedzinie inżynierii tkankowej jest sieciowanie polimerów, prowadzące do otrzymania hydrożeli [43].

#### 4. Hydrożele

Termin „hydrożel” pierwszy raz pojawił się w literaturze naukowej już 1894 roku i określał koloidalny żel soli nieorganicznych [44]. Początkiem intensywnego rozwoju hydrożeli o znaczeniu, jakie jest znane obecnie, była praca Wichterle’a i Lima opublikowana w *Nature* w 1960 roku. Dotyczyła ona syntezy oraz właściwości hydrofilowych żeli na bazie 2-hydroksyetylo-metakrylanu (pHEMA) do zastosowania w produkcji miękkich soczewek kontaktowych [45]. Hydrożele definiuje się jako struktury składające się z trójwymiarowych sieci polimerów oraz wody, która wypełnia przestrzeń między makrocząsteczkami. Zdolność do pochłaniania dużej ilości wody wynika z obecności grup hydrofilowych, takich jak  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-OH$ ,  $-CONH_2$ ,  $-CONH$  czy  $-SO_3H$ , przy jednoczesnym zachowaniu struktury dzięki chemicznemu lub fizycznemu usieciowaniu poszczególnych łańcuchów polimerowych [46]. Pęcznienie w środowisku wodnym, duża zawartość wody i związana z tym elastyczność oraz możliwość dyfuzji substancji odżywczych są kluczowymi właściwościami, dzięki którym hydrożele mają ogromny potencjał w zastosowaniach biomedycznych, w szczególności jako alternatywna struktura dla naturalnych tkanek [47]. Woda w hydrożelach może występować w różnych stanach – silnie lub słabo związana z siecią polimerową oraz w stanie niezwiązanym. Zawartość wody zmienia się podczas pęcznienia bądź kurczenia hydrożelu pod wpływem takich czynników zewnętrznych jak temperatura, pH czy siła jonowa [48].

Hydrożele są klasyfikowane ze względu na różne parametry, z których jednym z głównych jest mechanizm sieciowania. Do podstawowych mechanizmów sieciowania łańcuchów polimerowych należą sieciowanie fizyczne oraz sieciowanie chemiczne (**Rysunek 6**). Hydrożele sieciowane fizycznie uzyskuje się dzięki interakcjom międzycząsteczkowym, do których zaliczają się oddziaływania jonowe, wiązania wodorowe, krystalizacja czy oddziaływania hydrofobowe lub hydrofilowe [49][50][51]. Sieciowanie fizyczne może nieść korzyści dla zastosowań biomedycznych ze względu na brak dodatkowych chemicznych czynników sieciujących, które mogą być potencjalnie cytotoksyczne oraz możliwości projektowania hydrożeli reagujących na pożądane bodźce zewnętrzne [52]. Sieciowanie chemiczne natomiast polega na tworzeniu się silnych kowalencyjnych wiązań w strukturze hydrożeli. Hydrożele chemiczne mogą być otrzymywane poprzez zastosowanie cząsteczek sieciujących, które zawierają grupy funkcyjne odpowiedzialne za tworzenie połączeń między łańcuchami polimerowymi, wykorzystywane są również substancje światłoczułe oraz reakcje katalizowane enzymatycznie [53][54][55]. Przewagą hydrożeli chemicznych nad hydrożelami fizycznymi może być ich większa stabilność strukturalna w warunkach fizjologicznych, lepsze właściwości mechaniczne i możliwość dostosowania stopnia degradacji [52].



**Rysunek 6.** Schemat dwóch głównych mechanizmów sieciowania hydrożeli – fizyczny i chemiczny [56].

Hydrożele są klasyfikowane także ze względu na pochodzenie polimerów (naturalne, syntetyczne, hybrydowe), ładunek jonów (kationowe, anionowe, niejonowe), otrzymywanie (homopolimery, kopolimery, wzajemnie przenikające się sieci polimerowe) czy odpowiedź na bodźce (temperatura, światło, pole magnetyczne i elektryczne, pH, enzymy) [57].

Szereg pożądanych właściwości hydrożeli czyni je atrakcyjnymi materiałami do zastosowań biomedycznych i w farmacji, obecnie na rynku dostępnych jest wiele produktów na ich bazie.

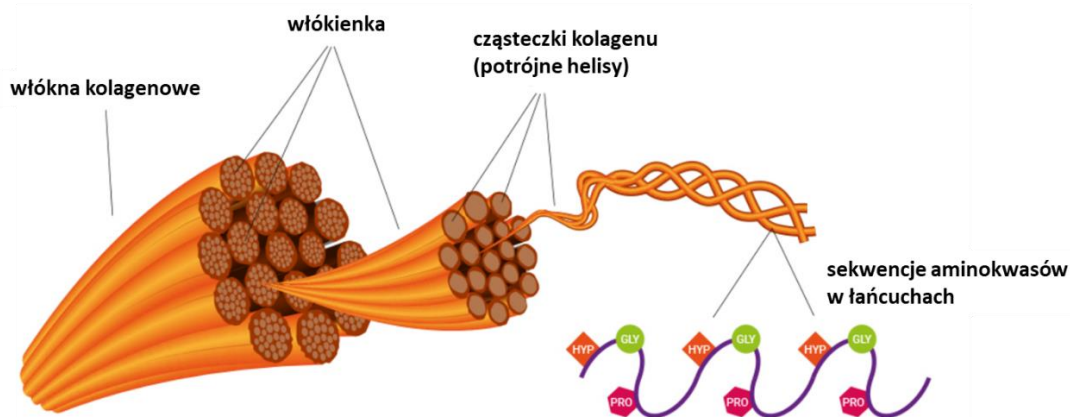
Hydrożele odgrywają ważną rolę w projektowaniu systemów dostarczania leków. Porowata matryca może stanowić efektywny nośnik dla leków, a ich uwalnianie może być kontrolowane poprzez czynniki, takie jak pH czy temperatura [58][59]. Dużą popularnością cieszą się hydrożelowe opatrunki na rany. Hydrożele mogą zapewnić nawilżenie w miejscu rany, wymianę gazową ze środowiskiem zewnętrznym, absorpcję płynów biologicznych czy też efekt chłodzący. Ponadto są wygodne w aplikacji. Przykładami produktów dostępnych na rynku są opatrunki ALGISITE® M (Smith & Nephew) na bazie alginianu czy HELIX3-CM® (Amerx Health Care) na bazie kolagenu [60]. Kolejnym istotnym obszarem dla zastosowania hydrożeli są soczewki kontaktowe, których intensywny rozwój został zapoczątkowany za sprawą przytoczonej wcześniej pracy Wichterle'a i Lima. Aby materiał hydrożelowy mógł być wykorzystany do otrzymywania soczewek kontaktowych powinien być przepuszczalny dla tlenu, wystarczająco przezroczysty, zapewniać stabilność hydrolityczną i być komfortowy w użytkowaniu. Przełomem w technologii soczewek kontaktowych okazało się zastosowanie do ich produkcji materiału silikonowo-hydrożelowego, a jednym z najpopularniejszych produktów tego typu na rynku są soczewki ACUVUE® OASYS (Johnson & Johnson) [61]. Hydrożele należą także do jednego z najczęściej wybieranych typów biomateriałów do zastosowań w inżynierii tkankowej. Ich ogromny potencjał jako rusztowań wynika ze zdolności do utrzymania stabilnej struktury, zapewniającej mechaniczne wsparcie dla komórek, możliwość dostarczania i kontrolowanego uwalniania czynników wzrostu oraz fizyczną integrację z uszkodzoną tkanką, a wysoka zawartość wody pozwala na naśladowanie naturalnej tkanki. Istotna dla efektywności regeneracji jest także metoda wprowadzenia do organizmu, coraz większym zainteresowaniem w tym zakresie cieszą się hydrożele w formie wstrzykiwalnej. Wstrzyknięcie pozwala na zminimalizowanie inwazyjności zabiegu, dotarcie do głębiej położonych ubytków oraz dokładne wypełnienie uszkodzonego miejsca [62][63][64]. Hydrożele stanowią dużą grupę materiałów wykorzystywanych do projektowania rusztowań na potrzeby regeneracji tkanki kostnej. Ich zaletą w stosowaniu do ubytków kostnych jest zdolność do żelowania w warunkach *in situ* czy możliwość wypełnienia ubytku nawet bez wystarczającej wytrzymałości mechanicznej, właściwości te mogą być poprawiane dzięki dostarczaniem przez hydrożele substancjom bioaktywnym, lekom czy czynnikom wzrostu [65]. **W niniejszej pracy otrzymywano hydrożele oparte na biopolimerach – kolagenie, chitozanie i kwasie hialuronowym, mogące służyć jako rusztowania komórkowe do regeneracji tkanki kostnej.**



## 4.1. Polimery użyte do otrzymywania hydrożeli

### 4.1.1. Kolagen

Kolagen jest białkiem strukturalnym, będącym głównym składnikiem macierzy zewnątrzkomórkowej większości tkanek łącznych ssaków. Występuje m.in. w kościach, chrząstkach czy skórze, a jego zasadniczą funkcją jest zapewnienie stabilności i strukturalnej integralności tkanek, ale również oddziaływanie na adhezję, wzrost i różnicowanie komórek poprzez interakcję ze specyficznymi receptorami. Procesy starzenia mają znaczący wpływ na strukturę kolagenu, wraz z wiekiem zwiększa się jego stopień usieciowania oraz zmniejsza rozpuszczalność w wodzie [66][67]. Charakterystyczną cechą strukturalną białek kolagenowych jest tworzenie się prawoskrętnej helisy, która stanowi pojedynczą cząsteczkę włókienek kolagenu (**Rysunek 7**). Helisę tworzą trzy lewoskrętne łańcuchy polipeptydowe skręcone wokół własnej osi. Każdy łańcuch polipeptydowy zawiera powtarzającą się sekwencję  $(\text{Gly-X-Y})_n$ , gdzie Gly to glicyna, a X i Y to inne dowolne aminokwasy. Najczęściej jednak za X podstawiona jest prolina, a za Y hydroksyprolina. Kolagen jest syntezowany w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, a proces ten jest wieloetapowy i obejmuje formowanie się cząsteczek tropokolagenu, które tworzą mikrowłókienka i następnie włókienka, które finalnie składają się w dojrzałe włókno kolagenowe [68].



**Rysunek 7.** Struktura kolagenu [69].

Supramolekularna struktura jest obecna w całej rodzinie białek kolagenowych, jednakże jej rozmiar, funkcje i rozmieszczenie mogą być różne. Do tej pory opisano prawie 30 odrębnych typów kolagenu, które dodatkowo pogrupowano ze względu na różnorodność strukturalną.

Główne grupy to:

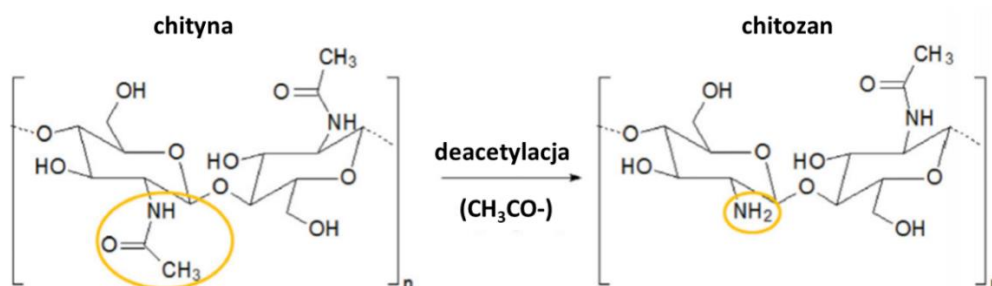
- kolageny fibrylarne (I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII)
- kolageny niefibrylarne, wśród których można wyróżnić:
  - kolageny FACITs (ang. *Fibril-associated Collagens with Interrupted Triple helices*, IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII)
  - kolageny tworzące układy sieciowe (IV, VIII, X)
  - kolageny zawierające domeny transbłonowe (XIII, XVII, XXIII, XXV) [70].

Największym zainteresowaniem cieszą się kolageny z grupy fibrylarnych, stanowią one zdecydowaną większość wszystkich białek kolagenowych, jakie występują u zwierząt. Wśród nich najczęściej występującym typem kolagenu jest typ I, składa się on na ponad 90% organicznej masy kości, występuje również w skórze, ścięgnach, ścianach naczyń krwionośnych czy rogówce. Dominującymi strukturami budującymi helisę kolagenu typu I są heterotrimery, utworzone z dwóch identycznych łańcuchów  $\alpha 1(I)$  i jednego  $\alpha 2(I)$ . Włókna kolagenowe są złożone z cząsteczek kolagenu typu I często razem z mniejszą frakcją cząsteczek kolagenu typu III, V i XI [71].

Kolagen jest atrakcyjnym biomateriałem do zastosowań w szerokim zakresie medycyny regeneracyjnej, zarówno w konstrukcji sztucznych narządów, jak i inżynierii tkankowej. Uważany jest za jeden z najważniejszych materiałów w regeneracji tkanki łącznej ze względu na swoją hydrofilowość, doskonałą biokompatybilność, wywoływanie minimalnej reakcji zapalnej, elastyczność oraz biodegradowalność. Wykorzystanie kolagenu koncentruje się na zastosowaniach w regeneracji kości, skóry i gojeniu ran. Powszechnie biomateriały na bazie kolagenu występują w dwóch głównych formach – odkomórkowanych matryc kolagenowych, zachowujących pierwotny kształt tkanki i strukturę ECM oraz funkcjonalnych rusztowań, tworzonych poprzez ekstrakcję, oczyszczanie i polimeryzację [72]. W inżynierii tkankowej dużą popularnością cieszą się kolagenowe hydrożele. Głównym ograniczeniem w ich wykorzystaniu jako rusztowań jest zbyt szybki proces degradacji oraz słabe właściwości mechaniczne. Efektywnym podejściem minimalizującym te wady jest stosowanie różnych metod sieciowania. Jedną z najbardziej popularnych metod jest sieciowanie chemiczne kolagenu z użyciem aldehydu glutarowego, który jest wysoce reaktywnym i niedrogim czynnikiem sieciującym, jednakże mogą występować problemy z jego cytotoksycznością [73][74][75].

#### 4.1.2. Chitozan

Chitozan jest biopolimerem, będącym pochodną chityny. Chityna jest drugim po celulozie najczęściej występującym naturalnie polisacharydem, syntezowanym przez organizmy żywe. Ma postać uporządkowanych krystalicznych mikrowłókien, będących składnikami budulcowymi egzoszkieletu stawonogów czy ścian komórkowych grzybów i drożdży. Głównym źródłem chityny dla celów komercyjnych są skorupki krabów i krewetek. Jest związkiem o słabej rozpuszczalności, co jest głównym czynnikiem ograniczającym jej praktyczne zastosowanie. Chitozan jest najważniejszą pochodną chityny, mający większy potencjał w obszarze biomedycyny ze względu na lepszą rozpuszczalność w wodzie o niskim pH i w niektórych rozpuszczalnikach organicznych [76]. Otrzymuje się go poprzez deacetylację chityny na drodze procesów enzymatycznych bądź chemicznych, jednak preferowane są te drugie jako tańsze i bardziej przydatne w masowej produkcji (**Rysunek 8**). Chemiczna deacetylacja odbywa się poprzez poddawanie chityny działaniu stężonych wodorotlenków w wysokiej temperaturze. Uzyskany chitozan jest kopolimerem, składającym się z dwóch jednostek: 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glukopiranozy i 2-amino-2-deoxy- $\beta$ -glukopiranozy. Zawartość merów zdeacetylowanych z wolną grupą aminową wyraża stopień deacetylacji, który należy do kluczowych parametrów charakteryzujących chitozan. Chitozaniem nazywana jest chityna o stopniu deacetylacji powyżej 50%, staje się ona wtedy rozpuszczalna w kwaśnych roztworach wodnych. W takich warunkach grupy aminowe ulegają protonowaniu, dzięki czemu chitozan jest jedynym występującym naturalnie kationowym polisacharydem, co ma istotne znaczenie w oddziaływaniach z różnymi typami cząsteczek [77]. Może on tworzyć kompleksy z naturalnymi formami anionowymi, takimi jak lipidy, białka czy DNA. Występowanie w strukturze chitozanu grup aminowych oraz hydroksylowych sprawia, że możliwe jest stosowanie różnych reakcji modyfikujących oraz tworzenie silnych wiązań kowalencyjnych [78].



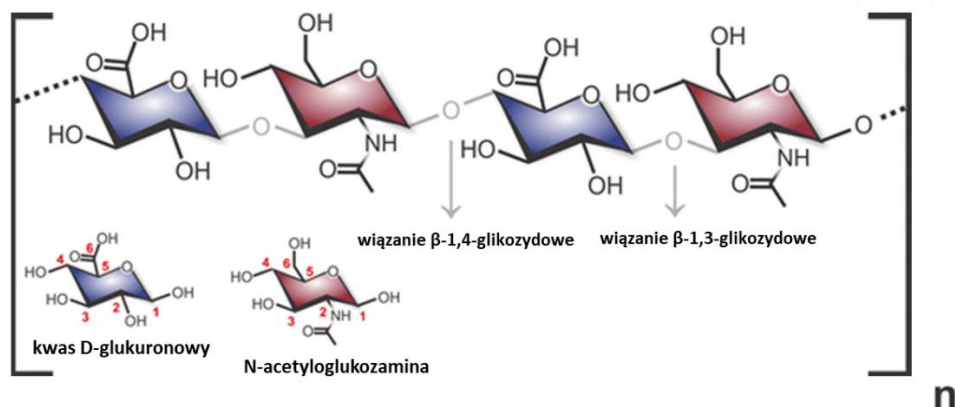
**Rysunek 8.** Struktura chityny i chitozanu [77].

Chitozan wzbudza ogromne zainteresowanie w kontekście zastosowań biomedycznych czy w przetwórstwie żywności ze względu na wiele korzystnych właściwości, takich jak biokompatybilność, nietoksyczność, biodegradowalność i doskonałe właściwości sorpcyjne. Szczególnie dużo uwagi poświęca się wykorzystaniu chitozanu jako środka przeciwdrobnoustrojowego, mogącego eliminować bakterie, wirusy i grzyby. Jego przewagą nad innymi środkami dezynfekującymi jest szerokie spektrum działania i wysoka aktywność przeciwdrobnoustrojowa przy zachowaniu stosunkowo niskiej toksyczności dla komórek ssaków. Chitozan jest powszechnie wykorzystywany w procesach konserwacji czy pakowania żywności, nie tylko w celach hamowania rozwoju mikroorganizmów, ale także aby poprawić jakość i trwałość żywności oraz istotnie przyczynić się do ograniczenia niebiodegradowalnego plastiku w środowisku [79]. Innym przykładem komercyjnego zastosowania chitozanu są opatrunki na rany. W porównaniu do tradycyjnych materiałów opatrunkowych, opatrunki na bazie chitozanu wykazują właściwości antybakteryjne oraz aktywnie uczestniczą w procesach gojenia. Na rynku dostępne są różne formy takich opatrunków, od gąbek po granulaty i żele. Przykładowymi produktami na bazie chitozanu są Chitoderm<sup>®</sup> plus (Trusetal) czy Opticell<sup>®</sup> (Medline) [80]. Chitozan jest także biopolimerem wykazującym strukturalne podobieństwo do glikozaminoglikanów naturalnie występujących w ECM, a jego hydrofilowy charakter wspiera adhezję, proliferację i różnicowanie różnych typów komórek. Dzięki temu należy do najczęściej wykorzystywanych polimerów naturalnych na potrzeby medycyny regeneracyjnej i inżynierii tkankowej. Stosuje się go w różnych formach, takich jak hydrożele, gąbki i włókna, do projektowania rusztowań dla regeneracji tkanki kostnej, skóry czy chrząstki [81][82][83]. Możliwość tworzenia wiązań kowalencyjnych dzięki wolnym grupom aminowym w strukturze promuje wykorzystanie chitozanu w formie wstrzykiwalnych hydrożeli, w szczególności dla zastosowań w inżynierii tkankowej kości. Takie hydrożele są często modyfikowane dodatkowymi składnikami w celu zoptymalizowania procesu sieciowania, poprawy właściwości mechanicznych czy zdolności regeneracyjnych [84][85][86].

#### **4.1.3. Kwas hialuronowy**

Kwas hialuronowy (HA) jest naturalnym polimerem o anionowym charakterze, zaliczanym do liniowych polisacharydów. Uważany jest za najbardziej wszechstronną makrocząsteczkę występującą w tkance łącznej wszystkich kręgowców. Po raz pierwszy został wykryty i wyizolowany z tkanek w 1934 roku przez Karla Meyera i Johna Palmera [87]. Składa się

z powtarzających się jednostek kwasu D-glukuronowego i N-acetyloglukozaminy, połączonych naprzemiennie wiązaniami  $\beta$ -1,3- i  $\beta$ -1,4-glikozydowymi (**Rysunek 9**). Jego masa cząsteczkowa mieści się w zakresie od  $10^4$  do  $10^7$  Da w zależności od miejsca występowania i funkcji. Jest najprostszym strukturalnie glikozaminoglikanem, a od innych GAG odróżnia go fakt, że nie tworzy wiązania kowalencyjnego z białkami i nie zawiera grup siarczanowych [88].



**Rysunek 9.** Struktura kwasu hialuronowego [89].

Duża masa cząsteczkowa i powiązane z nią specyficzne właściwości reologiczne rzutują na odgrywanie przez kwas hialuronowy ważnej roli w organizmach żywych i jednocześnie czynią go atrakcyjnym biomateriałem do zastosowań w medycynie. Największe ilości HA występują w ECM miękkich tkanek łącznych kręgowców, wykazano także jego obecność wewnątrz komórek. Niezwykle bogatym źródłem jego pozyskiwania są kogucie grzebienie, ale izoluje się go również z niektórych szczepów bakterii. W organizmie ludzkim HA występuje głównie w skórze, ale też w mazi stawowej, pępowinie czy ciele szklistym oka. Kwas ten ma wpływ na funkcjonowanie komórek, w tym ich proliferację i różnicowanie, aktywnie uczestniczy w procesach gojenia się ran. Jedną z jego najważniejszych cech jest zdolność wiązania wody, należy do najbardziej higroskopijnych związków występujących w naturze. Unieruchamianie przez HA wody w skórze wpływa na jej objętość i ściśliwość, dodatkowo ważną funkcją HA jest usuwanie wolnych rodników, które są tworzone przez światło ultrafioletowe [90].

Kwas hialuronowy znalazł wiele zastosowań w medycynie i przemyśle kosmetycznym. W związku z jego występowaniem w ciele szklistym oka jest kluczową substancją w okulistyce. Służy jako substytut dla utraconego płynu szklistego podczas operacji zaćmy czy przy implantacji soczewek [90]. HA może być dodawany do nawilżających kropli

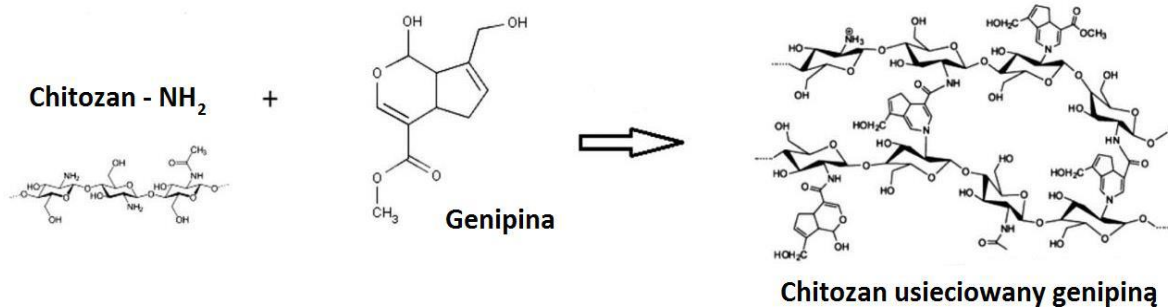
do oczu (sztuczne łzy), aby zwiększyć i przedłużyć czas nawilżenia, łagodząc przy tym dolegliwości związane z zespołem suchego oka. Komercyjnie dostępne krople z HA to np. Systane<sup>®</sup> Hydration (Alcon) czy Vismed<sup>®</sup> (TRB Chemedica) [91]. Oprócz okulistyki HA jest powszechnie wykorzystywany w terapiach zmniejszających ból w chorobie zwyrodnieniowej stawów, gdyż jest głównym glikozaminoglikanem w mazi stawowej. Produkty na bazie HA, takie jak HYALGAN<sup>®</sup> (Fidia Farmaceutici) czy ORTHOVISC<sup>®</sup> (Anika Therapeutics) występują w formie wstrzykiwalnej i mają za zadanie normalizację właściwości płynu stawowego [92]. Obecnie kwas hialuronowy należy do najpopularniejszych substancji aktywnych używanych w przemyśle kosmetycznym oraz w medycynie estetycznej. Kluczowe w tych obszarach są doskonałe właściwości nawilżające HA oraz jego zdolność do transportowania jonów i składników odżywczych, co jest niezbędne do zachowania dobrej kondycji skóry. HA oraz jego sole są składnikami nawilżających i przeciwstarzeniowych produktów do twarzy (kremy, maski, toniki), ale też antycellulitowych produktów do ciała. Pierwszym produktem z HA, który rozpoczął nową erę w pielęgnacji skóry, było kultowe serum Night Repair wprowadzone na rynek w 1982 roku przez Estée Lauder. Jeszcze lepsze rezultaty w wygładzie skóry daje wstrzykiwanie kwasu hialuronowego. Zabieg taki może efektywnie wypełnić zmarszczki, poprawić owal twarzy, kształt ust czy elastyczność skóry [93]. Kolejnym ważnym i ciągle rozwijającym się obszarem dla zastosowań kwasu hialuronowego jest projektowanie rusztowań na potrzeby inżynierii tkankowej. Wykorzystuje się w tym aspekcie fakt, że HA jest głównym węglowodanowym składnikiem ECM. Jednakże dużym ograniczeniem w stosowaniu HA jako materiału na rusztowania komórkowe są problemy ze stabilnością i mechaniczną integralnością w środowisku wodnym. Można temu zapobiec poprzez wykorzystanie obecności grup funkcyjnych w strukturze HA do chemicznych modyfikacji i sieciowania [94]. Do grup tych należą pierwszo- i drugorzędowe grupy hydroksylowe oraz grupy karboksylowe. Najczęściej modyfikacje i procesy sieciowania prowadzą do otrzymywania hydrożeli. Czynnikiem sieciującymi HA mogą być eter diglicydylowy poli(glikolu etylenowego), diwinylosulfon czy karbodiimidy. Ich stężenie wpływa na takie właściwości hydrożeli jak toksyczność, stopień pęcznienia, właściwości mechaniczne i reologiczne oraz szybkość degradacji [95][96][97].

#### **4.2. Genipina – czynnik sieciujący**

Proces sieciowania, czyli tworzenie fizycznych bądź chemicznych połączeń między łańcuchami polimerowymi jest prostą i powszechnie stosowaną metodą dla wzmocnienia właściwości polimerowych hydrożeli. Dobór czynnika sieciującego jest istotnym elementem

projektowania rusztowań, gdyż może wpływać na właściwości mechaniczne, zachowanie w różnych temperaturach, interakcje komórka-matryca, przepuszczalność gazów czy degradację. Doniesienia literaturowe wskazują, że spośród różnych metod sieciowania metody chemiczne należą do najpopularniejszych i najskuteczniejszych. Optymalny czynnik sieciujący powinien nie tylko poprawiać właściwości fizykochemiczne rusztowania, ale także powinien być nietoksyczny. Jednym z najczęściej wykorzystywanych środków sieciujących jest aldehyd glutarowy, jednakże w związku z pojawianiem się wielu, często sprzecznych wyników badań na temat jego cytotoksyczności, dużo uwagi kieruje się w stronę ekologicznych i naturalnych czynników sieciujących [98].

Genipina jest środkiem sieciującym naturalnego pochodzenia, który zyskuje na znaczeniu w inżynierii tkankowej. Jest to produkt hydrolizy genipozydu, który jest ekstrahowany z owoców gardenii jaśminowatej (*Gardenia jasminoides*). Roślina ta występuje głównie w południowych regionach Chin. Ekstrakt z jej owoców był stosowany w tradycyjnej medycynie chińskiej jako doustny lek pomocny przy stanach zapalnych, żółtacze i zaburzeniach wątroby, jest także traktowany jako lek ziołowy lub suplement diety w krajach orientalnych. Genipina jest bezbarwna, ale reagując z grupami aminowymi aminokwasów w obecności tlenu tworzy niebieskie pigmenty, które wykorzystywane są w przemyśle spożywczym. Wykazuje ona również właściwości przeciwzapalne, przeciwzakrzepowe, przeciwnowotworowe czy przeciwcukrzycowe [99]. Zdolność genipiny do reagowania z pierwszorzędowymi grupami aminowymi, naturalne pochodzenie, biodegradowalność i niska cytotoksyczność wpływa na jej coraz większą popularność jako czynnika sieciującego w wielu zastosowaniach biomedycznych, w tym w inżynierii tkankowej kości. Powszechnie stosuje się ją jako czynnik sieciujący dla chitozanu (**Rysunek 10**) i kolagenu, które zawierają w swojej strukturze pierwszorzędowe grupy aminowe [100][101][102].



**Rysunek 10.** Schemat sieciowania chitozanu genipiną [103].

Mechanizm reakcji genipiny ze związkami zawierającymi pierwszorzędowe grupy aminowe nie jest dokładnie wyjaśniony, w literaturze opisywane są różne podejścia tłumaczące ten proces. Jednym z nich jest mechanizm zaproponowany przez Butlera i współpracowników na podstawie wyników badań reakcji chitozanu, albuminy surowicy bydlęcej i żelatyny z genipiną. Według tej pracy dwie oddzielne reakcje prowadzą do wytworzenia wiązań kowalencyjnych. Szybsza i tym samym pierwsza z nich polega na nukleofilowym ataku pierwszorzędowej grupy aminowej biopolimeru na węgiel C3 genipiny, prowadząc do otrzymania heterocyklicznego związku genipiny połączonej z tym biopolimerem. Druga, wolniejsza reakcja polega na ataku nukleofilowym innej grupy aminowej na grupę metoksykarbonylową, tworząc drugorzędowe wiązanie amidowe z jednoczesnym uwalnianiem metanolu [104]. Mechanizm ten był akceptowany i potwierdzany później także przez innych badaczy [105][106]. Niezależnie jednak od sposobu wyjaśnienia procesu sieciowania genipina stała się niezwykle użytecznym, nietoksycznym czynnikiem sieciującym dla biopolimerów. **Wykorzystano ją także jako czynnik sieciujący hydrożeli otrzymywanych w ramach tej pracy.**

## 5. Nanokompozyty

Nanokompozyty cieszą się coraz większym zainteresowaniem w kontekście wykorzystania w medycynie regeneracyjnej i inżynierii tkankowej. Ich główną zaletą jest to, że mogą wiernie naśladować środowisko naturalne dla komórek i struktury, które w przyrodzie również są klasyfikowane jako nanokompozyty. Ponadto właściwości nanokompozytów mogą być modyfikowane i dostosowywane do konkretnych wymagań dla każdego rodzaju tkanki. Kombinacje różnych składników umożliwiają otrzymanie nanokompozytów o niepowtarzalnych cechach, których osobno te składniki nie wykazują [107]. Według ogólnej definicji nanokompozyt to wieloskładnikowy materiał, w którym przynajmniej jeden składnik ma co najmniej jeden wymiar w skali nanometrycznej. W literaturze występuje wiele różnych klasyfikacji nanokompozytów, bardzo często zestawiane są z materiałami hybrydowymi. Mianem materiałów hybrydowych określa się obecnie szeroki zakres produktów, co może utrudniać rozróżnienie hybryd od klasycznych kompozytów. Jedna z definicji mówi, że materiał hybrydowy to mieszanina składników organicznych i nieorganicznych połączonych na poziomie molekularnym. W zależności od rodzaju oddziaływań między tymi składnikami, materiały hybrydowe można podzielić na dwie grupy – klasę I, w której występują słabe oddziaływania typu elektrostatyczne, Van der Waalsa czy wiązania



wodorowe oraz klasę II, w której występują silne wiązania, takie jak jonowe czy kowalencyjne. W wielu przypadkach nanokompozyty należą do materiałów hybrydowych [108][109]. W tej pracy nanokompozyt jest rozumiany jako organiczno-nieorganiczny materiał hybrydowy, w którym przynajmniej jeden składnik rozproszony charakteryzuje się co najmniej jednym wymiarem w skali nanometrycznej [110][111]. Najczęściej nanokompozyty bazują na polimerowych matrycach, w których rozproszone są składniki pochodzenia nieorganicznego. Oczekuje się, że takie połączenie wzmocni właściwości fizykochemiczne i biologiczne nanokompozytów w porównaniu do właściwości samej matrycy polimerowej czy samych komponentów nieorganicznych. Poważnym problemem, mogącym pojawić się przy projektowaniu nanokompozytów, jest tendencja do aglomeracji komponentów nieorganicznych i związana z tym trudność w uzyskaniu stabilnego i równomiernego rozproszenia ich w matrycy polimerowej. Aby temu zapobiec stosuje się modyfikacje powierzchniowe, a pożądane nanokompozyty otrzymuje się poprzez zastosowanie różnych metod fizycznych i chemicznych. Wśród nich można wyróżnić mieszanie jako metodę fizyczną oraz metodę zol-żel i polimeryzację *in situ*, zaliczane do metod chemicznych [111].

W ostatnich latach nanokompozyty zyskują na znaczeniu jako rusztowania dla potrzeb inżynierii tkankowej, w szczególności te oparte na polimerowych hydrożelach. Wykorzystanie samych hydrożeli jako rusztowań komórkowych na ogół nie spełnia wszystkich wymagań stawianych materiałom implantacyjnym. Dodatek komponentów nieorganicznych do hydrożeli może znacząco poprawić funkcjonalność oraz zdolności regeneracyjne rusztowań [112]. W inżynierii tkankowej kości dużą popularnością cieszą się rusztowania na bazie biopolimerowych hydrożeli z dodatkiem hydroksyapatytu. Takie rusztowania mają jak najwierniej naśladować tkankę kostną, naturalny nanokompozyt, którego głównymi składnikami są kolagen i apatyt kostny. Biopolimerowe matryce z rozproszonym hydroksyapatytem mogą efektywnie wspierać regenerację tkanki kostnej, co wykazały badania zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [113][114][115][116]. Innymi komponentami nieorganicznymi umieszczanymi w hydrożelach są metale (m.in. Au), tlenki metali (np.  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) czy tlenki niemetalu (np.  $\text{SiO}_2$ ). Mogą one korzystnie wpływać na adhezję i wzrost komórek, ale też polepszać właściwości mechaniczne, bioaktywność, czułość na bodźce zewnętrzne czy stabilność skafoldów [117][118][119][120]. **W niniejszej pracy w matrycach hydrożelowych rozpraszano cząstki krzemionki oraz**

**superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza w celu uzyskania funkcjonalnych nanokompozytów.**

### **5.1. Cząstki krzemionki jako komponent nieorganiczny nanokompozytów**

Materiały zawierające krzem i jego związki stały się przedmiotem zainteresowania naukowców prowadzących badania w obszarze biomedycyny ze względu na pojawianie się licznych prac, wykazujących pozytywne działanie krzemu na tkankę łączną, a w szczególności jego rolę w naprawie kości i rozwoju szkieletu. Na początku lat 70. XX wieku w czasopiśmie *Science* opublikowano pracę Edith M. Carlisle, analizującą zawartość krzemu u młodych myszy i szczurów. Autorka wnioskuje, że krzem jest ważny w inicjowaniu mineralizacji, ponieważ występuje w dużej ilości w niedojrzałym osteoidzie, ale jego stężenie spada wraz ze wzrostem zawartości wapnia w dojrzałej kości [121]. Od tego czasu ukazują się liczne doniesienia literaturowe, które postulują znaczącą rolę krzemu w kościotworzeniu, jednakże mechanizm ten nie jest dokładnie poznany. Krzem wpływa na funkcjonowanie osteoblastów i stymuluje syntezę włókien kolagenowych. Korzystne działanie na tkankę kostną wzbudziło zainteresowanie krzemem jako dodatkowym suplementem diety obok wapnia i witaminy D. Krzem w postaci krzemionki ( $\text{SiO}_2$ ) jest powszechnym dodatkiem do żywności, występuje w preparatach wzmacniających skórę, włosy i paznokcie. Ze względu na biologiczną funkcję krzemu, w ostatnich dekadach szeroko badane są także biomateriały na bazie tego pierwiastka, takie jak bioaktywne szkła i ceramika krzemowa [122][123].

Amorficzna krzemionka w postaci nano-, submikro- i mikrocząstek jest atrakcyjnym materiałem dla inżynierii tkankowej i systemów do dostarczania leków, ponieważ można ją łatwo otrzymać w różnych kształtach i rozmiarach, jest chemicznie stabilna oraz może być poddawana modyfikacjom. Toksyczność cząstek krzemionki może być zależna od ich rozmiaru, właściwości powierzchniowych, kształtu czy ilości. Wykazano także, że cytotoksyczność może się różnić w zależności od zastosowanej linii komórkowej [124]. Ostatnio ukazały się badania, w których analizowano cząstki krzemionki o różnych kształtach (kuliste, pręty) oraz różnych rozmiarach (6 - 600 nm) i ich wpływ na funkcjonowanie makrofagów. Wyniki pokazały, że zarówno badane kształty, jak i rozmiar cząstek nie odgrywały istotnej roli w procesach komórkowych, o ile ich stężenie nie było zbyt wysokie [125]. Połączenie cząstek krzemionki z niektórymi czynnikami bioaktywnymi może stymulować różnicowanie osteogenne komórek macierzystych. Potwierdzono, że skafoldy

z cząstkami krzemionki skoniugowanymi z białkiem BMP-2 efektywniej wspierały początkowy etap różnicowania osteogennego komórek macierzystych tkanki tłuszczowej w porównaniu do skafoldów z samym BMP-2 bądź samymi cząstkami krzemionki [126]. Wzmocnienie efektu osteogenezy zaobserwowano także dla układu nanocząstek krzemionki połączonych z pochodną białka BMP-7 [127]. Rola samej krzemionki w procesie osteogenezy nie jest dokładnie poznana. Yang i współpracownicy zaobserwowali.in.in. znaczący wzrost aktywności fosfatazy alkalicznej (ALP) jako ważnego markera kościotworzenia w przypadku mezenchymalnych komórek macierzystych traktowanych nanocząstkami krzemionki. Wnioskowali, że wzmocnienie potencjału osteogennego takiego układu może być powiązane z uwolnieniem jonów krzemu z nanocząstek krzemionki w trakcie ich degradacji wewnątrz komórek [128].

Pozytywny efekt cząstek krzemionki na różnicowanie komórek w kierunku osteoblastów sprawił, że są one obiecującym materiałem dla inżynierii tkankowej kości. Mogą one być dodawane do polimerowych matryc, tworząc rusztowania dla komórek. Jedną z istotnych właściwości optymalnego rusztowania powinna być bioaktywność, która określa zdolność do mineralizacji. Większość materiałów polimerowych nie posiada właściwości bioaktywnych, dlatego też atrakcyjne staje się projektowanie nanokompozytów na bazie polimerowych matryc i bioaktywnej fazy nieorganicznej. Funkcję takiej bioaktywnej fazy mogą pełnić cząstki krzemionki [129]. Krzemionka jest kluczowym składnikiem w procesie biomineralizacji dzięki obecności na jej powierzchni grup silanolowych (Si-OH), które sprzyjają formowaniu się hydroksyapatytu w warunkach *in vivo*. Bioaktywność cząstek krzemionki jest zależna od ich ładunku powierzchniowego, składu i morfologii. Depozycję apatyty na powierzchni cząstek krzemionki obserwuje się w modelowych warunkach *in vitro* podczas inkubacji w symulowanym sztucznym osoczu (SBF, ang. *simulated body fluid*). Pierwszym etapem nukleacji apatyty jest adsorpcja jonów wapnia na powierzchni zawierającej grupy silanolowe, a następnie ich łączenie się z jonami fosforanowymi, co prowadzi do wytworzenia się warstwy apatytovej na powierzchni krzemionki [130][131]. Cząstki krzemionki dodawane do biopolimerowych hydrożeli mogą zatem korzystnie wpływać na regenerację tkanki kostnej. Wykazano, że dodatek cząstek krzemionki do hydrożeli na bazie kolagenu i chitozanu wzmacnia bioaktywność i biokompatybilność rusztowania [132] oraz umożliwia otrzymanie kompozytu o samoistnych właściwościach osteoindukcyjnych, czego dowiedziono w badaniach *in vitro* z użyciem ludzkich komórek macierzystych [133]. W innej pracy potwierdzono, że nanocząstki krzemionki wzmacniają

właściwości mechaniczne hydrożeli opartych na fibroinie jedwabiu oraz wspierają proces osteogenezy zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* [134].

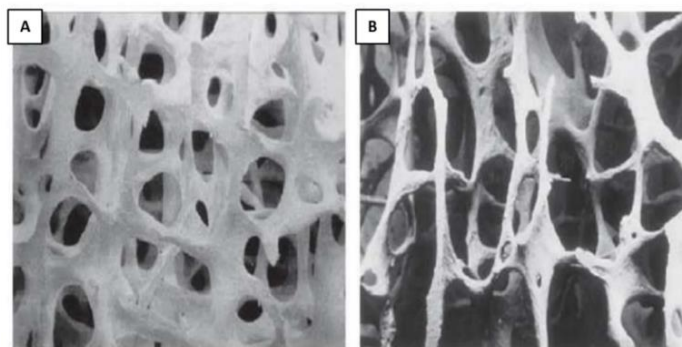
## **5.2. Wielofunkcyjne nanokompozyty przydatne w leczeniu osteoporozy**

### **5.2.1. Osteoporoza**

Osteoporoza jest najczęstszą chorobą układu kostnego, WHO klasyfikuje ją jako chorobę cywilizacyjną. Jedna na trzy kobiety i co najmniej jeden na sześciu mężczyzn dozna w swoim życiu złamania osteoporotycznego. Według szacunków w UE ponad 23 miliony osób jest narażonych na wysokie ryzyko zachorowania na osteoporozę. Schorzenie to jest nie tylko problemem zdrowotnym, ale także socjoekonomicznym, ponieważ miliony złamań osteoporotycznych oraz związane z nimi rehabilitacja i opieka nad osobami niepełnosprawnymi kosztuje europejskie systemy opieki zdrowotnej ponad 56 miliardów euro rocznie (dane z 2019 roku). Każdego roku w Europie złamanie biodra lub kręgosłupa przyczynia się do śmierci prawie ćwierć miliona osób [135]. Udział osteoporozy wśród innych chorób nasila się ze względu na starzejące się społeczeństwo większości krajów rozwiniętych, w tym krajów UE. Dlatego też niezbędna jest skuteczna profilaktyka oraz rozwój efektywnych metod diagnozowania i leczenia osteoporozy.

Według definicji *National Osteoporosis Foundation* i *National Institutes of Health* osteoporoza to „choroba szkieletu, charakteryzująca się upośledzoną wytrzymałością kości, co powoduje zwiększone ryzyko złamania” [136]. Choroba ta długo nie daje żadnych objawów, mimo postępującego rozpadu masy kostnej, a pierwszym objawem często już zaawansowanego stanu chorobowego może być złamanie osteoporotyczne. Za najczęstsze złamania związane z osteoporozą uważa się złamania nadgarstka, kręgosłupa i bliższego odcinka kości udowej. Osteoporozę dzieli się powszechnie na pierwotną i wtórną, z czego pierwotna stanowi 70% wszystkich przypadków i jest typowa dla kobiet po menopauzie i mężczyzn w starszym wieku [137]. Główną przyczyną osteoporozy są zaburzenia w metabolizmie kostnym. Szkielet człowieka zbudowany jest z kości korowej (80%) oraz z kości bełczkowej (20%), które podlegają ciągłym procesom przebudowy wewnętrznej. Do procesów tych należy formowanie macierzy kostnej przez komórki kościotwórcze – osteoblasty oraz resorpcja kości, za którą odpowiedzialne są komórki kościogubne – osteoklasty. Aby mogła być utrzymana stała masa kostna o właściwej odporności, procesy kościotworzenia powinny być równoważone procesami resorpcji. Obrót kostny jest zależny

od działania wielu hormonów, a jego zaburzenie najczęściej wynika z niedoboru estrogenu, którego ilości zmniejszają się w okresie okołomenopauzalnym. Efektem tego jest przewaga aktywności osteoklastów nad aktywnością osteoblastów, powodująca przerzedzenie kości korowej i beleczkowej (**Rysunek 11**) oraz związany z tym wzrost ryzyka złamań osteoporotycznych [138]. Czynnikiem zwiększającym podatność na zachorowanie na osteoporozę są zaawansowany wiek, płeć żeńska, w szczególności rasy białej i żółtej, uwarunkowania genetyczne, mała masa ciała, niewłaściwa dieta z nadmiernym spożyciem kawy i alkoholu, palenie tytoniu oraz niedostateczna aktywność fizyczna [137].



**Rysunek 11.** Struktura kości beleczkowej w zdrowym szkielecie (**A**) i dotkniętym osteoporozą (**B**) [139].

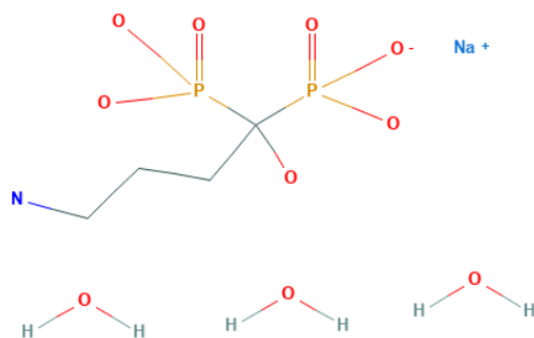
Podstawowymi zaleceniami dla osób zmagających się z osteoporozą są zmiana nawyków żywieniowych, wprowadzenie i dobranie właściwej aktywności fizycznej oraz suplementacja wapniem i witaminą D. Suplementy są istotnym czynnikiem wspomagającym leczenie osteoporozy, ponieważ wpływają na skuteczność leków przeciwosteoporotycznych. W leczeniu osteoporozy wykorzystuje się dwie klasy leków – antyresorpcyjne, które spowalniają resorpcję i anaboliczne, które stymulują tworzenie kości. Spośród leków antyresorpcyjnych najliczniejszą grupę stanowią bisfosfoniany [140].

### **5.2.2. Alendronian – lek przeciwosteoporotyczny z grupy bisfosfonianów**

Alendronian jest jednym z najczęściej stosowanych leków przeciwosteoporotycznych, należącym do grupy bisfosfonianów. Bisfosfoniany są obecnie wykorzystywane w leczeniu nie tylko osteoporozy, ale również takich schorzeń jak hiperkalcemia, choroba Pageta czy przerzuty do kości u pacjentów z nowotworami złośliwymi. Pod względem struktury chemicznej są analogiem naturalnie występujących pirofosforanów. Pirofosforan łatwo można wykryć w wielu tkankach, ponieważ jest produktem ubocznym różnych reakcji organizmu. Badania wykazały, że jest zdolny do hamowania zwapnienia poprzez wiązanie się

z kryształami hydroksyapatytu. Bisfosfoniany również posiadają powinowactwo do minerałów kostnych, wiążąc się z hydroksyapatytem. Wbudowywane są w miejscach aktywnej przebudowy kości, a te które nie zostały zatrzymane w szkielecie są wydalane przez nerki. Bisfosfoniany posiadają także zdolność do hamowania rozpadu hydroksyapatytu, stanowiąc tym samym skuteczny czynnik hamujący resorpcję kości. Dzięki tej właściwości bisfosfoniany stały się użyteczne w zastosowaniach klinicznych [141]. Dzieli się je na dwie klasy - związki niezawierające azotu (generacja I) oraz związki zawierające azot (generacja II i III). Różnią się one mechanizmem działania i siłą hamowania resorpcji kości. Substancje należące do II i III generacji nie tylko hamują resorpcję kości, ale także mają działanie przeciwnowotworowe oraz wpływają na aktywność makrofagów i osteoblastów [142].

Alendronian (sól sodowa kwasu alendronowego, **Rysunek 12**) jest bisfosfonianem II generacji, wiąże się i hamuje aktywność syntazy pirofosforanu farnezyli – enzymu regulującego procesy podczas wytwarzania cholesterolu, innych steroli i lipidów izoprenoidowych. Hamowanie aktywności tego enzymu prowadzi do zaburzenia cytoszkieletu osteoklastów, skutkując zmniejszeniem resorpcji kości [143].



**Rysunek 12.** Struktura alendronianu sodu (trihydrat) [144].

Alendronian, podobnie jak inne bisfosfoniany, podawany doustnie jest słabo wchłaniany, jego biodostępność wynosi ok. 0,7%. Wchłanianie alendronianu jest utrudnione lub całkowicie uniemożliwione przez obecność żywności zawierającej wapń czy inne jony dwuwartościowe, które chelatują bisfosfoniany. Dlatego też zaleca się przyjmowanie leku na czczo, co najmniej 30 minut przed jedzeniem. Po podaniu go poprzez infuzję dożylną, 40% dawki jest szybko wydalane z moczem, nie będąc metabolizowane. Mała frakcja jest wydalana z żółcią, a reszta jest pobierana głównie przez kości. Okres półtrwania alendronianu w organizmie jest szacowany na około 12 lat. W celu efektywnego leczenia może być zalecane ciągłe i częste podawanie, ponieważ postuluje się, że optymalna aktywność biologiczna alendronianu

występuje podczas jego związania z powierzchnią kości i słabnie wraz z wchłanianiem do wewnątrz tkanki [145]. W przypadku osteoporozy zaleca się przyjmowanie 10 mg alendronianu doustnie raz na dobę. Badania wykazały również, że równoważny wzrost gęstości mineralnej kości można osiągnąć poprzez przyjmowanie 35 mg leku dwa razy w tygodniu bądź 70 mg raz w tygodniu, co może być wygodniejsze dla pacjentów [146]. Stosowanie alendronianu może wiązać się z występowaniem działań niepożądanych, które mogą się nasilać przy innych współistniejących schorzeniach pacjentów oraz w przypadku przyjmowania leku niezgodnie z zaleceniami lekarza. Do najczęściej pojawiających się skutków ubocznych podczas leczenia należą zapalenia i owrzodzenia przełyku, wzdęcia, bóle mięśniowo-szkieletowe i bóle głowy [147].

### **5.2.3. Systemy dostarczania alendronianu**

Alendronian może być podawany doustnie bądź dożylnie, jednak stosowanie doustne jest metodą zdecydowanie bardziej powszechną w trakcie leczenia. Niestety taka forma podawania nie jest pozbawiona wad, głównymi problemami są niska biodostępność i możliwość wystąpienia skutków ubocznych, w szczególności w stosowaniu doustnym istnieje duże ryzyko podrażnienia przełyku i wywołania innych schorzeń przewodu pokarmowego. Mając na uwadze te ograniczenia, naukowcy pracują nad rozwojem nowych systemów do dostarczania alendronianu. Badania wykazały, że alendronian wykorzystywany w krótkotrwałych, zlokalizowanych terapiach może zwiększyć efektywność naprawy kości poprzez wzmocnienie mineralizacji, aktywności fosfatazy alkalicznej oraz działania czynnika osteoindukcyjnego (BMP-2) [148]. Jednym z podejść jest stosowanie liposomalnej formułacji alendronianu. Liposomy wykazują podobieństwo do błony komórkowej i charakteryzują się niską toksycznością, jednakże dużym problemem może być ich niestabilność. Wykazano, że liposomy pokrywane chitozaniem są bardziej stabilne niż liposomy bez polimerowej otoczki oraz mogą być skutecznym układem do dostarczania alendronianu, zwiększając jego biodostępność po podaniu doustnym. Dodatkową korzyścią wynikającą z wykorzystania takiego układu może być potencjalne zmniejszenie działania niepożądanego w przełyku, gdyż lek efektywnie zamknięty w pęcherzykach liposomowych nie będzie miał bezpośredniego kontaktu z przewodem pokarmowym [149]. W innym podejściu pokazano, że uwalnianie alendronianu z liposomów może być ukierunkowane i kontrolowane dzięki zastosowaniu nanocząstek tlenku żelaza, do których przyłączono lek i sterowanych za pomocą zewnętrznego pola magnetycznego [150]. Kolejnymi strukturami, które mogą pełnić funkcję

nośnika alendronianu są mikrosfery. Jednym z przykładów są mikrosfery na bazie kopolimeru polilaktyd-glikolid (PLGA), w których zamknięto cząstki hydroksyapatytu z alendronianem. Hydroksyapatyt może być skutecznym nośnikiem dla alendronianu ze względu na silne powinowactwo tego leku do składników mineralnych kości, natomiast PLGA pozwolił na kontrolowane uwalnianie leku, ale także zapewniał ochronę przed zbyt szybkim usuwaniem cząstek hydroksyapatytu z układu przez płyny ustrojowe [151]. Dodatkowo mikrosfery z hydroksyapatytem mają potencjał do lokalnego dostarczania zarówno alendronianu, jak i czynnika osteoindukcyjnego BMP-2 [152]. Interesującymi systemami dostarczania alendronianu są także polimerowe hydrożele, w szczególności te z możliwością aplikacji w formie wstrzykiwalnej. Wyniki badań dla hydrożeli opartych zarówno na polimerach pochodzenia naturalnego (chitozan), jak i syntetycznych (PEG, guma gellan) wykazały, że uwalnianie alendronianu z takich układów było przedłużone w czasie, a pozytywne efekty w kontekście leczenia osteoporozy były obserwowane w eksperymentach *in vitro* i *in vivo* [153][154][155]. Obiecującym rozwiązaniem może być projektowanie materiałów hybrydowych zawierających alendronian, przydatnych w regeneracji tkanki kostnej. Xin Ma i współpracownicy otrzymali hydrożelowy materiał hybrydowy na bazie kolagenu, hydroksyapatytu i alendronianu, którego właściwości fizykochemiczne takie jak pęcznienie, degradacja czy właściwości mechaniczne były korzystniejsze w porównaniu do samego hydrożelu kolagenowego oraz mogły być kontrolowane poprzez zmianę ilości poszczególnych składników czy zmianę stężenia czynnika sieciującego. Dodatkowo wstępne badania biologiczne wykazały, że materiał hybrydowy wspierał adhezję i proliferację mysich preosteoblastów [156].

Do tej pory opracowano różne formułacje mające potencjał jako nośniki alendronianu, jednakże efekty miejscowego dostarczania tego leku wymagają dalszych optymalizacji i badań ze względu na powszechnie występujące problemy ze zbyt słabą wydajnością enkapsulacji w układzie czy niedostateczną kontrolą nad dyfuzją i uwalnianiem tego leku. **W ramach niniejszej pracy opracowano nośnik dla alendronianu sodu w postaci cząstek krzemionkowo-apatytowych umieszczanych w matrycy hydrożelowej.**



### 5.3. Nanokompozyty oparte na matrycy hydrożelowej i nanocząstkach magnetycznych

#### 5.3.1. Wpływ pola magnetycznego na regenerację tkanki kostnej

Pole magnetyczne może być wytwarzane bezpośrednio lub pośrednio przez materiały ferro- lub ferrimagnetyczne, które zwykle zawierają żelazo (Fe), kobalt (Co) lub nikiel (Ni), ew. pierwiastki ziem rzadkich, jak również przez zmiany pola elektrycznego (pole elektromagnetyczne). Najszerszej stosowane jest statyczne pole magnetyczne (ang. *static magnetic field*, SMF) wytwarzane przez magnesy trwałe oraz impulsowe pole elektromagnetyczne (ang. *pulse electromagnetic field*, PEMF). Wszystkie organizmy żywe podlegają ziemskiemu polu magnetycznemu, co więcej pole magnetyczne ma wpływ na procesy zachodzące już na poziomie pojedynczej komórki. Dlatego też od kilku lat obserwuje się wzrost zainteresowania materiałami magnetycznymi i samym polem magnetycznym w zastosowaniach medycznych, m.in. w leczeniu raka piersi, w infekcjach bakteryjnych, w regeneracji układu krążenia czy układu kostnego [157].

Wiele uwagi poświęca się roli pola magnetycznego w procesie regeneracji tkanki kostnej i osteogenezy. Pole magnetyczne może wspomagać integrację implantów z tkankami gospodarza, zwiększać gęstość mineralną kości i przyspieszać procesy gojenia. Magnetoterapia należy do nieinwazyjnych i bezpiecznych metod leczenia urazów czy zapaleń. Magnetyzm znalazł zastosowanie także w inżynierii tkankowej kości, wykorzystywane jest magnetycznie wspomagane zamrażanie i rozmrażanie komórek macierzystych czy projektowanie rusztowań komórkowych i powłok z właściwościami magnetycznymi. Zastosowanie terapii łączącej pole magnetyczne z lekami czy czynnikami wzrostu może dać efekt synergii w celu znacznej poprawy regeneracji kości. Jak wspomniano wcześniej, SMF oraz PEMF są najczęściej badanymi typami pól magnetycznych [158]. SMF można podzielić na bardzo słabe i słabe (do 1 mT), umiarkowane (1 mT – 1 T) oraz silne i bardzo silne (powyżej 1 T). Powszechnie wykorzystuje się pole o umiarkowanej intensywności ze względu na to, że łatwiej jest takie pole zrealizować w warunkach prowadzonej terapii. Badania wykazały, że SMF korzystnie wpływało na proliferację, migrację i różnicowanie komórek osteoblastopodobnych oraz indukowało różnicowanie osteogenne mezenchymalnych komórek macierzystych [159][160][161]. Efekt ten może być związany z tym, że błona komórkowa i białka w ECM posiadają właściwości diamagnetyczne (namagnesowanie w zewnętrznym polu magnetycznym w kierunku przeciwnym do tego pola), a działanie SMF może wpływać na ich strukturę i orientację [158]. PEMF to pole

o niskiej częstotliwości w zakresie od 6 do 500 Hz, jego stosowanie indukuje sygnały bioelektryczne w tkankach, wywołując różne efekty biologiczne [162]. Może ono wspierać osteogenezę, zwiększać gęstość mineralną kości oraz przyspieszać gojenie się ran [163][164][165]. Liczne badania potwierdzają, że wykorzystanie SMF i PEMF może przynieść wiele korzyści w procesie regeneracji układu kostnego, jednakże dokładny mechanizm ich działania w tym zakresie nie jest jeszcze poznany [158].

### 5.3.2. Nanocząstki magnetyczne

Nanocząstki magnetyczne należą do jednej z najczęściej badanych grup nanomateriałów do zastosowań biomedycznych. Zastosowania te obejmują takie obszary jak obrazowanie (np. środki wzmacniające kontrast w obrazowaniu metodą rezonansu magnetycznego [ang. *Magnetic Resonance Imaging*, MRI]) czy hipertermia i celowane dostarczanie leków. Duże zainteresowanie badaczy nanocząstkami magnetycznymi wynika z ich unikalnych właściwości jako struktur o rozmiarach mniejszych niż 100 nm, m.in. wysokiej reaktywności i dużym stosunku powierzchni do objętości, ale także ze względu na możliwość manipulacji poprzez przyłożenie zewnętrznego pola magnetycznego. Skuteczność terapii może być wzmocniona dzięki wykorzystaniu materiałów o wysokiej magnetyzacji nasycenia ( $M_s$ ), do których należą metale takie jak Fe, Co czy tlenki metali (np.  $Fe_3O_4$  i  $\gamma-Fe_2O_3$ ). Stosowanie nanocząstek z czystych metali jest ograniczone, ponieważ bez modyfikacji są one toksyczne i wrażliwe na utlenianie. Zdecydowanie najwięcej uwagi poświęca się superparamagnetycznym nanocząstkom tlenku żelaza (ang. *superparamagnetic iron oxide nanoparticles*, SPION) ze względu na ich biokompatybilność, względną łatwość funkcjonalizacji oraz mniejszą wrażliwość na utlenianie, dzięki czemu możliwa jest stabilna odpowiedź magnetyczna [166].

Nanocząstki wykazujące superparamagnetyzm są preferowane w zastosowaniach biomedycznych, ponieważ w obecności pola magnetycznego ulegają namagnesowaniu, osiągając znacznie wyższe wartości magnetyzacji nasycenia w porównaniu ze znanymi strukturami biologicznymi, a namagnesowanie nie jest trwałe i zanika po wyłączeniu pola magnetycznego [167]. Zjawisko superparamagnetyzmu występuje w jednodomenowych nanocząstkach ferromagnetycznych lub ferrimagnetycznych o rozmiarach poniżej pewnej granicznej wielkości. Ich wypadkowe momenty magnetyczne nie wykazują stabilnego stanu ferro- czy ferrimagnetycznego, ale fluktuują, analogicznie jak momenty poszczególnych atomów w paramagnetyku. Dla takich nanocząstek krzywa magnesowania nie wykazuje

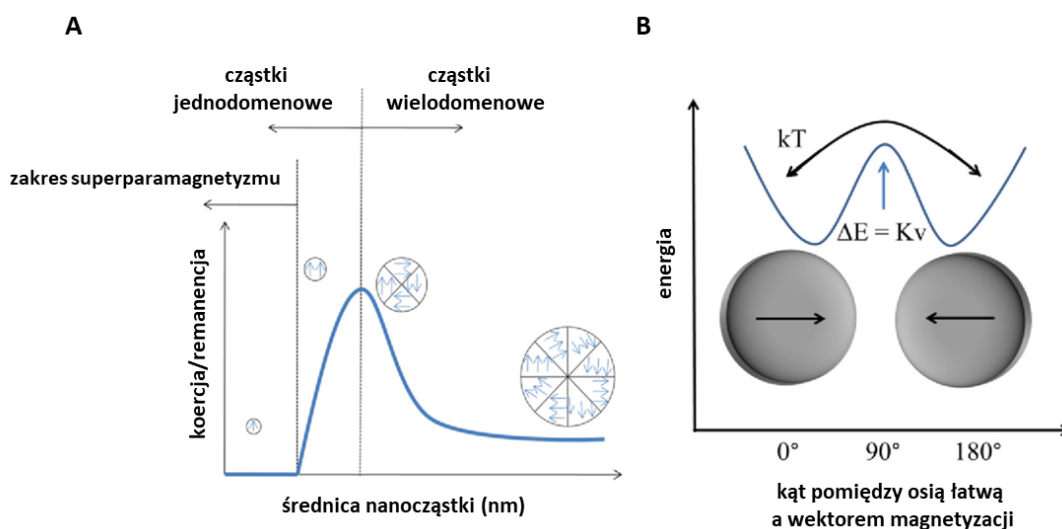
histerezy – remanencja (namagnesowanie po usunięciu pola magnetycznego) oraz koercja (wartość pola magnetycznego potrzebna do zredukowania remanencji do zera) przyjmują wartości zerowe (**Rysunek 13A**). Dla cząstki superparamagnetycznej energia anizotropii, będącej istotną właściwością każdego materiału magnetycznego, staje się równa lub mniejsza od energii termicznej i występuje typowa niestabilność termiczna, wyrażona jako:

$$(1) \quad k_B T \geq KV$$

gdzie  $k_B T$  jest energią termiczną ( $k_B$  – stała Boltzmanna,  $T$  – temperatura), a  $KV$  jest energią anizotropii magnetycznej ( $K$  – stała anizotropii magnetycznej,  $V$  – objętość cząstki). Pokonanie bariery energetycznej  $\Delta E = KV$  prowadzi do spontanicznych fluktuacji wektora magnetyzacji cząstki od jednego kierunku łatwego do drugiego (**Rysunek 13B**). Fluktuacje termiczne są opisane przez czynnik, zwany czasem relaksacji Néela  $\tau$ :

$$(2) \quad \tau = \tau_0 \exp\left(\frac{KV}{k_B T}\right)$$

gdzie  $\tau_0$  jest stałą czasową rzędu  $10^{-9}$  s. Przejście cząstki ze stanu superparamagnetycznego, w którym występują termiczne fluktuacje jej momentu magnetycznego do stanu uporządkowanego, w którym fluktuacje ustają i moment magnetyczny zostaje „zablokowany”, zachodzi w tzw. temperaturze blokowania. Nanocząstki w reżimie superparamagnetycznym umożliwiają kontrolowanie ich działania i aktywności przez samo włączanie i wyłączenie pola magnetycznego, co może być niezwykle użyteczne w obszarze biomedycyny [168].



**Rysunek 13.** Zależność koercji/remanencji od rozmiaru nanocząstek (**A**) i fluktuacje wektora magnetyzacji (**B**) [168].

Głównymi odmianami SPION, które są najlepiej przebadane pod kątem zastosowań biomedycznych, są magnetyt ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) i maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Magnetyt wykazuje regularną symetrię ze strukturą odwróconego spinelu, z komórką elementarną utworzoną przez 32 jony  $\text{O}^{2-}$ , pomiędzy którymi znajdują się luki tetraedryczne i oktaedryczne. Jony  $\text{Fe}^{2+}$  zajmują połowę miejsc oktaedrycznych, a jony  $\text{Fe}^{3+}$  są rozłożone w równych liczbach na pozostałe luki oktaedryczne i tetraedryczne. Magnetyt jest wrażliwy na utlenianie i zwykle przekształca się w maghemit w obecności tlenu. Maghemit różni się od magnetytu tym, że wszystkie lub większość jonów Fe jest trójwartościowych, a kompensacja ładunku jest zapewniona przez wakancje kationowe, które preferują luki oktaedryczne [169].

Na przestrzeni lat opracowano kilka metod otrzymywania SPION o kontrolowanych rozmiarach, kształcie, właściwościach powierzchniowych oraz magnetycznych, a także o dostatecznej powtarzalności. Zapewnienie tych wszystkich wymogów często stanowi wyzwanie w projektowaniu materiałów dla potrzeb biomedycznych. Powszechnie stosowanymi metodami syntezy nanocząstek magnetycznych są metody współstrącania, termiczna dekompozycja, procesy hydrotermalne czy metody mikroemulsyjne [170]. Wśród nich najpopularniejszą metodą otrzymywania SPION jest technika współstrącania, opisana przez Massarta w 1981 roku [171]. Synteza SPION odbywa się w tej technice poprzez rozpuszczenie soli żelaza (III) i żelaza (II) w stosunku molowym 2:1 w wodzie, następnie dodaje się zasady (np.  $\text{NH}_{3(\text{aq})}$  czy  $\text{NaOH}$ ) w celu wytworzenia nanocząstek według reakcji:  $8\text{OH}^- + \text{Fe}^{2+} + 2\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}_3\text{O}_4\downarrow + 4\text{H}_2\text{O}$ . W późniejszych badaniach procedura ta była optymalizowana pod kątem wpływu takich parametrów jak pH i siła jonowa ośrodka, rodzaj i stężenie soli, temperatura reakcji czy obecność tlenu [170]. Dodatkowo, w celu zminimalizowania toksyczności i zwiększenia stabilności w środowisku fizjologicznym stosuje się różnego rodzaju modyfikacje powierzchniowe, dobierane pod kątem docelowego zastosowania. Powszechną metodą jest powlekanie nanocząstek biokompatybilnymi polimerami, zarówno syntetycznymi (np. PEG, PLGA), jak i pochodzenia naturalnego (np. dekstran, chitozan) [172][173][174][175]. Szczególnym zainteresowaniem cieszy się chitozan ze względu na jego duże zasoby naturalne (chityna) oraz obecność wielu użytecznych grup funkcyjnych w jego strukturze [176].

SPION wykazują duży potencjał w różnych terapiach biomedycznych. Dzięki temu, że wpływają na relaksację spinów protonów (jąder wodoru) w konkretnych tkankach, co pozwala odróżnić je od otoczenia, mogą służyć jako środki kontrastowe w obrazowaniu MRI [177]. Jednym z najbardziej pożądanym zastosowań SPION jest celowane dostarczanie

leków w terapiach przeciwnowotworowych. Nanocząstki mogą być funkcjonalizowane i modyfikowane właściwie dobranymi związkami (np. PEG, PNIPAM, kwas cytrynowy), połączone z lekami przeciwnowotworowymi (np. paklitaksel, dokсорubicyna, epirubicyna), a następnie kierowane w docelowe miejsce za pomocą zewnętrznego pola magnetycznego [178][179][180]. Oprócz dostarczania leków SPION mogą być również przydatne do lokalnego podniesienia temperatury w procesie hipertermii, który wykorzystuje fakt, że ciepło prowadzi do apoptozy i martwicy komórek, w szczególności komórek nowotworowych [181]. Generowanie ciepła następuje podczas działania zmiennego pola magnetycznego na SPION, a mechanizm ten oparty jest na relaksacji Browna i relaksacji Néela [182]. Obiecującym podejściem jest możliwość wykorzystania SPION w terapiach komórkami macierzystymi, przeznaczonych do regeneracji różnych tkanek. Odgrywają one istotną rolę w medycynie regeneracyjnej, problemem jest jednak dostarczenie pożądanej ilości komórek do uszkodzonej tkanki. Wykazano, że komórki macierzyste znakowane SPION efektywniej migrowały w docelowe miejsce poprzez zastosowanie zewnętrznego pola magnetycznego w porównaniu do komórek nieznakowanych, a ich zdolność do różnicowania nie była zaburzona obecnością nanocząstek w badanym czasie [183][184].

### **5.3.3. Hydrożele magnetyczne**

Hydrożele magnetyczne są stosunkowo nową klasą biomateriałów. Ich rozwój jest motywowany rosnącym zapotrzebowaniem na materiały z ulepszoną sterowalnością i możliwością szybkiej odpowiedzi na bodźce zewnętrzne. Opierają się one na hydrożelowej matrycy, do której wprowadzane są magnetyczne komponenty (głównie nanocząstki tlenku żelaza). Dzięki obecności nanocząstek magnetycznych w polimerowej sieci hydrożele mogą reagować na zewnętrzne pole magnetyczne, a reakcja ta jest łatwiejsza do kontrolowania w porównaniu do innych powszechnie stosowanych bodźców, takich jak pH czy temperatura [185].

Właściwości hydrożeli magnetycznych są zależne od rodzaju hydrożelowej matrycy oraz od rozmiaru, stężenia i rozkładu nanocząstek magnetycznych w matrycy. Przy braku zewnętrznego pola magnetycznego ich momenty są ułożone losowo (w stanie superparamagnetycznym – fluktuują), a hydrożel nie jest namagnesowany.

W obecności pola magnetycznego magnetyzacja  $M$  hydrożelu może być wyrażona jako:

$$(3) \quad M = \Phi_m M_s \left( \coth \xi - \frac{1}{\xi} \right)$$

gdzie  $\Phi_m$  – objętościowa frakcja nanocząstek magnetycznych w całym hydrożelu,  $M_s$  – magnetyzacja nasycenia, a parametr  $\xi$  jest definiowany jako  $\xi = mH/k_B T$  ( $m$  – moment magnetyczny nanocząstek,  $H$  – natężenie pola magnetycznego,  $k_B$  – stała Boltzmanna,  $T$  – temperatura). Z powyższego równania wynika, że magnetyzacja hydrożelu jest wprost proporcjonalna do stężenia nanocząstek magnetycznych i ich magnetyzacji nasycenia [186].

Opracowano kilka różnych metod otrzymywania hydrożeli magnetycznych. Opierają się one zarówno na oddziaływaniach fizycznych, jak i tworzeniu chemicznych wiązań pomiędzy hydrożelową matrycą a nanocząstkami magnetycznymi. Trzema głównymi metodami są mieszanie, strącanie *in situ* oraz „szczepienie” umożliwiające wprowadzenie pożądanych grup funkcyjnych [187]. W przypadku mieszania nanocząstki magnetyczne i polimerowe zole przygotowuje się oddzielnie. Nanocząstki są zwykle syntezowane metodą współstrącania, dodawane do polimerowego zolu i mieszane, a końcowym etapem jest proces żelowania, w wyniku którego otrzymuje się hydrożel magnetyczny. Metoda mieszania jest szeroko stosowana ze względu na nieskomplikowaną i szybką procedurę, jednakże jej ograniczeniem może być nierównomierna dystrybucja nanocząstek w żelu, ich aglomeracja i niekontrolowany wyciek [188][189]. Kolejną metodą otrzymywania, która podobnie jak mieszanie opiera się na oddziaływaniach fizycznych między komponentami, jest strącanie *in situ*. W tej metodzie najpierw otrzymuje się hydrożel, który następnie jest traktowany jonami żelaza  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ , a dalej zanurzany w roztworze alkalicznym w celu formowania się nanocząstek magnetycznych w hydrożelowej matrycy. W rezultacie można otrzymać hydrożel magnetyczny zawierający wysokie stężenie nanocząstek, które są dobrze rozproszone w matrycy. Problemem może być ryzyko niszczenia struktury hydrożelowej przez roztwory alkaliczne, dlatego w tej metodzie wymagane jest użycie hydrożeli, które są odporne na takie środowisko [190]. W przypadku metod mieszania oraz strącania *in situ* nie ma gwarancji, że uzyskane materiały będą stabilne w czasie. Stabilność może być wzmocniona wytworzeniem chemicznych wiązań w strukturze hydrożelu magnetycznego poprzez zastosowanie metody „szczepienia”. Polega ona na powierzchniowym sfunkcjonalizowaniu nanocząstek różnymi grupami funkcyjnymi, dzięki czemu mogą one działać jako czynniki sieciujące, wiążąc kowalencyjnie łańcuchy polimerowe [191]. Metoda ta umożliwia efektywne unieruchomienie nanocząstek w hydrożelu, jednakże jej

zastosowanie może być skomplikowane i drogie. Dodatkowo w tej metodzie nie są preferowane hydrożele na bazie polimerów pochodzenia naturalnego ze względu na brak aktywnych miejsc do oddziaływania z funkcjonalizowanymi nanocząstkami [187][192].

Hydrożele magnetyczne, podobnie jak same nanocząstki magnetyczne, mogą znaleźć zastosowanie w obrazowaniu MRI [193], dostarczaniu leków [194] czy terapiach przeciwnowotworowych, takich jak hipertermia [195]. Stanowią także alternatywę dla tradycyjnych hydrożeli, posiadając nowe czy też wzmocnione właściwości, pożądane w inżynierii tkankowej. W przypadku regeneracji tkanki kostnej atrakcyjnym rozwiązaniem jest połączenie nanocząstek magnetycznych z hydroksyapatytem. Oba te komponenty mogą mieć istotne znaczenie w osteogenezie oraz poprawie właściwości mechanicznych rusztowań [196]. Wykazano, że rusztowania na bazie powlekanych hydroksyapatytem nanocząstek tlenku żelaza, umieszczonych w matrycy hydrożelowej znacząco wspomagały adhezję i proliferację osteoblastów w porównaniu z rusztowaniami na bazie samego hydrożelu bądź hydrożelu z hydroksyapatytem [197]. Efektywność regeneracji może być istotnie zwiększona nie tylko poprzez samą obecność nanocząstek magnetycznych w układzie, ale również poprzez wykorzystanie zewnętrznego pola magnetycznego. Oddziaływanie SMF na zasiedlony komórkami hydrożel magnetyczny oparty na SPION i syntetycznym polimerze miał pozytywny wpływ na różnicowanie osteoblastów [198]. Dodatkowo, przyłożenie pola może być wykorzystane do zmiany architektury rusztowania i uporządkowania komponentów w nim zawartych. Panseri i współpracownicy badali wpływ pola magnetycznego na rusztowanie otrzymane na bazie kolagenu, hydroksyapatytu oraz superparamagnetycznych nanocząstek i potwierdzili w badaniach *in vivo*, że przyłożenie trwałego magnesu w pobliżu implantacji może „uaktywnić” nanocząstki, które są dzięki temu zdolne do determinowania orientacji całej struktury rusztowania wzdłuż linii pola. Taka metoda może skrócić czas przebudowy tkanki i skutkować szybkim rozwojem dojrzałej kości [199].

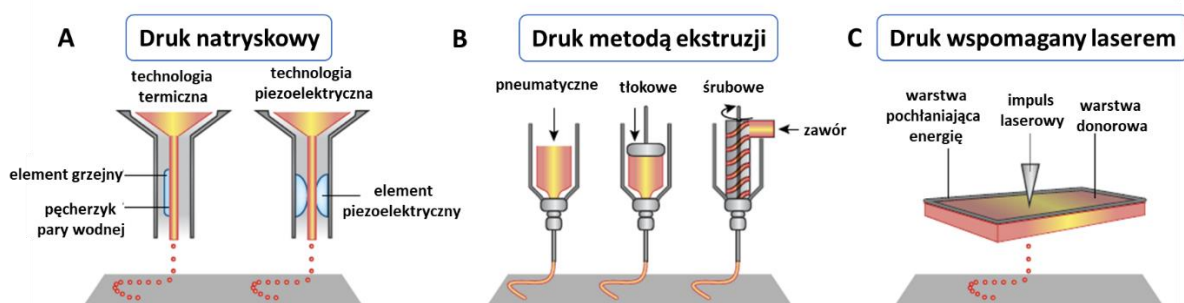
Hydrożele magnetyczne są obiecującymi materiałami do zastosowań biomedycznych, w tym dla medycyny regeneracyjnej, jednakże ich wykorzystanie wiąże się z takimi ograniczeniami jak trudność w kontrolowaniu efektów cieplnych po implantacji, potencjalna toksyczność komponentów hydrożeli czy problemy ze stabilnością i równomiernym rozproszeniem nanocząstek w matrycy. W związku z tym istnieje potrzeba udoskonalania obecnych rozwiązań i badanie efektów długoterminowych, osiągniętych przez zastosowanie hydrożeli magnetycznych [185]. **W niniejszej pracy opracowano stabilne strukturalnie hydrożele magnetyczne na bazie biopolimerów, w których nanocząstki magnetyczne powlekane**

pochodną chitozanu wbudowują się w matrycę polimerową w trakcie procesu sieciowania.

## 6. Druk 3D jako metoda otrzymywania rusztowań komórkowych

Rusztowania komórkowe powinny spełniać szereg wymagań, aby móc skutecznie odgrywać swoją rolę w regeneracji tkanek. Wśród tych wymagań istotnym parametrem, wpływającym na funkcjonowanie komórek, jest mikro- i nanostruktura rusztowań. Potrzeba optymalizacji rusztowań pod kątem ich zewnętrznego kształtu i rozmiaru, morfologii powierzchni, a także porowatości i architektury wewnętrznej spowodowała, że od trzech dekad rozwijane są różnorodne metody, umożliwiające otrzymywanie pożądanych pod względem struktury materiałów. Należą do nich, cieszące się coraz większą popularnością, technologie wytwarzania addytywnego (ang. *additive manufacturing*, AM) [200].

Technologie wytwarzania addytywnego zostały opracowane pod koniec lat 80. i wiele z nich zostało z powodzeniem wprowadzonych do praktyki. Termin technologii AM jest zwykle synonimem drukowania 3D, szczególnie w obszarach biomedycznych. Technologie AM polegają na wytwarzaniu trójwymiarowego obiektu poprzez dodawanie materiału warstwa po warstwie. Wytwarzanie takiego obiektu odbywa się na podstawie modelu 3D, który jest projektowany dzięki metodologii CAD (ang. *computer aided design*). Wśród różnych metod AM, do otrzymywania rusztowań komórkowych szeroko stosowane są drukowanie natryskowe, drukowanie oparte na ekstruzji oraz drukowanie wspomagane laserem (stereolitografia – SLA i selektywne spiekanie laserowe – SLS) (**Rysunek 14**) [201].



**Rysunek 14.** Trzy różne rodzaje druku 3D stosowanego do otrzymywania skafoldów [202][203].

**W niniejszej pracy do otrzymywania trójwymiarowych rusztowań wykorzystano drukowanie 3D metodą ekstruzji.** Metoda ta polega na wytłaczaniu materiału z igły bądź innej jednostki dozującej pod wpływem nacisku tłoka, działania śruby lub jak w przypadku tej



pracy pod wpływem kontrolowanego ciśnienia. Wytłaczane pasma materiału są pozycjonowane względem siebie według modelu wybranego przez użytkownika, dzięki czemu możliwe jest uzyskanie rusztowania o złożonej geometrii i kontrolowanej porowatości. Dodatkową zaletą tej metody jest możliwość drukowania bez konieczności stosowania wysokich temperatur, co jest korzystne dla wrażliwych na ten czynnik materiałów organicznych. Najczęściej wykorzystywaną klasą biomateriałów w technice ekstruzji są polimerowe hydrożele w formie lepkich past [204]. Według Grolla i współpracowników materiały do otrzymywania trójwymiarowych rusztowań można podzielić na dwie grupy – bioatramenty (ang. *bioinks*) i atramenty biomateriałowe (ang. *biomaterial ink*). W przypadku bioatramentów koniecznym składnikiem drukowalnej formułacji są komórki, mogą one występować same lub być połączone z biomateriałem, a proces drukowania takiej mieszaniny nazywany jest biodrukiem 3D. Atramenty biomateriałowe natomiast nie zawierają komórek, w tym podejściu pierwszym krokiem jest druk 3D pożądanego rusztowania, a następnie zasiedlenie go komórkami i prowadzenie hodowli [205]. Otrzymanie rusztowania komórkowego na drodze druku bądź biodruku 3D wymaga optymalizacji właściwości reologicznych materiału, jego biozgodności, dostosowania parametrów drukowania oraz stabilizacji rusztowania po wydrukowaniu. Jedną z najważniejszych właściwości w projektowaniu rusztowań 3D jest lepkość, którą można dostosować poprzez dodatek różnych składników w celu otrzymania drukowalnej pasty. Lepkość atramentów i bioatramentów maleje wraz ze wzrostem szybkości ścinania, co określa się jako przerzedzanie przez ścinanie, będące charakterystycznym zachowaniem dla płynów nienewtonowskich. Ułatwia to przepływ materiału przez igłę, który po wytłoczeniu szybko powraca do swojego stanu początkowego. Dodatkowo materiał powinien mieć konsystencję umożliwiającą wytłaczanie go w temperaturze pokojowej. Przy ustalonej wartości ciśnienia i średnicy igły, na jakość i szerokość wytłaczanych pasm materiału ma wpływ także prędkość wytłaczania, parametr ten powinien być dostosowany do lepkości. Zbyt duża prędkość wytłaczania skutkuje nieciągłością pasm, a zbyt mała powoduje nadmierne osadzenie się materiału [206]. Biorąc pod uwagę, że powszechnie jako atramentów i bioatramentów używa się polimerowych hydrożeli, dużym problemem może być brak stabilności hydrożelowego rusztowania po wydrukowaniu. Słabe właściwości mechaniczne oraz wysoka hydrofilowość hydrożeli mogą powodować zapadanie czy też rozplaszczanie się wydrukowanej struktury, przez co trudno jest utrzymać kształt rusztowania otrzymanego według wybranego modelu. Dlatego też opracowywane są metody stabilizujące strukturę po wydrukowaniu, które jednocześnie nie będą szkodliwe dla funkcjonowania komórek. Można je w ogólności

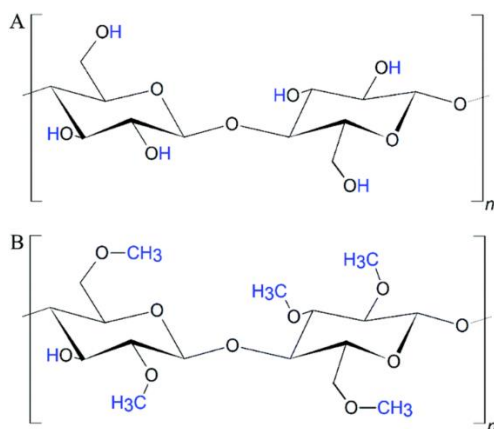
podzielić na główne dwie kategorie – sieciowanie oraz dodawanie do atramentów składników wzmacniających właściwości mechaniczne. W przypadku sieciowania najczęściej stosuje się sieciowanie jonowe, enzymatyczne, fotopolimeryzację rodnikową oraz procesy indukowane termicznie, natomiast w przypadku drugiej kategorii, materiały o korzystnych właściwościach mechanicznych mogą być drukowane razem z hydrożelowym atramentem bądź tworzone osobno, stanowiąc materiał podporowy, do którego drukowane jest hydrożelowe rusztowanie. Po zakończeniu drukowania i ustabilizowaniu, materiały podporowe mogą zostać usunięte bądź pozostać jako integralna część rusztowania [207]. Kolejnym ważnym punktem w projektowaniu trójwymiarowych rusztowań jest zapewnienie korzystnego środowiska dla funkcjonowania komórek, w szczególności dużym wyzwaniem jest otrzymanie bioatramentu o dobrze zdefiniowanej strukturze, który jednocześnie będzie wsparciem dla migracji, proliferacji i różnicowania komórek. Optymalny kształt rusztowań hydrożelowych w druku 3D zazwyczaj uzyskuje się dla sztywnych struktur, charakteryzujących się wysokim stężeniem polimerów bądź wysokim stopniem usieciowania, jednakże zbyt gęsta sieć polimerowa może utrudniać procesy komórkowe. Balans pomiędzy właściwościami strukturalnymi a biologicznymi bioatramentu określa się mianem „okna biofabrykacji” (ang. *biofabrication window*) [202].

## **6.1. Materiały użyte do dostosowania właściwości nanokompozytów do warunków drukowania**

### **6.1.1. Metyloceluloza**

Hydrożelowe bioatramenty o małej gęstości usieciowania wywołują pozytywną odpowiedź komórkową, jednakże ich struktura może być zbyt niestabilna, by wiernie odwzorować pożądany model rusztowania. Jedną ze strategii stosowaną dla poprawy właściwości strukturalnych jest mieszanie hydrożeli z dodatkowymi składnikami, które właściwie dobrane wzmocnią integralność rusztowania w trakcie procesu drukowania i jednocześnie nie wpłyną negatywnie na komórki. Obiecującym komponentem dla takich zastosowań jest metyloceluloza [208]. Metyloceluloza (MC) jest nietoksycznym biopolimerem i jednym z najpopularniejszych eterów celulozy, stosowanym w wielu gałęziach przemysłu, m.in. jako zagęszczacz w przemyśle spożywczym i w produkcji kosmetyków. Powstaje poprzez podstawienie atomów wodoru odpowiednich grup hydroksylowych w strukturze celulozy grupami metylowymi (**Rysunek 15**). Jest rozpuszczalna w wodzie, ale wraz ze wzrostem stopnia podstawienia grupami metylowymi rozpuszczalność spada. MC jest klasyfikowana

jako termoodwracalny żel - w niższych temperaturach ma postać zolu, natomiast wraz ze wzrostem temperatury silnie wzrasta lepkość, co powoduje powstanie żelu [209].

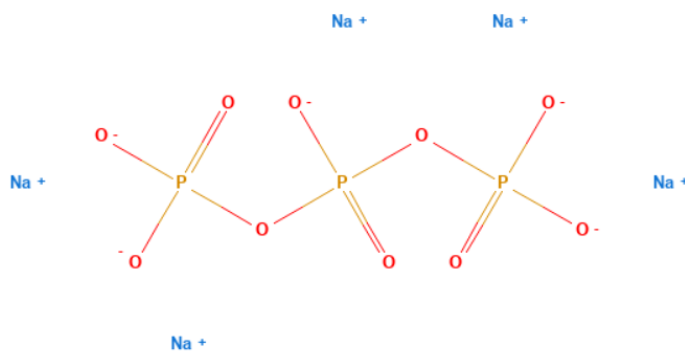


**Rysunek 15.** Struktura celulozy (A) i metylocelulozy (B) [208].

Zdolność MC do tworzenia mieszanin o wysokiej lepkości już przy małych stężeniach może być wykorzystana w biodruku 3D. Wykazano, że hydrożele na bazie metylocelulozy mogą być z powodzeniem użyte jako bioatramenty w metodzie ekstruzji. Poprzez zmianę parametrów drukowania możliwe było uzyskiwanie rusztowań o kontrolowanym rozmiarze i geometrii, a przeżywalność zastosowanej linii komórkowej mysich mioblastów po wydrukowaniu rusztowania osiągała wartości powyżej 80% [210]. MC może być także zmieszana z innymi biopolimerami w celu zwiększenia ich lepkości i uzyskiwania rusztowań o pożądanej strukturze. Szeroko badane jest połączenie alginianu i MC jako bioatramentów odpowiednich dla druku opartego na ekstruzji. Schütz i współpracownicy wykazali, że dodatek 9% MC do 3% zolu alginianowego zwiększył znacząco lepkość bioatramentu, co umożliwiło wydrukowanie kilkudziesięciu warstw rusztowania razem z mezenchymalnymi komórkami macierzystymi. Po wydrukowaniu MC była usuwana z rusztowania w trakcie hodowli komórkowej, ponieważ nie brała udziału w procesie sieciowania alginianu [211]. Oprócz alginianu, potencjał w druku 3D w połączeniu z MC wykazują też kwas hialuronowy [212] oraz żelatyna metakrylowana [213]. Metyloceluloza stanowi więc atrakcyjny składnik bioatramentów, znacząco poprawiając ich drukowalność, ale nie zaburzając przy tym biokompatybilności. Może ona być używana tylko na etapie drukowania do zwiększenia lepkości atramentów, gdyż nie biorąc udziału w sieciowaniu nie jest integralną częścią rusztowania, [208]. **Metyloceluloza została wykorzystana do zwiększenia lepkości materiałów hydrożelowych jako atramentów do druku 3D opracowanych w ramach tej pracy.**

### 6.1.2. Tripolifosforan sodu

Alternatywnym rozwiązaniem dla szeroko stosowanego sieciowania biopolimerów poprzez wytworzenie wiązań chemicznych z użyciem aldehydu glutarowego czy genipiny jest sieciowanie fizyczne oparte na oddziaływaniach jonowych. Tripolifosforan sodu (TPP, **Rysunek 16**) jest popularnym jonowym środkiem sieciującym ze względu na takie właściwości jak: nietoksyczność, stabilność, łatwość kontrolowania procesu i sieciowanie w łagodnych warunkach [214]. W szczególności, TPP należy do najczęściej stosowanych anionowych środków sieciujących dla chitozanu, środek ten badany jest pod kątem otrzymywania chitozanowych nano- i mikrocząstek, membran, hydrożeli, nanokompozytów i innych rodzajów rusztowań dla zastosowań biomedycznych [215][216][217][218]. Co więcej, TPP może wzmacniać właściwości biomimetyczne rusztowań do regeneracji tkanki kostnej. Wykazano, że chitozan usieciowany TPP podczas inkubacji w SBF stanowił korzystniejszą matrycę dla wytworzenia się fazy mineralnej o zbliżonych właściwościach do minerału kostnego w porównaniu do matrycy sieciowanej aldehydem glutarowym, dla której uzyskana faza mineralna znacznie różniła się parametrami od naturalnego apatytu. W przypadku matrycy sieciowanej TPP zaobserwowano również efektywniejszą proliferację i zdolność do różnicowania komórek osteoblastopodobnych [219].



**Rysunek 16.** Struktura tripolifosforanu sodu (TPP) [220].

Tworzenie usieciowanej struktury jest możliwe dzięki oddziaływaniu grup aminowych chitozanu jako polikationu z grupami fosforanowymi TPP, który jest ujemnie naładowany. Tworzenie się kompleksu polielektrolitowego pomiędzy chitozaniem a TPP jest regulowane przez pH. Parametr ten wpływa na stopień jonizacji zarówno chitozanu, jak i TPP, a stopień jonizacji określa wzajemne oddziaływania elektrostatyczne oraz stechiometrię sieciowania [221][222].

TPP wykorzystuje się do jonowego sieciowania nie tylko struktur opartych na samym chitozanie, ale też rusztowań i membran na bazie połączeń chitozanu z alginianem [223], z żelatyną [224] czy też z kolagenem [225][226]. Potwierdzono, że TPP może być efektywnym czynnikiem stabilizującym takie struktury. Może on być też stosowany w podejściu, które zakłada sieciowanie zarówno fizyczne, jak i chemiczne. W jednej z prac pokazano, że chitozanowe nanocząstki sieciowane TPP oraz genipiną w sposób symultaniczny mogą być obiecującym systemem dostarczania leków, charakteryzowały się przedłużonym uwalnianiem substancji w porównaniu do nanocząstek sieciowanych tylko TPP [227]. Inna praca zademonstrowała, że sieciowanie dwuetapowe z użyciem TPP, a następnie genipiny wzmacniało właściwości mechaniczne rusztowań na bazie kolagenu, chitozanu i polilaktydu, a jednocześnie nie wpływało negatywnie na funkcjonowanie komórek [228]. **W niniejszej pracy pasty hydrożelowe były wstępnie sieciowane genipiną, a po procesie drukowania uzyskane trójwymiarowe rusztowania były stabilizowane poprzez użycie TPP.**

# CZEŚĆ EKSPERYMENTALNA

## I. Nanokompozyty oparte na hydrożelowej matrycy i cząstkach krzemionki

### Wprowadzenie

Część I badań dotyczy otrzymania i scharakteryzowania właściwości fizykochemicznych i biologicznych nanokompozytów opartych na hydrożelowej matrycy i cząstkach krzemionki, potencjalnie przydatnych jako wstrzykiwalne bioaktywne rusztowania do regeneracji tkanki kostnej.

W pierwszym etapie (**rozdział 7**) otrzymano i scharakteryzowano serie wstrzykiwalnych, chemicznie sieciowanych hydrożeli ColChHA opartych na kolagenie (Col), chitozanie (Ch) i kwasie hialuronowym (HA). Badnia te stanowiły kontynuację i poszerzenie prac zainicjowanych przez Autorkę niniejszej rozprawy w ramach pracy magisterskiej. Wybór tych biopolimerów jako składników hydrożeli był podyktowany tym, że zarówno kolagen, jak i kwas hialuronowy są ważnymi składnikami naturalnej ECM, a chitozan wykazuje strukturalne podobieństwo do naturalnie występujących glikozaminoglikanów. Zastosowanym środkiem sieciującym te układy była genipina. Otrzymanie hydrożeli było możliwe dzięki temu, że genipina reaguje z pierwszorzędowymi grupami aminowymi, które są obecne w strukturze kolagenu oraz chitozanu, natomiast kwas hialuronowy jako polianion wbudowuje się poprzez oddziaływanie z makromolekułami chitozanu, obdarzonymi ładunkiem dodatnim, tworząc wzajemnie przenikającą się sieć polimerową [229]. Wyniki badań dotyczące tego etapu zostały opublikowane w pracy zatytułowanej: *Collagen/chitosan/hyaluronic acid – based injectable hydrogels for tissue engineering applications – design, physicochemical and biological characterization* (A. Gilarska, J. Lewandowska-Łańcucka, W. Horak, M. Nowakowska, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 170 (2018) 152–162) [230]. W oparciu o wyniki tych badań wybrano skład hydrożelu ColChHA, który następnie pełnił rolę matrycy dla cząstek krzemionki.

W kolejnym etapie (**rozdział 8**) otrzymano i scharakteryzowano hydrożelowy materiał hybrydowy na bazie wybranej we wcześniejszym etapie matrycy hydrożelowej ColChHA i zdyspergowanych w niej cząstek krzemionki, pełniących funkcję fazy bioaktywnej. **Cząstki krzemionki zostały sfunkcjonalizowane powierzchniowo grupami aminowymi,**

co umożliwiło ich kowalencyjne związanie z hydrożelową siecią polimerową w trakcie sieciowania genipiną (reagującej z grupami aminowymi) i tym samym otrzymanie nowego bioaktywnego i homogenicznego materiału hybrydowego. Związanie kowalencyjne nanocząstek krzemionkowych z matrycą eliminuje poważny problem, jakim jest separacja fazowa cząstek i ich niekontrolowana dyfuzja do tkanek w warunkach zastosowania *in vivo* w sytuacji braku ich immobilizacji w matrycy. Opracowany materiał jest chroniony patentem krajowym (M. Nowakowska, J. Lewandowska-Łańcucka, A. Gilarska, patent polski nr 239179, do zgłoszenia patentowego nr P.428993 (21.02.2019), *Hydrożelowy materiał hybrydowy, sposób jego otrzymywania i zastosowanie*, właściciel: UJ, data wydania decyzji o udzieleniu patentu 21.07.2021, data uzyskania (opublikowania) patentu: 08.11.2021) oraz objęty międzynarodowymi zgłoszeniami patentowymi (M. Nowakowska, J. Lewandowska-Łańcucka, A. Gilarska, wynalazek pt.: *Hydrogel hybrid material, method of its preparation and application*, nr PCT/PL2020/050019, 21.02.2020 oraz US 17/426,629, 28.07.2021). Wyniki badań zostały także opublikowane w pracy: *Genipin crosslinked bioactive collagen/chitosan/hyaluronic acid injectable hydrogels structurally amended via covalent attachment of surface-modified silica particles* (J. Lewandowska-Łańcucka, A. Gilarska, A. Buła, W. Horak, A. Łatkiewicz, M. Nowakowska, *International Journal of Biological Macromolecules* 136 (2019) 1196–1208) [231].

## **7. Otrzymywanie i scharakteryzowanie hydrożeli opartych na kolagenie, chitozanie i kwasie hialuronowym**

### **7.1. Materiały i metody**

#### **7.1.1. Materiały**

Kolagen typu I, z ogona szczurzego (4,1 mg/ml w 0,02N kwasie octowym, Corning), chitozan (niska masa cząsteczkowa, Sigma-Aldrich), kwas hialuronowy (Sigma-Aldrich), genipina (Challenge Bioproducts Co., 98%), kwas octowy (Chempur), kolagenaza ( $\geq 125$  U/mg, Sigma-Aldrich), chlorek wapnia  $\text{CaCl}_2$  (Sigma-Aldrich), etanol (POCh), medium hodowlane (DMEM, Sigma-Aldrich), roztwór penicylina/streptomycyna (10.00 jednostek/ml), płodowa surowica bydlęca (FBS, HyClone), trypsyna (HyClone), glutaraldehyd (Sigma-Aldrich), heksametylodisilazan (HMDS, Sigma-Aldrich), komórki ludzkiego mięsaka kościopochodnego (MG-63, ATCC).

### **7.1.2. Otrzymywanie hydrożeli**

Otrzymano serię hydrożeli opartych na kolagenie i chitozanie - ColCh oraz na kolagenie, chitozanie i kwasie hialuronowym – ColChHA. Hydrożele ColCh przygotowywano przez zmieszanie 590  $\mu$ l roztworu kolagenu, 241  $\mu$ l roztworu chitozanu (roztwór 1% (w/v) w 1% kwasie octowym) i 169  $\mu$ l roztworu genipiny (roztwór w 10x buforze PBS) o trzech stężeniach: 2 mM (ColCh 2), 10 mM (ColCh 10) i 20 mM (ColCh 20). Stosunek wagowy kolagenu do chitozanu wynosił 50:50. Hydrożele ColChHA przygotowywano przez zmieszanie 590  $\mu$ l roztworu kolagenu, 96-193  $\mu$ l roztworu chitozanu, 48-145  $\mu$ l roztworu kwasu hialuronowego (roztwór 1% (w/v) w 10x buforze PBS) i 169  $\mu$ l roztworu genipiny o trzech stężeniach: 2 mM, 10 mM i 20 mM. Ustalono trzy stosunki wagowe dla Col:Ch:HA, odpowiednio 50:40:10 (ColChHA 4/1), 50:30:20 (ColChHA 3/2) i 50:20:30 (ColChHA 2/3). Po poddaniu biopolimerowych zoli energicznemu wytrząsaniu, inkubowano je w 37 °C do zakończenia procesu żelowania.

### **7.1.3. Badanie właściwości fizykochemicznych hydrożeli**

#### **Analiza widm FTIR**

Przeprowadzono analizę wiązań i grup funkcyjnych w strukturach hydrożeli, wykorzystując widma uzyskane przy użyciu spektrometru podczerwieni z transformacją Fouriera FTIR (Thermo Nicolet iS10 FTIR z przystawką ATR, Thermo Scientific). W tym celu wykonano pomiar widm FTIR dla hydrożeli ColCh 10, ColChHA 4/1 10, ColChHA 3/2 10 oraz ColCh 2/3 10, które uprzednio zostały poddane procesowi liofilizacji.

#### **Badanie właściwości reologicznych**

Przeprowadzono badania właściwości reologicznych na reometrze rotacyjnym MCR 301 (Anton Paar), wyposażonym w dodatkową komorę P-PTD 200 umożliwiającą stabilizację temperaturową próbek w badanym zakresie i zapobieganie ich wysychania. Badania wykonano z wykorzystaniem geometrii pomiarowej typu płytka-płytko o średnicy 20 mm, przy szczelinie pomiarowej  $h = 0,1$  mm. Każdą próbkę w formie zolu nakładano na płytkę reometru (schłodzoną do 4 °C) i zamykano komorę. Następnie układ był podgrzewany do temperatury 37 °C (0,33 °C/s). W celu określenia modułu zachowawczego  $G'$  badane próbki poddano wymuszeniu oscylacyjnemu o następujących parametrach: odkształcenie  $\gamma = 0,1\%$  z częstotliwością  $f = 1$  Hz. Pojedynczy pomiar próbki trwał 60 minut, wykonano po trzy powtórzenia dla każdego rodzaju próbki.



### **Badanie procesu degradacji enzymatycznej**

Przeprowadzono badania procesu degradacji hydrożeli w obecności enzymu – kolagenazy. W tym celu przygotowaną serię hydrożeli (po trzy powtórzenia dla każdego rodzaju) przepłukano wodą dejonizowaną, zważono i przyjęto uzyskaną wartość jako 100% całkowitej masy hydrożeli ( $M_0$ ). Następnie przeniesiono materiały do płytki 24-dółkowej, zalano roztworem kolagenazy (1 ml/dółek, roztwór 0,2 mg/ml w buforze PBS z 0,36 mM  $\text{CaCl}_2$ ), zabezpieczono płytkę i inkubowano w temperaturze 37 °C z delikatnym wytrząsaniem. Po wyznaczonych punktach czasowych od rozpoczęcia inkubacji (po 4, 24, 48, 72 i 144 godzinach) materiały ważono ( $M_t$ ), a następnie przenoszono z powrotem do płytki, wymieniając każdorazowo roztwór kolagenazy na świeży. Zmiany masy w trakcie eksperymentu wyrażono jako:

$$(4) \quad \text{Masa pozostała [\%]} = \frac{M_t}{M_0} * 100$$

#### **7.1.4. Badanie adhezji i morfologii komórek**

Przeprowadzono badania biologiczne z wykorzystaniem linii komórek osteoblastopodobnych MG-63. Powierzchnia hydrożeli z wysianymi komórkami MG-63 była obrazowana przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego SEM (FESEM, HITACHI S-4700). W tym celu po trzech dniach prowadzenia hodowli komórkowej (gęstość wysiewu  $2 \cdot 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup>), materiały przepłukano buforem PBS i wykonano procedurę utrwalania i odwadniania hydrożeli z komórkami. Procedura była następująca: zalano materiały roztworem glutaraldehydu (300  $\mu\text{l}$ /dółek, roztwór 2,5% w PBS) i pozostawiono na 75 minut, po tym czasie odciągnięto roztwór, przepłukano buforem PBS i traktowano materiały etanolem o rosnących stężeniach - kolejno 60%, 70%, 80% i 90%, każdorazowo po 500  $\mu\text{l}$ /dółek na 5 minut, po czym zalano materiały etanolem absolutnym na 7 minut. Końcowym etapem było zanurzenie próbek w heksametylodisilazanie (HMDS, 300  $\mu\text{l}$ /dółek) na około 15 minut i suszenie w temperaturze pokojowej. Tak przygotowane próbki były naklejane na taśmę węglową i bezpośrednio przed obrazowaniem SEM napyłane złotem. Mikrografie SEM powierzchni hydrożeli z komórkami były analizowane z wykorzystaniem programu ImageJ.

## 7.2. Wyniki i dyskusja

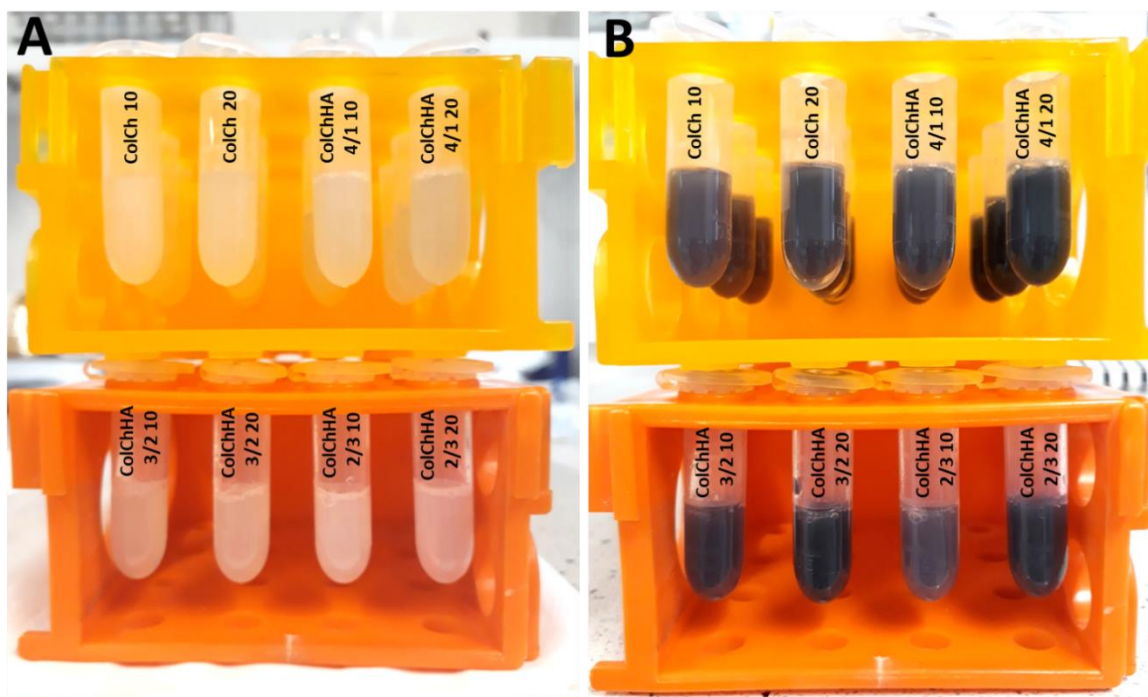
### 7.2.1. Otrzymywanie hydrożeli

Otrzymywano materiały hydrożelowe oparte na kolagenie (Col), chitozanie (Ch) i kwasie hialuronowym (HA) o różnych stosunkach wagowych tych polimerów, sieciowane genipiną o trzech stężeniach: 2 mM, 10 mM i 20 mM. Nowe hydrożele ColChHA były porównywane z hydrożelem kontrolnym ColCh, który został opracowany i scharakteryzowany wcześniej, także w ramach pracy magisterskiej Autorki. Zestawienie wszystkich syntezowanych materiałów przedstawia **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Zestawienie otrzymywanych hydrożeli.

Material	Stosunek wagowy Col:Ch:HA	Stężenie genipiny [mM]
ColCh 2	50:50:0	2
ColCh 10		10
ColCh 20		20
ColChHA 4/1 2	50:40:10	2
ColChHA 4/1 10		10
ColChHA 4/1 20		20
ColChHA 3/2 2	50:30:20	2
ColChHA 3/2 10		10
ColChHA 3/2 20		20
ColChHA 2/3 2	50:20:30	2
ColChHA 2/3 10		10
ColChHA 2/3 20		20

W przypadku wszystkich rodzajów otrzymywanych hydrożeli obserwowano zmianę koloru próbek z lekko mlecznego na ciemnoniebieski w trakcie przejścia ze stanu zolu do żelu, co jest charakterystyczne dla procesu sieciowania z wykorzystaniem genipiny, która reaguje z grupami aminowymi [104], obecnymi w strukturze kolagenu i chitozanu. Zmiany koloru próbek przed i po zajściu procesu żelowania przedstawia **Rysunek 17**.

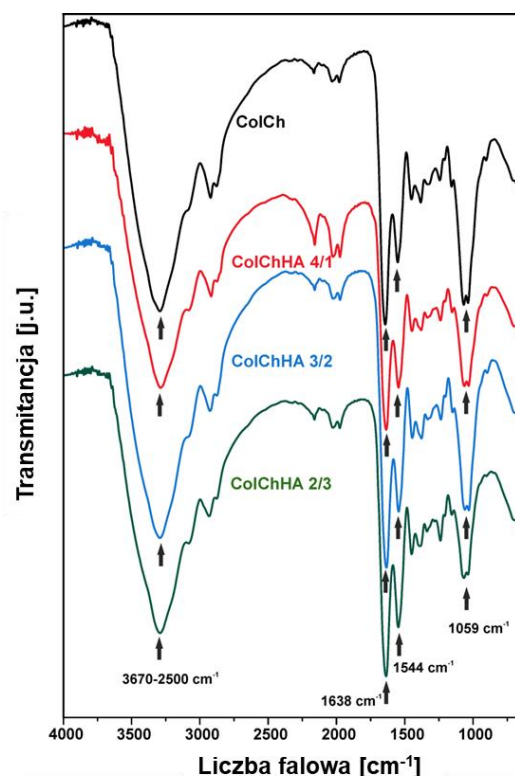


**Rysunek 17.** Próbkki hydrożeli w stanie zolu (A) i po zejściu procesu sieciowania (B).

## 7.2.2. Właściwości fizykochemiczne hydrożeli

### Analiza FTIR

Dokonano analizy grup funkcyjnych w strukturze hydrożeli, wykorzystując spektrometr FTIR. Widma FTIR hydrożeli sieciowanych genipiną o stężeniu 10 mM przedstawia **Rysunek 18**. Na widmach wszystkich próbek pojawiły się charakterystyczne pasma amidowe I i II. Pasma amidowe I odpowiada drganiom rozciągającym wiązania C=O przy około  $1638\text{ cm}^{-1}$ , natomiast pasmo amidowe II odpowiada drganiom zginającym wiązania N-H przy około  $1544\text{ cm}^{-1}$ . Dodatkowo pasmo przy  $1059\text{ cm}^{-1}$  można przypisać ugrupowaniu C-O-C, a szerokie pasmo w zakresie  $3670\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$  jest związane z drganiemi rozciągającymi O-H i N-H w chitozanie [232]. Brak różnic między widmem dla ColCh i widmami dla serii ColChHA wskazuje, że obecne w układzie makrocząsteczki kwasu hialuronowego oddziaływały elektrostatycznie z makrocząsteczkami chitozanu i nie dochodziło do powstawania nowych wiązań chemicznych.



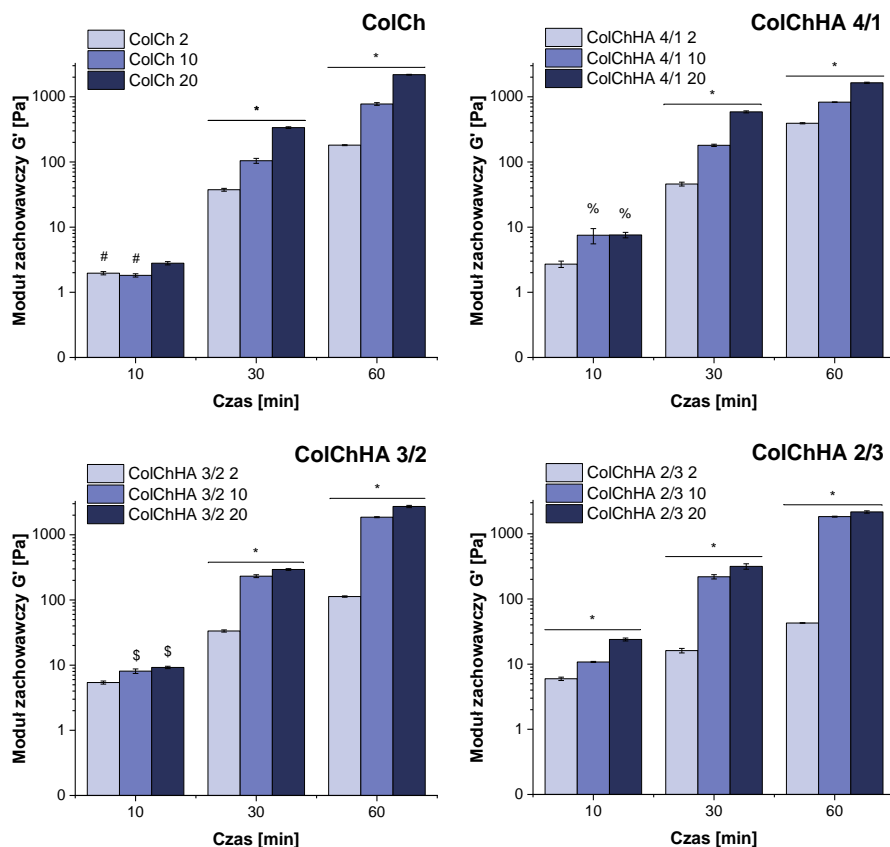
**Rysunek 18.** Widma FTIR dla hydrożeli ColCh i ColChHA, sieciowanych genipiną o stężeniu 10 mM.

### Właściwości reologiczne

Wykonano pomiary wartości modułu zachowawczego ( $G'$ ) po 10, 30 i 60 minutach od rozpoczęcia eksperymentu dla próbek wprowadzonych do układu pomiarowego w stanie zolu bezpośrednio po zmieszaniu wszystkich składników. W początkowej fazie układ był podgrzewany według ustalonej procedury (od 4 °C do 37 °C), a następnie utrzymywał uzyskaną temperaturę (37 °C) do końca eksperymentu. Wartości modułu  $G'$  dla wszystkich rodzajów próbek przedstawia **Rysunek 19**. Moduł zachowawczy  $G'$  jest parametrem opisującym właściwości sprężyste substancji podczas odkształcenia. W przypadku hydrożeli zachowanie sprężyste jest związane z procesem sieciowania - mocniejsza i bardziej usieciowana struktura hydrożeli przekłada się na wyższe wartości modułu  $G'$  [233]. Po 10 minutach prowadzenia pomiaru moduł  $G'$  dla wszystkich badanych rodzajów hydrożeli przyjmował niskie wartości w zakresie od 2 do 24 Pa, wskazując na stan zolu. Następnie parametr ten rósł w czasie, osiągając maksymalne wartości po 60 minutach prowadzenia pomiaru, co wskazuje na postępujący proces sieciowania do momentu uzyskania żelu. Otrzymywane hydrożele posiadały zatem zdolność do przechodzenia ze stanu zolu do żelu w temperaturze 37 °C. Umożliwia to ich potencjalne wykorzystywanie w charakterze materiałów wstrzykiwalnych, wprowadzanych w postaci zolu do ubytku, a następnie

sieciowanych *in situ* w warunkach fizjologicznych z utworzeniem żelu, stanowiącego wsparcie dla odtwarzającej się tkanki.

Uzyskane wyniki pokazały silną zależność wartości modułu  $G'$  od stężenia genipiny, im wyższe stężenie czynnika sieciującego w układzie, tym większy stopień usieciowania i tym samym wyższa wartość  $G'$ . Najwyższe wartości  $G'$  wykazały hydrożele sieciowane genipiną o najwyższym stężeniu (20 mM), po 60 minutach eksperymentu wartości te wyniosły średnio 2183 Pa dla ColCh 20, 1640 Pa dla ColChHA 4/1 20, 2720 Pa dla ColChHA 3/2 20 oraz 2163 Pa dla ColChHA 2/3 20. Różnice między tymi wartościami wskazują, że obecność kwasu hialuronowego (HA) w strukturze hydrożeli również może mieć wpływ na moduł  $G'$ , a efekt zależny jest od stężenia HA. Należy jednak podkreślić, że nie zaobserwowano znaczącego pogorszenia modułu  $G'$  dla hydrożeli ColChHA w porównaniu do hydrożelu ColCh, co potwierdza efektywną integrację HA w hydrożelową strukturę. W odróżnieniu od kolagenu i chitozanu, kwas hialuronowy nie bierze udziału w sieciowaniu chemicznym genipiną. Stabilność i zachowanie podobnych właściwości sprężystych hydrożeli ColChHA do hydrożelu ColCh można przypisać oddziaływaniu ujemnie naładowanych grup HA z dodatnio naładowanymi grupami Ch oraz tworzeniu przenikającej się sieci polimerowej (ang. *interpenetrating polymer network*, IPN) [229][234].

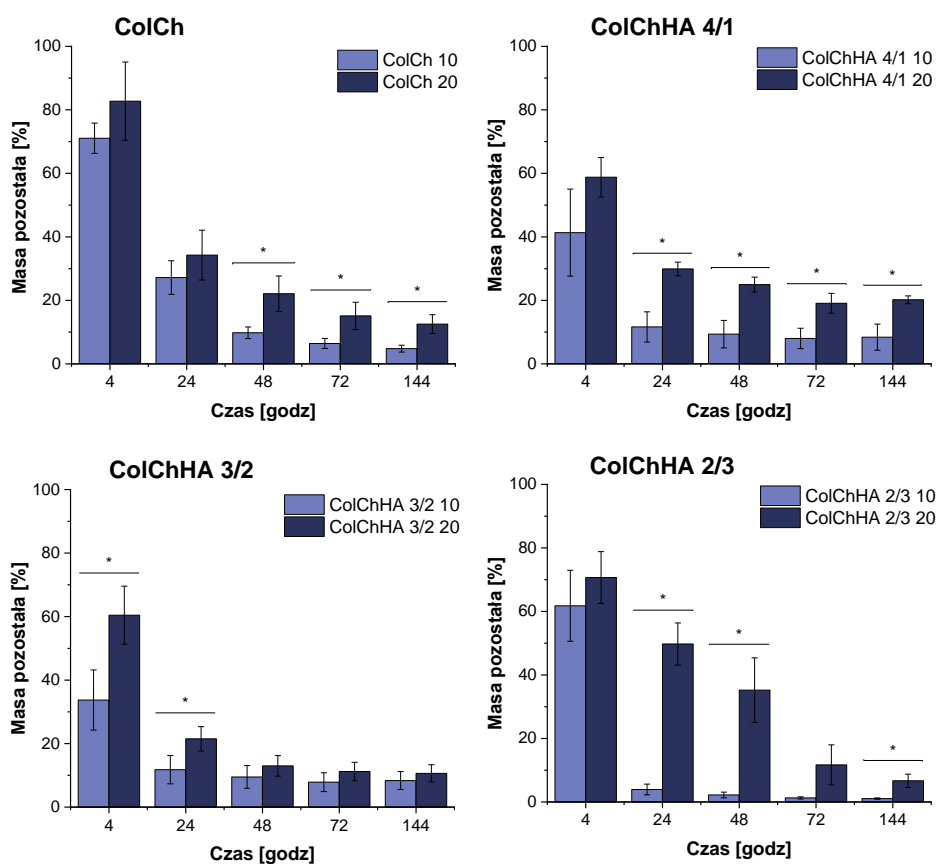


**Rysunek 19.** Wartości modułu zachowawczego  $G'$  dla hydrożeli ColCh i ColChHA, osiągnięte po 10, 30 i 60 minutach od rozpoczęcia pomiaru. \* nad czarną linią oznacza istotność statystyczną pomiędzy materiałami o takim samym składzie polimerów, sieciowanych 2 mM, 10 mM i 20 mM genipiną w tym samym punkcie czasowym (poziom istotności  $p < 0,05$ ), # oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColCh 20 po 10 min ( $p < 0,05$ ), % oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA 4/1 2 po 10 min ( $p < 0,05$ ), \$ oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA 3/2 2 po 10 min ( $p < 0,05$ ).

### Degradacja enzymatyczna

Zbadano proces degradacji enzymatycznej w warunkach *in vitro*, masę próbek hydrożelowych monitorowano po 4, 24, 48, 72 oraz 144 godzinach inkubacji w roztworze kolagenazy. Degradacji nie poddano hydrożeli sieciowanych genipiną o najniższym stężeniu (2 mM) ze względu na ich zbyt dużą płynność. Zmiany masy hydrożeli w trakcie eksperymentu przedstawia **Rysunek 20**. Kolagenaza jest enzymem posiadającym zdolność do rozkładu naturalnego kolagenu [235] i dzięki temu była czynnikiem powodującym redukcję masy badanych hydrożeli, gdyż wszystkie zawierały kolagen. Po 4 godzinach inkubacji w roztworze enzymu ubytek masy wyniósł średnio od 30 do 70% dla próbek sieciowanych genipiną o stężeniu 10 mM oraz od 20 do 40% dla próbek sieciowanych genipiną o stężeniu 20 mM. W następnych punktach czasowych obserwowano dalszy postęp degradacji badanych materiałów z zachowaniem tendencji większych spadków masy dla hydrożeli sieciowanych

niższym stężeniem genipiny. Po 144 godzinach kończących eksperyment hydrożele sieciowane genipiną o stężeniu 10 mM zachowały od około 1 do 10% masy początkowej, a te sieciowane genipiną o stężeniu 20 mM zachowały od 5 do 20% masy początkowej, przy czym największą masę pozostałą wykazał hydrożel ColChHA 4/1 20 (średnio 20% masy początkowej). Wyniki potwierdziły, że zastosowanie wyższego stężenia genipiny pozwala na uzyskanie hydrożeli o większej gęstości usieciowania, co utrudnia dyfuzję cząsteczkom kolagenazy i tym samym spowalnia proces degradacji [156]. Szybkość degradacji może być zatem dostosowana w zależności od potrzeb poprzez zmianę stężenia genipiny.



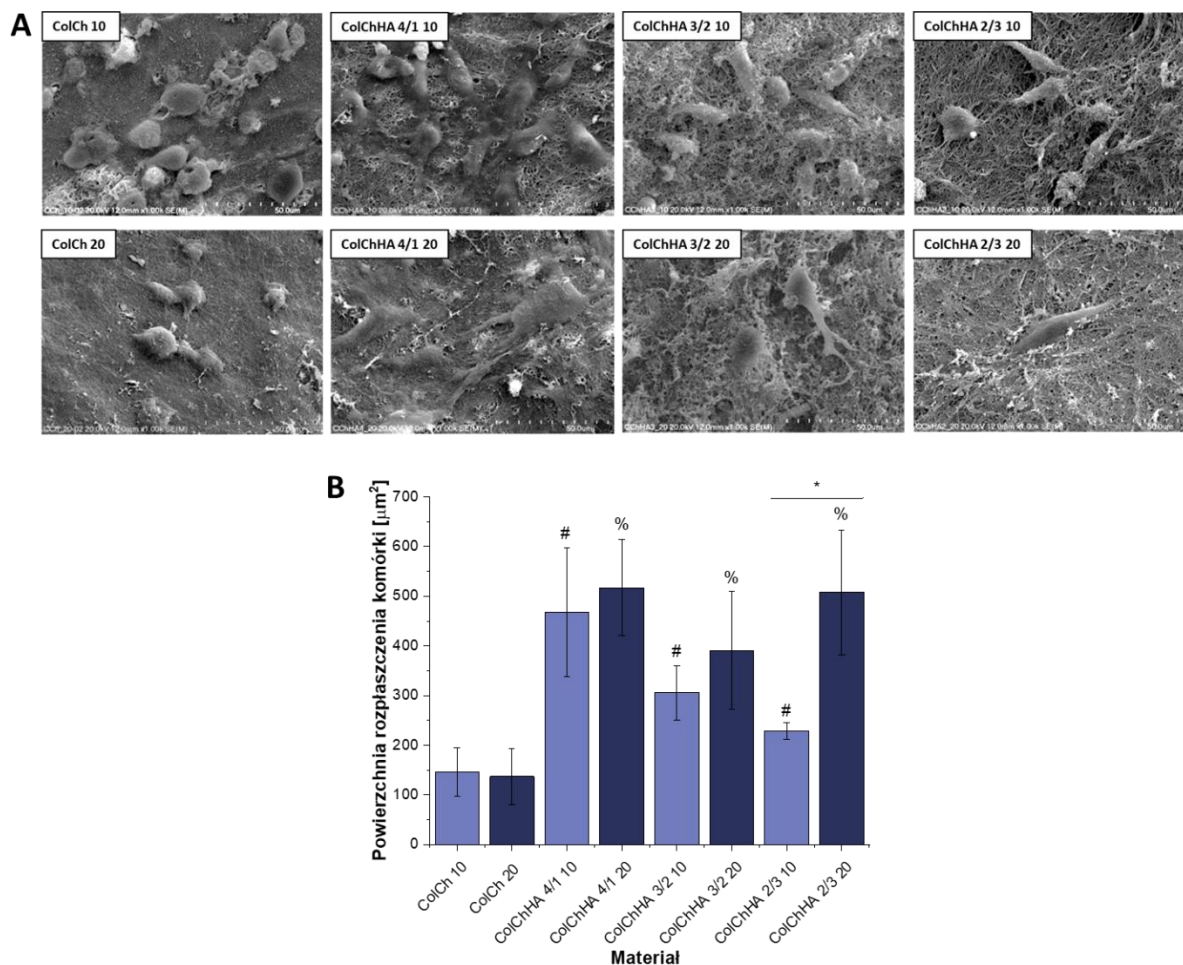
**Rysunek 20.** Zmiany masy hydrożeli ColCh i ColChHA sieciowanych genipiną o stężeniach 10 i 20 mM w obecności kolagenazy. \* nad czarną linią oznacza istotność statystyczną pomiędzy hydrożelami sieciowanymi genipiną o stężeniu 10 i 20 mM w tym samym punkcie czasowym badania degradacji ( $p < 0,05$ ).

### 7.2.3. Adhezja i morfologia komórek

Zbadano adhezję i morfologię komórek linii MG-63 hodowanych przez 3 dni na powierzchni hydrożeli sieciowanych genipiną o stężeniu 10 i 20 mM. Podobnie jak w przypadku degradacji nie badano hydrożeli sieciowanych genipiną o najniższym stężeniu (2 mM). Utrwalone komórki obrazowano, wykorzystując skaningowy mikroskop elektronowy (SEM),

mikrofotografie powierzchni materiałów z komórkami przedstawia **Rysunek 21A**. Komórki są dobrze widoczne na wszystkich badanych hydrożelach. Na adhezję i kształt komórek wpływają właściwości mechaniczne hydrożeli, a w szczególności sztywność. W przypadku hydrożeli ColCh można zauważyć, że komórki przyjmowały głównie kuliste kształty, natomiast na hydrożelach zawierających dodatkowo kwas hialuronowy (ColChHA) komórki były bardziej rozplaszczone i wydłużone, efekt ten jest lepiej widoczny dla materiałów sieciowanych genipiną o stężeniu 20 mM. Obserwacje te zostały potwierdzone poprzez wyznaczenie średniej powierzchni rozplaszczania komórek na hydrożelach (**Rysunek 21B**). Komórki o kulistych kształtach na hydrożelach ColCh zajmowały znacznie mniejszą powierzchnię w porównaniu z bardziej rozplaszczonymi komórkami na hydrożelach ColChHA. Dodatkowo w przypadku materiałów ColChHA widoczny był trend wskazujący na wzrost powierzchni komórek hodowanych na hydrożelach sieciowanych przy użyciu genipiny o wyższym stężeniu genipiny (20 mM). Największą powierzchnię rozplaszczania komórek wykazano dla materiałów ColChHA 4/1 20 oraz ColChHA 2/3 20. Zastosowanie wyższego stężenia genipiny pozwala na uzyskanie większego stopnia usieciowania i sztywniejszych materiałów. Badania reologiczne potwierdziły wyższe wartości modułu zachowawczego  $G'$  dla tych hydrożeli w porównaniu do hydrożeli sieciowanych genipiną o niższym stężeniu. Doniesienia literaturowe wskazują, że na mniej sztywnych podłożach komórki mogą przyjmować bardziej zaokrąglone kształty, natomiast im sztywniejsze jest podłoże tym kształt komórek może być bardziej zróżnicowany, z tendencją do rozplaszczania [236][237].





**Rysunek 21.** Mikrofotografie SEM przedstawiające morfologie komórek MG-63 hodowanych przez 3 dni na powierzchni hydrożeli ColCh oraz ColChHA sieciowanych genipiną o stężeniu 10 i 20 mM (**A**) oraz średnia powierzchnia rozplaszczenia komórek MG-63 hodowanych przez 3 dni na powierzchni hydrożeli ColCh oraz ColChHA sieciowanych genipiną o stężeniu 10 i 20 mM (**B**). \* nad czarną linią oznacza istotność statystyczną pomiędzy hydrożelami o takim samym składzie polimerów, sieciowanymi genipiną o stężeniu 10 i 20 mM ( $p < 0,05$ ), # oznacza istotność statystyczną w porównaniu z hydrożelem ColCh 10 ( $p < 0,05$ ), % oznacza istotność statystyczną w porównaniu z hydrożelem ColCh 20 ( $p < 0,05$ ).

### 7.3. Podsumowanie

Otrzymano i scharakteryzowano biomimetyczne materiały hydrożelowe, które mogą być potencjalnie przydatne jako wstrzykiwalne rusztowania dla potrzeb inżynierii tkankowej. Komponentami hydrożeli były biopolimery – kolagen, chitozan oraz kwas hialuronowy, które należą do najczęściej stosowanych polimerów naturalnych w inżynierii tkankowej, a czynnikiem sieciującym te układy była genipina. Badania wykazały, że zarówno skład biopolimerów, jak i użyte stężenie genipiny miały wpływ na właściwości fizykochemiczne i biologiczne otrzymanych hydrożeli. Poprzez monitorowanie procesu sieciowania w badaniach reologicznych potwierdzono, że hydrożele posiadały potencjał sieciowania *in situ* w temperaturze 37 °C i mogą być aplikowane w formie wstrzykiwalnej. Hydrożele

sieciowane genipiną o najwyższym stężeniu (20 mM) charakteryzowały się stabilną strukturą o lepszych właściwościach mechanicznych, a proces degradacji enzymatycznej zachodził wolniej w porównaniu do hydrożeli sieciowanych genipiną o niższym stężeniu. Najniższe używane stężenie genipiny (2 mM) okazało się niewystarczające dla zapewnienia integralności materiałów podczas procesu degradacji i w warunkach hodowli komórkowej. Obecność kwasu hialuronowego w strukturze hydrożeli istotnie wspierała adhezję komórek linii MG-63 na powierzchni badanych materiałów.

Wstępne badania prowadzone w ramach pracy magisterskiej Autorki dowiodły, że hydrożele ColChHA posiadają wysoki stopień pęcznienia, hydrofilową powierzchnię oraz nie są toksyczne dla komórek linii MG-63. Wyniki badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej wskazują, że najbardziej obiecującymi hydrożelami spośród wszystkich badanych są materiały ColChHA 4/1 i ColChHA 2/3 sieciowane najwyższym stężeniem genipiny (20 mM) ze względu na najlepsze właściwości mechaniczne, wolniejszą degradację oraz zapewnienie najlepszego środowiska dla adhezji i rozplaszczania się komórek. Po wnikliwej analizie wszystkich przeprowadzonych eksperymentów do kolejnego etapu badań jako hydrożelowa matryca do otrzymania materiału hybrydowego został wybrany hydrożel ColChHA 4/1 20.

## **8. Otrzymywanie i scharakteryzowanie materiałów hybrydowych opartych na matrycy hydrożelowej i cząstkach krzemionki**

### **8.1. Materiały i metody**

#### **8.1.1. Materiały**

Oprócz odczynników wymienionych w rozdziale 7 (punkt 7.1.1, str. 71) użyto również: kolagen typu I, z ogona szczurzego (3,5 mg/ml w 0,02N kwasie octowym, Corning), tetraetoksylan (TEOS,  $\geq 98\%$ , Fluka), 3-aminopropylotrietoksylan (APTES,  $\geq 98\%$ , Fluka), chlorek sodu NaCl (POCH), wodorowęglan sodu NaHCO<sub>3</sub> (POCH), chlorek potasu KCl (Chempur), trójwodny fosforan potasu K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich), sześciowodny chlorek magnezu MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O (POCH), chlorek wapnia CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich), siarczan (VI) sodu Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (POCH), tris(hydroksymetylo)aminometan (HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub> (tris, Sigma-Aldrich), kwas solny HCl 1M (POCH), odczynnik Alamar Blue (Invitrogen), bufor do lizy komórek Cell Digestion Buffer i Cell Assay Buffer [tris(hydroksymetylo)aminometan (HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub> (tris, Sigma-Aldrich), chlorek cynku ZnCl<sub>2</sub> (POCH), sześciowodny chlorek

magnezu  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (POCh), Triton X-100 (POCh)], fosforan paranitrofenolu (pNPP, Sigma-Aldrich).

### **8.1.2. Otrzymywanie cząstek krzemionki funkcjonalizowanych powierzchniowo grupami aminowymi**

Sfunkcjonalizowane grupami aminowymi cząstki krzemionkowe otrzymano metodą zol-żel. Do mieszaniny składającej się z etanolu (5,1 ml) i wody (5ml) wprowadzono kolejno 1 ml tetraetoksyilanu (TEOS) i 0,1 ml aminopropylotrietoksyilanu (APTES). Uzyskaną w ten sposób mieszaninę mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Otrzymany materiał poddano procesowi wirowania, a następnie oczyszczono przepłukując wodą dejonizowaną i wirując. Cykl płukania/wirowania powtórzono czterokrotnie. Materiał suszono w piecu próżniowym w temperaturze 60 °C. Po oczyszczeniu uzyskano biały proszek.

### **8.1.3. Scharakteryzowanie cząstek krzemionki**

#### **Badanie składu powierzchniowego**

Efekt funkcjonalizacji powierzchni cząstek krzemionki grupami aminowymi charakteryzowano, wykorzystując spektrometr podczerwieni z transformacją Fouriera FTIR (Thermo Nicolet iS10 FTIR z przystawką ATR, Thermo Scientific). Skład powierzchniowy analizowano także przy użyciu rentgenowskiej spektrometrii fotoelektronów XPS (ESCA, PREVAC). Do pomiarów XPS próbki suszono w temperaturze 100 °C przez 24 godziny oraz wykorzystywano układ do neutralizacji ładunku powierzchniowego FS40A-PS (PREVAC). Analizę otrzymanych danych przeprowadzono korzystając z programu CasaXPS. Identyfikację składu pierwiastkowego badanego materiału wykonano na podstawie położenia pików na widmie.

#### **Badanie morfologii, rozmiaru i potencjału zeta**

Wykonano pomiary średnic hydrodynamicznych ( $d_z$ ), wykorzystując metodę dynamicznego rozpraszania światła DLS oraz pomiary potencjałów zeta ( $\zeta$ ) cząstek krzemionkowych, wykorzystując technikę laserowego pomiaru prędkości metodą Dopplera LDV. Do pomiarów średnic hydrodynamicznych i potencjałów zeta użyto aparat Nano ZS (Malvern Instruments). Dla określenia rozmiarów i morfologii powierzchni cząstek krzemionki wykonano także obrazowanie skaningowym mikroskopem elektronowym SEM (FESEM, HITACHI S-4700).

W tym celu kroplę zawiesiny z cząstkami umieszczano na podłożu krzemowym i pozostawiono do wyschnięcia. Bezpośrednio przed badaniem SEM próbki napyłano złotem.

### **Badanie porowatości**

Wyznaczono rozmiar porów oraz powierzchnię właściwą ( $S_{\text{BET}}$ ) cząstek krzemionki, korzystając z pomiaru izoterm adsorpcji azotu. Eksperyment adsorpcji azotu przeprowadzono w temperaturze  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  przy pomocy automatycznego analizatora powierzchni właściwej i porowatości 3 Flex (Micromeritics). Przed pomiarami próbki odgazowano w temperaturze  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  przez 24 godziny. Powierzchnia właściwa została określona na podstawie modelu Brunauera, Emmetta i Teller (BET), a objętość porów według metody Barreta, Joynera i Halendy (BJH).

### **8.1.4. Otrzymywanie materiałów hybrydowych**

Materiały hybrydowe otrzymywano w wyniku jednoczesnego sieciowania genipiną mieszaniny biopolimerów (kolagenu, chitozanu i kwasu hialuronowego) i powierzchniowo modyfikowanych cząstek krzemionkowych. Zmieszano odpowiednie objętości roztworów biopolimerów:  $590\text{ }\mu\text{l}$  roztworu kolagenu,  $193\text{ }\mu\text{l}$  roztworu chitozanu (roztwór  $1\%$  (w/v) w  $1\%$  kwasie octowym) i  $48\text{ }\mu\text{l}$  roztworu kwasu hialuronowego (roztwór  $1\%$  (w/v) w  $10\times$  buforze PBS) – według procedury opisanej w rozdziale 7 (punkt 7.1.2, str. 72) dla hydrożelu ColChHA 4/1. Otrzymany zol poddano energicznemu wytrząsaniu, a następnie dodano  $0,3\text{ ml}$  wodnej zawiesiny sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionkowych o odpowiednim stężeniu ( $C_1 = 16,6\text{ mg/ml}$ ,  $C_2 = 8,3\text{ mg/ml}$ ,  $C_3 = 1,7\text{ mg/ml}$ ). Mieszaninę ponownie wytrząsano, a następnie dodawano  $169\text{ }\mu\text{l}$  roztworu genipiny (roztwór o stężeniu  $20\text{ mM}$ , sporządzony w  $10\times$  buforze PBS) i inkubowano w temperaturze  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  aż do całkowitego usieciowania. Stosunek wagowy biopolimerów w otrzymanym materiale wyniósł: Col:Ch:HA – 50:40:10. Stosując trzy różne stężenia zawiesin cząstek krzemionkowych otrzymano trzy rodzaje materiałów hybrydowych: ColChHA 4/1 C1, ColChHA 4/1 C2 i ColChHA 4/1 C3. Jako materiał kontrolny otrzymano hydrożel o analogicznym składzie biopolimerów, ale bez dodatku cząstek krzemionkowych (ColChHA 4/1).

### 8.1.5. Badania właściwości fizykochemicznych materiałów hybrydowych

#### Badanie zdolności do pęcznienia

Przeprowadzono badania zdolności uzyskanych materiałów hydrożelowych do pęcznienia w warunkach fizjologicznych. W tym celu otrzymywano serię materiałów (po trzy powtórzenia dla każdego rodzaju), przenoszono je do płytek 6-dołkowych i zalewano buforem PBS (3 ml/dołek). Płytki zabezpieczano i inkubowano w 37 °C z delikatnym wytrząsaniem przez 24 godziny. Następnie odciągano PBS i przepłukiwano dwukrotnie wodą dejonizowaną, każdorazowo inkubując materiały w 37 °C przez 30 minut. Po odciągnięciu wody ważono materiały ( $M_s$ ) i poddano procesowi liofilizacji. Zliofilizowane materiały ponownie zważono ( $M_d$ ). Stopień pęcznienia materiału ( $SR$ ) wyznaczano, stosując wzór:

$$(5) \quad SR[\%] = \frac{M_s - M_d}{M_d} \cdot 100$$

#### Badanie liofilowości

W celu określenia liofilowości materiałów wykonywano pomiary kąta zwilżania przy użyciu urządzenia Surftens Universal instrument (OEG GmbH, Frankfurt, Germany). Dla każdego rodzaju materiału wykonywano po pięć pomiarów kątów zwilżania, starając się, aby punkty pomiarowe obejmowały jak największy obszar dostępnej powierzchni próbki. Z otrzymanych danych obliczano średni kąt zwilżalności dla każdego materiału.

#### Badanie właściwości reologicznych

Przeprowadzono badania właściwości reologicznych stosując reometr rotacyjny MCR 301 (Anton Paar), zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 7.1.3 (str. 72). Badania wykonano z wykorzystaniem geometrii pomiarowej typu płytka-płytko o średnicy 20 mm, przy szczelnie pomiarowej  $h = 1$  mm, próbki poddano wymuszeniu oscylacyjnemu o następujących parametrach: odkształcenie  $\gamma = 1\%$  z częstotliwością  $f = 1$  Hz. Pojedynczy pomiar próbki trwał 60 minut, wykonano po trzy powtórzenia dla każdego rodzaju próbki.

#### Badanie procesu degradacji

##### *Degradacja w buforze PBS*

Przez okres 21 dni monitorowano proces degradacji materiałów hydrożelowych w buforze PBS. Przygotowaną do tego eksperymentu serię materiałów (po trzy powtórzenia dla każdego rodzaju) przepłukano wodą dejonizowaną, zważono i przyjęto uzyskaną wartość jako 100% całkowitej masy hydrożeli ( $M_0$ ). Następnie przeniesiono materiały do płytki 24-dołkowej, zalano buforem PBS (1 ml/dołek), zabezpieczono płytkę i inkubowano w temperaturze 37 °C

z delikatnym wytrząsaniem. W określonych punktach czasowych w okresie 3 tygodni sprawdzano ubytek masy materiałów, każdorazowo ważąc je ( $M_t$ ), a następnie zalewając świeżym PBS. Zmiany masy w trakcie eksperymentu wyrażono jako % masy pozostałej, obliczany według wzoru (4) w punkcie 7.1.3 (str. 73).

### ***Degradacja enzymatyczna***

Przez okres 144 godzin monitorowano proces degradacji materiałów w obecności enzymu kolagenazy (roztwór 0,2 mg/ml w buforze PBS z 0,36 mM CaCl<sub>2</sub>) zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 7.1.3 (str. 73). Zmiany masy w trakcie eksperymentu wyrażono jako % masy pozostałej, obliczany według wzoru (4).

### **8.1.6. Badanie biomineralizacji *in vitro***

Prowadzono badania zdolności do tworzenia się fazy mineralnej na powierzchni materiałów hydrożelowych poprzez inkubację w symulowanym sztucznym osoczu (SBF).

### **Otrzymywanie SBF**

Sztuczne osocze przygotowywano według procedury opisanej przez Kokubo i Takadama [238]. W **Tabeli 2** znajduje się wykaz wszystkich reagentów i ich ilości użytych do otrzymania 1000 ml SBF.

**Tabela 2.** Reagenty użyte do otrzymania SBF.

<b>Lp.</b>	<b>Reagenty</b>	<b>Ilość</b>
1	NaCl	8,035 g
2	NaHCO <sub>3</sub>	0,355 g
3	KCl	0,225 g
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,231 g
5	MgCl <sub>2</sub>	0,311 g
6	1 M HCl	39 ml
7	CaCl <sub>2</sub>	0,292 g
8	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,072 g
9	Tris	6,118 g
10	1 M HCl	0-5 ml

Do plastikowej zlewki wprowadzono 700 ml wody dejonizowanej, umieszczono ją w łaźni wodnej, a całość ustawiono na mieszadło magnetycznym i podgrzano wodę do  $36,5 \pm 1,5$  °C. W takiej temperaturze rozpuszczano reagenty w kolejności od 1 do 8 (**Tabela 2**). Następnie dodano wody dejonizowanej do uzyskania objętości 900 ml i ustalono temperaturę  $36,5 \pm 1,5$  °C. Do roztworu wprowadzono elektrodę pH-metru i rozpuszczano Tris przy jednoczesnym pomiarze pH. Kiedy pH wyniosło  $7,30 \pm 0,05$ , sprawdzono temperaturę, aby wynosiła  $36,5 \pm 1,5$  °C. Następnie podniesiono pH na  $7,45 \pm 0,01$  przez dodanie Tris, po czym obniżono pH do  $7,42 \pm 0,01$  przez dodanie 1 M HCl. Rozpuszczono pozostały Tris, uważając by pH mieściło się w zakresie 7,42 – 7,45, a dalej ustalono temperaturę roztworu na  $36,5 \pm 0,2$  °C. Ostatecznie ustalono pH równe 7,40 w temperaturze 36,5 °C. Roztwór przelano z plastikowej zlewki do kolby i uzupełniono wodą dejonizowaną do kreski. Roztwór wymieszano i ochłodzono do temperatury pokojowej, po czym przechowywano w lodówce przez 30 dni.

### **Inkubacja materiałów w SBF**

Materiały hybrydowe umieszczono w płytce 24-dołkowej, zalano roztworem SBF (1 ml/dołek) i inkubowano w 37 °C przez 7 dni, wymieniając SBF co 2 dni na świeży. Po zakończeniu inkubacji materiały przepłukano kilka razy wodą dejonizowaną i zliofilizowano.

Strukturę powierzchni zliofilizowanych materiałów zobrazowano przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego (FESEM HITACHI S-4700). W celu potwierdzenia obecności fazy mineralnej i wyznaczenia stosunku wapnia do fosforu dokonano mikroanalizy rentgenowskiej (EDS, NORAN Vantage). Przed obrazowaniem próbki napyłono złotem.

### **8.1.7. Badania właściwości biologicznych *in vitro***

Do badań biologicznych *in vitro* wykorzystano linię komórek osteoblastopodobnych MG-63. Na potrzeby hodowli komórek przygotowywano pożywkę, która składała się z medium hodowlanego (DMEM), suplementowanego antybiotykami (roztwór penicylina/streptomycyna) w ilości 1% (obj.) oraz płodowej surowicy bydlęcej (FBS), która stanowiła 10% (obj.) całkowitej ilości pożywki. Pożywkę wymieniało co 2-3 dni hodowli. W celu wykonania pasażu odrywano zaadherowane do dna butelki hodowlanej komórki w sposób chemiczny z wykorzystaniem trypsyny. Materiały hybrydowe do hodowli komórkowej otrzymywano w płytkach 24-dołkowych (po 3 powtórzenia dla każdego rodzaju), przepłukiwano dwukrotnie buforem PBS, każdorazowo inkubując je przez 30 minut

z delikatnym wytrząsaniem. Następnie sterylizowano je promieniowaniem UV przez około 20 minut i inkubowano przez godzinę w obecności medium hodowlanego (0,5 ml/dołek, bez FBS) w warunkach hodowli komórkowej (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Bezpośrednio przed wysiewaniem komórek usuwano medium z materiałów, komórki wysiewano na materiałach w ilości 2·10<sup>4</sup> komórek/cm<sup>2</sup>.

#### **Badanie żywotności komórek – test Alamar Blue**

Test żywotności komórek wysianych na materiałach prowadzono z użyciem odczynnika Alamar Blue po 1, 3 oraz 7 dniu hodowli komórkowej. Roztwór Alamar Blue otrzymywano, dodając do pożywki odczynnik Alamar Blue, który stanowił 10% (obj.) całkowitej ilości roztworu. Po usunięciu z materiałów pożywki, wprowadzano po 200 µl/dołek roztworu Alamar Blue, zabezpieczano płytki folią aluminiową i zostawiano w inkubatorze hodowlanym na 2 godziny i 40 minut. Po upływie tego czasu pobierano po 100 µl roztworu z każdego dołka i przenoszono do płytek 96-dołkowych. Płytki umieszczano w czytniku mikropłytek TECAN Infinite M200 i przeprowadzano pomiar absorbancji przy długościach fali 560 nm i 600 nm. Wartości absorbancji przeliczano na ilość komórek, korzystając z krzywej kalibracyjnej otrzymanej z pomiarów absorbancji dla znanych ilości komórek MG-63.

#### **Badanie aktywności fosfatazy alkalicznej – test ALP**

Test na aktywność fosfatazy alkalicznej ALP był prowadzony równoległe do testu Alamar Blue po 3 i 7 dniu hodowli komórek na materiałach. Aby przygotować materiały do testu ALP, po przeprowadzeniu testu Alamar Blue materiały płukano dwukrotnie buforem PBS, a następnie zalewano je buforem do lizy komórek (Cell Digestion Buffer, 200 µl/dołek), który sporządzono przez 10-krotne rozcieńczenie wodnego roztworu Cell Assay Buffer (1,5 M Tris, 1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> z dodatkiem 1% surfaktanta Triton X-100). Zalane tym buforem materiały umieszczano w inkubatorze hodowlanym na 30 minut, po czym zostawiano je na 24 godziny w temperaturze 4 °C. Następnego dnia zbierano lizat z dołków poprzez zdrapywanie komórek z powierzchni materiałów, zebrane próbki mieszano przez wytrząsanie i wirowano przez 5 minut. Przygotowano roztwór substratu poprzez rozpuszczenie 37,1 mg fosforanu paranitrofenolu (pNPP) w 20 ml Cell Assay Buffer. Do płytki 96-dołkowej wprowadzano po 190 µl roztworu pNPP i po 10 µl próbki eksperymentalnej (zebrane z materiałów lizaty komórkowe), następnie płytkę zabezpieczano folią aluminiową i pozostawiano w temperaturze pokojowej na około 50 minut. W kolejnym etapie umieszczano płytkę w czytniku mikropłytek TECAN Infinite M200 i przez 6 minut wykonywano, co minutę, pomiar absorbancji przy długości fali 405 nm. Aby przeliczyć



absorbancję na ilość wytworzonego produktu (paranitrofenol, pNP, (nmol)), zastosowano równanie:

$$(6) \quad \text{produkt [nmol]} = \left( \frac{\Delta A_{410} \cdot K}{V_{\text{próbki}}} \right) \cdot V_{\text{całkowita}}$$

gdzie  $\Delta A_{410}$  - różnica absorbancji pomiędzy następującymi po sobie pomiarami,  $K$  – współczynnik wyznaczany z krzywej kalibracyjnej równy stężeniu paranitrofenolu przy absorbancji  $A = 1$ , objętości:  $V_{\text{próbki}} - 10 \mu\text{l}$ ,  $V_{\text{całkowita}} - 200 \mu\text{l}$ . Po odpowiednim przeliczeniu ilości produktu, wyniki odnoszono do liczby żywych komórek z testu Alamar Blue. Tym samym aktywność ALP wyrażano jako ilość produktu (pNP) w przeliczeniu na liczbę żywych komórek.

### **Badanie adhezji i morfologii komórek**

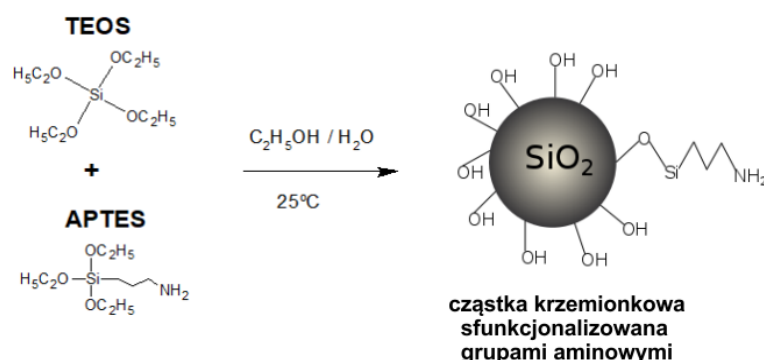
Powierzchnia materiałów z wysianymi komórkami linii MG-63 była obrazowana przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego SEM (FESEM, HITACHI S-4700). W tym celu po trzech dniach prowadzenia hodowli komórkowej materiały przepłukano buforem PBS i wykonano procedurę utrwalania i odwadniania zgodnie z opisem zamieszczonym w punkcie 7.1.4 (str. 73). Bezpośrednio przed obrazowaniem SEM próbki były napyłane złotem. Mikrofotografie SEM powierzchni hydrożeli z komórkami były analizowane z wykorzystaniem programu ImageJ.

## **8.2. Wyniki i dyskusja**

### **8.2.1. Otrzymywanie cząstek krzemionki funkcjonalizowanych powierzchniowo grupami aminowymi**

Otrzymano cząstki krzemionki funkcjonalizowane grupami aminowymi na powierzchni, wykorzystując jednoetapową metodę zol-żel (ang. *one-pot sol-gel method*) w układzie tetraetoksylan (TEOS)/aminopropylotrietoksylan (APTES)/etanol/woda (**Rysunek 22**) [239]. Grupy aminowe obecne w strukturze APTES są zdolne do katalizowania reakcji hydrolizy i kondensacji TEOS [240]. Jak wykazał Ottenbrite i współpracownicy, dodatek APTES do układu TEOS/etanol/woda powodował gwałtowny wzrost pH mieszaniny, wynikający z protonacji grup aminowych oraz wytwarzaniu dużej ilości jonów  $\text{OH}^-$ , co zapoczątkowało reakcję zol-żel [241]. Warunki syntezy cząstek krzemionki funkcjonalizowanych grupami aminowymi zostały zoptymalizowane w celu otrzymania struktur o zdefiniowanym rozmiarze oraz zapewnienia współistnienia na powierzchni grup

aminowych oraz grup silanolowych (Si-OH), które sprzyjają formowaniu się hydroksyapatytu w warunkach *in vivo*.



**Rysunek 22.** Schemat otrzymywania sfunkcjonalizowanych grupami aminowymi cząstek krzemionkowych.

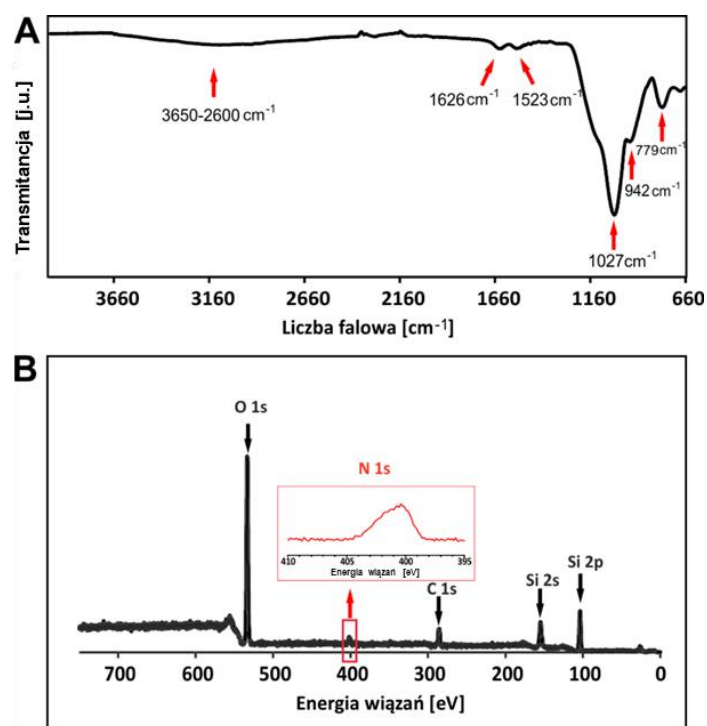
### 8.2.2. Właściwości fizykochemiczne cząstek krzemionki

#### Skład powierzchniowy

Wykonano analizę grup funkcyjnych obecnych na powierzchni otrzymanych cząstek krzemionki, wykorzystując spektroskopię FTIR. Zarejestrowane widmo jest przedstawione na **Rysunku 23A**. Intensywne wąskie pasmo przy 1027 cm<sup>-1</sup> pochodzi od drgań zginających Si-O, a pik przy 779 cm<sup>-1</sup> od drgań rozciągających Si-O-Si, co jest typowe dla struktury krzemionki. Pasma przy 942 cm<sup>-1</sup> można przypisać grupom Si-OH, natomiast pik przy 1523 cm<sup>-1</sup> pochodzi od grup NH<sub>2</sub>. Pasma przy 1626 cm<sup>-1</sup> można przypisać do zaadsorbowanej H<sub>2</sub>O, natomiast szerokie rozległe pasmo pojawiające się w zakresie 2600-3650 cm<sup>-1</sup> jest złożeniem pasm pochodzących od zaadsorbowanych cząsteczek wody, grup OH<sup>-</sup> obecnych na powierzchni próbki i grup aminowych [239][242]. Analiza grup funkcyjnych potwierdziła zatem obecność na powierzchni cząstek krzemionki zarówno grup aminowych, jak i grup silanolowych.

W celu pełniejszej analizy składu powierzchniowego otrzymanego materiału wykonano analizę z użyciem spektroskopii fotoelektronów (XPS). Pozwala ona na określenie jakościowego i ilościowego składu pierwiastkowego warstwy powierzchniowej badanego materiału [243]. **Rysunek 23B** przedstawia widmo XPS, natomiast w **Tabeli 3** zawarto pierwiastkowy skład powierzchni dla sfunkcjonalizowanych grupami aminowymi cząstek krzemionki. Obecne na widmie piki można przypisać do O 1s (531,1 eV), N 1s (402,6 eV), C 1s (286,5 eV), Si 2s (155,1 eV) i Si 2p (103,5) [244]. Sygnały pochodzące od N 1s i C 1s można uznać za diagnostyczne dla powierzchniowej funkcjonalizacji przy pomocy APTES,

ponieważ cząstki krzemionki otrzymane z TEOS nie zawierają tych pierwiastków. Analiza składu powierzchni materiału (**Tabela 3**) wykazała otrzymanie struktur SiCON o składzie atomowym odpowiednio 78%, 3%, 7% i 12% dla O, N, C i Si. Teoretyczny skład atomowy obliczono, zakładając strukturę chemiczną funkcjonalizowanych cząstek krzemionkowych wynikającą z zastosowanego w syntezie stosunku molowego TEOS:APTES (10:1). W przypadku danych eksperymentalnych można zauważyć wyższą zawartość tlenu w porównaniu do danych teoretycznych, co mogło wynikać z obecności eksponowanych na powierzchni grup silanolowych, utworzonych w wyniku częściowej polikondensacji użytych prekursorów. Wyniki analizy widm XPS oraz FTIR potwierdzają, że zastosowana metoda syntezy pozwoliła na otrzymanie cząstek krzemionki sfunkcjonalizowanych grupami aminowymi. Oprócz grup aminowych na powierzchni cząstek krzemionki eksponowane były także grupy silanolowe, co jest korzystne dla zachowania właściwości bioaktywnych krzemionki.



**Rysunek 23.** Widmo FTIR (A) oraz widmo XPS (B) dla cząstek krzemionki funkcjonalizowanych grupami aminowymi.

**Tabela 3.** Wyniki XPS pierwiastkowego składu powierzchni (%) dla sfunkcjonalizowanych grupami aminowymi cząstek krzemionkowych.

Pierwiastkowy skład powierzchni (%)	O 1s	N 1s	C 1s	Si 2p
Dane eksperymentalne	78	3	7	12
Dane teoretyczne	49	2	5	44

### Rozmiar, potencjał zeta, morfologia i porowatość

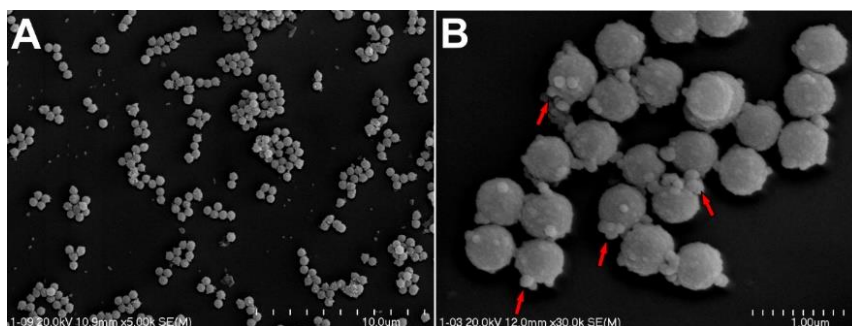
Wykonano pomiary średnicy hydrodynamicznej ( $d_z$ ), współczynnika dyspersji ( $DI$ ), a także potencjału zeta ( $\zeta$ ) sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionki. Wyniki przedstawia **Tabela 4**. Średnica hydrodynamiczna cząstek uzyskanych z pomiarów DLS wyniosła około 607 nm przy współczynniku dyspersji  $DI = 0,3$ . Zgodnie z oczekiwaniami potencjał zeta otrzymanych cząstek przyjął wartość dodatnią (35 mV) (pH zawiesiny wynosiło 6,8), co wynika z protonowania grup aminowych obecnych w szkielecie APTES. Rezultat ten potwierdza, że proces funkcjonalizacji cząstek grupami aminowymi zaszedł efektywnie.

Morfologię otrzymanego materiału określono, wykorzystując technikę skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM). Mikrografie cząstek krzemionki przedstawia **Rysunek 24**. Cząstki charakteryzują się kulistym kształtem oraz występują w dwóch populacjach. Większe z nich mają średnicę około 400 nm, podczas gdy mniejsze cząstki mają około 100 nm. Mniejsze cząstki (oznaczone strzałkami na **Rysunku 24B**) wykazują tendencję do agregowania wokół większych obiektów. Średnica cząstek obserwowanych dzięki mikroskopii SEM jest zatem mniejsza niż uzyskana średnica hydrodynamiczna z pomiarów DLS, które uwzględniają także wszystkie cząsteczki wody przenoszone wraz ze strefą hydratacyjną cząstki.

W oparciu o pomiary izotermy adsorpcji azotu określono parametry charakteryzujące porowatość otrzymanych cząstek (**Tabela 4**). Oznaczono powierzchnię właściwą ( $S_{BET}$ ) w oparciu o model Brunauer-Emmett-Teller (BET), a także rozmiary i objętość porów. Stwierdzono, iż sfunkcjonalizowane cząstki krzemionkowe charakteryzują się powierzchnią właściwą 24 m<sup>2</sup>/g, a także wykazują znaczną mezoporowatość (0,14 cm<sup>3</sup>/g).

**Tabela 4.** Wartości średnicy hydrodynamicznej ( $d_z$ ), współczynnika dyspersji ( $DI$ ), potencjału zeta ( $\zeta$ ) oraz parametrów porozymetrycznych: powierzchnia całkowita ( $S_{BET}$ ), objętość ( $V_{mes}$ ) i średnica ( $D_{mes}$ ) mezoporów dla sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionki.

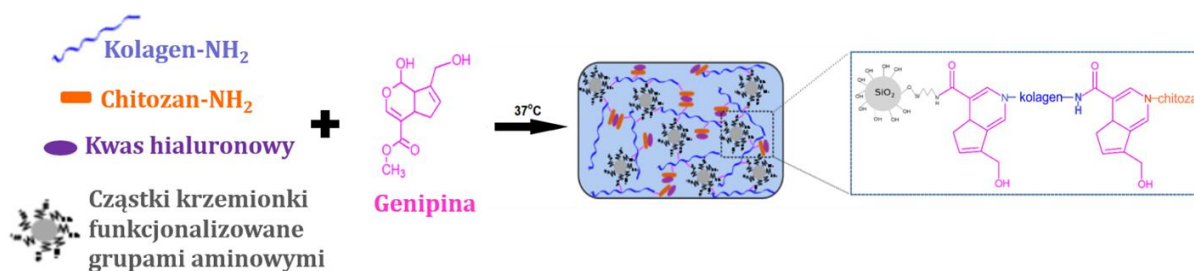
$d_z$ [nm]	$DI$	$\zeta$ [mV]	$S_{BET}$ [m <sup>2</sup> /g]	$V_{mes}$ (BJH) [cm <sup>3</sup> /g]	$D_{mes}$ (BJH) [nm]
607 ± 23	0,3	35 ± 1	24	0,14	23



**Rysunek 24.** Mikrofotografie SEM dla sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionki.

### 8.2.3. Otrzymywanie materiałów hybrydowych

Otrzymywano materiały hybrydowe złożone z matrycy hydrożelowej oraz rozproszonych w niej cząstkach krzemionki funkcjonalizowanych grupami aminowymi. Matryca hydrożelowa ColChHA 4/1 składała się z kolagenu (Col), chitozanu (Ch) oraz kwasu hialuronowego (HA) o stosunku wagowym: Col:Ch:HA – 50:40:10. Do biopolimerowych zoli wprowadzono cząstki krzemionki o trzech różnych stężeniach (C1, C2, C3). Czynnikiem sieciującym te układy była genipina o stężeniu 20 mM. Schemat otrzymywania materiałów hybrydowych przedstawia **Rysunek 25**. Materiałem kontrolnym był hydrożel bez dodatku cząstek krzemionki. Zestawienie otrzymywanych materiałów przedstawia **Tabela 5**.

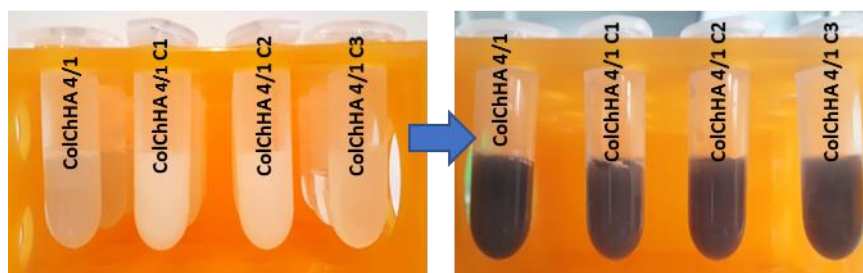


**Rysunek 25.** Schemat otrzymywania materiału hybrydowego.

**Tabela 5.** Zestawienie otrzymywanych materiałów.

<b>Materiał</b>	<b>Stężenie cząstek krzemionki [mg/ml]</b>
ColChHA 4/1	-
ColChHA 4/1 C1	16,6
ColChHA 4/1 C2	8,3
ColChHA 4/1 C3	1,7

Funkcjonalizacja powierzchni cząstek krzemionkowych grupami aminowymi umożliwiła ich trwałe wbudowanie w hydrożelową matrycę w trakcie sieciowania genipiną, która ma zdolność do tworzenia wiązań kowalencyjnych z pierwszorzędowymi grupami aminowymi. W przypadku wszystkich rodzajów otrzymywanych materiałów hybrydowych obserwowano zmianę koloru próbek z lekko mlecznego na ciemnoniebieski w trakcie przejścia ze stanu zolu do żelu, podobnie jak dla hydrożelu bez dodatku cząstek (**Rysunek 26**), co jest typowe dla sieciowania genipiną. Można zatem stwierdzić, że obecność w układzie cząstek krzemionki nie zaburzała procesu sieciowania.



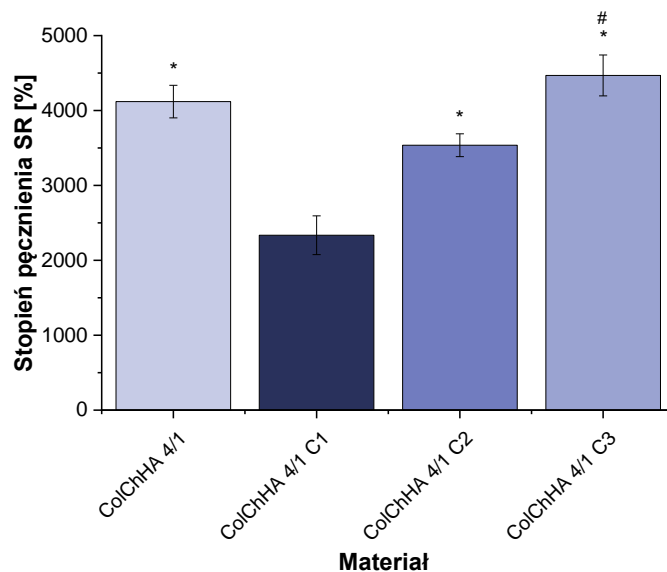
**Rysunek 26.** Próbki hydrożeli w stanie zolu (jasne zabarwienie) i po zajściu procesu sieciowania (ciemne zabarwienie).

#### **8.2.4. Właściwości fizykochemiczne materiałów hybrydowych**

##### **Zdolność do pęcznienia**

Określono stopień pęcznienia (*SR*) dla otrzymanych materiałów hybrydowych w warunkach fizjologicznych ( $\text{pH} = 7,4$ ; temperatura =  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), wyniki przedstawiono na **Rysunku 27**. Obecność i stężenie sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionkowych miało istotny wpływ na właściwości pęcznienia badanych materiałów – stopień pęcznienia malał wraz ze wzrostem ich stężenia. W przypadku materiału o najwyższym stężeniu cząstek (ColChHA 4/1 C1) stopień pęcznienia był znacznie niższy w porównaniu z materiałem kontrolnym (ColChHA 4/1). Wynik ten wskazuje, że cząstki krzemionki wpływały na sztywność struktury hydrożelu

[103][245]. Dodatkowo na mniejszą zdolność do pęcznienia mogła mieć wpływ funkcjonalizacja cząstek krzemionki grupami aminowymi. Umożliwiają one kowalencyjne przyłączenie cząstek do sieci polimerowej, co może przyczynić się do zwiększania gęstości sieci w materiałach hybrydowych [246]. Jednakże w przypadku materiałów o mniejszych zawartościach cząstek krzemionki (ColChHA 4/1 C2 i ColChHA 4/1 C3) nie zaobserwowano znaczącej zmiany właściwości pęcznienia w porównaniu z hydrożelem ColChHA 4/1.



**Rysunek 27.** Stopień pęcznienia w warunkach fizjologicznych dla otrzymanych materiałów. \* oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA 4/1 C1 ( $p < 0,05$ ), # oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA 4/1 C2 ( $p < 0,05$ ).

### Liofilowość

Liofilowość powierzchni otrzymanych materiałów określono w oparciu o wyniki pomiarów kątów zwilżania, które przedstawia **Tabela 6**. Kąt zwilżania dla hydrożelu ColChHA 4/1 wyniósł blisko  $90^\circ$ , wartość ta jest uznawana za wartość graniczną, powyżej której powierzchnię uznaje się za hydrofobową [247]. Wprowadzenie do matrycy polimerowej sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionkowych spowodowało, że powierzchnia materiałów hybrydowych stała się bardziej hydrofilowa, o czym świadczą niższe wartości kąta zwilżania w porównaniu z hydrożelem niezawierającym tych cząstek. Materiał o najwyższym stężeniu cząstek krzemionki (ColChHA 4/1 C1) charakteryzował się najbardziej hydrofilową powierzchnią. Powierzchnie materiałów o mniejszej zawartości cząstek krzemionki (ColChHA 4/1 C2 i ColChHA 4/1 C3) wykazywały zwilżalność na podobnym poziomie. Poprawę hydrofilowości można wyjaśnić obecnością na powierzchni materiałów hybrydowych sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionkowych zawierających eksponowane

powierzchniowo hydrofilowe grupy aminowe [248], co potwierdziła przeprowadzona analiza XPS.

**Tabela 6.** Wartości kątów zwilżania mierzonych na powierzchni otrzymanych materiałów.

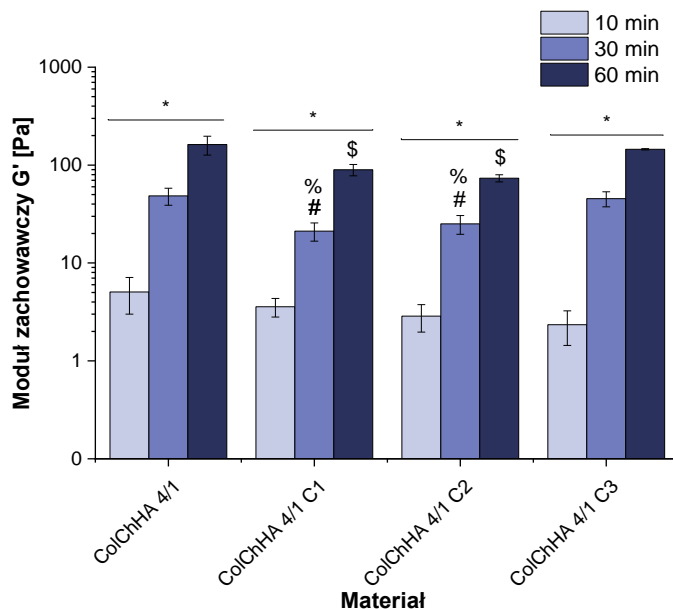
Typ materiału	Wartości kąta zwilżania [°]
ColChHA 4/1	87,2 ± 2,5
ColChHA 4/1 C1	68,6 ± 1,6
ColChHA 4/1 C2	76,9 ± 2,4
ColChHA 4/1 C3	76,5 ± 1,7

### Właściwości reologiczne

W celu potwierdzenia możliwości wykorzystania opracowanych układów hybrydowych jako materiałów wstrzykiwalnych przeprowadzono pomiary reologiczne, które poprzez śledzenie w czasie zmian modułu zachowawczego ( $G'$ ) pozwoliły zweryfikować przejście od stanu zolu do żelu w temperaturze 37 °C. Wartości  $G'$  zmierzone po 10, 30 i 60 minutach eksperymentu są przedstawione na **Rysunku 28**. Na początku procesu żelowania (po 10 minutach) wartości  $G'$  dla wszystkich materiałów były na niskim poziomie (w zakresie 2-5 Pa), potwierdzając ich lepko-sprężysty stan i postać wstrzykiwalną. Następnie wartości  $G'$  znacznie wzrastały po 30 minutach i osiągały wartość maksymalną w ciągu 60 minut od rozpoczęcia procesu sieciowania (tworzenie żelu). Tym samym, porównanie wartości  $G'$  na początku (zol) i na końcu (żel) doświadczenia reologicznego dowiodło, że opracowane materiały mogą pełnić funkcję materiałów wstrzykiwalnych. Można stwierdzić, iż obecność sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionkowych nie utrudnia procesu tworzenia żelu. Jednocześnie wyniki pokazały, że moduł zachowawczy był zależny od użytego stężenia cząstek. Najwyższą wartość  $G'$  po 60 minutach eksperymentu osiągnął materiał z najniższym stężeniem cząstek krzemionki (ColChHA 4/1 C3), była ona porównywalna do wartości  $G'$  dla hydrożelu bez cząstek. Jak wykazał Alvarez i współpracownicy cząstki krzemionki w wyższych stężeniach mogą formować agregaty, wpływając na organizację włókien kolagenowych w badanych kompozytach, co może pogarszać ich właściwości sprężyste [249]. Występowanie takiego efektu było niewykluczone w przypadku materiałów ColChHA 4/1 C1 oraz ColChHA 4/1 C2. Na etapie sieciowania część cząstek mogła zorganizować się w większe struktury, które zostały w takiej formie unieruchomione w matrycy, zmniejszając wartości modułu zachowawczego dla całego układu hybrydowego. Możliwe jest zatem dokonanie zmiany właściwości mechanicznych otrzymywanych materiałów w zakresie badanych stężeń cząstek



krzemionki przy zachowaniu potencjału iniekcyjnego, co jest szczególnie istotne, biorąc pod uwagę łatwość implantacji takich układów w potencjalnych zastosowaniach w inżynierii tkankowej.



**Rysunek 28.** Wartości modułu zachowawczego  $G'$  dla materiałów, osiągnięte po 10, 30 i 60 minutach od rozpoczęcia pomiaru. \* nad czarną linią oznacza istotność statystyczną pomiędzy wartościami  $G'$  danego materiału w kolejnych punktach czasowych ( $p < 0,05$ ), # oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA 4/1 po 30 min ( $p < 0,05$ ), % oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA 4/1 C3 po 30 min ( $p < 0,05$ ), \$ oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA 4/1 C3 po 60 min ( $p < 0,05$ ).

## Degradacja

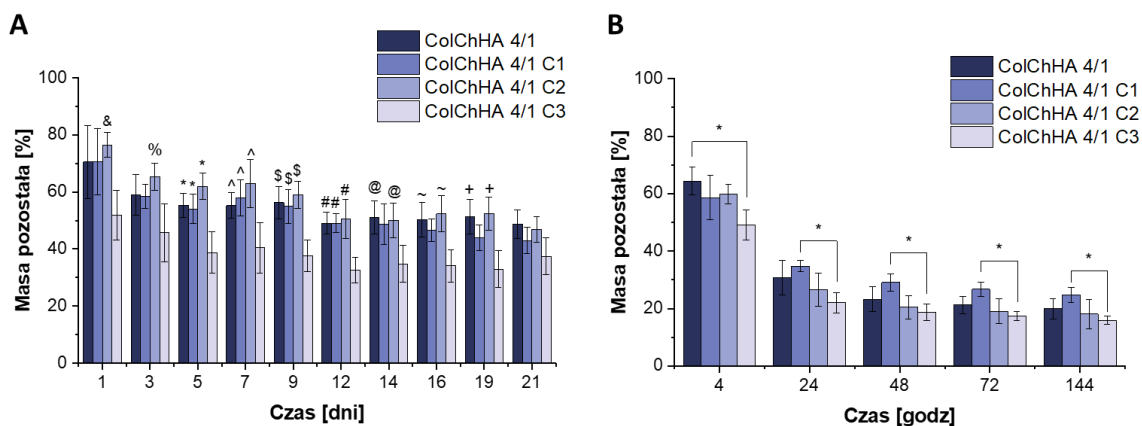
### Degradacja w buforze PBS

Zbadano proces degradacji materiałów w warunkach buforu PBS w 37 °C przez okres 21 dni. Na **Rysunku 29A** przedstawiono zmiany masy materiałów podczas inkubacji w PBS. Największy ubytek masy następował po pierwszym dniu degradacji i dotyczył wszystkich badanych materiałów. W kolejnych dniach obserwowano tylko nieznaczne wahania masy. W przypadku materiałów hybrydowych ColChHA 4/1 C1 i ColChHA 4/1 C2 przebieg procesu degradacji przez cały czas trwania eksperymentu był zbliżony do degradacji dla materiału kontrolnego ColChHA 4/1 (różnice są statystycznie nieistotne). Oznacza to, że obecność sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionkowych przy najwyższym (C1) i średnim (C2) stężeniu nie wpływała na szybkość utraty masy hydrożelu. Brak znaczących różnic w ubytku masy potwierdza również efektywność wbudowania sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionki do sieci polimerowej, ponieważ w przeciwnym razie "wyciekanie"

krzemionki z sieci hydrożelowej powinno objawiać się większym spadkiem masy otrzymanych układów hybrydowych. Materiał o najniższym stężeniu cząstek krzemionki (ColChHA 4/1 C3) przez prawie cały czas trwania eksperymentu wykazywał relatywnie większą utratę masy w porównaniu z innymi badanymi materiałami. Po zakończeniu eksperymentu (po 21 dniach) wartości pozostałej masy wszystkich materiałów były podobne, mieszcząc się w zakresie od 37 do 48%.

### ***Degradacja enzymatyczna***

Degradację enzymatyczną materiałów badano przez 144 godziny w obecności kolagenazy. Otrzymane wyniki są przedstawione na **Rysunku 29B**. Po 4 godzinach degradacji enzymatycznej ubytek masy badanych materiałów wyniósł około 35-50%. Następna istotna zmiana nastąpiła po 24 godzinach, gdy materiały utraciły około 65-80% swojej masy początkowej. Wydłużenie inkubacji materiałów w roztworze kolagenazy do 144 godzin nie spowodowało dodatkowych znaczących zmian w ich masie. Analizując utratę masy wszystkich badanych materiałów w danym momencie trwania eksperymentu można zauważyć mniejszy stopień degradacji materiału o najwyższym stężeniu cząstek krzemionki (ColChHA 4/1 C1). Podobnie jak w przypadku degradacji w warunkach PBS, nieznaczne różnice w przebiegu degradacji enzymatycznej pomiędzy materiałem kontrolnym (ColChHA 4/1) a materiałami hybrydowymi może wskazywać na efektywne unieruchomienie sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionkowych w strukturze hydrożelu.

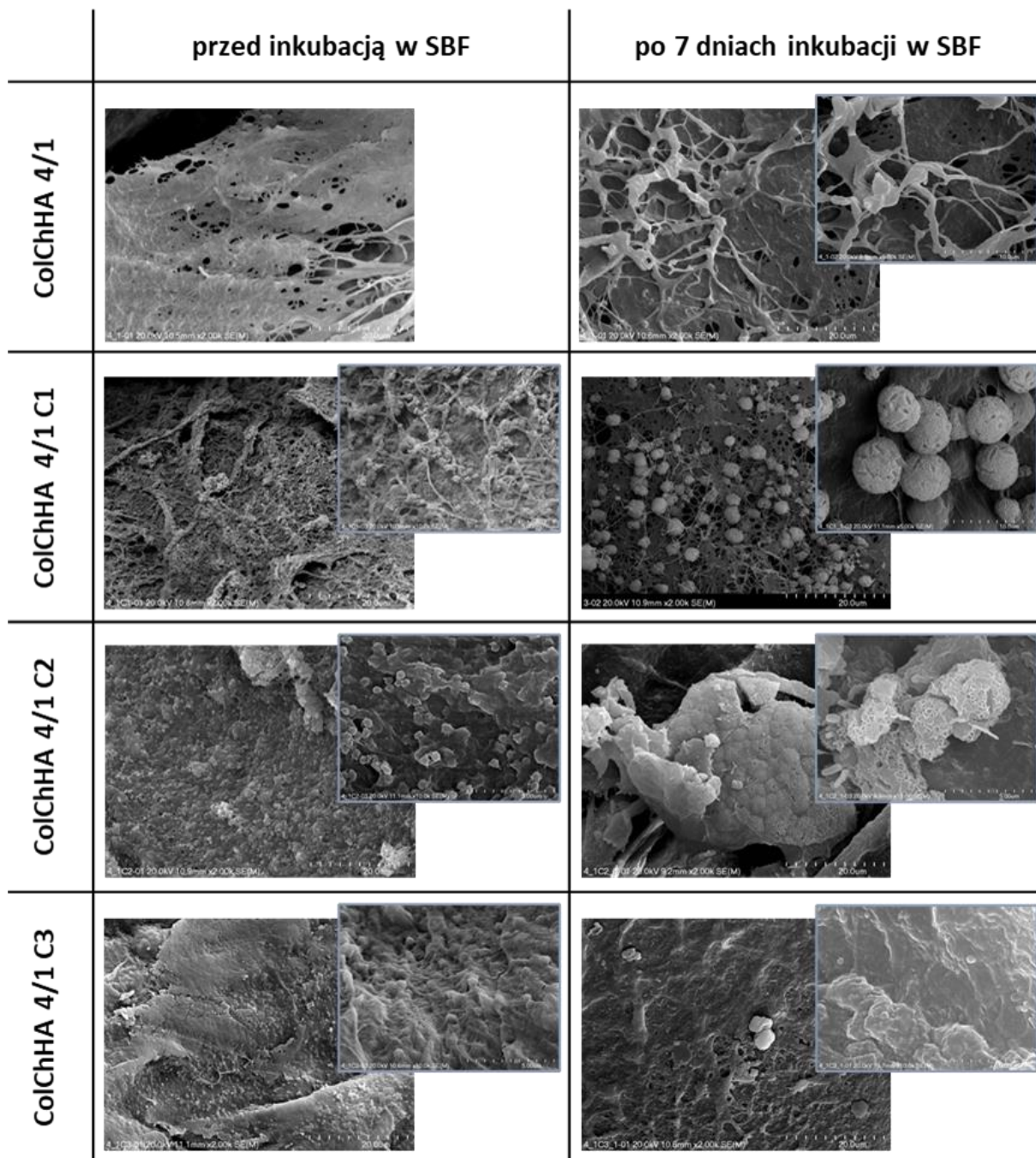


**Rysunek 29.** (A) Zmiany masy materiałów podczas inkubacji w PBS. Analizę statystyczną wykonano poprzez porównanie wszystkich otrzymywanych materiałów w tym samym dniu eksperymentu degradacji. & oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA 4/1 C3 po 1 dniu ( $p < 0,05$ ), % oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA 4/1 C3 po 3 dniach ( $p < 0,05$ ), \* oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA 4/1 C3 po 5 dniach ( $p < 0,05$ ), ^ oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA 4/1 C3 po 7 dniach ( $p < 0,05$ ), \$ oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA 4/1 C3 po 9 dniach ( $p < 0,05$ ), # oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA 4/1 C3 po 12 dniach ( $p < 0,05$ ), @ oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA 4/1 C3 po 14 dniach ( $p < 0,05$ ), ~ oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA 4/1 C3 po 16 dniach ( $p < 0,05$ ), + oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA 4/1 C3 po 19 dniach ( $p < 0,05$ ). (B) Zmiany masy materiałów w obecności kolagenazy. Analizę statystyczną wykonano poprzez porównanie wszystkich otrzymywanych materiałów w tym samym punkcie czasowym eksperymentu degradacji. \* oznacza istotność statystyczną pomiędzy zaznaczonymi materiałami ( $p < 0,05$ ).

### 8.2.5. Biomineralizacja *in vitro*

Biorąc pod uwagę potencjalne zastosowanie otrzymanych materiałów hybrydowych jako rusztowań w inżynierii tkanki kostnej zbadano ich właściwości bioaktywne. W tym celu przeprowadzono eksperyment biomineralizacji *in vitro* w warunkach symulowanego sztucznego osocza (SBF). Dane literaturowe pokazują, iż materiały zdolne do wytwarzania na ich powierzchni warstwy apatytu w warunkach SBF będą również ulegać biomineralizacji w żywym organizmie, zapewniając tym samym efektywną integrację rusztowania z naturalną kością [250]. Obecność cząstek krzemionki w hydrożelowej matrycy ma silny wpływ na tworzenie się nowej fazy mineralnej [103]. Zdolność opracowanych materiałów do inicjowania procesu nukleacji apatytu została zbadana w eksperymencie obejmującym ich 7-dniową inkubację w SBF w 37 °C. Następnie materiały zostały poddane badaniom przy użyciu dwóch technik: SEM i EDS. Na **Rysunku 30** przedstawiono uzyskane mikrofotografie SEM powierzchni materiałów przed i po inkubacji w SBF. W przypadku materiałów hybrydowych przed inkubacją w SBF dobrze widoczne są cząstki krzemionki w hydrożelowej matrycy, niezależnie od użytego stężenia. Po 7 dniach inkubacji w SBF na powierzchni

materiałów hybrydowych zawierających cząstki krzemionki o wyższych stężeniach (ColChHA 4/1 C1 i ColChHA 4/1 C2) zaobserwowano znaczącą ilość wytworzonej fazy mineralnej, co dowodzi bioaktywności tych materiałów. W **Tabeli 7** zestawiono wyznaczony techniką EDS stosunek wapnia do fosforu (Ca/P) dla nowo utworzonej fazy mineralnej. Stosunek molowy wapnia do fosforu dla stechiometrycznego hydroksyapatytu wynosi 1,67, natomiast dla fazy mineralnej w naturalnej kości zawiera się on w przedziale 1,5 – 1,7 [132]. W przypadku obu badanych materiałów hybrydowych stosunek Ca/P wyniósł 1,29. Wartość ta jest więc niższa niż dla minerału kostnego, a zbliżona do fazy fosforanu ośmiowapniowego (OCP, Ca/P = 1,33), co może wskazywać na początkowy etap tworzenia minerału typowego dla kości [251]. Materiał hybrydowy z najniższym stężeniem cząstek krzemionki (ColChHA 4/1 C3) nie wspierał znacząco powstawania fazy mineralnej, zidentyfikowano jedynie śladowe ilości nowych struktur. Oznacza to, że zawartość cząstek krzemionki w tym materiale była zbyt niska, aby biomineralizacja mogła postępować efektywnie. W przypadku hydrożelu bez dodatku cząstek krzemionki nie zaobserwowano powstawania fazy mineralnej, po 7-dniowej inkubacji w SBF zachowana była charakterystyczna struktura matrycy hydrożelowej. Eksperyment biomineralizacji *in vitro* dowiódł więc, że sfunkcjonalizowane grupami aminowymi cząstki krzemionki w stężeniach C1 oraz C2 były kluczowe dla nadania właściwości bioaktywnych materiałom hybrydowym ColChHA 4/1 C1 i ColChHA 4/1 C2.



**Rysunek 30.** Mikrofotografie SEM materiałów przed i po 7 dniach inkubacji w SBF.

**Tabela 7.** Stosunek Ca/P wyznaczony techniką EDS dla fazy mineralnej utworzonej na powierzchni materiałów po 7-dniowej inkubacji w SBF.

Typ materiału	Stosunek Ca/P
ColChHA 4/1	-
ColChHA 4/1 C1	1,29 ± 0,03
ColChHA 4/1 C2	1,29 ± 0,08
ColChHA 4/1 C3	-

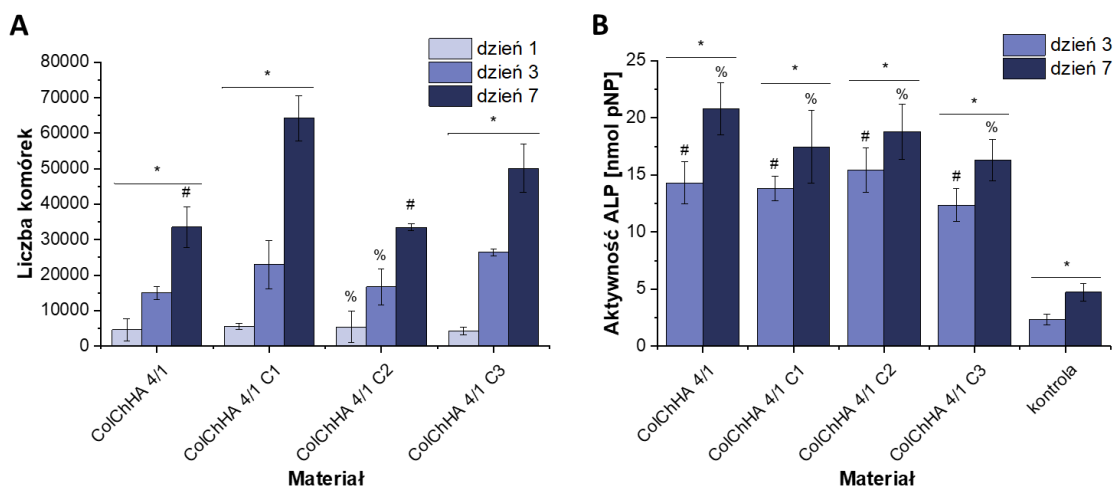
## 8.2.6. Właściwości biologiczne *in vitro*

### Żywotność komórek

Przeprowadzono test żywotności komórek MG-63 z użyciem odczynnika Alamar Blue po 1, 3 oraz 7 dniu hodowli na otrzymanych materiałach. Wyniki eksperymentów są przedstawione na **Rysunku 31A**. Test potwierdził, że wszystkie badane materiały były zdolne do wspierania proliferacji wysianych na ich powierzchni komórek. Liczba komórek znacząco wzrosła zarówno po dniu 3, jak i po dniu 7 (jedynie dla ColChHA 4/1 C2 różnica pomiędzy dniem 1 i 3 nie była istotna statystycznie). Największą liczbę komórek obserwowano po dniu 7 eksperymentu dla materiału hybrydowego z najwyższym stężeniem cząstek krzemionki (ColChHA 4/1 C1). Wyniki wykazały, iż obecność trwale związanych z siecią polimerową sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionkowych nie obniżała biokompatybilności materiałów hybrydowych, a także ich zdolności do wspierania proliferacji komórek MG-63 w porównaniu do materiału kontrolnego ColChHA 4/1.

### Aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP)

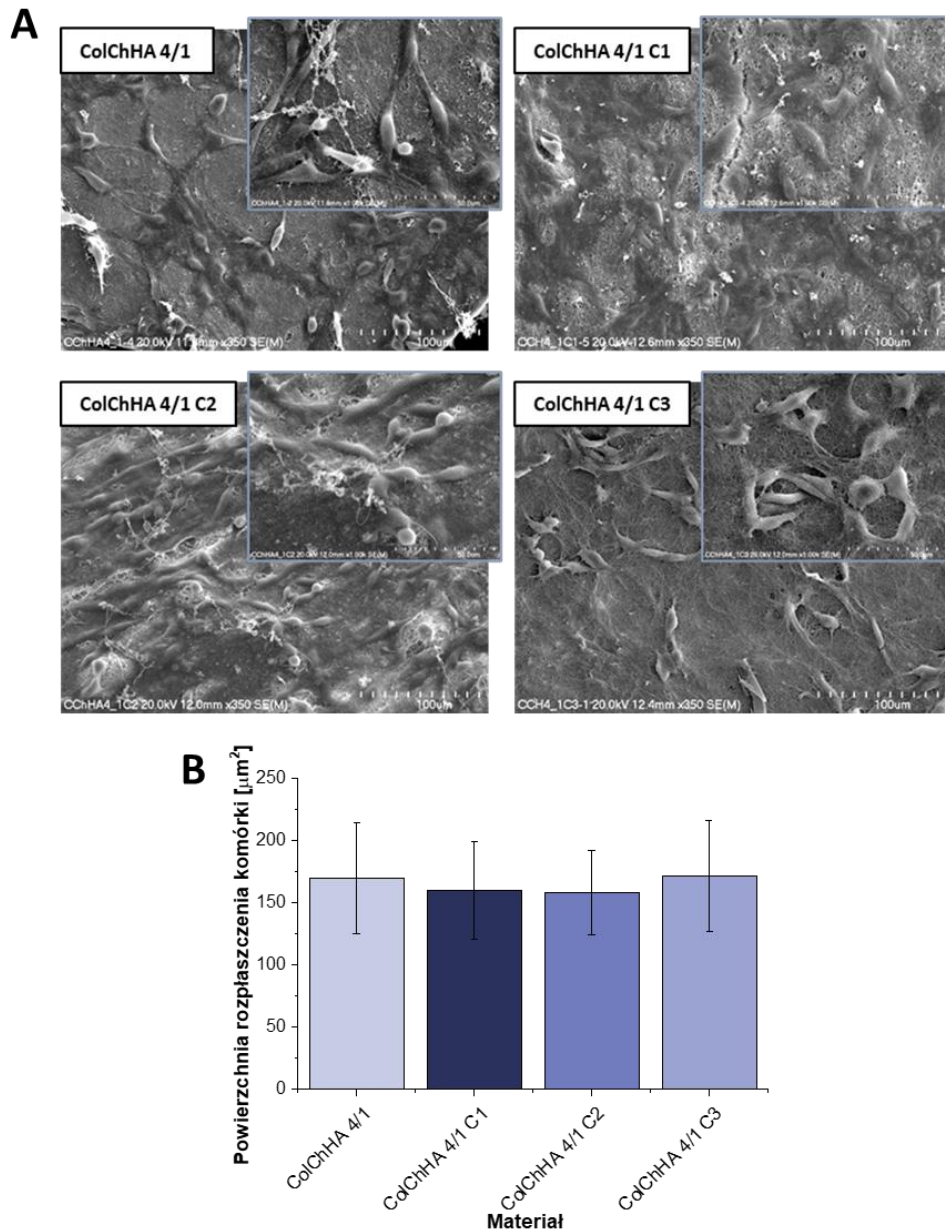
Fosfataza alkaliczna (ALP) jest białkiem kościotwórczym, będącym markerem wczesnych etapów różnicowania osteoblastów [252]. Biorąc pod uwagę funkcję fizjologiczną, ALP pełni również rolę znacznika potwierdzającego fenotyp i mineralizację osteoblastów [253]. Aktywność ALP komórek MG-63 hodowanych na badanych materiałach określono w 3 i 7 dniu hodowli, kontrolą były komórki hodowane na samej płytce hodowlanej. Wyniki przedstawiono na **Rysunku 31B**. Dla wszystkich materiałów obserwowano podobną tendencję, poziom fosfatazy alkalicznej wzrastał w badanym czasie. Należy podkreślić, że aktywność ALP była istotnie wyższa w przypadku komórek hodowanych na materiałach hybrydowych i hydrożelu zarówno w dniu 3, jak i 7 w porównaniu do kontroli. Dodatkowo wyniki wskazują, że obecność cząstek krzemionki w matrycy hydrożelowej nie była czynnikiem zwiększającym aktywność ALP na tle samego hydrożelu w badanym okresie czasu. Według danych literaturowych krzemionka może efektywnie stymulować komórki do różnicowania, powodując m.in. wzmożoną aktywność ALP [128]. Niewykluczone, że w przypadku badanych materiałów hybrydowych takie efekty mogłyby być obserwowane po dłuższym czasie hodowli komórkowej.



**Rysunek 31.** (A) Proliferacja komórek MG-63 po 1, 3 i 7 dniu hodowli na powierzchni badanych materiałów. \* nad czarną linią oznacza istotność statystyczną pomiędzy dniem 1, 3 i 7 dla tego samego rodzaju materiału ( $p < 0,05$ ), # oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA 4/1 C1 w dniu 7 ( $p < 0,05$ ), % oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA 4/1 C2 w dniu 7 ( $p < 0,05$ ). (B) Aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) komórek MG-63 po 3 i 7 dniu hodowli na powierzchni badanych materiałów. \* nad czarną linią oznacza istotność statystyczną pomiędzy dniem 3 i 7 dla tego samego rodzaju materiału ( $p < 0,05$ ), # oznacza istotność statystyczną w porównaniu z kontrolą w dniu 3 ( $p < 0,05$ ), % oznacza istotność statystyczną w porównaniu z kontrolą w dniu 7 ( $p < 0,05$ ).

### Adhezja i morfologia komórek

Zbadano adhezję i morfologię komórek MG-63 po 3 dniach hodowli na powierzchni materiałów. W tym celu komórki zostały utrwalone i obrazowane przy użyciu techniki SEM. Na **Rysunku 32** zestawiono mikrofotografie SEM przedstawiające morfologie utrwalonych komórek (A), a także wykres przedstawiający ich średnią powierzchnię (B). W oparciu o analizę mikrofotografii można stwierdzić, iż komórki przylegają dobrze zarówno do powierzchni materiałów hybrydowych, jak i hydrożelu kontrolnego. Na wszystkich badanych powierzchniach komórki miały wydłużone kształty, co może wskazywać na zwartą i dobrze usieciowaną strukturę badanych materiałów [254]. Ponadto funkcjonalizacja cząstek krzemionki również mogła mieć znaczenie, gdyż dodatnio naładowane grupy aminowe eksponowane na powierzchni mogą ułatwiać adhezję komórek [255]. Oszacowana średnia powierzchnia komórek przyjmowała wartości zbliżone dla wszystkich materiałów, co w sposób ilościowy potwierdza, że morfologia komórek na badanych materiałach była podobna. Dane te dowodzą zatem, iż obecność sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionkowych nie wpływała niekorzystnie na adhezję komórek.



**Rysunek 32.** Mikrofotografie SEM przedstawiające morfologie komórek MG-63 hodowanych przez 3 dni na powierzchni badanych materiałów (A), wykres przedstawiający średnią powierzchnię komórek po 3 dniach hodowli na materiałach (B).

### 8.3. Podsumowanie

Otrzymano i scharakteryzowano bioaktywne materiały hybrydowe, które mogą służyć jako potencjalne wstrzykiwalne rusztowania dla zastosowań w inżynierii tkankowej, w szczególności do regeneracji małych ubytków tkanki kostnej. Opracowane materiały składały się z hydrożelowej matrycy na bazie kolagenu, chitozanu i kwasu hialuronowego, do której wprowadzono sfunkcjonalizowane grupami aminowymi cząstki krzemionki w trzech różnych stężeniach. Efektywność funkcjonalizacji cząstek krzemionkowych grupami



aminowymi została potwierdzona metodami spektroskopowymi (FTIR, XPS). Grupy aminowe umożliwiły trwałe związanie cząstek z polimerową matrycą podczas sieciowania genipiną, co eliminuje potencjalny problem separacji fazowej czy niekontrolowanego wycieku cząstek z matrycy. Otrzymano w ten sposób stabilne strukturalnie materiały hybrydowe, co potwierdziły badania pęcznienia i degradacji. Badania reologiczne dowiodły, że opracowane materiały hybrydowe można wytwarzać w postaci zolu i po dodaniu czynnika sieciującego (genipiny) i inkubacji w temperaturze 37 °C przekształcać w żel, co jest równoznaczne z możliwością ich zastosowania w postaci wstrzykiwalnej. Eksperymenty przeprowadzone w warunkach symulujących ludzkie osocze (SBF) wykazały bioaktywność materiałów hybrydowych zawierających wyższe stężenia cząstek krzemionki – ColChHA 4/1 C1 oraz ColChHA 4/1 C2. Biomineralizację dla tych układów zaobserwowano po 7 dniach inkubacji w SBF. Materiał z najniższą zawartością cząstek krzemionki (ColChHA 4/1 C3) oraz hydrożel kontrolny (bez cząstek) nie wykazały właściwości bioaktywnych. Przeprowadzone testy biologiczne *in vitro* wykazały, iż obecność trwale związanych z siecią polimerową sfunkcjonalizowanych cząstek krzemionkowych nie obniża biokompatybilności materiałów hybrydowych w porównaniu do hydrożelu kontrolnego, a także ich zdolności do wspierania adhezji, proliferacji oraz utrzymania fenotypu komórek osteoblastycznych (MG-63).

Biorąc pod uwagę takie aspekty jak prosta metoda otrzymywania, wstrzykiwalny charakter, stabilność strukturalna i bioaktywność, opracowane materiały mogą stanowić obiecujące układy jako rusztowania komórkowe przydatne w regeneracji tkanki kostnej.

## II. Wielofunkcyjne nanokompozyty przydatne w leczeniu osteoporozy

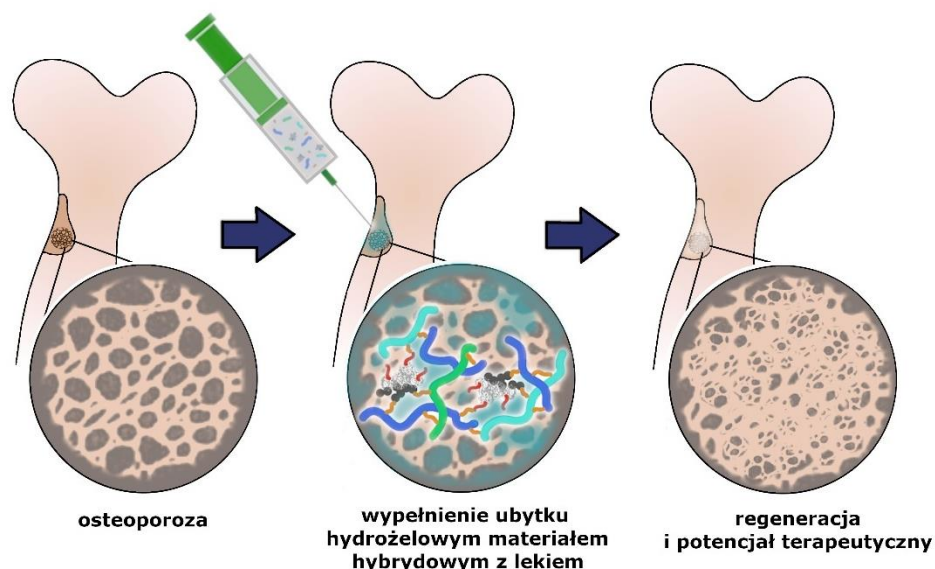
### Wprowadzenie

Część II badań dotyczy otrzymania i scharakteryzowania właściwości fizykochemicznych i biologicznych nanokompozytów zbudowanych z hydrożelowej matrycy i cząstek krzemionkowo-apatytowych z przyłączonym lekiem przeciwosteoporotycznym, potencjalnie przydatnych jako wstrzykiwalne rusztowania do odbudowy tkanki kostnej, w szczególności niewielkich ubytków kostnych spowodowanych osteoporozą.

W pierwszym etapie (**rozdział 9**) otrzymano i scharakteryzowano serię wstrzykiwalnych hydrożeli opartych na kolagenie, chitozanie oraz kwasie hialuronowym funkcjonalizowanym grupami aminowymi, sieciowanych genipiną. W odróżnieniu od hydrożeli opracowanych w **rozdziale 7**, do których użyto komercyjnie dostępnego kwasu hialuronowego, w tym podejściu użyty kwas hialuronowy został sfunkcjonalizowany grupami aminowymi dzięki przyłączeniu do polimerowych łańcuchów cząsteczek lizyny. Taka modyfikacja umożliwiła chemiczne sieciowanie genipiną nie tylko kolagenu i chitozanu, ale także kwasu hialuronowego ze względu na obecność pierwszorzędowych grup aminowych w strukturze, prowadzące do otrzymania stabilnych hydrożeli. Wyniki badań dotyczące tego etapu zostały opublikowane w pracy zatytułowanej: *Bioactive yet antimicrobial structurally stable collagen/chitosan/lysine functionalized hyaluronic acid – based injectable hydrogels for potential bone tissue engineering applications* (A. Gilarska, J. Lewandowska-Łańcucka, K. Guzdek-Zajac, A. Karewicz, W. Horak, R. Lach, K. Wójcik, M. Nowakowska, *International Journal of Biological Macromolecules* **155** (2020) **938-950**) [256]. Na tej podstawie wybrano skład hydrożelu, który następnie pełnił rolę matrycy dla nośnika leku przeciwosteoporotycznego.

W następnym etapie (**rozdział 10**) otrzymano i scharakteryzowano wielofunkcyjne, wstrzykiwalne materiały hybrydowe na bazie wybranej we wcześniejszym etapie matrycy hydrożelowej oraz rozproszonych w niej cząstkach krzemionki dekorowanych apatylem, do których został przyłączony alendronian – lek przeciwosteoporotyczny. Taka kompozycja może stanowić rusztowanie dla komórek, umożliwiając odbudowę tkanki kostnej przy jednoczesnym posiadaniu wysokiego potencjału terapeutycznego dzięki obecności leku. Może zatem pełnić dodatkowo funkcję układu do kontrolowanego, zlokalizowanego (w miejscu uszkodzenia tkanki) dostarczania substancji aktywnej

(alendronianu), odgrywającej kluczową rolę w terapii osteoporozy (Rysunek 33). Rozwiązanie to zapewnia nieinwazyjną lokalizację rusztowania w miejscu implantacji, przy jednoczesnym zachowaniu struktury, właściwości biologicznych i ograniczeniu potencjalnych, niekorzystnych skutków ubocznych terapii. Opracowany materiał został przebadany zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* i jest objęty krajowym zgłoszeniem patentowym (J. Lewandowska-Łańcucka, M. Nowakowska, A. Gilarska, wynalazek pt.: *Wielofunkcyjny, hydrożelowy materiał hybrydowy, sposób jego otrzymywania oraz zastosowanie w leczeniu ubytków kostnych*, nr P.435104, 26.08.2020) oraz międzynarodowym zgłoszeniem patentowym (J. Lewandowska-Łańcucka, M. Nowakowska, A. Gilarska, wynalazek pt.: *Multifunctional, hydrogel hybrid material, the method of its preparation and the use in the treatment of bone losses*, nr PCT/PL2021/050060, 26.08.2021). Wyniki badań zostały także opublikowane w pracy: *Addressing the Osteoporosis Problem - Multifunctional Injectable Hybrid Materials for Controlling Local Bone Tissue Remodeling* (A. Gilarska, A. Hinz, M. Bzowska, G. Dyduch, K. Kamiński, M. Nowakowska, J. Lewandowska-Łańcucka, ACS Applied Materials & Interfaces 13 (2021) 49762–49779) [257].



**Rysunek 33.** Schematyczna prezentacja zastosowania hydrożelowego materiału hybrydowego z lekiem przeciwosteoporotycznym.

## **9. Otrzymywanie i scharakteryzowanie hydrożeli opartych na kolagenie, chitozanie i modyfikowanym kwasie hialuronowym**

### **9.1. Materiały i metody**

#### **9.1.1. Materiały**

Oprócz odczynników wymienionych w rozdziale 7 (punkt 7.1.1, str. 71) użyto również: kolagen typu I, z ogona szczurzego (3,5 mg/ml w 0,02N kwasie octowym, Corning), L-Lizyny monochlorowodorek (Sigma-Aldrich,  $\geq 98\%$ ), kwas 2-morfolinoetylosulfonowy (MES, Sigma-Aldrich,  $\geq 99\%$ ), EDC chlorowodorek (Sigma Aldrich, 99%), N-Hydroksysukcynimid (NHS, Sigma-Aldrich, 98%), węglan sodu  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Sigma-Aldrich, bezwodny,  $\geq 99.5\%$ ), odczynnik Alamar Blue (Invitrogen), bufor do lizy komórek Cell Digestion Buffer i Cell Assay Buffer [tris(hydroksymetylo)aminometan  $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$  (tris, Sigma-Aldrich), chlorek cynku  $\text{ZnCl}_2$  (POCh), sześciowodny chlorek magnezu  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (POCh), Triton X-100 (POCh)], fosforan paranitrofenolu (pNPP, Sigma-Aldrich),

#### **9.1.2. Modyfikacja kwasu hialuronowego lizyną**

W celu dokonania modyfikacji 500 mg kwasu hialuronowego (HA) rozpuszczono w 20 ml buforu MES (50 mM, pH = 4). Następnie rozpuszczono 360 mg EDC, 220 mg NHS i 730 mg lizyny, każdy odczynnik osobno w 5 ml buforu MES i dodano je do roztworu HA. Aby zminimalizować prawdopodobieństwo współistniejącego procesu sieciowania użyto dużego nadmiaru lizyny względem ilości HA. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono na mieszadle magnetycznym i mieszano przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie przeniesiono mieszaninę do tuby dializacyjnej (MWCO 12000) i dializowano wobec 0,1 M roztworu  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  przez pierwsze 12 godzin, a następnie wobec wody przez 8 dni. Po tym czasie oczyszczony roztwór produktu zagęszczono, używając wyparki rotacyjnej oraz zliofilizowano.

#### **9.1.3. Scharakteryzowanie modyfikowanego kwasu hialuronowego**

Efektywność procesu funkcjonalizacji kwasu hialuronowego grupami aminowymi pochodzącymi od lizyny oceniono na podstawie pomiarów  $^1\text{H}$  NMR próbek w  $\text{D}_2\text{O}$  przy użyciu spektrometru BRUKER AMX-400 Hz. Analiza NMR:  $\delta$  4,80 (pozostała  $\text{D}_2\text{O}$ ;

odniesienie), 4,49 i 4,48 (N1, U1; struktura HA), 4,22 (N2; struktura HA), 3,85 (N6, N6', U4, U5; struktura HA), 3,54 (U3, N3, N4, N5; struktura HA), 3,38 (U2; struktura HA), 3,03 (L5; jednostka lizyny), 1,91 (HA -CH<sub>3</sub>; struktura HA), 1,90 (L2; jednostka lizyny), 1,74 (L4; jednostka lizyny), 1,44 (L3; jednostka lizyny). Wykonano także analizę elementarną, wykorzystując analizator elementarny CHNS (Vario Micro Cube).

#### **9.1.4. Otrzymywanie hydrożeli**

Otrzymano hydrożele oparte na kolagenie, chitozanie i modyfikowanym kwasie hialuronowym – ColChHA<sub>mod</sub>. Przygotowywano je przez zmieszanie 590 µl roztworu kolagenu, 96-193 µl roztworu chitozanu (roztwór 1% (w/v) w 1% kwasie octowym), 48-145 µl roztworu modyfikowanego kwasu hialuronowego (roztwór 1% (w/v) w 10x buforze PBS) i 169 µl roztworu genipiny (roztwór w 10x buforze PBS) o trzech stężeniach: 2 mM, 10 mM i 20 mM. Ustalono trzy stosunki wagowe dla Col:Ch:HA<sub>mod</sub>, odpowiednio 50:40:10 (ColChHA<sub>mod</sub> 4/1), 50:30:20 (ColChHA<sub>mod</sub> 3/2) i 50:20:30 (ColChHA<sub>mod</sub> 2/3). Po poddaniu biopolimerowych zoli energicznemu wytrząsaniu, inkubowano je w 37 °C do zakończenia procesu żelowania.

#### **9.1.5. Badanie właściwości fizykochemicznych hydrożeli**

##### **Badanie mikrostruktury i porowatości**

Mikrostrukturę materiałów zobrazowano przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego SEM (FESEM HITACHI S-4700). W tym celu otrzymane hydrożele przepłukano kilka razy wodą dejonizowaną i zliofilizowano. Bezpośrednio przed obrazowaniem próbki napyłono złotem. Wykonano również analizę porowatości materiałów. Gęstość próbek została zmierzona za pomocą piknometr helowego (Micromeritics, AccuPyc II 1340). Rozkłady wielkości porów w próbkach wyznaczono, wykorzystując porozymetr rtęciowy PoreMaster 60 (Quantachrome Inc.).

##### **Badanie zdolności do pęcznienia**

Przeprowadzono badania zdolności uzyskanych materiałów hydrożelowych do pęcznienia w warunkach fizjologicznych, według procedury opisanej w punkcie 8.1.5 (str. 85). Materiały ważono po 24-godzinnej inkubacji w PBS w postaci spęczniałej, a następnie w postaci suchej po zliofilizowaniu. Stopień pęcznienia materiału (*SR*) wyznaczano, stosując wzór (5).

### **Badanie liofilowości**

W celu określenia liofilowości materiałów wykonywano pomiary kąta zwilżania przy użyciu urządzenia Surfens Universal instrument (OEG GmbH, Frankfurt, Germany) zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 8.1.5 (str. 85).

### **Badanie właściwości reologicznych**

Przeprowadzono badania właściwości reologicznych wykorzystując reometr rotacyjny MCR 301 (Anton Paar) zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 7.1.3 (str. 72). Badania wykonano z wykorzystaniem geometrii pomiarowej typu płytko-płytko o średnicy 20 mm, przy szczeliny pomiarowej  $h = 1$  mm, próbki poddano wymuszeniu oscylacyjnemu o następujących parametrach: odkształcenie  $\gamma = 1\%$  z częstotliwością  $f = 1$  Hz. Pojedynczy pomiar próbki trwał 65 minut, wykonano po trzy powtórzenia dla każdego rodzaju próbki.

### **Badanie procesu degradacji enzymatycznej**

Przez okres 144 godzin monitorowano proces degradacji materiałów w obecności enzymu kolagenazy (roztwór 0,2 mg/ml w buforze PBS z 0,36 mM  $\text{CaCl}_2$ ) zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 7.1.3 (str. 73). Zmiany masy w trakcie eksperymentu wyrażono jako % masy pozostałej, obliczany według wzoru (4).

#### **9.1.6. Badania właściwości biologicznych *in vitro***

Do badań biologicznych *in vitro* wykorzystano linię komórek osteoblastopodobnych MG-63. Prowadzenie hodowli komórkowej oraz przygotowanie materiałów do badań biologicznych realizowano zgodnie z procedurami opisanymi w punkcie 8.1.7 (str. 87). Komórki wysiewano na materiałach w ilości  $2 \cdot 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup>.

#### **Badanie żywotności komórek – test Alamar Blue**

Test żywotności komórek wysianych na materiałach prowadzono z użyciem odczynnika Alamar Blue po 1, 3 oraz 7 dniu hodowli komórkowej, zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 8.1.7 (str. 88). Pomiar absorbancji przeprowadzono w czytniku mikroplątek TECAN Infinite M200 przy długościach fali 560 nm i 600 nm. Wartości absorbancji przeliczano na ilość komórek, korzystając z krzywej kalibracyjnej otrzymanej z pomiarów absorbancji dla znanych ilości komórek MG-63.

#### **Badanie aktywności fosfatazy alkalicznej – test ALP**

Test na aktywność fosfatazy alkalicznej ALP był prowadzony równolegle do testu Alamar Blue po 3 i 7 dniu hodowli komórek na materiałach, zgodnie z procedurą opisaną w punkcie

8.1.7 (str. 88). Pomiar absorbancji prowadzono co minutę, przez 6 minut przy długości fali 405 nm. Aby przeliczyć absorbancję na ilość wytworzonego produktu (nmol), zastosowano równanie (6). Po odpowiednim przeliczeniu ilości produktu, wyniki odnoszono do liczby żywych komórek z testu Alamar Blue.

### **Badanie adhezji i morfologii komórek**

Powierzchnia materiałów z wysianymi komórkami linii MG-63 była obrazowana skaningowym mikroskopem elektronowym SEM (FESEM, HITACHI S-4700). W tym celu po 3 dniach prowadzenia hodowli komórkowej materiały przepłukano buforem PBS i wykonano procedurę utrwalania i odwadniania zgodnie z opisem zamieszczonym w punkcie 7.1.4 (str. 73). Bezpośrednio przed obrazowaniem SEM próbki były napyłane złotem. Mikrografie powierzchni hydrożeli z komórkami były analizowane z wykorzystaniem programu ImageJ.

### **Badanie właściwości antybakteryjnych**

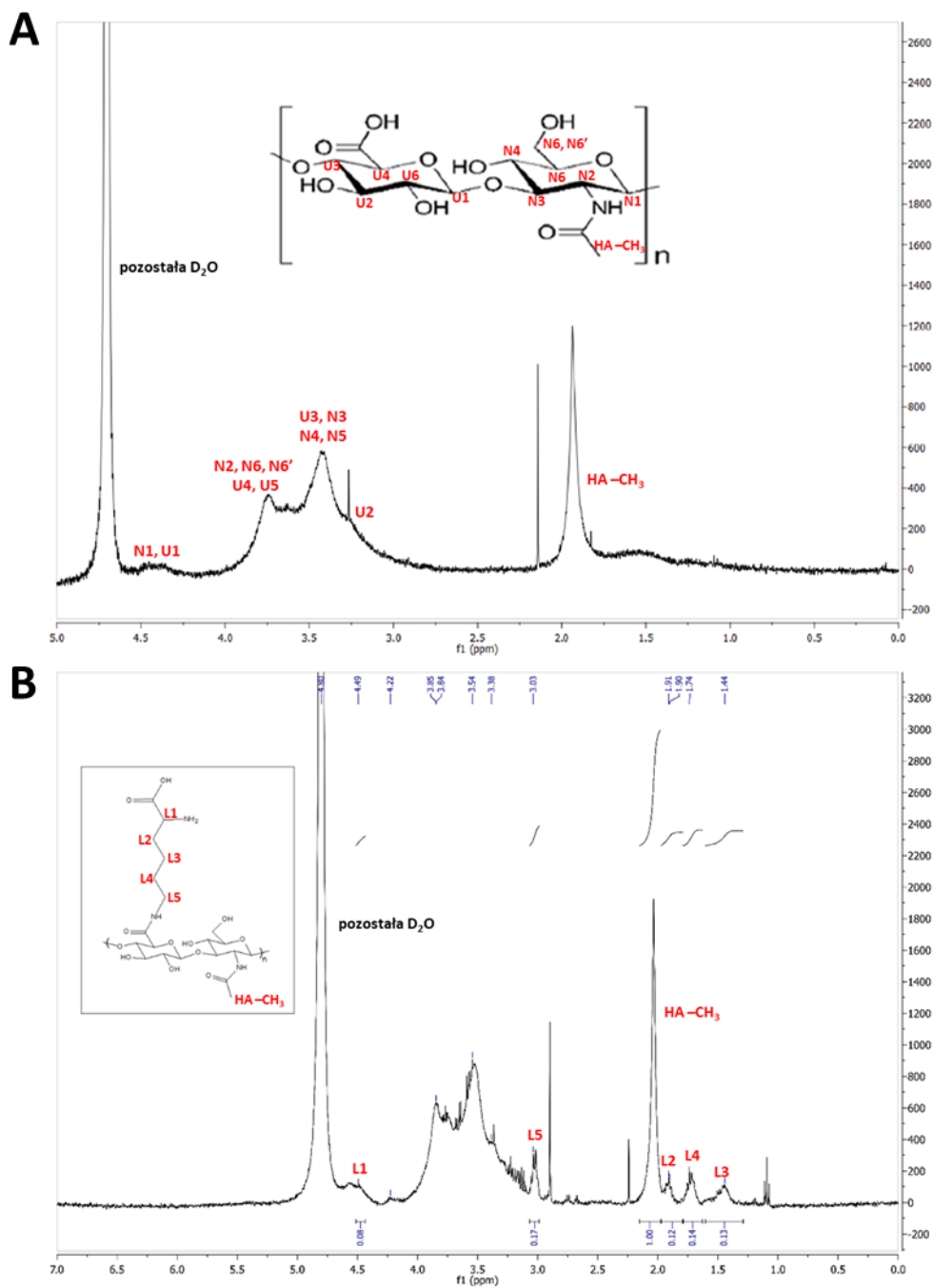
Zbadano również właściwości antybakteryjne hydrożeli wobec bakterii *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538, bakterie Gram-dodatnie) i *Escherichia coli* (ATCC 25922, bakterie Gram-ujemne). Hydrożele do testu *in vitro* przygotowano w płytce 96-dołkowej, poddano sterylizacji promieniowaniem UV oraz przepłukano kilka razy PBS. Zawiesiny bakterii *S. aureus* i *E. coli* przygotowano w pożywce Mueller Hinton II Broth (BD BBL™), a następnie dodawano je do dołek z hydrożelami (po 50 µl/dołek) z gęstością około  $1,2 \cdot 10^3$  komórek/dołek w przypadku *S. aureus* i  $1,9 \cdot 10^2$  komórek/dołek w przypadku *E. coli*. Kontrolę pozytywną stanowił dołek bez materiału, a kontrolą negatywną był hydrożel oparty na samym chitozanie, sieciowany genipiną o stężeniu 20 mM. Tak przygotowaną płytkę inkubowano w 37 °C przez 4 godziny. W kolejnym kroku po delikatnym wymieszaniu pobierano zawiesinę bakterii znad materiałów. Liczbę żywych komórek bakterii oznaczano poprzez wykorzystanie testu MTT.

## **9.2. Wyniki i dyskusja**

### **9.2.1. Efektywność modyfikacji kwasu hialuronowego lizyną**

W celu wprowadzenia grup aminowych do struktury kwasu hialuronowego zastosowano modyfikację z użyciem lizyny. Widma  $^1\text{H}$  NMR dla kwasu hialuronowego (HA) oraz modyfikowanego kwasu hialuronowego (HA<sub>mod</sub>) są przedstawione na **Rysunku 34**. Na widmie dla HA<sub>mod</sub> pojawiły się nowe sygnały, które można przypisać do protonów

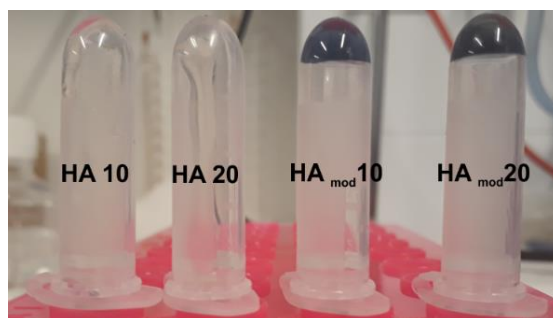
jednostek lizyny (L1 - L5), inne sygnały pochodzą od struktury kwasu hialuronowego i zostały zaznaczone na widmie dla HA. Analiza pierwiastkowa wykazała wzrost zawartości azotu dla próbki HA<sub>mod</sub> w porównaniu do próbki HA. Stopień podstawienia na podstawie uzyskanych danych analizy elementarnej wyniósł 25%. Badania <sup>1</sup>H NMR oraz analiza pierwiastkowa potwierdziły zatem efektywność modyfikacji kwasu hialuronowego lizyną i tym samym sfunkcjonalizowanie go grupami aminowymi.



**Rysunek 34.** Widma <sup>1</sup>H NMR dla kwasu hialuronowego HA (A) oraz modyfikowanego kwasu hialuronowego HA<sub>mod</sub> (B).



Przeprowadzono również próbę sieciowania zolu na bazie HA<sub>mod</sub> oraz na bazie HA genipiną o stężeniach 10 oraz 20 mM. Proces tworzenia ciemnoniebieskiego hydrożelu w 37 °C obserwowano tylko w przypadku próbki HA<sub>mod</sub> (**Rysunek 35**), co potwierdziło reakcję genipiny z grupami aminowymi obecnymi w strukturze HA<sub>mod</sub>.



**Rysunek 35.** Materiały HA oraz HA<sub>mod</sub> z dodatkiem genipiny o stężeniach 10 i 20 mM po inkubacji w 37 °C.

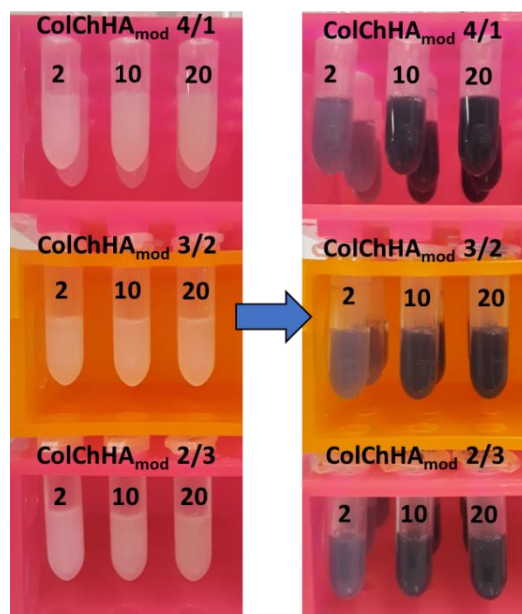
### 9.2.2. Otrzymywanie hydrożeli

Otrzymywano materiały hydrożelowe oparte na kolagenie (Col), chitozanie (Ch) i modyfikowanym kwasie hialuronowym (HA<sub>mod</sub>) o różnych stosunkach wagowych tych polimerów, sieciowane genipiną o trzech stężeniach: 2 mM, 10 mM i 20 mM. Zestawienie wszystkich syntezowanych hydrożeli ColChHA<sub>mod</sub> przedstawia **Tabela 8**.

**Tabela 8.** Zestawienie otrzymywanych hydrożeli.

Material	Stosunek wagowy Col:Ch:HA <sub>mod</sub>	Stężenie genipiny [mM]
ColChHA <sub>mod</sub> 4/1 2		2
ColChHA <sub>mod</sub> 4/1 10	50:40:10	10
ColChHA <sub>mod</sub> 4/1 20		20
ColChHA <sub>mod</sub> 3/2 2		2
ColChHA <sub>mod</sub> 3/2 10	50:30:20	10
ColChHA <sub>mod</sub> 3/2 20		20
ColChHA <sub>mod</sub> 2/3 2		2
ColChHA <sub>mod</sub> 2/3 10	50:20:30	10
ColChHA <sub>mod</sub> 2/3 20		20

Funkcjonalizacja kwasu hialuronowego grupami aminowymi umożliwiła jego kowalencyjne związanie z hydrożelową siecią podczas procesu sieciowania genipiną. Zgodnie z oczekiwaniami wszystkie próbki na bazie Col, Ch i HA<sub>mod</sub> zmieniały kolor z lekko mlecznego na ciemnoniebieski w trakcie przejścia ze stanu zolu do żelu (**Rysunek 36**).

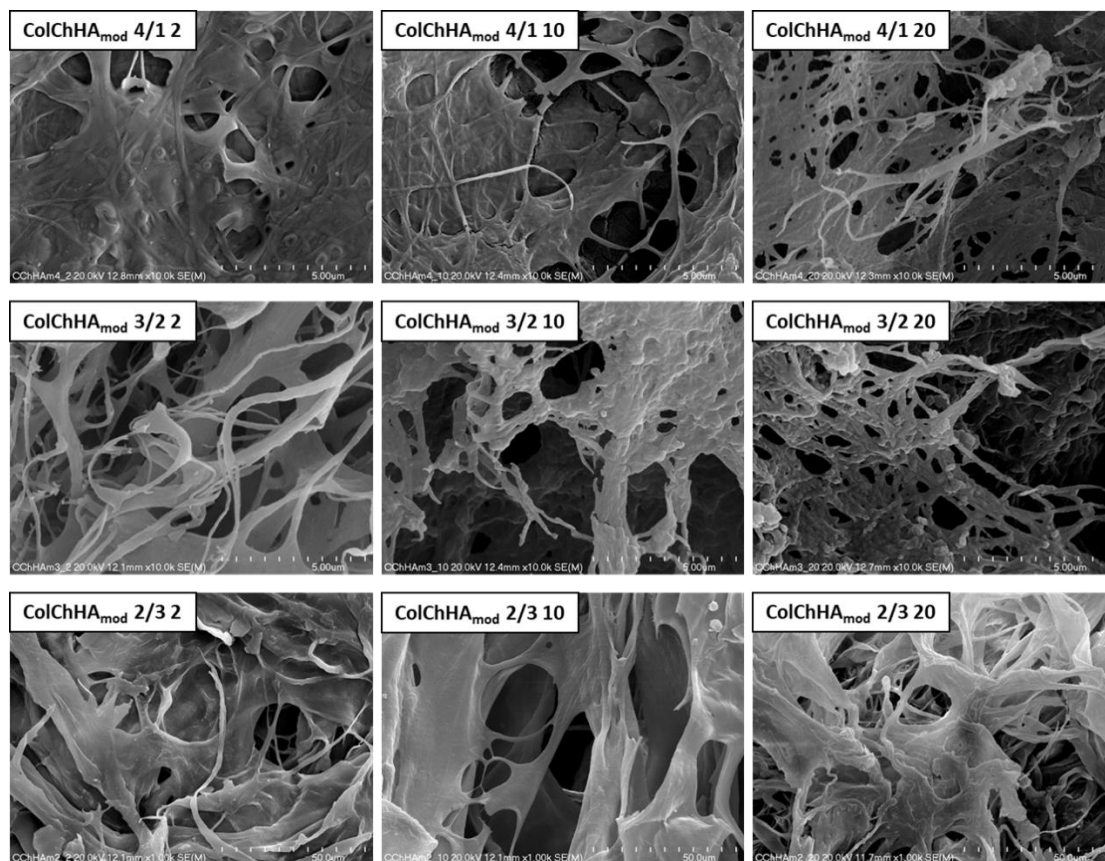


**Rysunek 36.** Próbki hydrożeli ColChHA<sub>mod</sub> w stanie zolu i po zajęciu procesu sieciowania.

### 9.2.3. Właściwości fizykochemiczne hydrożeli

#### Mikrostruktura i porowatość

Mikrostruktura i charakterystyka porów są istotnymi właściwościami materiałów projektowanych do zastosowań w inżynierii tkankowej, ponieważ determinują aktywność komórek oraz przepuszczalność dla tlenu i składników odżywczych wewnątrz rusztowania. Mikrostruktura otrzymanych hydrożeli została zobrazowana za pomocą mikroskopii SEM (**Rysunek 37**). Na podstawie mikrofotografii można stwierdzić, że wszystkie hydrożele miały podobną porowatą strukturę bez względu na zawartość biopolimerów i stężenie genipiny, jednakże zauważalna jest różnorodność rozmiarów i ilości widocznych porów.



**Rysunek 37.** Mikrofotografie SEM otrzymanych hydrożeli.

W celu dokładniejszej analizy struktury badanych hydrożeli określono charakterystykę porów, wykorzystując w tym celu porozymetrię rtęciową. W **Tabeli 9** przedstawiono rozkład rozmiarów i objętość porów oraz porowatość procentową. Wartości porowatości procentowej wskazują, że wszystkie materiały posiadały wysoce porowate struktury w zakresie 85 – 95%. Największą porowatością charakteryzowały się hydrożele ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 10 i ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 20, a najmniejszą ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 2 i ColChHA<sub>mod</sub> 4/1 10. Wszystkie materiały wykazały bimodalny rozkład wielkości porów – duży udział porów o średnicy z zakresu 3 – 250 µm (mediana w zakresie 35 – 87 µm) oraz mniejszy udział porów o średnicy z zakresu 5 – 100 nm (mediana w zakresie 5 – 13 nm). Objętość porów o rozmiarach w zakresie 3–250 µm wyniosła od 86% (ColChHA<sub>mod</sub> 4/1 10) do nawet 98% (ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 10) porowatości całkowitej. Otrzymane parametry z badań porozymetrycznych nie wykazały jednoznacznego wpływu stężenia genipiny na porowatość hydrożeli, jednakże w przypadku serii materiałów sieciowanych genipiną o stężeniu 10 i 20 mM zaobserwowano tendencję wzrostu porowatości wraz ze wzrostem zawartości modyfikowanego kwasu hialuronowego i tym samym zmniejszeniem ilości chitozanu w strukturze. Porowatość dla ColChHA<sub>mod</sub> 4/1 10, ColChHA<sub>mod</sub> 3/2 10, ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 10 wyniosła odpowiednio 86%,

90% i 95%, natomiast dla ColChHA<sub>mod</sub> 4/1 20, ColChHA<sub>mod</sub> 3/2 20, ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 20 wyniosła odpowiednio 87%, 93% i 95%. Taką tendencję wykazały również wartości całkowitej objętości porów. Może być to spowodowane zmniejszającą się ilością chitozanu w hydrożelach, który tworzy bardziej zwarte warstwy, zmniejszając objętość porów [258]. Niemniej jednak wszystkie otrzymane hydrożele charakteryzowały się wysokim stopniem porowatości, co jest korzystną właściwością dla rusztowań komórkowych.

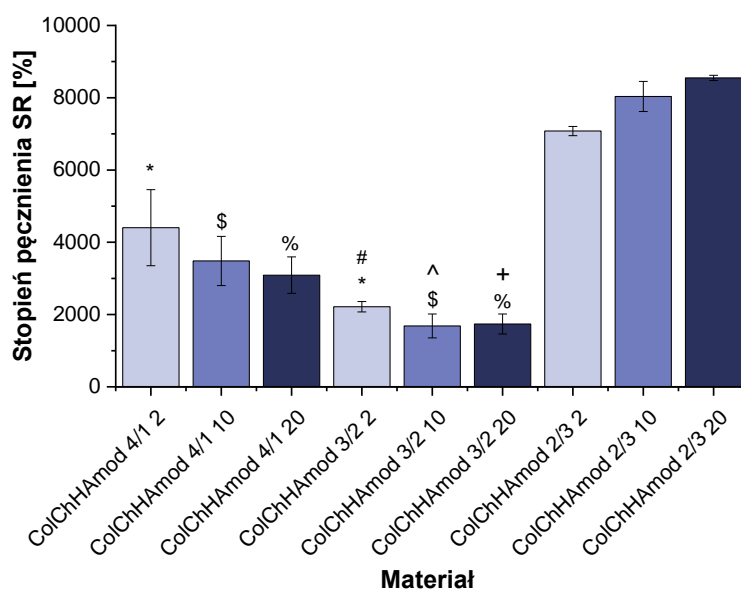
**Tabela 9.** Objętość porów i porowatość procentowa hydrożeli.

Hydrożel	Pory o średnicy 3-250 $\mu\text{m}$		Pory o średnicy 5-100 nm		Całkowita objętość porów (pory otwarte) [ $\text{cm}^3/\text{g}$ ]	Porowatość [%]
	Objętość porów [%]	Mediana	Objętość porów [%]	Mediana		
ColChHA <sub>mod</sub> 4/1 2	97,8	57,5	2,2	12,2	10,7	93,0 $\pm$ 0,3
ColChHA <sub>mod</sub> 4/1 10	86,3	58,3	13,7	7,3	5,4	85,5 $\pm$ 1,3
ColChHA <sub>mod</sub> 4/1 20	88,2	35,0	11,8	12,1	5,3	87,4 $\pm$ 0,3
ColChHA <sub>mod</sub> 3/2 2	93,0	65,0	7,0	11,0	10,3	94,2 $\pm$ 0,2
ColChHA <sub>mod</sub> 3/2 10	91,0	44,4	9,0	11,3	6,2	89,7 $\pm$ 0,2
ColChHA <sub>mod</sub> 3/2 20	95,4	63,0	4,7	6,1	8,6	92,6 $\pm$ 0,4
ColChHA <sub>mod</sub> 2/3 2	88,0	41,0	12,1	12,2	4,8	85,2 $\pm$ 0,6
ColChHA <sub>mod</sub> 2/3 10	98,3	86,6	1,7	5,8	13,5	95,1 $\pm$ 0,3
ColChHA <sub>mod</sub> 2/3 20	92,3	66,8	7,7	7,4	11,4	94,8 $\pm$ 0,1

### Zdolność do pęcznienia

Zbadano zdolność do pęcznienia otrzymanych hydrożeli w warunkach fizjologicznych (pH = 7,4; temperatura = 37 °C), stopień pęcznienia materiałów jest przedstawiony na **Rysunku 38**. Otrzymane rezultaty wskazują, że zdolność do pęcznienia jest silnie uzależniona od zawartości poszczególnych biopolimerów w hydrożelach. Najwyższe wartości stopnia pęcznienia wykazały hydrożele z największą zawartością modyfikowanego kwasu hialuronowego (seria ColChHA<sub>mod</sub> 2/3), co zdecydowanie wyróżniało je pod tym względem na tle innych hydrożeli. Może być to spowodowane większą dostępnością grup funkcyjnych wiążących wodę, które naturalnie występują w strukturze kwasu hialuronowego i nie biorą udziału w procesie sieciowania [259]. Na ekspozycję tych grup wpływa także gęstość sieci

polimerowej. Na ogół pęcznienie hydrożeli jest zależne od stężenia użytych czynników sieciujących [260]. W przypadku badanych materiałów nie zaobserwowano wyraźnego wpływu stężenia genipiny na stopień pęcznienia, różnice pomiędzy hydrożelami o takiej samej zawartości biopolimerów sieciowanych genipiną o stężeniu 2, 10 oraz 20 mM są niewielkie. Dla serii hydrożeli ColChHA<sub>mod</sub> 4/1 oraz ColChHA<sub>mod</sub> 3/2 stopień pęcznienia nieznacznie malał wraz ze wzrostem stężenia użytej genipiny, natomiast w przypadku serii ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 obserwowano odwrotny efekt. Badania zdolności do pęcznienia wykazały zatem, że dominującym czynnikiem wpływającym na wchłanianie wody przez otrzymane hydrożele była zawartość biopolimerów, a w szczególności ilość modyfikowanego kwasu hialuronowego.

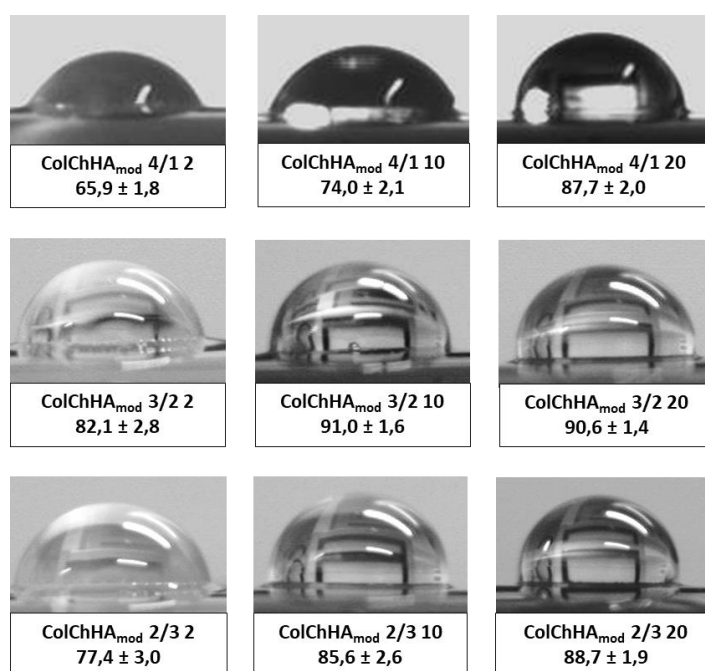


**Rysunek 38.** Stopień pęcznienia w warunkach fizjologicznych dla otrzymanych materiałów. Analizę statystyczną wykonano porównując między sobą materiały sieciowane genipiną o takim samym stężeniu. \* oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 2 ( $p < 0,05$ ), # oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA<sub>mod</sub> 4/1 2 ( $p < 0,05$ ), \$ oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 10 ( $p < 0,05$ ), ^ oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA<sub>mod</sub> 4/1 10 ( $p < 0,05$ ), % oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 20 ( $p < 0,05$ ), + oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA<sub>mod</sub> 4/1 20 ( $p < 0,05$ ).

### Liofilowość

Określono liofilowość powierzchni hydrożeli poprzez pomiary kątów zwilżania (**Rysunek 39**). Właściwa równowaga między właściwościami hydrofilowymi i hydrofobowymi powierzchni materiałów do zastosowań w inżynierii tkankowej pozytywnie wpływa na ich biokompatybilność, zbyt duża zwilżalność lub jej brak może utrudniać adhezję komórek [261]. Dla badanych hydrożeli zmierzone kąty zwilżania mieściły się w zakresie 65 – 91

stopni, co wskazuje na umiarkowaną zwilżalność powierzchni z tendencją do bardziej hydrofobowego charakteru. Na tej podstawie można wnioskować, że hydrożele ColChHA<sub>mod</sub>, w których wszystkie biopolimery uczestniczyły w chemicznym sieciowaniu genipiną, posiadały stosunkowo zwartą strukturę. W szczególności dla materiałów o większej zawartości modyfikowanego kwasu hialuronowego (ColChHA<sub>mod</sub> 3/2 oraz ColChHA<sub>mod</sub> 2/3) zaobserwowano znacznie wyższe wartości kątów zwilżania w porównaniu z hydrożelami ColChHA, zawierającymi niemodyfikowany kwas hialuronowy [230]. Ponadto stężenie użytej genipiny wpływało na właściwości powierzchniowe – generalnie wraz ze wzrostem stężenia genipiny hydrofilowość powierzchni maleje.

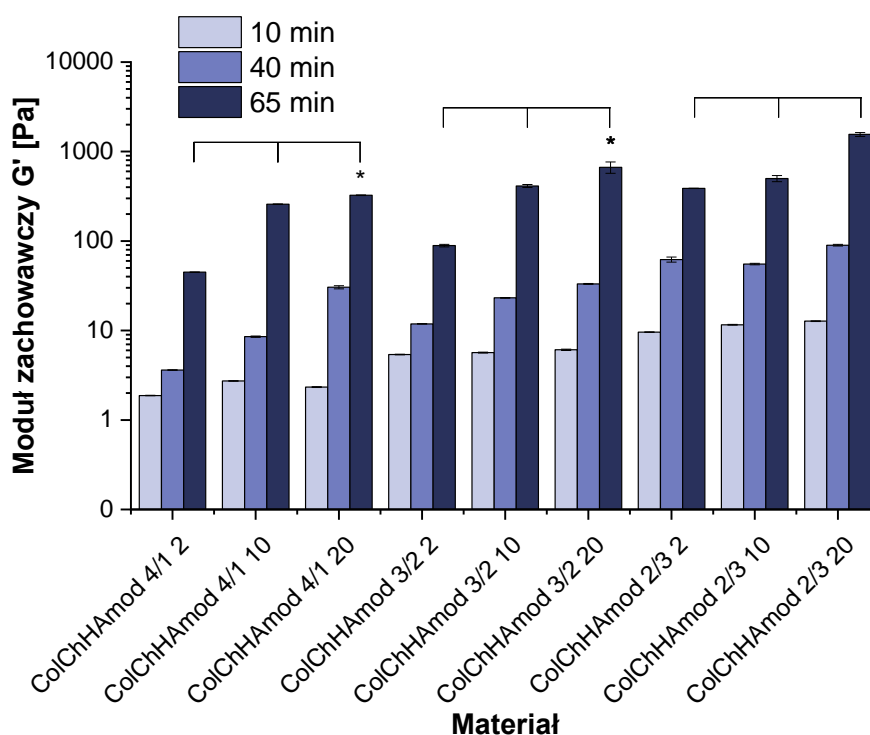


**Rysunek 39.** Wartości kąta zwilżania [°] mierzonych na powierzchni otrzymanych materiałów.

### Właściwości reologiczne

W celu oceny hydrożeli pod kątem możliwości aplikacji w formie wstrzykiwalnej i zdolności do żelowania *in situ* wykonano badania reologiczne, monitorując proces przejścia próbek od stanu zolu do żelu w 37 °C. Wartości modułu zachowawczego G' po 10, 40 oraz 65 minutach od rozpoczęcia pomiaru są przedstawione na **Rysunku 40** oraz w **Tabeli 10**. W początkowym etapie eksperymentów moduł zachowawczy dla wszystkich badanych próbek przyjmował niskie wartości w zakresie 2 – 13 Pa, potwierdzając stan umożliwiający wstrzyknięcie. Następnie wartości G' wzrastały po 40 minutach i osiągały wartość maksymalną w ciągu 65 minut od rozpoczęcia procesu sieciowania, dzięki czemu można stwierdzić, że otrzymane materiały są zdolne do przejścia ze stanu zolu do żelu w 37 °C.

Proces ten może być regulowany zarówno poprzez stężenie genipiny, jak i zawartość biopolimerów, gdyż obserwowano wpływ obu tych czynników na wartość  $G'$ . Zastosowanie wyższego stężenia genipiny powodowało większy stopień usieciowania i tym samym wzrost wartości modułu  $G'$ . Ponadto niezależnie od stężenia genipiny wyższe wartości modułu  $G'$  uzyskiwano dla hydrożeli z większą zawartością modyfikowanego kwasu hialuronowego. Takiej wyraźnej tendencji nie obserwowano w przypadku hydrożeli ColChHA z niemodyfikowanym kwasem hialuronowym (punkt 7.2.2, str. 76). Najwyższą wartość modułu zachowawczego osiągnął hydrożel z największą zawartością  $HA_{mod}$  oraz największym stężeniem genipiny (ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 20). Badania właściwości reologicznych dowiodły, że kwas hialuronowy funkcjonalizowany grupami aminowymi jest efektywnie sieciowany razem z pozostałymi biopolimerami przez genipinę, tworząc w ten sposób stabilne strukturalnie hydrożele.



**Rysunek 40.** Wartości modułu zachowawczego  $G'$  dla materiałów, osiągnięte po 10, 40 i 65 minutach od rozpoczęcia pomiaru. Czarne linie oznaczają istotność statystyczną pomiędzy wartościami  $G'$  materiałów o takim samym składzie biopolimerów, sieciowanych genipiną o stężeniu 2, 10 i 20 mM po 65 min pomiaru ( $p < 0,05$ ), \* oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA<sub>mos</sub> 2/3 20 po 65 min ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 10.** Wartości modułu zachowawczego  $G'$  dla materiałów, osiągnięte po 10, 40 i 65 minutach od rozpoczęcia pomiaru.

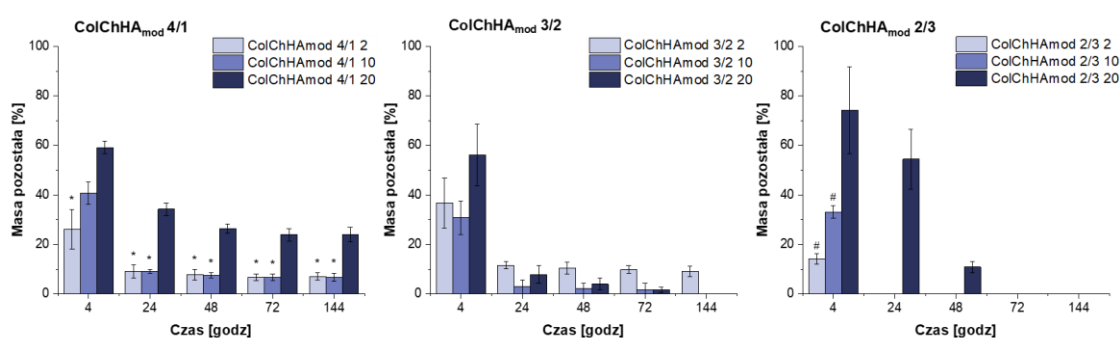
Hydrożele	$G'$ [Pa] po 10 min	$G'$ [Pa] po 40 min	$G'$ [Pa] po 65 min
ColChHA <sub>mod</sub> 4/1 2	1,88 ± 0,01	3,61 ± 0,03	44,87 ± 0,23
ColChHA <sub>mod</sub> 4/1 10	2,73 ± 0,02	8,54 ± 0,14	257,94 ± 1,69
ColChHA <sub>mod</sub> 4/1 20	2,33 ± 0,03	30,46 ± 1,24	325,17 ± 2,86
ColChHA <sub>mod</sub> 3/2 2	5,40 ± 0,04	11,87 ± 0,07	88,90 ± 2,81
ColChHA <sub>mod</sub> 3/2 10	5,67 ± 0,06	23,19 ± 0,22	412,27 ± 15,81
ColChHA <sub>mod</sub> 3/2 20	6,10 ± 0,11	33,20 ± 0,35	667,79 ± 96,86
ColChHA <sub>mod</sub> 2/3 2	9,58 ± 0,07	62,10 ± 4,07	388,08 ± 1,31
ColChHA <sub>mod</sub> 2/3 10	11,60 ± 0,10	55,31 ± 1,08	500,29 ± 39,95
ColChHA <sub>mod</sub> 2/3 20	12,73 ± 0,11	89,89 ± 2,01	1555,40 ± 76,85

### Degradacja enzymatyczna

Zbadano proces degradacji enzymatycznej wszystkich otrzymanywanych hydrożeli ColChHA<sub>mod</sub>. Zmiany masy hydrożeli w czasie 144 godzin pod wpływem działania kolagenazy przedstawia **Rysunek 41**. Skład hydrożeli miał znaczący wpływ na proces degradacji. W przypadku serii ColChHA<sub>mod</sub> 4/1 znaczny ubytek masy nastąpił po 4 i 24 godzinach od rozpoczęcia badania - w zakresie odpowiednio 40 – 75% i 65 – 90%. Kontynuacja eksperymentu nie wpływała już znacząco na pozostałą masę hydrożeli. Zgodnie z oczekiwaniami, najniższym stopniem degradacji charakteryzował się hydrożel z najwyższym stężeniem genipiny (ColChHA<sub>mod</sub> 4/1 20) – masa pozostała wyniosła ok. 24% masy początkowej po 144 godzinach badania. Hydrożele sieciowane genipiną o niższych stężeniach (ColChHA<sub>mod</sub> 4/1 2 i ColChHA<sub>mod</sub> 4/1 10) wykazały zbliżone masy pozostałe (ok. 7% po 144 godzinach badania). W przypadku serii ColChHA<sub>mod</sub> 3/2 zaobserwowano bardzo szybką degradację niezależnie od stężenia genipiny – po 24 godzinach badania ubytek masy wahał się w granicach 89 – 97%. Materiały te uległy szybkiej dezintegracji na mniejsze fragmenty, co ułatwiało działanie kolagenazy. Takiego zjawiska nie obserwowano dla pozostałych rodzajów badanych hydrożeli. Materiały z najwyższą zawartością modyfikowanego kwasu hialuronowego (ColChHA<sub>mod</sub> 2/3) ulegały całkowitej degradacji w trakcie eksperymentu, a decydujące znaczenie dla szybkości degradacji miało stężenie użytej genipiny. Materiały sieciowane genipiną o niższym stężeniu (ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 2



i ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 10) uległy całkowitej degradacji po już 24 godzinach badania, natomiast materiał otrzymany w obecności najwyższego stężenia genipiny (ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 20) zachował 55% masy początkowej po tym czasie i został całkowicie zdegradowany po 72 godzinach badania. Całkowite rozpuszczenie tej serii hydrożeli mogło być związane z ich wysokim stopniem pęcznienia (str. 116). Przy takiej zdolności do pęcznienia próbki enzymy mogą łatwiej dyfundować w strukturze hydrożeli, a tym samym przyspieszać degradację w całej objętości sieci polimerowej [262]. Badania degradacji enzymatycznej wykazały, że szybkość degradacji może być regulowana poprzez dobór stężenia czynnika sieciującego oraz skład biopolimerów użytych do otrzymania hydrożeli.



**Rysunek 41.** Zmiany masy hydrożeli ColChHA<sub>mod</sub> w obecności kolagenazy. Analizę statystyczną wykonano poprzez porównanie materiałów o takim samym składzie biopolimerów, sieciowanych genipiną o stężeniu 2, 10 i 20 mM w danym punkcie czasowym. \* oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA<sub>mod</sub> 4/1 20 ( $p < 0,05$ ), # oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 20 ( $p < 0,05$ ).

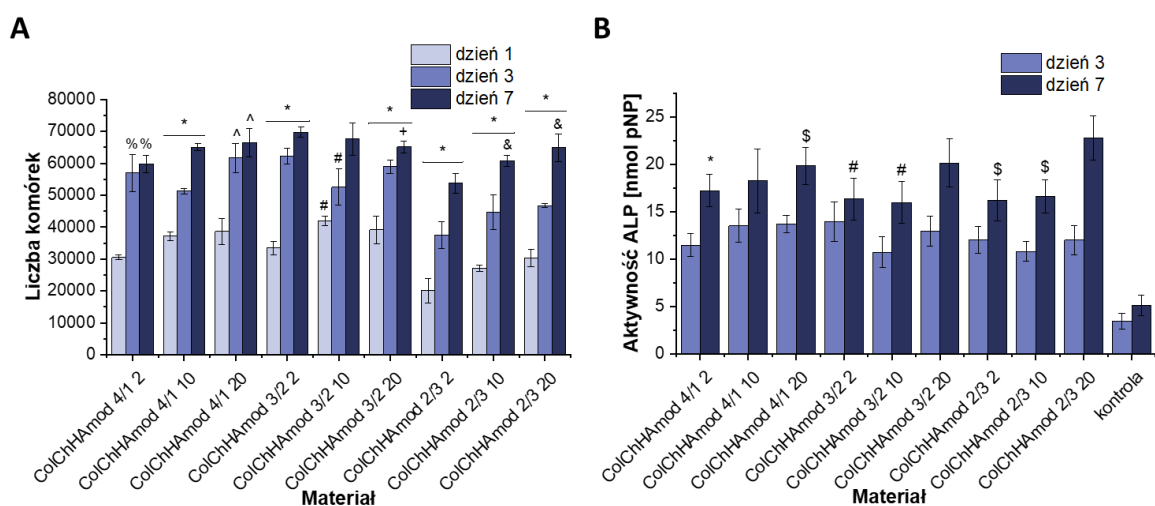
#### 9.2.4. Właściwości biologiczne *in vitro*

##### Żywotność komórek

Przeprowadzono badania żywotności komórek osteoblastopodobnych MG-63 wysianych na otrzymanych hydrożelach. Test z użyciem odczynnika Alamar Blue przeprowadzono po 1, 3 i 7 dniu hodowli. Wyniki eksperymentów przedstawia **Rysunek 42A**. Zmiany liczby komórek w czasie trwania eksperymentu zachowywały podobną tendencję dla wszystkich materiałów - liczba komórek znacząco wzrosła po 3 dniu hodowli (różnice między dniem 1 i 3 istotne statystycznie z wyjątkiem wyników dla ColChHA<sub>mod</sub> 3/2 10) i osiągnęła maksymalne wartości po 7 dniu hodowli (różnice między dniem 3 i 7 istotne statystycznie z wyjątkiem wyników dla ColChHA<sub>mod</sub> 4/1 2 i ColChHA<sub>mod</sub> 4/1 20). Eksperyment potwierdził zatem, że wszystkie otrzymane hydrożele wspierały proliferację komórek osteoblastopodobnych w badanym czasie.

## Aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP)

Zbadano aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) jako markera aktywności osteoblastów. Aktywność ALP komórek MG-63 hodowanych na badanych materiałach określono po 3 i 7 dniu hodowli, kontrolą były komórki hodowane na samej płytce hodowlanej. Wyniki przedstawiono na **Rysunku 42B**. Dla wszystkich materiałów obserwowano podwyższenie poziomu ALP po dniu 7 w porównaniu do dnia 3 oraz znaczny wzrost aktywności tego markera w porównaniu do kontroli ogółem. Dla każdej serii hydrożeli najwyższą aktywność ALP wykazano dla materiałów sieciowanych genipiną o najwyższym stężeniu (20 mM), a wśród nich maksymalną wartość uzyskano dla materiału ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 20. Badania potwierdziły zatem, że hydrożele ColChHA<sub>mod</sub> z modyfikowanym kwasem hialuronowym są nie tylko biokompatybilne, ale także zdolne do utrzymania fenotypu komórek osteoblastycznych (MG-63).

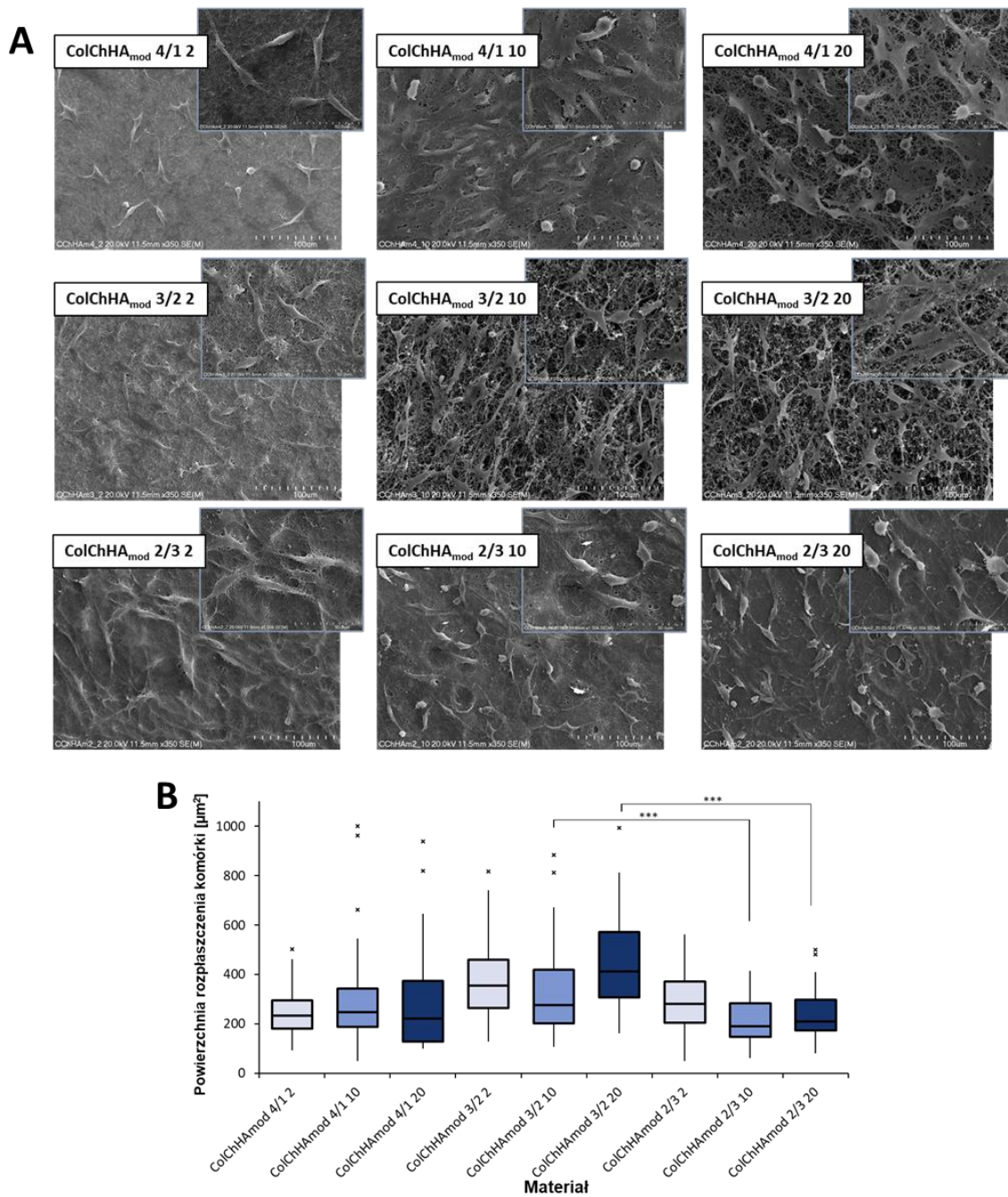


**Rysunek 42.** (A) Proliferacja komórek MG-63 po 1, 3 i 7 dniu hodowli na powierzchni badanych materiałów. \* nad czarną linią oznacza istotność statystyczną pomiędzy dniem 1, 3 i 7 dla tego samego rodzaju materiału ( $p < 0,05$ ), % oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA<sub>mod</sub> 4/1 2 w dniu 1 ( $p < 0,05$ ), ^ oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA<sub>mod</sub> 4/1 20 w dniu 1 ( $p < 0,05$ ), # oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA<sub>mod</sub> 3/2 10 w dniu 7 ( $p < 0,05$ ), + oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA<sub>mod</sub> 3/2 2 w dniu 7 ( $p < 0,05$ ), & oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 2 w dniu 7 ( $p < 0,05$ ). (B) Aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) komórek MG-63 po 3 i 7 dniu hodowli na powierzchni badanych materiałów. \* oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA<sub>mod</sub> 4/1 20 w dniu 7 ( $p < 0,05$ ), # oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA<sub>mod</sub> 3/2 20 w dniu 7 ( $p < 0,05$ ), \$ oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 20 w dniu 7 ( $p < 0,05$ ).

## Adhezja i morfologia komórek

Przeprowadzono analizę morfologii oraz zdolności do adhezji komórek MG-63 do powierzchni hydrożeli na podstawie uzyskanych mikrofotografii SEM (**Rysunek 43A**).

Powierzchnie wszystkich badanych hydrożeli ułatwiały adhezję komórek, większość obserwowanych komórek jest rozplaszczona na podłożach. Dla serii materiałów ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 oraz materiałów ColChHA<sub>mod</sub> 4/1 2 i ColChHA<sub>mod</sub> 3/2 2 morfologia przylegających komórek była podobna, posiadały one dobrze zdefiniowane i wydłużone kształty. W przypadku materiałów ColChHA<sub>mod</sub> 4/1 sieciowanych genipiną o wyższych stężeniach (szczególnie największym – 20 mM) kształty komórek były bardziej zróżnicowane, od okrągłych po dobrze rozplaszczone. Taką różnorodność można wyjaśnić istnieniem zależności między stopniem adhezji a szybkością wzrostu komórek [263]. Dla materiałów ColChHA<sub>mod</sub> 3/2 10 i ColChHA<sub>mod</sub> 3/2 20 zauważono tendencję do nakładania i łączenia się komórek na podłożach. Powyższe obserwacje znajdują odzwierciedlenie w analizie powierzchni zajmowanych przez przylegające komórki (**Rysunek 43B**). Dla materiałów ColChHA<sub>mod</sub> 3/2 i ColChHA<sub>mod</sub> 4/1 sieciowanych genipiną o wyższych stężeniach uzyskano szerszy rozkład powierzchni, zajmowanych przez rozplaszczone komórki w porównaniu do serii materiałów ColChHA<sub>mod</sub> 2/3.



**Rysunek 43.** Mikrofotografie SEM przedstawiające morfologie komórek MG-63 hodowanych przez 3 dni na powierzchni badanych materiałów (A), wykres przedstawiający średnią powierzchnię komórek po 3 dniach hodowli na materiałach (B). x oznacza punkt odstający, \*\*\* oznacza istotność statystyczną ( $p < 0,05$ ).

### Właściwości antybakteryjne

W celu wykazania wielofunkcyjnego potencjału opracowanych hydrożeli przeprowadzono badania właściwości *in vitro* wobec dwóch szczepów bakterii – *Escherichia coli* (Gram-ujemne) i *Staphylococcus aureus* (Gram-dodatnie). Wyniki testów przedstawia **Tabela 11**. Negatywną kontrolą w eksperymencie był hydrożel oparty na samym chitozanie usieciowanym genipiną o stężeniu 20 mM. Uzasadnieniem takiego wyboru kontroli jest fakt,

że chitozan jest znany ze swoich korzystnych właściwości w kierunku gojenia ran oraz działania antybakteryjnego [264]. Badane materiały inkubowano przez 4 godziny w zawiesinie bakterii w ilości około  $1,2 \cdot 10^3$  komórek/dolek w przypadku *S. aureus* i  $1,9 \cdot 10^2$  komórek/dolek w przypadku *E. coli*. Po tym czasie liczba komórek bakteryjnych zdecydowanie wzrosła w przypadku kontroli pozytywnej (odpowiednio  $8,5 \cdot 10^4$  i  $2,7 \cdot 10^5$  komórek/dolek dla *S. aureus* i *E. coli*). W przypadku hydrożelu na bazie samego chitozanu (kontrola negatywna) potwierdzono wysoką aktywność antybakteryjną względem obu szczepów bakterii, w szczególności efekt ten był bardziej wyraźny względem *E. coli*. Materiał ColChHA<sub>mod</sub> 4/1 10 wykazał się podobnym działaniem antybakteryjnym zarówno względem *S. aureus*, jak i *E. coli*, natomiast ColChHA<sub>mod</sub> 4/1 20 tylko względem *E. coli*. Hydrożele z mniejszą zawartością chitozanu - ColChHA<sub>mod</sub> 3/2 oraz ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 częściowo zapobiegały namnażaniu się bakterii *E. coli* w porównaniu z kontrolą pozytywną. Zaobserwowano zatem tendencję słabszego działania antybakteryjnego wraz ze zmniejszającą się zawartością chitozanu w strukturze hydrożeli. Dodatkowo otrzymane hydrożele wykazywały większy potencjał bakteriostatyczny względem bakterii Gram-ujemnych (*E. coli*) niż bakterii Gram-dodatnich (*S. aureus*), co może wynikać z różnic w budowie błon tych drobnoustrojów. Możliwość hamowania rozwoju bakterii przez opracowane materiały wskazała na ich wielofunkcyjność w potencjalnych zastosowaniach biomedycznych.

**Tabela 11.** Ilość komórek bakteryjnych (*S. aureus* i *E. coli*) obecnych na powierzchni hydrożeli po 4 godzinach inkubacji.

Rodzaj materiału	<i>S. aureus</i> (ilość komórek/dolek)	<i>E. coli</i> (ilość komórek/dolek)
<b>Płytki hodowlana (kontrola pozytywna)</b>	<b><math>8,5 \cdot 10^4</math></b>	<b><math>2,7 \cdot 10^5</math></b>
Ch 20 (kontrola negatywna)	$1,1 \cdot 10^1$	$3,5 \cdot 10^1$
ColChHA <sub>mod</sub> 4/1 10	$1,2 \cdot 10^2$	$9,5 \cdot 10^1$
ColChHA <sub>mod</sub> 4/1 20	$8,2 \cdot 10^3$	$9,0 \cdot 10^2$
ColChHA <sub>mod</sub> 3/2 10	$3,6 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^4$
ColChHA <sub>mod</sub> 3/2 20	$4,3 \cdot 10^4$	$7,5 \cdot 10^4$
ColChHA <sub>mod</sub> 2/3 10	$8,2 \cdot 10^4$	$8,6 \cdot 10^4$
ColChHA <sub>mod</sub> 2/3 20	$3,5 \cdot 10^4$	$9,5 \cdot 10^4$

### 9.3. Podsumowanie

Opracowano wstrzykiwalne hydrożele zbudowane z kolagenu, chitozanu oraz modyfikowanego lizyną kwasu hialuronowego, mogące potencjalnie służyć jako wielofunkcyjne rusztowania komórkowe w inżynierii tkankowej kości. Modyfikacja kwasu hialuronowego cząsteczkami lizyny zapewniła obecność grup aminowych w strukturze kwasu hialuronowego, a efektywność funkcjonalizacji została potwierdzona metodami analizy elementarnej i spektroskopii NMR. Dzięki temu wszystkie trzy biopolimery brały udział w chemicznym sieciowaniu genipiną, tworząc stabilne strukturalnie hydrożele dla wszystkich używanych stężeń czynnika sieciującego (2, 10 i 20 mM). Wykazano, że podstawowe właściwości fizykochemiczne hydrożeli takie jak pęcznienie, liofilowość, stopień degradacji i porowatość mogą być dostosowywane/modyfikowane poprzez dobór stężenia genipiny oraz zawartości funkcjonalizowanego kwasu hialuronowego. Materiały z najwyższą zawartością HA<sub>mod</sub> charakteryzowały się najwyższym stopniem pęcznienia, co istotnie wpływało także na proces ich degradacji. Wszystkie badane hydrożele cechował wysoki poziom porowatości (85 – 95%). Dla materiałów sieciowanych genipiną o stężeniach 10 i 20 mM porowatość rosła wraz ze wzrostem zawartości HA<sub>mod</sub>. Badania reologiczne potwierdziły wstrzykiwalność oraz korzystny wpływ HA<sub>mod</sub> na właściwości mechaniczne hydrożeli – rosnąca zawartość tego modyfikowanego biopolimeru powodowała wzrost modułu zachowawczego G', co wskazuje na efektywne usieciowanie HA<sub>mod</sub> w hydrożelach. Należy podkreślić, że nie obserwowano tak wyraźnego trendu w przypadku hydrożeli ColChHA z niemodyfikowanym kwasem hialuronowym (punkt 7.2.2, str. 76). Badania biologiczne *in vitro* z wykorzystaniem komórek osteoblastopodobnych MG-63 dowiodły, że hydrożele ColChHA<sub>mod</sub> były biokompatybilne, wspierały proliferację i adhezję komórek, a także wpływały na zwiększenie aktywności fosfatazy alkalicznej (ALP). Dodatkowo wykazano potencjał bakteriostatyczny hydrożeli, szczególnie względem bakterii *E. coli*, co potwierdziło możliwości rozszerzenia ich funkcji biologicznych.

Biorąc pod uwagę wszystkie wyniki badań przeprowadzonych dla serii hydrożeli ColChHA<sub>mod</sub> stwierdzono, że hydrożel z największą zawartością modyfikowanego kwasu hialuronowego oraz sieciowany genipiną o najwyższym stężeniu (ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 20) wyróżniał się na tle innych wysokim stopniem pęcznienia i porowatości, najwyższą wartością modułu zachowawczego w badaniach reologicznych, a także najwyższym poziomem aktywności ALP podczas hodowli komórkowej. W związku z tym hydrożel ColChHA<sub>mod</sub>

2/3 20 został wybrany do dalszych badań jako matryca dla nośnika leku przeciwosteoporotycznego.

## **10. Otrzymywanie i scharakteryzowanie wielofunkcyjnych materiałów hybrydowych opartych na matrycy hydrożelowej i nośniku leku przeciwosteoporotycznego**

### **10.1. Materiały i metody**

#### **10.1.1. Materiały**

Oprócz odczynników wymienionych w rozdziałach 7 i 8 (punkt 7.1.1, str. 71 oraz punkt 8.1.1, str. 82) użyto również: kwas hialuronowy (Sigma-Aldrich) modyfikowany lizyną HA<sub>mod</sub> (stopień podstawienia ok. 25%), trójwodny alendronian sodu (Sigma-Aldrich), kwas nadchlorowy (70%, Chempur), sześciowodny chlorek żelaza (III) FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich), mysie makrofagi linii J774A.1 (ATCC TIB-67<sup>TM</sup>), formalina (roztwór 10%, Sigma-Aldrich), Eozyna Y (roztwór w etanolu, Sigma-Aldrich), czerwień alizarynowa S (roztwór w etanolu, Sigma-Aldrich), balsam do szkiełek Cytoseal XYL (VWR Chemicals), hematoksylina Harrisa (VWR Chemicals), ksylen (Avantor Performance Materials), aceton (Avantor Performance Materials), paski testowe do analiz biochemicznych Spotchem II Panel V (Woodley), zestaw do detekcji cytokin LEGENDplex Mouse Inflammation Panel (13-plex) (BioLegend).

#### **10.1.2. Otrzymywanie nośnika leku przeciwosteoporotycznego**

##### **Otrzymywanie cząstek krzemionkowo-apatytowych (SiO<sub>2</sub>-Ap)**

Otrzymano sfunkcjonalizowane grupami aminowymi cząstki krzemionkowe metodą zol-żel według procedury opisanej w punkcie 8.1.2 (str. 83). W kolejnym etapie w fiolkach o pojemności 50 ml umieszczono po 20 mg otrzymanych cząstek i dodano po 20 ml roztworu 1,5 SBF. 1,5 SBF przygotowywano według procedury otrzymywania SBF opisanej w punkcie 8.1.6 (str. 86) z uwzględnieniem odpowiednio większych ilości reagentów w celu otrzymania 1,5 raza wyższego stężenia wszystkich substancji rozpuszczonych. Próbkę cząstek krzemionki w 1,5 SBF poddano sonikacji ciągłej przez 10 - 15 minut. Następnie fiołki zabezpieczono parafilmem, umieszczono w inkubatorze w temperaturze 37 °C i wytrząsano (50 rpm). Tak przygotowane materiały inkubowano przez okres 10 dni, wymieniając roztwór 1,5 SBF

na świeży co 2 - 3 dni. W tym celu zawiesinę cząstek w 1,5 SBF odwirowywano z prędkością 10 000 rpm przez 5 minut, zbierano roztwór z nad osadu, wprowadzano świeżą porcję buforu, energicznie mieszano i ponownie inkubowano. Po 10-dniowej inkubacji w sztucznym osoczu materiał poddano procesowi wirowania, a następnie oczyszczono przepłukując wodą i wirując (procedurę powtórzono trzykrotnie), po czym wysuszono w temperaturze pokojowej. Otrzymano materiał ( $\text{SiO}_2\text{-Ap}$ ) w postaci białego proszku.

### **Otrzymywanie cząstek krzemionkowo-apatytowych z przyłączonym lekiem przeciwosteoporotycznym ( $\text{SiO}_2\text{-Ap-ALN}$ )**

Do otrzymanego w wyniku kontrolowanej depozycji w warunkach 1,5 SBF układu  $\text{SiO}_2\text{-Ap}$  przyłączono alendronian sodu. W tym celu 20 mg materiału  $\text{SiO}_2\text{-Ap}$  zawieszono w 3 ml zasady sodowej (5 mM) i poddano 5 min sonifikacji. Następnie rozpuszczono 4 mg alendronianu sodu (ALN) w 2 ml roztworu NaOH (5 mM). Umieszczono elektrodę pH-metru w roztworze i dodając 20 mM roztwór NaOH ustalono jego pH do wartości 10. Następnie tak sporządzony roztwór alendronianu sodu dodano do zawiesiny  $\text{SiO}_2\text{-Ap}$ . Próbkę umieszczono na mieszadle magnetycznym z funkcją grzania (500 rpm, 37°C) na 3 dni. Otrzymany nośnik z przyłączonym alendronianem ( $\text{SiO}_2\text{-Ap-ALN}$ ) oczyszczono w drodze dializy do wody (24 godziny, temperatura pokojowa) i poddano liofilizacji, otrzymując biały proszek.

#### **10.1.3. Scharakteryzowanie cząstek $\text{SiO}_2\text{-Ap}$ oraz $\text{SiO}_2\text{-Ap-ALN}$**

Dla określenia mikrostruktury cząstek wykonano obrazowanie stosując skaningowy mikroskop elektronowy SEM (FESEM, HITACHI S-4700) oraz dokonano mikroanalizy rentgenowskiej (EDS, NORAN Vantage), aby potwierdzić obecność fazy mineralnej i wyznaczyć stosunek wapnia do fosforu. W tym celu kroplę zawiesiny z cząstkami umieszczano na podłożu krzemowym i pozostawiono do wyschnięcia. Bezpośrednio przed badaniem SEM próbki napyłano złotem. Badania struktury metodą dyfrakcji rentgenowskiej (XRD) przeprowadzono przy użyciu dyfraktometru X'Pert PRO MPD (PANalytical) z geometrią Bragga-Brentano z zastosowaniem lampy miedzianej i monochromatora grafitowego. Grupy funkcyjne cząstek charakteryzowano, wykorzystując spektrometr podczerwieni z transformacją Fouriera FTIR (Thermo Nicolet iS10 FTIR z przystawką ATR, Thermo Scientific). Skład powierzchniowy analizowano także przy użyciu rentgenowskiej spektrometrii fotoelektronów XPS (ESCA, PREVAC) z układem do neutralizacji ładunku powierzchniowego FS40A-PS (PREVAC). Analizę otrzymanych danych przeprowadzono korzystając z programu CasaXPS. Identyfikację składu pierwiastkowego badanego materiału



wykonano na podstawie położenia pików na widmie. Analizę termogravimetryczną (TG) materiałów wykonano za pomocą termogravimetru Mettler-Toledo TGA/SDTA851e. Próbki ogrzewano z szybkością 10 °C/min od zera do 1000 °C w przepływie argonu 110 mL/min. Ilość leku ALN przyłączonego do cząstek oceniano poprzez wykonanie testu spektrofotometrycznego opartego na tworzeniu kompleksu pomiędzy jonami ALN i Fe<sup>3+</sup> w obecności kwasu nadchlorowego. W tym celu 0,5 ml zawiesiny SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN (1 mg/ml w 0,2 M kwasie nadchlorowym) zmieszano z 0,15 ml 5 mM roztworu FeCl<sub>3</sub> w kwasie nadchlorowym (0,2 M) i uzupełniono do 3 ml kwasem nadchlorowym (0,2 M). Absorbancję mierzono przy 300 nm względem roztworu odniesienia, jakim była zawiesina SiO<sub>2</sub>-Ap w kwasie nadchlorowym. Zawartość ALN określono na podstawie krzywej kalibracyjnej ALN w 0,2 M kwasie nadchlorowym w zakresie stężeń 4 - 63 µg/ml.

#### **10.1.4. Otrzymywanie materiałów hybrydowych**

Otrzymane cząstki SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN zawieszono w zolu biopolimerowym składającym się z kolagenu, chitozanu oraz sfunkcjonalizowanego lizyną kwasu hialuronowego i usieciowano genipiną otrzymując materiał hybrydowy. W tym celu przygotowano trzy naważki cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN, odpowiednio 5 mg, 2,5 mg oraz 1 mg i każdą z nich zawieszono w 0,1 ml wody. Następnie dodawano odpowiednie objętości roztworów biopolimerów (według procedury opisanej w punkcie 9.1.4, str. 109 dla hydrożelu ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 20): 76 µl roztworu chitozanu (roztwór 1% (w/v) w 1% kwasie octowym), 540 µl roztworu kolagenu i 114 µl roztworu zmodyfikowanego lizyną kwasu hialuronowego (roztwór 1% (w/v) w 10x buforze PBS). Otrzymany zol poddano energicznemu wytrząsaniu a następnie dodano 170 µl roztworu genipiny (roztwór o stężeniu 20 mM, sporządzony w 10x buforze PBS) i inkubowano w temperaturze 37 °C aż do całkowitego usieciowania. Stosunek wagowy biopolimerów w otrzymanych materiałach wyniósł: Col:Ch:HA<sub>mod</sub> – 50:20:30. Stosując trzy różne stężenia zawiesin cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN (A1 = 5 mg/ml, A2 = 2,5 mg/ml, A3 = 1 mg/ml) otrzymano trzy rodzaje materiałów hybrydowych: ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1, ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A2 i ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A3. Jako materiał kontrolny otrzymano hydrożel o analogicznym składzie biopolimerów, ale bez dodatku cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN (dodawano 0,1 ml wody) (ColChHA<sub>mod</sub> 2/3).

### **10.1.5. Badania właściwości fizykochemicznych materiałów hybrydowych**

#### **Badanie mikrostruktury**

Mikrostrukturę materiałów zobrazowano przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego SEM (FESEM HITACHI S-4700). W tym celu otrzymane materiały przepłukano kilka razy wodą dejonizowaną i zliofilizowano. Bezpośrednio przed obrazowaniem próbki napyłono złotem.

#### **Badanie zdolności do pęcznienia**

Przeprowadzono badania zdolności uzyskanych materiałów do pęcznienia w warunkach fizjologicznych, według procedury opisanej w punkcie 8.1.5 (str. 85). Materiały ważono po 24-godzinnej inkubacji w PBS w postaci spęczniałej, a następnie w postaci suchej po zliofilizowaniu. Stopień pęcznienia materiału ( $SR$ ) wyznaczano, stosując wzór (5).

#### **Badanie liofilowości**

W celu określenia liofilowości materiałów wykonywano pomiary kąta zwilżania przy użyciu urządzenia SurfTens Universal instrument (OEG GmbH, Frankfurt, Germany) zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 8.1.5 (str. 85).

#### **Badanie właściwości reologicznych**

Przeprowadzono badania właściwości reologicznych z wykorzystaniem reometru rotacyjnego MCR 301 (Anton Paar) zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 7.1.3 (str. 72). Badania wykonano z wykorzystaniem geometrii pomiarowej typu płytka-płytko o średnicy 20 mm, przy szczelinie pomiarowej  $h = 1$  mm, próbki poddano wymuszeniu oscylacyjnemu o następujących parametrach: odkształcenie  $\gamma = 1\%$  z częstotliwością  $f = 1$  Hz. Pojedynczy pomiar próbki trwał 70 minut, wykonano po trzy powtórzenia dla każdego rodzaju próbki.

#### **Badanie procesu degradacji enzymatycznej**

Przez okres 144 godzin monitorowano proces degradacji materiałów w obecności enzymu kolagenazy (roztwór 0,2 mg/ml w buforze PBS z 0,36 mM  $\text{CaCl}_2$ ) zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 7.1.3 (str. 73). Zmiany masy w trakcie eksperymentu wyrażono jako % masy pozostałej, obliczany według wzoru (4).

### **10.1.6. Badanie uwalniania leku z materiałów hybrydowych**

Badania uwalniania leku przeprowadzono dla materiału z największą zawartością ALN – ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1. W tym celu próbki materiału umieszczano w płytce 24-dołkowej,

zalewano buforem PBS (1 ml/dołek) i inkubowano w 37 °C z wytrząsaniem (100 rpm). W określonych punktach czasowych (po 1, 2, 4, 6, 24, 48, 72, 144 i 168 godzinach) pobierano całą objętość roztworu z dołków i zalewano materiały świeżym PBS. Taką samą procedurę stosowano dla materiału bez zawartości leku, który stanowił materiał odniesienia. Zebrane roztwory przechowywano w temperaturze -20 °C do czasu pomiarów spektrofotometrycznych. Do określenia ilości uwolnionego ALN w zebranych roztworach wykorzystano metodę spektrofotometryczną, polegającą na tworzeniu się kompleksu pomiędzy jonami ALN i Fe<sup>3+</sup>, analogicznie jak opisano w punkcie 10.1.3 (str. 128). Dla każdej próbki eksperymenty przeprowadzono trzykrotnie i wyznaczono wartości średnie. Dodatkowo dane eksperymentalne zostały dopasowane do trzech modeli kinetycznych, pozwalających na analizę mechanizmu uwalniania: Higuchiego, Ritgera-Peppasa i Weibulla.

#### **10.1.7. Badanie biomineralizacji *in vitro***

Prowadzono badania zdolności do tworzenia się fazy mineralnej na powierzchni materiałów hybrydowych poprzez inkubację w symulowanym sztucznym osoczu (SBF). SBF otrzymywano według procedury opisanej w punkcie 8.1.6 (str. 86). Materiały hybrydowe umieszczono w płytkach 24-dołkowych, zalano roztworem SBF (1 ml/dołek) i inkubowano w 37 °C przez 3 oraz 5 dni, wymieniając codziennie SBF na świeży. Po zakończeniu inkubacji materiały przepłukano kilka razy wodą dejonizowaną i zliofilizowano. Strukturę powierzchni zliofilizowanych materiałów zobrazowano przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego (FESEM HITACHI S-4700). W celu potwierdzenia obecności fazy mineralnej i wyznaczenia stosunku wapnia do fosforu dokonano mikroanalizy rentgenowskiej (EDS, NORAN Vantage). Przed obrazowaniem próbki napyłono złotem.

#### **10.1.8. Badania właściwości biologicznych *in vitro***

Badania właściwości biologicznych *in vitro* prowadzono z użyciem linii komórek osteoblastopodobnych MG-63 oraz komórek osteoklastopodobnych J774A.1. Otrzymanie materiałów hybrydowych do hodowli komórkowych oraz hodowlę komórek MG-63 realizowano zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 8.1.7 (str. 87). W przypadku komórek J774A.1 wykonywano analogiczne czynności za wyjątkiem pasażowania – pasaż tej linii komórkowej prowadzono poprzez delikatne mechaniczne zdrapywanie komórek z dna butelki przy użyciu skrobaka do komórek. Komórki wysiewano na materiałach w ilości 2·10<sup>4</sup> komórek/cm<sup>2</sup>.

### **Badanie żywotności komórek – test Alamar Blue**

Test żywotności komórek MG-63 oraz J774A.1 wysianych na materiałach prowadzono z użyciem odczynnika Alamar Blue po 1, 3 oraz 7 dniu hodowli komórkowej, zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 8.1.7 (str. 88). Pomiar absorbancji przeprowadzono w czytniku mikroplątek TECAN Infinite M200 przy długościach fali 560 nm i 600 nm. Wartości absorbancji przeliczano na ilość komórek, korzystając z krzywych kalibracyjnych otrzymanych z pomiarów absorbancji dla znanych ilości komórek MG-63 oraz J774A.1.

### **Badanie aktywności fosfatazy alkalicznej – test ALP**

Test na aktywność fosfatazy alkalicznej ALP dla komórek MG-63 był prowadzony równoległe do testu Alamar Blue po 3 i 7 dniu hodowli komórek na materiałach, zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 8.1.7 (str. 88). Pomiar absorbancji prowadzono co minutę przez 6 minut przy długości fali 405 nm. Aby przeliczyć absorbancję na ilość wytworzonego produktu (nmol), zastosowano równanie (6). Po odpowiednim przeliczeniu ilości produktu, wyniki odnoszono do liczby żywych komórek z testu Alamar Blue.

### **Badanie adhezji i morfologii komórek**

Powierzchnia materiałów z wysianymi komórkami linii MG-63 była obrazowana skaningowym mikroskopem elektronowym SEM (FESEM, HITACHI S-4700). W tym celu po 3 dniach prowadzenia hodowli komórkowej, materiały przepłukano buforem PBS i wykonano procedurę utrwalania i odwadniania zgodnie z opisem zamieszczonym w punkcie 7.1.4 (str. 73). Bezpośrednio przed obrazowaniem SEM próbki były napyłane złotem. Mikrofotografie SEM powierzchni hydrożeli z komórkami były analizowane z wykorzystaniem programu ImageJ.

#### **10.1.9. Badania właściwości biologicznych *in vivo***

Eksperymenty *in vivo* przeprowadzono na modelu mysim przy współpracy z dr Moniką Bzowską i mgr Alicją Hinz z Zakładu Biochemii Komórki na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ (WBBiB UJ). Sześciotygodniowe samice myszy C57BL/6 wykorzystane do badań pochodziły ze Zwierzętarni WBBiB UJ, utrzymywano je w kontrolowanych warunkach (wymiana powietrza, temperatura, wilgotność) oraz zapewniano dostęp do wody i pożywienia *ad libitum*. Wszystkie procedury wykonywano w odniesieniu do Ustawy o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (D20150266L), wdrażającej dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady (2010/63/UE). Doświadczenia prowadzono zgodnie z wytycznymi Institutional Animal Care and Use

Committee (IACUC) oraz na podstawie uchwały nr 81/2020 z dnia 02.04.2020 wydanej przez II Lokalną Komisję Etyczną do spraw doświadczeń na zwierzętach w Krakowie.

### **Ocena wstrzykiwalności, biodegradowalności i biokompatybilności**

Myszy zostały zważone i losowo podzielone na grupy eksperymentalne – jednej grupie wstrzyknięto sterylny bufor PBS (grupa kontrolna), drugiej wstrzyknięto hydrożel ColChHA<sub>mod</sub> 2/3, a trzeciej grupie wstrzyknięto materiał hybrydowy ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1. Przed rozpoczęciem eksperymentów materiały do badań przygotowano poprzez zmieszanie wszystkich komponentów z genipiną o stężeniu 20 mM, przeniesiono do strzykawki i inkubowano w 37 °C przez 15 minut, aby zainicjować tworzenie się żelu. Następnie wstrzyknięto myszom podskórnie w lewy bok po 200 µl materiału (za pomocą igły o średnicy 29G). Po tym etapie zwierzęta badano codziennie przez 7 dni w celu wykrycia zmian w objętości materiałów widocznych pod skórą (ocena palpacyjna i pomiary suwmiarką). Po upływie pierwszego tygodnia badań obserwacje były prowadzone w odstępach 7-dniowych. Myszy uśmiercano po 24 godzinach (pierwszy dzień eksperymentu) oraz po 7, 30 i 60 dniach od wstrzyknięcia materiałów. Krew, główne narządy i fragmenty skóry z pozostałościami wstrzykniętych materiałów wyizolowano do dalszych analiz. Objętość materiału ( $V_{\text{hydrożel}}$ ) ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 obliczono, stosując wzór:

$$(7) \quad V_{\text{hydrożel}} = \frac{\text{wymiar pionowy} \cdot \text{wymiar poziomy}^2}{2}$$

### **Analiza morfologii i parametrów biochemicznych krwi i badania immunologiczne**

W dniu uśmiercania krew była najpierw pobierana z żyły twarzowej do analiz hematologicznych, wykonywanych za pomocą automatycznego analizatora weterynaryjnego ABC Vet (HORIBA, Wielka Brytania) – oznaczenie liczby białych i czerwonych krwinek, płytek krwi, granulocytów, limfocytów i monocytów, wartości hematokrytu, średnich objętości krwinki, stężenia hemoglobiny i rozkładu wielkości krwinek czerwonych. Następnie krew pobierano pośmiertnie przez nakłucie serca, pozostawiono do skrzepnięcia i wirowano przez 10 min. Wyizolowane w ten sposób serum poddano analizie biochemicznej z wykorzystaniem analizatora SPOTCHEM EZ Chemistry Analyzer (Woodley Equipment) i pasków testowych SPOTCHEM II Panel V oraz oznaczono profile cytokin. Poziom cytokin IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17 $\alpha$ , IL-23, IL-27, MCP-1, IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  i GM-CSF był badany za pomocą zestawu LEGENDplex Mouse Inflammation Panel (13-plex) (BioLegend) oraz cytometru przepływowego BD LSRFortessa, analizę przeprowadzono poprzez wykorzystanie oprogramowania LEGENDplex (BioLegend).

### **Przygotowanie tkanek i barwienie do badań histologicznych**

Utrwalono wyizolowane fragmenty skóry z pozostałościami hydrożelu, wątrobę, nerkę i śledzionę. W tym celu tkanki inkubowano w formalinie w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Po tym czasie tkanki były przechowywane kilka dni w temperaturze 4 °C dla przeprowadzenia procesu odwadniania. Dzień przed odwadnianiem tkanki umieszczono w etanolu o stężeniu 70%. Następnego dnia przeprowadzono serię inkubacji materiałów w roztworach o rosnącym stężeniu etanolu, ksyleny, a na koniec w rozpuszczonej parafinie (60 °C) według procedury opisaney przez Berry'ego i współpracowników [265]. Po całonocnej inkubacji w rozpuszczonej parafinie, fragmenty tkanek zatopiono w bloczkach parafinowych przy użyciu zatapiarki HistoStar (Thermo Scientific). Następnie przygotowano skrawki tkanek o grubości 4 µm za pomocą mikrotomu (Thermo Scientific) i umieszczono je na szkiełkach podstawowych pokrywanych poli-L-lizyną (Thermo Scientific). Przed barwieniem usunięto parafinę z preparatów poprzez inkubację w 60 °C przez 60 minut, potem trzykrotnie w roztworze ksyleny przez 5 minut i trzykrotnie w etanolu (99,8%) przez 5 minut. Następnie tkanki nawodniono, inkubując w etanolu o stężeniach kolejno 95% i 80%, a na koniec w wodzie przez 2 minuty. Po procesie odparafinowania uzyskane preparaty barwiono hematoksyliną i eozyną lub trichromem Massona zgodnie z zaleceniami producenta (Sigma-Aldrich). Próbki zabezpieczono, stosując balsam do szkiełek Cytoseal XYL i badano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego Leica DM6B w jasnym polu przy powiększeniach 5x, 10x lub 20x.

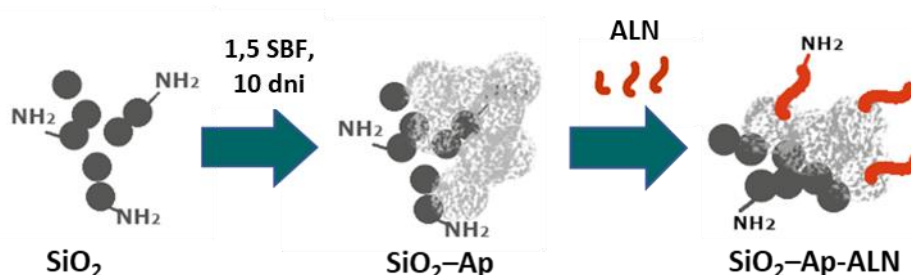
### **Barwienie hydrożeli wyizolowanych ze skóry czerwienią alizarynową**

Utrwalono wyizolowane fragmenty skóry z pozostałościami hydrożelu według procedury opisaney w poprzedniej sekcji. Otrzymane preparaty barwiono roztworem czerwieni alizarynowej (2% w wodzie destylowanej) przez 2 minuty, a następnie odwadniano przez 20-krotne zanurzenie w acetonie, a dalej 20-krotne zanurzenie w roztworze aceton/ksylen zmieszane w stosunku 1:1. W kolejnym kroku preparaty inkubowano w ksylenie przez 1 minutę i finalnie przeniesiono do świeżego ksyleny przed uszczelnieniem. Próbki zabezpieczono, stosując balsam do szkiełek Cytoseal XYL i badano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego Leica DM6B w jasnym polu przy powiększeniu 5x.

## 10.2. Wyniki i dyskusja

### 10.2.1. Otrzymywanie cząstek krzemionkowo-apatytowych z przyłączonym lekiem przeciwosteoporotycznym (SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN)

Nośnik leku przeciwosteoporotycznego alendronianu sodu (ALN) w postaci układu SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN otrzymano według dwuetapowej procedury, przedstawionej schematycznie na **Rysunku 44**. W pierwszym etapie otrzymano cząstki krzemionkowo-apatytowe SiO<sub>2</sub>-Ap poprzez inkubację sfunkcjonalizowanych grupami aminowymi cząstek krzemionki SiO<sub>2</sub> w roztworze symulowanego sztucznego osocza (1,5 SBF) przez 10 dni. Depozycja fazy mineralnej na powierzchni cząstek krzemionki była możliwa dzięki obecności grup silanolowych Si-OH, które sprzyjają formowaniu się apatytu przy udziale SBF [130]. W kolejnym kroku ALN został przyłączony do SiO<sub>2</sub>-Ap, z wykorzystaniem procedury opisanej przez Ma i współpracowników [156]. Stabilność otrzymanego materiału wynika z występowania oddziaływań wynikających z silnego powinowactwa ALN do apatytu. Zdeprotonowane atomy tlenu grup fosforanowych w ALN oddziałują elektrostatycznie z jonami wapnia obecnymi na powierzchni apatytu [266].

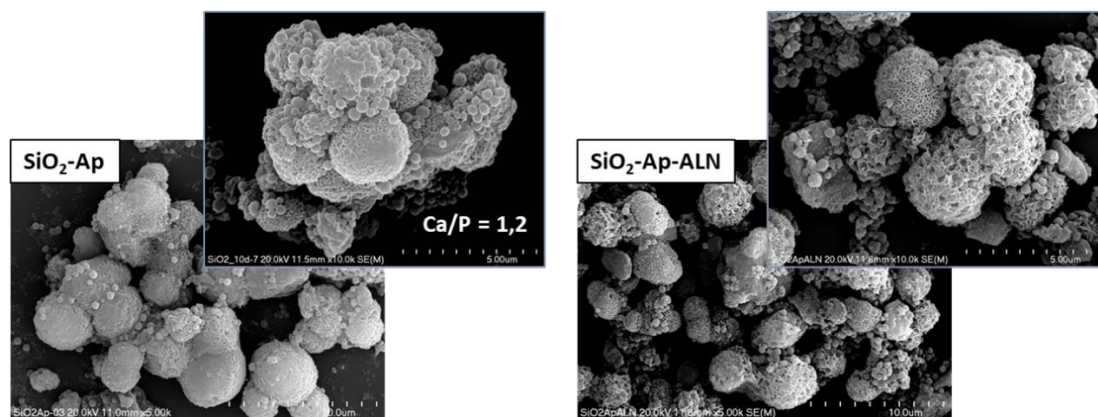


**Rysunek 44.** Schemat otrzymywania nośnika alendronianu w postaci układu SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN.

### 10.2.2. Właściwości fizykochemiczne układu SiO<sub>2</sub>-Ap oraz SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN

Wytworzenie nowej fazy mineralnej na powierzchni cząstek krzemionkowych po inkubacji w SBF, a więc otrzymanie układu SiO<sub>2</sub>-Ap zostało potwierdzone za pomocą mikroskopii SEM z analizą rentgenowską EDS oraz dyfraktometrii rentgenowskiej (XRD). Badania SEM i EDS (**Rysunek 45**) wykazały obecność fazy mineralnej o morfologii i składzie (stosunek Ca/P = 1,2) charakterystycznym dla struktur apatytowych. Wyniki analizy XRD (**Rysunek 46A**) jednoznacznie potwierdziły obecność fazy krystalicznej w otrzymanym materiale. Ponadto sygnały pojawiające się na dyfraktogramach przy 2θ równym: 25,9; 32,0; 39,4; 42,2;

46,8; 53,2 pozostają w zgodności z wartościami literaturowymi sygnałów przypisywanym hydroksyapatytowi [156]. Potwierdzono zatem skuteczność zaproponowanej metodologii otrzymywania bioaktywnego materiału hybrydowego ( $\text{SiO}_2\text{-Ap}$ ) w łagodnych warunkach symulujących proces biomineralizacji.



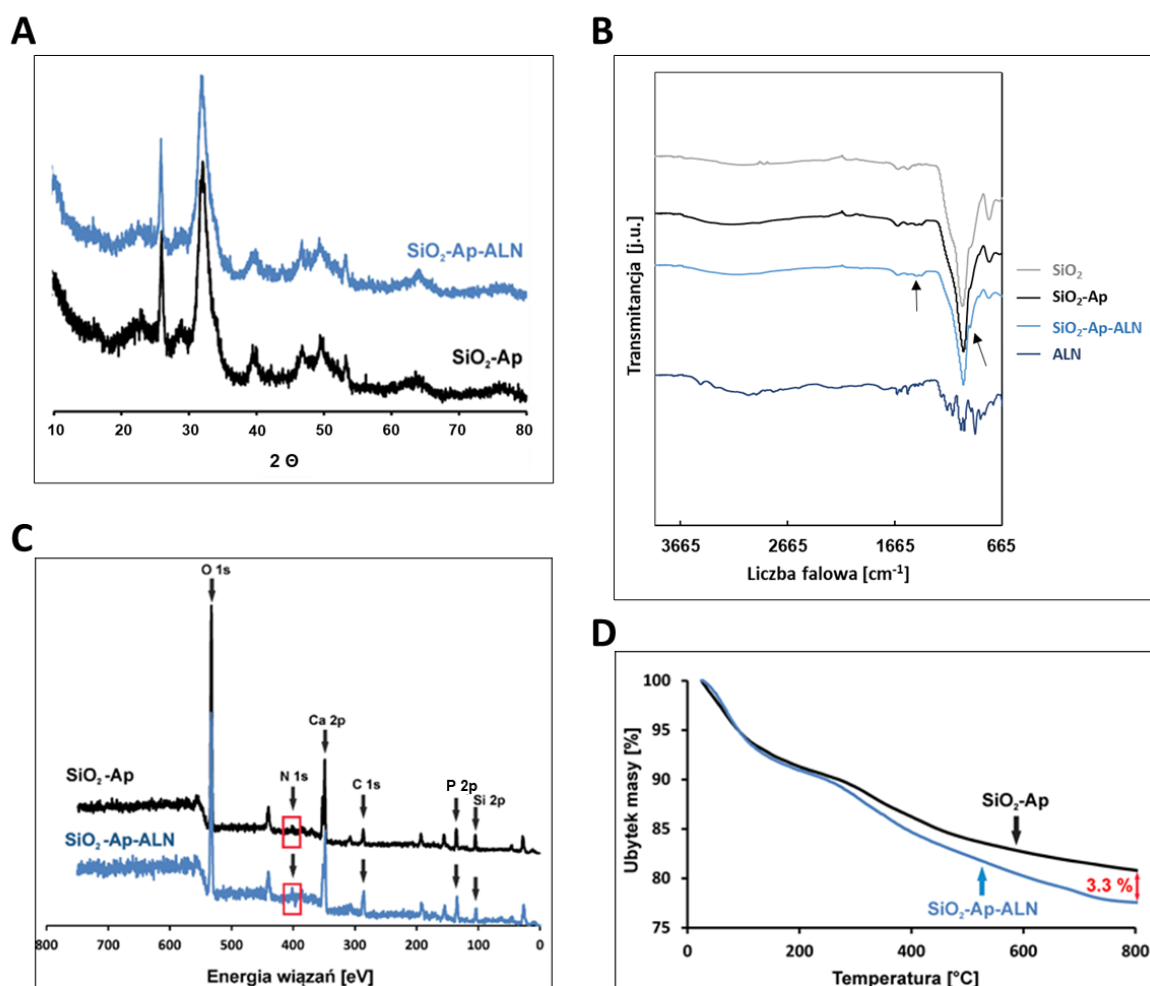
**Rysunek 45.** Mikrofotografie SEM cząstek  $\text{SiO}_2\text{-Ap}$  oraz  $\text{SiO}_2\text{-Ap-ALN}$ .

Otrzymane w kolejnym etapie cząstki krzemionkowo-apatytowe z przyłączonym alendronianem ( $\text{SiO}_2\text{-Ap-ALN}$ ) zostały scharakteryzowane za pomocą szeregu komplementarnych metod fizykochemicznych. Na podstawie mikrofotografii SEM (**Rysunek 45**) nie stwierdzono zmian w strukturze cząstek po przyłączeniu ALN. Dyfraktogram dla materiału z przyłączonym lekiem (**Rysunek 46A**) nie wykazał istotnych różnic w porównaniu do dyfraktogramu uzyskanego dla samego nośnika, co potwierdza, że proces koniugacji ALN do  $\text{SiO}_2\text{-Ap}$  nie wpływa na jego strukturę krystaliczną. Analizy grup funkcyjnych dla materiałów  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2\text{-Ap}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-Ap-ALN}$  oraz ALN dokonano, wykorzystując spektrometr FTIR (**Rysunek 46B**). Widma dla  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2\text{-Ap}$  i  $\text{SiO}_2\text{-Ap-ALN}$  zawierają piki charakterystyczne dla struktury krzemionki ( $1020\text{ cm}^{-1}$ ,  $959\text{ cm}^{-1}$ ,  $779\text{ cm}^{-1}$ ) oraz wynikające z funkcjonalizacji grupami aminowymi ( $1540\text{ cm}^{-1}$ ), jak opisano w punkcie 8.2.2 (str. 90). W przypadku  $\text{SiO}_2\text{-Ap}$  i  $\text{SiO}_2\text{-Ap-ALN}$  pojawiło się pasmo przy  $1450\text{ cm}^{-1}$  oraz słaby pik przy  $877\text{ cm}^{-1}$ , które można przypisać grupom  $\text{CO}_3^{2-}$  pochodzącym od apatyty (oznaczone na Rysunku 46B czarnymi strzałkami) [267]. Nie jest możliwe wyróżnienie pasm charakterystycznych dla ALN (zakres  $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$  [268]) z powodu nakładania się w tym zakresie także pasm pochodzących od krzemionki i apatyty.

Badania z użyciem spektroskopii fotoelektronów (XPS) i termogravimetrii (TG) potwierdziły efektywność przyłączania alendronianu do bioaktywnego nośnika  $\text{SiO}_2\text{-Ap}$ . Obecne na widmie XPS (**Rysunek 46C**) piki można przypisać do O 1s ( $533\text{ eV}$ ), N 1s ( $401\text{ eV}$ ), Ca 2p



(349 eV), C 1s (286 eV), P 2p (134 eV) oraz Si 2p (105 eV) [244]. Analiza składu pierwiastkowego powierzchni badanych materiałów (**Tabela 12**) wykazała 2-krotny wzrost sygnałów N 1s i C 1s dla układu SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN w porównaniu do SiO<sub>2</sub>-Ap, co może wynikać z eksponowania na powierzchni SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN łańcuchów węglowych zakończonych grupami aminowymi, pochodzących od ALN. Analiza TG (**Rysunek 46D**) również wykazała różnice w profilach termograwimetrycznych materiałów SiO<sub>2</sub>-Ap i SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN. Dla materiału z przyłączonym lekiem zaobserwowano ubytek masy większy o 3,3% w stosunku do samego nośnika SiO<sub>2</sub>-Ap. Wartość ta była mniejsza niż zawartość ALN w nośniku wyznaczona na podstawie pomiarów spektrofotometrycznych (około 6%). Podsumowując, wszystkie wykonane badania dla SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN potwierdzają, iż alendronian został skutecznie przyłączony do nośnika SiO<sub>2</sub>-Ap w ramach zastosowanej metody otrzymywania takiego układu.



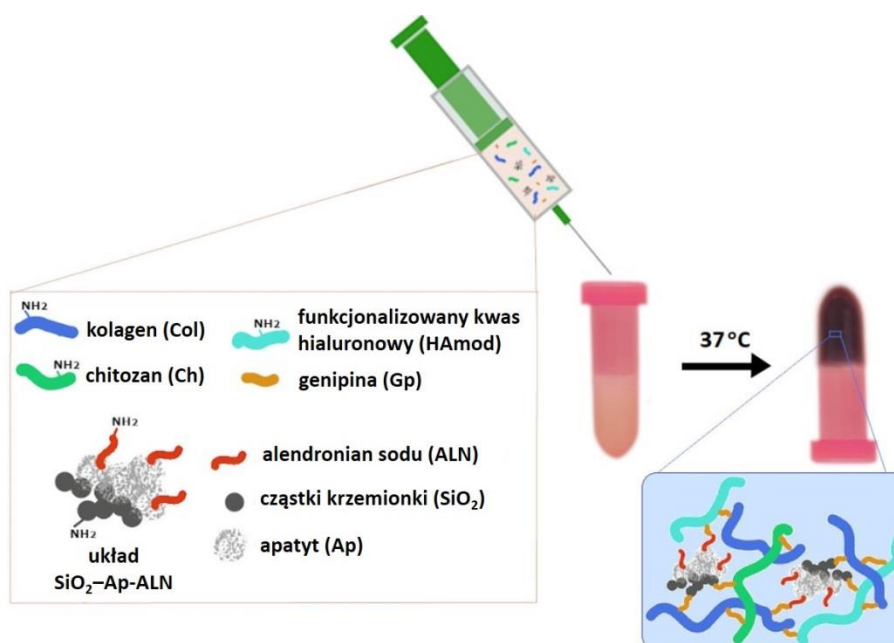
**Rysunek 46.** Dyfraktogramy (**A**), widma FTIR (**B**), widma XPS (**C**) oraz profile TG (**D**) dla cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap oraz SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN.

**Tabela 12.** Wyniki analizy XPS dla cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap oraz SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN.

<b>Skład pierwiastkowy (%) badanych materiałów</b>	<b>O 1s</b>	<b>Si 2p</b>	<b>C 1s</b>	<b>N 1s</b>	<b>Ca 2p</b>	<b>P 2p</b>
SiO <sub>2</sub> -Ap	62	3	4	1	26	4
SiO <sub>2</sub> -Ap-ALN	60	3	8	2	23	4

### 10.2.3. Otrzymywanie materiałów hybrydowych

Otrzymywano materiały hybrydowe oparte na matrycy hydrożelowej oraz rozproszonych w niej cząstkach krzemionkowo-apatytowych z przyłączonym alendronianem (SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN). Matryca hydrożelowa ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 składała się z kolagenu (Col), chitozanu (Ch) oraz modyfikowanego lizyną kwasu hialuronowego (HA<sub>mod</sub>) o stosunku wagowym: Col:Ch:HA<sub>mod</sub> – 50:20:30. Do biopolimerowych zoli wprowadzono trzy różne stężenia cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN (A1, A2, A3). Czynnikiem sieciującym te układy była genipina o stężeniu 20 mM. Schemat otrzymywania materiałów hybrydowych przedstawia **Rysunek 47**. Materiałem kontrolnym był hydrożel bez dodatku cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN. Zestawienie wszystkich otrzymywanych materiałów przedstawia **Tabela 13**.



**Rysunek 47.** Schemat otrzymywania materiału hybrydowego z lekiem.

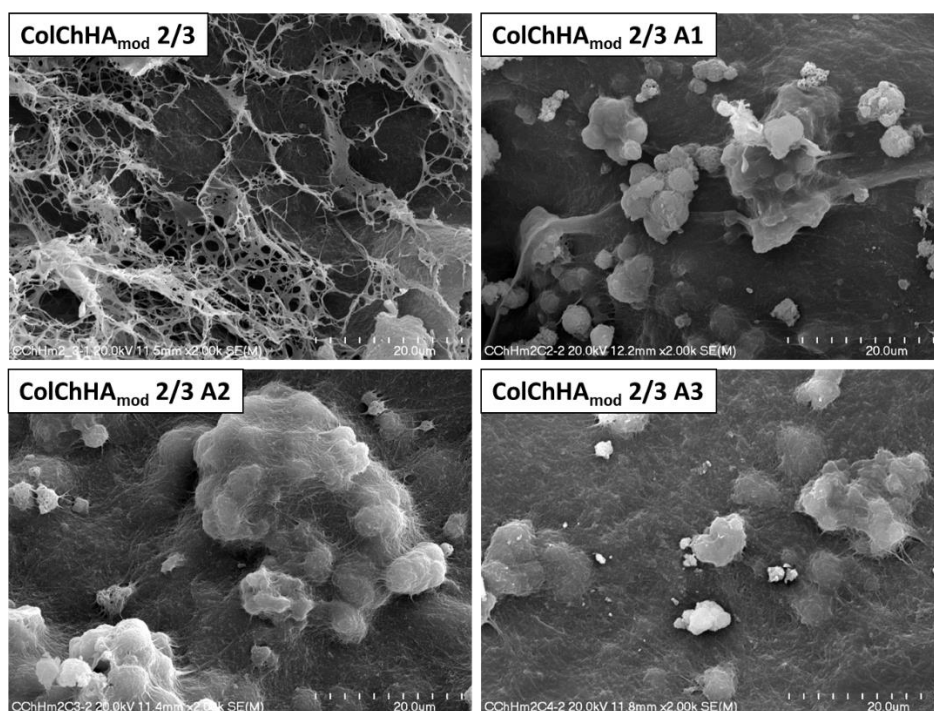
**Tabela 13.** Zestawienie wszystkich otrzymywanych materiałów.

<b>Material</b>	<b>Ilość cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN w 1 ml materiału [mg]</b>
ColChHA <sub>mod</sub> 2/3	-
ColChHA <sub>mod</sub> 2/3 A1	5,0
ColChHA <sub>mod</sub> 2/3 A2	2,5
ColChHA <sub>mod</sub> 2/3 A3	1,0

#### 10.2.4. Właściwości fizykochemiczne materiałów hybrydowych

##### Mikrostruktura

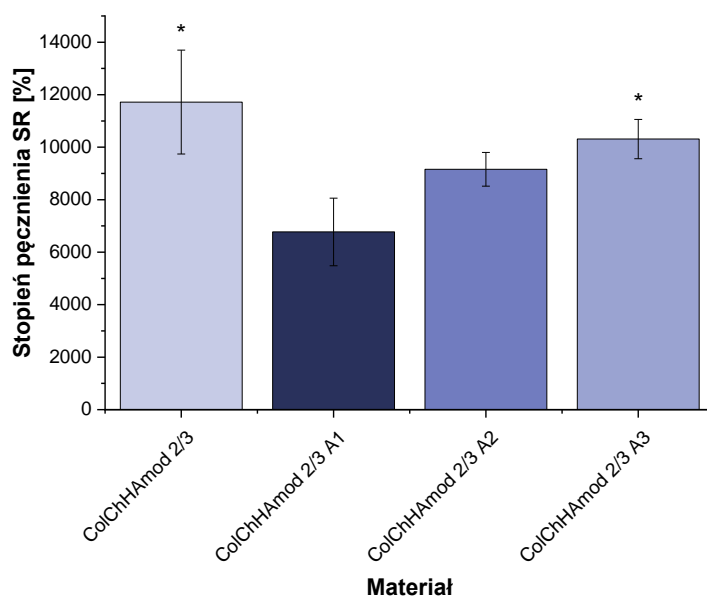
Wykorzystując technikę SEM scharakteryzowano mikrostrukturę otrzymanych materiałów (**Rysunek 48**). Hydrożel ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 posiada dobrze widoczną włóknistą strukturę, typową dla kolagenu. Analizując mikrofotografie dla materiałów hybrydowych, można zauważyć obecność cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN w każdym z otrzymanych układów niezależnie od stężenia nośnika. Cząstki występują zarówno jako pojedyncze obiekty, jak również w postaci agregatów częściowo pokrytych utworzoną zwartą siecią biopolimerową.



**Rysunek 48.** Mikrofotografie SEM otrzymywanych materiałów.

## Zdolność do pęcznienia

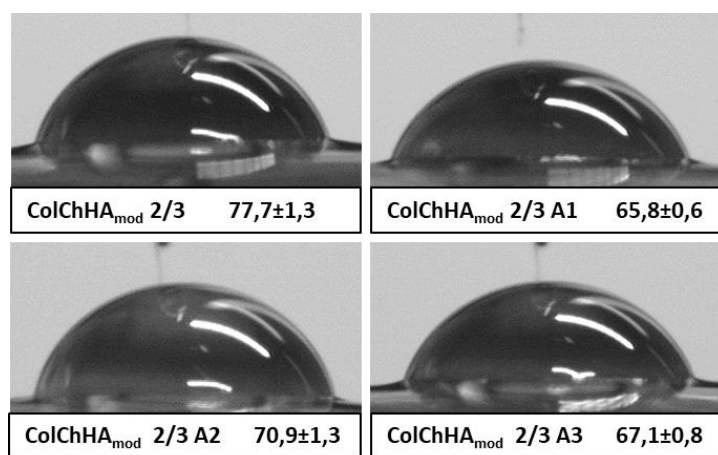
Wyznaczono stopień pęcznienia ( $SR$ ) dla otrzymanych materiałów hybrydowych, eksperyment prowadzono w warunkach fizjologicznych ( $pH = 7,4$ ; temperatura =  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Wyniki są przedstawione na **Rysunku 49**. Hydrożel ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 charakteryzował się wysokim stopniem pęcznienia, na co wpływ miał skład hydrożelu, a w szczególności zawartość HA<sub>mod</sub>, jak wykazano w punkcie 9.2.3 (str. 116). Dodatek cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN do sieci hydrożelowej zmniejszał zdolność uzyskanego materiału hybrydowego do pęcznienia, zwłaszcza w przypadku materiału z najwyższym stężeniem nośnika (ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1) stopień pęcznienia był znacznie niższy w porównaniu do hydrożelu kontrolnego. Stosunkowo niewielka ilość ALN nie powinna istotnie wpływać na pęcznienie materiału, na co wskazują dane literaturowe [269]. Głównym czynnikiem obniżającym zdolność do pęcznienia badanych materiałów powinien być układ SiO<sub>2</sub>-Ap. Jak wykazano w punkcie 8.2.4 (str. 94), obecność cząstek krzemionki wpływała na usztywnienie struktury materiału hybrydowego i tym samym zmniejszała zdolność do pęcznienia, podobny efekt może powodować dodanie do polimerowej matrycy apatytu [270]. Należy jednak zaznaczyć, że materiały z dodatkiem SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN nadal osiągały względnie duży stopień pęcznienia, co jest istotne w kontekście ich zastosowania do regeneracji tkanek.



**Rysunek 49.** Stopień pęcznienia w warunkach fizjologicznych dla otrzymanych materiałów. \* oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1 ( $p < 0,05$ ).

## Liofilowość

Zbadano liofilowość powierzchni otrzymanych materiałów, wyniki uzyskane w oparciu o pomiary kątów zwilżania zestawiono na **Rysunku 50**. Wszystkie badane materiały charakteryzowały się umiarkowaną zwilżalnością o kątach zwilżania w zakresie 66 – 78 stopni. Jednakże wprowadzenie do matrycy biopolimerowej cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN spowodowało, że powierzchnia materiałów hybrydowych stała się bardziej hydrofilowa, o czym świadczą niższe wartości kątów zwilżania w porównaniu z materiałem kontrolnym (ColChHA<sub>mod</sub> 2/3). Poprawę hydrofilowości można wyjaśnić obecnością na powierzchni materiałów hybrydowych cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN (widoczne na mikrofotografiach SEM) i hydrofilowej natury ich poszczególnych komponentów – zarówno krzemionki, apatytu, jak i eksponowanych grup aminowych pochodzących od alendronianu [271][272], co potwierdziła analiza XPS.

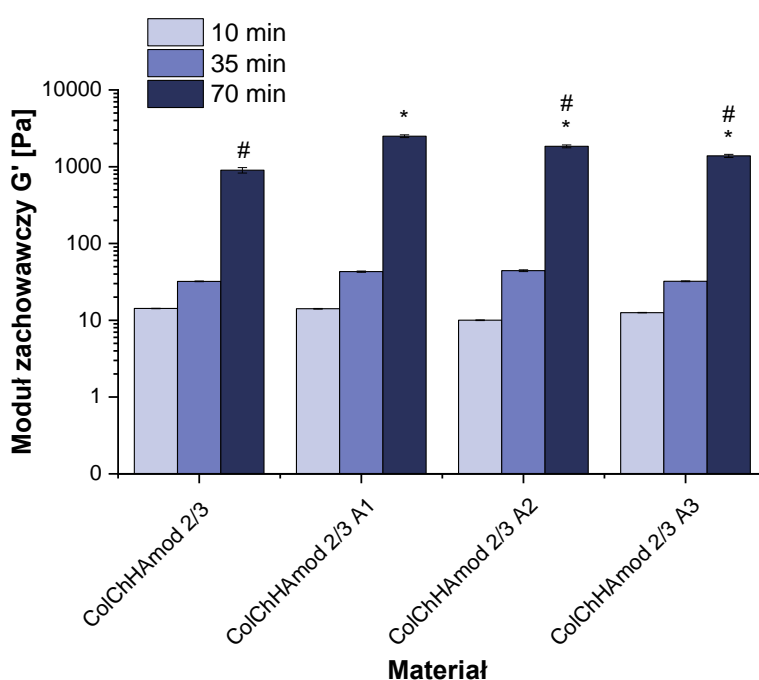


**Rysunek 50.** Wartości kąta zwilżania [°] mierzonych na powierzchni otrzymanych materiałów.

## Właściwości reologiczne

W celu potwierdzenia możliwości wykorzystania opracowanych układów jako materiałów wstrzykiwalnych przeprowadzono badania właściwości reologicznych. Otrzymane wartości modułu zachowawczego (G') zmierzone po 10, 35 i 70 minutach eksperymentu przedstawione są na **Rysunku 51**. Na początku procesu żelowania (po 10 minutach od sporządzenia mieszaniny) wartości modułu elastyczności dla wszystkich materiałów były na niskim poziomie (w zakresie 10-14 Pa), co potwierdza ich lepko-sprężysty stan i postać wstrzykiwalną. Wartości G' znacznie wzrastały po 35 minutach, osiągając wartość maksymalną w ciągu 70 minut od rozpoczęcia procesu sieciowania (tworzenie żelu). Tym samym porównanie wartości G' na początku i na końcu eksperymentu reologicznego dowodzi, że opracowane materiały mogą pełnić funkcję materiałów wstrzykiwalnych.

Ponadto otrzymane wyniki wykazały, iż wprowadzenie bioaktywnego nośnika do matrycy biopolimerowej w istotny sposób poprawia właściwości mechaniczne uzyskanych hybryd. Wykazano istotną statystycznie różnicę dla wartości  $G'$  po 70 minutach żelowania dla wszystkich materiałów hybrydowych, w porównaniu z modułem zachowawczym otrzymanym dla materiału kontrolnego po tym czasie. Zaobserwowano wzrost wartości modułu  $G'$  z wartości 900 Pa dla matrycy polimerowej do 2500 Pa dla układu z najwyższą zawartością nośnika (ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1) po ostatnim punkcie czasowym. Takiej tendencji nie zauważono w przypadku materiałów hybrydowych z dodatkiem samych cząstek krzemionki (ColChHA 4/1 C1-C3, punkt 8.2.4, str. 96). Powyższe wyniki jednoznacznie dowodzą, że materiały hybrydowe ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1-A3 przy zachowaniu wstrzykiwalności typowej dla samej matrycy polimerowej, charakteryzują się znacznie wyższymi (istotność statystyczna) wartościami modułu zachowawczego po zakończonym procesie żelowania.

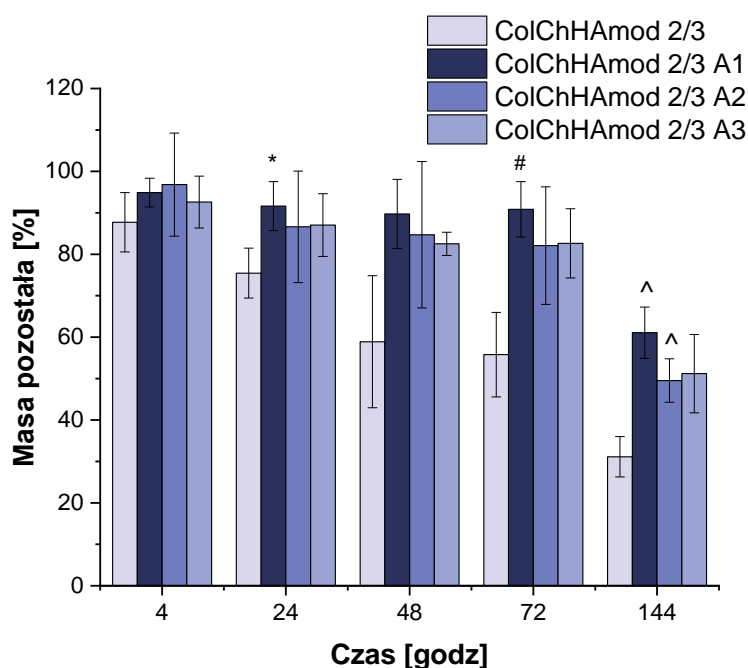


**Rysunek 51.** Wartości modułu zachowawczego  $G'$  dla materiałów, osiągnięte po 10, 35 i 70 minutach od rozpoczęcia pomiaru. \* oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 po 70 min ( $p < 0,05$ ), # oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA<sub>mos</sub> 2/3 A1 po 70 min ( $p < 0,05$ ).

### Degradacja enzymatyczna

Otrzymane materiały zostały poddane procesowi degradacji enzymatycznej, w obecności enzymu – kolagenazy. Degradację enzymatyczną badano przez 144 godziny, na **Rysunku 52** przedstawiono zmiany masy materiałów podczas inkubacji w roztworze kolagenazy.

Zaobserwowano znaczące spowolnienie procesu degradacji enzymatycznej dla wszystkich materiałów z wprowadzonym nośnikiem. Po 4 godzinach degradacji enzymatycznej odnotowano nieznaczny ubytek masy dla materiałów hybrydowych (około 3-7%) i 12 % dla hydrożelu ColChHA<sub>mod</sub> 2/3. W kolejnych punktach pomiarowych zaobserwowano istotne zmiany w masie pozostałej dla materiału kontrolnego (31% po 144 h), podczas gdy ubytek masy dla materiałów hybrydowych następował znacznie wolniej. Po 144 h degradacji dla materiałów hybrydowych zaobserwowano ubytki masy na poziomie około 44-52%. Analizując utratę masy wszystkich badanych materiałów w danym momencie trwania eksperymentu można wskazać tendencję, iż ze wzrostem zawartości cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN zmniejszała się szybkość procesu degradacji. Wyniki te pozostają w zgodności z rezultatami eksperymentu reologicznego, który potwierdził poprawę właściwości mechanicznych materiałów hybrydowych wraz ze wzrastającym stężeniem cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN obecnych w układzie.



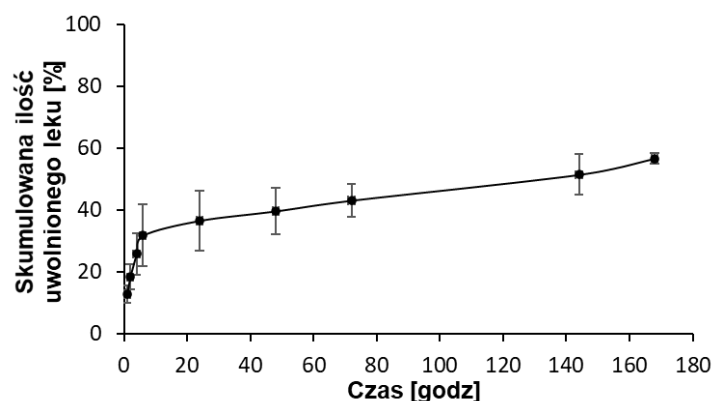
**Rysunek 52.** Zmiany masy materiałów w obecności kolagenazy. Analizę statystyczną wykonano poprzez porównanie wszystkich rodzajów materiałów w danym punkcie czasowym. \* oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 po 24 godzinach ( $p < 0,05$ ), # oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 po 72 godzinach ( $p < 0,05$ ), ^ oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 po 144 godzinach ( $p < 0,05$ ).

### 10.2.5. Uwalnianie leku z materiałów hybrydowych

W celu oceny potencjału opracowanych materiałów hybrydowych jako systemów do lokalnego dostarczania alendronianu przeprowadzono badania uwalniania tego leku z materiału ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1, zawierającego najwyższe stężenie ALN. Eksperymenty prowadzono poprzez inkubację materiałów w buforze PBS przez 168 godzin. Profil kumulatywnego uwalniania ALN do PBS jest przedstawiony na **Rysunku 53**. Po pierwszych 6 godzinach uzyskano około 31% wyrzut leku, po którym nastąpiło stopniowe uwalnianie do poziomu około 56% całkowitej ilości leku zawartego w nośniku po 168 godzinach badania. Początkowy wyrzut leku mógł być związany z tym, że pewna ilość cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN była eksponowana na powierzchni materiałów hybrydowych, jak potwierdziły badania SEM i liofilowości, co ułatwiało szybsze uwalnianie ALN. Stosunkowo zwarta struktura i wolniejsza degradacja materiałów hybrydowych mogła mieć wpływ na przedłużone uwalnianie ALN z ich wnętrza w późniejszych etapach eksperymentu. W celu określenia mechanizmu uwalniania ALN z badanych materiałów zastosowano trzy powszechnie stosowane modele kinetyki uwalniania leku - Higuchiego, Ritgera-Peppasa i Weibulla. Ich opis matematyczny oraz uzyskane z dopasowania danych eksperymentalnych wartości parametrów przedstawiono w **Tabeli 14**. Modele Higuchiego i Ritgera-Peppasa zostały zastosowane do 60% danych eksperymentalnych [273]. Lepsze dopasowanie uzyskano dla modelu Ritgera-Peppasa ze względu na wyższy współczynnik  $R^2$ . W tym modelu wartość parametru  $n$  charakteryzuje różne mechanizmy uwalniania. Dla  $n \leq 0,45$  uwalnianie odbywa się zgodnie z kinetyką dyfuzji Ficka (ang. *Fickian diffusion*), zakres  $0,45 < n < 0,89$  oznacza anomalną dyfuzję (ang. *non-Fickian diffusion*), natomiast dla  $n = 0,89$  uwalnianie zachodzi zgodnie z mechanizmem zerowego rzędu (ang. *case II transport*) [274]. W przypadku badanego systemu parametr  $n$  wyniósł 0,33, co wskazuje na uwalnianie ALN z materiałów hydrożelowych zgodnie z kinetyką dyfuzji Ficka. W kolejnym kroku wykorzystano model Weibulla do dopasowania wszystkich danych eksperymentalnych. W tym modelu wartość parametru  $b$  wskazuje na mechanizm uwalniania substancji z matrycy polimerowej, jeśli  $b < 0,75$  to dominuje dyfuzja Ficka, dla  $0,75 < b < 1$  dyfuzja jest złożona, zależna także od zdolności do pęcznienia [275]. W badanym układzie parametr  $b$  osiągnął wartość 0,30, co wskazuje na dyfuzję Ficka jako główny mechanizm uwalniania i jest to zgodne z wynikiem dopasowania według modelu Ritgera-Peppasa. Powyższe wyniki pokazały, że możliwe jest przedłużone uwalnianie leku ALN z materiału hybrydowego ColChHA<sub>mod</sub> 2/3



A1, dzięki czemu materiał ten może potencjalnie wspierać regenerację tkanki wraz z efektem terapeutycznym.



**Rysunek 53.** Profil uwalniania alendronianu (kumulatywnie) z materiału hybrydowego ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1.

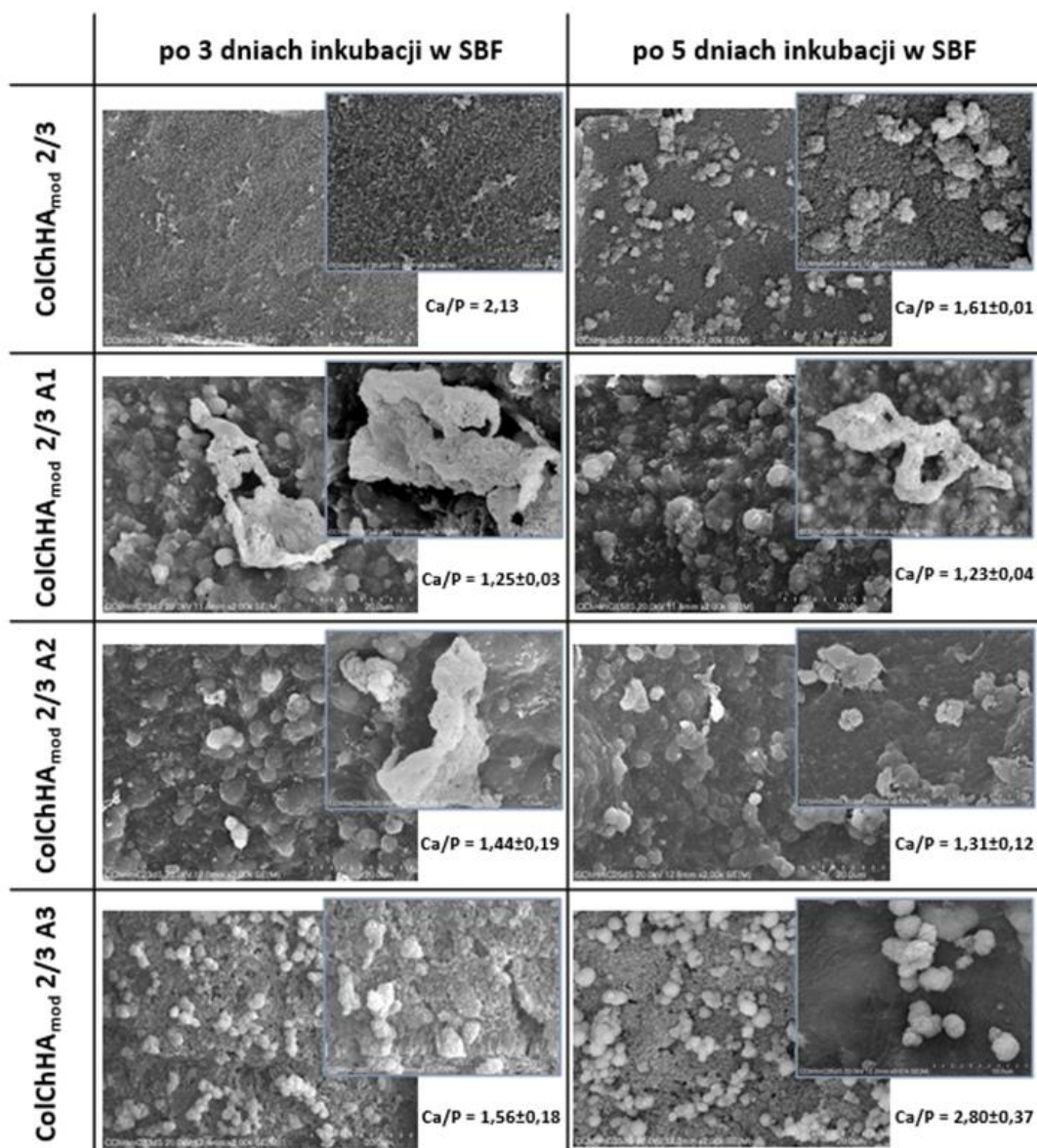
**Tabela 14.** Wartości parametrów uzyskanych z dopasowania danych eksperymentalnych uwalniania ALN z ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1 dla trzech zastosowanych modeli matematycznych: Higuchiego, Ritgera-Peppasa i Weibulla.  $Q_t$  – ilość uwolnionego leku w czasie  $t$ ,  $K_H$ ,  $K_{RP}$  – stałe szybkości uwalniania,  $n$  – wykładnik dyfuzyjny,  $a$ ,  $b$  – stałe równania Weibulla,  $R^2$  – współczynnik determinacji.

Opis matematyczny modelu	Parametry	
Higuchi	$K_H$	5,63
	$Q_t = K_H \sqrt{t}$	$R^2$ 0,7944
Ritger-Peppas	$K_{RP}$	14,54
	$n$	0,33
	$Q_t = K_{RP} t^n$	$R^2$ 0,8885
Weibull	$a$	5,89
	$b$	0,30
	$Q_t = 1 - \exp(-t^b/a)$	$R^2$ 0,9418

### 10.2.6. Biomineralizacja *in vitro*

W celu wykazania, iż otrzymane materiały hybrydowe dzięki obecności cząstek krzemionkowo-apatytowych będą sprzyjały biointegracji materiału z kością i tym samym

wspomagały proces mineralizacji kości zaburzony w procesie osteoporozy, zbadano ich właściwości bioaktywne. Przeprowadzono eksperyment biomineralizacji *in vitro*, obejmujący 5-dniową inkubację materiałów w warunkach symulowanego sztucznego osocza (SBF) w 37 °C. Następnie materiały zostały poddane badaniom przy użyciu technik SEM i EDS. Na **Rysunku 54** przedstawiono uzyskane mikrofotografie SEM i wartości stosunku wapnia do fosforu (Ca/P) wyznaczone techniką EDS dla fazy mineralnej utworzonej na powierzchni materiałów po 3 i 5 dniach inkubacji w SBF. Dokładna analiza wyników (SEM/EDS) pozwoliła stwierdzić, iż tworzenie fazy mineralnej w formie struktury kwiatowej, w której stosunek Ca/P jest charakterystyczny dla apatytu, zaobserwowano już po 3 dniach w przypadku materiałów hybrydowych z większym stężeniem nośnika (ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1 i ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A2). Warto podkreślić, iż poddane analogicznemu eksperymentowi materiały z dodatkiem samych cząstek krzemionki (ColChHA 4/1 C1 i ColChHA 4/1 C2, punkt 8.2.5, str. 99) wykazywały właściwości bioaktywne dopiero po 7 dniach. Ponadto ze względu na fakt, iż matryca hydrożelowa badanych materiałów składała się w 30% (wagowo) z modyfikowanego kwasu hialuronowego, zaobserwowano dodatkowe wsparcie biomineralizacji pochodzące od kwasu hialuronowego - tworzenie fazy mineralnej w postaci warstw na powierzchni ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 i ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A3. Wyznaczone dla tych materiałów stosunki Ca/P powyżej 2,0 (po 3 dniu dla ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 i po 5 dniu dla ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A3) wskazują na nadmiar wapnia i możliwość współistnienia CaO razem z inną fazą [276]. Ilość HA<sub>mod</sub> w matrycy miała istotne znaczenie dla biomineralizacji, ponieważ w przypadku matrycy hydrożelowej z niemodyfikowanym kwasem hialuronowym w ilości 10% wagowo (ColChHA 4/1) nie zauważono tworzenia się żadnej nowej fazy mineralnej (punkt 8.2.5, str. 99). Przeprowadzone badania biomineralizacji w SBF jasno wskazują, iż materiały hybrydowe z cząstkami SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN o stężeniu w zakresie 1-5 mg/ml charakteryzują się właściwościami bioaktywnymi, zapewniającymi znaczne przyspieszenie procesu biomineralizacji (do 3 dni), a co za tym idzie efektywniejszą biointegrację materiału z naturalną kością.



**Rysunek 54.** Mikrofotografie SEM materiałów po 3 i 5 dniach inkubacji w SBF.

### 10.2.7. Właściwości biologiczne *in vitro*

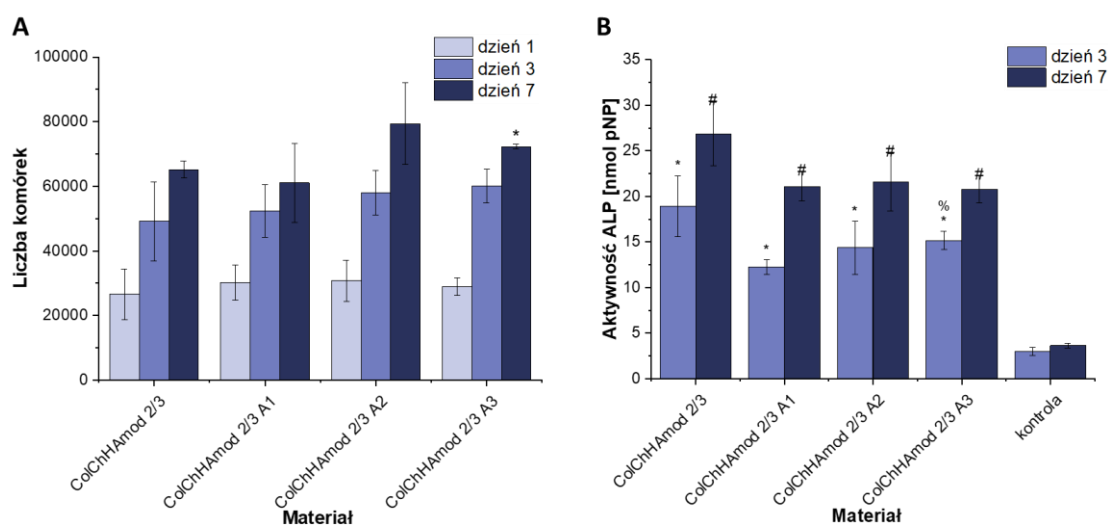
#### Żywotność komórek

Przeprowadzono badania żywotności komórek osteoblastopodobnych MG-63 wysianych na otrzymanych hydrożelach. Test z użyciem odczynnika Alamar Blue przeprowadzono po 1, 3 i 7 dniu hodowli, wyniki eksperymentów przedstawia **Rysunek 55A**. Wprowadzenie cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN w testowanych stężeniach A1, A2 i A3 do matrycy hydrożelowej nie obniżało biokompatybilności materiałów hybrydowych w porównaniu do materiału kontrolnego ColChHA<sub>mod</sub> 2/3. Wszystkie otrzymane materiały hybrydowe wspierały zdolność do proliferacji komórek MG-63. Zaobserwowano porównywalny (brak różnic istotnych

statystycznie) wzrost liczby komórek w kolejnych dniach eksperymentu, prowadzonych z użyciem materiałów hybrydowych z cząstkami SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN o stężeniach A1 i A2 względem wyników dla kontroli (ColChHA<sub>mod</sub> 2/3).

### Aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP)

Zbadano również aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) będącej markerem potwierdzającym fenotyp i mineralizację osteoblastów w 3 i 7 dniu hodowli komórek MG-63 (**Rysunek 55B**). W przypadku wszystkich analizowanych materiałów zaobserwowano wzrost aktywności po 7 dniach eksperymentu. Poziom ALP zarówno w trzecim, jak i w siódmym dniu hodowli był istotnie wyższy w porównaniu do aktywności ALP komórek na płycie hodowlanej. Analizując wpływ stężenia cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN na aktywność ALP zaobserwowano różnice istotne statystycznie tylko dla materiału ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A3 w 3 dniu eksperymentu (względem ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1, 3 dzień). W 7 dniu hodowli nie wykazano istotnych różnic w aktywności ALP pomiędzy otrzymanymi układami hybrydowymi.

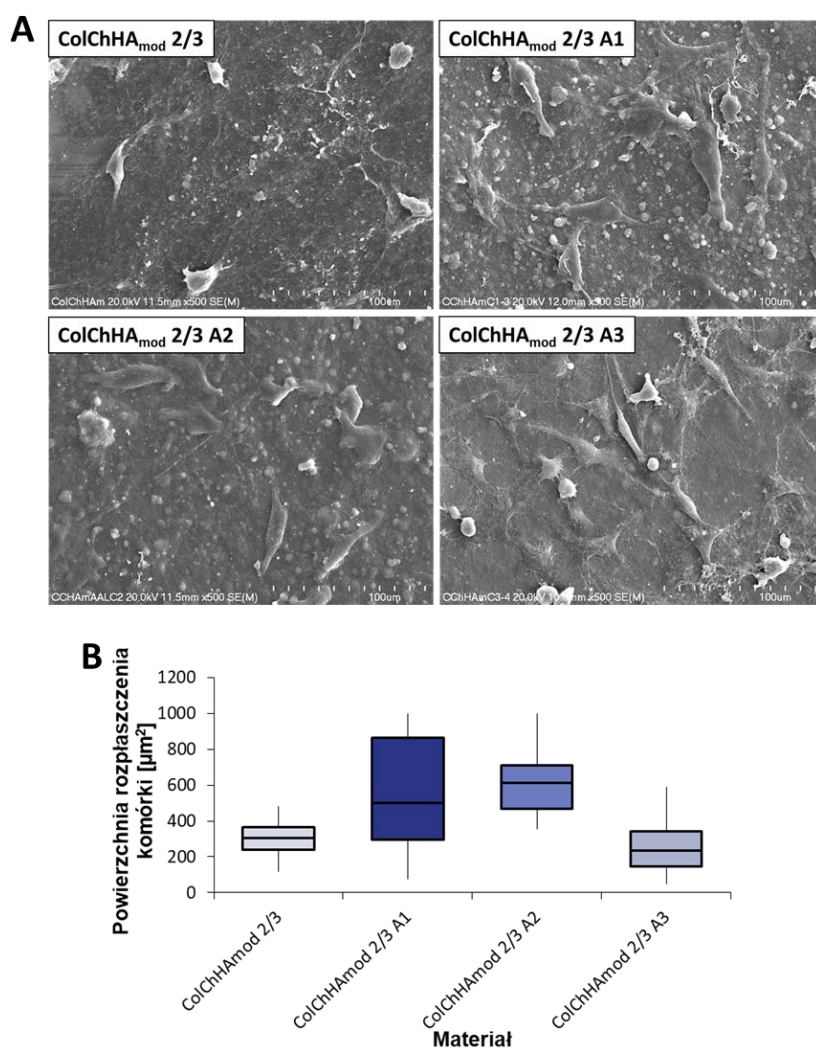


**Rysunek 55.** (A) Proliferacja komórek MG-63 po 1, 3 i 7 dniu hodowli na powierzchni badanych materiałów. \* oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 w dniu 7 ( $p < 0,05$ ). (B) Aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) komórek MG-63 po 3 i 7 dniu hodowli na powierzchni badanych materiałów. \* oznacza istotność statystyczną w porównaniu z kontrolą w dniu 3 ( $p < 0,05$ ), # oznacza istotność statystyczną w porównaniu z kontrolą w dniu 7 ( $p < 0,05$ ), % oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1 w dniu 3 ( $p < 0,05$ ).

### Adhezja i morfologia komórek

Dokonano analizy adhezji i morfologii komórek MG-63 po 3 dniach hodowli na powierzchni materiałów. Komórki utrwalono i obrazowano przy użyciu techniki SEM. Na **Rysunku 56** zestawiono mikrofotografie SEM przedstawiające morfologie utrwalonych komórek (A),

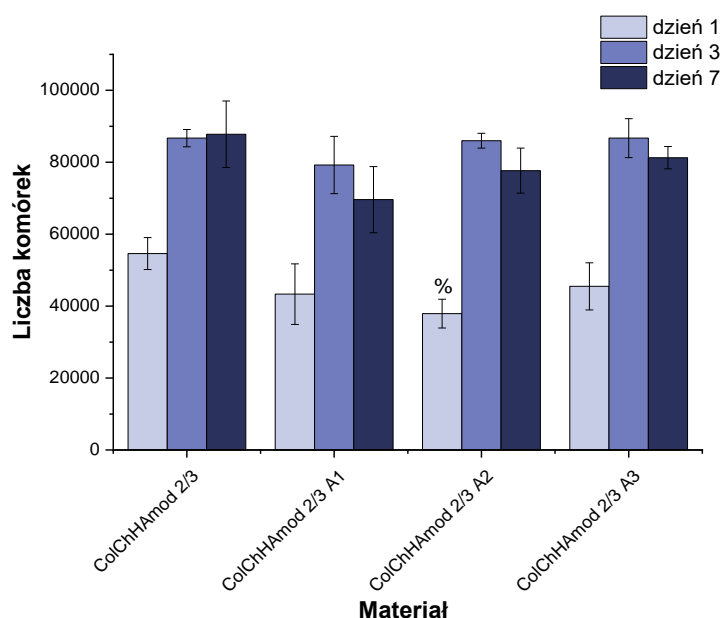
a także wykres z rozkładem powierzchni komórek MG-63 po 3 dniach hodowli, oszacowany w oparciu o uzyskane mikrofotografie SEM (**B**). Analizując otrzymane mikrofotografie można stwierdzić, iż komórki przylegają dobrze zarówno do powierzchni materiałów hybrydowych jak i hydrożelu kontrolnego (ColChHA<sub>mod</sub> 2/3). Oszacowany rozkład powierzchni komórek wskazuje, iż komórki hodowane na materiale kontrolnym ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 i na układzie hybrydowym o najniższym stężeniu cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN (ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A3) zajmowały porównywalną powierzchnię i charakteryzowały się zbliżoną morfologią. Morfologia komórek hodowanych na materiałach hybrydowych z cząstkami o stężeniach A1 i A2 była bardziej zróżnicowana. Zaobserwowano populację zajmujących większą powierzchnie rozplaszczonych komórek o wydłużonych kształtach. Dane te dowodzą zatem, iż obecność cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN wpływa korzystnie na adhezję komórek.



**Rysunek 56.** (A) Mikrofotografie SEM przedstawiające morfologie komórek MG-63 hodowanych przez 3 dni na powierzchni badanych materiałów. (B) Wykres przedstawiający średnią powierzchnię komórek po 3 dniach hodowli na materiałach.

## Właściwości terapeutyczne

W celu wykazania zdolności opracowanego materiału hybrydowego do zahamowania resorpcji kości przeprowadzono wstępne badania biologiczne *in vitro* z wykorzystaniem modelowej linii osteoklastów (komórki J774A.1). Linia ta jest linią referencyjną stosowaną w analizach *in vitro*, dotyczących metabolizmu związków z grupy bisfosfonianów. Wyniki testów na żywotność komórek (wykorzystano test Alamar Blue) przeprowadzone po 1, 3 i 7 dniach hodowli przedstawiono na **Rysunku 57**. Wstępne badania biologiczne wykazały, iż proliferacja komórek osteoklastycznych hodowanych na materiałach hybrydowych zostaje zahamowana po 7 dniach eksperymentu. Zaobserwowano, iż efekt ten rośnie wraz ze wzrostem stężenia cząstek  $\text{SiO}_2\text{-Ap-ALN}$  obecnych w matrycy hydrożelowej i jest najbardziej widoczny dla układu ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1. Tym samym wykazano, iż testowane materiały hybrydowe o zaproponowanej zawartości cząstek  $\text{SiO}_2\text{-Ap-ALN}$  (A1, A2 i A3) posiadały potencjał terapeutyczny, przejawiający się upośledzeniem aktywności modelowych komórek osteoklastycznych. Biorąc zatem pod uwagę postać opracowanej formułacji, umożliwiającej miejscowe podanie poprzez wstrzyknięcie do ubytku, możliwym będzie także zapewnienie lokalnego działania leku, minimalizując tym samym ogólnoustrojowe skutki uboczne stosowania alendronianu.



**Rysunek 57.** Proliferacja komórek osteoklastopodobnych J774A.1 po 1, 3 i 7 dniu hodowli na powierzchni badanych materiałów. % oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 w dniu 1 ( $p < 0,05$ ).

### 10.2.8. Właściwości biologiczne *in vivo*

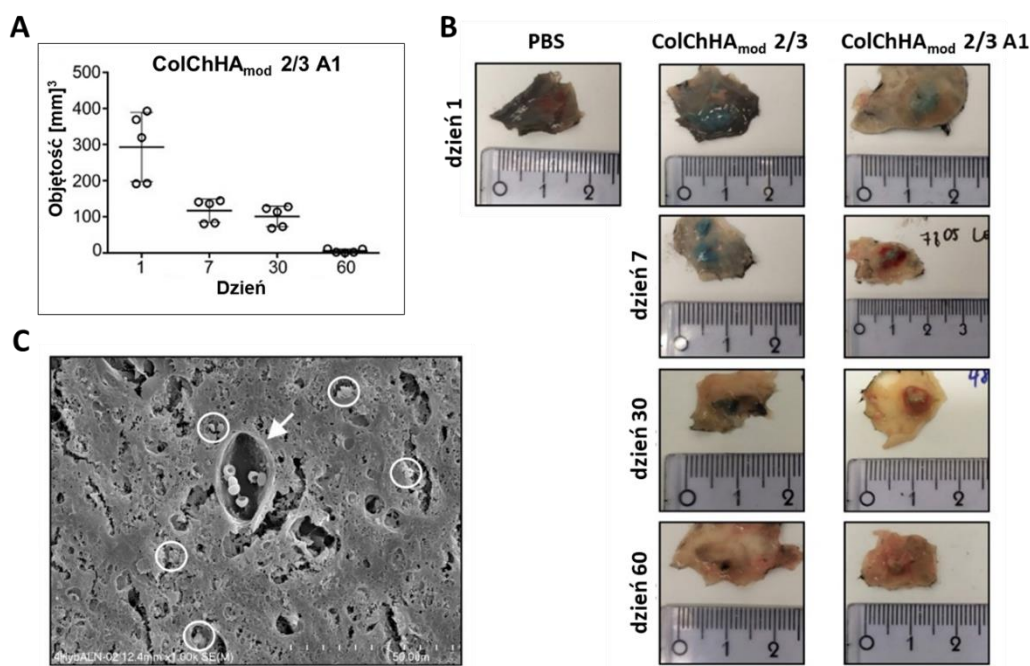
Biorąc pod uwagę możliwość zastosowania opracowanych materiałów w przyszłości, wykonano badania na modelu mysim w celu oceny biokompatybilności i zachowania materiałów w warunkach *in vivo*. Na podstawie badań właściwości fizykochemicznych i biologicznych *in vitro* do badań *in vivo* wybrano materiał hybrydowy o najwyższej zawartości ALN – ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1 oraz hydrożel bez nośnika (ColChHA<sub>mod</sub> 2/3) jako materiał kontrolny.

#### Wstrzykiwalność i degradacja

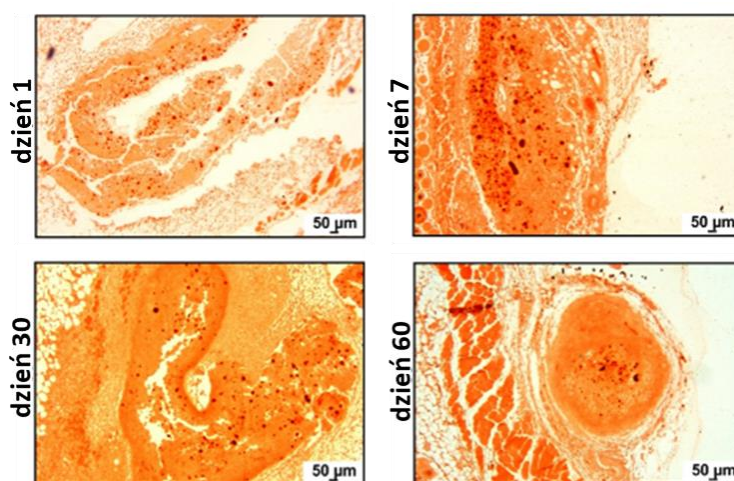
Badane materiały wstrzykiwano podskórnym myszom przy użyciu igły o średnicy 0,33 mm (29G), jako kontrolę używano buforu PBS. Materiały inkubowano przez 15 minut w 37 °C zanim podano je zwierzętom. Podczas podawania materiały nadal posiadały płynną postać, dzięki czemu ich aplikacja przebiegała bez problemów. Potwierdzono zatem, że badane materiały charakteryzowały się dobrą wstrzykiwalnością. Ponadto nie obserwowano wycieku materiałów po podaniu całej ich objętości pod skórę. Następnie zwierzęta monitorowano przez 1, 7, 30 lub 60 dni. Przy pomocy suwmiarki wyznaczano objętość wstrzykniętego materiału, jednakże obserwacja palpacyjna była możliwa tylko w przypadku materiału hybrydowego ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1, hydrożel bez nośnika tworzył bowiem pod skórą miękkie niewyczuwalne struktury. W trakcie trwania eksperymentu objętość ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1 malała znacząco w trakcie pierwszych 7 dni, następnie nie zmieniła się pomiędzy 7 a 30 dniem i ostatecznie osiągnęła objętość 60-krotnie mniejszą niż początkowa w 60 dniu eksperymentu (**Rysunek 58A**). Dodatkowo im mniejsza stawała się objętość podskórnym podanego ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1, tym bardziej twarda stawała się badana struktura materiału. Strukturę materiałów oceniono również pośmiertnie poprzez obserwacje wyizolowanych fragmentów skóry wraz ze wstrzykniętym materiałem (w 1, 7, 30 lub 60 dniu po podaniu). Podane podskórnym materiały miały ciemnoniebieskie zabarwienie, ulegały postępującej redukcji rozmiaru, ale były widoczne do końca trwania eksperymentu (60 dni) (**Rysunek 58B**). Wokół wyczuwalnego palpacyjnie ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1 tworzyła się wyraźna sieć naczyń krwionośnych. Uzyskane wyniki potwierdzają zatem zdolność badanych hydrożeli do żelowania w warunkach *in vivo*, a także ulegania procesowi biodegradacji.

Dodatkowo wyizolowane materiały zostały wybarwione czerwienią alizarynową pod kątem wizualizacji depozytów fosforanu wapnia (widoczne jako ciemnopomarańczowe kropki). W przypadku ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1 potwierdzono obecność apatytu, będącego komponentem

nośnika ALN przez cały czas trwania eksperymentu (**Rysunek 59**), co jest istotne biorąc pod uwagę długi proces regeneracji tkanki. Obecność fazy mineralnej oraz naczyń krwionośnych w materiale hybrydowym ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1 potwierdziły także badania SEM (**Rysunek 58C**).



**Rysunek 58.** (A) Zmiany objętości materiału ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1 po wstrzyknięciu pod skórę myszy (n = 5). (B) Fragmenty wyizolowanej skóry z pozostałościami wstrzykniętych materiałów po 1, 7, 30 i 60 dniach od podania pod skórę. (C) Mikrofotografia SEM materiału ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1 wyizolowanego ze skóry po 60 dniach od podania. Białymi okręgami zaznaczono apatyt zidentyfikowany za pomocą analizy EDS, białą strzałką wskazano naczynie krwionośne w materiale.

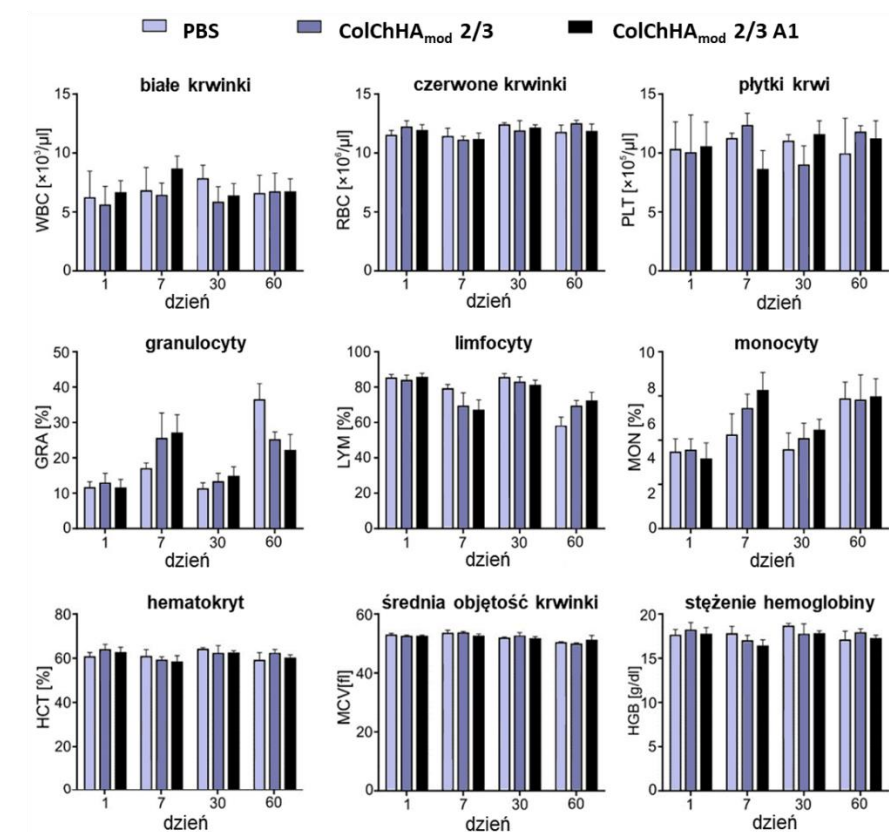


**Rysunek 59.** Zdjęcia materiału ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1 barwionego czerwienią alizarynową. Ciemnopomarańczowe kropki oznaczają apatyt w materiale.



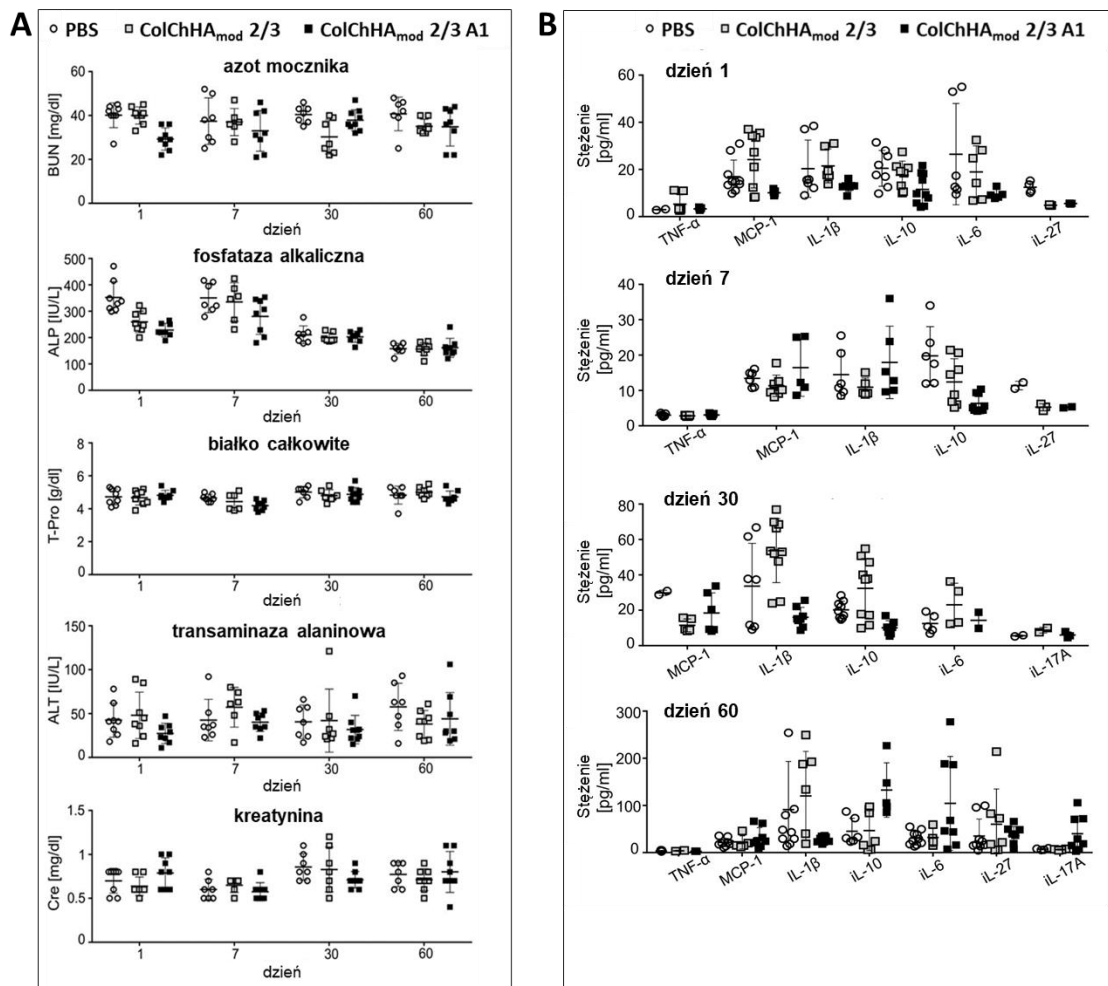
## Biozgodność

Po podaniu myszom badanych materiałów monitorowano zachowanie (np. ruchliwość) oraz masę zwierząt. Nie zaobserwowano żadnych zmian zarówno behawioralnych, jak i w masie ciała zwierząt podczas całego okresu obserwacji. W celu oceny biozgodności badanych hydrożeli przeprowadzono również analizę morfologii oraz parametrów biochemicznych krwi myszy w różnych czasach od podskórnego podania hydrożelu ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 oraz materiału hybrydowego ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1. Nie zaobserwowano zmian w morfologii krwi (m.in. pod kątem ilości krwinek białych oraz czerwonych, płytek krwi czy stężenia hemoglobiny) po podaniu materiałów w porównaniu z kontrolą – grupą myszy, którym podano roztwór PBS (**Rysunek 60**). Dodatkowo analiza parametrów biochemicznych krwi wykazała brak wpływu badanych materiałów na stężenie mocznika, fosfatazy alkalicznej, białka całkowitego, transaminazy alaninowej oraz kreatyniny (**Rysunek 61A**). Wynik ten wskazuje na brak zarówno nefro- oraz hepatotoksyczności preparatów ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 oraz ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1.



**Rysunek 60.** Analizy hematologiczne krwi myszy po podaniu materiałów – oznaczenie liczby białych i czerwonych krwinek, płytek krwi, granulocytów, limfocytów i monocytów, wartości hematokrytu, średnich objętości krwinki i stężenia hemoglobiny (n = 7). Myszom w grupie kontrolnej podano PBS.

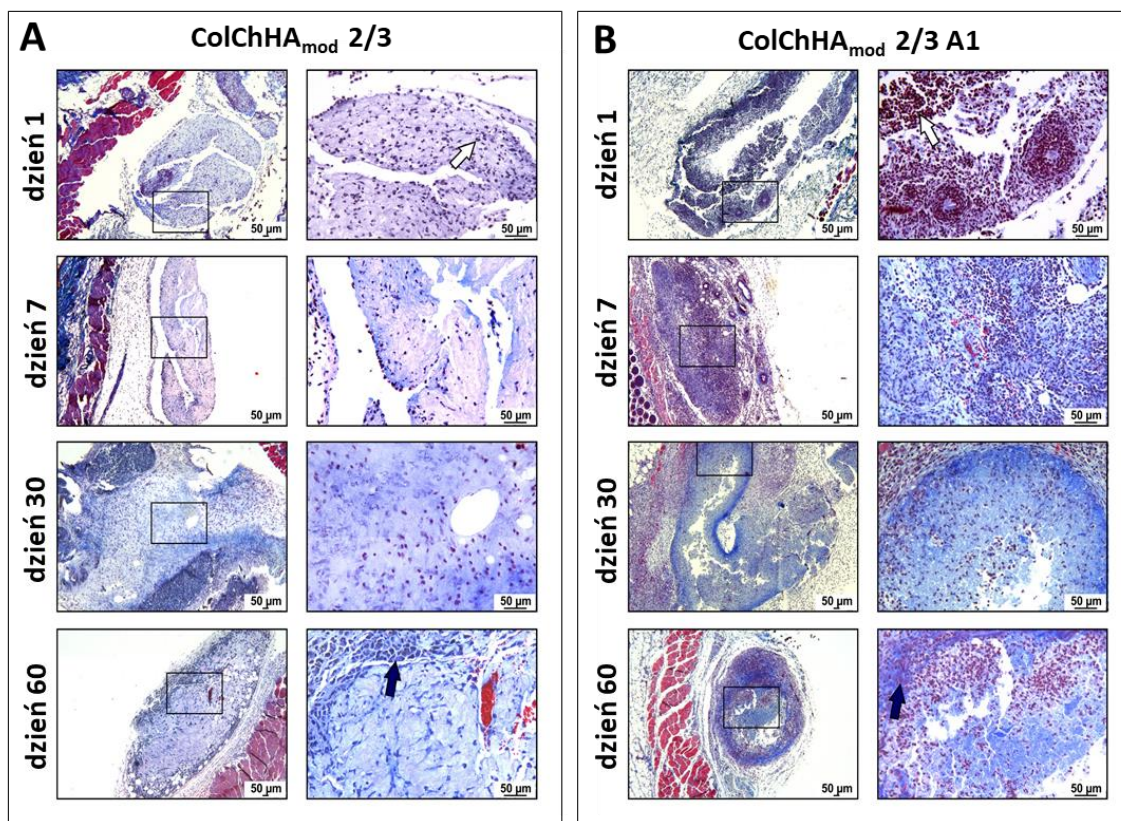
Zbadano również prozapalne właściwości wstrzykiwanych materiałów. W tym celu w uzyskanych pośmiertnie preparatach surowicy (po 1, 7, 30 lub 60 dniach od podania materiałów) oznaczono poziom cytokin, w tym cytokin prozapalnych (**Rysunek 61B**). Nie zaobserwowano żadnych zmian w poziomie cytokin w osoczu po podaniu materiałów w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki badań wykazały zatem brak ogólnoustrojowej toksyczności, która mogłaby wynikać z podania zwierzętom materiału z potencjalnie toksycznymi produktami degradacji. Dlatego też użycie materiału hydrożelowego ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 zawierającego cząstki SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN może stanowić obiecującą metodę naprawy tkanki kostnej osłabionej zmianami osteoporotycznymi bez ryzyka wystąpienia ogólnoustrojowej toksyczności.



**Rysunek 61.** (A) Analiza parametrów biochemii krwi myszy po podskórnym podaniu preparatów materiałów - stężenie azotu mocznika, fosfatazy alkalicznej, białka całkowitego, transaminazy alaninowej oraz kreatyniny (n = 7). Mysiom w grupie kontrolnej podano PBS. (B) Poziom cytokin w surowicy myszy po podaniu materiałów (n = 2-10). Mysiom w grupie kontrolnej podano PBS.

### **Analiza procesu wgajania**

Wyizolowane wraz ze skórą materiały wybarwiono oraz poddano analizie pod kątem procesu wgajania. W tym celu zastosowano barwienie trichromem Massona, które umożliwia ocenę zarówno stopnia zasiedlenia materiału przez komórki gospodarza, jak i obecności nowopowstałych naczyń krwionośnych (**Rysunek 62**). Po 24 godzinach od podania preparatów ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 i ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1 zaobserwowano napływ komórek odpornościowych, których pojawienie się było związane z miejscowym stanem zapalnym. Były one obecne w materiałach we wszystkich analizowanych punktach czasowych eksperymentów. Najwięcej komórek znajdowało się na obrzeżach wstrzykniętych materiałów, ale również niewielka ich ilość przedostała się w głębsze partie materiałów. Silniejszy stan zapalny występował dla materiału hybrydowego ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1, czego wynikiem było tworzenie się włóknistej otoczki wokół materiału, widocznej po 30 i 60 dniach od jego podania. Ponadto po 60 dniach od podania pojawiły się także pojedyncze naczynia krwionośne w wyizolowanych materiałach, co potwierdziły również badania SEM (**Rysunek 58C**). Trudno jest określić, który składnik cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN w największym stopniu przyczyniał się do wystąpienia stanu zapalnego. Jednakże w związku z tym, że nie wykazano podwyższonego stężenia cytokin prozapalnych we krwi (**Rysunek 61B**), wprowadzenie materiału ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1 może wiązać się z pojawieniem tylko miejscowego stanu zapalnego.



**Rysunek 62.** Materiały ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 (A) i ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1 (B) wybarwione trichromem Massona. Białe i ciemnoniebieskie strzałki wskazują na komórki odpornościowe – odpowiednio neutrofile i makrofagi.

### 10.3. Podsumowanie

Otrzymano i scharakteryzowano wielofunkcyjne materiały hybrydowe, mogące potencjalnie służyć jako rusztowania komórkowe w regeneracji tkanki kostnej, zapewniając jednocześnie efekt terapeutyczny w przypadku zmian osteoporotycznych. Opracowane materiały były oparte na hydrożelowej matrycy złożonej z kolagenu, chitozanu oraz modyfikowanego lizyną kwasu hialuronowego, w której rozproszono bioaktywne cząstki krzemionkowo-apatytowe, będące nośnikiem leku przeciwosteoporotycznego – alendronianu sodu (SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN). Czynnikiem sieciującym te wieloskładnikowe układy była genipina. Materiały takie mogą być wprowadzane do ubytku poprzez wstrzyknięcie, minimalizując inwazyjność zabiegu i stanowić podporę dla tkanki kostnej oraz system do kontrolowanego i miejscowego dostarczania alendronianu. Takie podejście umożliwia zwiększenie efektywności leczenia osteoporozy poprzez dostarczenie alendronianu do docelowego miejsca oraz ograniczenie efektów ubocznych, jakie może wywoływać ten lek przy standardowym podawaniu doustnym. Otrzymane materiały hybrydowe charakteryzowały się pożądanymi właściwościami fizykochemicznymi – umiarkowana hydrofilowość powierzchni, zdolność do

pęcznienia, przedłużona degradacja oraz wzmocnione właściwości mechaniczne wraz z możliwością aplikacji w formie wstrzykiwalnej. Badania biomineralizacji w warunkach SBF wykazały przyspieszony proces tworzenia się nowej fazy mineralnej zbliżonej do struktury apatyty kostnego, w szczególności na materiałach z większym stężeniem cząstek SiO<sub>2</sub>-Ap-ALN (ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1 i ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A2) – właściwości bioaktywne zaobserwowano już po 3 dniach inkubacji w SBF. Wyniki badań biologicznych *in vitro* zademonstrowały, że materiały hybrydowe wspierały aktywność komórek osteoblastopodobnych (MG-63) i jednocześnie posiadały potencjał terapeutyczny przejawiający się upośledzeniem aktywności komórek osteoklastopodobnych (J774A.1). Opracowane materiały zostały także przetestowane w badaniach *in vivo*, przeprowadzonych na modelu mysim przez okres 60 dni. Analizy morfologii i parametrów biochemicznych krwi oraz profile cytokin pokazały, że wstrzyknięte podskórnie materiały były biozgodne i nie wywoływały ogólnoustrojowej toksyczności, obserwowano jedynie miejscowy stan zapalny. Ponadto materiały wspierały proces angiogenezy – w strukturze wyizolowanych materiałów widoczne były naczynia krwionośne. Potwierdzono także, że materiały mogą być z powodzeniem podawane w formie wstrzykiwalnej i ulegają stopniowej biodegradacji.

Przeprowadzone badania zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* wykazały, że zastosowanie wielofunkcyjnych, hybrydowych materiałów wstrzykiwalnych otrzymanych poprzez wprowadzenie do hydrożelowej matrycy biopolimerowej cząstek krzemionkowo-apatytowych, będących nośnikiem alendronianu może być atrakcyjną metodą leczenia ubytków spowodowanych osteoporozą, dzięki łatwości ich implantacji, bezpieczeństwie i pożądanej wielokierunkowej aktywności biologicznej.

### III. Nanokompozyty oparte na hydrożelowej matrycy i nanocząstkach magnetycznych

#### Wprowadzenie

Część III badań prezentowanych w ramach niniejszej rozprawy dotyczy otrzymania i scharakteryzowania właściwości fizykochemicznych i biologicznych nanokompozytów opartych na hydrożelowej matrycy i nanocząstkach magnetycznych, określanych jako hydrożele magnetyczne, potencjalnie przydatnych do zastosowań w inżynierii tkankowej kości z możliwością wspomagania regeneracji zewnętrznym polem magnetycznym.

Otrzymywane hydrożele magnetyczne składały się z biopolimerowej matrycy otrzymanej z chitozanu i kolagenu, do której wprowadzono fazę magnetyczną w postaci opłaszczonych kationową pochodną chitozanu (CCh) superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza (SPION). **Polimerowe otoczki umożliwiły kowalencyjne związanie nanocząstek magnetycznych z hydrożelową matrycą podczas procesu sieciowania genipiną, reagującą z pierwszorzędowymi grupami aminowymi obecnymi zarówno w strukturze kolagenu, chitozanu, jak i w otoczkach SPION (kationowa pochodna chitozanu).** Zapropionowana prosta metoda otrzymywania hydrożeli magnetycznych zapobiega separacji faz oraz agregacji nanocząstek magnetycznych w strukturze hydrożelu i prowadzi do uzyskania stabilnego strukturalnie materiału. Procedura ta stanowi atrakcyjną alternatywę dla powszechnie stosowanych metod otrzymywania hydrożeli magnetycznych polegających na mieszaniu składników lub strącaniu cząstek magnetycznych *in situ*, prowadzących do otrzymywania hydrożeli magnetycznych, w których występują wyłącznie oddziaływania fizyczne między jego komponentami, czy metody szczepienia grupami funkcyjnymi, w której wytworzenie wiązań kowalencyjnych może być procesem skomplikowanym i obciążonym wysokimi kosztami. Wyniki badań dotyczące hydrożeli magnetycznych otrzymywanych zaproponowaną metodą zostały opublikowane w pracy: ***Structurally stable hybrid magnetic materials based on natural polymers - preparation and characterization*** (S. Fiejdasz, A. Gilarska, W. Horak, A. Radziszewska, T. Strączek, M. Szuwarzyński, M. Nowakowska, C. Kapusta, *Journal of Materials Research and Technology* **15** (2021) 3149-3160) [277]. Wyniki badań nad właściwościami magnetycznymi opracowanych hydrożeli zostały opublikowane w pracy: ***Magnetic Properties of Collagen–Chitosan Hybrid Materials with Immobilized Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs)*** (S. Fiejdasz, A. Gilarska, T. Strączek, M. Nowakowska, C. Kapusta, *Materials* **14** (2021) 7652) [278].

## **11. Otrzymywanie i scharakteryzowanie hydrożeli magnetycznych**

### **11.1. Materiały i metody**

#### **11.1.1. Materiały**

Oprócz odczynników wymienionych w rozdziale 7 (punkt 7.1.1, str. 71) użyto również: kolagen typu I, z ogona szczurzego (3,5 mg/ml w 0,02N kwasie octowym, Corning), sześciowodny chlorek żelaza (III)  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich), czterowodny chlorek żelaza (II)  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich), woda amoniakalna (25%, Sigma-Aldrich), kationowa pochodna chitozanu otrzymywana zgodnie z procedurą opracowaną wcześniej [279].

#### **11.1.2. Otrzymywanie superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza powlekanych kationową pochodną chitozanu (SPION-CCh)**

Nanocząstki SPION-CCh otrzymywano metodą współstrącania według wcześniej opisanej procedury [280]. W tym celu rozpuszczono 0,1622 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  oraz 0,0596 g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (stosunek molowy  $\text{Fe(III)}:\text{Fe(II)} = 2:1$ ) w 50 ml wodnego roztworu kationowej pochodnej chitozanu (3 g/l). Następnie mieszaninę przedmuchiwano argonem i poddawano sonikacji (1 impuls co 5 sekund) przez 10 minut w łaźni wodnej termostatowanej (20 °C). Po tym czasie do mieszaniny dodawano 5 ml 5M wody amoniakalnej i kontynuowano sonikację przez 30 minut. W końcowym etapie otrzymaną zawiesinę wytrąconych nanocząstek SPION-CCh poddawano oczyszczaniu, wykorzystując kolumnę magnetyczną.

#### **11.1.3. Scharakteryzowanie nanocząstek SPION-CCh**

Wykonano pomiary średnic hydrodynamicznych ( $d_z$ ), wykorzystując metodę dynamicznego rozpraszania światła DLS oraz pomiary potencjałów zeta ( $\zeta$ ) nanocząstek SPION-CCh, stosując technikę laserowego pomiaru prędkości metodą Dopplera LDV. Do pomiarów średnic hydrodynamicznych i potencjałów zeta użyto aparat Nano ZS (Malvern Instruments). Dla określenia rozmiaru i kształtu nanocząstek SPION-CCh wykonano obrazowanie skaningowo-transmisyjnym mikroskopem elektronowym STEM (FEI Nova NanoSEM 450). W tym celu kroplę zawiesiny z nanocząstkami umieszczano na siateczce miedzianej pokrytej błoną węglową i pozostawiono do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Badania struktury metodą dyfrakcji rentgenowskiej (XRD) przeprowadzono przy użyciu dyfraktometru Siemens D5000 z zastosowaniem lampy miedzianej i monochromatora grafitowego. Analizę

właściwości magnetycznych wysuszonych nanocząstek przeprowadzono za pomocą magnetometru z wibrującą próbką, VSM – ang. *Vibrating Sample Magnetometer* (Quantum Design, San Diego, CA, USA), wyposażonego w magnes nadprzewodzący generujący pole magnetyczne o indukcji do 9 Tesli. Pomiary pętli histerezy wykonywano w wybranych temperaturach z zakresu 4 – 300 K. Krzywe zależności magnetyzacji od temperatury, ZFC/FC (ang. *Zero Field Cooled* – chłodzenie próbki w zerowym polu, ang. *Field Cooled* – chłodzenie próbki w polu) otrzymywano dla natężenia pola magnetycznego o wartości 100 Oe. Do uzyskania dodatkowej informacji o właściwościach magnetycznych i strukturze nanocząstek wykorzystano spektroskopię Mössbauera w trybie transmisyjnym. Użyto źródła  $^{57}\text{Co}$  w matrycy Rh o aktywności 50 mCi.

#### **11.1.4. Otrzymywanie hydrożeli magnetycznych**

Hydrożele na bazie chitozanu (Ch) oraz kolagenu i chitozanu (ColCh) przygotowano przez zmieszanie odpowiednich ilości roztworu chitozanu (roztwór 2% (w/v) w 1% kwasie octowym), roztworu kolagenu i 200  $\mu\text{l}$  roztworu genipiny (roztwór 0,1% (w/v) w 96% etanolu) do otrzymania 1 ml zolu. Stosunki objętościowe biopolimerów Col:Ch w próbkach mieszanych wynosiły 25:75 oraz 50:50 (odpowiednio ColCh 25:75 i ColCh 50:50). Stosunki wagowe Col:Ch w przypadku tych hydrożeli wyniosły odpowiednio 5:95 i 15:85. Po poddaniu biopolimerowych zoli energicznemu wytrząsaniu, inkubowano je w 37 °C do zakończenia procesu żelowania.

W celu otrzymania hydrożeli magnetycznych do biopolimerowych zoli Ch oraz ColCh wprowadzano 150  $\mu\text{l}$  wodnej zawiesiny SPION-CCh (zawartość żelaza 235  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Po poddaniu zoli energicznemu wytrząsaniu, inkubowano je w 37 °C do zakończenia procesu żelowania, otrzymując w ten sposób hydrożele magnetyczne Ch S1, ColCh 25:75 S1 i ColCh 50:50 S1.

#### **11.1.5. Badania właściwości fizykochemicznych hydrożeli**

##### **Analiza NMR**

W ramach pomiarów NMR na aparaturze RCA (Magritek Rock Core Analyzer) wykonano pomiary protonowych czasów relaksacji  $T_1$  i  $T_2$ , stosując sekwencję Inversion Recovery (IR) oraz sekwencję Carr-Purcell-Meiboom-Gill'a (CPMG). Dla sekwencji IR rejestrowano 30 punktów w przedziale 0,05 ms – 7,5 s, a dla CPMG rejestrowano 50 000 ech z czasem echa  $TE = 200 \mu\text{s}$ . Dla obu eksperymentów czas repetycji wynosił 7,5 s. Dane po odjęciu tła



zostały przetworzone przy użyciu odwrotnej transformaty Laplace'a (ILT) z algorytmem Lawsona i Hansona w oprogramowaniu Prospa. W ramach pomiarów na systemie NMR MoUSE (Mobile Universal Surface Explorer) wykonano pomiary współczynnika dyfuzji przy polu magnetycznym 0,5 T i gradiencie pola magnetycznego 24 T/m. Dla warstw badanych próbek o grubości 200  $\mu\text{m}$  zastosowano sekwencję SSE, opartą na echu stymulowanym, dla którego ustalono  $\tau$  w zakresie 0,02 – 0,2 ms, a przedział czasowy  $\Delta = 10$  ms. Pomiary NMR wykonywano dla próbek hydrożeli w dniu przygotowania oraz po 3, 7 i 14 dniach od przygotowania.

### **Badania stabilności i procesu żelowania**

Stabilność i proces żelowania hydrożeli były monitorowane przy pomocy urządzenia Turbiscan Classic 2 (Formulation). W tym celu próbki w stanie zolu (4 ml) przenoszono do szklanej cylindrycznej kuwety, a następnie prowadzono pomiar natężenia światła przechodzącego poprzez skanowanie próbki wzdłuż jej wysokości co 2 godziny przez okres 7 dni w temperaturze pokojowej. Otrzymane dane analizowano przy pomocy oprogramowania TurbiSoft.

### **Badania mikrostruktury**

Mikrostrukturę materiałów zobrazowano przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego SEM (FEI Nova NanoSEM 450). W tym celu otrzymane materiały zliofilizowano oraz napyłono złotem bezpośrednio przed obrazowaniem. Aby zobrazować rozmieszczenie nanocząstek SPION-CCh w matrycy hydrożelowej wykorzystano skaningowo-transmisyjną mikroskopię elektronową (STEM, FEI Nova NanoSEM 450). W tym celu kroplę zolu biopolimerowego z nanocząstkami umieszczano na siateczce miedzianej pokrywanej węglem i inkubowano w 37 °C do utworzenia żelu.

### **Analiza AFM/MFM**

Topografię powierzchni otrzymanych materiałów badano za pomocą mikroskopu sił atomowych Dimension Icon XR (Bruker, Santa Barbara, CA), wykorzystując technikę mikroskopii sił magnetycznych (MFM) w trybie podnoszenia (wysokość podnoszenia 150 nm) w powietrzu. Do wszystkich pomiarów zastosowano dźwignie pokryte warstwą Co/Cr o nominalnej stałej sprężystości 2 N/m z sondą o promieniu 30 nm. Przed badaniem dźwignie użyte do pomiarów zostały namagnesowane małym magnesem neodymowym.

### **Badania właściwości magnetycznych**

Badania właściwości magnetycznych otrzymanych hydrożeli magnetycznych przeprowadzono analogicznie, jak dla samych nanocząstek SPION-CCh, co zostało opisane w punkcie 11.1.3. Przed pomiarami próbki hydrożeli magnetycznych poddano liofilizacji.

### **Badania zdolności do pęcznienia i degradacji**

Pęcznienie hydrożeli było badane poprzez inkubację w buforze PBS w 37 °C z delikatnym wytrząsaniem. Po 24 godzinach inkubacji odciągano PBS z materiałów, przepłukiwano dwukrotnie wodą dejonizowaną, każdorazowo inkubując w 37 °C przez 30 minut. Po odciągnięciu wody ważono materiały ( $M_s$ ) i poddano procesowi liofilizacji. Zliofilizowane materiały ponownie zważono ( $M_d$ ). Stopień pęcznienia materiału ( $SR$ ) wyznaczano, stosując wzór (5) (str. 85). Zmianę masy  $\Delta M$  obliczono poprzez zastosowanie wzoru:

$$(8) \quad \Delta M = M_s - M_d$$

Zdolność do dalszego poboru wody i degradacja hydrożeli były badane poprzez inkubację w PBS w 37 °C przez 30 dni. W tym celu otrzymane materiały zważono i przyjęto uzyskaną wartość jako 100% całkowitej masy hydrożeli ( $M_0$ ). Następnie przeniesiono materiały do płytki 24-dołkowej, zalano buforem PBS (1 ml/dołek), zabezpieczono płytkę i inkubowano w temperaturze 37 °C z delikatnym wytrząsaniem. W wyznaczonych dniach sprawdzano ubytek masy materiałów, każdorazowo ważąc je ( $M_t$ ), a następnie zalewając świeżym PBS. Zmiany masy w trakcie eksperymentu wyrażono jako % masy pozostałej, obliczany według wzoru (4) w punkcie 7.1.3 (str. 73).

### **Badanie liofilowości**

W celu określenia liofilowości materiałów wykonywano pomiary kąta zwilżania przy użyciu urządzenia SurfTens Universal instrument (OEG GmbH, Frankfurt, Germany) zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 8.1.5 (str. 85).

### **Badanie właściwości reologicznych**

Przeprowadzono badania właściwości reologicznych na reometrze rotacyjnym MCR 301 (Anton Paar), wyposażonego w dodatkową komorę P-PTD 200 umożliwiającą stabilizację temperaturową próbek i zapobieganie ich wysychania. Badania wykonano z wykorzystaniem geometrii pomiarowej typu płytka-płytko o średnicy 20 mm, przy szczeliny pomiarowej  $h = 1,3$  mm w temperaturze 37 °C. Każdą próbkę (0,5 ml) nakładano na płytkę reometru po usieciowaniu w formie żelu i rozpoczynano pomiar. W celu określenia modułu zachowawczego  $G'$ , badane próbki poddano wymuszeniu oscylacyjnemu o następujących

parametrach: odkształcenie  $\gamma = 5\%$  z częstotliwością  $f = 1$  Hz. Wykonano po trzy powtórzenia dla każdego rodzaju próbki, każdy kolejny pomiar wykonywano na nowej próbce.

#### **11.1.6. Badania właściwości biologicznych *in vitro***

Do badań biologicznych *in vitro* wykorzystano linię komórek osteoblastopodobnych MG-63. Prowadzenie hodowli komórkowej oraz przygotowanie materiałów do badań biologicznych realizowano zgodnie z procedurami opisanymi w punkcie 8.1.7 (str. 87). Komórki wysiewano na materiałach w ilości  $2 \cdot 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup>.

##### **Badanie żywotności komórek – test Alamar Blue**

Test żywotności komórek wysianych na materiałach prowadzono z użyciem odczynnika Alamar Blue po 1 oraz 3 dniu hodowli komórkowej, zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 8.1.7 (str. 88). Pomiar absorpcji przeprowadzono w czytniku mikroplatek TECAN Infinite M200 przy długościach fali 560 nm i 600 nm. Wartości absorpcji przeliczano na ilość komórek, korzystając z krzywej kalibracyjnej otrzymanej z pomiarów absorpcji dla znanych ilości komórek MG-63.

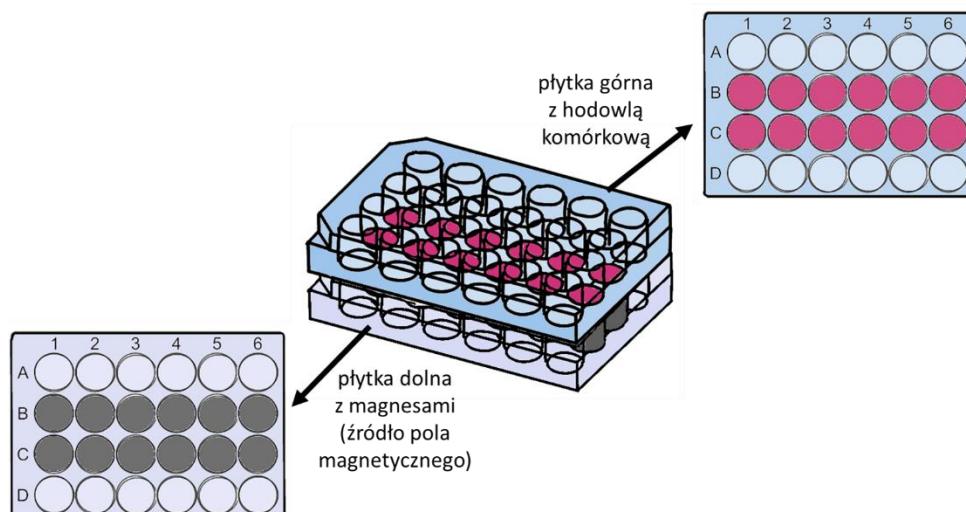
##### **Badanie adhezji i morfologii komórek**

Powierzchnia materiałów z wysianymi komórkami linii MG-63 była obrazowana skaningowym mikroskopem elektronowym SEM (FEI Nova NanoSEM 450). W tym celu po 3 dniach prowadzenia hodowli komórkowej, materiały przepłukano buforem PBS i wykonano procedurę utrwalania i odwadniania zgodnie z opisem zamieszczonym w punkcie 7.1.4 (str. 73). Bezpośrednio przed obrazowaniem SEM próbki były napyłane złotem.

##### **Badania żywotności komórek w polu magnetycznym**

Przeprowadzono badania żywotności komórek wysianych na materiałach, poddanych działaniu zewnętrznego statycznego pola magnetycznego (SMF). W tym celu zaprojektowano odpowiedni układ eksperymentalny (**Rysunek 63**). Wykonano płytkę magnetyczną, stanowiącą źródło SMF poprzez umieszczenie walcowych magnesów neodymowych (o średnicy 14 mm) w dołkach dwóch środkowych rzędów 24-dołkowej płytki hodowlanej (12 dołków). Wykorzystano magnesy o dwóch różnych wysokościach: 2 oraz 10 mm, tworząc dwie płytki o różnym natężeniu pola magnetycznego. Tak przygotowane płytki magnetyczne poddano sterylizacji promieniowaniem UV, a następnie nakładano na nie płytki z materiałami oraz wysianymi komórkami (materiały z komórkami znajdowały się tylko w dołkach dwóch środkowych rzędów płytki, analogicznie do płytki magnetycznej) i prowadzono hodowlę.

Płytki generowały pole magnetyczne o średnim natężeniu odpowiednio 500 oraz 2000 Oe - wartości te zmierzono miernikiem pola magnetycznego na wysokości powierzchni hydrożeli w płytkach (w odległości około 1 cm od powierzchni magnesów). Test żywotności komórek pod wpływem pola magnetycznego wykonywano z użyciem odczynnika Alamar Blue w analogiczny sposób jak dla hodowli bez pola. Test przeprowadzono po 1, 3 i 7 dniu hodowli.

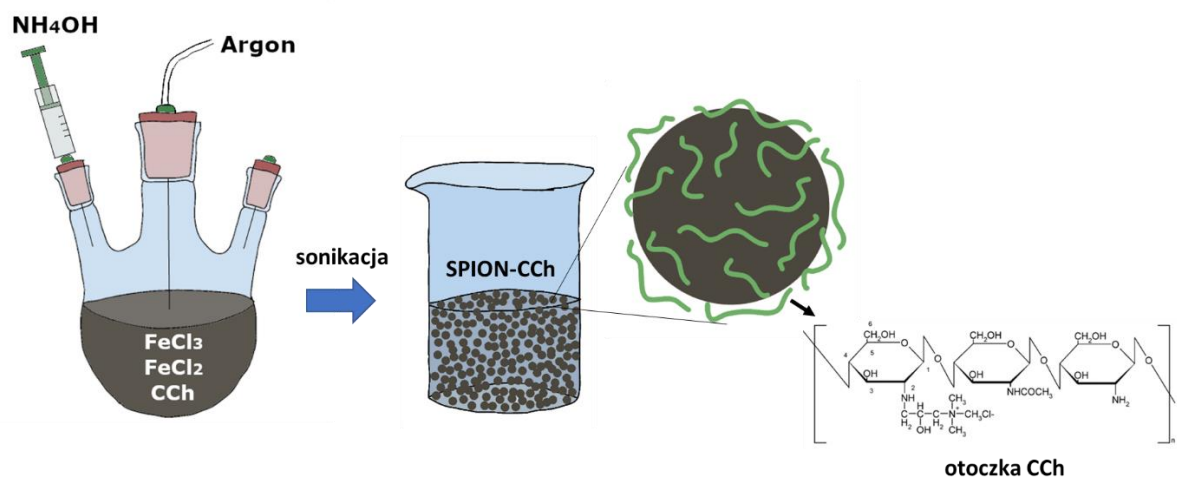


**Rysunek 63.** Schemat przedstawiający układ eksperymentalny do prowadzenia badań dotyczących wpływu pola magnetycznego na hodowlę komórek.

## 11.2. Wyniki i dyskusja

### 11.2.1. Właściwości fizykochemiczne nanocząstek SPION-CCh

Otrzymane metodą współstrącania superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza powlekanie kationową pochodną chitozanu – SPION-CCh (**Rysunek 64**) zostały scharakteryzowane pod kątem rozmiaru, kształtu, stabilności, struktury krystalicznej i właściwości magnetycznych.



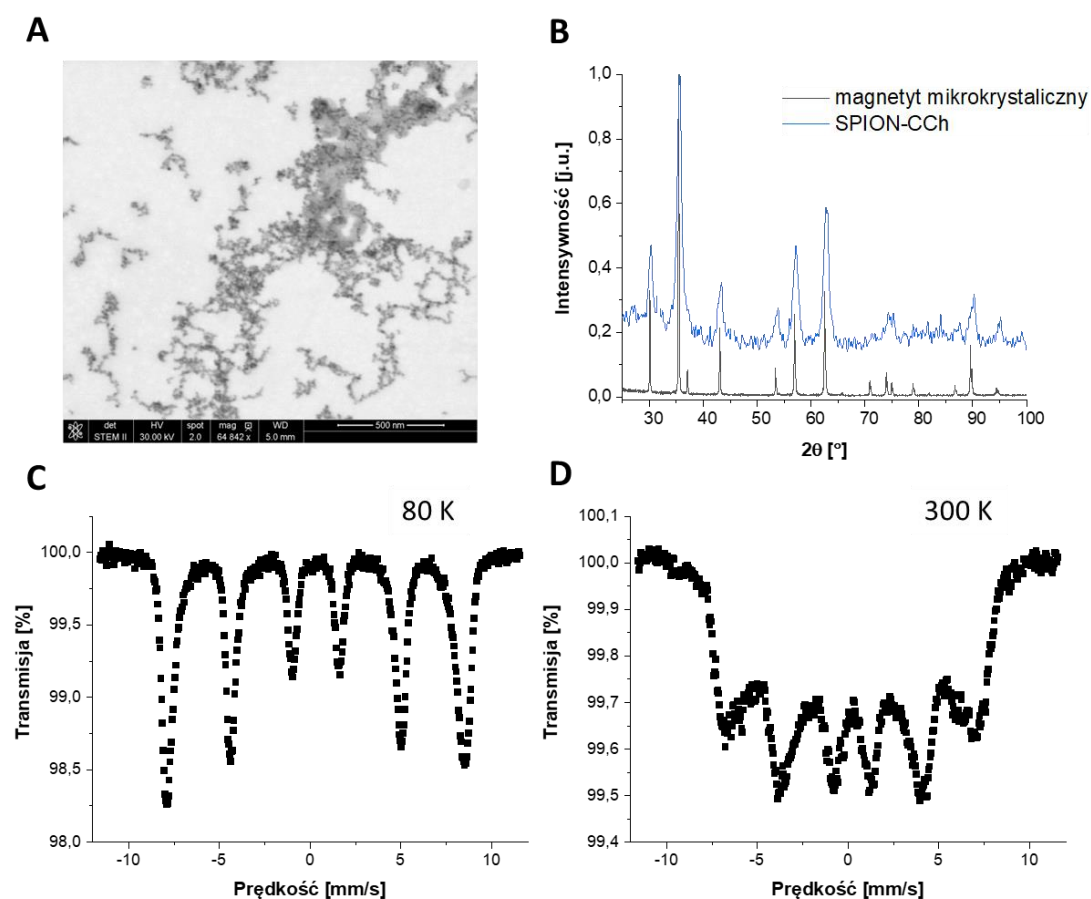
**Rysunek 64.** Schemat otrzymywania SPION-CCh metodą współstrącania.

Pomiary średnicy hydrodynamicznej w badaniach DLS i potencjału zeta wykonano w dniu syntezy oraz po 8 tygodniach od dnia syntezy (**Tabela 15**). Zmierzona średnica hydrodynamiczna nanocząstek w dniu syntezy wyniosła średnio 140 nm, co wskazuje na występowanie niewielkich aglomeratów. Dodatnia wartość potencjału zeta (pH zawiesiny = 6,9) potwierdziła efektywne pokrycie nanocząstek kationową pochodną chitozanu, a dodatkowo wskazała na ich stabilność w wodzie (wartość powyżej 30 mV). Wartości średnicy hydrodynamicznej oraz potencjału zeta zmierzone po 8 tygodniach od dnia syntezy nie różniły się znacząco od tych mierzonych w dniu syntezy, potwierdzając stabilność dyspersji wodnej SPION-CCh w tym okresie. Badania z wykorzystaniem mikroskopii STEM wykazały, że magnetyczne rdzenie SPION-CCh charakteryzowały się średnicą około 15 nm i miały tendencję do układania się w nieregularne łańcuchy (**Rysunek 65A**). Wyniki analizy XRD pokazały, że badane nanocząstki miały strukturę krystaliczną odwróconego spinelu, jaką wykazuje magnetyt (**Rysunek 65B**). Widoczne na dyfraktogramie linie dla SPION-CCh są zgodne z tymi dla mikrokrystalicznego magnetytu, można jednak zauważyć pewne ich przesunięcie w kierunku większych kątów. Takie przesunięcie jest typowe dla utlenionej formy magnetytu – maghemitu [281]. Dodatkowo, poszerzenie linii na dyfraktogramie SPION-CCh wskazuje na nanokrystaliczny charakter badanego materiału. Właściwości struktury analizowano także poprzez spektroskopię Mössbauera, widma Mössbauera uzyskane w temperaturach 80 K oraz 300 K przedstawia odpowiednio **Rysunek 65C i 65D**. Obserwowane sześć linii widmowych (sekszet) na widmie w 80 K jest charakterystyczne dla maghemitu (widmo magnetytu zawiera dwa sekszety). Ponadto, linie sekszety pokazują znaczne poszerzenie w stronę centrum widma (najsilniejsze dla linii zewnętrznych)

w temperaturze 300 K, co świadczy o relaksacyjnym charakterze i jest typowe dla materiałów superparamagnetycznych [282]. Wyniki badań właściwości magnetycznych nanocząstek SPION-CCh z pomiarów magnetometrem VSM zostały zestawione razem z wynikami dla hydrożeli magnetycznych w punkcie 11.2.3.

**Tabela 15.** Wartości średnicy hydrodynamicznej ( $d_z$ ) i potencjału zeta ( $\zeta$ ) dla nanocząstek SPION-CCh.

material	$d_z$ [nm]	$\zeta$ [mV]
SPION-CCh w dniu syntezy	$140 \pm 35$	$36 \pm 1$
SPION-CCh po 8 tygodniach	$136 \pm 48$	$35 \pm 1$



**Rysunek 65.** Mikrofotografia STEM nanocząstek SPION-CCh (A), dyfraktogram XRD magnetytu oraz nanocząstek SPION-CCh (B), widna Mössbauera w 80 K oraz 300 K dla SPION-CCh (C, D).

### 11.2.2. Otrzymywanie hydrożeli magnetycznych

Otrzymywano materiały hydrożelowe oparte na chitozanie (Ch) oraz kolagenie i chitozanie (ColCh) o dwóch różnych stosunkach objętościowych tych polimerów, sieciowane genipiną o stężeniu 0,1% (roztwór w 96% etanolu). Skład biopolimerów oraz stężenie genipiny były optymalizowane pod kątem otrzymania materiału, który mógłby być aplikowany do ubytku w usieciowanej formie, zdolnej do dopasowania się do kształtu ubytku bez utraty swojej integralności (**Rysunek 66**).

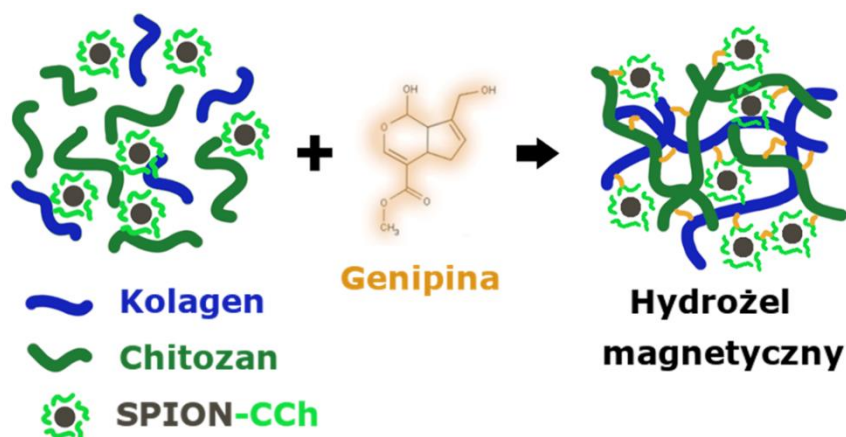


**Rysunek 66.** Hydrożel ColCh z możliwością dopasowania się do kształtu ubytku.

W celu otrzymania hydrożeli magnetycznych opracowane wcześniej matryce hydrożelowe zostały wzbogacone dodatkiem nanocząstek SPION-CCh – każdy rodzaj matrycy z tym samym stężeniem nanocząstek (S1). Zestawienie wszystkich syntezowanych hydrożeli przedstawia **Tabela 16**. Otoczki nanocząstek magnetycznych w postaci kationowej pochodnej chitozanu (CCh) umożliwiły wbudowanie się nanocząstek w strukturę sieci hydrożelowej podczas procesu sieciowania genipiną. Pomędzy wszystkimi komponentami hydrożeli magnetycznych (Col, Ch oraz SPION-CCh) mogły utworzyć się silne wiązania kowalencyjne, zapobiegając agregacji nanocząstek w strukturze hydrożeli. Schemat otrzymywania hydrożeli magnetycznych jest przedstawiony na **Rysunku 67**.

**Tabela 16.** Zestawienie otrzymywanych hydrożeli.

Material	Stosunek objętościowy Col:Ch	Stężenie genipiny
Ch		
Ch S1	0:100	
ColCh 25:75		
ColCh 25:75 S1	25:75	0,1%
ColCh 50:50		
ColCh 50:50 S1	50:50	



Rysunek 67. Schemat otrzymywania hydrożeli magnetycznych.

### 11.2.3. Właściwości fizykochemiczne hydrożeli

#### Analiza NMR

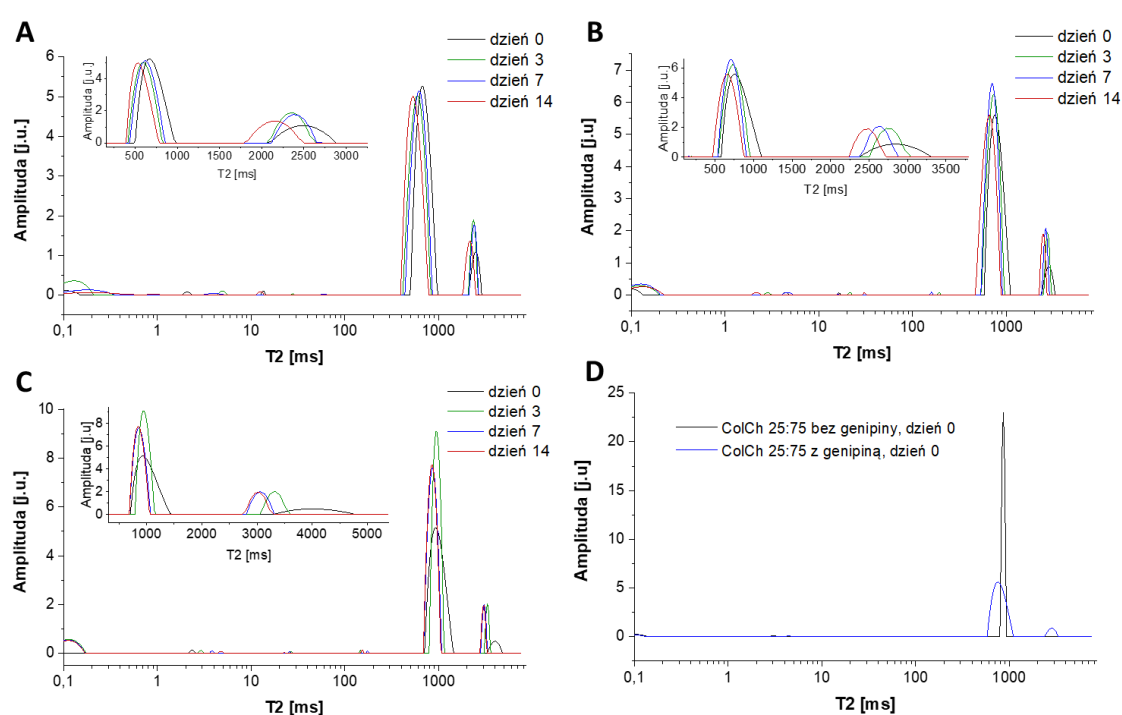
Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) jest metodą, za pomocą której można charakteryzować zarówno strukturę sieci polimerowej (rozdział 9), jak i molekularne procesy relaksacyjne. Analiza takich właściwości jak stopień uwodnienia czy przepuszczalność hydrożeli jest istotna z punktu widzenia zastosowań biomedycznych, czynniki te mogą mieć wpływ na integralność hydrożelu czy dyfuzję różnych składników wewnątrz struktury [48]. Technika NMR została tutaj wykorzystana do wyznaczenia protonowych czasów relaksacji  $T_1$  i  $T_2$  oraz współczynników dyfuzji  $D$  dla opracowanych hydrożeli Ch, ColCh 25:75 i ColCh 50:50 (bez dodatku SPION-CCh). Pomiary wykonywano dla próbek w stanie zolu oraz w stanie żelu - zaraz po zmieszaniu biopolimerów i genipiny (dzień 0) oraz po 3, 7 i 14 dniach od przygotowania.

#### *Stany związania wody w strukturze hydrożeli*

Protonowy czas relaksacji poprzecznej  $T_2$  jest ważnym wskaźnikiem ruchliwości wody w hydrożelach. Może ona występować w nich w różnych stanach – silnie lub słabo związana z siecią polimerową oraz w stanie niezwiązanym. Im silniejsze oddziaływanie cząsteczek wody z polimerową siecią, tym krótsze czasy relaksacji  $T_2$  [283]. Rozkłady czasów relaksacji  $T_2$  dla badanych hydrożeli w dniu przygotowania (dzień 0) oraz po 3, 7 i 14 dniach od przygotowania są przedstawione na **Rysunku 68 (A, B, C)**. Dla wszystkich hydrożeli obserwowano wielomodalny rozkład czasów relaksacji  $T_2$  z dwoma głównymi składowymi – dominującą o maksimach w zakresie 533 – 945 ms i słabszą w zakresie 2175 – 4007 ms. Zidentyfikowano również słabe składowe pojawiające się w zakresach 0,1 – 5 i 10 – 200 ms,



w zależności od próbki. Zmierzono również czasy  $T_2$  w dniu przygotowania dla mieszaniny biopolimerów ColCh 25:75 bez dodatku genipiny w porównaniu do analogicznej próbki zawierającej ten czynnik sieciujący (**Rysunek 68D**). Rozkład czasów  $T_2$  dla próbki niezawierającej genipiny zawierał jedną dominującą wąską składową i mniejsze sygnały w zakresie 0,1 - 5 ms. Składowe przy najkrótszych czasach relaksacji (0,1 - 10 ms) można przypisać do wody silnie związanej z siecią polimerową, natomiast dominujące udziały dla dłuższych czasów  $T_2$  mogą odpowiadać słabo związanej i wolnej wodzie.



**Rysunek 68.** Rozkłady czasów relaksacji  $T_2$  dla hydrożeli Ch (A), ColCh 25:75 (B) i ColCh 50:50 (C) uzyskane w dniu 0, 3, 7 oraz 14 od przygotowania próbek oraz rozkłady czasów relaksacji  $T_2$  dla próbki ColCh 25:75 z genipiną oraz bez zmierzone w dniu przygotowania (D).

### *Struktura żelu/tworzenie sieci*

Porównując rozkłady  $T_2$  dla próbki ColCh 25:75 bez i z dodatkiem genipiny (**Rysunek 68D**) obserwowano dodatkową składową dla dłuższego czasu  $T_2$  oraz poszerzoną składową dominującą przesuniętą w stronę krótszych  $T_2$  w przypadku próbki z dodatkiem genipiny, co może wskazywać na postępowanie zmian strukturalnych w trakcie procesu żelowania. Podobny charakter rozkładu  $T_2$  został zachowany dla wszystkich badanych próbek sieciowanych genipiną, jednakże wartości  $T_2$  dla maksimów rozkładu różniły się między

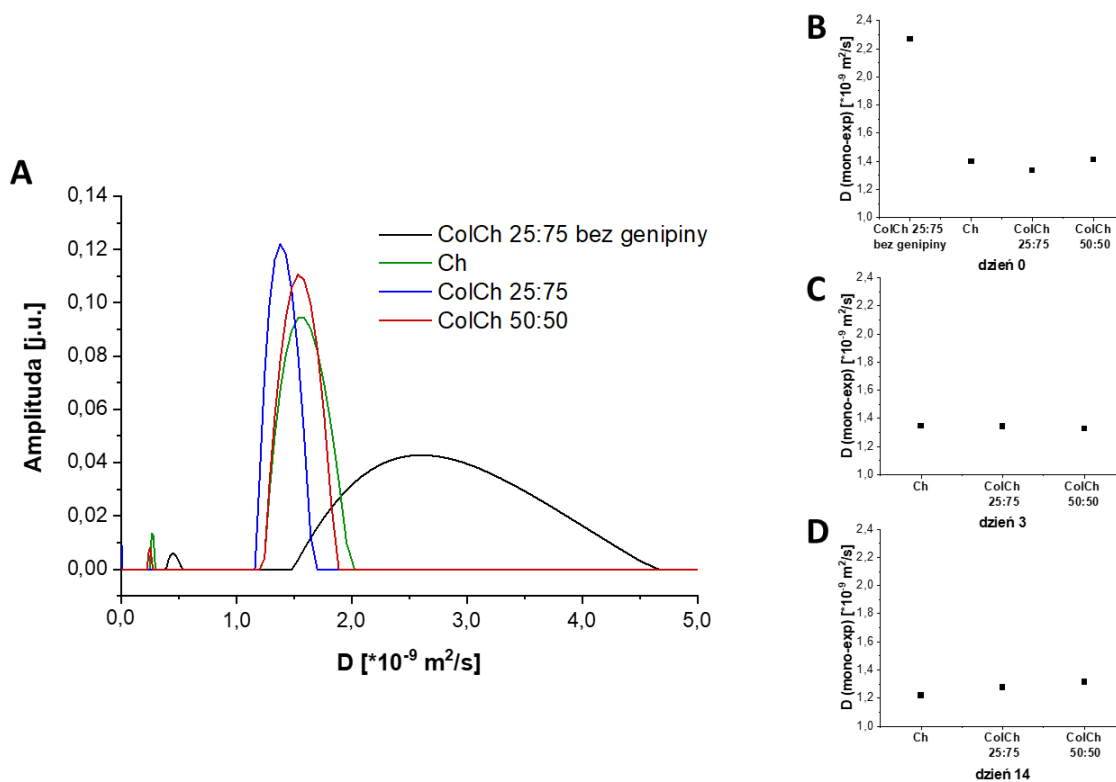
poszczególnymi próbkami. W każdym punkcie czasowym pomiarów (dzień 0, 3, 7 i 14) próbka Ch charakteryzowała się najkrótszymi czasami  $T_2$ . Skrócenie czasu relaksacji może wynikać z silniejszego uwięzienia cząsteczek wody w polimerowej sieci, wskazując na wyższą gęstość usieciowania oraz tworzenie się sztywniejszej sieci dla hydrożelu opartego na samym chitozanie [284]. Dłuższe czasy  $T_2$  otrzymano dla próbek kolejno ColCh 25:75 i ColCh 50:50, co może świadczyć o mniej zwartej strukturze i zwiększeniu odległości między protonami cząsteczek wody ze wzrostem zawartości kolagenu w hydrożelach.

### ***Rozkład wielkości porów***

Rozkład czasów  $T_2$  może dostarczyć ogólnych informacji na temat rozkładu wielkości porów w badanym materiale, mniejsze rozmiary porów odpowiadają krótszym czasom relaksacji  $T_2$  [285]. Analiza rozkładów  $T_2$  (**Rysunek 68**) wykazała, że dla wszystkich badanych hydrożeli główne frakcje porów mieściły się w większych zakresach rozmiarów (przypisane największym udziałom w rozkładzie) - ze wzrostem zawartości kolagenu w strukturze rozmiary porów były większe. Jednak określenie dokładnych rozmiarów porów wykracza poza zakres tych badań.

### ***Współczynniki dyfuzji***

Kolejnym badanym parametrem był współczynnik dyfuzji wody, który umożliwia monitorowanie ruchu translacyjnego cząsteczek wody w materiałach hydrożelowych i uzyskanie informacji na temat dynamiki molekularnej [286]. Na **Rysunku 69** przedstawiono wartości współczynników dyfuzji wody ( $D$ ) dla wszystkich badanych próbek hydrożeli bezpośrednio po przygotowaniu, a także dla próbki niezawierającej genipiny. Badanie wykazało, że współczynnik dyfuzji dla mieszaniny nieusieciowanych biopolimerów był około 2 razy wyższy w porównaniu do próbek sieciowanych genipiną, co oznacza ułatwiony ruch translacyjny cząsteczek wody w nieusieciowanej próbce. W próbkach sieciowanych genipiną dyfuzja była ograniczona ze względu na tworzenie się struktury hydrożelu na poziomie molekularnym. Po 3 i 14 dniach wartości  $D$  były niższe niż zmierzone w materiale bezpośrednio po przygotowaniu i są na porównywalnym poziomie (**Rysunek 69 [B, C, D]**), co wskazuje na efektywne zakończenie procesu tworzenia struktury hydrożelowej po kilku dniach.



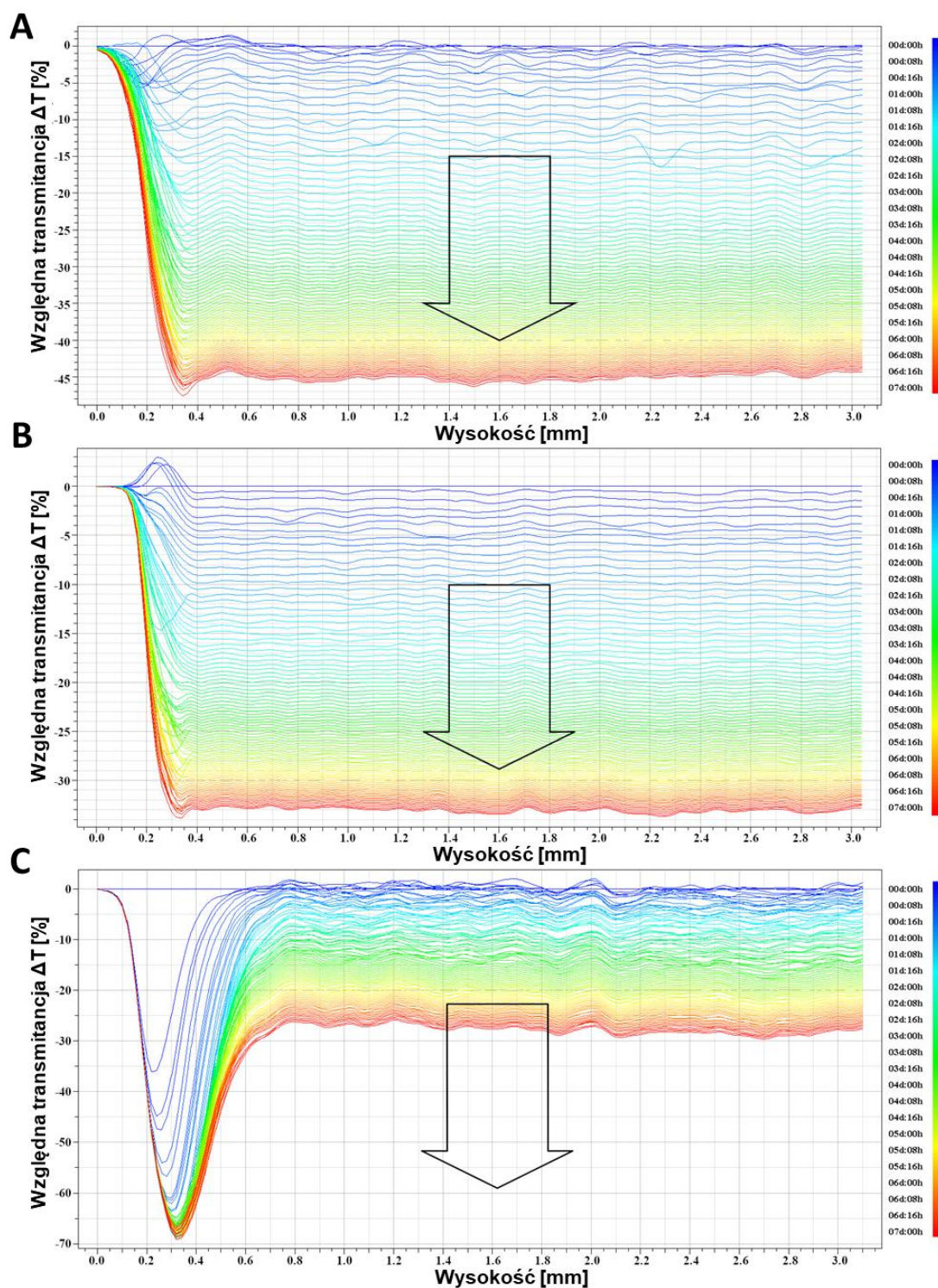
**Rysunek 69.** Rozkłady współczynników dyfuzji wody  $D$  dla wszystkich otrzymywanych hydrożeli oraz próbki ColCh 25:75 bez genipiny zmierzone w dniu przygotowania próbek (**A**) oraz wartości  $D$  dla badanych hydrożeli w dniu przygotowania (**B**), w 3 dniu (**C**) oraz w 14 dniu (**D**) od przygotowania.

Podsumowując analizę NMR, dodatek genipiny inicjował proces tworzenia się sieci hydrożelowej z powstaniem dwóch głównych rozkładów wielkości porów, jak wykazały rozkłady czasów relaksacji  $T_2$ . Zmiany rozkładów czasów  $T_2$  oraz współczynników dyfuzji  $D$  obserwowane dla wszystkich badanych materiałów w kolejnych punktach czasowych były związane z procesem żelowania i związaną z tym gęstością usieciowania, zależną od składu hydrożeli.

### Stabilność hydrożeli

Proces żelowania i stabilność hydrożeli bez komponentu magnetycznego oraz zawierających nanocząstki SPION-CCh monitorowano poprzez pomiary natężenia światła przechodzącego przez próbki wzdłuż ich wysokości co 2 godziny przez okres 7 dni, wykorzystując urządzenie Turbiscan. Pomiary rozpoczynano dla próbek po zmieszaniu w stanie zolu. Zmiany transmitancji w czasie w zależności od wysokości próbki (3 mm od dna kuwety) dla układu ColCh 25:75 bez i z komponentami magnetycznymi przedstawia **Rysunek 70**. Kolorowa skala reprezentuje punkty czasowe, w których odbywały się pomiary, kierunek strzałek pokazuje postęp eksperymentu na skali czasu od dnia 0 do dnia 7.  $\Delta T$  reprezentuje różnicę

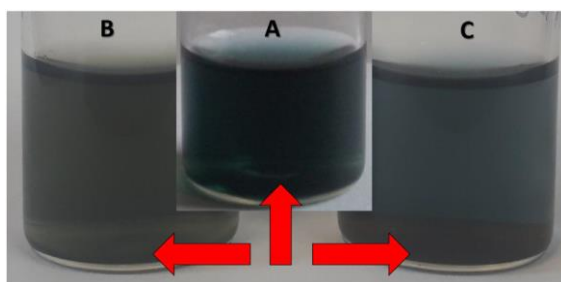
transmitancji w danym punkcie czasowym względem transmitancji zmierzonej w pierwszym pomiarze. W przypadku hydrożelu ColCh 25:75 oraz hydrożelu magnetycznego, zawierającego nanocząstki SPION-CCh (ColCh 25:75 S1) obserwowano podobną tendencję – równomierny spadek transmitancji wzdłuż całej wysokości próbki (**Rysunek 70A i 70B**), dla próbek Ch S1 i ColCh 50:50 S1 otrzymano analogiczne wyniki). Spadek transmitancji wynikał z postępującego procesu sieciowania, podczas którego zachodziła zmiana koloru próbek z lekko żółtego na ciemnoniebieski [287]. Równomierny rozkład  $\Delta T$  w czasie wzdłuż całej wysokości hydrożelu magnetycznego ColCh 25:75 S1 (analogicznie jak dla hydrożelu bez nanocząstek) potwierdził jednorodność i stabilność materiału bez zjawisk agregacji czy sedymentacji nanocząstek na dnie próbki. Dla porównania przygotowano próbkę ColCh 25:75 z dodatkiem sedymentujących agregatów niestabilizowanych nanocząstek magnetycznych, a wyniki zmian transmitancji w czasie dla tej próbki przedstawia **Rysunek 70C**. Sedymentacja agregatów w próbce została zarejestrowana poprzez wyraźnie większy spadek transmitancji przy dnie kuwety pomiarowej obserwowany przez cały okres prowadzenia eksperymentu, podczas gdy  $\Delta T$  wzdłuż pozostałej wysokości próbki była na poziomie porównywalnym do jednorodnych próbek ColCh 25:75 oraz ColCh 25:75 S1.



**Rysunek 70.** Zmiany transmitancji w czasie (7 dni) względem wysokości próbki ColCh 25:75 (A), ColCh 25:75 S1 (B) oraz ColCh 25:75 zawierającej sedimentujące agregaty nanocząstek (C).

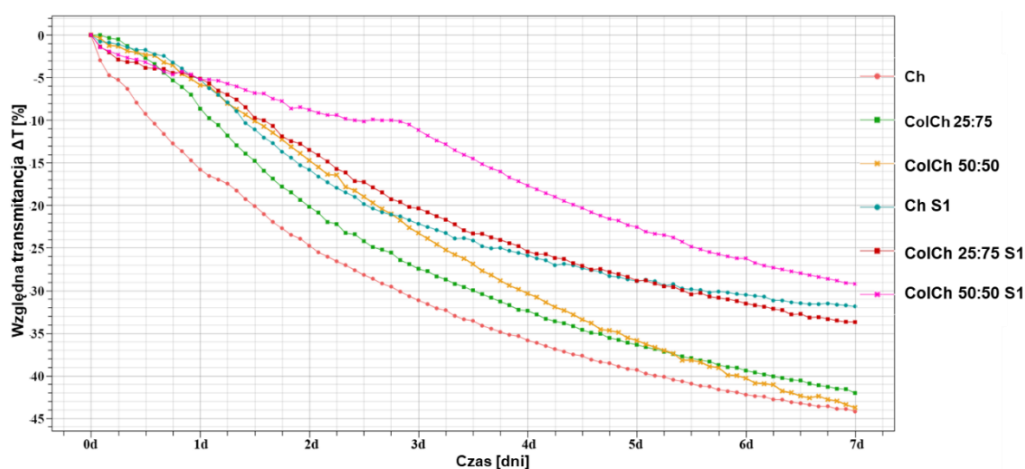
Zdjęcia usieciowanych hydrożeli ColCh 25:75, ColCh 25:75 S1 (S1 oznacza dodatek SPION-CCh) oraz ColCh 25:75 z opadającymi agregatami nanocząstek przedstawia **Rysunek 71**. Kolor próbek ColCh 25:75 oraz ColCh 25:75 S1 (A, B) był jednorodny w całej objętości

próbek (zmieniona barwa ColCh 25:75 S1 w stosunku do ColCh 25:75 wynikała z obecności nanocząstek SPION-CCh). W przypadku hydrożelu z opadającymi nanocząstkami (C) obserwowano zmianę zabarwienia przy dnie względem pozostałej objętości próbki, wskazując na separację faz. Badania z zastosowaniem urządzenia Turbiscan potwierdziły zatem, że zastosowana metoda otrzymywania hydrożeli magnetycznych z użyciem nanocząstek SPION-CCh umożliwiła uzyskanie jednorodnego i stabilnego materiału bez agregacji nanocząstek i separacji faz.



**Rysunek 71.** Usieciowane próbki hydrożeli ColCh 25:75 (A), ColCh 25:75 S1 (B) oraz ColCh 25:75 zawierającej sedymentujące agregaty nanocząstek (C).

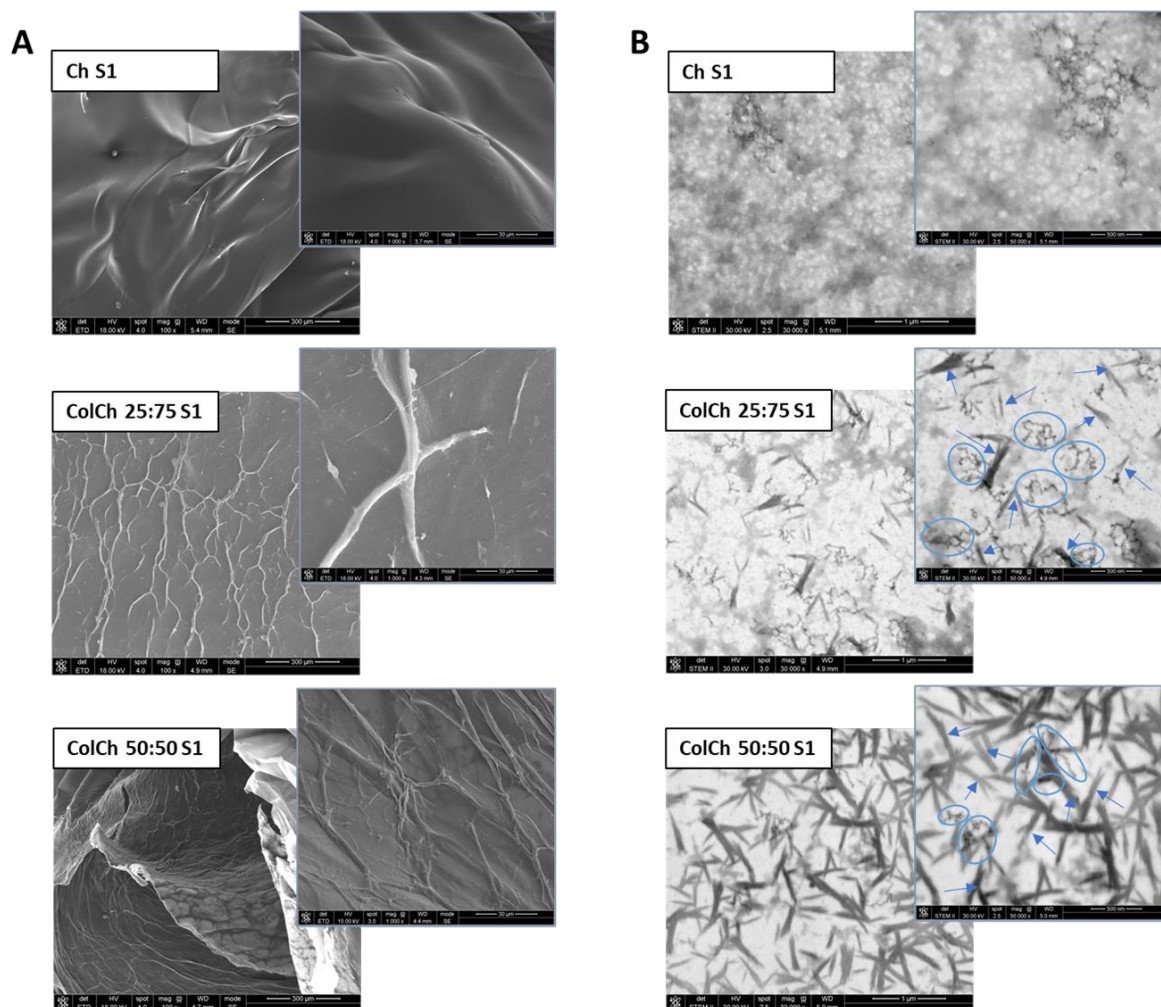
Pomiary na urządzeniu Turbiscan posłużyły także do analizy procesu sieciowania genipiną. Zmiany transmitancji w zależności od czasu (7 dni w temperaturze pokojowej) dla wszystkich badanych hydrożeli przedstawia **Rysunek 72**. Badania wykazały, że spadek transmitancji w czasie związany z procesem sieciowania i zmianą koloru próbek był najszybszy dla próbki Ch, wskazując na najszybszy proces sieciowania tej próbki. Dodatek kolagenu do hydrożelowej matrycy spowalniał sieciowanie. Ponadto, rozproszenie w matrycy hydrożelowej nanocząstek SPION-CCh również powodowało taki efekt.



**Rysunek 72.** Zmiany transmitancji w czasie (7 dni) dla wszystkich badanych hydrożeli.

## **Mikrostruktura**

Do badań mikrostruktury hydrożeli magnetycznych wykorzystano metody SEM oraz STEM (**Rysunek 73**). Materiały w formie zliofilizowanej obrazowano techniką SEM (**Rysunek 73A**). Wszystkie hydrożele magnetyczne charakteryzowały się zwartą strukturą, w przypadku materiałów z kolagenem (ColCh 25:75 S1, ColCh 50:50 S1) w strukturze widoczne były typowe dla tego polimeru włókna. Technika SEM nie pozwoliła jednak na obserwację nanocząstek SPION-CCh rozproszonych w hydrożelowych matrycach, w tym celu wykonano obrazowanie hydrożeli magnetycznych przy użyciu metody STEM (**Rysunek 73B**). Próbki przygotowano poprzez nałożenie kropli zolu biopolimerowego z nanocząstkami na siateczce miedzianej z błoną węglową, a następnie inkubowano w 37 °C do utworzenia żelu. W przypadku hydrożelu magnetycznego na bazie samego chitozanu (Ch S1) obserwowano nanoporowatą strukturę, w której rozmieszczone były nanocząstki SPION-CCh, układając się w typowe dla nich łańcuchy (jak pokazano w punkcie 11.2.1, str. 166). Dla materiałów z dodatkiem kolagenu w mikrostrukturze pojawiły się ugrupowania włókniste, wyraźniej widoczne w próbce z większą ilością kolagenu (ColCh 50:50 S1). Nanocząstki magnetyczne w tych matrycach również formowały się w łańcuchy, jednak nieco mniejsze niż w hydrożelu chitozanowym i wydawały się częściej organizować i wiązać z włóknami kolagenu.

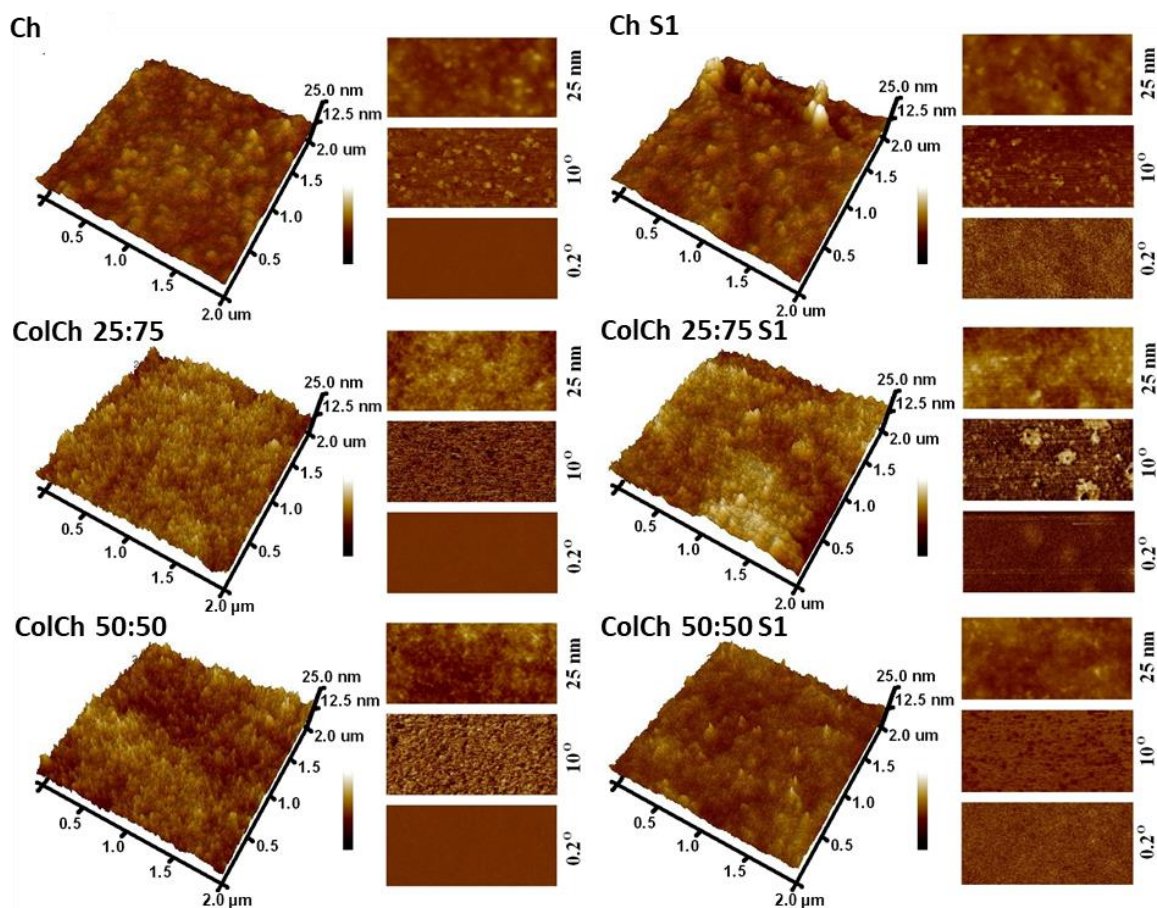


**Rysunek 73.** Mikrofotografie SEM (A) i STEM (B) otrzymanych hydrożeli magnetycznych. W niebieskich elipsach zaznaczone łańcuchy SPION-CCh, niebieskie strzałki wskazują włóknistą strukturę kolagenu.

### Analiza AFM/MFM

Określono topografię otrzymanych hydrożeli przy użyciu mikroskopu sił atomowych AFM. Wykorzystano również mikroskopię sił magnetycznych (MFM) do potwierdzenia właściwości magnetycznych hydrożeli z dodatkiem SPION-CCh. Obrazy AFM/MFM przedstawiono na **Rysunku 74**. Dla wszystkich badanych hydrożeli magnetycznych uzyskano sygnały na obrazach fazy magnetycznej. Jest to możliwe tylko wtedy, gdy próbka zawiera domeny lub cząstki magnetyczne zdolne do interakcji z namagnesowaną sondą, a więc uzyskane sygnały wskazują, że badane próbki były magnetyczne. Ponadto, ponieważ rozdzielanie obrazów magnetycznych pojedynczych SPION nie jest możliwe, można przypuszczać, że nanocząstki SPION-CCh były rozproszone w całej objętości badanych warstw hydrożeli. Sygnału magnetycznego nie zarejestrowano w przypadku hydrożeli bez dodatku SPION-CCh.





**Rysunek 74.** Obrazy AFM/MFM dla badanych hydrożeli – topografia (3D po lewej), obraz fazowy (środkowe prostokąty) oraz faza magnetyczna (dolne prostokąty).

### Właściwości magnetyczne

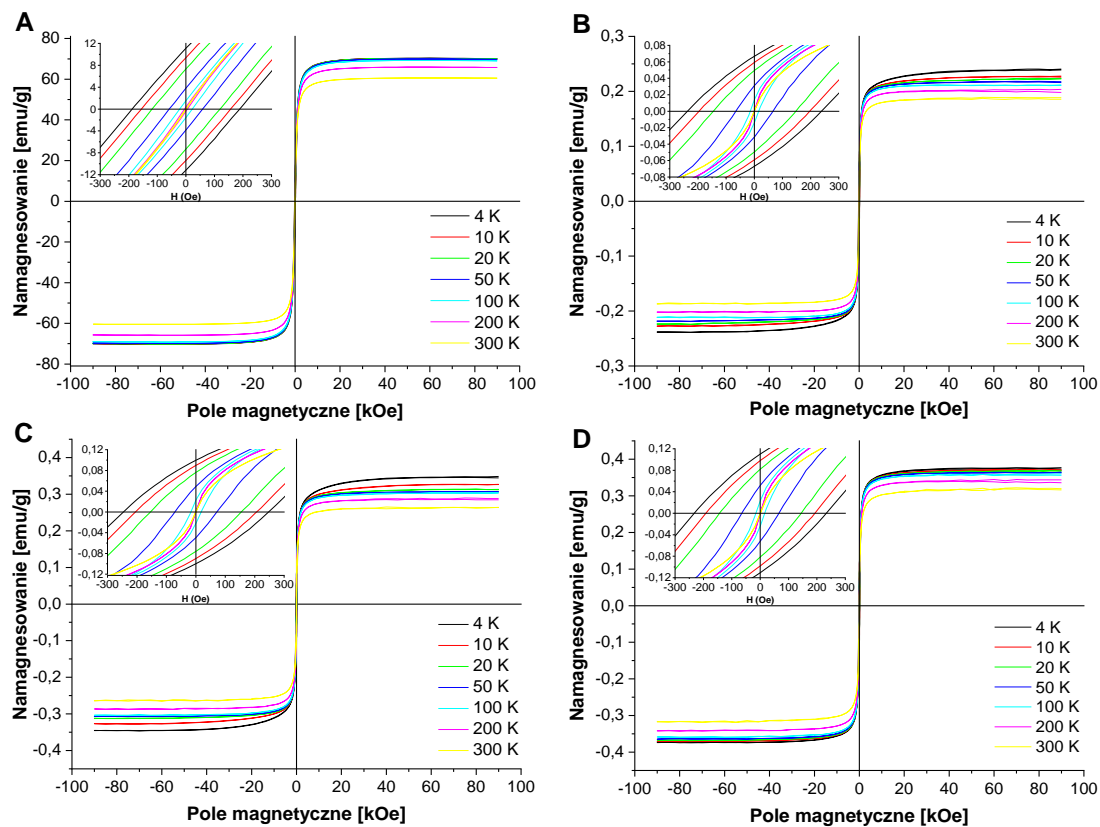
Zbadano właściwości magnetyczne hydrożeli magnetycznych z dodatkiem SPION-CCh – Ch S1, ColCh 25:75 S1 oraz ColCh 50:50 S1, wykorzystując magnetometr VSM. Pomiary prowadzono w szerokim zakresie temperatur (4 – 300 K). Wykonano również analogiczne pomiary dla samych nanocząstek SPION-CCh, porównując ich właściwości magnetyczne do właściwości hydrożeli magnetycznych i rozważając wpływ matrycy polimerowej na zachowanie nanocząstek. Właściwości magnetyczne hydrożeli zostały potwierdzone także poprzez przyciąganie ich (w zliofilizowanej formie) do stałego magnesu neodymowego (**Rysunek 75**).



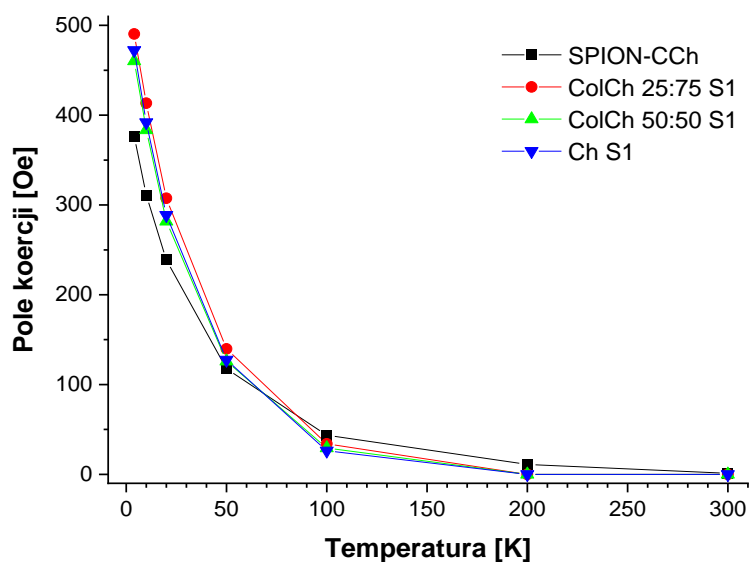
**Rysunek 75.** Zdjęcia prezentujące hydrożel przyciągnięty do magnesu stałego.

### ***Pętle histerezy, koercja magnetyczna***

Zależności namagnesowania od pola magnetycznego dla nanocząstek SPION-CCh oraz hydrożeli magnetycznych są przedstawione na **Rysunku 76**. Pętle histerezy magnetycznej wykazywały podobny kształt dla wszystkich hydrożeli magnetycznych, z zerową koercją w temperaturach 200 i 300 K (**Rysunek 76 [B, C, D]**). Wyniki te wskazują, że hydrożele magnetyczne były już w stanie superparamagnetycznym w temperaturze 200 K, a zatem także w temperaturze pokojowej. Dla próbki samych nanocząstek SPION-CCh pole koercji było nadal niezerowe w temperaturze 200 K (**Rysunek 76A**), co świadczy o znacznie wyższej temperaturze blokowania nanocząstek w porównaniu do hydrożeli magnetycznych. Nieoczywistym zjawiskiem było wykazywanie przez hydrożele magnetyczne wyższego pola koercji w niskich temperaturach niż przez SPION-CCh. W temperaturze 4 K obserwowano przykładowo dla tych materiałów pole koercji wyższe o 30% w porównaniu do samych SPION-CCh (**Rysunek 77**). Podobny efekt wykazał Ceylan i współpracownicy dla polimerowych nanokompozytów z magnetycznymi wypełniaczami, tłumacząc to zjawisko specyficzną organizacją magnetycznych wypełniaczy w łańcuchy i ich zgrupowania, prowadzących do wzmocnionej reakcji magnetycznej [288]. Magnetyzacja nasycenia w 300 K osiągnęła wartości odpowiednio 0,20, 0,26, i 0,35 emu/g dla Ch S1, ColCh 25:75 S1 oraz ColCh 50:50 S1. Wartości te były znacznie niższe niż magnetyzacja nasycenia dla samych SPION-CCh (60,1 emu/g), co jest związane z tym, że namagnesowanie hydrożeli magnetycznych jest wprost proporcjonalne do stężenia nanocząstek magnetycznych i ich magnetyzacji nasycenia [186]. Różnice w wartościach magnetyzacji nasycenia pomiędzy poszczególnymi hydrożelami magnetycznymi wynikają z różnej ilości wody utraconej w procesie liofilizacji hydrożeli (pomiar wykonywano dla suchych próbek). Zawartość wody w próbkach wynosiła odpowiednio 98,2%, 98,6% i 99,0% dla Ch S1, ColCh 25:75 S1 oraz ColCh 50:50 S1.

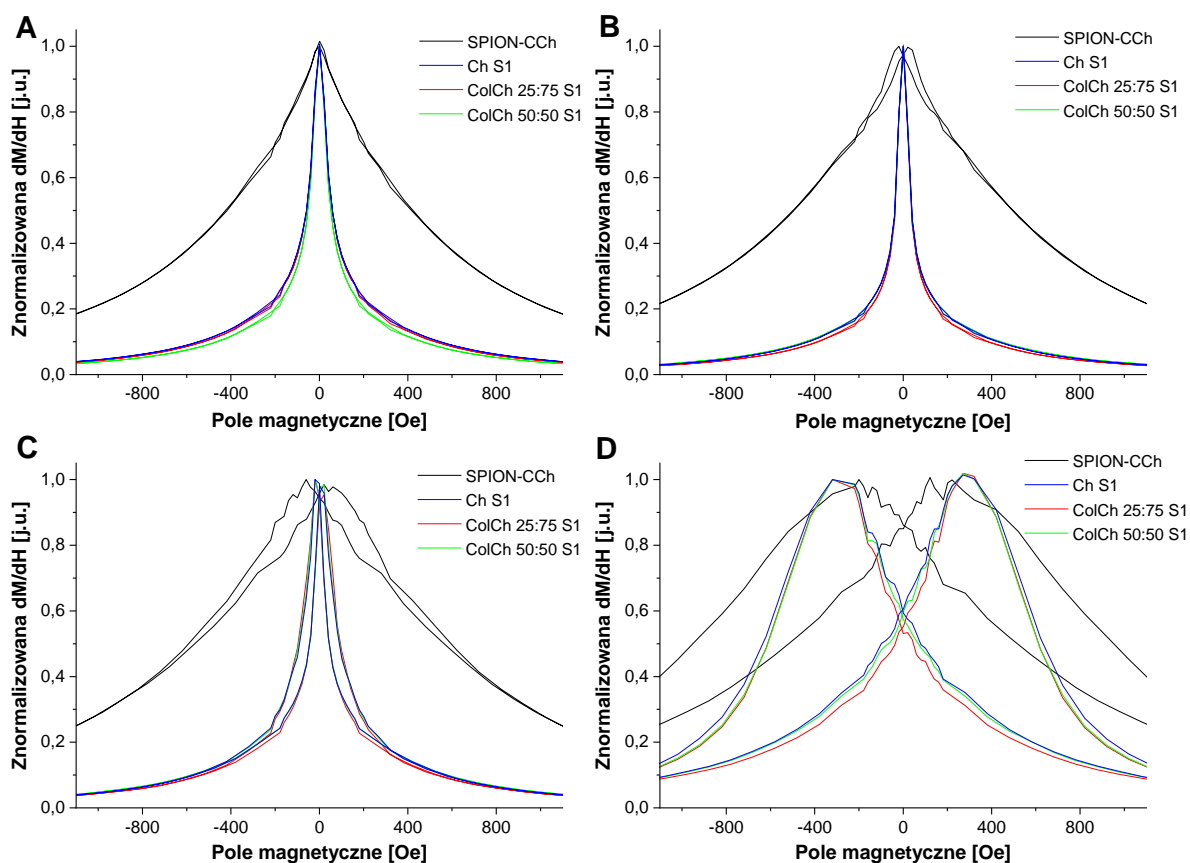


Rysunek 76. Pętle histerezy magnetycznej dla SPION-CCh (A) oraz hydrożeli magnetycznych Ch S1 (B), ColCh 25:75 S1 (C) i ColCh 50:50 S1 (D).



Rysunek 77. Pole koercyj w zależności od temperatury dla badanych nanocząstek i hydrożeli magnetycznych.

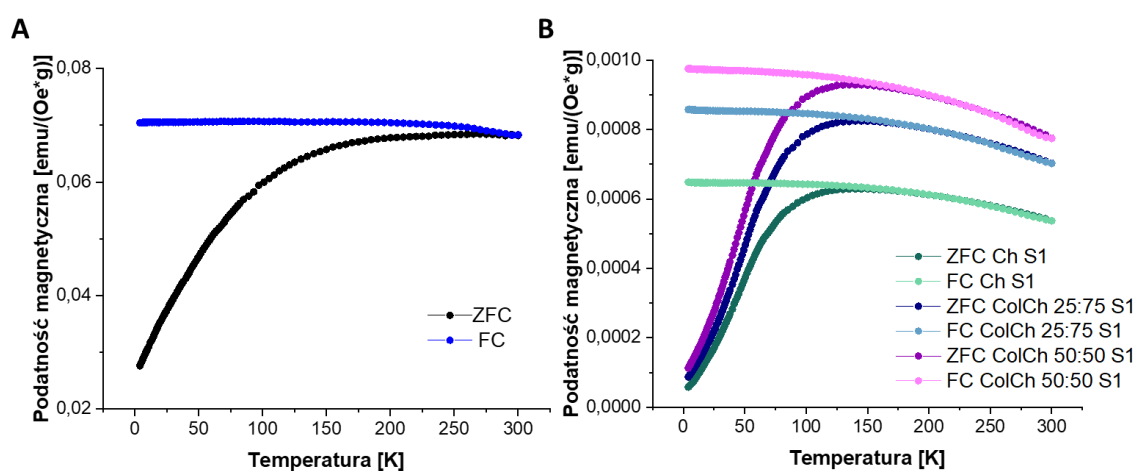
Rozpatrując właściwości magnetyczne materiałów należy wziąć pod uwagę również oddziaływania dipolowe czy bardziej złożone oddziaływania magnetyczne związane z rozmieszczeniem łańcuchów nanocząstek magnetycznych w matrycy hydrożelowej, ich związaniem z matrycą i wielkością agregatów. Badanie STEM wykazało, że nanocząstki SPION-CCh miały tendencję do organizowania się w strukturze hydrożeli przy włóknach kolagenowych i tworzyły tam łańcuchy. Były one jednak krótsze w porównaniu do tych w hydrożelu na bazie samego chitozanu (str. 175). Obserwacje te znalazły odzwierciedlenie w różniczkowej podatności magnetycznej (**Rysunek 78**). Krzywe różniczkowej podatności dla hydrożeli magnetycznych zawierających kolagen były węższe, a najwyraźniej efekt ten był widoczny w 300 K dla próbki z największą ilością kolagenu (ColCh 50:50 S1) (**Rysunek 78A**).



**Rysunek 78.** Znormalizowana pochodna magnetyzacji (różniczkowa podatność) w funkcji pola magnetycznego w 300 K (**A**), 200 K (**B**), 100 K (**C**) i 4 K (**D**) dla nanocząstek i hydrożeli magnetycznych.

### Krzywe ZFC/FC

Wykonano badania temperaturowych zależności podatności magnetycznej dla nanocząstek SPION-CCh oraz hydrożeli magnetycznych. Krzywe ZFC i FC są przedstawione na **Rysunku 79**. Kształt krzywych ZFC/FC jest podobny dla wszystkich badanych hydrożeli magnetycznych. Temperaturę blokowania dla poszczególnych materiałów oszacowano na podstawie maksimów krzywych ZFC. Jej wartości wyniosły odpowiednio 150, 149 i 135 K dla Ch S1, ColCh 25:75 S1 oraz ColCh 50:50 S1 – zatem im większa zawartość chitozanu w strukturze hydrożelu, tym wyższa temperatura blokowania. Może to wynikać z różnej długości łańcuchów SPION pomiędzy tymi materiałami – dłuższe łańcuchy w hydrożelu z chitozaniem skutkują bardziej efektywnym oddziaływaniem magnetycznym (dipolowym), a zatem wyższą temperaturą blokowania. Próbka samych nanocząstek opłaszczonych pochodną chitozanu (SPION-CCh) wykazała najwyższą temperaturę blokowania, 270 K. Wyniki te potwierdziły, że nanocząstki SPION-CCh rozproszone w hydrożelowych matrycach były w stanie superparamagnetycznym w temperaturze pokojowej. Wyraźnie niższe temperatury blokowania dla hydrożeli magnetycznych w porównaniu do samych SPION-CCh można tłumaczyć znacznie słabszymi oddziaływaniami nanocząstek umieszczonych w matrycy hydrożelowej. W przypadku próbki zawierającej tylko nanocząstki SPION-CCh, ich stężenie było znacznie większe niż w próbkach hydrożeli magnetycznych i oddziaływania dipolowe, będąc bardziej efektywnymi, mogły wpłynąć na temperaturę blokowania, przesuując ją w kierunku wyższych wartości [289].



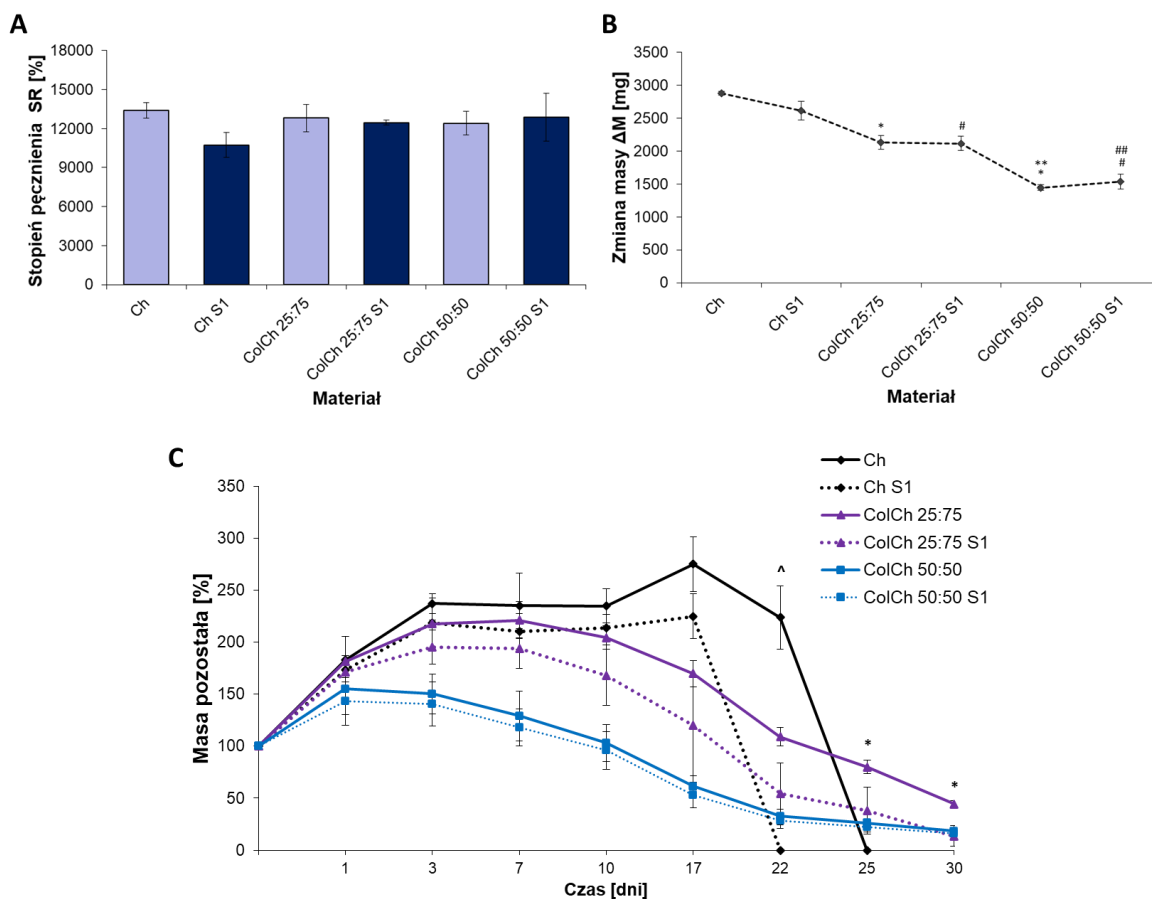
**Rysunek 79.** Krzywe ZFC/FC dla nanocząstek SPION-CCh (A) i dla hydrożeli magnetycznych (B).

Badania właściwości magnetycznych wykazały zatem, że rozproszenie nanocząstek SPION-CCh w hydrożelowych matrycach nie powodowało utraty superparamagnetycznego charakteru nanocząstek, w szczególności były one superparamagnetyczne w temperaturze pokojowej. Temperatura blokowania dla hydrożeli magnetycznych była niższa w porównaniu do samych nanocząstek. Na właściwości magnetyczne nanocząstek w strukturze miał też wpływ skład matrycy hydrożelowej. Zmieniając odpowiednio ilości poszczególnych biopolimerów tworzących matrycę hydrożelową można zmienić także sposób rozmieszczenia nanocząstek magnetycznych w polimerowej sieci.

### **Pęcznienie i degradacja**

Zdolność do pęcznienia i degradację otrzymanych hydrożeli badano poprzez inkubację w buforze PBS (pH = 7,4) w 37 °C. Pęcznienie wpływa na proces dyfuzji składników wewnątrz hydrożelowej sieci, co ma także znaczenie w procesie degradacji. Wszystkie badane hydrożele wykazywały podobną wartość stopnia pęcznienia (*SR*) po 24 godzinach inkubacji w PBS (**Rysunek 80A**). Wprowadzenie nanocząstek SPION-CCh do matrycy hydrożelowych nie wpłynęło znacząco na zdolność do pęcznienia. Zauważono jednak, że zmiana masy hydrożeli pomiędzy stanem spęczniałym i suchym ( $\Delta M$ ) zmieniała się w zależności od zastosowanej kompozycji polimerowej (**Rysunek 80B**). Największa zmiana masy wystąpiła dla hydrożeli na bazie chitozanu (Ch i Ch S1), co było związane ze zwiększoną zawartością wody w strukturze po zanurzeniu w PBS. Najwyższa zawartość wchłoniętej wody w hydrożelach chitozanowych mogła wynikać z większej dostępności grup wiążących wodę w porównaniu do żeli z dodatkiem kolagenu [290]. W celu określenia zdolności do dalszego wnikania wody do polimerowej sieci, a następnie degradacji hydrożele inkubowano w PBS przez 30 dni (**Rysunek 80C**). W przypadku hydrożeli ColCh 25:75 oraz ColCh 50:50 po początkowym wzroście zawartości wody w strukturze następował stopniowy ubytek masy (odpowiednio od 7 i 3 dnia eksperymentu). Po 30 dniach masa pozostała dla ColCh 25:75 oraz ColCh 50:50 wyniosła odpowiednio 44 i 18% masy początkowej. Hydrożel Ch wykazywał inne zachowanie, wysoka zawartość wody w jego strukturze utrzymywała się przez cały czas aż do 25 dnia eksperymentu, kiedy hydrożel uległ dezintegracji. Wchłanianie dużej ilości wody powodowało ciągłe rozszerzanie się sieci polimerowej, wiązania wewnątrz struktury mogły ulegać stopniowemu zrywaniu, aż do całkowitej utraty integralności materiału [291]. W przypadku hydrożeli magnetycznych obserwowano podobne przebiegi wchłaniania wody i degradacji do ich odpowiedników bez nanocząstek, jednakże obecność nanocząstek SPION-CCh wpływała na nieco niższe wartości masy pozostałej hydrożeli

magnetycznych w każdym punkcie czasowym badania, co może świadczyć o wpływie nanocząstek na oddziaływania pomiędzy łańcuchami polimerowymi i organizację struktury hydrożelowej. Pęcznienie i degradacja mogą być zatem regulowane poprzez zmiany zarówno zawartości biopolimerów, jak i dodatku nanocząstek magnetycznych.



**Rysunek 80.** (A) Stopień pęcznienia (SR) hydrożeli po 24 godzinach inkubacji. (B) Zmiany masy pomiędzy hydrożelem spęczniałym (24 godziny w PBS) i suchym. Analizę statystyczną wykonano poprzez osobne porównanie hydrożeli bez nanocząstek między sobą i hydrożeli magnetycznych między sobą. \* oznacza istotność statystyczną w porównaniu do Ch ( $p < 0,05$ ), \*\* oznacza istotność statystyczną w porównaniu do ColCh 25:75 ( $p < 0,05$ ), # oznacza istotność statystyczną w porównaniu do Ch S1 ( $p < 0,05$ ), ## oznacza istotność statystyczną w porównaniu do ColCh 25:75 S1 ( $p < 0,05$ ). (C) Zmiany masy hydrożeli podczas 30 dni inkubacji w PBS. Analizę statystyczną wykonano poprzez porównanie między sobą materiałów o takim samym składzie biopolimerów w tym samym punkcie czasowym. ^ oznacza istotność statystyczną w porównaniu do Ch S1 ( $p < 0,05$ ), \* oznacza istotność statystyczną w porównaniu do ColCh 25:75 S1 ( $p < 0,05$ ).

## Liofilowość

Określono liofilowość powierzchni hydrożeli bez oraz z dodatkiem nanocząstek SPION-CCh. Zmierzone wartości kątów zwilżania przedstawia **Tabela 17**. Wszystkie materiały charakteryzowały się wartościami kątów zwilżania w zakresie 82 – 89 stopni, co oznacza hydrofilowe właściwości z tendencją w kierunku hydrofobowych, o czym świadczyła

względnie duża spójność kropli i kąty zwilżania bliskie wartości 90°, uznawanej za wartość graniczną pomiędzy hydrofilowością i hydrofobowością. Nie zaobserwowano istotnego wpływu dodatku nanocząstek magnetycznych na właściwości hydrofilowe hydrożeli.

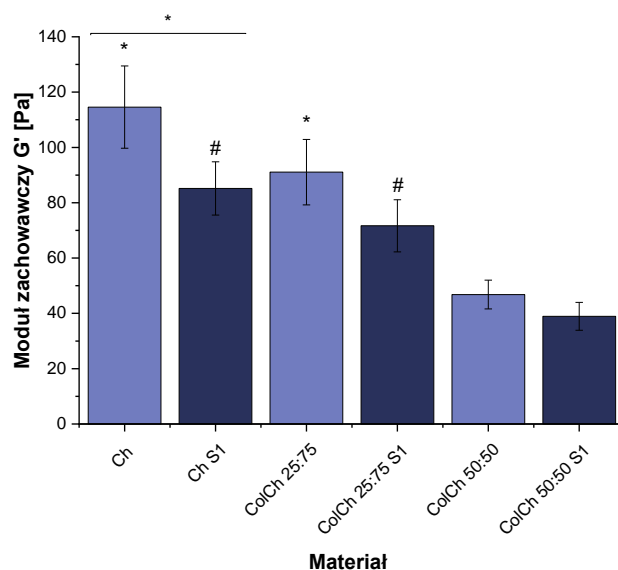
**Tabela 17.** Wartości kątów zwilżania dla powierzchni badanych hydrożeli.

<b>Materiał</b>	<b>Kąt zwilżania [°]</b>
Ch	88,8 ± 3,4
Ch S1	82,3 ± 1,8
ColCh 25:75	85,0 ± 4,9
ColCh 25:75 S1	81,9 ± 2,7
ColCh 50:50	83,1 ± 2,2
ColCh 50:50 S1	87,3 ± 1,9

### **Właściwości reologiczne**

Zbadano właściwości reologiczne otrzymanych hydrożeli, wartości modułu zachowawczego  $G'$  zmierzone dla hydrożeli po 3 dniach od rozpoczęcia procesu sieciowania przedstawia **Rysunek 81**. Dodatek kolagenu do hydrożelowej matrycy powodował zmniejszenie wartości  $G'$ . Większe wartości modułu  $G'$  dla hydrożeli z większą zawartością chitozanu mogą być związane z większą sztywnością i zwartą strukturą materiałów hydrożelowych na bazie chitozanu [292]. Zaobserwowano również zmniejszenie modułu  $G'$  dla hydrożeli magnetycznych, zawierających nanocząstki SPION-CCh. Ze względu na pokrycie nanocząstek SPION kationową pochodną chitozanu dominującymi oddziaływaniami w otrzymanych hydrożelach były oddziaływania polimer-polimer. Badania wykazały, że wraz ze wzrostem zawartości kolagenu w strukturze malał wpływ nanocząstek SPION-CCh na wartość  $G'$  hydrożeli magnetycznych w porównaniu do ich odpowiedników bez dodatku nanocząstek. Największą różnicę  $G'$  uzyskano pomiędzy hydrożelami na bazie chitozanu - Ch i Ch S1 (różnica istotna statystycznie), co może wskazywać na duży wpływ oddziaływania chitozanu z kationową pochodną chitozanu z otoczek nanocząstek na wartość  $G'$ . Dodatek kolagenu mógł w pewien sposób neutralizować ten efekt, biorąc pod uwagę wyniki badań STEM i krzywych różniczkowej podatności magnetycznej, wskazujących na tendencję do organizowania się łańcuchów SPION-CCh wzdłuż włókien kolagenowych.



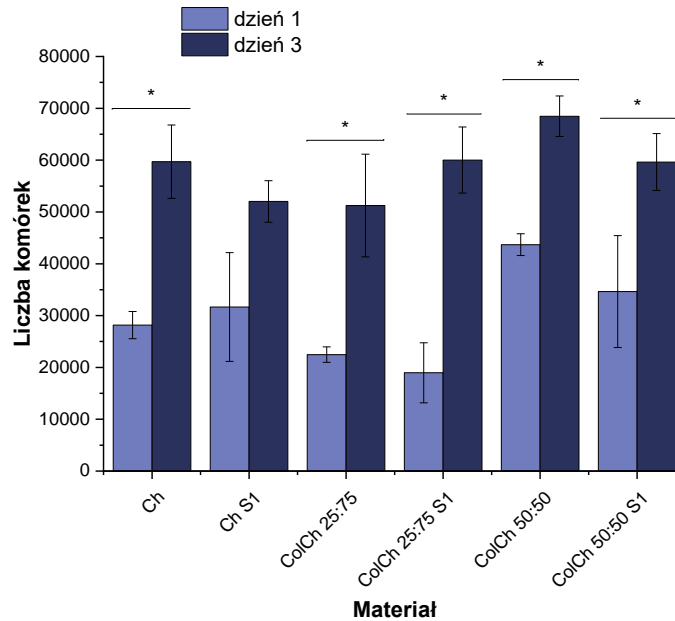


**Rysunek 81.** Wartości modułu zachowawczego G' dla materiałów, osiągnięte po 3 dniach od rozpoczęcia procesu sieciowania. \* nad czarną linią oznacza istotność statystyczną pomiędzy wartościami G' materiałów o takim samym składzie biopolimerów ( $p < 0,05$ ), \* oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColCh 50 ( $p < 0,05$ ), # oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColCh 50 S1 ( $p < 0,05$ ).

#### 11.2.4. Właściwości biologiczne *in vitro*

##### Żywotność komórek

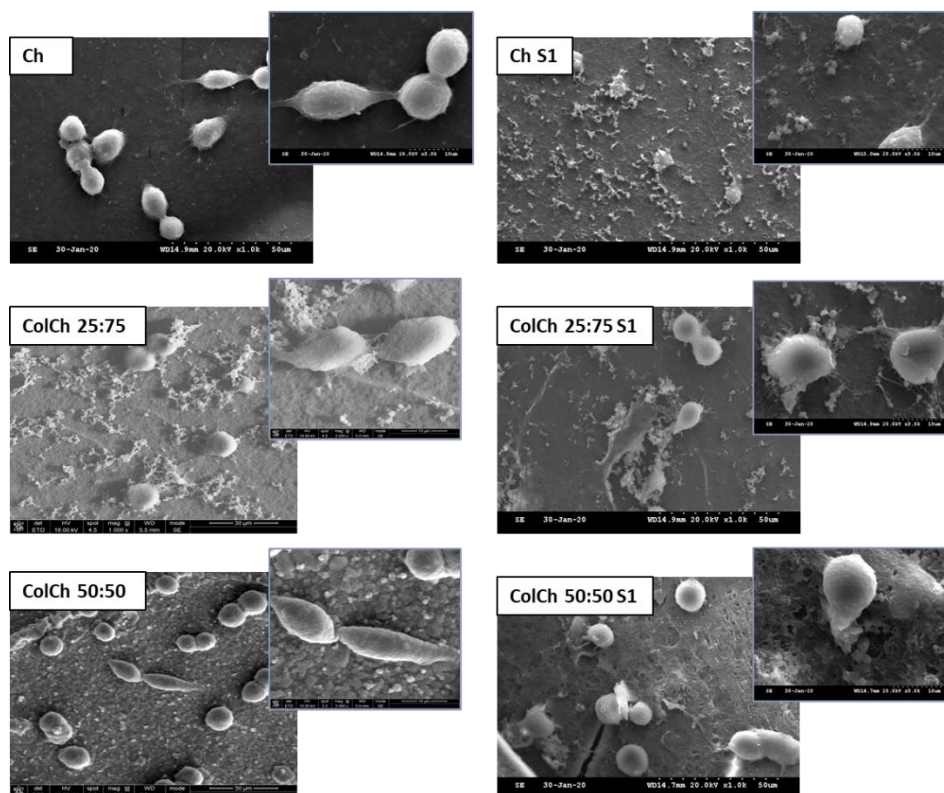
W celu weryfikacji biogodności otrzymanych materiałów hydrożelowych i wpływu nanocząstek SPION-CCh na zachowanie komórek osteoblastopodobnych linii MG-63 wykonano test z użyciem odczynnika Alamar Blue po 1 i 3 dniu hodowli komórkowej prowadzonej na powierzchni materiałów. Wyniki przedstawiono na **Rysunku 82**. Zarówno po 1, jak i 3 dniu hodowli ilość komórek na powierzchni hydrożeli bez nanocząstek i odpowiadającym im hydrożeli magnetycznych była na porównywalnym poziomie, co oznacza, że dodane nanocząstki magnetyczne nie wykazywały negatywnego wpływu na komórki MG-63. Ponadto dla wszystkich materiałów ilość komórek po 3 dniach doświadczenia była znacząco wyższa (różnice istotne statystycznie) niż po 1 dniu, wskazując na efektywne wsparcie proliferacji w badanym okresie czasu. Największy wzrost ilości komórek między 1 i 3 dniem zaobserwowano dla hydrożelu magnetycznego ColCh 25:75 S1. Badania żywotności komórek MG-63 wykazały zatem brak negatywnego wpływu hydrożeli magnetycznych z nanocząstkami SPION-CCh na zachowanie tej linii komórkowej w porównaniu do hydrożeli bez nanocząstek w badanym czasie.



**Rysunek 82.** Proliferacja komórek MG-63 po 1 i 3 dniu hodowli na powierzchni badanych materiałów. \* nad czarną linią oznacza istotność statystyczną pomiędzy dniem 1 i 3 dla tego samego rodzaju materiału ( $p < 0.05$ ).

### Adhezja i morfologia komórek

Dokonano analizy adhezji i morfologii komórek MG-63 po 3 dniach hodowli na powierzchni hydrożeli. Komórki utrwalono i obrazowano przy użyciu techniki SEM (**Rysunek 83**). Większość komórek na hydrożelach przyjmowała kuliste kształty, niektóre były bardziej wydłużone. Nie obserwowano znaczącej różnicy w kształtach komórek pomiędzy hydrożelami bez nanocząstek magnetycznych i dla hydrożeli magnetycznych. Tendencja do występowania komórek o kulistych kształtach wskazuje na stosunkowo miękkie podłoże, podobne rezultaty obserwowano dla kontrolnych hydrożeli ColCh w porównaniu do hydrożeli z dodatkiem kwasu hialuronowego (ColChHA), opisane w punkcie 7.2.3 (str. 79). Należy zaznaczyć jednak, że hydrożele z kwasem hialuronowym projektowano z myślą o zastosowaniu w formie wstrzykiwalnej, miękkość hydrożeli ColCh opracowanych jako matryce dla nanocząstek SPION-CCh wynikała z optymalizacji użytego stężenia genipiny w kierunku uzyskania usieciowanych materiałów łatwo formowalnych i zdolnych do dopasowania się do kształtu otoczenia.



**Rysunek 83.** Mikrofotografie SEM powierzchni hydrożeli z komórkami MG-63 po 3 dniach hodowli.

### **Żywotność komórek w polu magnetycznym**

Wykonano badania żywotności komórek MG-63 na powierzchni hydrożeli w obecności umiarkowanego statycznego pola magnetycznego (SMF) o dwóch wartościach natężenia – 500 oraz 2000 Oe. Test żywotności z użyciem odczynnika Alamar Blue prowadzono po 1, 3 oraz 7 dniu hodowli komórkowej pod wpływem przyłożonego pola magnetycznego. Analogiczny eksperyment prowadzono bez obecności pola magnetycznego. Do eksperymentów wybrano hydrożel ColCh 25:75 i odpowiadający mu hydrożel magnetyczny ColCh 25:75 S1.

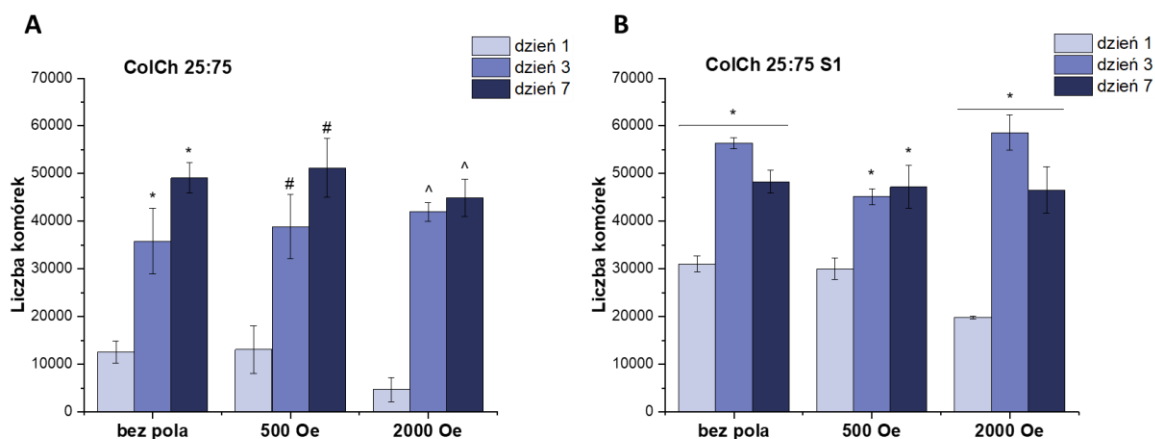
### ***Wpływ pola magnetycznego na komórki na hydrożelach bez nanocząstek magnetycznych***

Proliferacja komórek na hydrożelach bez nanocząstek (ColCh 25:75) po 1, 3 oraz 7 dniu hodowli bez obecności pola magnetycznego i w obecności pola o wartościach 500 Oe oraz 2000 Oe jest przedstawiona na **Rysunku 84A**. Zaobserwowano podobną tendencję wzrostu liczby komórek w badanym czasie w przypadku komórek hodowanych na materiałach bez obecności pola i w polu o wartości 500 Oe – stopniowy przyrost liczby komórek po 3 i 7 dniu hodowli, co wskazuje, że zastosowane pole o niższej wartości natężenia nie zmienia istotnie proliferacji komórek w porównaniu do eksperymentu bez pola. Nieco inną tendencję obserwowano w przypadku hodowli komórkowej w obecności pola magnetycznego

o natężeniu 2000 Oe. Pomiędzy dniem 1 i 3 nastąpił bardzo duży przyrost liczby komórek, natomiast pomiędzy dniem 3 i 7 proliferacja została zahamowana. Jednakże różnice pomiędzy liczbą komórek na materiałach bez obecności pola i w polu w poszczególnych dniach nie są istotne statystycznie.

### ***Wpływ pola magnetycznego na komórki na hydrożelach magnetycznych***

Proliferacja komórek na hydrożelach magnetycznych (ColCh 25:75 S1) po 1, 3 oraz 7 dniu hodowli bez obecności pola magnetycznego i pod wpływem pola o wartościach 500 Oe oraz 2000 Oe jest przedstawiona na **Rysunku 84B**. W przypadku hodowli komórkowej bez obecności pola magnetycznego liczba komórek po wzroście w początkowej fazie (między 1 i 3 dniem) zmniejszyła się między dniem 3 i 7 (różnice istotne statystycznie). Wynik ten wskazuje na wpływ samych nanocząstek SPION-CCh na proliferację komórek MG-63 w badanym okresie, takiej tendencji nie obserwowano w analogicznym eksperymencie dla hydrożeli bez nanocząstek (**Rysunek 84A**). Podobna redukcja liczby komórek między dniem 3 i 7 hodowli następowała w przypadku hydrożeli magnetycznych poddanych działaniu wyższego pola magnetycznego (2000 Oe). Mniejsze pole (500 Oe) nie powodowało zmniejszenia a zahamowanie proliferacji komórek na hydrożelach magnetycznych między dniem 3 i 7 (liczby komórek na podobnym poziomie, brak różnicy istotnej statystycznie). Badania żywotności komórek na hydrożelach magnetycznych w okresie 7 dni wykazały, że zarówno same nanocząstki SPION-CCh, jak i ich synergia z polem magnetycznym miały wpływ na proliferację komórek. Doniesienia literaturowe wskazują, że redukcja liczby komórek w eksperymentach magnetycznych może wynikać ze zwiększonej aktywności komórek osteoblastopodobnych linii MG-63 w kierunku różnicowania. Przy zmniejszonej proliferacji wykazano istotnie wyższy poziom aktywności fosfatazy alkalicznej, osteokalcyny oraz depozycji fazy mineralnej dla komórek wysianych na materiałach magnetycznych i stymulowanych umiarkowanym polem SMF w porównaniu do hodowli bez obecności pola magnetycznego [293]. Dlatego też w przypadku badanych hydrożeli magnetycznych ColCh 25:75 S1 należy wykonać dalsze badania weryfikujące ich potencjał w kierunku różnicowania się komórek pod wpływem przyłożonego pola magnetycznego.



**Rysunek 84.** (A) Proliferacja komórek MG-63 hodowanych na powierzchni hydrożeli ColCh 25:75 po 1, 3 i 7 dniu hodowli bez pola magnetycznego oraz w obecności pola o wartościach 500 Oe oraz 2000 Oe. \* oznacza istotność statystyczną w porównaniu do ColCh 25:75 w 1 dniu bez pola ( $p < 0,05$ ), # oznacza istotność statystyczną w porównaniu do ColCh 25:75 w 1 dniu przy 500 Oe ( $p < 0,05$ ), ^ oznacza istotność statystyczną w porównaniu do ColCh 25:75 w 1 dniu przy 2000 Oe ( $p < 0,05$ ). (B) Proliferacja komórek MG-63 hodowanych na powierzchni hydrożeli magnetycznych ColCh 25:75 S1 po 1, 3 i 7 dniu hodowli bez pola magnetycznego oraz w obecności pola o wartościach 500 Oe oraz 2000 Oe. \* nad czarną linią oznacza istotność statystyczną pomiędzy dniem 1, 3 i 7 dla danej wartości przyłożonego pola, \* oznacza istotność statystyczną w porównaniu do ColCh 25:75 S1 w 1 dniu przy 500 Oe ( $p < 0,05$ ).

### 11.3. Podsumowanie

Otrzymano i scharakteryzowano stabilne strukturalnie hydrożele magnetyczne, mogące znaleźć potencjalne zastosowanie w inżynierii tkankowej kości. Hydrożelowa matryca wytworzona została z dwóch biopolimerów – kolagenu i chitozanu, sieciowanych chemicznie genipiną. Skład hydrożeli i stężenie czynnika sieciującego optymalizowano pod kątem otrzymania materiału mogącego dostosować się do kształtu ubytku bez utraty swojej integralności. Strukturę sieci polimerowej oraz proces sieciowania analizowano metodami NMR. Właściwości magnetyczne hydrożeli uzyskano poprzez dodatek superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza, które były dodatkowo pokrywane kationową pochodną chitozanu (SPION-CCh). Polimerowe otoczki zapewniły kowalencyjne wbudowanie się nanocząstek magnetycznych w strukturę hydrożeli podczas sieciowania genipiną. Zastosowana metoda pozwoliła na otrzymanie stabilnych hydrożeli magnetycznych, bez separacji fazowej czy agregacji nanocząstek w polimerowej sieci, co potwierdziły badania z wykorzystaniem urządzenia Turbiscan. Pomiary VSM dowiodły, że SPION-CCh wbudowane w strukturę hydrożeli zachowały swoje superparamagnetyczne właściwości (w temperaturach powyżej 200 K), co jest korzystne z punktu widzenia zastosowań biomedycznych. Ponadto nanocząstki SPION-CCh umieszczone w hydrożelach przechodziły

w superparamagnetyczny stan w niższych temperaturach w porównaniu z samymi SPION-CCh. Właściwości magnetyczne hydrożeli zostały potwierdzone również w analizie MFM, która wykazała rozmieszczenie nanocząstek magnetycznych w całej objętości hydrożeli. Badania mikrostrukturalne i różniczkowej podatności magnetycznej wskazały na tendencję nanocząstek magnetycznych do układania się w niewielkie łańcuchy wzdłuż włókien kolagenowych, co mogłoby zostać potencjalnie wykorzystane do większej kontroli nad ułożeniem nanocząstek w zależności od składu hydrożelu i wzmocnienia ich działania pod wpływem przyłożonego pola magnetycznego. Dodatek nanocząstek magnetycznych oraz zmiana zawartości kolagenu oraz chitozanu w hydrożelach wpływała także na takie właściwości fizykochemiczne jak pęcznienie i wnikanie wody do wnętrza hydrożeli, szybkość procesu degradacji czy właściwości reologiczne. Wstępne badania biologiczne *in vitro* przeprowadzone na komórkach osteoblastopodobnych MG-63 wykazały, że po 3 dniach hodowli wsparcie proliferacji komórek na hydrożelach magnetycznych jest na podobnym poziomie jak dla hydrożeli bez nanocząstek magnetycznych. Eksperyment 7-dniowy z wykorzystaniem statycznego pola magnetycznego o umiarkowanym natężeniu (500 Oe oraz 2000 Oe) wykazał, że zarówno obecność w strukturze hydrożeli SPION-CCh, jak i przyłożenie zewnętrznego pola magnetycznego miało wpływ na proliferację komórek – po 7 dniach hodowli obserwowano redukcję liczby komórek lub zahamowanie ich wzrostu. Efekt ten powinien być zweryfikowany w przyszłych badaniach zdolności do różnicowania się komórek hodowanych na otrzymanych hydrożelach magnetycznych w obecności pola magnetycznego.

Przeprowadzone badania wykazały zatem, że zaproponowana prosta metoda otrzymywania hydrożeli magnetycznych pozwala na uzyskanie stabilnych strukturalnie materiałów z wytworzeniem silnych wiązań kowalencyjnych pomiędzy wszystkimi komponentami i zachowaniem pożądanых superparamagnetycznych właściwości. Tym samym procedura ta pozwala zminimalizować ograniczenia innych powszechnie stosowanych metod otrzymywania hydrożeli magnetycznych. Z tego względu otrzymane hydrożele magnetyczne stanowią atrakcyjny materiał do dalszych badań, skupiających się na aspekcie biologicznym i potencjale do przyspieszenia procesów regeneracyjnych, dzięki wykorzystaniu pola magnetycznego.

## IV. Nanokompozyty otrzymywane metodą druku 3D

### Wprowadzenie

Ostatnim etapem badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej było zweryfikowanie potencjału opracowanych wcześniej komponentów nanokompozytów do zastosowania w charakterze atramentów w metodzie druku 3D, pozwalającej na uzyskanie rusztowań 3D według zaprojektowanego wcześniej modelu.

Opisane w tym rozdziale badania zostały wykonane w The Centre for Translational Bone, Joint and Soft Tissue Research, należącego do Uniwersytetu Technicznego w Dreźnie (TU Dresden, Niemcy) w ramach 4-miesięcznego stażu naukowego Autorki, finansowanego ze środków przyznanego grantu NCN ETIUDA 8 (UMO-2020/36/T/ST5/00184, okres realizacji: 01.10.2020 – 30.09.2021). Staż odbyto pod naukową opieką kierownika instytutu prof. Michaela Gelinsky'ego przy współpracy z dr Tilmanem Ahlfeldem. Projekt zakładał **przetestowanie opracowanych w ramach pracy doktorskiej cząstek krzemionki SiO<sub>2</sub>, cząstek krzemionkowo-apatytowych SiO<sub>2</sub>-Ap oraz nanocząstek magnetycznych powlekanych kationową pochodną chitozanu SPION-CCh jako nieorganicznych komponentów polimerowych rusztowań, możliwych do otrzymania techniką druku 3D metodą ekstruzji**. Metoda ta pozwala na prowadzenie eksperymentu w łagodnych warunkach bez konieczności podgrzewania, dzięki czemu chronione są wrażliwe na temperaturę składniki rusztowania. Wytworzenie tym sposobem rusztowań otwierałoby perspektywę ich dalszego rozwoju w kierunku opracowania bioatramentów, pozwalających na otrzymanie struktur 3D zasiedlonych komórkami, mogących spełniać rolę sztucznych tkanek czy organów. W ramach stażu opracowywano atramenty w postaci lepkich past na bazie różnych kombinacji polimerów używanych w ramach pracy doktorskiej – kolagenu, chitozanu oraz kwasu hialuronowego. Do zwiększenia lepkości mieszanin wykorzystywano metylocelulozę. Następnie optymalizowano parametry drukowania oraz sposób sieciowania rusztowań z wykorzystaniem genipiny oraz TPP. Po wykonaniu wstępnych badań stabilności otrzymywanych rusztowań 3D wybrano najbardziej obiecujące atramenty, do których w kolejnym etapie dodawano komponenty nieorganiczne - SiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>-Ap oraz SPION-CCh i analizowano ich wpływ na podstawowe właściwości rusztowań, jak stabilność, pęcznienie, degradację czy mikrostrukturę. Finalnym punktem było podjęcie próby badań biologicznych z wykorzystaniem mezenchymalnych komórek macierzystych.

## **12. Otrzymywanie i scharakteryzowanie rusztowań 3D na bazie wybranych polimerów i komponentów nieorganicznych**

### **12.1. Materiały i metody**

#### **12.1.1. Materiały**

Oprócz odczynników wymienionych w rozdziale 7 (punkt 7.1.1, str. 71) użyto również: kolagen typu I, z ogona szczurzego (3,1 mg/ml w 0,02N kwasie octowym, Corning), kwas hialuronowy modyfikowany lizyną HA<sub>mod</sub> (stopień podstawienia ok. 25%), cząstki krzemionki SiO<sub>2</sub>, cząstki krzemionkowo-apatytowe SiO<sub>2</sub>-Ap, nanocząstki magnetyczne SPION-CCh, metyloceluloza (4,000 cP, Sigma Aldrich), tripolifosforan sodu (TPP, Sigma Aldrich), symulowane sztuczne osocze HPLM (Gibco), zbalansowany roztwór soli Hank'a HBSS (HyClone), zestaw do oceny żywotności komórek LIVE/DEAD kit (Thermo Fisher), unieśmiertelnione mezenchymalne komórki macierzyste z reekspresją ludzkiej telomerazy hTERT-MSC zapewnione przez Szpital Uniwersytecki w Monachium.

#### **12.1.2. Otrzymywanie rusztowań 3D**

Otrzymywano trzy rodzaje biopolimerowych mieszanin na bazie kolagenu (Col), chitozanu (Ch), kwasu hialuronowego (HA) oraz modyfikowanego lizyną kwasu hialuronowego (HA<sub>mod</sub>) według procedur opisanych wcześniej: ColChHA 4/1 (rozdział 7), ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 (rozdział 9) i ColCh 25:75 (rozdział 11). Analogicznie przygotowywano mieszaniny zawierające komponenty nieorganiczne: na etapie dodawania kolejnych biopolimerów dodawano również SiO<sub>2</sub> i SiO<sub>2</sub>-Ap w dwóch stężeniach C1 (zawiesina wodna, 16,6 mg/ml) i C2 (zawiesina wodna, 8,3 mg/ml) oraz SPION-CCh o stężeniu S1 (zawiesina wodna, zawartość żelaza 235 µg/ml). Następnie do biopolimerowych mieszanin wprowadzano genipinę (Gp) o stężeniu 2 mM (w 10x buforze PBS) oraz metylocelulozę (MC) w postaci proszku o dwóch stężeniach – 3 i 9% (w/v) i pozostawiano do wstępnego usieciowania w 37 °C. Tak otrzymane lepkie pasty umieszczano w jednostce dozującej drukarki 3D BioScaffolder 3.1 (GeSiM, Niemcy) z wykorzystaniem igieł stożkowych (Globaco, Niemcy) o średnicy wewnętrznej 410 µm. Parametry drukowania metodą ekstruzji (ciśnienie oraz prędkość wytłaczania) dostosowywano w zależności od składu drukowanej pasty, do większości analiz drukowano rusztowania składające się z 4 warstw materiału. Testowano także drukowanie past bez wstępnego sieciowania z użyciem genipiny. Bezpośrednio



po wydrukowaniu rusztowania obrazowano za pomocą mikroskopu stereoskopowego (Leica M205 C wyposażony w kamerę DFC295) oraz poddawano końcowemu sieciowaniu poprzez zanurzenie w roztworach genipiny o stężeniu 20 mM (w 10x buforze PBS) lub TPP o stężeniu 10% (w/v, w wodzie dejonizowanej) na 20 minut lub 24 godziny.

### **12.1.3. Scharakteryzowanie rusztowań 3D**

#### **Badania stabilności**

Stabilność wydrukowanych i usieciowanych rusztowań (4 warstwy materiału) była testowana poprzez inkubację w 37 °C w różnych mediach: PBS, HPLM, DMEM oraz w pożywce hodowlanej (DMEM suplementowane 1% roztworu antybiotyków i 10% FBS). W tym celu rusztowania przenoszono do płytek hodowlanych (6- lub 12-dołkowych) i zalewano odpowiednim medium w takiej objętości, aby rusztowanie było całkowicie zanurzone w płynie. Prowadzono badania zarówno w krótkich (3 dni), jak i dłuższych (21 dni) okresach czasu. W ustalonych punktach czasowych badania obrazowano strukturę rusztowań za pomocą mikroskopu stereoskopowego (Leica M205 C wyposażony w kamerę DFC295). Uzyskane fotografie analizowano z użyciem programu ImageJ.

#### **Badanie właściwości reologicznych**

W celu weryfikacji zjawiska rozrzedzania ścinaniem (ang. *shear thinning*) wykonano badania zależności lepkości od szybkości ścinania na reometrze MCR 301 (Anton Paar) w geometrii płytka-płytką z odległością pomiędzy płytkami równą 0,5 mm. Do badania na reometrze przygotowywano wstępnie usieciowane pasty (po trzy próbki z każdego rodzaju materiału).

#### **Test właściwości mechanicznych**

Właściwości mechaniczne rusztowań 3D były badane poprzez przeprowadzenie statycznej próby jednoosiowego ściskania na uniwersalnej maszynie wytrzymałościowej Zwick Roell Z010. W tym celu drukowano rusztowania składające się z 12 warstw materiału (po trzy próbki z każdego rodzaju materiału) i poddano końcowemu sieciowaniu. Z otrzymanych z testu zależności odkształcenia od naprężenia wyznaczano moduł Younga.

#### **Badania pęcznienia i degradacji**

Zdolność do pęcznienia, a następnie proces degradacji wydrukowanych rusztowań (4 warstwy) były monitorowane przez 21 dni poprzez inkubację w medium HPLM (symulowane sztuczne osocze) w 37 °C. W tym celu wydrukowane i usieciowane rusztowania ważono ( $M_0$ ), umieszczono w płytkach 12-dołkowych i przepłukano PBS (30 minut

inkubacji), a następnie zalano HPLM (po trzy próbki dla każdego rodzaju materiału). Materiały ponownie ważono po 1, 7, 14 oraz 21 dniach inkubacji w HPLM ( $M_t$ ). Medium w płytce z materiałami wymieniano na świeże co 3 dni. Zmiany masy w trakcie eksperymentu obliczano, korzystając ze wzoru (4)

### **Badanie mikrostruktury**

Mikrostrukturę wydrukowanych rusztowań analizowano z wykorzystaniem mikroskopu SEM (Philips XL 30/ESEM). W tym celu rusztowania po wydrukowaniu i usieciowaniu zliofilizowano, a bezpośrednio przed badaniem napyłano złotem.

### **Badania biologiczne *in vitro***

Do badań biologicznych *in vitro* wykorzystano unieśmiertelnione mezenchymalne komórki macierzyste hTERT-MSC. Hodowlę prowadzono w pożywce, która składała się z medium hodowlanego (DMEM), suplementowanego antybiotykami (roztwór penicylina/streptomycyna) w ilości 1% (obj.) oraz płodowej surowicy bydlęcej (FBS), która stanowiła 10% (obj.) całkowitej ilości pożywki. Pożywkę wymieniano co 2-3 dni hodowli.

### **Otrzymywanie bioatramentów**

W celu otrzymania bioatramentów przygotowano wstępnie usieciowane pasty (po 3 ml z każdego rodzaju materiału), a następnie poddano sterylizacji promieniowaniem UV przez około 40 minut. W kolejnym kroku do past dodano po 250  $\mu$ l zawiesiny komórkowej w pożywce ( $3 \cdot 10^6$  komórek na 1 gram materiału) i wymieszano szpatułką. Gotowe bioatramenty przekładano do jednostki dozującej drukarki 3D i drukowano rusztowania (4 warstwy). Wydrukowane rusztowania poddawano końcowemu sieciowaniu z wykorzystaniem TPP o stężeniu 10% przez 20 minut. Następnie zalewano rusztowania z komórkami pożywką i wkładano do inkubatora przeznaczonego do hodowli komórkowych. W alternatywnym podejściu rusztowania z komórkami do hodowli zalewano pożywką suplementowaną 1% TPP. Żywotność komórek w rusztowaniach weryfikowano poprzez barwienie – kalceina AM została wykorzystana do oznaczania żywych komórek, a homodimer-1 etydyny do oznaczania martwych komórek. Obrazowanie wykonywano przy użyciu mikroskopu konfokalnego (Leica TCS SP5).

### **Wysiewanie komórek na wydrukowane rusztowania**

Drugim podejściem było wysiewanie komórek na gotowe, wydrukowane rusztowania i prowadzenie hodowli 3D. W tym celu wydrukowane i usieciowane materiały przepłukano PBS i zliofilizowano. Następnie poddano je sterylizacji promieniowaniem UV przez 40 minut

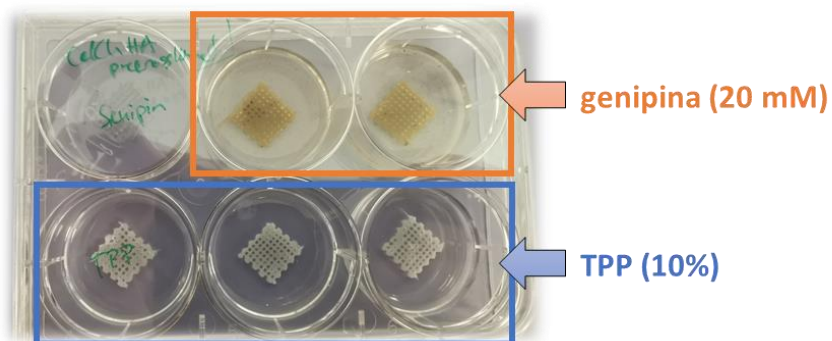
i przeniesiono do płytek hodowlanych z umieszczonymi na dnie dołków wykrojonymi plasterkami parafilmu, na którym komórki nie adherują. Przed wysiewaniem zalano rusztowania pożywką i pozostawiono w inkubatorze hodowlanym na 24 godziny. Komórki wysiewano na materiały w ilości  $2 \cdot 10^5$  komórek/dołek. Żywotność komórek testowano poprzez barwienie analogicznie jak w przypadku bioatramentów.

## 12.2. Wyniki i dyskusja

### 12.2.1. Otrzymywanie rusztozań 3D

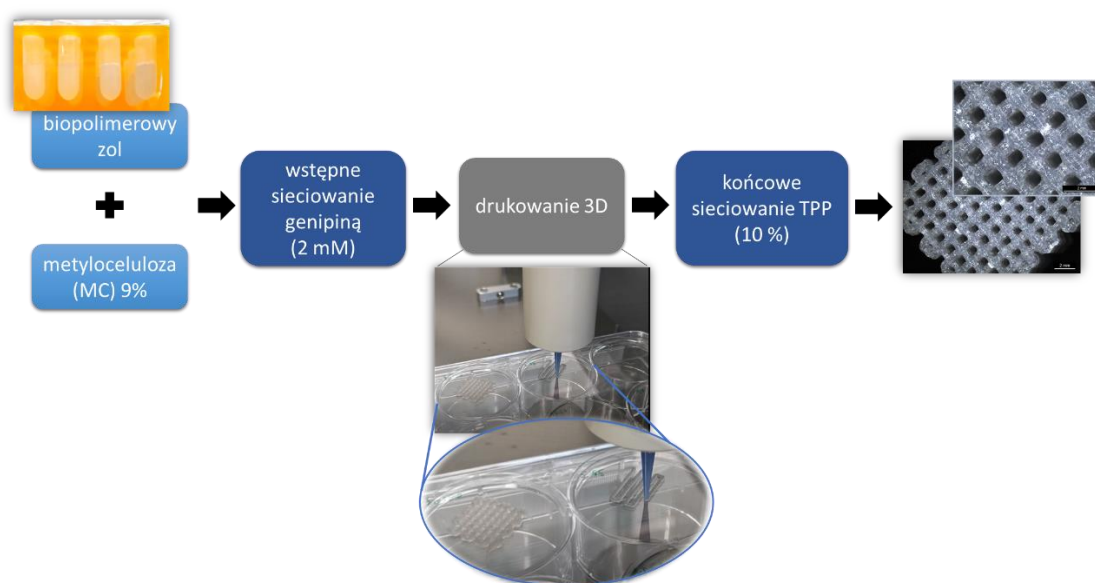
Kluczowym etapem i zarazem jednym z najbardziej czasochłonnych była optymalizacja składu i metody otrzymywania stabilnych rusztozań 3D na bazie komponentów opracowanych w ramach pracy doktorskiej, otrzymywanych metodą ekstruzji. Pierwszym krokiem było zwiększenie lepkości mieszanin kolagenu, chitozanu i kwasu hialuronowego poprzez dodatek metylocelulozy (MC) – nietoksycznego biopolimeru posiadającego zdolność do tworzenia mieszanin o wysokiej lepkości, odpowiedniej do procesu drukowania. Testowano dodatek MC w dwóch stężeniach – 3 oraz 9% wybrane na podstawie wcześniejszych doświadczeń prowadzonych w instytucie, gdzie odbywano staż. Dodatkowo optymalizacji podlegał sposób sieciowania rusztozań – głównymi podejściami było sieciowanie dwuetapowe (wstępne przed drukowaniem oraz końcowe po drukowaniu) oraz sieciowanie jednoetapowe po wydrukowaniu rusztozań. W ramach etapu wstępnego sieciowania wykorzystywano genipinę o stężeniu 2 mM. Na podstawie wstępnych prób drukowania najbardziej obiecującą metodą otrzymywania lepkich past wydawało się podejście z dodatkiem 9% MC do mieszanin biopolimerów oraz z zastosowaniem wstępnego sieciowania 2 mM genipiną. Kolejnym krokiem był wybór metody sieciowania końcowego (po wydrukowaniu rusztozań). W tym celu testowano dwa czynniki sieciujące – genipinę o stężeniu 20 mM (sieciowanie chemiczne) oraz TPP o stężeniu 10% (sieciowanie fizyczne). Po pozostawieniu wydrukowanych rusztozań zanurzonych w roztworach tych dwóch czynników sieciujących na 24 godziny w ogólności nie zaobserwowano istotnych różnic w wytrzymałości rusztozań (wstępnie sprawdzano integralność materiału podczas prostych prób przenoszenia materiałów i podatność na uszkodzenia mechaniczne wywołane traktowaniem szpatułką). Widoczną różnicą była zmiana koloru rusztozań sieciowanych genipiną z białego na żółty, podczas gdy rusztowania sieciowane TPP pozostawały w niezmienionym kolorze od momentu wydrukowania (**Rysunek 85**). Zdecydowano, że do dalszych badań czynnikiem sieciującym wykorzystywanym do sieciowania końcowego

będzie TPP. Ustalono więc dwuetapowy sposób sieciowania – wstępne sieciowanie chemiczne 2 mM genipiną oraz końcowe sieciowanie fizyczne 10% TPP. Warto podkreślić, iż doniesienia literaturowe wskazują na pozytywne efekty takiego protokołu [227][228].



**Rysunek 85.** Zdjęcia wydrukowanych rusztowań po sieciowaniu końcowym z użyciem genipiny oraz TPP.

Schemat opisujący wybrany sposób otrzymywania rusztowań 3D metodą ekstruzyjną przedstawia **Rysunek 86**. Wybrana metoda pozwalała na bardzo dobrą drukowalność z wiernym zachowaniem struktury według zaprojektowanych modeli 3D. Zestawienie wszystkich rodzajów materiałów wraz z parametrami drukowania są zamieszczone w **Tabeli 18**. Po przeprowadzeniu wstępnych badań stabilności wydrukowanych rusztowań wybrano najlepsze składy mieszanin biopolimerowych dla procesu drukowania i dodawano do nich opracowane w ramach pracy doktorskiej komponenty nieorganiczne: SiO<sub>2</sub> i SiO<sub>2</sub>-Ap w stężeniach C1 i C2 oraz SPION-CCh w stężeniu S1.



**Rysunek 86.** Schemat otrzymywania rusztowań 3D.

**Tabela 18.** Zestawienie otrzymywanych rusztowań biopolimerowych oraz parametry drukowania.

<b>Material</b>	<b>Ciśnienie drukowania [kPa]</b>	<b>Prędkość drukowania [mm/s]</b>
ColChHA 4/1 MC9	70 ± 10	9 - 10
ColChHA <sub>mod</sub> 2/3 MC9		
ColCh 25:75 MC9	200 ± 10	

### 12.2.2. Scharakteryzowanie rusztowań 3D

#### Stabilność (3 dni)

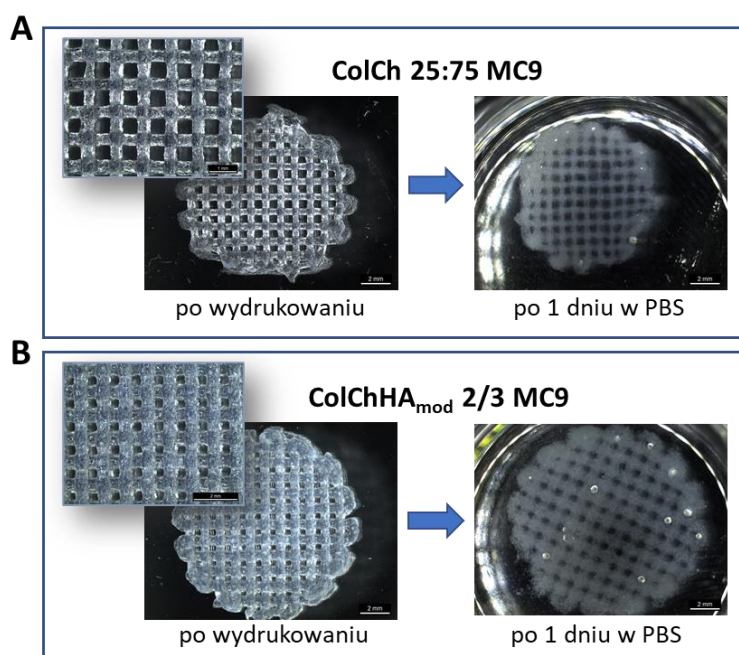
Określono wstępną stabilność wydrukowanych i usieciowanych rusztowań 3D poprzez inkubację w trzech różnych mediach – PBS, DMEM i HPLM. Inkubację prowadzono w 37 °C w krótkim okresie po wydrukowaniu (przez 3 dni). Wyniki przedstawiono w **Tabeli 19**. Materiał na bazie kolagenu, chitozanu oraz kwasu hialuronowego (ColChHA 4/1) okazał się niestabilny i tracił integralność, całkowicie rozpuszczając się we wszystkich trzech testowanych mediach po 1 dniu inkubacji. Nieznaczną poprawę stabilności uzyskano dla materiału z dodatkiem modyfikowanego lizyną kwasu hialuronowego (ColChHA<sub>mod</sub> 2/3) – materiał był stabilny w pierwszych dniach w buforze PBS, jednak podobnie jak ColChHA 4/1 całkowicie tracił integralność w DMEM i HPLM. Stabilność we wszystkich mediach zachowywał materiał na bazie kolagenu i chitozanu (ColCh 25:75).

**Tabela 19.** Stabilność wydrukowanych i usieciowanych rusztowań przez pierwsze dni po wydrukowaniu w różnych mediach- PBS, DMEM i HPLM, – oznacza niestabilność, + oznacza stabilność.

<b>Material</b>	<b>Stabilność (3 dni inkubacji)</b>		
	<b>PBS</b>	<b>DMEM</b>	<b>HPLM</b>
ColChHA 4/1 MC9	-	-	-
ColChHA <sub>mod</sub> 2/3 MC9	+	-	-
ColCh 25:75 MC9	+	+	+

Wstępne badania stabilności wykazały, że w zastosowanych warunkach i metodzie otrzymywania najlepszą stabilnością charakteryzował się materiał ColCh 25:75 MC9, w którym poza MC głównym składnikiem był chitozan i to ten polimer wydawał się mieć

największe znaczenie dla integralności rusztowania. Rusztowania ColCh 25:75 MC9 po krótkoterminowych inkubacjach w różnych mediach miały zwartą i elastyczną strukturę oraz były łatwe do przenoszenia bez utraty integralności. Zauważono także nieznaczny efekt skurczenia rusztowania po końcowym usieciowaniu TPP w porównaniu do rozmiaru rusztowania zaraz po wydrukowaniu, co widać także na fotografiach mikroskopowych (**Rysunek 87A**). W przypadku materiałów ColChHA 4/1 MC9 i ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 MC9 lepkie pasty na ich bazie charakteryzowały się bardzo dobrą drukowalnością przy zastosowaniu znacznie niższego ciśnienia (około 70 kPa) w porównaniu do ColCh 25:75 MC9 (około 200 kPa), co ma znaczenie w kontekście potencjalnego tworzenia bioatramentów z komórkami – niższe ciśnienie drukowania może sprzyjać wyższej przeżywalności drukowanych komórek. Jednakże materiały z dodatkiem HA lub HA<sub>mod</sub> okazały się zbyt delikatne i szybko ulegały całkowitej dezintegracji podczas inkubacji w testowanych mediach. Zastosowanie HA<sub>mod</sub> nieznacznie poprawiło wytrzymałość materiału ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 MC9 (obserwowaną w buforze PBS) dzięki funkcjonalizacji tego polimeru grupami aminowymi i możliwością tworzenia wiązań kowalencyjnych razem z kolagenem i chitozanem podczas wstępnego sieciowania past genipiną. Jednakże nie było to wystarczające do uzyskania optymalnej stabilności, struktura ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 MC9 była bardzo podatna na mechaniczne uszkodzenia. Ponadto obserwowano widoczne jej pęcznienie w buforze PBS (**Rysunek 87B**), co odróżniało te materiały od ColCh 25:75 MC9.



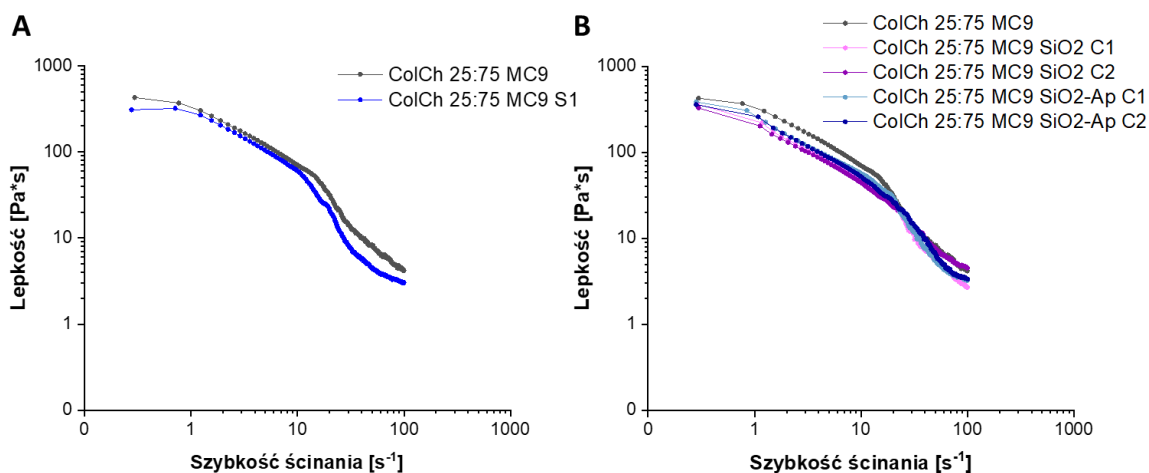
**Rysunek 87.** Struktura rusztowań ColCh 25:75 MC9 (**A**) oraz ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 MC9 (**B**) zaraz po wydrukowaniu i po 1 dniu inkubacji w PBS.

Czynnikiem wpływającym na niestabilność materiałów na bazie ColChHA i ColChHA<sub>mod</sub> mogła być obecność nie tylko kwasu hialuronowego, ale również kolagenu, który stanowił w tych składach 50% (wagowo). Podczas stażu używano kolagenu o stężeniu 3,1 mg/ml (według deklaracji producenta Corning) i było to niższe stężenie w porównaniu do używanego dla otrzymywania hydrożeli i materiałów hybrydowych opisanych we wcześniejszych rozdziałach (głównie 3,5, ale też 4,1 mg/ml). Badania reologiczne prowadzone na różnych etapach pracy doktorskiej wskazywały, że niższe stężenia kolagenu mogą mieć wpływ na obniżenie modułu zachowawczego  $G'$ . W celu poprawy stabilności tych rusztowań testowano różne podejścia – m.in. zmiany składu czy modyfikacja procesu sieciowania, jednak nie uzyskano zadowalających efektów w ramach przeznaczonego na ten etap czasu stażu. Zdecydowano ostatecznie na kontynuowanie badań z wykorzystaniem past do otrzymania stabilnych rusztowań ColCh 25:75 MC, które stanowiły matrycę dla komponentów nieorganicznych SiO<sub>2</sub> i SiO<sub>2</sub>-Ap w stężeniach C1 i C2 oraz SPION-CCh w stężeniu S1.

### Właściwości reologiczne

Lepkość jest jednym z najważniejszych parametrów materiałów opracowywanych jako atramenty do drukowania 3D. Atramenty takie wykazują właściwości typowe dla cieczy nienewtonowskich - ich lepkość maleje wraz ze wzrostem szybkości ścinania, co określa się mianem rozrzedzania ścinaniem (ang. *shear thinning*). Zjawisko to ułatwia wytłaczanie materiału przez igłę, który po przepłynięciu przez nią powraca do swojego stanu początkowego [206]. Zależności lepkości od szybkości ścinania uzyskane dla opracowywanych past na bazie ColCh 25:75 MC9 zarówno samych, jak i z dodatkiem komponentów nieorganicznych SiO<sub>2</sub> i SiO<sub>2</sub>-Ap w stężeniach C1 i C2 oraz SPION-CCh w stężeniu S1 przedstawiono na **Rysunku 88**. Wyniki badań potwierdziły, że wszystkie otrzymywane pasty charakteryzowały się właściwościami pożądanymi dla efektywnego procesu drukowania metodą ekstruzyjną – ich lepkość malała wraz ze wzrostem szybkości ścinania. W przypadku pasty zawierającej SPION-CCh (**A**) zaobserwowano nieznaczne obniżenie lepkości w porównaniu do pasty bez nanocząstek, co jest związane ze stosunkowo niewielkim stężeniem SPION-CCh wprowadzanych do matrycy, ale w zawiesinie wodnej, która mogła wpłynąć na rozrzedzenie konsystencji pasty. W przypadku cząstek krzemionki (SiO<sub>2</sub> i SiO<sub>2</sub>-Ap), które wprowadzane były w stężeniach znacznie wyższych w porównaniu do SPION-CCh, nie zauważono jednoznacznego trendu przebiegu krzywych lepkości

w zależności od stężenia cząstek (**B**). Wszystkie otrzymane krzywe były do siebie zbliżone, łącznie z krzywą uzyskaną dla pasty bez cząstek.

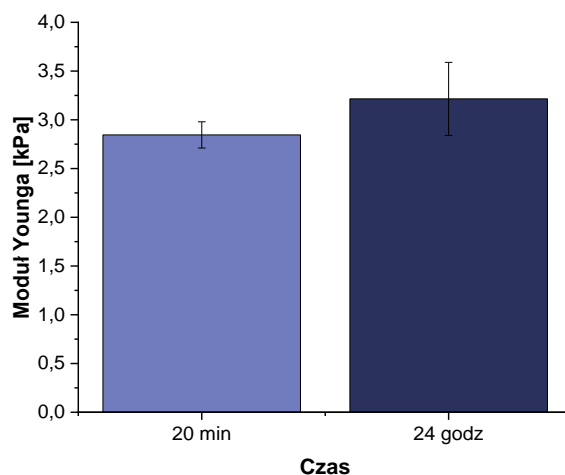


**Rysunek 88.** Krzywe lepkości w zależności od szybkości ścinania dla past na bazie materiałów ColCh 25:75 MC9 z dodatkiem SPION-CCh (**A**) oraz z dodatkiem SiO<sub>2</sub> i SiO<sub>2</sub>-Ap w stężeniach C1 i C2 (**B**).

### Wpływ czasu sieciowania na właściwości mechaniczne rusztowań

Optymalizacja czasu sieciowania rusztowań po wydrukowaniu jest istotna przy opracowywaniu bioatramentów. Krótki czas wymagany do efektywnego usieciowania wydrukowanych rusztowań pozwala na szybsze zapewnienie wydrukowanym komórkom właściwych warunków hodowli, sprzyjającym ich aktywności. W tym celu wykonano badania właściwości mechanicznych z wykorzystaniem statycznej próby jednoosiowego ściskania wydrukowanego rusztowania ColCh 25:75 MC9 po 20 minutach oraz po 24 godzinach sieciowania końcowego z użyciem 10% TPP. Uzyskane wartości modułu Younga przedstawiono na **Rysunku 89**. Badanie ściskania wykazało, że rusztowanie ColCh 25:75 MC9 charakteryzowało się podobnymi właściwościami mechanicznymi po 20 minutach oraz po 24 godzinach sieciowania. Wartość modułu Younga rusztowania sieciowanego przez 24 godziny była nieznacznie wyższa w porównaniu do materiału sieciowanego przez 20 minut (różnice nieistotne statystycznie). Test potwierdził zatem, że sieciowanie 10% TPP było efektywne już po 20 minutach i w przypadku pracy z komórkami powinien to być wystarczający czas, aby ustabilizować strukturę rusztowania z komórkami i jednocześnie zminimalizować czas przebywania komórek poza inkubatorem hodowlanym.



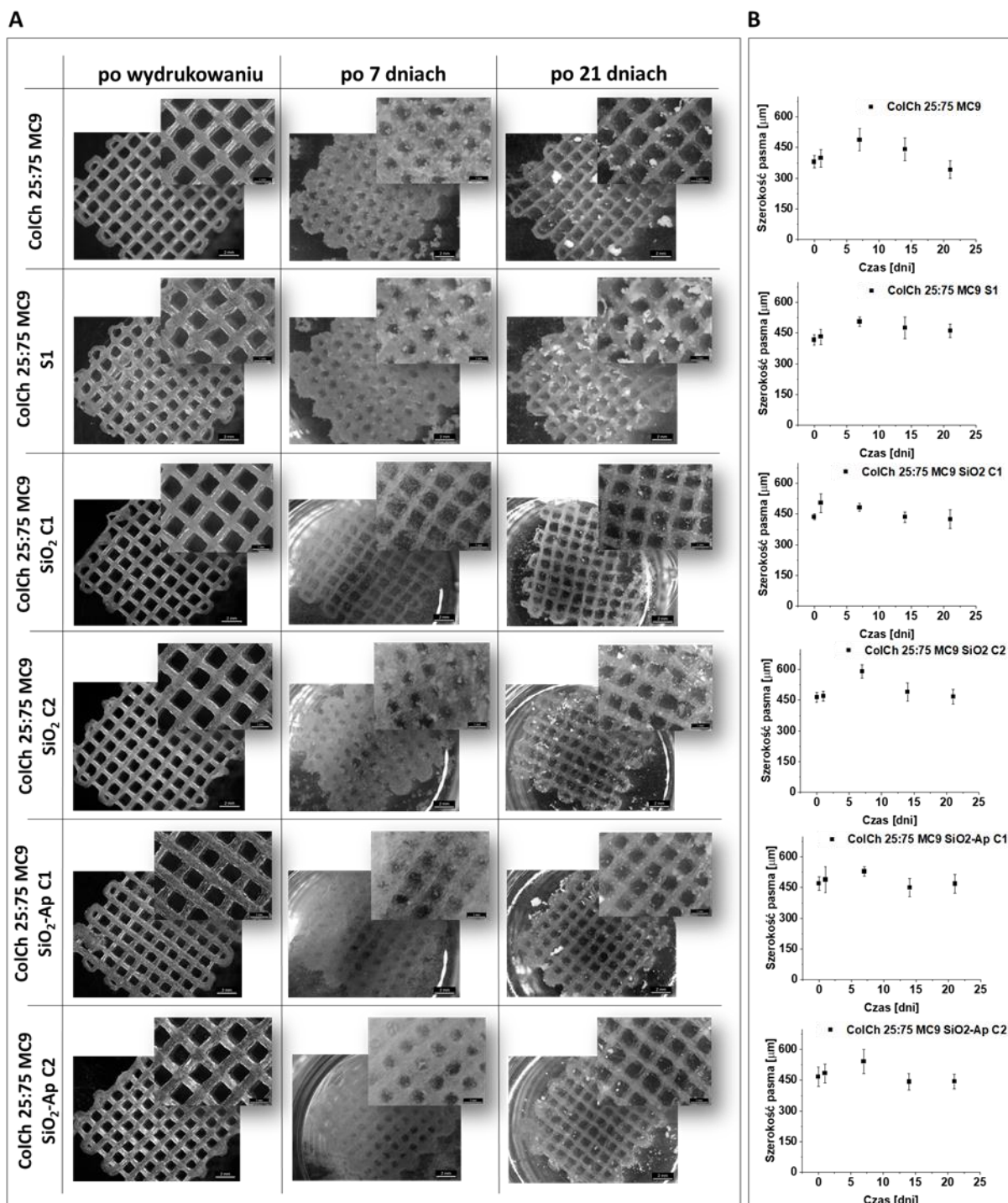


**Rysunek 89.** Wartości modułu Younga dla rusztowania ColCh 25:75 MC9 po 20 minutach i 24 godzinach sieciowania końcowego z użyciem 10% TPP.

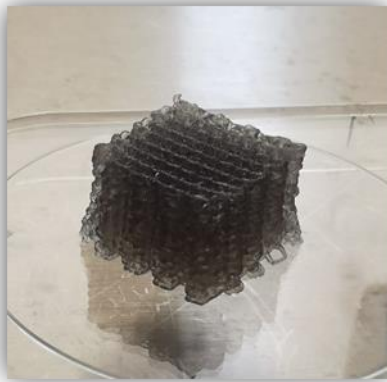
### Stabilność (21 dni)

Zbadano stabilność wydrukowanych rusztowań ColCh 25:75 MC9 bez oraz z dodatkiem badanych komponentów nieorganicznych poprzez inkubację w symulowanym sztucznym osoczu (HPLM) w 37 °C przez 21 dni. Zmiany strukturalne monitorowano poprzez obrazowanie mikroskopem stereoskopowym zaraz po wydrukowaniu oraz po 1, 7, 14 i 21 dniach inkubacji w HPLM. Fotografie struktury z wybranych dni oraz zmiany szerokości pasm rusztowania w trakcie badania są przedstawione na **Rysunku 90**. Należy zaznaczyć, że dodatek komponentów nieorganicznych SiO<sub>2</sub> i SiO<sub>2</sub>-Ap oraz SPION-CCh do past ColCh 25:75 MC9 nie utrudnił procesu wyłaczania przez igłę. Drukowane rusztowania z ich dodatkiem zachowywały formę i kształt pożądaných modeli 3D tak samo jak rusztowania bez dodatku komponentów nieorganicznych, co jest widoczne na fotografiach wykonanych zaraz po wydrukowaniu. Możliwe było także wydrukowanie rusztowania składającego się z 30 warstw (**Rysunek 91**). W kolejnych dniach inkubacji w HPLM (**Rysunek 90A**) obserwowano stopniowe uwalnianie z rusztowań metylocelulozy, której główną funkcją było dostosowanie lepkości past do procesu drukowania, natomiast nie brała ona udziału w procesie sieciowania. Pomimo stopniowej utraty MC ze struktury, rusztowania na bazie ColCh 25:75 zachowały integralność i stabilność do końca eksperymentu (21 dni) – zarówno bez dodatku oraz z dodatkiem wszystkich rodzajów użytych komponentów nieorganicznych. Zmiany objętościowe rusztowań w trakcie badania wyrażono poprzez pomiar szerokości pasm rusztowań w programie ImageJ (**Rysunek 90B**). Wyniki nie pokazały znaczących odchyień w szerokości pasm w okresie 21 dni – szerokość pasm dla wszystkich materiałów

zawierała się głównie w zakresie 400 – 500  $\mu\text{m}$ . Zaobserwowano jedynie tendencję do występowania największych szerokości pasm głównie 7 dnia badania, co było związane ze wzmożonym wydzielaniem MC z rusztowań.



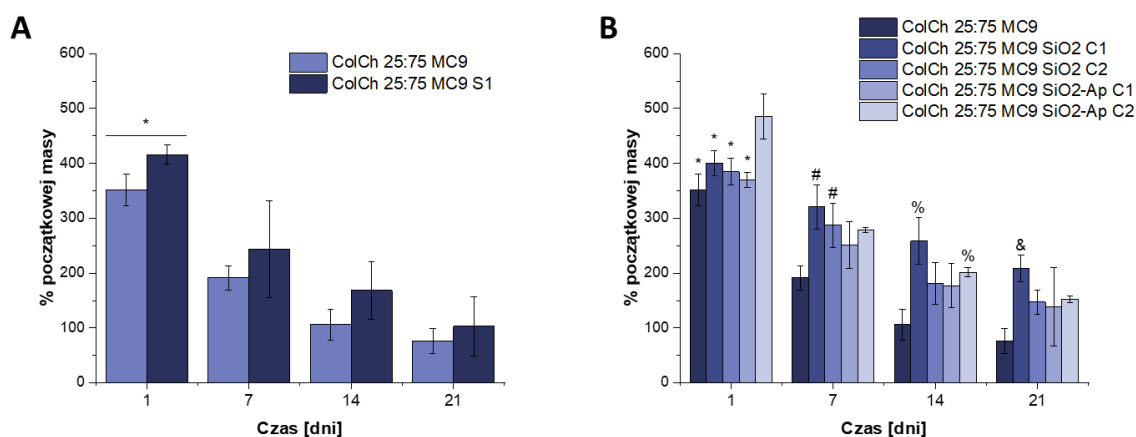
**Rysunek 90.** Fotografie struktury rusztowań 3D (A) oraz zmiany szerokości pasm rusztowań (B) w trakcie inkubacji HPLM przez 21 dni.



**Rysunek 91.** Rusztowanie ColCh 25:75 MC9 S1 składające się z 30 warstw.

### **Pęcznienie i degradacja**

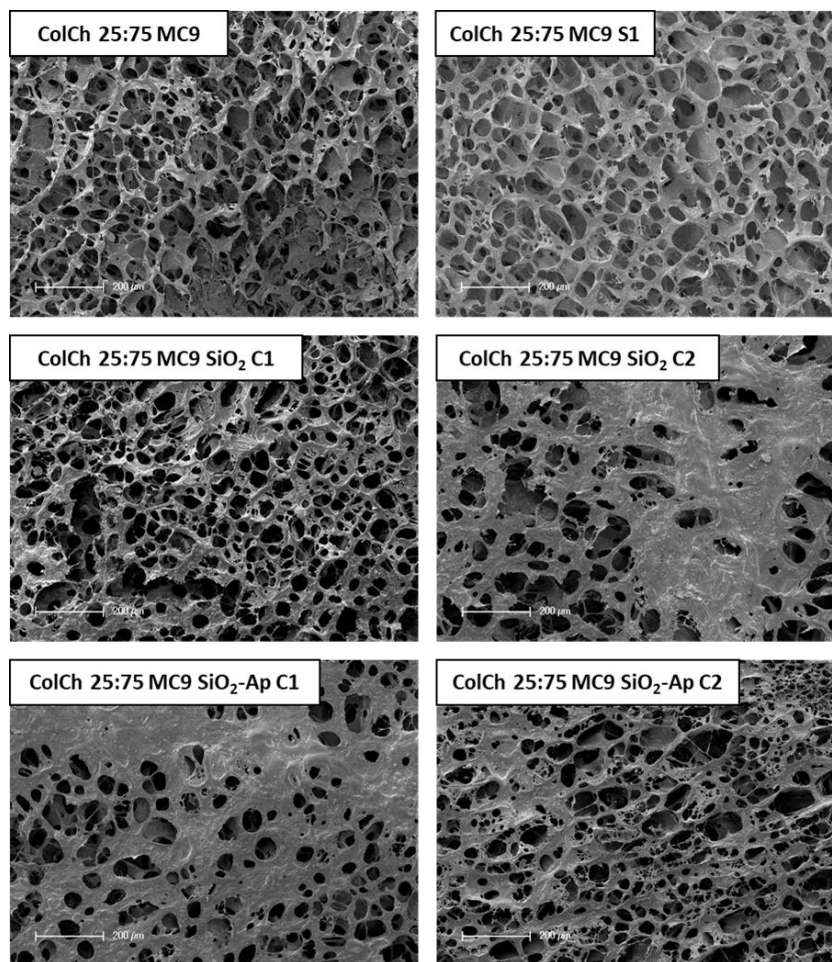
Zdolność do pęcznienia oraz proces degradacji analizowano poprzez inkubację rusztowań w HPLM przez 21 dni. Zmiany masy w trakcie inkubacji przedstawiono na **Rysunku 92**. Wszystkie badane rusztowania były zdolne do pęcznienia w początkowym etapie eksperymentu, ich masa zwiększyła się po 1 dniu, osiągając wartości w zakresie 350 – 485% masy początkowej. W kolejnych punktach czasowych obserwowano stopniowy spadek masy rusztowań, jednak na koniec eksperymentu (po 21 dniach) masy były niewiele niższe lub nawet wyższe od mas początkowych (traktowanych jako 100%). Największy ubytek masy wystąpił dla rusztowań bez dodatku komponentów nieorganicznych ColCh 25:75 MC9 – masa pozostała wyniosła około 78%. Nieco większą masą pozostałą (około 95%) charakteryzowało się rusztowanie z dodatkiem SPION-CCh (ColCh 25:75 MC9 S1), jednakże różnice nie są istotne statystycznie. Największe masy po 21 dniach obserwowano dla wszystkich rusztowań z cząstkami SiO<sub>2</sub> i SiO<sub>2</sub>-Ap w dwóch stężeniach (C1 i C2), mieściły się one w zakresie 153 - 183% masy początkowej. Obecność komponentów nieorganicznych wpływała zatem na wolniejszą utratę masy spęczniałych rusztowań. Wyniki tego eksperymentu oraz analiza stabilności opisana we wcześniejszym punkcie świadczą o tym, że głównym czynnikiem powodującym spadek masy rusztowań było uwalnianie ze struktury metylocelulozy, a nie degradacja właściwych rusztowań, zachowujących integralność podczas całego okresu badania.



**Rysunek 92.** Zmiany masy rusztowań 3D bazie materiałów ColCh 25:75 MC9 z dodatkiem SPION-CCh (**A**) oraz z dodatkiem SiO<sub>2</sub> i SiO<sub>2</sub>-Ap w stężeniach C1 i C2 (**B**) podczas inkubacji w HPLM przez 21 dni. \* nad czarną linią oznacza istotność statystyczną pomiędzy materiałami w tym samym dniu ( $p < 0,05$ ), \* oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColCh 25:75 MC9 SiO<sub>2</sub>-Ap C2 w dniu 1 ( $p < 0,05$ ), # oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColCh 25:75 MC9 w dniu 7 ( $p < 0,05$ ), % oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColCh 25:75 MC9 w dniu 14 ( $p < 0,05$ ), & oznacza istotność statystyczną w porównaniu z ColCh 25:75 MC9 w dniu 21 ( $p < 0,05$ ).

## Mikrostruktura

Mikrostrukturę otrzymywanych rusztowań analizowano z wykorzystaniem mikroskopu SEM, mikrofotografie przedstawiono na **Rysunku 93**. Wszystkie opracowane rusztowania charakteryzowały się podobną wysokoporowatą strukturą, z możliwością wystąpienia także bardziej zwartych części (widoczne na mikrofotografiach ColCh 25:75 MC9 SiO<sub>2</sub> C2 oraz ColCh 25:75 MC9 SiO<sub>2</sub>-Ap C1). Taka porowatość jest wynikiem działania procesu liofilizacji oraz metylocelulozy, która może zwiększać mikroporowatość. Należy zaznaczyć, że mikrostruktura rusztowań na bazie mieszaniny ColCh 25:75 była całkowicie inna niż mikrostruktura hydrożeli ColCh 25:75 (punkt 11.2.3, str. 175) – hydrożele charakteryzowały się głównie gładką i zwartą powierzchnią.

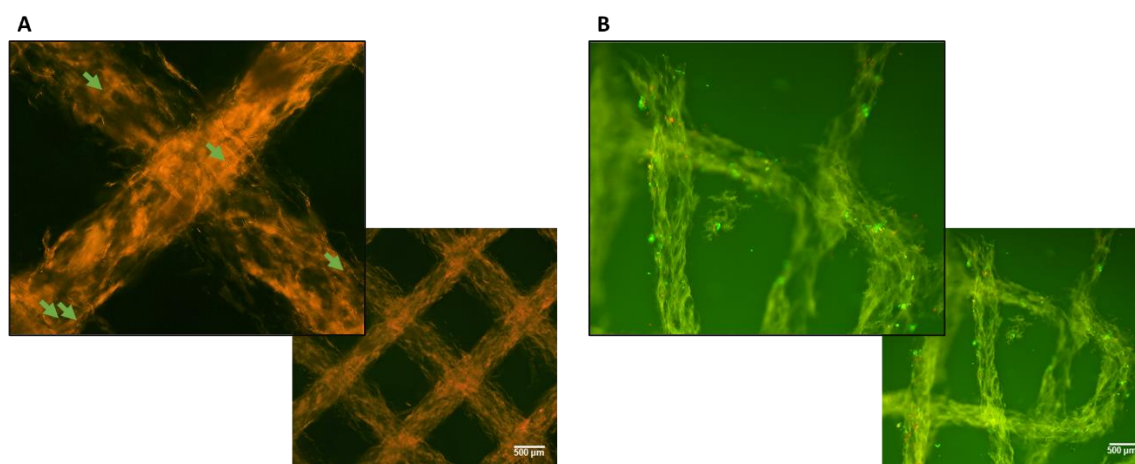


**Rysunek 93.** Mikrofotografie SEM otrzymanych rusztowań 3D.

### **Wstępne badania biologiczne *in vitro***

Przeprowadzono próbę hodowli komórek hTERT-MSC, wykorzystując dwa podejścia: (i) otrzymanie bioatramentów i wytlaczania komórek razem z biopolimerową pastą oraz (ii) wysianie komórek na gotowe rusztowania 3D. W ramach pierwszego podejścia testowano także stabilność rusztowań w standardowej pożywce (zawierającej antybiotyki stanowiące 1% i FBS stanowiący 10%) oraz w pożywce suplementowanej dodatkowo TPP w ilości 1%, jednak nie zaobserwowano istotnych różnic w integralności materiałów. W obu podejściach dużym wyzwaniem był proces przygotowania próbek do obrazowania metodą barwienia – w trakcie wykonywania kolejnych etapów procedury rusztowania były podatne na mechaniczne uszkodzenia w trakcie przenoszenia ich na kolejne podłoża i płytki, często uniemożliwiając obrazowanie. Dodatkowo analiza komórek żywych i martwych była utrudniona ze względu na to, że sygnał pochodził nie tylko od komórek, ale od całej struktury. Genipina użyta do wstępnego sieciowania, reagując z biopolimerami takimi jak kolagen czy chitozan, ma również zdolność do fluorescencji [292]. Na **Rysunku 94** przedstawiono

przykładowe obrazy z mikroskopu konfokalnego otrzymane dla podejścia z drukowaniem mieszaniny komórek i pasty biopolimerowej (A) oraz dla podejścia wysiewania komórek na gotowe rusztowania (B). Dla podejścia pierwszego było możliwe znalezienie jedynie pojedynczych i słabo widocznych komórek, na **Rysunku 94A** zaznaczono zielonymi strzałkami kilka zidentyfikowanych żywych komórek. Zdecydowanie więcej można było zidentyfikować w przypadku podejścia z wysiewaniem na gotowe rusztowanie (**Rysunek 94B**), zarówno żywe (zielone punkty), jak i martwe komórki (czerwone punkty) są widoczne na przykładowym obrazie mikroskopowym. W tym podejściu jednak występowały większe problemy z zachowaniem integralności próbek w trakcie procedury barwienia. Wstępne badania biologiczne wskazały, że opracowane rusztowania wydają się mieć większy potencjał w metodzie wysiewania komórek na wydrukowane rusztowania niż jako bioatramenty. Jednakże, aby to potwierdzić koniecznym jest powtórzenie eksperymentów oraz optymalizacja metody oznaczania żywotności komórek w takich rusztowaniach.



**Rysunek 94.** Obrazy z mikroskopu konfokalnego rusztowań ColCh 25:75 MC9 S1 z komórkami hTERT-MSC – 14 dzień hodowli komórkowej na rusztowaniu, które powstało przez drukowanie mieszaniny komórek z biopolimerową pastą (A), 3 dzień hodowli komórek wysianych na gotowe rusztowanie (B). Kanał zielony – komórki żywe, kanał czerwony – komórki martwe.

### 12.3. Podsumowanie

Otrzymano i wstępnie scharakteryzowano rusztowania 3D oparte na biopolimerach i komponentach nieorganicznych, które zostały opracowane w ramach wcześniejszych etapów pracy doktorskiej. Rusztowania 3D otrzymywano metodą ekstruzji, wytłaczanie pasm materiału było możliwe dzięki zastosowaniu kontrolowanego ciśnienia. Zoptymalizowano metodę otrzymywania lepkich past biopolimerowych, służących jako atramenty do druku 3D,

wykorzystując metylocelulozę jako środek zwiększający lepkość biopolimerowych mieszanin. Badania właściwości reologicznych potwierdziły, że otrzymywane pasty wykazywały zjawisko rozrzedzania ścinaniem, co umożliwiało efektywny proces drukowania. Do stabilizacji struktury rusztowań wykorzystano dwuetapową metodę sieciowania – wstępne sieciowanie chemiczne z użyciem genipiny o stężeniu 2 mM (przed drukowaniem) oraz końcowe sieciowanie fizyczne z użyciem TPP o stężeniu 10% (po drukowaniu). Testy ściskania na maszynie wytrzymałościowej wykazały, że rusztowania sieciowane końcowo przez 20 minut charakteryzowały się podobnymi właściwościami mechanicznymi do rusztowań sieciowanych przez 24 godziny. Przeprowadzone badania stabilności otrzymanych rusztowań 3D w różnych mediach (PBS, DMEM, HPLM) wskazały, że najbardziej stabilną strukturę wykazywały rusztowania na bazie mieszaniny kolagenu i chitozanu ColCh 25:75 z dodatkiem 9% metylocelulozy. Pasty z większą ilością kolagenu i dodatkiem kwasu hialuronowego charakteryzowały się bardzo dobrą drukowalnością, jednak uzyskiwane z nich rusztowania ulegały dezintegracji w badanych warunkach. W kolejnym kroku otrzymywano atramenty na bazie wybranej pasty ColCh 25:75 MC9 oraz dodatku komponentów nieorganicznych: SiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>-Ap oraz SPION-CCh. Badania wykazały, że dodatek komponentów nieorganicznych do biopolimerowych past nie wpływał negatywnie na proces drukowania, pasty takie charakteryzowały się bardzo dobrą drukowalnością. Ponadto obecność komponentów nieorganicznych nie zaburzała bardzo dobrej integralności strukturalnej rusztowań i powodowała wolniejsze ubytki masy spęczniałych rusztowań podczas 21 dni inkubacji w symulowanym sztucznym osoczu (HPLM). Przeprowadzone wstępne badania biologiczne z wykorzystaniem komórek hTERT-MSC wykazały, że powodzenie w otrzymywaniu bioatramentów oraz prowadzeniu hodowli komórkowych 3D zależy od wielu czynników, wymagających optymalizacji. Na podstawie wstępnej oceny żywotności komórek rusztowania na bazie ColCh 25:75 wydawały się mieć większy potencjał jako podłoża 3D do wysiewania na nich komórek niż tworzenia bioatramentów.

Otrzymywanie efektywnych bioatramentów wymaga balansu między właściwościami strukturalnymi a biologicznymi rusztowania. Rusztowania na bazie ColCh charakteryzowały się bardzo dobrymi właściwościami strukturalnymi – stabilnością i integralnością w warunkach eksperymentalnych. Z drugiej strony wcześniej prowadzone badania w ramach pracy doktorskiej wskazywały, że materiały z dodatkiem kwasu hialuronowego (ColChHA lub ColChHA<sub>mod</sub>) wpływały znacząco na adhezję komórek, wspierając ich rozplaszczanie na powierzchni i dlatego można przypuszczać, że materiały takie mogłyby pozytywnie

oddziaływać z komórkami na etapie tworzenia bioatramentów. Jednakże rusztowania 3D na ich bazie ulegały dezintegracji w badanych warunkach. Wydaje się więc, że „okno biofabrykacji” znajduje się pomiędzy materiałem ColCh a ColChHA (lub ColChHA<sub>mod</sub>), co może stanowić kierunek przyszłych badań.



## Podsumowanie rozprawy i wnioski

W ramach interdyscyplinarnej pracy doktorskiej otrzymano i scharakteryzowano nanokompozyty, potencjalnie przydatne jako rusztowania komórkowe dla potrzeb inżynierii tkankowej, w szczególności do regeneracji tkanki kostnej. Inżynieria tkankowa kości ma na celu opracowanie materiałów, które umożliwiłyby efektywną odbudowę tkanki kostnej, minimalizując przy tym bądź nawet całkowicie eliminując powszechnie występujące problemy i ograniczenia tradycyjnych przeszczepów kostnych. W niniejszej rozprawie skupiono się na rozwoju kierunków badawczych, które należą do grupy najbardziej obiecujących w kontekście projektowania rusztowań komórkowych do regeneracji tkanki kostnej w XXI wieku. Są nimi otrzymywanie organiczno-nieorganicznych materiałów hybrydowych oraz wykorzystanie metody druku 3D do wytwarzania rusztowań o pożądanej i stabilnej trójwymiarowej strukturze. Opracowane nanokompozyty bazowały na biopolimerowych matrycach hydrożelowych oraz komponentach nieorganicznych w postaci cząstek krzemionki lub nanocząstek magnetycznych. Uzyskano w ten sposób wielofunkcyjne materiały, które mogą znaleźć zastosowanie w regeneracji tkanki kostnej. Otrzymane nanokompozyty charakteryzowano pod kątem właściwości fizykochemicznych i biologicznych istotnych z punktu widzenia inżynierii tkankowej – m.in. zdolności do pęcznienia i degradacji w warunkach fizjologicznych, bioaktywności, właściwości reologicznych, stabilności w czasie, porowatości czy potencjału rusztowań do wsparcia aktywności komórek – ich adhezji, proliferacji i różnicowania.

W I części badań otrzymano i scharakteryzowano nanokompozyty oparte na hydrożelowej matrycy i cząstkach krzemionki, umożliwiające aplikację w formie wstrzykiwalnej. Matryca hydrożelowa składała się z trzech biopolimerów – kolagenu, chitozanu i kwasu hialuronowego, sieciowanych genipiną (ColChHA). Wykazano, że zarówno skład hydrożelu, jak i użyte stężenie substancji sieciującej (genipiny) mają wpływ na właściwości fizykochemiczne i biologiczne rusztowania. Szczególnie ważną rolę w badanych układach odgrywał kwas hialuronowy - jego dodatek do hydrożeli istotnie wpływał na adhezję komórek na powierzchni materiałów. **Najbardziej optymalnym materiałem spośród wszystkich badanych przez Autorkę okazał się hydrożel o stosunku wagowym biopolimerów Col:Ch:HA = 50:40:10, sieciowany genipiną o stężeniu 20 mM (ColChHA 4/1 20). Posłużył on jako matryca dla cząstek krzemionki funkcjonalizowanych grupami aminowymi, tworząc w ten sposób stabilny materiał hybrydowy.** Cząstki krzemionki stanowiły fazę bioaktywną w badanych układach – nowa faza mineralna na powierzchni

materiałów tworzyła się po 7 dniach inkubacji w symulowanym sztucznym osoczu (SBF). Jednocześnie zastosowany komponent nieorganiczny nie obniżał biokompatybilności opracowanych materiałów hybrydowych w warunkach *in vitro*.

W II części badań otrzymano i scharakteryzowano nanokompozyty oparte na hydrożelowej matrycy i cząstkach krzemionkowo-apatytowych z przyłączonym lekiem przeciwosteoporotycznym – alendronianem sodu, które mogą być potencjalnie przydatne w regeneracji i leczeniu niewielkich ubytków kostnych spowodowanych np. osteoporozą. Do otrzymania matrycy hydrożelowej wykorzystano kolagen, chitozan oraz funkcjonalizowany grupami aminowymi kwas hialuronowy, dzięki czemu wszystkie biopolimery mogły brać udział w chemicznym sieciowaniu genipiną (ColChHA<sub>mod</sub>). Przeprowadzone badania reologiczne potwierdziły nie tylko wstrzykiwalny charakter uzyskanych hydrożeli, ale również zasadność funkcjonalizacji kwasu hialuronowego grupami aminowymi. Najlepszym układem spośród badanych okazał się hydrożel z największą zawartością modyfikowanego kwasu hialuronowego, sieciowany genipiną o stężeniu 20 mM (ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 20). Hydrożel ten wykorzystano jako matrycę dla cząstek krzemionkowo-apatytowych, stanowiących nośnik dla alendronianu sodu. Obecność w polimerowej sieci nośnika leku istotnie wpłynęła na wzmocnienie właściwości mechanicznych materiałów hybrydowych w porównaniu do samej matrycy hydrożelowej. Potwierdzono, że **materiał z najwyższą zawartością nośnika (ColChHA<sub>mod</sub> 2/3 A1) jest biozgodny i zdolny do stopniowej degradacji zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Dodatkowo wstępne badania *in vitro* wykazały, że materiał ten charakteryzuje się potencjałem terapeutycznym** – obserwowano zahamowanie proliferacji komórek osteoklastopodobnych podczas 7 dni prowadzenia hodowli.

W III części badań otrzymano i scharakteryzowano nanokompozyty oparte na hydrożelowej matrycy i nanocząstkach magnetycznych, uzyskując hydrożele magnetyczne z możliwością wykorzystania zewnętrznego pola magnetycznego do przyspieszenia regeneracji kości. Matryce chitozanowe (Ch) i kolagenowo-chitozanowe (ColCh) sieciowane genipiną optymalizowano w kierunku ich aplikacji w formie usieciowanego rusztowania z możliwością łatwego dopasowania się do miejsca ubytku. Proces sieciowania oraz wpływ składu biopolimerów na otrzymywane hydrożele śledzono, wykorzystując analizę NMR. Natępnie w matrycach hydrożelowych rozpraszano superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza, pokrywane kationową pochodną chitozanu (SPION-CCh), nadając otrzymanym materiałom hybrydowym właściwości magnetyczne. Polimerowe otoczki pozwoliły na wbudowanie się

nanocząstek w strukturę hydrożeli, zapobiegając zjawiskom agregacji i separacji fazowej, co wykazano w badaniach stabilności. Jednocześnie zachowany został superparamagnetyczny charakter nanocząstek w matrycach, jak pokazały pomiary VSM. **Wstępne badania biologiczne w warunkach *in vitro* wykazały, że zarówno obecność nanocząstek magnetycznych, jak i zewnętrznego pola magnetycznego ma wpływ na proliferację komórek na materiałach, co może być przesłanką do dalszego rozwoju otrzymanych hydrożeli magnetycznych.**

W IV, ostatniej części badań otrzymano metodą ekstruzji i poddano wstępnym badaniom rusztowania 3D. W celu otrzymania lepkich past stanowiących atramenty do drukowania 3D, przetestowano biopolimery używane we wcześniejszych częściach pracy – kolagen, chitozan, kwas hialuronowy oraz kwas hialuronowy funkcjonalizowany grupami aminowymi. Dla poprawy lepkości past zastosowano metylocelulozę (MC), a do stabilizacji rusztowań wykorzystano dwuetapowe sieciowanie genipiną i TPP. Najbardziej stabilnymi rusztowaniami 3D w badanych warunkach eksperymentalnych okazały się być te oparte na kolagenie i chitozanie o stosunku objętościowym Col:Ch = 25:75 (ColCh 25:75 MC9). Następnie takie rusztowania wzbogacano poprzez dodatek do biopolimerowych past komponentów nieorganicznych – cząstek krzemionki SiO<sub>2</sub>, cząstek krzemionkowo-apatytowych SiO<sub>2</sub>-Ap oraz nanocząstek magnetycznych SPION-CCh. Wykazano, że w przypadku każdego rodzaju używanych komponentów nieorganicznych możliwe było efektywne drukowanie trójwymiarowych struktur według wcześniej zaprojektowanego modelu.

**Otrzymane w ramach pracy doktorskiej wyniki badań wykazały, że opracowane nanokompozyty posiadają obiecujące właściwości jako materiały przydatne do tworzenia rusztowań komórkowych dla potrzeb inżynierii tkankowej kości. Dodatkowo, nieskomplikowane metody ich otrzymywania zwiększają ich potencjał komercjalizacyjny.**

## Dorobek naukowy Autorki rozprawy

### Publikacje powstałe w ramach pracy doktorskiej

1. Fiejdasz, S., **Gilarska, A.**, Strączek, T., Nowakowska, M., Kapusta, C. (2021). Magnetic Properties of Collagen–Chitosan Hybrid Materials with Immobilized Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs). *Materials*, 14(24), 7652. doi: 10.3390/ma14247652, **IF=3,623, punktacja MEiN: 140.**
2. **Gilarska, A.**, Hinz, A., Bzowska, M., Dyduch, G., Kamiński, K., Nowakowska, M., Lewandowska-Łańcucka, J. (2021). Addressing the Osteoporosis Problem—Multifunctional Injectable Hybrid Materials for Controlling Local Bone Tissue Remodeling. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13(42), 49762-49779. doi: 10.1021/acsami.1c17472, **IF=9,229, punktacja MEiN: 200.**
3. Fiejdasz, S., **Gilarska, A.**, Horak, W., Radziszewska, A., Strączek, T., Szuwarzyński, M., Nowakowska, M., Kapusta, C. (2021). Structurally stable hybrid magnetic materials based on natural polymers—preparation and characterization. *Journal of Materials Research and Technology*, 15, 3149-3160. doi: 10.1016/j.jmrt.2021.09.124, **IF=5,039, punktacja MEiN: 100.**
4. **Gilarska, A.**, Lewandowska-Łańcucka, J., Guzdek-Zajac, K., Karewicz, A., Horak, W., Lach, R., Wójcik, K., Nowakowska, M. (2020). Bioactive yet antimicrobial structurally stable collagen/chitosan/lysine functionalized hyaluronic acid–based injectable hydrogels for potential bone tissue engineering applications. *International journal of biological macromolecules*, 155, 938-950. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.052, **IF=6,953, punktacja MEiN: 100.**
5. Lewandowska-Łańcucka, J., **Gilarska, A.**, Buła, A., Horak, W., Łatkiewicz, A., Nowakowska, M. (2019). Genipin crosslinked bioactive collagen/chitosan/hyaluronic acid injectable hydrogels structurally amended via covalent attachment of surface-modified silica particles. *International journal of biological macromolecules*, 136, 1196-1208. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.184, **IF=6,953, punktacja MEiN: 100.**
6. **Gilarska, A.**, Lewandowska-Łańcucka, J., Horak, W., Nowakowska, M. (2018). Collagen/chitosan/hyaluronic acid–based injectable hydrogels for tissue engineering applications—design, physicochemical and biological characterization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 170, 152-162. doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.06.004, **IF=5,268, punktacja MEiN: 100.**

### Publikacja w przygotowaniu

**Gilarska, A.**, Fiejdasz, S., Radziszewska, A., Habina-Skrzyniarz, I., Krzyżak, A., Nowakowska, M., Kapusta, C., Hybrid magnetic materials- promising scaffolds for bone tissue engineering.

## Publikacje powstałe w ramach pracy magisterskiej i licencjackiej

1. Filipowska, J., Lewandowska-Łańcucka, J., **Gilarska, A.**, Niedźwiedzki, Ł., Nowakowska, M. (2018). In vitro osteogenic potential of collagen/chitosan-based hydrogels-silica particles hybrids in human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell cultures. *International journal of biological macromolecules*, 113, 692-700. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.02.161, **IF=6,953, punktacja MEiN: 100.**
2. Lewandowska-Łańcucka, J., Mystek, K., **Gilarska, A.**, Kamiński, K., Romek, M., Sulikowski, B., Nowakowska, M. (2016). Silicone-stabilized liposomes as a possible novel nanostructural drug carrier. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 143, 359-370. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.03.057, **IF=5,268, punktacja MEiN: 100.**

## Patent krajowy

Nowakowska, M., Lewandowska-Łańcucka, J., **Gilarska, A.**, patent polski nr 239179, do zgłoszenia patentowego nr P.428993 (21.02.2019), *Hydrożelowy materiał hybrydowy, sposób jego otrzymywania i zastosowanie*, właściciel: UJ, data wydania decyzji o udzieleniu patentu 21.07.2021, data uzyskania (opublikowania) patentu: 08.11.2021.

## Zgłoszenia patentowe

1. Lewandowska-Łańcucka, J., Nowakowska, M., **Gilarska, A.**, międzynarodowe zgłoszenie patentowe nr PCT/PL2021/050060, *Multifunctional, hydrogel hybrid material, the method of its preparation and the use in the treatment of bone losses*, 26.08.2021.
2. Nowakowska, M., Lewandowska-Łańcucka, J., **Gilarska, A.**, zgłoszenie patentowe w Stanach Zjednoczonych nr US 17/426,629 (28.07.2021), *Hydrogel hybrid material, method of its preparation and application*, opublikowane 17.02.2022 pod numerem US 2022/0047776 A1.
3. Lewandowska-Łańcucka, J., Nowakowska, M., **Gilarska, A.**, polskie zgłoszenie patentowe nr P.435104, *Wielofunkcyjny, hydrożelowy materiał hybrydowy, sposób jego otrzymywania oraz zastosowanie w leczeniu ubytków kostnych*, 26.08.2020.
4. Nowakowska, M., Lewandowska-Łańcucka, J., **Gilarska, A.**, międzynarodowe zgłoszenie patentowe nr PCT/PL2020/050019 (21.02.2020), *Hydrogel hybrid material, method of its preparation and application*, wejście w fazę regionalną EPO, data zgłoszenia w EPO: 21.09.2021, numer zgłoszenia: EP 20754841.3.

## Publikacje promujące wynalazki chronione patentem i zgłoszeniami patentowymi

1. Artykuł pt. *Hydrożele leczą osteoporozę* opublikowany na platformie Innowacyjny Start powstałej z inicjatywy Urzędu Marszałkowskiego Województwa Małopolskiego w periodyku Innowacyjny Start nr 1 (51) lipiec 2021, ISSN 1898-5009 oraz online

(15.10.2021) na stronie <https://www.innowacyjnystart.pl/index.php/inspiracje/307-hydrozele-lecza-osteoporoze>.

2. Artykuł pt. *Szpachlówka do zębów* promujący wynalazek *Hydrożelowy materiał hybrydowy, sposób jego otrzymywania i zastosowanie* opublikowany w gazecie Dziennik Gazeta Prawna (DGP i e-DGP), wydanie 44, 05.03.2021, w ramach ósmej edycji konkursu *Eureka! DGP – odkrywamy polskie wynalazki*, dostęp online na stronie <https://biznes.gazetaprawna.pl/artykuly/8112538,szpachlowka-do-zebow-eureka-dgp.html> i <https://gospodarka.dziennik.pl/news/artykuly/8112536,hydrozel-eureka-dgp-naukowcy-uniwersytet-jagiellonski.html>.
3. Film promujący wynalazek *Wielofunkcyjny hydrożel do leczenia ubytków kostnych* z udziałem dr hab. Joanny Lewandowskiej-Łańcuckiej i mgr Adriany Gilarskiej, zrealizowany na potrzeby Małopolskiego Festiwalu Innowacji (19-25.10.2020), dostępny na kanale Innowacyjna Małopolska na platformie YouTube [https://www.youtube.com/watch?v=NKF0PIHjGKA&feature=emb\\_imp\\_woyt](https://www.youtube.com/watch?v=NKF0PIHjGKA&feature=emb_imp_woyt) oraz na stronie <https://innovacyjna.malopolska.pl/malopolski-festiwal-innowacji/mfi-2020/strefa-wynalazkow/>.
4. Animacja i artykuł o wynalazku pt. *Hydrożelowy materiał hybrydowy do odbudowy ubytków kostnych* zrealizowane w ramach projektu *Nauka dla społeczeństwa* dofinansowanego przez MNiSW, animacja dostępna na stronie <https://naukadlaspoleczenstwa.com/portfolio/nauka-dla-zdrowia/> oraz na kanale ImpactCEE na platformie YouTube <https://www.youtube.com/watch?v=Pgk95-5m57Y&t=2s>, artykuł dostępny na stronie <https://naukadlaspoleczenstwa.com/hydrozelowy-material-hybrydowy-do-odbudowy-ubytkow-kostnych/> oraz <https://300gospodarka.pl/material-partnera/hydrozelowy-material-hybrydowy-do-odbudowy-ubytkow-kostnych-material-partnera>.
5. Prezentacje wynalazków przez przedstawicieli CTT CITTRU UJ firmom farmaceutycznym podczas następujących wydarzeń: BioEurope Spring 2020, BioEurope Fall 2020, China Bio 2020, BioFit 2020, BioInvestors Forum 2020, Life Science Open Space 2020.

### Udział w projektach badawczych

1. Projekt *Bioaktywne nanokompozyty dla potrzeb inżynierii tkankowej* realizowany w ramach grantu ETIUDA 8 finansowanego przez NCN, UMO-2020/36/T/ST5/00184, okres realizacji: 01.10.2020 – 30.09.2021, pozycja: **kierownik**.
2. Projekt *Wielofunkcyjne hydrożelowe materiały hybrydowe do zastosowań w leczeniu ubytków kostnych - badania in vivo* realizowany w ramach prac przedwdrożeniowych dla Innowacji UJ finansowanego ze środków CTT CITTRU, Dec: 30.621.8.2020, okres realizacji: 03.2020 – 12.2020, pozycja: **wykonawca**.

3. Projekt *Biomimetyczne hydrożelowe materiały hybrydowe dla potrzeb inżynierii tkankowej – możliwość odbudowy ubytków kostnych* realizowany w ramach grantu SONATA 11 finansowanego przez NCN, UMO-2016/21/D/ST5/01635, okres realizacji: 2017 - 2019, pozycja: **wykonawca**.

### **Odbyte staże naukowe**

1. The Centre for Translational Bone, Joint and Soft Tissue Research, TU Dresden, Drezno, Niemcy, staż naukowy pod kierunkiem prof. Michaela Gelinsky'ego zrealizowany w ramach grantu NCN ETIUDA 8, okres realizacji stażu: 01.06.2021 – 30.09.2021.
2. Institute of Nanoscience of Aragon, University of Zaragoza, Saragossa, Hiszpania, staż naukowy pod kierunkiem prof. Manuela Ricardo Ibarry zrealizowany w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój, nr projektu POWR.03.02.00-00-I004/16, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej, okres realizacji stażu: 08.07.2019 - 30.07.2019.
3. Instytut Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodniczańskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, staż naukowy pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Kąc zrealizowany w ramach programu studiów „kierunków zamawianych” finansowanego z europejskiego Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, okres realizacji stażu: 15.07.2014 – 31.08.2014.

### **Wystąpienia konferencyjne**

Współautorstwo **19** prezentacji posterowych i/lub ustnych podczas konferencji międzynarodowych i **12** prezentacji posterowych i/lub ustnych podczas konferencji krajowych, w tym odpowiednio **9** i **7** jako autor prezentujący (pierwszy współautor jest autorem prezentującym):

### **Konferencje międzynarodowe**

#### ***Prezentacje ustne:***

1. **A. Gilarska**, M. Nowakowska, J. Lewandowska-Łańcucka, *Multifunctional hydrogel-based hybrid materials for bone repair therapy*, CEBioForum, R&D Biomedical Projects Arising from Polish Universities, BioTech Week 2021, 27.09.2021, konferencja online.
2. **J. Lewandowska-Łańcucka**, **A. Gilarska**, A. Buła, W. Horak, A. Łatkiewicz, M. Nowakowska, *Bioactive Multicomponent Injectable Hybrids – Structural Stabilization Via Attachment of Inorganic Particles to the Biopolymeric Network*, 30th Annual Conference of the European Society for Biomaterials, 09-13.09.2019, Drezno, Niemcy.
3. **S. Fiejdasz**, **A. Gilarska**, W. Prendota, K. Goc, T. Strączek, J. Przewoźnik, C. Kapusta, S. Zapotoczny, M. Nowakowska, *Systems containing magnetic nanoparticles for biomedical applications*, Innovative technologies in biomedicine, 22-24.10.2018, Kraków.
4. **J. Lewandowska-Łańcucka**, J. Filipowska, **A. Gilarska**, T. Niedźwiedzki, M. Nowakowska, *In Vitro Osteogenic Potential of Biopolymeric Hydrogels-silica Particles Hybrids in Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stromal Cell (hBMSCs) Cultures*,

9th International Workshop on Interfaces: New Frontiers in Biomaterials, 16-18.04.2018, Santiago de Compostela, Hiszpania.

5. J. Lewandowska-Łańcucka, **A. Gilarska**, J. Filipowska, Ł. Rodzik, S. Fiejdasz, M. Nowakowska, *Biomimetic hybrid materials for tissue engineering applications*, International Conference & Exhibition on Advanced & Nano Materials ICANM 2017, 7-9.08.2017, Toronto, Kanada.

### **Prezentacje posterowe**

1. **A. Gilarska**, S. Fiejdasz, S. Zapotoczny, M. Nowakowska, C. Kapusta, *Magnetic nanoparticles as inorganic components of hybrid materials for tissue regeneration*, InterNano Poland 2019, 16-17.10.2019, Katowice.
2. S. Fiejdasz, **A. Gilarska**, S. Zapotoczny, M. Nowakowska, C. Kapusta, *Hydrogel-based hybrid magnetic scaffolds for tissue engineering applications*, 30th Annual Conference of the European Society for Biomaterials, 9-13.09.2019, Drezno, Niemcy.
3. **A. Gilarska**, S. Fiejdasz, S. Zapotoczny, M. Nowakowska, C. Kapusta, *Magnetic nanoparticles as inorganic components of hybrid materials for tissue regeneration*, XXXVIIth Biennial Meeting of the Spanish Royal Society of Physics, 15-17.07.2019, Saragossa, Hiszpania.
4. **A. Gilarska**, J. Lewandowska-Łańcucka, W. Horak, M. Nowakowska, *Biopolymeric hydrogels as injectable scaffold materials for tissue regeneration*, Innovative technologies in biomedicine, 22-24.10.2018, Kraków.
5. **A. Gilarska**, S. Fiejdasz, C. Kapusta, M. Nowakowska, S. Zapotoczny, *Characterization of magnetic nanoparticles coated with chitosan derivatives for tissue engineering application*, NanoBio – International Conference on Nanotechnologies and Bionanoscience, 24-28.09.2018, Heraklion, Kreta, Grecja.
6. **A. Gilarska**, J. Lewandowska-Łańcucka, M. Nowakowska, *Physicochemical and biological properties of biomimetic hydrogel materials for tissue engineering application*, 4th International Conference on Biomedical Polymers & Polymeric Biomaterials, 15-18.07.2018, Kraków.
7. **A. Gilarska**, S. Fiejdasz, C. Kapusta, M. Nowakowska, S. Zapotoczny, *Chitosan and its derivatives as biocompatible coatings and scaffold materials*, 4th International Conference on Biomedical Polymers & Polymeric Biomaterials, 15-18.07.2018, Kraków, poster.
8. S. Fiejdasz, **A. Gilarska**, J. Lewandowska-Łańcucka, S. Zapotoczny, M. Nowakowska, C. Kapusta, *Nanoparticles as building blocks for tissue engineering scaffolds*, 9th International Workshop on Interfaces: New Frontiers in Biomaterials, 16-18.04.2018, Santiago de Compostela, Hiszpania.
9. A. Buła, **A. Gilarska**, J. Lewandowska-Łańcucka, A. Łatkiewicz, M. Nowakowska, *Preparation and characterization of the novel bioactive hybrid materials silica particles-apatite*, 20th JCF- Frühjahrssymposium 2018, 03.2018, Konstanz, Niemcy.
10. **A. Gilarska**, J. Lewandowska-Łańcucka, K. Mystek, J. Filipowska, M. Nowakowska, *Biomimetic hydrogel materials for bone tissue engineering*, 19th JCF- Frühjahrssymposium 2017, 29.03-01.04.2017, Mainz, Niemcy.



11. **A. Gilarska**, J. Lewandowska-Łańcucka, K. Mystek, K. Kamiński, M. Romek, B. Sulikowski, M. Nowakowska, *Synthesis and physicochemical characterization of the new drug delivery system based on silicone stabilized lipid vesicles*, Tera 2016 Seminar: New Materials and Techniques in the Theranostics of Degenerative Diseases, 23.09.2016, Kraków.
12. **J. Lewandowska-Łańcucka**, K. Mystek, **A. Gilarska**, K. Kamiński, M. Romek, M. Nowakowska, *Novel Carriers of Biologically Active Substances Based on Silicone Stabilized Lipid Vesicles*, Kick-off Meeting for the GoBone Project, Max Bergmann Center of Biomaterials, 05.2016, Dresden, Niemcy.
13. **K. Mystek**, J. Lewandowska-Łańcucka, **A. Gilarska**, K. Kamiński, M. Romek, M. Nowakowska, *Silicone Stabilized Liposomes As Novel Advanced Drug Delivery System*, 18th JCF-Frühjahrssymposium 2016, 03.2016, Kiel, Niemcy.
14. **K. Mystek**, J. Lewandowska-Łańcucka, **A. Gilarska**, K. Kamiński, M. Nowakowska, *Silicone Stabilized Liposomes As Novel Nanostructural Drug Carriers*, Suspensions – Designing, Synthesis, Properties, Application (SUSPENS), 09.2015, Kraków.

## Konferencje krajowe

### *Prezentacje ustne*

1. **A. Gilarska**, J. Lewandowska-Łańcucka, A. Buła, W. Horak, A. Łatkiewicz, M. Nowakowska, *Bioaktywne hydrożelowe materiały hybrydowe do regeneracji tkanki kostnej*, III Doktoranckie Sympozjum Nanotechnologii NanoMat, 13-14.06.2019, Łódź.
2. **A. Gilarska**, J. Lewandowska-Łańcucka, K. Mystek, M. Romek, B. Sulikowski, M. Nowakowska, *Pęcherzyki lipidowe stabilizowane warstwą silikonową jako nowe nanonośniki substancji biologicznie aktywnych*, Zaawansowane Materiały i Nanotechnologia, 12.03.2017, Kraków.
3. **J. Lewandowska-Łańcucka**, K. Mystek, **A. Gilarska**, K. Kamiński, M. Romek, B. Sulikowski, M. Nowakowska, *Silicone - stabilized liposomes as a possible novel nanocarriers for anticancer drugs*, 24th Kraków Conference on Endothelium/ the 7th interdisciplinary JCET seminar, 06.2016, Wierchomla Mała.
4. **K. Mystek**, J. Lewandowska-Łańcucka, **A. Gilarska**, K. Kamiński, M. Romek, M. Nowakowska, *Nowe nanonośniki substancji biologicznie aktywnych oparte na pęcherzykach lipidowych stabilizowanych warstwą silikonową*, VI Konferencja doktorantów Uniwersytetu Jagiellońskiego - Collegium Medicum, 04.2016, Kraków.

### *Prezentacje posterowe*

1. **A. Gilarska**, K. Kamiński, W. Horak, M. Nowakowska, J. Lewandowska-Łańcucka, *Wielofunkcyjny hydrożelowy materiał hybrydowy do zastosowań w leczeniu ubytków kostnych spowodowanych osteoporozą*, II Sympozjum Biomateriały w medycynie i kosmetologii, 28.01.2021, Toruń, konferencja online.
2. **A. Gilarska**, S. Fiejdasz, S. Zapotoczny, M. Nowakowska, C. Kapusta, *Otrzymywanie i właściwości nanocząstek magnetycznych do zastosowań w inżynierii tkankowej*, Dokonania naukowe doktorantów, 30.03.2019, Poznań.

3. A. Buła, **A. Gilarska**, J. Lewandowska-Łańcucka, A. Łatkiewicz, M. Nowakowska, *Fabrication of biomimetic multicomponent hydrogel-based scaffolds for potential bone tissue engineering applications*, Horyzonty Nauki: Forum Prac Dyplomowych 2018, 05.2018, Kraków.
4. **A. Gilarska**, J. Lewandowska-Łańcucka, K. Mystek, M. Nowakowska, J. Filipowska, *Biomimetyczne materiały hydrożelowe dla potrzeb inżynierii tkankowej*, Kraków InnoTech Summit 2017, 26.10.2017, Kraków.
5. **A. Gilarska**, J. Lewandowska-Łańcucka, K. Mystek, J. Filipowska, M. Nowakowska, *Biomimetic hydrogel materials for bone tissue engineering*, Horyzonty Nauki: Forum Prac Dyplomowych 2017, 23-24.05.2017, Kraków.
6. **A. Gilarska**, J. Lewandowska-Łańcucka, K. Mystek, K. Kamiński, M. Romek, B. Sulikowski, M. Nowakowska, *Nowe nanonośniki leków oparte na liposomach stabilizowanych warstwą silikonową*, Samoorganizacja, mikroskopia, spektroskopia, 6-7.10.2016, Kraków.
7. J. Lewandowska-Łańcucka, K. Mystek, **A. Gilarska**, K. Kamiński, M. Romek, B. Sulikowski, M. Nowakowska, *Silicone - stabilized liposomes as a possible novel nanocarriers for anticancer drugs*, 24th Kraków Conference on Endothelium/ the 7th interdisciplinary JCET seminar, 06.2016, Wierchomla Mała.
8. K. Mystek, J. Lewandowska-Łańcucka, **A. Gilarska**, K. Kamiński, M. Nowakowska, *Silicone Stabilized Liposomes As Novel Nanostructural Drug Carriers*, Zjazd Zimowy Sekcji Studenckiej PTChem 2015, 12.2015, Kraków.

## Stypendia

1. Stypendium za osiągnięcia naukowe z Własnego Funduszu AGH w roku akademickim 2021/2022.
2. Stypendium Rektora AGH dla najlepszych doktorantów w roku akademickim 2019/2020.
3. Stypendium Rektora AGH dla najlepszych doktorantów oraz zwiększenie stypendium doktoranckiego z dotacji projakościowej w roku akademickim 2018/2019.
4. Stypendium Rektora UJ dla najlepszych studentów w roku akademickim 2016/2017.
5. Stypendium im. Mariana Smoluchowskiego z funduszy KNOW dla najlepszych studentów studiów II stopnia na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej UJ w roku akademickim 2016/2017.
6. Stypendium motywacyjne dla najlepszych studentów studiów I stopnia na kierunku Zaawansowane Materiały i Nanotechnologia WFAiS UJ w ramach programu „kierunków zamawianych”, finansowane z europejskiego Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki w roku akademickim 2012/2013, 2013/2014 oraz 2014/2015.

## Bibliografia

---

- [1] Noncommunicable diseases progress monitor 2020. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO, ISBN 978-92-4-000049-0.
- [2] Ageing Europe — looking at the lives of older people in the EU — 2020 edition, Eurostat, ISBN 978-92-76-21520-2. <https://doi.org/10.2785/628105>.
- [3] Xia, H., Li, X., Gao, W., Fu, X., Fang, R. H., Zhang, L., Zhang, K. (2018). Tissue repair and regeneration with endogenous stem cells. *Nature Reviews Materials*, 3(7), 174-193. <https://doi.org/10.1038/s41578-018-0027-6>.
- [4] Daar, A. S., Greenwood, H. L. (2007). A proposed definition of regenerative medicine. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 1(3), 179-184. <https://doi.org/10.1002/term.20>.
- [5] Berthiaume, F., Maguire, T. J., Yarmush, M. L. (2011). Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 2, 403-430. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257>.
- [6] Green, H., Kehinde, O., Thomas, J. (1979). Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(11), 5665-5668. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.11.5665>.
- [7] Bell, E., Ehrlich, H. P., Buttle, D. J., Nakatsuji, T. (1981). Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science*, 211(4486), 1052-1054. <https://doi.org/10.1126/science.7008197>.
- [8] Vacanti, J. P., Morse, M. A., Saltzman, W. M., Domb, A. J., Perez-Atayde, A., Langer, R. (1988). Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *Journal of pediatric surgery*, 23(1), 3-9. [https://doi.org/10.1016/S0022-3468\(88\)80529-3](https://doi.org/10.1016/S0022-3468(88)80529-3).
- [9] Langer, R., Vacanti, J. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260(5110), 920-926. <https://doi.org/10.1126/science.8493529>.
- [10] Almouemen, N., Kelly, H. M., O'leary, C. (2019). Tissue engineering: understanding the role of biomaterials and biophysical forces on cell functionality through computational and structural biotechnology analytical methods. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 591-598. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.04.008>.
- [11] Howard, D., Buttery, L. D., Shakesheff, K. M., Roberts, S. J. (2008). Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *Journal of anatomy*, 213(1), 66-72. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00878.x>.
- [12] Asadian, M., Chan, K. V., Norouzi, M., Grande, S., Cools, P., Morent, R., De Geyter, N. (2020). Fabrication and plasma modification of nanofibrous tissue engineering scaffolds. *Nanomaterials*, 10(1), 119. <https://doi.org/10.3390/nano10010119>.

- 
- [13] Roseti, L., Parisi, V., Petretta, M., Cavallo, C., Desando, G., Bartolotti, I., Grigolo, B. (2017). Scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and new perspectives. *Materials Science and Engineering: C*, 78, 1246-1262. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.017>.
- [14] Wubneh, A., Tsekoura, E. K., Ayranci, C., Uludağ, H. (2018). Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 80, 1-30. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.031>.
- [15] Agarwal, R., García, A. J. (2015). Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair. *Advanced drug delivery reviews*, 94, 53-62. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.03.013>.
- [16] Reichert J.C., Hutmacher D.W. (2011). Bone Tissue Engineering. In: Pallua N., Suscheck C. (eds) Tissue Engineering. Springer, Berlin, Heidelberg, ISBN 978-3-642-02824-3. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-02824-3\\_21](https://doi.org/10.1007/978-3-642-02824-3_21)
- [17] Koons, G. L., Diba, M., Mikos, A. G. (2020). Materials design for bone-tissue engineering. *Nature Reviews Materials*, 5(8), 584-603. <https://doi.org/10.1038/s41578-020-0204-2>.
- [18] Cipitria, A., Wagermaier, W., Zaslansky, P., Schell, H., Reichert, J. C., Fratzl, P., ... Duda, G. N. (2015). BMP delivery complements the guiding effect of scaffold architecture without altering bone microstructure in critical-sized long bone defects: a multiscale analysis. *Acta biomaterialia*, 23, 282-294. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.05.015>.
- [19] Philippart, A., Boccaccini, A. R., Fleck, C., Schubert, D. W., Roether, J. A. (2015). Toughening and functionalization of bioactive ceramic and glass bone scaffolds by biopolymer coatings and infiltration: a review of the last 5 years. *Expert review of medical devices*, 12(1), 93-111. <https://doi.org/10.1586/17434440.2015.958075>.
- [20] Li, J. J., Ebied, M., Xu, J., Zreiqat, H. (2017). Current Approaches to Bone Tissue Engineering: The Interface between Biology and Engineering. *Advanced Healthcare Materials*, 7(6), 1701061. <https://doi.org/10.1002/adhm.201701061>.
- [21] Sainio, A., Järveläinen, H. (2020). Extracellular matrix-cell interactions: Focus on therapeutic applications. *Cellular Signalling*, 66, 109487. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109487>.
- [22] Kusindarta, D. L., Wihadmadyatami, H. (2018). The role of extracellular matrix in tissue regeneration. *Tissue regeneration*, 65. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75728>.
- [23] Kular, J. K., Basu, S., Sharma, R. I. (2014). The extracellular matrix: structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *Journal of tissue engineering*, 5, 2041731414557112. <https://doi.org/10.1177/2041731414557112>.
- [24] Chan, B. P., Leong, K. W. (2008). Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European spine journal*, 17(4), 467-479. <https://doi.org/10.1007/s00586-008-0745-3>.

- 
- [25] Loh, Q. L., Choong, C. (2013). Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 19(6), 485-502. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0437>.
- [26] Calori, G. M., Mazza, E., Colombo, M., Ripamonti, C. (2011). The use of bone-graft substitutes in large bone defects: Any specific needs? *Injury*, 42, S56–S63. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.06.011>.
- [27] Blokhuis, T. J., Arts, J. J. C. (2011). Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: Definitions, facts and myths. *Injury*, 42, S26–S29. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.06.010>.
- [28] O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials today*, 14(3), 88-95. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X).
- [29] Marin, E., Boschetto, F., Pezzotti, G. (2020). Biomaterials and biocompatibility: An historical overview. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 108(8), 1617-1633. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36930>.
- [30] Keane, T. J., Badylak, S. F. (2014). Biomaterials for tissue engineering applications. *Seminars in Pediatric Surgery*, 23(3), 112–118. <https://doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2014.06.010>.
- [31] Ning, C., Zhou, L., Tan, G. (2016). Fourth-generation biomedical materials. *Mater. Today*, 19(1), 2-3. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2015.11.005>.
- [32] Filippi, M., Born, G., Chaaban, M., Scherberich, A. (2020). Natural polymeric scaffolds in bone regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 474. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00474>.
- [33] Ślósarczyk, A. (2012). Dlaczego fosforany wapnia? Przeszłość, terażniejszość i przyszłość bioceramiki CaPs. *Szkoło i Ceramika*, 63(1), 3-9, ISSN 0039-8144.
- [34] Teixeira, S., Fernandes, H., Leusink, A., van Blitterswijk, C., Ferraz, M. P., Monteiro, F. J., de Boer, J. (2010). In vivo evaluation of highly macroporous ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 93(2), 567-575. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32532>.
- [35] Baino, F., Novajra, G., Vitale-Brovarone, C. (2015). Bioceramics and scaffolds: a winning combination for tissue engineering. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3, 202. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00202>.
- [36] Miguel, B. S., Kriauciunas, R., Tosatti, S., Ehrbar, M., Ghayor, C., Textor, M., Weber, F. E. (2010). Enhanced osteoblastic activity and bone regeneration using surface-modified porous bioactive glass scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 94(4), 1023-1033. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32773>.

- 
- [37] Kaur, G., Kumar, V., Bains, F., Mauro, J. C., Pickrell, G., Evans, I., Bretcanu, O. (2019). Mechanical properties of bioactive glasses, ceramics, glass-ceramics and composites: State-of-the-art review and future challenges. *Materials science and engineering: C*, 104, 109895. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109895>.
- [38] Olszówka, M., Maciąg, K. (2015). Nowoczesne trendy w medycynie. Fundacja na rzecz promocji nauki i rozwoju TYGIEL, Lublin, ISBN 978-83-65272-10-2.
- [39] Asghari, F., Samiei, M., Adibkia, K., Akbarzadeh, A., Davaran, S. (2016). Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45(2), 185–192. <https://doi.org/10.3109/21691401.2016.1146731>.
- [40] Place, E. S., George, J. H., Williams, C. K., Stevens, M. M. (2009). Synthetic polymer scaffolds for tissue engineering. *Chemical Society Reviews*, 38(4), 1139. <https://doi.org/10.1039/B811392K>.
- [41] Hoyer, B., Bernhardt, A., Lode, A., Heinemann, S., Sewing, J., Klinger, M., ... Gelinsky, M. (2014). Jellyfish collagen scaffolds for cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 10(2), 883–892. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.022>.
- [42] Alizadeh-Osgouei, M., Li, Y., Vahid, A., Ataee, A., Wen, C. (2021). High strength porous PLA gyroid scaffolds manufactured via fused deposition modeling for tissue-engineering applications. *Smart Materials in Medicine*, 2, 15-25. <https://doi.org/10.1016/j.smaim.2020.10.003>.
- [43] Khan, F., Tanaka, M., Ahmad, S. R. (2015). Fabrication of polymeric biomaterials: a strategy for tissue engineering and medical devices. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(42), 8224–8249. <https://doi.org/10.1039/C5TB01370D>.
- [44] Buwalda, S. J., Boere, K. W. M., Dijkstra, P. J., Feijen, J., Vermonden, T., Hennink, W. E. (2014). Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials. *Journal of Controlled Release*, 190, 254–273. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.052>.
- [45] Wichterle, O., Lim, D. (1960). Hydrophilic gels for biological use. *Nature*, 185(4706), 117-118. <https://doi.org/10.1038/185117a0>.
- [46] Bahram, M., Mohseni, N., Moghtader, M. (2016). An introduction to hydrogels and some recent applications. In *Emerging concepts in analysis and applications of hydrogels*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/64301>.
- [47] Chai, Q., Jiao, Y., Yu, X. (2017). Hydrogels for Biomedical Applications: Their Characteristics and the Mechanisms behind Them. *Gels*, 3(1), 6. <https://doi.org/10.3390/gels3010006>.
- [48] Gun'ko, V., Savina, I., Mikhailovsky, S. (2017). Properties of Water Bound in Hydrogels. *Gels*, 3(4), 37. <https://doi.org/10.3390/gels3040037>.
- [49] Doderio, A., Pianella, L., Vicini, S., Alloisio, M., Ottonelli, M., Castellano, M. (2019). Alginate-based hydrogels prepared via ionic gelation: An experimental design approach to predict the crosslinking degree. *European Polymer Journal*, 118, 586-594. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.06.028>.

- 
- [50] Chang, X., Geng, Y., Cao, H., Zhou, J., Tian, Y., Shan, G., ... Pan, P. (2018). Dual-Crosslink Physical Hydrogels with High Toughness Based on Synergistic Hydrogen Bonding and Hydrophobic Interactions. *Macromolecular Rapid Communications*, 39(14), 1700806. <https://doi.org/10.1002/marc.201700806>.
- [51] Sepulveda-Medina, P. I., Wang, C., Li, R., Fukuto, M., Weiss, R. A., Vogt, B. D. (2020). Kinetically controlled morphology in copolymer-based hydrogels crosslinked by crystalline nanodomains determines efficacy of ice inhibition. *Molecular Systems Design & Engineering*, 5(3), 645-655. <https://doi.org/10.1039/C9ME00101H>.
- [52] Hu, W., Wang, Z., Xiao, Y., Zhang, S., Wang, J. (2019). Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels. *Biomaterials science*, 7(3), 843-855. <https://doi.org/10.1039/C8BM01246F>.
- [53] Martínez-Mejía, G., Vázquez-Torres, N. A., Castell-Rodríguez, A., del Río, J. M., Corea, M., Jiménez-Juárez, R. (2019). Synthesis of new chitosan-glutaraldehyde scaffolds for tissue engineering using Schiff reactions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 579, 123658. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.123658>.
- [54] Bo, Q., Yan, L., Li, H., Jia, Z., Zhan, A., Chen, J., ... Chen, R. (2020). Decellularized dermal matrix-based photo-crosslinking hydrogels as a platform for delivery of adipose derived stem cells to accelerate cutaneous wound healing. *Materials & Design*, 196, 109152. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2020.109152>.
- [55] McGill, M., Coburn, J. M., Partlow, B. P., Mu, X., Kaplan, D. L. (2017). Molecular and macro-scale analysis of enzyme-crosslinked silk hydrogels for rational biomaterial design. *Acta Biomaterialia*, 63, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.09.020>.
- [56] Bhattacharjee, P., Ahearne, M. (2021). Significance of Crosslinking Approaches in the Development of Next Generation Hydrogels for Corneal Tissue Engineering. *Pharmaceutics*, 13(3), 319. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030319>.
- [57] Ullah, F., Othman, M. B. H., Javed, F., Ahmad, Z., Akil, H. M. (2015). Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 57, 414–433. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.053>.
- [58] Wang, Y., Wang, J., Yuan, Z., Han, H., Li, T., Li, L., Guo, X. (2017). Chitosan cross-linked poly(acrylic acid) hydrogels: Drug release control and mechanism. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 152, 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.01.008>.
- [59] Osman, A., Oner, E. T., Eroglu, M. S. (2017). Novel levan and pNIPA temperature sensitive hydrogels for 5-ASA controlled release. *Carbohydrate Polymers*, 165, 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.097>.
- [60] Tavakoli, S., Klar, A. S. (2020). Advanced Hydrogels as Wound Dressings. *Biomolecules*, 10(8), 1169. <https://doi.org/10.3390/biom10081169>.
- [61] Cascone, S., Lamberti, G. (2020). Hydrogel-based commercial products for biomedical applications: A review. *International journal of pharmaceutics*, 573, 118803. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118803>.

- 
- [62] Liu, Y., Fan, D. (2019). Novel hyaluronic acid-tyrosine/collagen-based injectable hydrogels as soft filler for tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*, 141, 700-712. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.233>.
- [63] Hou, S., Niu, X., Li, L., Zhou, J., Qian, Z., Yao, D., ... Fan, Y. (2019). Simultaneous nano-and microscale structural control of injectable hydrogels via the assembly of nanofibrous protein microparticles for tissue regeneration. *Biomaterials*, 223, 119458. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119458>.
- [64] Mousavi, A., Mashayekhan, S., Baheiraei, N., Pourjavadi, A. (2021). Biohybrid oxidized alginate/myocardial extracellular matrix injectable hydrogels with improved electromechanical properties for cardiac tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 180, 692–708. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.097>.
- [65] Kondiah, P., Choonara, Y., Kondiah, P., Marimuthu, T., Kumar, P., du Toit, L., Pillay, V. (2016). A Review of Injectable Polymeric Hydrogel Systems for Application in Bone Tissue Engineering. *Molecules*, 21(11), 1580. <https://doi.org/10.3390/molecules21111580>.
- [66] Gelse, K., Pöschl, E., Aigner, T. (2003). Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews*, 55(12), 1531-1546. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.002>.
- [67] Sionkowska, A., Skrzyński, S., Śmiechowski, K., Kołodziejczak, A. (2016). The review of versatile application of collagen. *Polymers for Advanced Technologies*, 28(1), 4–9. <https://doi.org/10.1002/pat.3842>.
- [68] Czubak, K. A., Żbikowska, H. M. (2014). Struktura, funkcja i znaczenie biomedyczne kolagenów. In *Annales Academiae Medicae Silesiensis* (Vol. 4, No. 68, pp. 245-254), ISSN 1734-025X.
- [69] Reilly, D. M., Lozano, J. (2021). Skin collagen through the lifestages: Importance for skin health and beauty. *Plastic and Aesthetic Research*, 8, 2. <https://doi.org/10.20517/2347-9264.2020.153>.
- [70] Karsdal, M. (2019). *Biochemistry of collagens, laminins and elastin: structure, function and biomarkers*. Academic Press. ISBN 9780128170694.
- [71] Makareeva, E., Leikin, S. (2014). Collagen structure, folding and function. In *Osteogenesis Imperfecta* (pp. 71-84). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397165-4.00007-1>.
- [72] Lin, K., Zhang, D., Macedo, M. H., Cui, W., Sarmiento, B., Shen, G. (2019). Advanced collagen-based biomaterials for regenerative biomedicine. *Advanced Functional Materials*, 29(3), 1804943. <https://doi.org/10.1002/adfm.201804943>.
- [73] Tian, Z., Liu, W., Li, G. (2016). The microstructure and stability of collagen hydrogel cross-linked by glutaraldehyde. *Polymer Degradation and Stability*, 130, 264-270. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.06.015>,
- [74] Tian, Z., Duan, L., Wu, L., Shen, L., Li, G. (2016). Rheological properties of glutaraldehyde-crosslinked collagen solutions analyzed quantitatively using mechanical models. *Materials Science and Engineering: C*, 63, 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.02.047>.



- 
- [75] Veríssimo, D. M., Leitão, R. F. C., Ribeiro, R. A., Figueiró, S. D., Sombra, A. S. B., Góes, J. C., Brito, G. A. C. (2010). Polyanionic collagen membranes for guided tissue regeneration: Effect of progressive glutaraldehyde cross-linking on biocompatibility and degradation. *Acta Biomaterialia*, 6(10), 4011-4018. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.04.012>.
- [76] Younes, I., Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine drugs*, 13(3), 1133-1174. <https://doi.org/10.3390/md13031133>.
- [77] Muxika, A., Etxabide, A., Uranga, J., Guerrero, P., de la Caba, K. (2017). Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 1358–1368. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087>.
- [78] Ibrahim, H. M., El-Zairy, E. M. R. (2015). Chitosan as a biomaterial—structure, properties, and electrospun nanofibers. *Concepts, compounds and the alternatives of antibacterials*, 1(1), 81-101. <https://doi.org/10.5772/61300>.
- [79] Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012>.
- [80] Matica, M. A., Aachmann, F. L., Tøndervik, A., Sletta, H., Ostafe, V. (2019). Chitosan as a wound dressing starting material: Antimicrobial properties and mode of action. *International journal of molecular sciences*, 20(23), 5889. <https://doi.org/10.3390/ijms20235889>.
- [81] Chen, J., Li, Y., Wang, B., Yang, J., Heng, B. C., Yang, Z., ... Lin, J. (2018). TGF- $\beta$ 1 affinity peptides incorporated within a chitosan sponge scaffold can significantly enhance cartilage regeneration. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(4), 675–687. <https://doi.org/10.1039/C7TB02132A>.
- [82] Wu, C., Su, H., Karydis, A., Anderson, K. M., Ghadri, N., Tang, S., ... Bumgardner, J. D. (2017). Mechanically stable surface-hydrophobilized chitosan nanofibrous barrier membranes for guided bone regeneration. *Biomedical Materials*, 13(1), 015004. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aa853c>.
- [83] Kim, B. S., Kim, S. H., Kim, K., An, Y. H., So, K. H., Kim, B. G., Hwang, N. S. (2020). Enzyme-mediated one-pot synthesis of hydrogel with the polyphenol cross-linker for skin regeneration. *Materials Today Bio*, 8, 100079. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2020.100079>.
- [84] Pankongadisak, P., Suwantong, O. (2019). Enhanced properties of injectable chitosan-based thermogelling hydrogels by silk fibroin and longan seed extract for bone tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*, 138, 412-424. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.100>.
- [85] Saekhor, K., Udomsinprasert, W., Honsawek, S., Tachaboonyakiat, W. (2019). Preparation of an injectable modified chitosan-based hydrogel approaching for bone tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*, 123, 167-173. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.041>.

- 
- [86] Kazemi-Aghdam, F., Jahed, V., Dehghan-Niri, M., Ganji, F., Vasheghani-Farahani, E. (2021). Injectable chitosan hydrogel embedding modified halloysite nanotubes for bone tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 269, 118311. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118311>.
- [87] Meyer, K., Palmer, J. W. (1934). The polysaccharide of the vitreous humor. *Journal of Biological Chemistry*, 107(3), 629-634. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)75338-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)75338-6).
- [88] Sudha, P. N., Rose, M. H. (2014). Beneficial effects of hyaluronic acid. *Advances in food and nutrition research*, 72, 137-176. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800269-8.00009-9>.
- [89] de Oliveira, J. D., Carvalho, L. S., Gomes, A. M. V., Queiroz, L. R., Magalhães, B. S., Parachin, N. S. (2016). Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. *Microbial cell factories*, 15(1), 1-19. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0517-4>.
- [90] Kogan, G., Šoltés, L., Stern, R., Gemeiner, P. (2006). Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, 29(1), 17–25. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9219-z>.
- [91] Carlson, E., Kao, W. W. Y., Ogundele, A. (2018). Impact of Hyaluronic Acid-Containing Artificial Tear Products on Reepithelialization in an In Vivo Corneal Wound Model. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 34(4), 360–364. <https://doi.org/10.1089/jop.2017.0080>.
- [92] Fakhari, A., Berklund, C. (2013). Applications and emerging trends of hyaluronic acid in tissue engineering, as a dermal filler and in osteoarthritis treatment. *Acta Biomaterialia*, 9(7), 7081–7092. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.03.005>.
- [93] Olejnik, A. N. N. A., Goscianska, J., Nowak, I. (2012). Significance of hyaluronic acid in cosmetic industry and aesthetic medicine. *Chemik*, 66(2), 129-135.
- [94] Collins, M. N., Birkinshaw, C. (2013). Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1262–1279. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.028>.
- [95] Lee, H.-Y., Hwang, C.-H., Kim, H.-E., Jeong, S.-H. (2018). Enhancement of bio-stability and mechanical properties of hyaluronic acid hydrogels by tannic acid treatment. *Carbohydrate Polymers*, 186, 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.056>.
- [96] Del Olmo, J. A., Alonso, J. M., Martínez, V. S., Ruiz-Rubio, L., González, R. P., Vilas-Vilela, J. L., Pérez-Álvarez, L. (2021). Biocompatible hyaluronic acid-divinyl sulfone injectable hydrogels for sustained drug release with enhanced antibacterial properties against *Staphylococcus aureus*. *Materials Science and Engineering: C*, 125, 112102. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112102>.
- [97] Yan, S., Wang, Q., Tariq, Z., You, R., Li, X., Li, M., Zhang, Q. (2018). Facile preparation of bioactive silk fibroin/hyaluronic acid hydrogels. *International journal of biological macromolecules*, 118, 775-782. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.138>.

- 
- [98] Oryan, A., Kamali, A., Moshiri, A., Baharvand, H., Daemi, H. (2018). Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 678–688. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.184>.
- [99] Li, Y., Li, L., Hölscher, C. (2016). Therapeutic potential of genipin in central neurodegenerative diseases. *CNS drugs*, 30(10), 889-897. <https://doi.org/10.1007/s40263-016-0369-9>.
- [100] Dimida, S., Barca, A., Cancelli, N., De Benedictis, V., Raucci, M. G., Demitri, C. (2017). Effects of Genipin Concentration on Cross-Linked Chitosan Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Structural Characterization and Evidence of Biocompatibility Features. *International Journal of Polymer Science*, 2017, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/8410750>.
- [101] Perez-Puyana, V., Rubio-Valle, J. F., Jiménez-Rosado, M., Guerrero, A., Romero, A. (2020). Chitosan as a potential alternative to collagen for the development of genipin-crosslinked scaffolds. *Reactive and Functional Polymers*, 146, 104414. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104414>.
- [102] Montalbano, G., Borciani, G., Cerqueni, G., Licini, C., Banche-Niclot, F., Janner, D., ... Vitale-Brovarone, C. (2020). Collagen hybrid formulations for the 3d printing of nanostructured bone scaffolds: An optimized genipin-crosslinking strategy. *Nanomaterials*, 10(9), 1681. <https://doi.org/10.3390/nano10091681>.
- [103] Lewandowska-Łańcucka, J., Fiejdasz, S., Rodzik, Ł., Łatkiewicz, A., Nowakowska, M. (2015). Novel hybrid materials for preparation of bone tissue engineering scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 26(9), 1-15. <https://doi.org/10.1007/s10856-015-5564-6>.
- [104] Butler, M. F., Ng, Y. F., Pudney, P. D. (2003). Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 41(24), 3941-3953. <https://doi.org/10.1002/pola.10960>.
- [105] Dimida, S., Demitri, C., De Benedictis, V. M., Scalera, F., Gervaso, F., Sannino, A. (2015). Genipin-cross-linked chitosan-based hydrogels: reaction kinetics and structure-related characteristics. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(28). <https://doi.org/10.1002/app.42256>.
- [106] Pujana, M. A., Pérez-Álvarez, L., Iturbe, L. C. C., Katime, I. (2013). Biodegradable chitosan nanogels crosslinked with genipin. *Carbohydrate Polymers*, 94(2), 836-842. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.082>.
- [107] Wahid, F., Khan, T., Hussain, Z., Ullah, H. (2018). Nanocomposite scaffolds for tissue engineering; properties, preparation and applications. In *Applications of nanocomposite materials in drug delivery* (pp. 701-735). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813741-3.00031-5>.
- [108] Nanko, M. (2009). Definitions and categories of hybrid materials. *AZojomo*, 6(August), 1-8, ISSN 1833-122X.
- [109] Mir, S. H., Nagahara, L. A., Thundat, T., Mokarian-Tabari, P., Furukawa, H., Khosla, A. (2018). Organic-inorganic hybrid functional materials: An integrated platform for applied technologies. *Journal of The Electrochemical Society*, 165(8), B3137. <https://doi.org/10.1149/2.0191808jes>.

- 
- [110] Fawaz, J., Mittal, V. (2015). Synthesis of polymer nanocomposites: review of various techniques. *Synthesis techniques for polymer nanocomposites*, 1-30. <https://doi.org/10.1002/9783527670307.ch1>.
- [111] Park, W., Shin, H., Choi, B., Rhim, W. K., Na, K., Han, D. K. (2020). Advanced hybrid nanomaterials for biomedical applications. *Progress in Materials Science*, 114, 100686. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2020.100686>.
- [112] Mostafavi, A., Quint, J., Russell, C., Tamayol, A. (2020). Nanocomposite hydrogels for tissue engineering applications. In *Biomaterials for Organ and Tissue Regeneration* (pp. 499-528). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102906-0.00023-4>.
- [113] Wang, K., Cheng, W., Ding, Z., Xu, G., Zheng, X., Li, M., ... Lu, Q. (2021). Injectable silk/hydroxyapatite nanocomposite hydrogels with vascularization capacity for bone regeneration. *Journal of Materials Science & Technology*, 63, 172-181. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2020.02.030>.
- [114] Bakhtiarimoghadam, B., Shirian, S., Mirzaei, E., Sharifi, S., Karimi, I., Gharati, G., ... Nazari, H. (2021). Comparison capacity of collagen hydrogel, mix-powder and in situ hydroxyapatite/collagen hydrogel scaffolds with and without mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma in regeneration of critical sized bone defect in a rabbit animal model. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 109(12), 2199-2212. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34867>.
- [115] Song, T., Zhao, F., Wang, Y., Li, D., Lei, N., Li, X., ... Zhang, X. (2021). Constructing a biomimetic nanocomposite with the in situ deposition of spherical hydroxyapatite nanoparticles to induce bone regeneration. *Journal of Materials Chemistry B*, 9(10), 2469-2482. <https://doi.org/10.1039/D0TB02648D>.
- [116] Zou, Z., Wang, L., Zhou, Z., Sun, Q., Liu, D., Chen, Y., ... Zou, X. (2021). Simultaneous incorporation of PTH (1-34) and nano-hydroxyapatite into Chitosan/Alginate Hydrogels for efficient bone regeneration. *Bioactive materials*, 6(6), 1839-1851. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.11.021>.
- [117] Tentor, F. R., de Oliveira, J. H., Scariot, D. B., Lazzarin-Bidóia, D., Bonafé, E. G., Nakamura, C. V., ... Martins, A. F. (2017). Scaffolds based on chitosan/pectin thermosensitive hydrogels containing gold nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 1186-1194. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.106>.
- [118] Zazakowny, K., Lewandowska-Łańcucka, J., Mastalska-Popławska, J., Kamiński, K., Kusior, A., Radecka, M., Nowakowska, M. (2016). Biopolymeric hydrogels – nanostructured TiO<sub>2</sub> hybrid materials as potential injectable scaffolds for bone regeneration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 148, 607-614. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.09.031>.
- [119] Jauch, P., Weidner, A., Riedel, S., Wilharm, N., Dutz, S., Mayr, S. G. (2020). Collagen-iron oxide nanoparticle based ferrogel: large reversible magnetostrains with potential for bioactuation. *Multifunctional Materials*, 3(3), 035001. <https://doi.org/10.1088/2399-7532/abaa2d>.

- 
- [120] Ghanbari, M., Salavati-Niasari, M., Mohandes, F., Dolatyar, B., Zeynali, B. (2021). In vitro study of alginate–gelatin scaffolds incorporated with silica Nps as injectable, biodegradable hydrogels. *RSC Advances*, 11(27), 16688-16697. <https://doi.org/10.1039/D1RA02744A>.
- [121] Carlisle, E. M. (1970). Silicon: a possible factor in bone calcification. *Science*, 167(3916), 279-280. <https://doi.org/10.1126/science.167.3916.279>.
- [122] Derus, N., Filipowska, J., Osyczka, A. (2012). Wpływ podłoża i rusztowań zawierających krzem lub jego związki na osteogenezę in vitro mezenchymalnych komórek macierzystych i komórek osteoprogenitorowych. *Postępy Biologii Komórki*, 39(3).
- [123] Price, C. T., Koval, K. J., Langford, J. R. (2013). Silicon: a review of its potential role in the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *International journal of endocrinology*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/316783>.
- [124] Rabolli, V., Thomassen, L. C. J., Princen, C., Napierska, D., Gonzalez, L., Kirsch-Volders, M., ... Lison, D. (2010). Influence of size, surface area and microporosity on the in vitro cytotoxic activity of amorphous silica nanoparticles in different cell types. *Nanotoxicology*, 4(3), 307–318. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.482749>.
- [125] Kersting, M., Olejnik, M., Rosenkranz, N., Loza, K., Breisch, M., Rostek, A., ... Epple, M. (2020). Subtoxic cell responses to silica particles with different size and shape. *Scientific Reports*, 10(1), 1-17. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78550-5>.
- [126] Kim, K. J., Choi, M. S., Shim, J. H., Rhie, J. W. (2019). Bone morphogenetic protein 2-conjugated silica particles enhanced early osteogenic differentiation of adipose stem cells on the polycaprolactone scaffold. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 16(4), 395-403. <https://doi.org/10.1007/s13770-019-00195-x>.
- [127] Luo, Z., Deng, Y., Zhang, R., Wang, M., Bai, Y., Zhao, Q., ... Wei, S. (2015). Peptide-laden mesoporous silica nanoparticles with promoted bioactivity and osteo-differentiation ability for bone tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 131, 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.04.043>.
- [128] Yang, X., Li, Y., Liu, X., Huang, Q., He, W., Zhang, R., ... Benayahu, D. (2016). The stimulatory effect of silica nanoparticles on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Biomedical Materials*, 12(1), 015001. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/12/1/015001>.
- [129] Sarker, B., Lyer, S., Arkudas, A., Boccaccini, A. R. (2013). Collagen/silica nanocomposites and hybrids for bone tissue engineering. *Nanotechnology Reviews*, 2(4), 427-447. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2013-0012>.
- [130] Takadama, H., Kim, H. M., Miyaji, F., Kokubo, T., Nakamura, T. (2000). Mechanism of Apatite Formation Induced by Silanol Groups TEM Observation. *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 108(1254), 118-121. [https://doi.org/10.2109/jcersj.108.1254\\_118](https://doi.org/10.2109/jcersj.108.1254_118).
- [131] Zych, Ł., Osyczka, A. M., Łacz, A., Różycka, A., Niemiec, W., Rapacz-Kmita, A., Dzierzkowska, E., Stodolak-Zych, E. (2021). How Surface Properties of Silica Nanoparticles Influence Structural,

---

Microstructural and Biological Properties of Polymer Nanocomposites. *Materials*, 14(4), 843. <https://doi.org/10.3390/ma14040843>.

[132] Lewandowska-Łańcucka, J., Fiejdasz, S., Rodzik, Ł., Kozieł, M., Nowakowska, M. (2015). Bioactive hydrogel-nanosilica hybrid materials: a potential injectable scaffold for bone tissue engineering. *Biomedical Materials*, 10(1), 015020. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/10/1/015020>.

[133] Filipowska, J., Lewandowska-Łańcucka, J., Gilarska, A., Niedźwiedzki, Ł., Nowakowska, M. (2018). In vitro osteogenic potential of collagen/chitosan-based hydrogels-silica particles hybrids in human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell cultures. *International journal of biological macromolecules*, 113, 692-700. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.161>.

[134] Cheng, Y., Cheng, G., Xie, C., Yin, C., Dong, X., Li, Z., Zhou, X., Wang, Q., Deng, H., Li, Z. (2021). Biomimetic Silk Fibroin Hydrogels Strengthened by Silica Nanoparticles Distributed Nanofibers Facilitate Bone Repair. *Advanced Healthcare Materials*, 10(9), 2001646. <https://doi.org/10.1002/adhm.202001646>.

[135] Kanis, J. A., Norton, N., Harvey, N. C., Jacobson, T., Johansson, H., Lorentzon, M., McCloskey, E. V., Willers, C., Borgström, F. (2021). SCOPE 2021: a new scorecard for osteoporosis in Europe. *Archives of osteoporosis*, 16(1), 1-82. <https://doi.org/10.1007/s11657-020-00871-9>.

[136] on Osteoporosis, N. C. D. P., Prevention, D. (2001). Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *Jama*, 285(6), 785-795. <https://doi.org/10.1001/jama.285.6.785>.

[137] Tkaczuk-Wlach, J., Sobstyl, M., Jakiel, G. (2010). Osteoporoza-obraz kliniczny, czynniki ryzyka i diagnostyka. *Przegląd Menopauzalny*, 14(2), 113.

[138] Janiszewska, M., Kulik, T., Dziedzic, M., Żołnierczuk-Kieliszek, D., Barańska, A. (2015). Osteoporoza jako problem społeczny-patogeneza, objawy i czynniki ryzyka osteoporozy pomenopauzalnej. *Probl Hig Epidemiol*, 96(1), 106-114.

[139] Chhipa, N. M., Sen, D. J. (2013). Aminobiphosphonates in osteoporosis: a review. *Int J Drug Dev & Res*, 5, 120-132, ISSN 0975-9344.

[140] Rachner, T. D., Khosla, S., Hofbauer, L. C. (2011). Osteoporosis: now and the future. *The Lancet*, 377(9773), 1276-1287. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62349-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62349-5).

[141] Drake, M. T., Clarke, B. L., Khosla, S. (2008, September). Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 83, No. 9, pp. 1032-1045). Elsevier. <https://doi.org/10.4065/83.9.1032>.

[142] Czyżykowski, R., Krakowska, M., Potemski, P. (2017). Zastosowanie bisfosfonianów u pacjentów z nowotworami narządowymi. *Onkologia w Praktyce Klinicznej-Edukacja*, 3(6), 295-302.

[143] National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 23681107, Fosamax. Retrieved August 31, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fosamax>.

- 
- [144] National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Substance Record for SID 24724391, Alendronate sodium trihydrate, >=97% (NMR), powder, Source: Sigma-Aldrich. Retrieved August 31, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/24724391>.
- [145] Vasikaran, S. D. (2001). Bisphosphonates: an overview with special reference to alendronate. *Annals of clinical biochemistry*, 38(6), 608-623. <https://doi.org/10.1258/0004563011901037>.
- [146] Schnitzer, T., Bone, H. G., Crepaldi, G. F., Adami, S., McClung, M., Kiel, D., ... Orloff, J. F. (2000). Therapeutic equivalence of alendronate 70 mg once weekly and alendronate 10 mg daily in the treatment of osteoporosis. *Aging Clinical and Experimental Research*, 12(1), 1-12. <https://doi.org/10.1007/BF03339822>.
- [147] Alendrogen, charakterystyka produktu leczniczego, [http://leki.urpl.gov.pl/files/25\\_Alendrogen\\_tab.pdf](http://leki.urpl.gov.pl/files/25_Alendrogen_tab.pdf)
- [148] Wang, C. Z., Chen, S. M., Chen, C. H., Wang, C. K., Wang, G. J., Chang, J. K., Ho, M. L. (2010). The effect of the local delivery of alendronate on human adipose-derived stem cell-based bone regeneration. *Biomaterials*, 31(33), 8674-8683. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.096>.
- [149] Han, H. K., Shin, H. J., Ha, D. H. (2012). Improved oral bioavailability of alendronate via the mucoadhesive liposomal delivery system. *European journal of pharmaceutical sciences*, 46(5), 500-507. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.04.002>.
- [150] Benyettou, F., Chebbi, I., Motte, L., Seksek, O. (2011). Magnetoliposome for alendronate delivery. *Journal of Materials Chemistry*, 21(13), 4813-4820. <https://doi.org/10.1039/C1JM00060H>.
- [151] Shi, X., Wang, Y., Ren, L., Gong, Y., Wang, D. A. (2009). Enhancing alendronate release from a novel PLGA/hydroxyapatite microspheric system for bone repairing applications. *Pharmaceutical research*, 26(2), 422-430. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9759-0>.
- [152] Lee, J. H., Ko, I. H., Jeon, S. H., Chae, J. H., Chang, J. H. (2013). Micro-structured hydroxyapatite microspheres for local delivery of alendronate and BMP-2 carriers. *Materials Letters*, 105, 136-139. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2013.04.082>.
- [153] Posadowska, U., Parizek, M., Filova, E., Wlodarczyk-Biegun, M., Kamperman, M., Bacakova, L., Pamula, E. (2015). Injectable nanoparticle-loaded hydrogel system for local delivery of sodium alendronate. *International Journal of Pharmaceutics*, 485(1-2), 31-40. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.03.003>.
- [154] Li, D., Zhou, J., Zhang, M., Ma, Y., Yang, Y., Han, X., Wang, X. (2020). Long-term delivery of alendronate through an injectable tetra-PEG hydrogel to promote osteoporosis therapy. *Biomaterials Science*, 8(11), 3138-3146. <https://doi.org/10.1039/D0BM00376J>.
- [155] Nafee, N., Zewail, M., Boraie, N. (2018). Alendronate-loaded, biodegradable smart hydrogel: a promising injectable depot formulation for osteoporosis. *Journal of Drug Targeting*, 26(7), 563-575. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2017.1390670>.

- 
- [156] Ma, X., He, Z., Han, F., Zhong, Z., Chen, L., Li, B. (2016). Preparation of collagen/hydroxyapatite/alendronate hybrid hydrogels as potential scaffolds for bone regeneration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 143, 81-87. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.03.025>.
- [157] Peng, J., Zhao, J., Long, Y., Xie, Y., Nie, J., Chen, L. (2019). Magnetic materials in promoting bone regeneration. *Frontiers in Materials*, 268. <https://doi.org/10.3389/fmats.2019.00268>.
- [158] Xia, Y., Sun, J., Zhao, L., Zhang, F., Liang, X. J., Guo, Y., ... Xu, H. H. (2018). Magnetic field and nano-scaffolds with stem cells to enhance bone regeneration. *Biomaterials*, 183, 151-170. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.08.040>.
- [159] Kim, E. C., Leesungbok, R., Lee, S. W., Lee, H. W., Park, S. H., Mah, S. J., Ahn, S. J. (2015). Effects of moderate intensity static magnetic fields on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Bioelectromagnetics*, 36(4), 267-276. <https://doi.org/10.1002/bem.21903>.
- [160] Ba, X., Hadjiargyrou, M., DiMasi, E., Meng, Y., Simon, M., Tan, Z., Rafailovich, M. H. (2011). The role of moderate static magnetic fields on biomineralization of osteoblasts on sulfonated polystyrene films. *Biomaterials*, 32(31), 7831-7838. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.06.053>.
- [161] Chuo, W., Ma, T., Saito, T., Sugita, Y., Maeda, H., Zhang, G., ... Lu, L. (2013). A preliminary study of the effect of static magnetic field acting on rat bone marrow mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation in vitro. *Journal of Hard Tissue Biology*, 22(2), 227-232. <https://doi.org/10.2485/jhtb.22.227>.
- [162] Hu, H., Yang, W., Zeng, Q., Chen, W., Zhu, Y., Liu, W., ... Zhang, Y. (2020). Promising application of Pulsed Electromagnetic Fields (PEMFs) in musculoskeletal disorders. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131, 110767. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110767>.
- [163] Huang, J., Wang, D., Chen, J., Liu, W., Duan, L., You, W., ... Wang, D. (2017). Osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells by magnetic nanoparticle composite scaffolds under a pulsed electromagnetic field. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(4), 575-579. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.04.026>.
- [164] Jing, D., Zhai, M., Tong, S., Xu, F., Cai, J., Shen, G., ... Luo, E. (2016). Pulsed electromagnetic fields promote osteogenesis and osseointegration of porous titanium implants in bone defect repair through a Wnt/ $\beta$ -catenin signaling-associated mechanism. *Scientific Reports*, 6(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/srep32045>.
- [165] Choi, H. M., Cheing, A. K., Ng, G. Y., Cheing, G. L. (2018). Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) on the tensile biomechanical properties of diabetic wounds at different phases of healing. *PLoS one*, 13(1), e0191074. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191074>.
- [166] Tran, N., Webster, T. J. (2010). Magnetic nanoparticles: biomedical applications and challenges. *Journal of Materials Chemistry*, 20(40), 8760-8767. <https://doi.org/10.1039/C0JM00994F>.
- [167] Xiao, Y., Du, J. (2020). Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(3), 354-367. <https://doi.org/10.1039/C9TB01955C>.



- 
- [168] Khanna, L., Verma, N. K., Tripathi, S. K. (2018). Burgeoning tool of biomedical applications - Superparamagnetic nanoparticles. *Journal of Alloys and Compounds*, 752, 332-353. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2018.04.093>.
- [169] Cornell, R. M., & Schwertmann, U. (2003). *The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences, and uses* (Vol. 2, p. 71). Weinheim: Wiley-vch, ISBN 3-527-3027-3.
- [170] Cardoso, V. F., Francesko, A., Ribeiro, C., Bañobre-López, M., Martins, P., Lanceros-Mendez, S. (2018). Advances in magnetic nanoparticles for biomedical applications. *Advanced healthcare materials*, 7(5), 1700845. <https://doi.org/10.1002/adhm.201700845>.
- [171] Massart, R. (1981). Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE transactions on magnetics*, 17(2), 1247-1248. <https://doi.org/10.1109/TMAG.1981.1061188>.
- [172] Thapa, B., Diaz-Diestra, D., Beltran-Huarac, J., Weiner, B. R., Morell, G. (2017). Enhanced MRI T 2 relaxivity in contrast-probed anchor-free PEGylated iron oxide nanoparticles. *Nanoscale research letters*, 12(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2084-y>.
- [173] Hamzian, N., Hashemi, M., Ghorbani, M., Aledavood, S. A., Ramezani, M., Toosi, M. H. B. (2019). In-vitro study of multifunctional plga-spion nanoparticles loaded with gemcitabine as radiosensitizer used in radiotherapy. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 18(4), 1694. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.14050.12131>.
- [174] Fülöp, T., Nemes, R., Mészáros, T., Urbanics, R., Kok, R. J., Jackman, J. A., ... Szebeni, J. (2018). Complement activation in vitro and reactogenicity of low-molecular weight dextran-coated SPIONs in the pig CARPA model: Correlation with physicochemical features and clinical information. *Journal of controlled release*, 270, 268-274. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.043>.
- [175] Kania, G., Sternak, M., Jaształ, A., Chlopicki, S., Błażejczyk, A., Nasulewicz-Goldeman, A., ... Nowakowska, M. (2018). Uptake and bioreactivity of charged chitosan-coated superparamagnetic nanoparticles as promising contrast agents for magnetic resonance imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 14(1), 131-140. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.09.004>.
- [176] Mohammed, L., Gomaa, H. G., Ragab, D., Zhu, J. (2017). Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review. *Particuology*, 30, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2016.06.001>.
- [177] Yin, X., Russek, S. E., Zabow, G., Sun, F., Mohapatra, J., Keenan, K. E., ... Moreland, J. (2018). Large T1 contrast enhancement using superparamagnetic nanoparticles in ultra-low field MRI. *Scientific reports*, 8(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30264-5>.
- [178] Jeon, H., Kim, J., Lee, Y. M., Kim, J., Choi, H. W., Lee, J., ... Kim, W. J. (2016). Poly-paclitaxel/cyclodextrin-SPION nano-assembly for magnetically guided drug delivery system. *Journal of Controlled Release*, 231, 68-76. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.006>.

- 
- [179] Yar, Y., Khodadust, R., Akkoc, Y., Utkur, M., Saritas, E. U., Gozuacik, D., Acar, H. Y. (2018). Development of tailored SPION-PNIPAM nanoparticles by ATRP for dually responsive doxorubicin delivery and MR imaging. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(2), 289-300. <https://doi.org/10.1039/C7TB00646B>.
- [180] Nicciecka, D., Celej, J., Żuk, M., Majkowska-Pilip, A., Żelechowska-Matysiak, K., Lis, A., Osial, M. (2021). Hybrid system for local drug delivery and magnetic hyperthermia based on SPIONs loaded with doxorubicin and epirubicin. *Pharmaceutics*, 13(4), 480. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040480>.
- [181] Lachowicz, D., Kaczyńska, A., Wirecka, R., Kmita, A., Szczerba, W., Bodzoń-Kułakowska, A., ... Zapotoczny, S. (2018). A hybrid system for magnetic hyperthermia and drug delivery: SPION functionalized by curcumin conjugate. *Materials*, 11(12), 2388. <https://doi.org/10.3390/ma11122388>.
- [182] Cherukuri, P., Glazer, E. S., Curley, S. A. (2010). Targeted hyperthermia using metal nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews*, 62(3), 339-345. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.006>.
- [183] Yanai, A., Häfeli, U. O., Metcalfe, A. L., Soema, P., Addo, L., Gregory-Evans, C. Y., ... Gregory-Evans, K. (2012). Focused magnetic stem cell targeting to the retina using superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Cell transplantation*, 21(6), 1137-1148. <https://doi.org/10.3727/096368911X627435>.
- [184] Yun, W. S., Choi, J. S., Ju, H. M., Kim, M. H., Choi, S. J., Oh, E. S., ... Key, J. (2018). Enhanced homing technique of mesenchymal stem cells using iron oxide nanoparticles by magnetic attraction in olfactory-injured mouse models. *International journal of molecular sciences*, 19(5), 1376. <https://doi.org/10.3390/ijms19051376>.
- [185] Zhang, J., Huang, Q., Du, J. (2016). Recent advances in magnetic hydrogels. *Polymer International*, 65(12), 1365-1372. <https://doi.org/10.1002/pi.5170>.
- [186] Filipcsei, G., Csetneki, I., Szilágyi, A., Zrínyi, M. (2007). Magnetic field-responsive smart polymer composites. In *Oligomers-polymer composites-molecular imprinting* (pp. 137-189). Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/12\\_2006\\_104](https://doi.org/10.1007/12_2006_104).
- [187] Li, Y., Huang, G., Zhang, X., Li, B., Chen, Y., Lu, T., ... Xu, F. (2013). Magnetic hydrogels and their potential biomedical applications. *Advanced Functional Materials*, 23(6), 660-672. <https://doi.org/10.1002/adfm.201201708>.
- [188] Tóth, I. Y., Veress, G., Szekeres, M., Illés, E., Tombácz, E. (2015). Magnetic hyaluronate hydrogels: preparation and characterization. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 380, 175-180. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2014.10.139>.
- [189] Wang, X., Chang, J., Wu, C. (2018). Bioactive inorganic/organic nanocomposites for wound healing. *Applied Materials Today*, 11, 308-319. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2018.03.001>.
- [190] Wang, Y., Li, B., Zhou, Y., Jia, D. (2009). In situ mineralization of magnetite nanoparticles in chitosan hydrogel. *Nanoscale research letters*, 4(9), 1041-1046. <https://doi.org/10.1007/s11671-009-9355-1>.

- 
- [191] Messing, R., Frickel, N., Belkoura, L., Strey, R., Rahn, H., Odenbach, S., Schmidt, A. M. (2011). Cobalt ferrite nanoparticles as multifunctional cross-linkers in PAAm ferrohydrogels. *Macromolecules*, 44(8), 2990-2999. <https://doi.org/10.1021/ma102708b>.
- [192] Liu, Z., Liu, J., Cui, X., Wang, X., Zhang, L., Tang, P. (2020). Recent advances on magnetic sensitive hydrogels in tissue engineering. *Frontiers in chemistry*, 8, 124. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00124>.
- [193] Kim, J. I., Kim, B., Chun, C., Lee, S. H., Song, S. C. (2012). MRI-monitored long-term therapeutic hydrogel system for brain tumors without surgical resection. *Biomaterials*, 33(19), 4836-4842. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.048>.
- [194] Jahanban-Esfahlan, R., Derakhshankhah, H., Haghshenas, B., Massoumi, B., Abbasian, M., Jaymand, M. (2020). A bio-inspired magnetic natural hydrogel containing gelatin and alginate as a drug delivery system for cancer chemotherapy. *International journal of biological macromolecules*, 156, 438-445. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.074>.
- [195] Qian, K. Y., Song, Y., Yan, X., Dong, L., Xue, J., Xu, Y., ... Lu, Y. (2020). Injectable ferrimagnetic silk fibroin hydrogel for magnetic hyperthermia ablation of deep tumor. *Biomaterials*, 259, 120299. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120299>.
- [196] Mondal, S., Manivasagan, P., Bharathiraja, S., Moorthy, M. S., Kim, H. H., Seo, H., ... Oh, J. (2017). Magnetic hydroxyapatite: a promising multifunctional platform for nanomedicine application. *International journal of nanomedicine*, 12, 8389. <https://doi.org/10.2147/IJN.S147355>.
- [197] Hou, R., Zhang, G., Du, G., Zhan, D., Cong, Y., Cheng, Y., Fu, J. (2013). Magnetic nanohydroxyapatite/PVA composite hydrogels for promoted osteoblast adhesion and proliferation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103, 318-325. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.067>.
- [198] Huang, W. S., Chu, I. M. (2019). Injectable polypeptide hydrogel/inorganic nanoparticle composites for bone tissue engineering. *PLoS One*, 14(1), e0210285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210285>.
- [199] Panseri, S., Russo, A., Sartori, M., Giavaresi, G., Sandri, M., Fini, M., ... Marcacci, M. (2013). Modifying bone scaffold architecture in vivo with permanent magnets to facilitate fixation of magnetic scaffolds. *Bone*, 56(2), 432-439. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.07.015>.
- [200] Mota, C., Puppi, D., Chiellini, F., Chiellini, E. (2015). Additive manufacturing techniques for the production of tissue engineering constructs. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 9(3), 174-190. <https://doi.org/10.1002/term.1635>.
- [201] Qu, H. (2020). Additive manufacturing for bone tissue engineering scaffolds. *Materials Today Communications*, 24, 101024. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.101024>.
- [202] Malda, J., Visser, J., Melchels, F. P., Jüngst, T., Hennink, W. E., Dhert, W. J., ... Hutmacher, D. W. (2013). 25th anniversary article: engineering hydrogels for biofabrication. *Advanced materials*, 25(36), 5011-5028. <https://doi.org/10.1002/adma.201302042>.

- 
- [203] Murphy, S. V., Atala, A. (2014). 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature biotechnology*, 32(8), 773-785. <https://doi.org/10.1038/nbt.2958>.
- [204] Gleadall, A., Visscher, D., Yang, J., Thomas, D., Segal, J. (2018). Review of additive manufactured tissue engineering scaffolds: relationship between geometry and performance. *Burns & trauma*, 6. <https://doi.org/10.1186/s41038-018-0121-4>.
- [205] Groll, J., Burdick, J. A., Cho, D. W., Derby, B., Gelinsky, M., Heilshorn, S. C., ... Woodfield, T. B. F. (2018). A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. *Biofabrication*, 11(1), 013001. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aaec52>.
- [206] Kumar, A., Mandal, S., Barui, S., Vasireddi, R., Gbureck, U., Gelinsky, M., Basu, B. (2016). Low temperature additive manufacturing of three dimensional scaffolds for bone-tissue engineering applications: Processing related challenges and property assessment. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 103, 1-39. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2016.01.001>.
- [207] Shapira, A., Noor, N., Asulin, M., Dvir, T. (2018). Stabilization strategies in extrusion-based 3D bioprinting for tissue engineering. *Applied Physics Reviews*, 5(4), 041112. <https://doi.org/10.1063/1.5055659>.
- [208] Ahlfeld, T., Guduric, V., Duin, S., Akkineni, A. R., Schütz, K., Kilian, D., ... Gelinsky, M. (2020). Methylcellulose—a versatile printing material that enables biofabrication of tissue equivalents with high shape fidelity. *Biomaterials science*, 8(8), 2102-2110. <https://doi.org/10.1039/D0BM00027B>.
- [209] Nasatto, P. L., Pignon, F., Silveira, J. L., Duarte, M. E. R., Nosedá, M. D., Rinaudo, M. (2015). Methylcellulose, a cellulose derivative with original physical properties and extended applications. *Polymers*, 7(5), 777-803. <https://doi.org/10.3390/polym7050777>.
- [210] Negrini, N. C., Bonetti, L., Contili, L., Farè, S. (2018). 3D printing of methylcellulose-based hydrogels. *Bioprinting*, 10, e00024. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2018.e00024>.
- [211] Schütz, K., Placht, A. M., Paul, B., Brüggemeier, S., Gelinsky, M., Lode, A. (2017). Three-dimensional plotting of a cell-laden alginate/methylcellulose blend: towards biofabrication of tissue engineering constructs with clinically relevant dimensions. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 11(5), 1574-1587. <https://doi.org/10.1002/term.2058>.
- [212] Law, N., Doney, B., Glover, H., Qin, Y., Aman, Z. M., Sercombe, T. B., ... Doyle, B. J. (2018). Characterisation of hyaluronic acid methylcellulose hydrogels for 3D bioprinting. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 77, 389-399. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.09.031>.
- [213] Rastin, H., Ormsby, R. T., Atkins, G. J., Losic, D. (2020). 3D bioprinting of methylcellulose/gelatin-methacryloyl (MC/GelMA) bioink with high shape integrity. *ACS Applied Bio Materials*, 3(3), 1815-1826. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00169>.
- [214] Pan, C., Qian, J., Zhao, C., Yang, H., Zhao, X., Guo, H. (2020). Study on the relationship between crosslinking degree and properties of TPP crosslinked chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 241, 116349. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116349>.

- 
- [215] Sang, Z., Qian, J., Han, J., Deng, X., Shen, J., Li, G., Xie, Y. (2020). Comparison of three water-soluble polyphosphate tripolyphosphate, phytic acid, and sodium hexametaphosphate as crosslinking agents in chitosan nanoparticle formulation. *Carbohydrate Polymers*, 230, 115577. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115577>.
- [216] Silvestro, I., Francolini, I., Di Lisio, V., Martinelli, A., Pietrelli, L., Scotto d'Abusco, A., ... Piozzi, A. (2020). Preparation and characterization of TPP-chitosan crosslinked scaffolds for tissue engineering. *Materials*, 13(16), 3577. <https://doi.org/10.3390/ma13163577>.
- [217] Sacco, P., Travan, A., Borgogna, M., Paoletti, S., Marsich, E. (2015). Silver-containing antimicrobial membrane based on chitosan-TPP hydrogel for the treatment of wounds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 26(3), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s10856-015-5474-7>.
- [218] Xu, Y., Yuan, S., Han, J., Lin, H., Zhang, X. (2017). Design and fabrication of a chitosan hydrogel with gradient structures via a step-by-step cross-linking process. *Carbohydrate polymers*, 176, 195-202. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.032>.
- [219] Liao, C. T., Ho, M. H. (2011). The fabrication of biomimetic chitosan scaffolds by using SBF treatment with different crosslinking agents. *Membranes*, 1(1), 3-12. <https://doi.org/10.3390/membranes1010003>.
- [220] National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 24455, Sodium tripolyphosphate. Retrieved September 9, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-tripolyphosphate>.
- [221] Mazancová, P., Némethová, V., Treľová, D., Kleščíková, L., Lacík, I., Rázga, F. (2018). Dissociation of chitosan/tripolyphosphate complexes into separate components upon pH elevation. *Carbohydrate polymers*, 192, 104-110. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.030>.
- [222] Bhumkar, D. R., Pokharkar, V. B. (2006). Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: a technical note. *Aaps Pharmscitech*, 7(2), E138-E143. <https://doi.org/10.1208/pt070250>.
- [223] Gierszewska, M., Ostrowska-Czubenko, J., Chrzanowska, E. (2018). pH-responsive chitosan/alginate polyelectrolyte complex membranes reinforced by tripolyphosphate. *European Polymer Journal*, 101, 282-290. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.02.031>.
- [224] Fischetti, T., Celikkin, N., Contessi Negrini, N., Farè, S., Swieszkowski, W. (2020). Tripolyphosphate-crosslinked chitosan/gelatin biocomposite ink for 3D printing of uniaxial scaffolds. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 400. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00400>.
- [225] Martínez, A., Blanco, M. D., Davidenko, N., Cameron, R. E. (2015). Tailoring chitosan/collagen scaffolds for tissue engineering: Effect of composition and different crosslinking agents on scaffold properties. *Carbohydrate polymers*, 132, 606-619. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.084>.
- [226] Fang, Y., Zhang, T., Song, Y., Sun, W. (2020). Assessment of various crosslinking agents on collagen/chitosan scaffolds for myocardial tissue engineering. *Biomedical Materials*, 15(4), 045003. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ab452d>.

- 
- [227] Chen, K. Y., Zeng, S. Y. (2018). Fabrication of quaternized chitosan nanoparticles using tripolyphosphate/genipin dual cross-linkers as a protein delivery system. *Polymers*, *10*(11), 1226. <https://doi.org/10.3390/polym10111226>.
- [228] Yin, D., Wu, H., Liu, C., Zhang, J., Zhou, T., Wu, J., Wan, Y. (2014). Fabrication of composition-graded collagen/chitosan–polylactide scaffolds with gradient architecture and properties. *Reactive and Functional Polymers*, *83*, 98-106. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2014.07.017>.
- [229] Nath, S. D., Abueva, C., Kim, B., Lee, B. T. (2015). Chitosan–hyaluronic acid polyelectrolyte complex scaffold crosslinked with genipin for immobilization and controlled release of BMP-2. *Carbohydrate polymers*, *115*, 160-169. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.077>.
- [230] Gilarska, A., Lewandowska-Łańcucka, J., Horak, W., Nowakowska, M. (2018). Collagen/chitosan/hyaluronic acid–based injectable hydrogels for tissue engineering applications–design, physicochemical and biological characterization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *170*, 152-162. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.06.004>.
- [231] Lewandowska-Łańcucka, J., Gilarska, A., Buła, A., Horak, W., Łatkiewicz, A., Nowakowska, M. (2019). Genipin crosslinked bioactive collagen/chitosan/hyaluronic acid injectable hydrogels structurally amended via covalent attachment of surface-modified silica particles. *International journal of biological macromolecules*, *136*, 1196-1208. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.184>.
- [232] Gregorio-Jauregui, K. M., Pineda, M., Rivera-Salinas, J. E., Hurtado, G., Saade, H., Martinez, J. L., ... López, R. G. (2012). One-step method for preparation of magnetic nanoparticles coated with chitosan. *Journal of Nanomaterials*, *2012*. <https://doi.org/10.1155/2012/813958>.
- [233] Graulus, G. J., Mignon, A., Van Vlierberghe, S., Declercq, H., Fehér, K., Cornelissen, M., ... Dubrue, P. (2015). Cross-linkable alginate-graft-gelatin copolymers for tissue engineering applications. *European Polymer Journal*, *72*, 494-506. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.06.033>.
- [234] Park, H., Choi, B., Hu, J., Lee, M. (2013). Injectable chitosan hyaluronic acid hydrogels for cartilage tissue engineering. *Acta biomaterialia*, *9*(1), 4779-4786. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.08.033>.
- [235] Sunada, H., Nagai, Y. (1983). Mechanism of collagen degradation by collagenase: a transition process of the collagen molecule from collagenase-substrate to gelatinase-substrate. *Biomedical Research*, *4*(1), 61-70. <https://doi.org/10.2220/biomedres.4.61>.
- [236] Walters, N. J., Gentleman, E. (2015). Evolving insights in cell–matrix interactions: Elucidating how non-soluble properties of the extracellular niche direct stem cell fate. *Acta biomaterialia*, *11*, 3-16. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.09.038>.
- [237] Caliarì, S. R., Burdick, J. A. (2016). A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nature methods*, *13*(5), 405-414. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3839>
- [238] Kokubo, T., Takadama, H. (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?. *Biomaterials*, *27*(15), 2907-2915. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>.

- 
- [239] Chen, S., Osaka, A., Hayakawa, S., Tsuru, K., Fujii, E., Kawabata, K. (2008). Novel one-pot sol-gel preparation of amino-functionalized silica nanoparticles. *Chemistry Letters*, 37(11), 1170-1171. <https://doi.org/10.1246/cl.2008.1170>.
- [240] Hüsing, N., Schubert, U., Mezei, R., Fratzl, P., Riegel, B., Kiefer, W., ... Mader, W. (1999). Formation and structure of gel networks from Si (OEt) 4/(MeO) 3Si (CH2) 3NR '2 mixtures (NR '2= NH2 or NHCH2CH2NH2). *Chemistry of materials*, 11(2), 451-457. <https://doi.org/10.1021/cm980756l>.
- [241] Ottenbrite, R. M., Wall, J. S., Siddiqui, J. A. (2000). Self-Catalyzed Synthesis of Organo-Silica Nanoparticles. *Journal of the American Ceramic Society*, 83(12), 3214-3215. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.2000.tb01709.x>.
- [242] Lewandowska-Łańcucka, J., Staszewska, M., Szuwarzyński, M., Zapotoczny, S., Kepczynski, M., Olejniczak, Z., ... Nowakowska, M. (2018). Design and characterization of silicone micromaterials: A systematic study. *Materials & Design*, 146, 57-68. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2018.03.010>.
- [243] Kłonica, M. (2018). *Badania stanu energetycznego warstwy wierzchniej wybranych materiałów konstrukcyjnych po ozonowaniu*. Wydawnictwo Politechniki Lubelskiej.
- [244] Hijikata, Y., Yaguchi, H., Yoshikawa, M., Yoshida, S. J. A. S. S. (2001). Composition analysis of SiO2/SiC interfaces by electron spectroscopic measurements using slope-shaped oxide films. *Applied Surface Science*, 184(1-4), 161-166. [https://doi.org/10.1016/S0169-4332\(01\)00491-3](https://doi.org/10.1016/S0169-4332(01)00491-3).
- [245] Wang, Q., Hou, R., Cheng, Y., Fu, J. (2012). Super-tough double-network hydrogels reinforced by covalently compositing with silica-nanoparticles. *Soft Matter*, 8(22), 6048-6056. <https://doi.org/10.1039/C2SM07233E>.
- [246] van den Brom, C. R., Anac, I., Roskamp, R. F., Retsch, M., Jonas, U., Menges, B., Preece, J. A. (2010). The swelling behaviour of thermoresponsive hydrogel/silica nanoparticle composites. *Journal of Materials Chemistry*, 20(23), 4827-4839. <https://doi.org/10.1039/B927314J>.
- [247] Zhao, T., Jiang, L. (2018). Contact angle measurement of natural materials. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 161, 324-330. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.10.056>.
- [248] Lee, B., Kim, Y., Lee, H., Yi, J. (2001). Synthesis of functionalized porous silicas via templating method as heavy metal ion adsorbents: the introduction of surface hydrophilicity onto the surface of adsorbents. *Microporous and Mesoporous Materials*, 50(1), 77-90. [https://doi.org/10.1016/S1387-1811\(01\)00437-1](https://doi.org/10.1016/S1387-1811(01)00437-1).
- [249] Alvarez, G. S., Hélyary, C., Mebert, A. M., Wang, X., Coradin, T., Desimone, M. F. (2014). Antibiotic-loaded silica nanoparticle-collagen composite hydrogels with prolonged antimicrobial activity for wound infection prevention. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(29), 4660-4670. <https://doi.org/10.1039/C4TB00327F>.
- [250] Sambudi, N. S., Sathyamurthy, M., Lee, G. M., Park, S. B. (2015). Electrospun chitosan/poly (vinyl alcohol) reinforced with CaCO3 nanoparticles with enhanced mechanical properties and

---

biocompatibility for cartilage tissue engineering. *Composites Science and Technology*, 106, 76-84. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2014.11.003>.

[251] Ibsen, C. J., Chernyshov, D., Birkedal, H. (2016). Apatite formation from amorphous calcium phosphate and mixed amorphous calcium phosphate/amorphous calcium carbonate. *Chemistry–A European Journal*, 22(35), 12347-12357. <https://doi.org/10.1002/chem.201601280>.

[252] Roach, H. I. (1999). Association of matrix acid and alkaline phosphatases with mineralization of cartilage and endochondral bone. *The Histochemical Journal*, 31(1), 53-61. <https://doi.org/10.1023/A:1003519104980>.

[253] Lao, L., Wang, Y., Zhu, Y., Zhang, Y., Gao, C. (2011). Poly (lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 22(8), 1873-1884. <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4374-8>.

[254] Lee, S. J., San Choi, J., Park, K. S., Khang, G., Lee, Y. M., Lee, H. B. (2004). Response of MG63 osteoblast-like cells onto polycarbonate membrane surfaces with different micropore sizes. *Biomaterials*, 25(19), 4699-4707. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.11.034>.

[255] Lee, J. H., Jung, H. W., Kang, I. K., Lee, H. B. (1994). Cell behaviour on polymer surfaces with different functional groups. *Biomaterials*, 15(9), 705-711. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(94\)90169-4](https://doi.org/10.1016/0142-9612(94)90169-4).

[256] Gilarska, A., Lewandowska-Łańcucka, J., Guzdek-Zajac, K., Karewicz, A., Horak, W., Lach, R., ... Nowakowska, M. (2020). Bioactive yet antimicrobial structurally stable collagen/chitosan/lysine functionalized hyaluronic acid-based injectable hydrogels for potential bone tissue engineering applications. *International journal of biological macromolecules*, 155, 938-950. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.052>.

[257] Gilarska, A., Hinz, A., Bzowska, M., Dyduch, G., Kamiński, K., Nowakowska, M., Lewandowska-Łańcucka, J. (2021). Addressing the Osteoporosis Problem—Multifunctional Injectable Hybrid Materials for Controlling Local Bone Tissue Remodeling. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13(42), 49762-49779. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c17472>.

[258] Yan, L. P., Wang, Y. J., Ren, L., Wu, G., Caridade, S. G., Fan, J. B., ... Reis, R. L. (2010). Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular cartilage tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 95(2), 465-475. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32869>.

[259] Zhou, Z., Yang, Z., Kong, L., Liu, L., Liu, Q., Zhao, Y., ... Cao, D. (2012). Preparation and characterization of hyaluronic acid hydrogel blends with gelatin. *Journal of Macromolecular Science, Part B*, 51(12), 2392-2400. <https://doi.org/10.1080/00222348.2012.676355>.

[260] Butt, A., Jabeen, S., Nisar, N., Islam, A., Gull, N., Iqbal, S. S., ... Yameen, B. (2019). Controlled release of cephadrine by biopolymers based target specific crosslinked hydrogels. *International journal of biological macromolecules*, 121, 104-112. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.018>.

[261] Menzies, K. L., Jones, L. (2010). The impact of contact angle on the biocompatibility of biomaterials. *Optometry and Vision Science*, 87(6), 387-399. <https://doi.org/10.1097/OPX.0b013e3181da863e>.



- 
- [262] Ibrahim, S., Kang, Q. K., Ramamurthi, A. (2010). The impact of hyaluronic acid oligomer content on physical, mechanical, and biologic properties of divinyl sulfone-crosslinked hyaluronic acid hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 94(2), 355-370. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32704>.
- [263] Gao, L., Gan, H., Meng, Z., Gu, R., Wu, Z., Zhang, L., ... Dou, G. (2014). Effects of genipin cross-linking of chitosan hydrogels on cellular adhesion and viability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 117, 398-405. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.03.002>.
- [264] Michalska-Sionkowska, M., Kaczmarek, B., Walczak, M., Sionkowska, A. (2018). Antimicrobial activity of new materials based on the blends of collagen/chitosan/hyaluronic acid with gentamicin sulfate addition. *Materials Science and Engineering: C*, 86, 103-108. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.01.005>.
- [265] Berry, R., Church, C. D., Gericke, M. T., Jeffery, E., Colman, L., Rodeheffer, M. S. (2014). Imaging of adipose tissue. In *Methods in enzymology* (Vol. 537, pp. 47-73). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411619-1.00004-5>.
- [266] Ravanbakhsh, M., Labbaf, S., Karimzadeh, F., Pinna, A., Houreh, A. B., Nasr-Esfahani, M. H. (2019). Mesoporous bioactive glasses for the combined application of osteosarcoma treatment and bone regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, 104, 109994. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109994>.
- [267] Sossa, P. A. F., Giraldo, B. S., Garcia, B. C. G., Parra, E. R., Arango, P. J. A. (2018). Comparative study between natural and synthetic Hydroxyapatite: structural, morphological and bioactivity properties. *Matéria (Rio de Janeiro)*, 23. <https://doi.org/10.1590/S1517-707620180004.0551>.
- [268] Ananchenko, G., Novakovic, J., Tikhomirova, A. (2013). Alendronate sodium. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 38, 1-33. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407691-4.00001-0>.
- [269] Jiang, P., Mao, Z., Gao, C. (2015). Combinational effect of matrix elasticity and alendronate density on differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Acta biomaterialia*, 19, 76-84. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.03.018>.
- [270] Barros, J., Ferraz, M. P., Azeredo, J., Fernandes, M. H., Gomes, P. S., Monteiro, F. J. (2019). Alginate-nanohydroxyapatite hydrogel system: Optimizing the formulation for enhanced bone regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, 105, 109985. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109985>.
- [271] Chern, M. J., Yang, L. Y., Shen, Y. K., Hung, J. H. (2013). 3D scaffold with PCL combined biomedical ceramic materials for bone tissue regeneration. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*, 14(12), 2201-2207. <https://doi.org/10.1007/s12541-013-0298-1>.
- [272] Yang, D., Qu, S., Huang, J., Cai, Z., Zhou, Z. (2012). Characterization of alendronate sodium-loaded UHMWPE for anti-osteolysis in orthopedic applications. *Materials Science and Engineering: C*, 32(2), 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.09.012>.

- 
- [273] Karewicz, A., Zasada, K., Szczubiałka, K., Zapotoczny, S., Lach, R., Nowakowska, M. (2010). “Smart” alginate–hydroxypropylcellulose microbeads for controlled release of heparin. *International journal of pharmaceutics*, 385(1-2), 163-169. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.021>.
- [274] Ritger, P. L., Peppas, N. A. (1987). A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of controlled release*, 5(1), 37-42. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(87\)90035-6](https://doi.org/10.1016/0168-3659(87)90035-6).
- [275] Papadopoulou, V., Kosmidis, K., Vlachou, M., Macheras, P. (2006). On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *International journal of pharmaceutics*, 309(1-2), 44-50. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.044>.
- [276] Liu, H., Yazici, H., Ergun, C., Webster, T. J., Bermek, H. (2008). An in vitro evaluation of the Ca/P ratio for the cytocompatibility of nano-to-micron particulate calcium phosphates for bone regeneration. *Acta biomaterialia*, 4(5), 1472-1479. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.02.025>.
- [277] Fiejdasz, S., Gilarska, A., Horak, W., Radziszewska, A., Strączek, T., Szuwarzyński, M., Nowakowska, M., Kapusta, C. (2021). Structurally stable hybrid magnetic materials based on natural polymers–preparation and characterization. *Journal of Materials Research and Technology*, 15, 3149-3160. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.09.124>.
- [278] Fiejdasz, S., Gilarska, A., Strączek, T., Nowakowska, M., Kapusta, C. (2021). Magnetic Properties of Collagen–Chitosan Hybrid Materials with Immobilized Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs). *Materials*, 14(24), 7652. <https://doi.org/10.3390/ma14247652>.
- [279] Bulwan, M., Zapotoczny, S., Nowakowska, M. (2009). Robust “one-component” chitosan-based ultrathin films fabricated using layer-by-layer technique. *Soft Matter*, 5(23), 4726-4732. <https://doi.org/10.1039/B909355A>.
- [280] Szpak, A., Kania, G., Skórka, T., Tokarz, W., Zapotoczny, S., Nowakowska, M. (2013). Stable aqueous dispersion of superparamagnetic iron oxide nanoparticles protected by charged chitosan derivatives. *Journal of nanoparticle research*, 15(1), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1372-9>.
- [281] Strączek, T., Fiejdasz, S., Rybicki, D., Goc, K., Przewoźnik, J., Mazur, W., ... Kapusta, C. (2019). Dynamics of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Various Polymeric Coatings. *Materials*, 12(11), 1793. <https://doi.org/10.3390/ma12111793>.
- [282] Odrobińska, J., Gumieniczek-Chłopek, E., Szuwarzyński, M., Radziszewska, A., Fiejdasz, S., Strączek, T., ... Zapotoczny, S. (2019). Magnetically Navigated Core–Shell Polymer Capsules as Nanoreactors Loadable at the Oil/Water Interface. *ACS applied materials & interfaces*, 11(11), 10905-10913. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b22690>.
- [283] Ye, T., Dai, H., Lin, L., Lu, J. (2019). Employment of  $\kappa$ -carrageenan and high pressure processing for quality improvement of reduced NaCl surimi gels. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(9), e14074. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14074>.

- 
- [284] Bogaychuk, A., Sinyavsky, N., Kupriyanova, G. (2016). Investigation of polymer degradation using NMR relaxometry with inverse Laplace transformation. *Applied Magnetic Resonance*, 47(12), 1409-1417. <https://doi.org/10.1007/s00723-016-0833-1>.
- [285] Kleinberg, R. L. (1994). Pore size distributions, pore coupling, and transverse relaxation spectra of porous rocks. *Magnetic resonance imaging*, 12(2), 271-274. [https://doi.org/10.1016/0730-725X\(94\)91534-2](https://doi.org/10.1016/0730-725X(94)91534-2).
- [286] Proietti, N., Capitani, D., Di Tullio, V. (2018). Nuclear magnetic resonance, a powerful tool in cultural heritage. *Magnetochemistry*, 4(1), 11. <https://doi.org/10.3390/magnetochemistry4010011>.
- [287] Hwang, Y. J., Larsen, J., Krasieva, T. B., Lyubovitsky, J. G. (2011). Effect of genipin crosslinking on the optical spectral properties and structures of collagen hydrogels. *ACS applied materials & interfaces*, 3(7), 2579-2584. <https://doi.org/10.1021/am200416h>.
- [288] Ceylan, A., Baker, C. C., Hasanain, S. K., Shah, S. I. (2005). Nonmonotonic concentration dependence of magnetic response in Fe nanoparticle-polymer composites. *Physical Review B*, 72(13), 134411. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.72.134411>.
- [289] Mendoza Zélis, P., Muraca, D., Gonzalez, J. S., Pasquevich, G. A., Alvarez, V. A., Pirota, K. R., Sanchez, F. H. (2013). Magnetic properties study of iron-oxide nanoparticles/PVA ferrogels with potential biomedical applications. *Journal of nanoparticle research*, 15(5), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1613-6>.
- [290] Si, J., Yang, Y., Xing, X., Yang, F., Shan, P. (2019). Controlled degradable chitosan/collagen composite scaffolds for application in nerve tissue regeneration. *Polymer Degradation and Stability*, 166, 73-85. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2019.05.023>.
- [291] Martínez, A., Blanco, M. D., Davidenko, N., Cameron, R. E. (2015). Tailoring chitosan/collagen scaffolds for tissue engineering: Effect of composition and different crosslinking agents on scaffold properties. *Carbohydrate polymers*, 132, 606-619. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.084>.
- [292] Fiejdasz, S., Szczubiałka, K., Lewandowska-Łańcucka, J., Osyczka, A. M., Nowakowska, M. (2013). Biopolymer-based hydrogels as injectable materials for tissue repair scaffolds. *Biomedical Materials*, 8(3), 035013. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/8/3/035013>.
- [293] Paun, I. A., Popescu, R. C., Calin, B. S., Mustaciosu, C. C., Dinescu, M., Luculescu, C. R. (2018). 3D biomimetic magnetic structures for static magnetic field stimulation of osteogenesis. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 495. <https://doi.org/10.3390/ijms19020495>.