

INSTYTUT PODSTAWOWYCH PROBLEMÓW TECHNIKI

POLSKA AKADEMIA NAUK



ROZPRAWA DOKTORSKA

Wpływ biegunowości napięcia w procesie elektroprzędzenia na wybrane właściwości  
i modyfikację powierzchni nanowłókien oraz odpowiedź komórkową

mgr inż. Olga Urbanek-Świderska

Praca wykonana pod kierunkiem

Prof. dr hab. inż. Pawła Łukasza Sajkiewicza

Promotor pomocniczy: dr inż. Dorota Kołbuk-Konieczny

WARSZAWA 2018

Badania prowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej były częścią projektu  
PRELUDIUM o numerze 2014/15/N/ST8/03757 finansowanego przez  
Narodowe Centrum Nauki.



NARODOWE CENTRUM NAUKI

### **Składam serdeczne podziękowania**

*Promotorowi prof. dr hab. inż. Pawłowi Łukaszowi Sajkiewiczowi za podjęcie się opieki oraz pomoc merytoryczną podczas przygotowania rozprawy, a także okazaną cierpliwość i wyrozumiałość.*

*Dr. Dorocie Kolbuk-Konieczny za poświęcony czas, przekazaną wiedzę i doświadczenie oraz wyjątkowe zaangażowanie.*

*Wszystkim koleżankom i kolegom z Instytutu, a w szczególności współpracownikom z Pracowni Polimerów i Biomateriałów, którzy zawsze stanowili nieocenione wsparcie merytoryczne i od których tak wiele mogłam się nauczyć.*

*Rodzicom, za wysiłek włożony w moje wykształcenie.*

*Mężowi, za wsparcie i cierpliwość.*

*Rodzicom oraz Mężowi*

#### Oświadczenie autora pracy

Świadoma odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza praca doktorska została napisana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data

Podpis autora pracy



## Abstract

---

Electrospinning is a method of fibres formation which constantly gains in importance. The final material's properties obtained by electrospinning depend on various factors like solution properties or processing parameters. Most of them have been carefully studied. However, still more attention should be paid to charge polarity effect on structure and properties of bicomponent fibres containing polyelectrolytes.

The aim of this PhD thesis is to investigate the effect of charge polarity applied to the spinning nozzle during electrospinning process on structure and properties of poly( $\epsilon$ -caprolactone)/chitosan fibres(PCL/CHT). The additional aim is to analyse charge polarity effect on post-processing modification of nonwovens by physical adsorption of chondroitin sulphate and its effect on cellular response in *in vitro* conditions. Moreover, the electrospinning process parameters were optimized with special attention on selection of proper solvent system.

During the first stage of the research the effect of two different solvent systems was analysed, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) and acetic acid (AA)/formic acid (FA). Results obtained by various experimental methods clearly indicated the effect of the solvent system on the structure and properties of the fibres. Viscosity measurements confirmed different polymer–solvent interactions. Consequently this differences affected fibres morphological and structural characteristic, as well as its properties. Spectroscopy studies revealed the formation of chitosan salts in the case of the AA/FA solvent system.

On the second stage, the effect of charge polarity on structure and properties of bicomponent (PCL/CHT) blends was analysed, in particular the efficiency of further surface modification by chondroitin sulphate (CS). The differences observed in the morphology and properties of fibres formed at different charge polarities were interpreted in terms of various PCL-CHT molecular interactions. FT-IR results indicated stronger interactions while negative charge polarity was used on the spinning nozzle, resulting in lower PCL crystallinity. The charge polarity influenced PCL/CHT fibre morphology and some of their properties, e.g. wettability, mechanical properties. Efficiency of CS attachment was analysed by atomic force microscopy (AFM), and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). The cell studies conducted on fibroblast cells revealed slight differences in cellular response on changes in the structure and properties of PCL/CHT fibres under applied charge polarity.

## Streszczenie

---

Elektroprzędzenie jest metodą tworzenia włókien, która nieustannie zyskuje na praktycznym znaczeniu. Właściwości włókien otrzymanych tą metodą zależą od wielu czynników, jak np. właściwości roztworu czy parametry procesu. Jednak niektóre zagadnienia w dziedzinie elektroprzędzenia wymagają dalszych prac badawczych, jak np. wpływ biegunowości napięcia na strukturę i właściwości włókien. Do chwili obecnej nie przeprowadzono badań dotyczących wpływu biegunowości napięcia na strukturę i właściwości włókien dwuskładnikowych zawierających polielektrolity.

Celem niniejszej pracy doktorskiej jest analiza wpływu biegunowości napięcia w procesie elektroprzędzenia na strukturę i właściwości dwuskładnikowych włókien poli ( $\epsilon$ -kapolakton)/chitozan (PCL/CHT). Dodatkowym celem pracy była analiza wpływu biegunowości napięcia na efektywność post-procesowej modyfikacji siarczanem chondroityny oraz odpowiedź komórkową w warunkach *in vitro*. Dodatkowym celem tej pracy był dobór parametrów procesu elektroprzędzenia włókien PCL/CHT, ze szczególnym uwzględnieniem doboru rozpuszczalnika.

W pierwszym etapie badań analizowano dwa rozpuszczalniki, 1,1,1,3,3,3-heksafluoro-2-propanol (HFIP) i mieszaninę kwas octowy (AA)/kwas mrówkowy (FA). Wyniki prac badawczych wskazały różnice w strukturze i właściwościach włókien uformowanych z tych rozpuszczalników. Pomiar lepkości potwierdził różnice w interakcji pomiędzy molekułami polimeru i rozpuszczalnika, co skutkowało różnicami w morfologii i strukturze włókien oraz ich właściwościach. Badania spektroskopowe wykazały powstawanie soli amoniowych chitozanu z AA/FA.

W drugim etapie badań analizowano wpływ biegunowości napięcia na strukturę i właściwości włókien (PCL/CHT). Zaobserwowane różnice w morfologii i właściwościach włókien zostały zinterpretowane w kontekście interakcji molekuł PCL-CHT. Wyniki uzyskane metodą FT-IR wskazały na silniejsze interakcje molekuł tych polimerów przy zastosowaniu napięcia o ujemnym znaku potencjału elektrycznego na dyszy przędzalniczej, co skutkowało niższą krystalicznością PCL. Ponadto biegunowość napięcia wpłynęła na morfologię włókna PCL/CHT oraz zwilżalność, właściwości mechaniczne. Adsorpcję CS wykazano za pomocą metody mikroskopii sił atomowych (AFM) i spektroskopii fotoelektronów w zakresie promieniowania X (XPS). Badania komórkowe na fibroblastach wykazały niewielkie różnice w odpowiedzi komórkowej na zmiany w strukturze i właściwościach włókien PCL/CHT.



## Spis treści

1	WPROWADZENIE .....	14
1.1	Elektroprzędzenie jako metoda formowania włókien.....	14
1.1.1	Rys historyczny.....	14
1.1.2	Charakterystyka procesu.....	16
1.1.3	Rola biegunowości napięcia w procesie elektroprzędzenia.....	24
1.2	Polielektrolity.....	31
1.2.1	Właściwości roztworów polielektrolitów .....	31
1.2.2	Chitozan .....	35
1.2.3	Elektroprzędzenie roztworów chitozanu.....	37
1.3	Włókniny wykonane metodą elektroprzędzenia do zastosowania w inżynierii tkankowej .....	42
1.3.1	Inżynieria tkankowa.....	42
1.3.2	Materiały polimerowe w inżynierii tkankowej.....	48
1.3.3	Znaczenie powierzchni polimeru z perspektywy oddziaływania materiał-komórka 53	
1.3.4	Wybrane metody modyfikacji powierzchni włókien.....	55
1.4	Podsumowanie .....	60
2	CEL I ZAKRES PRACY .....	64
2.1	TEZY BADAWCZE.....	66
3	CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	68
3.1	Materiały .....	68
3.2	Formowanie włókien metodą elektroprzędzenia .....	68
3.2.1	Immobilizacja siarczanu chondroityny na włóknach poli( $\epsilon$ -kaprolakton)/chitozan 72	
3.3	Metody badawcze.....	72
3.3.1	Pomiar lepkości roztworów reometrem stożkowym .....	72
3.3.2	Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) .....	72
3.3.3	Mikroskopia sił atomowych (AFM) .....	73
3.3.4	Mikroskopia sił atomowych z zintegrowanym systemem spektroskopii w podczerwieni (AFM-IR).....	73
3.3.5	Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fourier'a (FT-IR).....	74

3.3.6	Skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC) .....	74
3.3.7	Spektroskopia fotoelektronów w zakresie promieniowania X (XPS) .....	74
3.3.8	Pomiar kąta zwilżania .....	75
3.3.9	Statyczna próba rozciągania .....	75
3.3.10	Badania <i>in vitro</i> na wybranych liniach komórkowych .....	75
3.3.11	Analiza cytotoksyczności.....	76
3.3.12	Analiza proliferacji komórek .....	77
3.3.13	Obrazowanie elementów cytoszkieletu komórkowego metodą mikroskopii fluorescencyjnej.....	77
3.3.14	Obrazowanie morfologii komórek metodą skaningowej mikroskopii elektronowej .....	78
3.3.15	Analiza bakteriobójczości.....	78
4	Wyniki i dyskusja .....	80
4.1	Dobór rozpuszczalnika do formowania włókien poli( $\epsilon$ -kapolakton)/chitozan .....	80
4.1.1	Analiza właściwości reologicznych roztworów poli( $\epsilon$ -kapolakton)/chitozan .....	80
4.1.2	Morfologia włókien .....	82
4.1.3	Struktura molekularna i nadmolekularna.....	85
4.1.4	Właściwości mechaniczne .....	90
4.1.5	Zwilżalność materiałów .....	91
4.1.6	Badania biologiczne.....	92
4.1.7	Podsumowanie .....	95
4.2	Analiza wpływu biegunowości napięcia na strukturę i wybrane właściwości włókien poli( $\epsilon$ -kapolakton)/chitozan .....	96
4.2.1	Morfologia włókien .....	96
4.2.2	Struktura molekularna i nadmolekularna.....	98
4.2.3	Właściwości mechaniczne .....	104
4.2.4	Właściwości powierzchni .....	106
4.2.5	Podsumowanie .....	107
4.3	Analiza wpływu biegunowości napięcia na efektywność przyłączenia substancji bioaktywnych do powierzchni włókien poli( $\epsilon$ -kapolakton)/chitozan .....	107
4.3.1	Skład chemiczny powierzchni włókien .....	107
4.3.2	Zwilżalność materiałów .....	108
4.3.3	Topografia powierzchni włókien .....	109

4.3.4	Właściwości mechaniczne .....	110
4.3.5	Podsumowanie .....	111
4.4	Analiza odpowiedzi komórkowej w warunkach <i>in vitro</i> na wybrane właściwości włóknin poli( $\epsilon$ -kapolakton)/chitozanu formowanych z zastosowaniem różnej biegunowości napięcia .....	111
4.4.1	Analiza cytotoksyczności włóknin .....	111
4.4.2	Analiza morfologii komórek.....	116
4.4.3	Podsumowanie .....	119
5	WNIOSKI KOŃCOWE .....	120
6	PERSPEKTYWY .....	122
7	Spis skrótów .....	124
8	Spis tabel .....	126
9	Spis rysunków .....	127
10	Bibliografia.....	131



# Rozdział I

---

---

# 1 WPROWADZENIE

## 1.1 Elektroprzędzenie jako metoda formowania włókien

Elektroprzędzenie jest metodą formowania włókien, która obecnie ma co raz większe znaczenie praktyczne w inżynierii tkankowej. W literaturze fachowej dostępnych jest wiele prac dotyczących zarówno teoretycznych jak i eksperymentalnych zagadnień tego tematu. W podrozdziale 1.1 zostaną opisane wybrane kwestie dotyczące elektroprzędzenia, ze szczególnym uwzględnieniem roli biegunowości napięcia. Opisane zagadnienia dotyczą jedynie elektroprzędzenia z roztworu.

### 1.1.1 Rys historyczny

Elektroprzędzenie jest zjawiskiem elektrohydrodynamicznym, w wyniku którego z roztworu lub stopu polimeru formowane są włókna. Na drodze strugi roztworu pomiędzy dyszą a kolektorem dochodzi do stopniowego odparowywania rozpuszczalnika lub zestalania się stopu polimeru. Uformowane włókna są zbierane na zazwyczaj uziemiony kolektor, który ma najczęściej postać metalowej płytki lub bębna. Do chwili obecnej, powstało wiele publikacji dotyczących elektroprzędzenia i opisujących zarówno jego aspekty teoretyczne [1] jak i doświadczalne [2]. Formowane tą techniką włókna są z powodzeniem stosowane np. w filtracji [3], jako opatrunki medyczne [4], rusztowania komórkowe [5] czy elementy układów magazynujących energię [6].

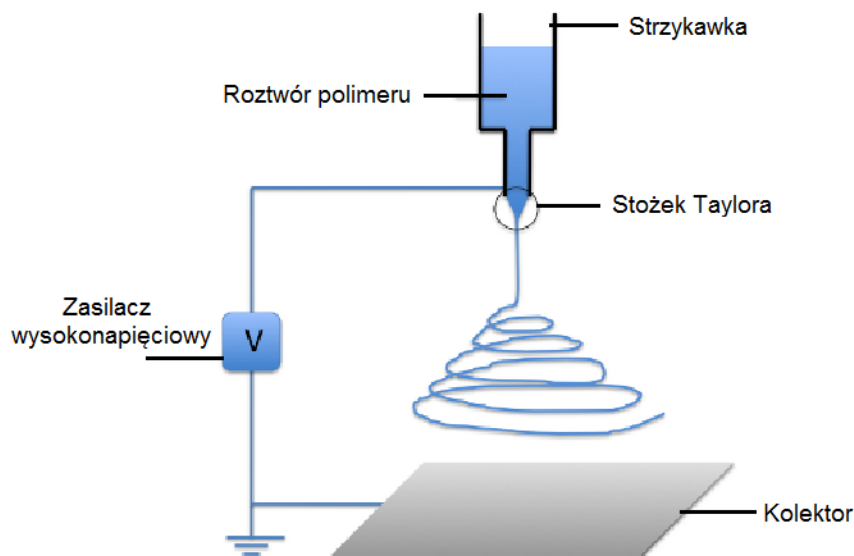
Pierwsze obserwacje oraz wynalazki powiązane z metodą elektroprzędzenia włókien miały miejsce już w XVI wieku. William Gilbert, brytyjski fizyk zajmujący się zjawiskami magnetycznymi i elektrostatycznymi, zauważył, że odpowiednio naładowany elektrycznie kawałek bursztynu umieszczony nad kroplą wody powoduje, iż kropla przybiera kształt stożka, a z jej wierzchołka odrywają się małe kropelki cieczy [7]. Prawdopodobnie była to pierwsza obserwacja elektrorozpylania. Z kolei, w XVIII w. profesor George Mathias Bose, opisał generowane aerozoli przez zastosowanie wysokich potencjałów elektrycznych

przyłożonych do cieczy [8]. Największy wzrost zainteresowania tematem przypadł jednak na XX i XXI wiek, skutkując prawdziwą eksplozją badań naukowych i patentów. Pierwszy patent dotyczący elektroprzędzenia został zgłoszony przez J.F. Cooleya w maju 1900, a następnie w lutym oraz lipcu 1902 przez W.J. Mortona [9-11]. Kolejne patenty w tej dziedzinie były zgłaszane w latach 1934-1944 r. (A. Formhals; C.L. Norton) [12-14]. Na początku XX wieku podjęto także próby matematycznego modelowania zachowania płynów pod wpływem sił elektrostatycznych. W 1914 roku John Zeleny opublikował pracę na temat zachowania się kropelek płynu na końcu metalowych kapilar [15]. Bardzo ważne były także badania dotyczące zachowania się cieczy pod wpływem pola elektrycznego, prowadzone w latach 1964-1969 przez Sir Geoffrey'a Ingram Taylora [16-18]. Dziś, od nazwiska uczonego nazywamy charakterystyczny kształt kropli cieczy w czasie formowania się strugi pod wpływem przyłożonego wysokiego napięcia.

Pierwsze praktyczne zastosowanie elektroprzędzonych włókien miało miejsce już w 1938 r. Nathalie D. Rozenblum oraz Igor V. Petryanov-Sokolov, w Laboratorium Aerozoli prowadzonym przez Nikołaja A. Fuchsa w Instytucie Karpowa w Związku Radzieckim, opracowali włókna z octanu celulozy formowane z mieszaniny dichloroetanu i etanolu [19]. Uformowane włókna posłużyły jako elementy filtrów dymu do masek gazowych (*filtry Petryanova*). Kolejnym pomysłem zastosowania włókien uformowanych metodą elektroprzędzenia były substraty komórkowe do badań *in vitro*. Ta idea została zaproponowana przez Simona w 1988 r., który tą techniką wytworzył maty z polistyrenu [20]. Ta idea do dziś rozwija się bardzo prężnie. Powstały liczne prace dotyczące wykorzystania włókien polimerowych wykonanych metodą elektroprzędzenia przeznaczonych do zastosowań biomedycznych, które były prowadzone od lat 90 XX wieku, np. przez grupę badawczą prof. Darrella H. Renekera [21]. Od tamtego czasu liczba publikacji dotyczących procesu elektroprzędzenia rośnie lawinowo. Obecnie technika elektroprzędzenia jest wykorzystywana na skalę przemysłową. Na przestrzeni ostatnich dziesięciu lat powstało wiele firm jak IME Technologies (Holandia), Stellenbosch Nanofibre Company (RPA) czy Bioinicia (Hiszpania), oferujących nie tylko urządzenia do wytwarzania włókien, ale także usługę optymalizacji wytwarzania i produkcję materiałów. Powstają także urządzenia do bezpośredniego nakładania elektroprzędzonych włókien na rany skórne (SpinCare, Nicast).

Mimo ogromnego postępu, jaki dokonał się na przestrzeni ostatniego wieku w zakresie formowania włókien metodą elektroprzędzenia, wiele kwestii wymaga jeszcze szczegółowej analizy, jak na przykład wpływ biegunowości napięcia na strukturę i właściwości włókien, a w szczególności tych zawierających polielektrolity. Warto poddać analizie, także jej wpływem na efektywność post-procesowej modyfikacji włókien.

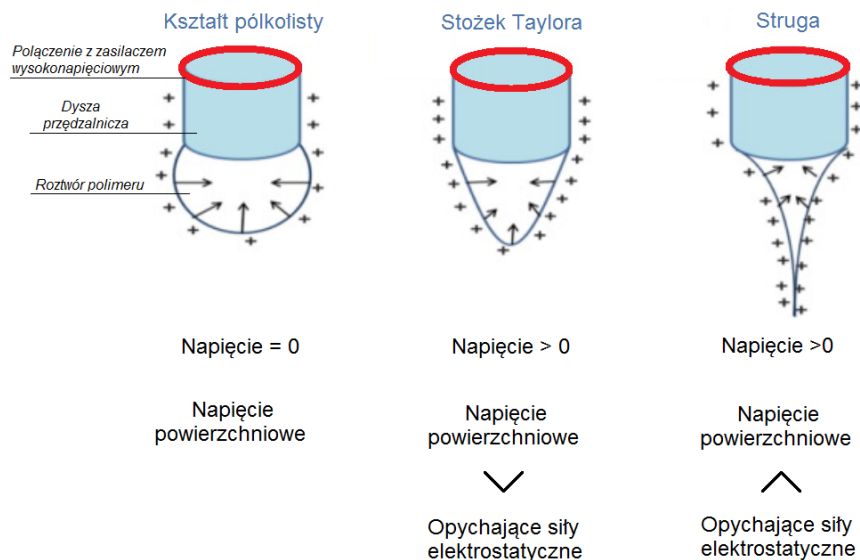
### 1.1.2 Charakterystyka procesu



**Rysunek 1.** Schemat układu do formowania włókien metodą elektroprzędzenia [na podstawie 22].

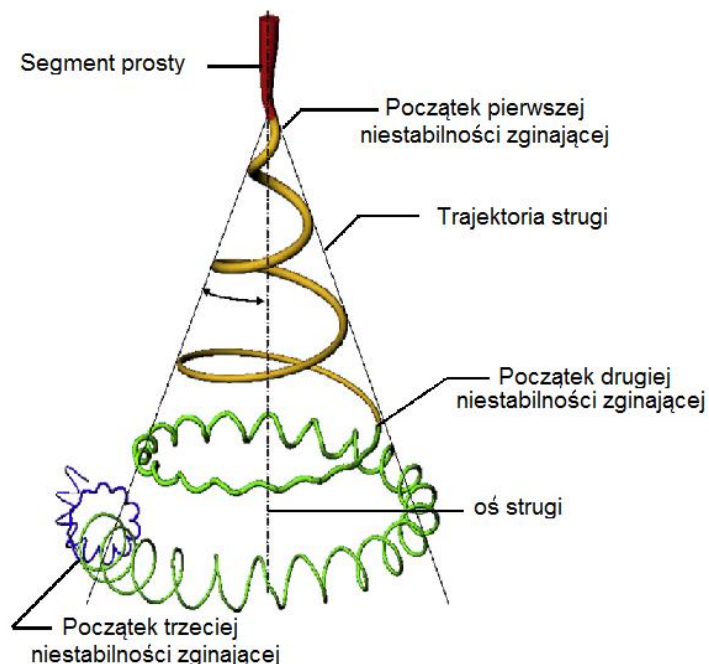
Formowanie włókien metodą elektroprzędzenia polega na jednoosiowym rozciąganiu lepkością roztworu podawanego z wybraną prędkością przez dyszę przędzalniczą. Typowy układ do elektroprzędzenia składa się ze strzykawki, pompy, kolektora oraz zasilacza wysokonapięciowego (Rysunek 1). Wyczerpujący przegląd kolektorów, które pozwalają uzyskać różne orientacje włókien oraz ich układ przestrzenny, został przedstawiony przez Teo i Ramakrishnę [2].





**Rysunek 2.** Schemat ilustrujący etapy tworzenia się strugi roztworu w czasie procesu elektroprzędzenia [na podstawie 23].

Pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego, kropla roztworu na końcu dyszy przewodniczej przyjmuje kształt stożka (Rysunek 2) [24]. Czas, w jakim zostanie utworzony stożek, zależy między innymi od lepkości roztworu i natężenia pola elektrycznego przyłożonego do roztworu. Kształt utworzonego stożka pod wpływem przyłożonego zewnętrznego pola elektrycznego był analizowany oraz szczegółowo opisany, między innymi przez grupę profesora Yarina [25]. Gdy przyłożone do roztworu wysokie napięcie przekroczy wartość krytyczną, zazwyczaj 5 kV, siły odpychające pomiędzy ładunkami elektrycznymi w roztworze stają się większe niż napięcie powierzchniowe roztworu, dzięki czemu zostaje uformowana struga roztworu (Rysunek 2). Czynnikiem warunkującym formowanie włókien ze strugi roztworu jest fizyczne splątanie molekuł (ang. *chain entanglement*). Ilość splątań molekuł wzrasta wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej polimeru oraz jego stężeniem w roztworze [26]. Wzrost ilości splątań molekuł powoduje wzrost lepkości roztworu, co prowadzi do powstania koherentnej strugi roztworu. Rola splątania molekuł polimeru w czasie formowania włókien metodą elektroprzędzenia była analizowana między innymi przez Shenoy i wsp. [27].



**Rysunek 3.** Schemat przykładowego toru ruchu strugi polimeru pod wpływem zewnętrznego pola elektrycznego [1].

Analizując kolejne odcinki strugi roztworu, można zauważyć, że pierwszy fragment strugi jest prostoliniowy (Rysunek 3). Obserwowano także zjawisko tworzenia wielu strug roztworu z jednej kropli [28]. Siły elektryczne z ładunku przeniesionego w strumieniu roztworu powodują jego dalsze wydłużanie. Średnica strumienia w tym fragmencie zmniejsza się wraz z odległością od końca dyszy przędzalniczej. W strefie prostoliniowej następuje pocienienie strugi roztworu polimeru zgodnie z wykładniczą zależnością średnicy strugi ( $d$ ) od odległości od dyszy ( $z$ ):

$$d(z) \sim z^{-n} \quad (1)$$

gdzie,  $n$  mieści się w zakresie 0,2-0,5 [1]. Następnie zaczyna się najdłuższy fragment strugi roztworu, mieszczący się w tzw. *bending instability region*, w którym dochodzi do zaginania strumienia roztworu pod wpływem odpychających sił elektrostatycznych pomiędzy ładunkami transportowanymi w strumieniu. Ten fragment strugi można podzielić na tzw. pierwszą i drugą niestabilność zginającą (ang. *first/ second electrical bending instability*) [1]. Na tym odcinku struga porusza się w nieregularny sposób, przypominający ruch po spirali

(Rysunek 3). Dzięki równowadze we wzajemnym oddziaływaniu molekuł polimeru oraz jonów obecnych w roztworze, nie dochodzi do powstania tak zwanych niestabilności kapilarnych (ang. *capillary instability*). Gdy jednak tego typu niestabilności powstają, z głównego strumienia roztworu odrywają się mniejsze strumienie lub krople, szybko zamieniające się w tzw. koraliki występujące na całej długości włókna. Niestabilności strugi w czasie procesu elektroprzędzenia można podzielić na: osiowo niesymetryczne (zginające) oraz osiowo symetryczne. Niestabilności osiowo niesymetryczne pojawiają się na skutek niewielkich zaburzeń w liniowej trajektorii strugi. Zaburzenia te wytwarzają siłę prostopadłą do osi głównej na skutek pojawienia się sił wewnętrznego odpychania się naładowanej strugi po utracie idealnej symetrii. Początkowo siła ta jest równoważona przez lepkością charakter roztworu polimeru. Składowa lepka opiera się ruchowi generowanemu przez tę siłę, a składowa sprężysta stara się przywrócić włókno do jego pierwotnego położenia. Jednak w pewnym momencie, perturbacje stają się większe niż opór, co prowadzi do niestabilności zginających, które rosnąc w czasie dalszej drogi strugi, powodują skuteczne jej rozciąganie. Niestabilność osiowo-symetryczna (niestabilność kapilarna, Rayleigha), prowadzi do lokalnych przewężeń strugi. Ma to miejsce, gdy gęstość powierzchniowa ładunku staje się mała w stosunku do siły napięcia powierzchniowego. Na skutek takich zjawisk może dochodzić do przerwania strugi na pojedyncze krople lub tworzenia się koralików [1]. Ponadto, na całej drodze, jaką przebywa strumień roztworu dochodzi do stopniowego odparowania rozpuszczalnika, dzięki czemu włókno padające na kolektor jest suche lub prawie suche. Uformowane włókna mają zazwyczaj przekrój okrągły, jednak na skutek np. różnej szybkości parowania rozpuszczalnika ze strugi roztworu, może dochodzić do formowania się innych kształtów włókien takich jak np. wstążka (ang. *ribbon*) [29].

Morfologia i struktura włókien formowanych tą metodą zależą od szeregu parametrów, które zazwyczaj są grupowane w trzy kategorie: parametry roztworu, parametry procesowe oraz parametry otoczenia [2]. Do parametrów roztworu zaliczają się np.: rodzaj rozpuszczalnika, stężenie polimeru, masa cząsteczkowa, lepkość roztworu czy przewodność roztworu. Parametrami procesowymi są np.: wielkość przyłożonego napięcia, odległość dysza przędzalnicza - kolektor, szybkość przepływu itp. Do parametrów otoczenia należą np.: temperatura otoczenia, wilgotność oraz przewodność ośrodka. W praktyce większość parametrów wzajemnie od siebie zależy.

Ważnym parametrem roztworu dla formowania się struktury nadmolekularnej włókien jest rozpuszczalnik, a w szczególności szybkość jego odparowywania, która wynika z temperatury wrzenia [28]. Szybkość, z jaką zachodzi ten proces zależy też od temperatury otoczenia czy objętości z jakiej odparowuje. W elektroprzędzonych włóknach, proces ten zachodzi bardzo szybko, dlatego powstające struktury są zwykle dalekie od stanu równowagi termodynamicznej [2]. Stopień orientacji molekularnej, który jest jednym z elementów struktury nadmolekularnej, we włóknach uformowanych tą metodą, nie jest duży. Wynika to z dużej mobilności molekuł w strudze roztworu, z której nie odparował jeszcze rozpuszczalnik. Relaksacja łańcuchów polimeru zachodzi w tym wypadku szybciej niż zupełne odparowanie rozpuszczalnika z formowanego włókna [30]. Wpływ rozpuszczalnika na strukturę elektroprzędzonych włókien był analizowany przez wielu badaczy [31 - 34]. Dobrze dobrany rozpuszczalnik warunkuje odpowiednią rozpuszczalność polimeru oraz odpowiednią przewodność roztworu (stała dielektryczna). Rozpuszczalność polimeru w danym rozpuszczalniku jest jednym z kluczowych parametrów dla przędzalności roztworu. Różnice w lepkości roztworów danego polimeru w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika wynikają również z oddziaływań polimer- rozpuszczalnik, co ma swoje odzwierciedlenie w wartości parametru  $K$  i  $\alpha$  w równaniu Marka- Houwinka-Sakurady (Równanie 3). Równanie Marka-Houwinka-Sakurady wiąże lepkość roztworu polimeru z masą cząsteczkową jego łańcuchów (Równanie (2)),

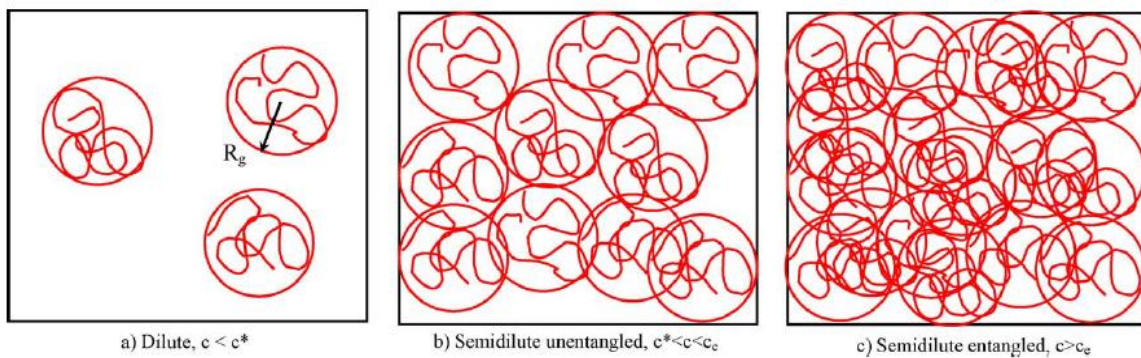
$$[\eta] = KM^\alpha \quad (3)$$

gdzie  $[\eta]$  to lepkość graniczna,  $M$  to masa cząsteczkowa oraz  $K$  i  $\alpha$  są współczynnikami zależnymi od polimeru oraz temperatury [35]. Jak wynika z równania (2) oraz (3), które są jednymi z podstawowych równań opisujących reologię roztworów polimerów, podanymi tu jako przykładowe, większość wartości jest ze sobą powiązana. Dlatego też formowanie jednorodnych włókien metodą elektroprzędzenia wymaga kontroli licznych parametrów.

Typ rozpuszczalnika jaki zostanie wybrany do formowania włókien wpływa także na konformację molekuł polimeru. W silnych rozpuszczalnikach, molekuły polimeru przyjmują konformację bardziej wydłużone, wtedy lepkość roztworu jest wysoka (wysokie wartości  $K$  i  $\alpha$ ). W słabych rozpuszczalnikach molekuły przyjmują bardziej "skłębione" konformacje, wtedy lepkość roztworu jest mniejsza (małe wartości  $K$  i  $\alpha$ ). Ostatecznie wpływa to na

przędzalność roztworu (możliwość uformowania strugi), morfologię włókien czy rozwinięcie ich powierzchni [31, 33, 34]. Efektem niewłaściwie dobranego rozpuszczalnika, jest na przykład powstawanie koralików na długości włókna. Pojawianie się koralików może wynikać także ze zbyt niskiej przewodności roztworu, a w konsekwencji zbyt małej siły elektrohydrodynamicznej powodującej rozciąganie strugi roztworu. Z drugiej strony, rozpuszczalniki dobrze przewodzące powodują powstawanie bardzo cienkich włókien, często o nanometrycznych wymiarach.

Roztwór możliwy do uformowania we włókna metodą elektroprzędzenia, powinien charakteryzować się przede wszystkim odpowiednią lepkością. Ta z kolei, zależy od jego masy cząsteczkowej i jego stężenia w roztworze, oraz jak opisano powyżej, od rozpuszczalnika. Zaobserwowano, że zwiększanie stężenia polimeru (a w konsekwencji lepkości roztworu) sprawia, że siły napięcia powierzchniowego stają się pomijalnie małe, dzięki czemu powstają wolne od defektów, jednorodne włókna [36]. Próba formowania włókien z polimerów o małej masie cząsteczkowej, najczęściej powoduje powstawanie tak zwanego elektrospray'u. W takim wypadku, włókno nie jest formowane, a ze strugi odrywają się jedynie mikroskopijne krople roztworu. Prace doświadczalne dotyczące wpływu masy cząsteczkowej na morfologię włókien były prowadzone między innymi przez Kolskiego i wsp. [37]. Wykazano, iż polimery o niższej masie cząsteczkowej wymagają przygotowania roztworów o wyższych stężeniach, aby były możliwe do formowania we włókna [37].



**Rysunek 4.** Schemat ilustrujący trzy układy roztworów polimerów: a) rozcieńczony (ang. *dilute*); b) częściowo rozcieńczony z brakiem splątania molekuł (ang. *semidilute unentangled*), c) częściowo rozcieńczony ze splątaniem molekuł (ang. *semidilute entangled*) [38].

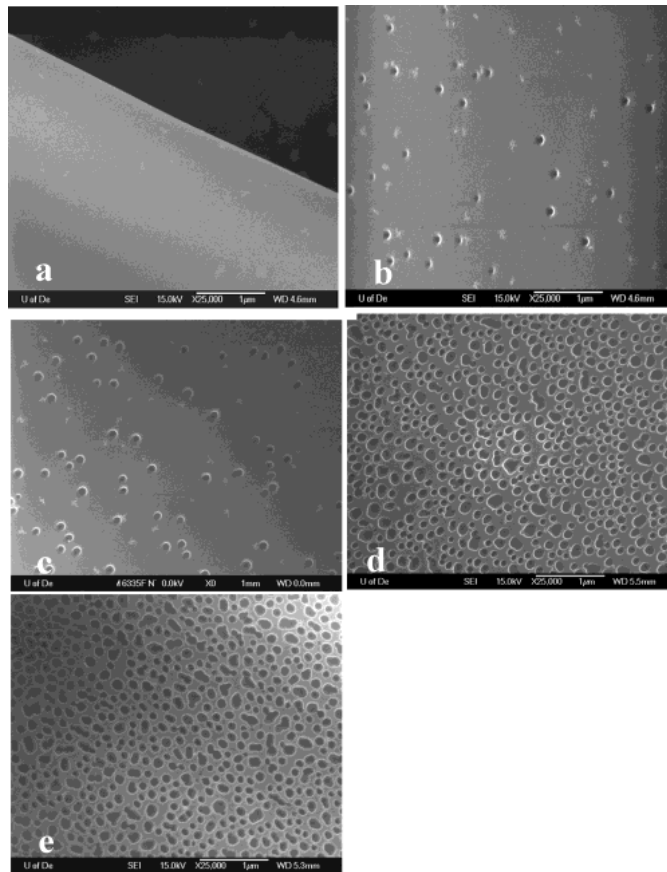
Wynika to z faktu iż molekuly polimeru nie osiągają odpowiedniego stopnia splątania (Rysunek 4) [27, 37, 38, 40]. Stężenie krytyczne splątania molekuł ( $C^*$ ) jest opisane wzorem

$$C^* \sim \frac{N}{\langle R^2 \rangle^{3/2}} \sim \frac{1}{[\eta]} \quad (2)$$

gdzie  $[\eta]$  to lepkość graniczna,  $\langle R^2 \rangle^{3/2}$  to kwadrat średniej odległości pomiędzy końcami łańcuchów polimerów [39]. Szczegółowe badania dotyczące wpływu właściwości reologicznych roztworu na morfologię włókien były prowadzone np. przez McKee i wsp.[40]. W tej pracy analizowano wpływ krytycznego stężenia splątania łańcuchów ( $C^*$ ) oraz krytycznego stężenia splątania molekuł w roztworach częściowo rozcieńczonych ( $C_e$ ) dla wybranego układu polimer/ rozpuszczalnik. Analizowano zarówno roztwory homopolimerów o strukturze liniowej jak i losowo rozgałęzionej. Jak ustalono, aby uformować jednorodne, wolne od koralików włókna, należy wykonać roztwór o stężeniu minimalnym 2-2,5  $C_e$  [40].

Kolejna kategoria parametrów to parametry procesowe. Do tej kategorii parametrów zaliczamy takie czynniki jak: wielkość przyłożonego napięcia, biegunowość napięcia (opisana dokładnie w podrozdziale 1.1.3), szybkość podawania roztworu, odległość dysza przędzalnicza – kolektor itp. Prowadzono na przykład, badania weryfikujące tezę, iż wielkość napięcia przyłożonego do dyszy przędzalniczej wpływa na średnicę włókien. Jak ustalono ten parametr wpływa na ich morfologię [41-43]. Zaobserwowano także dwa przeciwstawne mechanizmy zastosowania zbyt wysokiego napięcia przyłożonego do dyszy przędzalniczej: pocienienie włókien w wyniku wzrostu oddziaływań elektrostatycznych oraz pogrubienie włókien, na skutek wyciągania z dyszy przędzalniczej zbyt dużej ilości roztworu. Te dwa przeciwstawne mechanizmy tłumaczą często obserwowany efekt występowania pewnej minimalnej średnicy włókien przy danym napięciu. Przy zbyt małym napięciu włókna w ogóle nie zostaną uformowane. Istotnym parametrem jest także odległość dysza przędzalnicza – kolektor. Zwiększenie tej odległości przy danym napięciu, powoduje spadek natężenia pola, a w konsekwencji redukcję sił umożliwiających powstawanie włókna [44]. Zwiększenie odległości dysza-kolektor to także zwiększenie drogi strugi roztworu na jakiej dochodzi do odparowania rozpuszczalnika.

Ostatnią kategorią parametrów mających wpływ na strukturę i morfologię elektroprzędzonych włókien są parametry otoczenia, tj. temperatura, wilgotność, skład chemiczny ośrodka. Nieliczne prace naukowe wykazały, że podwyższona wilgotności ośrodka, w jakim formowane są włókna (najczęściej jest to wilgotność powietrza), powoduje redukcję średnic włókien, a w skrajnych wypadkach prowadzi do powstawania pewnych niedoskonałości na długości włókna, takich jak koraliki [45, 46]. Jest to związane ze wzrostem przewodności samego ośrodka. Wpływ wilgotności powietrza na morfologię włókien analizowano w kontekście jego wpływu na średnicę formowanych włókien, ale także na topografię ich powierzchni. Casper i wsp. [47] na przykładzie włókien polistyrenowych wykazał, że wraz ze wzrostem wilgotności powietrza zwiększa się porowatość powierzchni włókien (Rysunek 5).



**Rysunek 5.** Obrazy SEM ilustrujące powierzchnię włókien polistyrenowych o masie cząsteczkowej 190 000g/ mol, uformowanych z tetrachdrofuranu (THF) w różnych warunkach wilgotności otoczenia: a) 25 % ; b) 31-38 % ; c) 40-45% ; d) 50-59% ; e) 60-72% [47].

Jeśli chodzi o temperaturę jako parametr wpływający na morfologię uformowanych włókien, to można rozważać ten czynnik w kontekście temperatury zarówno otoczenia, w jakim prowadzony jest proces [48] jak i temperatury samego roztworu [49, 50]. Wzrost temperatury, w obu wypadkach, powoduje wzrost szybkości parowania rozpuszczalnika. W konsekwencji dochodzi do zmiany lepkości roztworu. Z drugiej strony, podwyższanie temperatury roztworu może w niektórych wypadkach poprawić rozpuszczalność czy mieszalność składników roztworu. Takie podejście może być pomocne w wypadku formowania włókien np. z politiofenów, które najlepiej formować we włókna z niepolarnych rozpuszczalników oraz w temperaturze wyższej niż temperatura otoczenia [50].

Jak doskonale pokazują badania teoretyczne i doświadczalne, elektroprzędzenie to tylko pozornie nieskomplikowany proces formowania włókien. W praktyce uzyskanie włókien o powtarzanych parametrach jest bardzo trudne, ponieważ wymaga kontrolowania wielu czynników jednocześnie. W zależności od specyfiki polimeru, który ma być formowany tą metodą, różne parametry mogą grać kluczową rolę. W przypadku formowania włókien zawierających polielektrolity, należy liczyć się z dodatkowymi komplikacjami związanymi z dysocjacją oraz możliwością tworzenia się soli w roztworze, jak również silnym wpływem biegunowości napięcia na molekuly znajdujące się w roztworze. Wymienione zagadnienia zostały opisane w kolejnych rozdziałach i podrozdziałach.

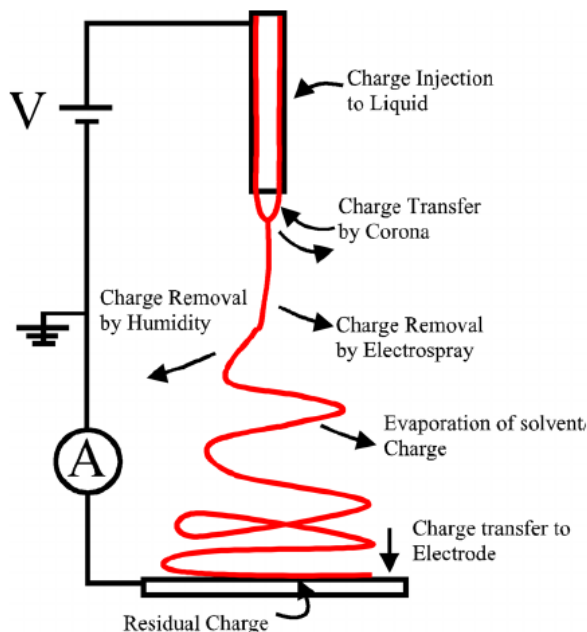
### **1.1.3 Rola biegunowości napięcia w procesie elektroprzędzenia**

Podstawą procesu elektroprzędzenia są ładunki elektryczne, które umożliwiają powstawanie sił rozciągających roztwór, a w konsekwencji tworzenie jego strugi (Rysunek 6). Napięcie elektryczne może być doprowadzone do roztworu na różne sposoby, jak pokazano na Rysunek 7. W uproszczonym założeniu, ładunki elektryczne powinny być stopniowo odprowadzane ze strugi roztworu i włókien, które są ostatecznie zbierane na uziemionym kolektorze. Zanim jednak do tego dojdzie, ładunki elektryczne są obecne na powierzchni strugi czy włókna, wpływając tym samym na ich strukturę oraz właściwości. Na drodze pomiędzy dyszą a kolektorem, gdy ze strugi roztworu nie odparował jeszcze cały rozpuszczalnik, ładunki elektryczne tożsame ze znakiem potencjału elektrycznego przyłożonego do dyszy, są gromadzone na powierzchni strugi roztworu, jak pokazuje



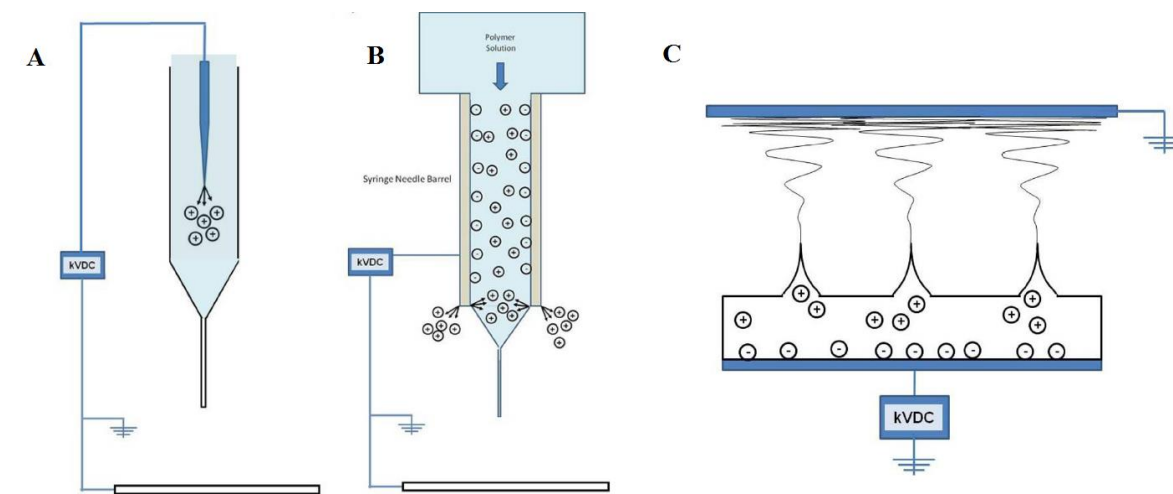
Rysunek 2. Obecność ładunków na powierzchni strugi, może wpływać na orientowanie się czy interakcje molekuł polimerów ją tworzących. Dlatego też, jest to kluczowy moment dla tworzącej się struktury nadmolekularnej włókien formowanych metodą elektroprzędzenia. Po całkowitym odparowaniu rozpuszczalnika, struktura ta zostanie w pewien sposób ustabilizowana, co ostatecznie warunkuje niektóre właściwości włókien (np. wytrzymałość mechaniczną). To właśnie opisane powyżej zjawiska zachodzące w strudze dwuskładnikowego roztworu zawierającego polielektrolit i poddanego działaniu napięcia o różnych znakach potencjału elektrycznego są przedmiotem analizy w niniejszej pracy doktorskiej. Drugim przypadkiem jest sytuacja, w której już na włóknie, z którego zupełnie odparował rozpuszczalnik, pozostają pewne ładunki elektryczne. Ich obecność wpływa na właściwości powierzchniowe całej włókniny np. zwilżalność czy energię powierzchniową. Jak pokazały badania Schreuder- Gibsona i wsp. [51] napięcie elektryczne na powierzchni włókien nawet po 20 h od wyprzędzenia, może utrzymywać się na poziomie 1 kV. W zależności od późniejszego zastosowania włókniny, efekt ten może być rozpatrywany zarówno jako korzystny jak i niekorzystny. Przykładem, gdy to zjawisko jest korzystne, może być zastosowanie włókien w filtracji wody czy fizycznej adsorpcji substancji leczniczych przez włókninę. Z drugiej strony może to być zjawisko niekorzystne w przypadku próby uzyskania włókien ukierunkowanych, zbieranych na niektóre rodzaje kolektorów [52]. Ilość ładunków elektrycznych pozostałych na powierzchni włókien zależy od szeregu czynników, takich jak struktura molekularna i nadmolekularna polimeru, przewodność elektryczna roztworu, obecność dodatków w roztworze, warunki otoczenia, wyładowania koronowe itp. [53]. Stopniowe gromadzenie ładunków we włóknach według Collins i wsp. [53], może doprowadzić do zakończenia elektroprzędzenia ze względu na zmniejszenie różnicy potencjałów pomiędzy kolektorem a dyszą przędzalniczą lub też może spowodować skierowanie strugi roztworu do innego obszaru o niższym potencjale elektrycznym [53]. W praktyce drugi efekt jest najczęściej obserwowany w połączeniu z innymi czynnikami, co w konsekwencji powoduje pewne straty materiałowe. Jak zauważył Schreuder-Gibson i wsp. [51], sama biegunowość napięcia nie ma wpływu na ilość zatrzymywanego ładunku elektrycznego. Według Tsai i Gibsona [54] polimery polarne, które mają tendencję do zatrzymywania wody, przez co wykazujące większą przewodność elektryczną, charakteryzują się małym gromadzeniem ładunków elektrycznych. Podobnie

zachowuje się nylon 6, nylon 66, poliuretany, tlenek polietylenu (PEO) czy poli( $\epsilon$ -kapolakton) (PCL). Z drugiej strony, niektóre polimery jak np. polistyren, poliwęglan czy poliakrylonitryl mogą utrzymywać resztkowe ładunki elektryczne nawet przez kilka dni lub tygodni po uformowaniu we włókna metodą elektroprzędzenia [54]. Bardziej szczegółowe badania dotyczące resztkowego ładunku elektrycznego i orientacji molekularnej w teraftalanie polibutylenu prowadził Catalani i wsp. [55].



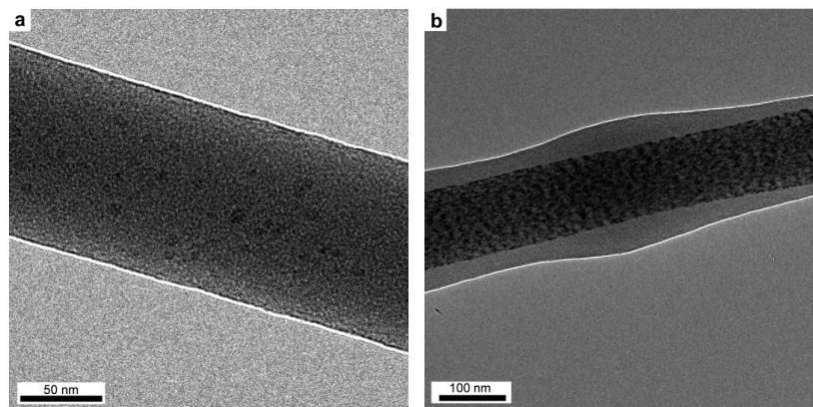
**Rysunek 6.** Schemat ilustrujący mechanizmy transportu ładunków elektrycznych w czasie elektroprzędzenia [53].

Jak wspomniano wcześniej, w związku z dużą mobilnością molekuł w strudze elektroprzędzonego roztworu oraz możliwym gromadzeniem się ładunków elektrycznych na włóknie warto zastanowić się nad wpływem zastosowanego napięcia na ich strukturę i właściwości. W tym przypadku można mieć na uwadze nie tylko różnicę potencjałów pomiędzy dyszą przędzalniczą a kolektorem, ale także biegunowość napięcia w układzie. Biegunowość napięcia może być zmieniana poprzez przyłożenie ujemnego lub dodatniego znaku potencjału elektrycznego do dyszy. Można także zmieniać znak potencjału elektrycznego zarówno dyszy jak i kolektora.



**Rysunek 7.** Schemat ilustrujący transport jonów w strudze roztworu w zależności od zastosowanego układu: A) elektroda zanurzona w roztworze; B) wysokie napięcie przyłożone do dyszy przędzalniczej o dodatnim znaku ładunku elektrycznego; C) elektroda płytkowa [53].

Wpływ różnicy potencjałów na stabilność strugi roztworu był opisywany przez wielu autorów [28, 56]. Nadmiar ładunku na powierzchni strugi powoduje powstawanie falistości na jej powierzchni. Gdy ilość ładunków na powierzchni strugi przekroczy wartość krytyczną dochodzi do wielostrumieniowego przędzenia roztworu. Za klasyczny układ do elektropzędzenia przyjmuje się taki układ, w którym do dyszy przędzalniczej podłączone jest wysokie napięcie o dodatnim znaku potencjału elektrycznego, a kolektor jest elementem uziemionym. Wpływ biegunowości napięcia w układzie klasycznym na strukturę włókien opisał np. Tsaroom i wsp. [57]. W tym wypadku formowano włókna typu rdzeń- otoczka (ang. *core-shell*). Włókna były uformowane z mieszaniny wybranych polimerów oraz soli metali. Obrazowanie transmisyjnym mikroskopem elektronowym ujawniło spontaniczną samoorganizację składników włókien w strukturę typu rdzeń otoczka (Rysunek 8). Fakt ten powiązano z dwoma czynnikami: oddziaływaniami odpychającymi pomiędzy atomami metalu a obarczoną dodatnim ładunkiem elektrycznym powierzchnią strugi roztworu, oraz postępującym frontem krystalizacji polimeru, spychającym atomy metalu do rdzenia strugi roztworu. Zmiany w strukturze krystalicznej polimeru zostały potwierdzone za pomocą takich metod analizy jak skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC) czy szerokokątowa dyfrakcja rentgenowska [57].



**Rysunek 8.** Obrazy uzyskane techniką transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) ilustrujące rozkład składników włókien: a) próbka kontrolna (mieszanka polimerów) F127/PEO; b) próbka zawierająca sole metali - F127/ PEO/MS [57].

Zmiany zaobserwowane pod wpływem wybranej biegunowości napięcia w strukturze włókien analizowane przez Tsaroom i wsp. [57] doskonale obrazują jak duży wpływ na ich strukturę ma biegunowość napięcia. W związku z tym można przypuszczać, że równie silne efekty mogą być obserwowane na molekułach polimerów. Spontaniczną samoorganizację molekuł chitozanu i kwasu hialuronowego zaobserwował Ma i wsp. [58]. W tych badaniach jako próbki referencyjne w analizie wykonanej metodą spektroskopii fotoelektronów w zakresie promieniowania X (XPS) zastosowano próbki wykonane metodą inną niż elektroprzędzenie. Każdy z komponentów był analizowany jako samodzielna próbka, dlatego też odniesienie tych wyników do rezultatów jakie dały próbki włókien uformowanych z obu składników jest problematyczne [58].

Podobne badania były prowadzone także przez Stachewicz i wsp. [59]. Włókna z nylonu 6 (PA6) zostały uformowane z zastosowaniem ujemnego i dodatniego znaku potencjału elektrycznego na dyszy przędzalniczej. W zależności od zastosowanego znaku potencjału elektrycznego, włókna wykazywały różną dystrybucję atomów tlenu i azotu na powierzchni (Tabela 1). Szczegółowa analiza właściwości powierzchni została przeprowadzona także za pomocą techniki AFM, dzięki której określono napięcie powierzchniowe ( $\gamma_1$ ), składową polarną ( $\gamma_1^p$ ) i dyspersyjną ( $\gamma_1^d$ ) według teorii Owensa-Wendta. Zaobserwowano o około 20% niższą energię powierzchniową włókien nylonowych uformowanych zastosowaniem ujemnego znaku potencjału elektrycznego na dyszy niż

włókien uformowanych z dodatnim znakiem potencjału elektrycznego [59]. Co więcej, składowa polarna włókien uformowanych z ujemnym znakiem potencjału elektrycznego na dyszy była znacząco niższa niż włókien formowanych w układzie o dodatnim znaku potencjału elektrycznego na dyszy. Jak wyjaśniają autorzy, mobilne makrocząsteczki polimeru w roztworze, orientowały się zgodnie z prawem Coulomba: obarczone ujemnym ładunkiem elektrycznym grupy funkcyjne PA6 były odpychane od powierzchni strugi polimeru, na której były zgromadzone ujemne ładunki elektryczne. Ostatecznie taki układ był utrwalany poprzez wysuszenie włókna na skutek odparowania rozpuszczalnika [59].

**Tabela 1.** Udział procentowy atomów tlenu O(1s) oraz azotu N(1s) na powierzchni włókien PA6 uformowanych z zastosowaniem ujemnego i dodatniego potencjału znaku elektrycznego na dyszy przedziałniczej. Wyniki uzyskane metodą XPS przy kącie padania wiązki 0° i 75° do płaszczyzny zebranych włókien [59].

Sample	Component	XPS measurement angle 0 [°]	XPS measurement angle 75 [°]
PA6 nanofibers (+)	O (1s) [%]	10.88	7.97
	N (1s) [%]	8.06	5.49
PA6 nanofibers (-)	O (1s) [%]	10.36	1.09
	N (1s) [%]	11.41	18.70

Prace nad poliamidem-6 (nylon 6, PA6) w kontekście biegunowości napięcia były prowadzone także przez Supaphola i wsp. [60]. W tej pracy zauważono różnice morfologiczne pomiędzy włóknami wykonanymi z zastosowaniem różnej biegunowości napięcia. Analizowano przy tym także wpływ szeregu innych parametrów i nie pogłębiono analizy o inne zagadnienia jak np. analiza struktury krystalicznej czy energii powierzchniowej [60]. Wpływ biegunowości napięcia był też analizowany przez Tong i wsp. [61] na przykładzie włókien poli(3-hydroksymaślanu-*co*-3-hydroksywalerianu) (PHBV). Niektóre prace dowodzą, iż zastosowanie odpowiedniej biegunowości napięcia, może mieć wpływ na późniejszą odpowiedź komórkową w badaniach *in vitro* [62]. Wykazano, że indukowany odpowiednią biegunowością napięcia ładunek elektryczny powierzchni włókien może wpływać na aktywność enzymów indukujących przemianę fosforanów (fosfataza alkaliczna) [62].

W innych pracach zaobserwowano, że nagromadzenie ładunków elektrycznych na powierzchni włókien może powodować powstawanie bardziej przestrzennych form włókniny (podobnej do waty). Bonino i wsp. [63] opisali zjawisko tworzenia się przestrzennych form włókniny z elektroprzędzonych włókien politlenku etylenu (PEO) oraz alginianu. Autorzy pracy wiązali ten efekt z wpływem znaku potencjału ładunku elektrycznego na dyszy na orientację molekuł we włóknie. Jak wykazali autorzy pracy, molekuly alginianu były rozmieszczone na powierzchni włókien i w skutek działania sił odpychających pomiędzy obciążonymi ujemnym ładunkiem elektrycznym powierzchniami, doszło do uformowania przestrzennej formy włókniny. Ponadto zauważono, że wilgotność ośrodka w jakim prowadzony był proces elektroprzędzenia miała istotny wpływ na tworzenie opisanej struktury włókniny z alginianem [63].

Ponadto, były prowadzone badania nad wpływem biegunowości napięcia na formowanie włókien chitozanu, co opisano w podrozdziale 1.2.2.

W literaturze można znaleźć także prace dotyczące takich układów, w których dodatkowo zmienia się znak potencjału elektrycznego kolektora [64]. W układzie klasycznym, kolektor jest zazwyczaj elementem uziemionym. W tych pracach zaproponowano inne rozwiązania, które jak wykazano, mogą wpływać na niektóre cechy włókien. Analizowane były układy, w których zwiększano różnicę potencjałów elektrycznych pomiędzy dyszą a kolektorem, poprzez podłączenie kolektora do zasilacza wysokonapięciowego [51, 65]. Prace te wykazały, że taka metoda zwiększenia napięcia elektrycznego pomiędzy dyszą a kolektorem, powoduje formowanie włókien o wyraźnie mniejszej średnicy w porównaniu do układu tradycyjnego. Innym przykładem, jest praca Kilicy i wsp. [66], którzy zaproponowali układ odwrócony, w którym to kolektor jest podłączony do zasilacza wysokonapięciowego, a dysza przędzalnicza jest uziemiona. W tym układzie włókna powstają z dużym trudem. Uziemienie dyszy spowodowało na tyle wyraźną redukcję ładunków w roztworze polimeru, że nie powstały siły, które mogłyby zainicjować formowanie strugi.

Wiele prac wskazuje na istotny efekt biegunowości napięcia na wiele cech włókien. Jest to istotna informacja z punktu widzenia potencjalnego zastosowania włókien uformowanych metodą elektroprzędzenia w inżynierii tkankowej. Jak widać z powyższego

przeglądu literaturowego, tylko nieliczne prace dotyczą włókien uformowanych z polielektrolitów. W literaturze brakuje także badań nad wpływem biegunowości napięcia na strukturę i właściwości dwuskładnikowych włókien uformowanych z mieszanin zawierających polielektrolity.

## 1.2 Polielektrolity

Polielektrolity są związkami naturalnie występującymi w tkankach żywych organizmów. Są one także wykorzystywane w tworzeniu rusztowań komórkowych czy systemów dostarczania leków. W podrozdziale 1.2.1 zostaną omówione wybrane zagadnienia dotyczące struktury i właściwości polielektrolitów oraz ich roztworów. W podrozdziale 1.2.2 zostaną omówione wybrane prace dotyczące tworzenia włókien chitozanu metodą elektroprzędzenia, a w podrozdziale 1.2.3 prace badawcze dotyczące wpływu biegunowości napięcia na proces formowania włókien zawierających chitozan.

### 1.2.1 Właściwości roztworów polielektrolitów

Zgodnie z definicją Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC), polielektrolity to polimery składający się z makrocząstek, w których znaczna część jednostek podstawowych (merów) zawiera grupy jonowe lub/i zdolne do jonizacji. W rozpuszczalnikach polarnych, takich jak woda, grupy te mogą dysocjować. Przykładami polielektrolitów są polistyrenosulfonian, poliakryl, polimetyloakryl, kwas hialuronowy, chitozan czy DNA. Polielektrolity i oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy ich makromolekułami mają bardzo istotne znaczenie w kontroli różnych procesów, od inżynierii materiałowej do biofizyki. Przykładem takich oddziaływań jest elektrostatyczne przyciąganie się obarczonych ujemnym znakiem potencjału elektrycznego helis DNA z histonami o dodatnim znaku potencjału elektrycznego, co w konsekwencji prowadzi do kondensacji DNA w chromosomy [67].

W przypadku elektroprzędzenia, bardzo istotną kwestią jest zrozumienie zjawisk zachodzących w roztworach polielektrolitów, tj. interakcji polimer-rozpuszczalnik, polimer-polimer i wpływu rozpuszczalnika na konformację makromolekuł polimeru. Roztwory

polielektrolitów można podzielić na: roztwory wolne od soli oraz roztwory zawierające sole. W grupie roztworów polielektrolitów nie zawierających soli można dodatkowo wyróżnić: roztwory wykonane w rozpuszczalniku teta ( $\theta$ ) lub w rozpuszczalniku zapewniającym silne oddziaływania pomiędzy rozpuszczalnikiem a molekułami polimeru (dobra rozpuszczalność) oraz roztwory o słabej rozpuszczalności [68].

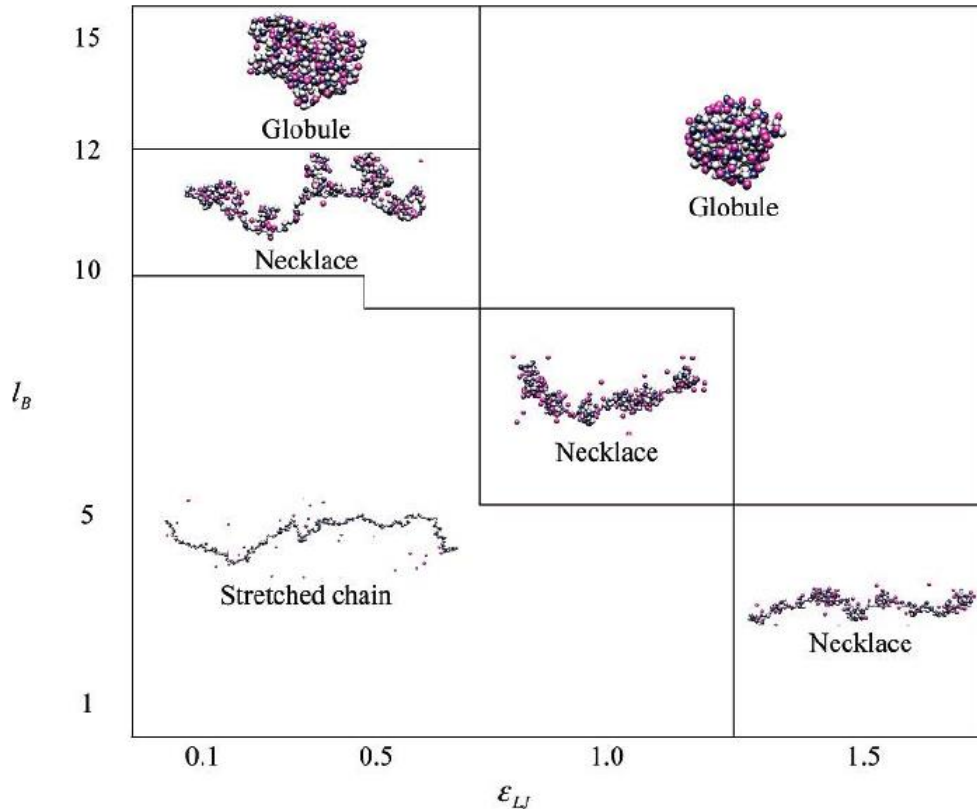
Jak zauważono w podrozdziale 1.1.2, konformacja molekuł polimeru w roztworze jest zależna od siły ich oddziaływań z rozpuszczalnikiem. W roztworach wolnych od soli, wykonanych z rozpuszczalnika teta ( $\theta$ ) lub w rozpuszczalniku zapewniającym silne oddziaływania z makromolekułami polielektrolitu, poniżej stężenia krytycznego splątania molekuł, oddziaływania wewnątrz-molekularne dominują nad oddziaływaniami międzymolekularnymi. Siła oddziaływań elektrostatycznych jest zależna od odległości pomiędzy nimi (tzw. odległość Bjerrum), a ta opisana jest przez równanie,

$$l_B = e^2 / \epsilon k_B T \quad (4)$$

gdzie  $e$  to ładunek,  $\epsilon$  to stała dielektryczna,  $k_B T$  to energia termiczna. W takich rozpuszczalnikach konformacja łańcuchów makromolekuł jest utrzymywana przez oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe oraz sprężystość łańcucha (ang. *chain elasticity*). Symulacje teoretyczne deformacji łańcucha polielektrolitu w takich warunkach zostały opisane przez Liao i wsp. [69]. Przejście roztworu z rozpuszczonego do częściowo rozpuszczonego ma miejsce, gdy odległość pomiędzy łańcuchami polimeru jest porównywalna z ich wielkością. Stężenie przy jakim zachodzi taka zmiana jest zazwyczaj wyraźnie niższe niż dla polimerów neutralnych [69]. W przypadku roztworów polielektrolitów w słabym rozpuszczalniku, molekuły przybierają kształt gęsto upakowanych sfer. W takim wypadku ilość oddziaływań polimer-polimer jest maksymalizowana, podczas gdy redukowane są oddziaływania polimer- rozpuszczalnik. Badania nad konformacją molekularną polielektrolitów w słabych rozpuszczalnikach były prowadzone np. przez Limbacha i wsp. [70]. W zależności od jakości rozpuszczalnika oraz od wartości pH-  $pK_0$ , łańcuch polimeru może przyjmować pięć różnych konformacji: zwój (ang. *coil*), zapadnięta sfera (ang. *collapsed spherical globule*), łańcuch z koralikami (ang. *neckles globule*), łańcuch z dużymi, miejscowymi splątaniem łańcucha (ang. *sausage like aggregate*) czy w pełni



rozciągniętego łańcucha [68]. Przy czym, niektóre z tych struktur są bardzo niestabilne jak np. struktura łańcucha z koralikami, w której rozpuszczalnik efektywnie osłabia przyciągania pomiędzy jednostkami łańcucha [71]. W słabych rozpuszczalnikach może dochodzić do separacji faz, tym wyraźniejszej im większe jest stężenie polimeru w roztworze. Łańcuchy polimeru mogą wtedy przyjąć strukturę sferyczną, cylindryczną lub lamelarną, w zależności od stężenia polimeru [72].



**Rysunek 9.** Schemat ilustrujący typowe konformacje molekuł polielektrolitu o stopniu polimeryzacji  $N=304$  oraz o stopniu obciążenia ładunkiem elektrycznym  $f=1/3$ . Obarczone ujemnym znakiem potencjału elektrycznego molekule polielektrolitu są oznaczone kolorem niebieskim, molekule neutralne są oznaczone kolorem szarym, a obarczone dodatnim ładunkiem elektrycznym jony są oznaczone na czerwono [73].

Z punktu widzenia przygotowania roztworu do elektroprzędzenia ważne są właściwości reologiczne roztworów. Lepkość roztworów polielektrolitów jest wartością proporcjonalną do kwadratu stężenia polimeru w roztworach o wysokim stopniu rozpuszczenia oraz  $c^{1.3}$  w roztworach częściowo rozpuszczonych [74]. Ponadto, czas

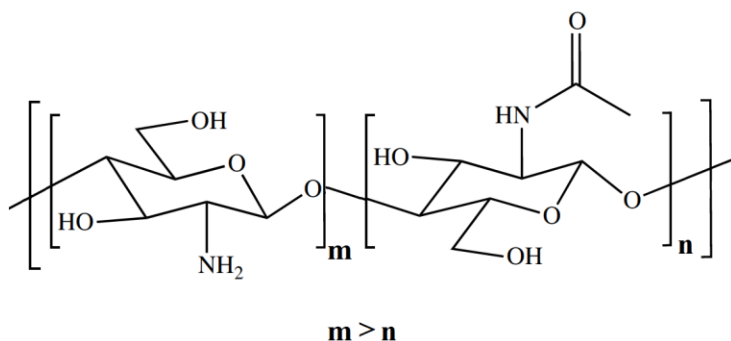
relaksacji makromolekuł jest zależny od stężenia roztworu. W roztworach dobrze rozpuszczonych czas relaksacji bardzo silnie zależy od stopnia polimeryzacji polimeru. Czas relaksacji jest też krótszy, gdy stężenie polimeru jest wyższe [68]. Jak wynika z powyższych informacji odpowiednio dobrany rozpuszczalnik ma istotne znaczenie dla reologicznych właściwości roztworów. Może także wyraźnie wpłynąć na strukturę nadmolekularną włókien, zarówno uformowanych z samych polielektrolitów jak i z ich mieszanin z innymi polimerami. W przypadku zastosowania rozpuszczalników, w których obecne są sole, oddziaływania molekuł polielektrolitu, są ekranowane przez jony soli, a siła tych oddziaływań obniża się wykładniczo z odległością pomiędzy makromolekułami [68]. Obecność wielowartościowych soli w roztworze również może wpływać na konformację molekuł. W przypadku, gdy stężenie soli jest duże, może dochodzić do gromadzenia się jonów soli wokół makromolekuły polielektrolitu oraz do lokalnej kompensacji jej ładunku elektrycznego [68]. Ponadto, roztwory polielektrolitów, w których obecne są sole, są bardzo wrażliwe na różne czynniki zewnętrzne, jak np. na przepływ. W czasie formowania włókien metodą elektroprzędzenia, roztwór polimeru porusza się w dyszy przędzalniczej w przepływie ścinającym, co dodatkowo wpływa na ostateczną strukturę nadmolekularną włókien. Prace dotyczące tego tematu były prowadzone przez Pamiesia i wsp. [75].

Konformacje molekuł polielektrolitów mogą mieć istotne znaczenie w przypadku ich adsorpcji do wybranych powierzchni. Zjawisko adsorpcji polielektrolitów jest wykorzystywane w osadzaniu warstw polimerów na materiałach do zastosowania medycznego tzw. metodą warstwa po warstwie (ang. *layer-by-layer assembly*), opisaną szczegółowo w podrozdziale 1.3.4. Zagadnienia adsorpcji polielektrolitów do obarczonych ładunkiem elektrycznym powierzchni były także przedmiotem wielu prac badawczych [76, 77]. Ważnymi parametrami warunkującymi efektywność adsorpcji są: gęstość i rozkład ładunku na powierzchni, rozpuszczalnik oraz siła bliskich oddziaływań pomiędzy molekułami polielektrolitu i molekułami powierzchni, do której są przyłączane [68]. Typ rozpuszczalnika wpływa na konformację molekuł osadzonych na danej powierzchni. Ustalono, że konformacja osadzonych molekuł jest funkcją gęstości ładunku na powierzchni oraz interakcji polimer- rozpuszczalnik, polimer- polimer oraz polimer-powierzchnia [78]. Wyniki prac teoretycznych Reddy'ego i wsp. [78] wykazały, że dynamika rotacyjna i translacyjna polijonów przebiega szybciej w wypadku zastosowania słabszego

rozpuszczalnika. Jak wyjaśniają autorzy pracy, prawdopodobnie jest to związane ze zmniejszeniem wielkości łańcucha polielektrolitu, co w konsekwencji powoduje wzrost współczynnika dyfuzji łańcuchów styčných do powierzchni [78].

### 1.2.2 Chitozan

Chitozan to liniowy, częściowo-krystaliczny polisacharyd, który zbudowany jest z jednostek (1→4) -2-acetoamido-2-deoksy-b-D-glukano (N-acetylo D- glukozaminy) oraz (1→4)-2-amino-2-deoksy-b-D-glukano (D- glukozaminy) (Rysunek 10). Chitozan jest polielektrolitem. Zazwyczaj pozyskiwany jest metodą częściowej deacetylacji chityny, polisacharydu budującego zewnętrzne pancerze stawonogów [79]. Stopień deacetylacji (DDA) chitozanu określa ilości grup aminowych wzdłuż łańcucha tego polisacharydu i definiowany jest jako stosunek ilości grup D- glukozaminy to sumy ilości grup D- glukozaminy i N-acetylo D- glukozaminy. Przyjmuje się, że chitozan posiada co najmniej 60% grup glukozaminy w swojej strukturze chemicznej. W związku ze zmiennymi właściwościami chitozanu w zależności od jego masy cząsteczkowej czy stopnia deacetylacji, można powiedzieć, że jest to grupa materiałów o podobnej strukturze chemicznej.



**Rysunek 10.** Schemat struktury chemicznej chitozanu.

Z budowy chemicznej chitozanu wynika szereg właściwości tego związku. Dzięki obecności większej ilości grup D- glukozaminy, chitozan jest dobrze rozpuszczalny w wodnych roztworach kwasów o pH <6. W przypadku chityny, właśnie słaba rozpuszczalność ogranicza jej praktyczne zastosowanie [80]. Grupy aminowe chitozanu

mogą tworzyć kompleksy jonowe z innymi związkami. Dlatego też chitozan jest materiałem często stosowanym do oczyszczania wody czy napojów (np. wino, soki). W praktyce najczęściej wykorzystuje się pochodne chitozanu jak np. *O*-karboksymetylochitozan czy chitozan-*6-O*-siarczan. Ponadto, protonowane grupy aminowe umożliwiają tworzenie kompleksów chitozanu z innymi związkami chemicznymi jak lipidy, proteiny, DNA czy polianiony innych polisacharydów. Chitozan wykazuje także właściwości przeciwbakteryjne [81], przeciwgrzybiczne [82], mukoadhezyjne [83] oraz hemostatyczne [84]. Większość wymienionych właściwości chitozanu wynika z obecności protonowanych grup aminowych. Tak na przykład, przeciwgrzybiczne właściwości tego związku wynikają ze zdolności jonowego łączenia się z obdarzonymi ujemnym ładunkiem elektrycznym resztami mucyny (kwas sialowy). Badania wykazały, że im wyższy jest stopień deacetylacji chitozanu tym lepszy efekt przeciwgrzybiczy [85]. Podobnie tłumaczony jest efekt hemostatyczny chitozanu czy łatwość oddziaływania z elementami błony komórkowej (mukoadhezja). Efekt bakteriobójczy jest tłumaczony najczęściej jako kombinacja oddziaływania z elementami błony komórkowej oraz możliwością wiązania się z DNA bakterii, co prowadzi do inhibicji syntezy RNA [86]. Ważnym aspektem zastosowania chitozanu w materiałach biomedycznych jest także jego biodegradacja. Do chwili obecnej ustalono, że w warunkach *in vivo* chitozan jest degradowany przez kilka proteaz, lizozymy czy chitynazy [87]. Degradacja chitozanu prowadzi do powstania nietoksycznych oligosacharydów, o różnej długości łańcucha, które ostatecznie są włączane do szlaku metabolicznego komórek. Degradacja chitozanu jest także powiązana z jego stopniem deacetylacji, co z kolei wiąże się ze strukturą krystaliczną. Chitozan osiąga maksymalną krystaliczność, gdy stopień jego deacetylacji wynosi 100%. Wraz z obniżaniem stopnia deacetylacji, krystaliczność spada. Jak zauważono wraz ze spadkiem stopnia deacetylacji, a tym samym stopnia jego krystaliczności, szybkość degradacji chitozanu rośnie. Dodatkowym czynnikiem wpływającym na krystaliczność chitozanu i szybkość jego biodegradacji jest rozmieszczenie grup aminowych wzdłuż łańcucha [88].

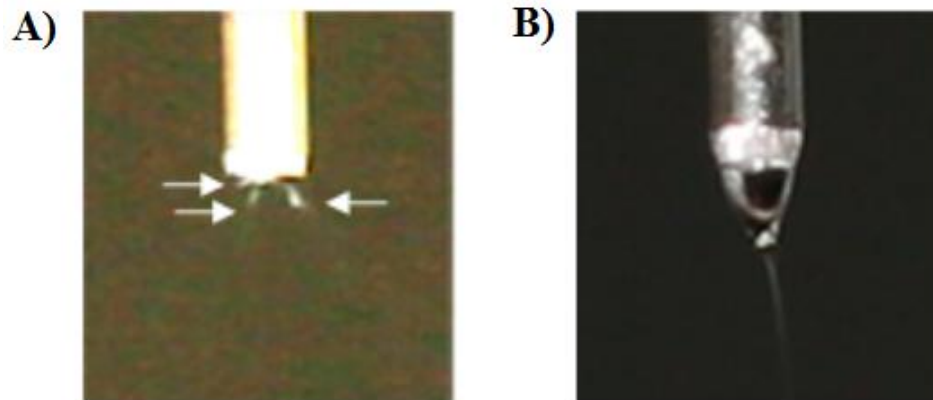
Jak wspomniano wcześniej, chitozan jest dobrze rozpuszczalny w wodnych roztworach kwasów. Właściwości roztworu chitozanu zależą od takich parametrów jak: typ rozpuszczalnika, stopień deacetylacji, masa cząsteczkowa, koncentracja jonów, pH oraz rozmieszczenie grup aminowych w łańcuchu. Bardzo istotne są także wewnątrzcząsteczkowe

wiązania wodorowe [79]. Rozpuszczalność chitozanu była analizowana na przykład w kwasie octowym [89] czy w kwasie chlorowodorowym [90]. Jak wykazały badania, stopień jonizacji grup aminowych zależy od pH oraz  $pK$  rozpuszczalnika [89, 90]. Zauważono także, że dla właściwości reologicznych roztworu bardzo istotna jest sztywność łańcucha chitozanu.

Jak zauważono wcześniej, ze względu na polielektrolityczny charakter chitozanu, może on tworzyć kompleksy elektrostatyczne z innymi jonami czy polijonami. Kompleksy jonowe mogą być formowane zarówno z obciążonymi przeciwnym ładunkiem elektrycznym surfaktantami (np. dodecylosiarczan sodu) jak i polielektrolitami (np. alginian, heparyna, kwas hialuronowy, siarczan chondroityny czy kwas poliakrylowy). Kompleksy polielektrolitów są powszechnie stosowane w materiałach przeciwzakrzepowych, systemach uwalniania leków czy enzymów. Efektywność tworzenia kompleksów polielektrolitów jest procesem zależnym od takich parametrów jak gęstość ładunku, pH czy przewodność roztworu.

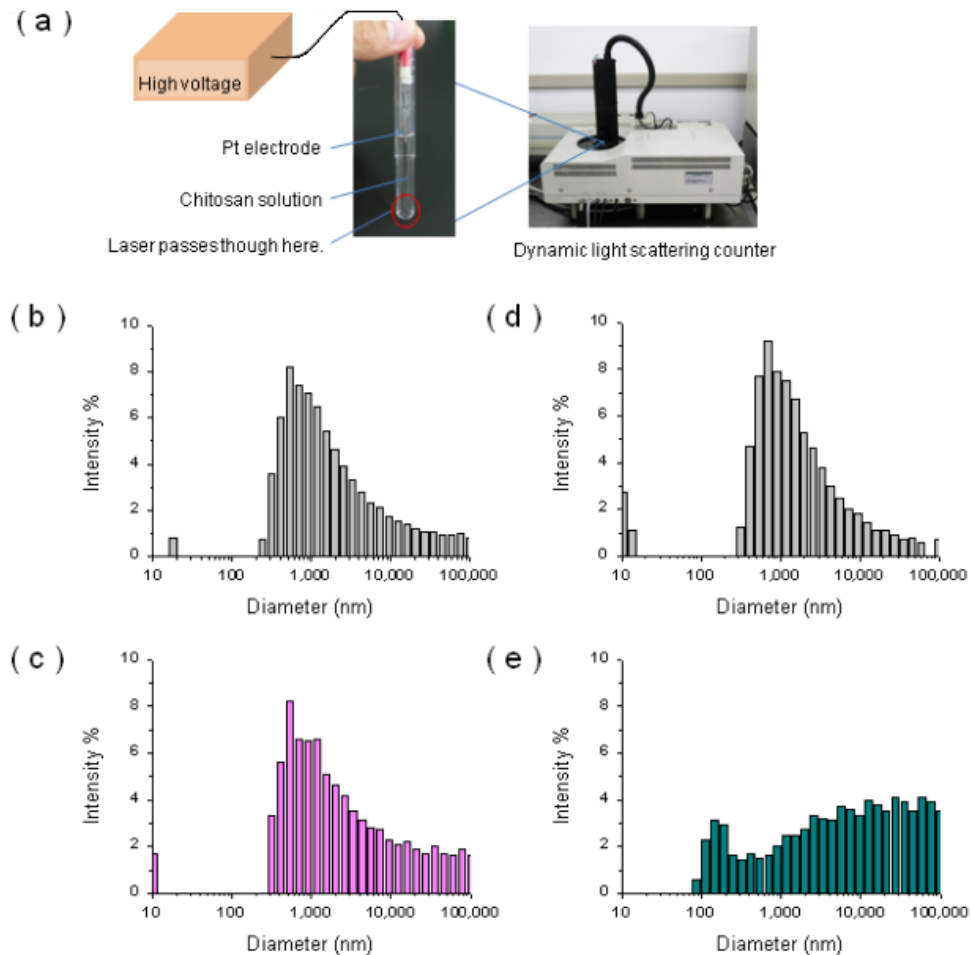
### **1.2.3 Elektroprzędzenie roztworów chitozanu**

Elektroprzędzone włókna zawierające polimery naturalne są często sugerowanym materiałem do zastosowań biomedycznych, ze względu na swoje wysokie podobieństwo chemiczne i morfologiczne do struktur występujących w tkankach żywych organizmów [91-93]. Ze względu na swoje właściwości, chitozan jest najczęściej wykorzystywany do tworzenia włókien przeznaczonych do regeneracji struktur układu krwionośnego czy szkieletowego, a także jako opatrunek medyczny. W literaturze fachowej można znaleźć prace dotyczące formowania włókien zawierających tylko chitozan [94], a także prace dotyczące jego mieszanin z innymi polimerami naturalnymi i syntetycznymi [91, 93, 95]. Włókna uformowane z mieszanin polimerów, wykazują zazwyczaj lepsze właściwości użytkowe, a ich formowanie metodą elektroprzędzenia jest łatwiejsze. W kontekście elektroprzędzenia roztworów chitozanu szczególną uwagę badaczy zwróciły dwa parametry, które mają istotny wpływ na efektywność procesu i właściwości uformowanych włókien: zastosowany rozpuszczalnik oraz biegunowość napięcia.



**Rysunek 11.** Zdjęcie przedstawiające koniec dyszy przędzalniczej w czasie elektroprzędzenia: a) wielostrumieniowe przędzenie roztworu chitozanu przy napięciu +14kV; b) utworzony stożek Taylora i jednostrumieniowe przędzenie roztworu chitozanu przy napięciu -14kV [94].

Jedna z prac dotyczących wpływu biegunowości napięcia na formowanie włókien chitozanu została opublikowana przez Teradę i wsp. [94]. Badania dotyczyły włókien chitozanu formowanych z wodnego roztworu kwasu octowego przy zastosowaniu dwóch układów biegunowości napięcia, z dodatnim i ujemnym znakiem potencjału elektrycznego przyłożonym do dyszy przędzalniczej. W pracy zwrócono uwagę na wpływ zastosowanej biegunowości napięcia na właściwości reologiczne roztworu chitozanu. Zaobserwowano, że zastosowanie dodatniego potencjału elektrycznego na dyszy spowodowało wielostrumieniowe przędzenie roztworu (Rysunek 11A). W tym wypadku, siły odpychające oddziaływań pomiędzy jednoimiennymi ładunkami wyraźnie przewyższyły siły napięcia powierzchniowego. W przypadku zastosowania ujemnego potencjału elektrycznego na dyszy przędzalniczej, formowana była pojedyncza struga polimeru (Rysunek 11B). Zdaniem autorów pracy [94] było to efektem deprotonowania grup aminowych chitozanu.



**Rysunek 12.** Wpływ przyłożonego napięcia elektrycznego na agregowanie molekuł chitozanu w roztworze. a) układ eksperymentalny z elektrodą Pt zanurzoną w roztworze; b) c) rozkład wielkości cząstek przed przyłożeniem napięcia; d) rozkład wielkości cząstek po przyłożeniu napięcia +16kV; e) rozkład wielkości cząstek po przyłożeniu napięcia -16kV [94].

Jak wykazują inne prace badawcze [96], pod wpływem przyłożonego napięcia o ujemnym znaku ładunku elektrycznego, chitozan może agregować na powierzchni elektrody, a jego ładunek elektryczny może być neutralizowany [96]. Gdy zastosowane zostanie napięcie rzędu 0,5- 2,5 V na anodzie, proces zachodzi stopniowo, a warstwa osadzonego na anodzie polielektrolitu może sięgać nawet 1  $\mu\text{m}$  [96]. Podobny eksperyment przeprowadził Terada i wsp. [94], w którym to poddali pomiarom metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS) rozkład molekuł chitozanu w roztworach o gęstości 1 mg/ml,

poddanych działaniu napięcia o wielkości 16 kV (Rysunek 12), takiego jak stosowano w czasie elektroprzędzenia tych roztworów. Autorzy pracy udowodnili, że molekuly chitozanu mogą agregować w czasie elektroprzędzenia, a ich ładunek elektryczny może być efektywnie neutralizowany. Zdaniem Terady i wsp. [94] proces ten zachodzi natychmiast w strudze roztworu chitozanu, dlatego struga nie ulega rozdzieleniu.

Inny aspekt wpływu biegunowości napięcia na formowanie włókien zawierających chitozan opisał Ma i wsp. [58]. Ma i wsp. zaproponowali włókna typu rdzeń- otoczka, uformowane z dwóch naturalnych polielektrolitów, chitozanu i kwasu hialuronowego. Pomysł opierał się na wywołaniu separacji faz w elektroprzedzionym roztworze, pod wpływem zastosowania zewnętrznego pola elektrycznego o odpowiednim znaku potencjału elektrycznego. W tej pracy wykonano roztwory o różnym wzajemnym stosunku chitozanu i kwasu hialuronowego. Jak zauważono, roztwór o proporcji polimerów 50:50 nie tworzył włókien. Pozostałe roztwory, które były analizowane utworzyły włókna typu rdzeń-otoczka, co zobrazowano techniką transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM). Zgodnie z obecną wiedzą autora niniejszej pracy, badania Terada i wsp.[94] oraz Ma i wsp.[58] są jedynymi dostępnymi pracami naukowymi opisującymi wpływ biegunowości napięcia na formowanie włókien chitozanu metodą elektroprzędzenia.

Znacznie częściej podejmowanym zagadnieniem formowania włókien chitozanu jest dobór rozpuszczalnika dla tego polimeru oraz jego mieszanin z innymi polimerami naturalnymi lub syntetycznymi [93, 97-100]. Dobór odpowiedniego rozpuszczalnika jest istotny z punktu widzenia właściwości reologicznych roztworu oraz możliwych interakcji jego jonów z polijonami chitozanu. Najczęściej stosowanymi rozpuszczalnikami do formowania włókien zawierających chitozan są: 1, 1, 1, 3, 3, 3-heksafluoro-2-propanol (HFIP) [101], kwas octowy [102, 103], mieszanina kwas octowy/kwas mrówkowy [99], kwas trifluorooctowy [104], tetrachydrofuran [97] czy dimetyloformamid/ chlorek metylenu [93]. W zależności od specyfiki rozpuszczalnika lub też proporcji jego składników można uzyskać roztwory o różnej lepkości i przewodności elektrycznej [99]. Ponadto jak opisał Ohkawa i wsp. [97] rozpuszczalnik może wchodzić reakcje z polijonami chitozanu, co w przypadku jego roztworów może wyraźnie poprawić przędzalność. Jony rozpuszczalnika mogą tworzyć stabilne sole z polikationami chitozanu, dzięki czemu zmniejszają się



interakcje chitozan-chitozan i roztwór jest łatwiejszy do formowania metodą elektroprzędzenia [97]. Interakcje pomiędzy molekułami chitozanu mogą zostać zredukowane także poprzez zmieszanie chitozanu z innym polimerem np. poli( $\epsilon$ -kaprolaktonem) (PCL), poli(L-laktydem) (PLLA) czy poli(laktydom-*co*-glikolidem). Dodatkowo, takie działanie jest zasadne z punktu widzenia właściwości wytrzymałościowych materiału.

Formowanie włókien, zawierających zarówno składnik naturalny jak i syntetyczny jest dodatkowo zasadne z wielu innych powodów. Chitozan jako składnik pochodzenia naturalnego zapewnia odpowiednią biodegradację, hydrofilowość czy bioadhezję materiału. Jednak chitozan jest też materiałem bardzo kruchym, co ogranicza jego zastosowanie. Formowanie materiałów będących jego połączeniem z polimerem syntetycznym, umożliwia połączenie zalet tych polimerów, tj. odpowiednią wytrzymałością mechaniczną oraz dłuższy czasem biodegradacji hydrolytycznej w warunkach *in vivo*. W konsekwencji połączenia tych polimerów, dochodzi także do zmiany krystaliczności składników [98]. W związku z tym, że biegunowość napięcia w układzie do elektroprzędzenia wpływa na molekuly chitozanu w sposób, jaki opisano w powyższym akapicie, można spodziewać się, że będzie to miało także istotny wpływ na zachowanie się molekuł chitozanu w mieszaninie polimerów oraz na krystalizację drugiego składnika.

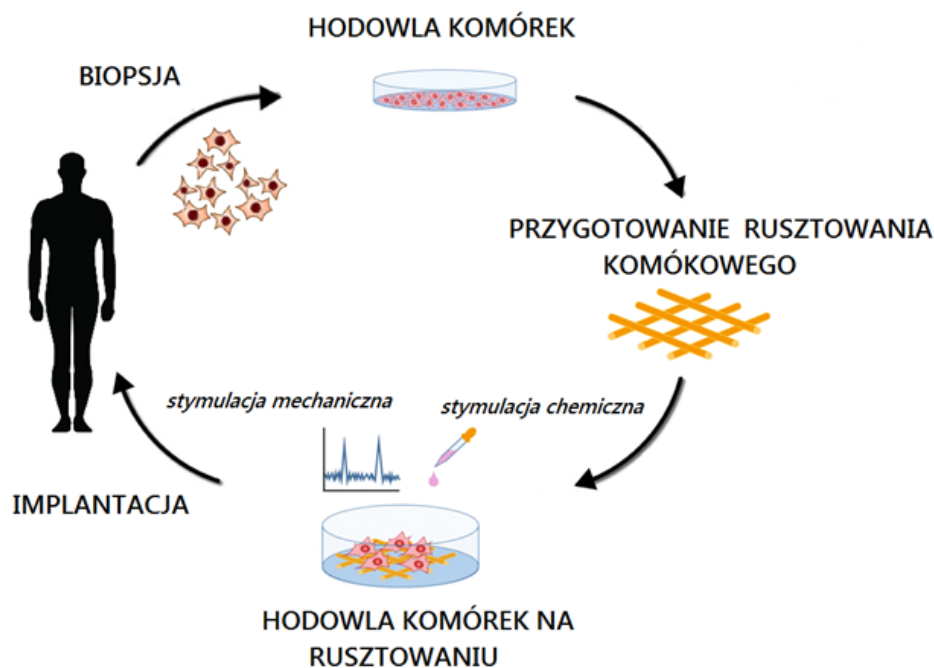
Dostępne publikacje w tematyce elektroprzędzenia roztworów chitozanu skupiają się głównie na optymalizacji procesu formowania włókien oraz charakterystyce ich wybranych właściwości, wliczając w to badania *in vitro*, prowadzonych najczęściej na komórkach fibroblastów, osteoblastów i chondrocytów. Badania nad wpływem biegunowości napięcia na właściwości włókien zawierających chitozan były prowadzone jedynie na roztworach samego chitozanu. W praktyce jednak powszechne jest stosowanie jego mieszanin z innymi polimerami, a w tym kontekście wpływ biegunowości napięcia na morfologię, strukturę i właściwości włókien nie został zanalizowany.

### **1.3 Włókniny wykonane metodą elektroprzędzenia do zastosowania w inżynierii tkankowej**

Inżynieria tkankowa to bardzo prężnie rozwijająca się dyscyplina naukowa, której osiągnięcia bezpośrednio przekładają się na podwyższenie poziomu opieki zdrowotnej poprzez opracowywanie nowych metod leczenia czy tworzenie nowych biomateriałów. Włókniny wykonane metodą elektroprzędzenia znajdują szerokie zastosowanie w tej dziedzinie, ze względu na swoje atrakcyjne właściwości i strukturę, a także na łatwość transferu do etapu masowej produkcji. W tym podrozdziale zostaną opisane cele inżynierii tkankowej i wybrane obecne osiągnięcia tej dyscypliny, jak również zostaną podane przykłady materiałów stosowanych do tworzenia rusztowań komórkowych i metod ich modyfikacji powierzchniowej.

#### **1.3.1 Inżynieria tkankowa**

Zgodnie z definicją zaproponowaną przez Langer i Vacanti inżynieria tkankowa to „interdyscyplinarna dziedzina nauki, która wykorzystuje wiedzę z zakresu inżynierii i nauk przyrodniczych w celu opracowywania rusztowań komórkowych, które utrzymują, odtwarzają lub poprawiają funkcjonowanie narządów” [105]. Dążenie do celu jaki wyznacza powyższa definicja jest realizowane poprzez aktywność na wielu polach, związanych przykładowo ze zjawiskami dotyczącymi wzrostu i różnicowania się komórek oraz sygnalizacji międzykomórkowej, interakcjami biomateriał-komórka czy z opracowywaniem nowych biomateriałów.



**Rysunek 13.** Schemat ilustrujący cykl postępowania w leczeniu metodami inżynierii tkankowej [na podstawie 106].

Podstawowymi ogniwami w realizacji idei inżynierii tkankowej są komórki i rusztowania komórkowe. Jak ilustruje Rysunek 13 idea inżynierii tkankowej opiera się na wyizolowaniu i hodowli *in vitro* właściwych komórek, uformowania rusztowania komórkowego (ang. *scaffold*), zasiedleniu rusztowania wyizolowanymi komórkami i ostatecznym wszczepieniu zasiedlonej przez komórki, konstrukcji do organizmu biorcy. W założeniu, pobiera się komórki od osobnika, któremu będą one ostatecznie ponownie implantowane na rusztowaniu komórkowym. Komórki inne niż własne, mogą być stosowane w przypadku osób obarczonych chorobami genetycznymi, osób z rozległymi oparzeniami czy osób starszych. W tych wypadkach może się okazać, że nie posiadają one wystarczającej ilości komórek danego typu, aby wykonać hodowlę. W niektórych wypadkach nie jest możliwe uzyskanie tych komórek, także z powodu narażenia pacjenta na infekcje, przewlekły ból czy inne powikłania wynikające z procedur ich pobrania. Dodatkowym problemem izolacji i hodowli komórek dojrzałych i wyspecjalizowanych jest tempo ich namnażania. Często komórki wysoko wyspecjalizowane, jak np. chondrocyty, hepatocyty czy komórki mięśnia sercowego, muszą być długo namnażane w warunkach *in vitro*, aby

uzyskać ich odpowiednią liczbę, wystarczającą do zasiedlenia rusztowania komórkowego. W związku z tym cała procedura wykonania gotowego do implantacji rusztowania jest bardzo wydłużona, co w konsekwencji dyskwalifikuje takie rozwiązanie w najbardziej nagłych przypadkach klinicznych. Dlatego inną, opracowywaną ścieżką rozwoju są komórki macierzyste. Komórki macierzyste to komórki niewyspecjalizowane, które mogą się wielokrotnie dzielić i wytwarzać identyczne kopie samych siebie. Te komórki mogą różnicować się w inny typ komórek. W związku ze swoimi unikatowymi cechami są one wykorzystywane do badań laboratoryjnych mających na celu modelowanie mechanizmów chorób, poznawania mechanizmów komórkowych różnych schorzeń czy testowania nowych metod leczenia. Ze względu na pochodzenie wyróżnia się embrionalne komórki macierzyste oraz somatyczne komórki macierzyste. Większość embrionalnych komórek macierzystych otrzymuje się z embrionów zapłodnionych metodą *in vitro*. Z kolei, somatyczne komórki macierzyste pochodzą z niezróżnicowanych komórek, które znajdują się wśród zróżnicowanych komórek w tkance lub organie. Poza pochodzeniem, oba typy komórek macierzystych różnią także możliwości różnicowania się, komórki embrionalne są komórkami pluripotencjalnymi, co oznacza, że mogą różnicować się w dowolny typ komórek, podczas gdy komórki macierzyste somatyczne są komórkami multipotencjalnymi, co oznacza, że mogą różnicować się tylko w kilka typów komórek. Komórki macierzyste somatyczne, są dużą nadzieją transplantologii i inżynierii tkankowej, ponieważ poza pewną zdolnością do różnicowania się, mogą zostać pobrane bezpośrednio od pacjenta, co zmniejsza ryzyko odrzucenia przeszczepu [107]. Opracowano także metodę otrzymywania tzw. indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC), uzyskiwanych na drodze genetycznych modyfikacji komórek macierzystych somatycznych. Jednak do wytworzenia iPSC wykorzystywane są wirusy i jak wykazały niektóre badania indukowały one powstawanie nowotworów, dlatego ta metoda musi zostać jeszcze poddana szczegółowym badaniom [108]. Mimo to, odkrycie metody otrzymywania iPSC jest uznawane, za jedno z największych odkryć ostatnich lat w tej dziedzinie. Mogą stanowić one ważny element nowej strategii leczenia, jaką jest terapia personalizowana.

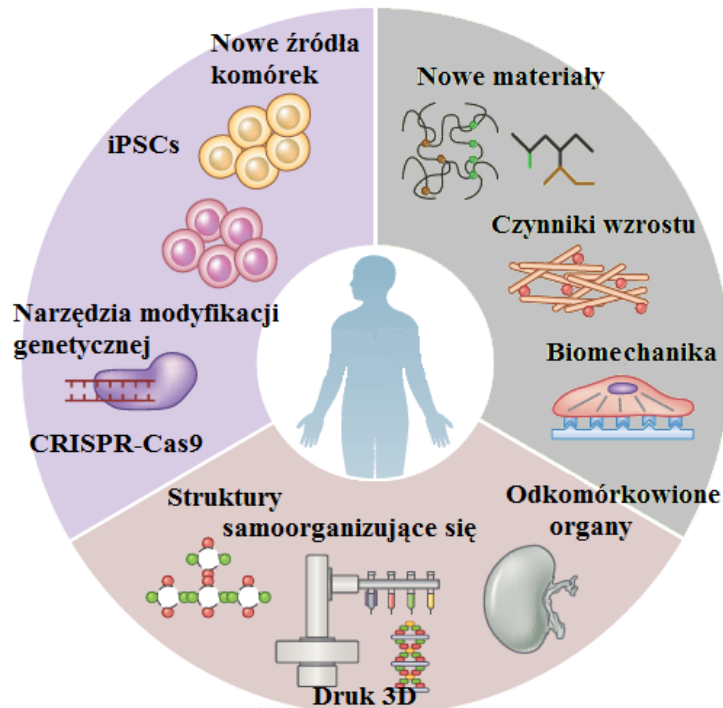
Drugim istotnym elementem w inżynierii tkankowej jest rusztowanie komórkowe. Głównym celem rusztowania komórkowego jest umożliwienie komórkom wzrostu na strukturze odtwarzającej trójwymiarową architekturę tkanek czy narządów. Rusztowania są

podłożem, na którym komórki osiadają, proliferują i migrują. Mogą być także nośnikiem różnych substancji chemicznych stymulujących aktywność komórkową, ich proliferację czy wzrost. Właściwości wytrzymałościowe rusztowań umożliwiają także przenoszenie pewnych obciążeń po implantacji. Przyjmuje się, że rusztowania komórkowe powinny spełniać pewne podstawowe wymagania, takie jak:

- Biozgodność - materiał nie powinien wywoływać reakcji układu immunologicznego;
- Bioaktywność - materiał wchodzi w interakcje z komórkami i stymuluje ich aktywność;
- Biodegradowalność – pod wpływem czynników zewnętrznych w środowisku *in vivo* takich jak np. działanie enzymów, pH czy hydrolizy, materiał powinien być rozkładany do prostszych związków chemicznych, które ostatecznie będą mogły być włączone do cykli metabolicznych komórek. Warunki cytotoksyczności materiałów są regulowane przez odpowiednie normy np. PN-EN ISO 10993 [109]. Temat biodegradacji rusztowań komórkowych jest problematyczny, ponieważ w założeniu powinien przebiegać w tempie adekwatnym do procesu tworzenia się nowej tkanki. W praktyce jednak często dochodzi do zbyt szybkiej degradacji materiału, co prowadzi do powstawania stanów zapalnych [110].
- Odpowiednia porowatość otwarta - rusztowanie komórkowe powinno stwarzać odpowiednie warunki do migracji komórek nie tylko po jego powierzchni, ale także powinno umożliwiać ich migrację do jego wnętrza. Porowata struktura rusztowania komórkowego powinna być także wystarczająca dla swobodnej wymiany składników odżywczych dla komórek oraz produktów przemiany materii [111].
- Odpowiednie właściwości mechaniczne - rusztowanie powinno być wytrzymałe na obciążenia mechaniczne występujące w miejscu implantacji, jak również powinno charakteryzować się np. odpowiednią twardością, zbliżoną do środowiska, w jakim zwykły bytować komórki je zasiedlające [111].

- Określone właściwości powierzchniowe - odpowiedni skład chemiczny powierzchni oraz właściwe rozwinięcie powierzchni umożliwiają adhezję komórek do rusztowania, a w konsekwencji prawidłową proliferację i aktywność [111].

Obecnie najczęściej wykorzystywaną grupą materiałów do tworzenia rusztowań komórkowych są polimery i kompozyty na osnowie polimerowej. Materiały te mogą mieć różną architekturę: od struktur projektowanych i wytarzanych techniką CAD/CAM, elektroprzędzonych włókien, liofilizowanych struktur 3D czy hydrożeli (więcej w podrozdziale 1.3.2) [112, 113]. Rozwój technik formowania rusztowań komórkowych, udowodnił, że poza właściwą architekturą materiału, należy skupić się przede wszystkim na właściwej stymulacji aktywności komórkowej poprzez skład chemiczny powierzchni biomateriałów. W pracach badawczych opublikowanych w ostatnich kilku latach można zauważyć wyraźne ukierunkowanie na takie tematy jak np. przyłączanie bioaktywnych molekuł do powierzchni rusztowań komórkowych lub systemach ich kontrolowanego uwalniania z materiałów [114-116]. Opracowano także techniki umożliwiające zwiększenie efektywności takich procedur. Dzięki dostępnym obecnie metodom analitycznym możemy śledzić kinetykę procesów zachodzących w komórkach pod wpływem substancji dołączonych do rusztowań [117]. Ważnym odkryciem ostatnich lat było także powiązanie wpływu sił mechanicznych na odpowiedź komórkową. Zauważono, że komórki macierzyste wykazują pewnego rodzaju „pamięć” co do obciążeń, jakim były poddawane i pod ich wpływem mogą rozpoczynać bądź zatrzymywać swoje funkcje [118]. Innym ważnym problemem, z jakim zmagają się nauka w kwestii reakcji biomateriał - komórka są reakcje immunologiczne na implantowane biomateriały. Prowadzone były liczne badania dotyczące wpływu składu chemicznego implantów oraz ich wielkości na reakcje immunologiczne organizmu gospodarza [119].



**Rysunek 14.** Schemat ilustrujący tematy dotyczące inżynierii tkankowej w jakich dokonał się wyraźny postęp na przestrzeni ostatnich lat [na podstawie 120].

Na przestrzeni wieków i wraz z postępem nauki, założenia inżynierii tkankowej co do odtwarzania i regeneracji funkcji narządów i tkanek zmieniały się. Początkowo sądzono, że przyszłością inżynierii tkankowej są urządzenia wiernie naśladowujące w swojej funkcji i strukturze naturalne organy ludzkie. Przyszłością tej dziedziny miały być między innymi wytworzone w laboratorium, pełnowartościowe organy. Nauka poczyniła jednak znacznie większe postępy niż się spodziewano. Obecny stan wiedzy pozwala np. na modyfikowanie genomu w precyzyjnie wybranych miejscach między innymi za pomocą metody CRISPR/Cas9 [121], tak, aby eliminować niepożądane czynności komórek lub wymusić ich prawidłowe zachowania. Jednocześnie dalej rozwija się idea tworzenia w warunkach laboratoryjnych pełnowartościowych organów. Tak np. naukowcy z University of Texas Medical Branch (UTMB) w Galveston, z sukcesem przeszczepiają świni, wyhodowane w warunkach laboratoryjnych płuco, które ostatecznie podjęło swoją funkcję [122]. Jak pokazują dotychczasowe osiągnięcia, ludzkość jest w stanie opracować nowe rozwiązania z zakresu inżynierii tkankowej, o których wcześniej nawet nie pomyślano (jak modyfikacje

genomu). Jednocześnie, ich udoskonalanie, wdrażanie czy weryfikacja zagrożeń jakie ze sobą niosą jest czasochłonna, dlatego wcześniej zaproponowane rozwiązania jak np. rusztowania komórkowe, w dalszym ciągu mają bardzo istotne znaczenie (Rysunek 14). Jednak w tym zakresie także pozostaje szereg zagadnień, które wymagają prowadzenia dalszych prac badawczych jak np. analiza interakcji materiał-komórka, degradacja *in vivo* biomateriałów, poprawa właściwości mechanicznych czy kwestia infiltracji rusztowania przez komórki.

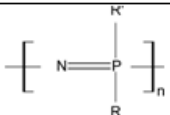
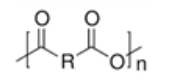
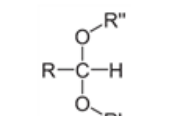
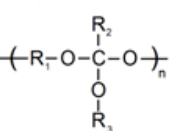
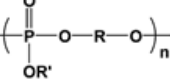
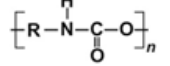
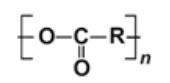
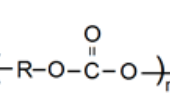
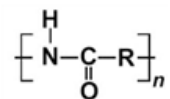
### 1.3.2 Materiały polimerowe w inżynierii tkankowej

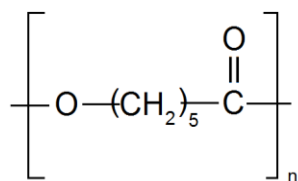
Obecnie w inżynierii tkankowej, najczęściej stosowaną grupą materiałów są polimery, zarówno pochodzenia syntetycznego jak i naturalnego. Często także, w zależności od potrzeb danej aplikacji są one łączone z innymi grupami materiałów jak ceramika (np. fosforany wapnia) czy metalami (np. złoto, srebro, stopy kobaltowo-chromowe, tytan).

Polimery syntetyczne są klasyfikowane w zależności od ich struktury chemicznej jak to pokazano w Tabeli 2. Z grupy polimerów syntetycznych, poliestry alifatyczne są obecnie najczęściej stosowane zarówno w badaniach laboratoryjnych jak i gotowych wyrobach medycznych. Strukturę chemiczną poliestrów alifatycznych charakteryzuje alifatyczne wiązanie estrowe. Poliestry są syntezowane metodą polimeryzacji z otwarciem pierścienia lub metodą polimeryzacji kondensacyjnej. Do poliestrów zalicza się np. poli(L-laktyd) (PLLA), poli(laktyd-co-glikolid) (PLGA), poli(glikolid) (PGA) czy poli( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL). Większość tych materiałów jest stosowana w praktyce już od dekad, jak np. PGA, który od lat 70 XX wieku jest stosowany na biodegradowalne szwy chirurgiczne (DEXON®) [123] czy pod nazwą Biofix® na piny kostne do roku 1996 [124]. Kwestie problematyczne tych polimerów są związane z tempem ich degradacji. Produkt degradacji PGA, kwas glikolowy, nie jest związkiem toksycznym. Jednak w wyniku zbyt szybkiej degradacji może dochodzić do lokalnego wzrostu stężenia kwasu glikolowego, co w konsekwencji powoduje reakcję immunologiczną organizmu [125]. Dodatkowo, degradacja materiału obniża jego właściwości wytrzymałościowe. Inny problem z wykorzystaniem poliestrów w inżynierii tkankowej dotyczy ich dużej hydrofobowości. W związku z tym często podejmowane są prace mające na celu zwiększenie hydrofilowości ich powierzchni oraz wprowadzenie substancji bioaktywnych [126].



**Tabela 2.** Ważniejsze grupy polimerów stosowanych w inżynierii tkankowej [110].

GRUPA POLIMERÓW	PRZYKŁADY	ZASTOSOWANIE	ZALETY	WADY	STRUKTURA
Polifosfazany	poli(dichloro)fosfazen	Inżynieria tkankowa, adjuwanty szczepionkowe	Szeroki zakres właściwości wytrzymałościowych	Złożony proces syntezy	
Polianhydrydy	poli (bezwodnik sebacynowy)	Systemy dostarczania leków, inżynieria tkankowa	Możliwa w kontroli szybkość degradacji	Niskie masy cząsteczkowe, słabe właściwości wytrzymałościowe	
Poliacetale	polioksymetylen	Systemy dostarczania leków	Szybkość degradacja kontrolowana przez pH	Niskie masy cząsteczkowe, złożony proces syntezy	
Poli(orto estry)	Wyróżnia się IV klasy (zależne od składników syntezy)	Systemy dostarczania leków	Możliwa w kontroli szybkość degradacji, szybkość degradacja kontrolowana przez pH	Złożony proces syntezy, słabe właściwości wytrzymałościowe	
Polifosfoestry	poli[1,4-bis(hydroksyetylo) tereftalan-alt-etyloksy fosforanu	Systemy dostarczania leków, inżynieria tkankowa	Nietoksyczne produkty degradacji	Złożony proces syntezy	
Poliuretany	Pellethane®	Protezy, inżynieria tkankowa	dobre właściwości mechaniczne	Ograniczona degradacja	
Poliestry	PGA, PLLA, PLGA, PCL, PHB, PHBV	Systemy dostarczania leków, inżynieria tkankowa, wyroby medyczne	Wysoce przetwarzalne, dostępne komercyjnie	Ograniczona degradacja	
Poliwęglany	poli (węglan trimetyleny)	Systemy dostarczania leków, inżynieria tkankowa, stabilizatory	Bardzo zależne od struktury chemicznej parametry mechaniczne, erozja powierzchniowa	Ograniczona degradacja	
Poliamidy	PA 6	Systemy dostarczania leków	Aktywne grupy boczne, biogodne	Bardzo ograniczona degradacja	



**Rysunek 15.** Struktura chemiczna poli(ε-kaprolaktonu).

W niniejszej rozprawie doktorskiej, w badaniach eksperymentalnych wykorzystano poli(ε-kaprolakton) (PCL). W związku z tym, właściwości tego materiału zostaną szerzej omówione. Poli(ε-kaprolakton) jest niepolarnym polimerem liniowym z grupy poliestrów alifatycznych o relatywnie dużym stopniu krystaliczności. Temperatury charakterystyczne tego materiału wynoszą odpowiednio: temperatura topnienia fazy krystalicznej ( $T_m$ ) 55-60°C, temperatura zeszklenia ( $T_g$ ) około -60 °C (Tabela 3). Jak pokazują najnowsze badania, szybkość degradacji tego materiału w warunkach *in vivo* może być różna od dotychczas raportowanych (2-3 lata) [110], ponieważ silnie zależy między innymi od warunków otoczenia (np. enzymy, pH) [127]. PCL jest polimerem dobrze rozpuszczalnym w większości rozpuszczalników organicznych. Często jest kopolimeryzowany z innymi poliestrami jak np. z PLLA [128] czy PLGA [129]. PCL charakteryzuje się także niską wytrzymałością na rozciąganie (ok. 23 MPa) i dużym wydłużeniem przy zerwaniu. Materiał ten jest łatwy w przetwarzaniu różnymi metodami jak np. poprzez elektroprzędzenie czy druk 3D [126]. PCL degradowe poprzez hydrolizę w objętości. Początkowo dochodzi do hydrolizy łańcuchów PCL do 6-hydroksylowego kwasu kapronowego oraz acetylu koenzymu A. Ostatecznie związki te są włączane do cyklu metabolicznego komórki i wydalane z ich organizmu jako dwutlenek węgla i woda [130]. Degradacja hydrolityczna PCL jak i pozostałych poliestrów zależy między innymi od wielkości materiału jaki jest poddawany temu procesowi. Inną dynamikę tego procesu będzie miał lity film, liofilizat czy nanowłókna. Prace prowadzone nad hydrolityczną degradacją PCL pozwoliły ustalić następujące etapy tego procesu: w okresie pierwszych sześciu miesięcy dochodzi do wstępnego nawodnienia materiału, następnie pomiędzy szóstym a dwunastym miesiącem ma miejsce degradacja hydrolityczna oraz utrata masy, po dwunastu miesiącach dochodzi do resorpcji, a ostatecznie do metabolizowania produktów hydrolizy (>18 miesięcy) [130]. W warunkach *in vivo* zaobserwowano, że proces ten może zachodzić dłużej i trwać nawet 24-36 miesięcy [131].

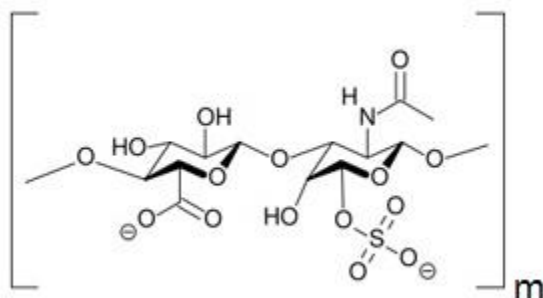
Podobnie jak w wypadku innych poliestrów, na czas degradacji hydrolitycznej wpływa także np. masa cząsteczkowa, polidispersja oraz krystaliczność wyjściowej struktury PCL [131].

**Tabela 3.** Wybrane właściwości pol( $\epsilon$ -kapolaktonu) [110, 111].

PARAMETR	WARTOŚĆ
$T_m$ (°C)	~ 60
$T_m^0$ (°C)	71, 79
$T_g$ (°C)	-60
$\Delta H_m$ ( $x_c=100\%$ ) (J/g)	142
Gęstość (g/cm <sup>3</sup> )	1,06-1,13
Rozpuszczalność w 25°C (J/cm <sup>3</sup> ) <sup>0,5</sup>	20,8
$\sigma_B$ (kg/mm <sup>2</sup> )	10-80
$\epsilon_B$ (%)	20-120

Polimery syntetyczne są mieszane z polimerami naturalnymi w celu zwiększenia biozgodności materiału i jego hydrofilowości, jak również wprowadzenia odpowiednich grup funkcyjnych, dla poprawienia interakcji komórka-materiał. Najczęściej stosowanymi polimerami naturalnymi w inżynierii tkankowej są białka (np. kolagen, żelatyna, albumina, elastyna) oraz polisacharydy (np. chitozan, kwas hialuronowy, siarczan chondroityny). Obecność polimerów naturalnych w rusztowaniach komórkowych jest elementem biomimetycznego podejścia do ich projektowania. Wymienione białka i polisacharydy są naturalnymi elementami budulcowymi macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *extracellular matrix*; ECM). Na przykład, kolagen tworzy gęstą siatkę włókien w ECM. Ponadto ECM zawiera inne składniki, zależne od lokalizacji tkanki i tak np. ECM tkanki chrzęstnej zawiera

dotatkowo takie polisacharydy jak: siarczan chondroityny, siarczan keratanu czy heparyna, które razem z kolagenem budują strukturę zwaną agrekanem.



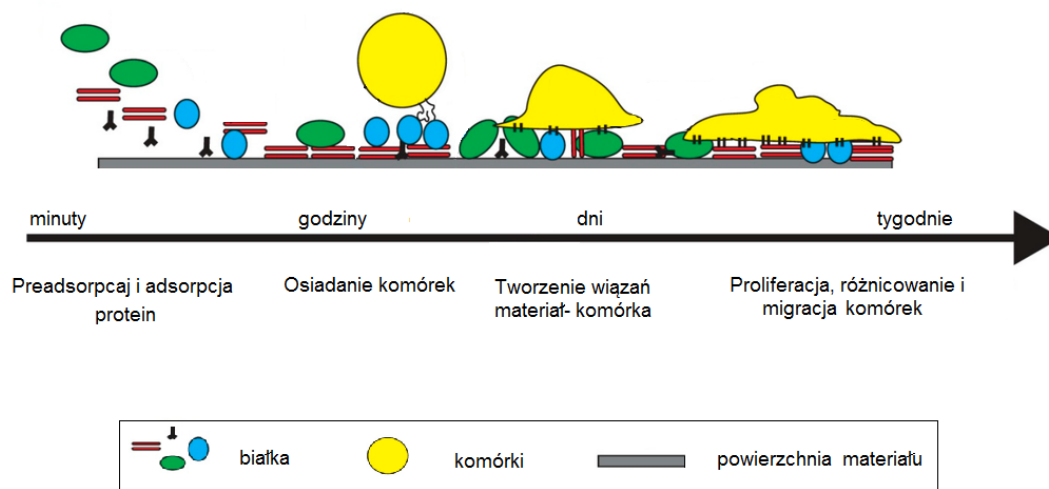
**Rysunek 16.** Struktura chemiczna siarczanu chondroityny.

Przykładem polisacharydu i polianionu wchodzącego w skład agrekanu jest siarczan chondroityny (CS). Siarczan chondroityny to glikozaminoglikan, który charakteryzuje wysoki ładunek ujemny grup funkcyjnych (Rysunek 16). Ta cecha powoduje, że w tkankach żywych organizmów wytwarza się duży gradient ładunków, przez co woda jest w nich zatrzymywana i może przyjmować duże obciążenia mechaniczne, jak ma to miejsce w tkance chrzęstnej. Ponadto udowodniono, że siarczan chondroityny razem z kwasem hialuronowym i N-acetyloglukozaminą (GlcNAc) stymulują syntezę glukozaminy czy kolagenu typ II, oraz ograniczają enzymatyczną degradację ECM [132]. Kompleksy polielektrolitów mają bardzo praktyczne zastosowanie terapeutyczne, ponieważ są wykorzystywane jako nośniki leków. Przykładem są kompleksy siarczan chondroityny - chitozan które wykorzystywane są do transportu leków pobieranych przez komórkę na drodze endocytozy [133]. Co więcej, kompleksy tych polielektrolitów mogą być wykorzystywane do tworzenia hydrożelowych rusztowań komórkowych [134]. Jednak materiały te są bardzo wrażliwe na różne czynniki zewnętrzne jak np.: wysokie temperatury, zmiany pH czy wilgotności. Dlatego w przypadku formowania włókien metodą elektroprzędzenia należy mieć na uwadze wpływ rozpuszczalnika na strukturę polimerów naturalnych [135]. Dlatego też, immobilizacja polimerów naturalnych na powierzchni biomateriałów innymi metodami może być lepszym rozwiązaniem (opisano w podrozdziale 1.3.4). Funkcje wybranych polisacharydów zostały opisane w podrozdziale 1.2.2.

### 1.3.3 Znaczenie powierzchni polimeru z perspektywy oddziaływania materiał- komórka

Pomiędzy komórkami tworzącymi organizmy żywe a otoczeniem w jakim się znajdują występuje szereg interakcji. Oddziaływania komórki z otoczeniem można podzielić na oddziaływania typu macierz zewnątrzkomórkowa (ECM)- komórka, komórka- komórka, a także po zasiedleniu w warunkach *in vitro* i implantacji rusztowania komórkowego, oddziaływania typu komórka- biomateriał. Można wyróżnić połączenia zwierające (desmosomy, hemidesmosomy), komunikacyjne jonowo-metaboliczne oraz zamykające/ nieprzepuszczalne [136]. Za interakcje komórka- macierz po stronie komórki odpowiadają przede wszystkim filamety cytoszkieletu aktynowego czy płytkowe struktury łączące filamety aktynowe z błonami oraz integryny. Białka transbłonowe takie jak: kadheryny, selektyny oraz związki z grupy immunoglobulin, odpowiadają za interakcje pomiędzy komórkami [137]. Po stronie macierzy zewnątrzkomórkowej za interakcje z komórką odpowiadają takie białka jak: fibronektyna, laminina, kolagen oraz witronektyna [137].

Od strony biomateriału to skład chemiczny i topografia powierzchni wytworzonego rusztowania komórkowego są jednymi z kluczowych czynników dla właściwych interakcji komórka- biomateriał. Celem rusztowania komórkowego jest po części spełnienie roli macierzy zewnątrzkomórkowej. ECM jest złożoną substancją wytworzoną przez komórki i wypełniającą przestrzeń między nimi, która jest integralną częścią wszystkich tkanek. W większości składa się ona z wody i zawieszonych w niej białek i polisacharydów, tworzących gęstą sieć. Macierz zewnątrzkomórkowa występuje w dwóch formach: w postaci błony podstawnej (ang. *basement membrane*) o charakterze włóknistym (kolagen) oraz bezpostaciowej substancji podstawowej (ang. *interstitial matrix*). ECM zapewnia integralność strukturalną i mechaniczną tkanek. Jest środowiskiem migracji, proliferacji i różnicowania się komórek, a także medium wymiany substancji odżywczych oraz komunikacji [137]. Macierz zewnątrzkomórkowa wypełnia przestrzeń między komórkami, spajając tkanki. Jak wykazało wiele ostatnich prac, macierz zewnątrzkomórkowa nie jest jedynie biernym rusztowaniem dla komórek, ale bardzo dynamiczną strukturą wpływającą na polarność, adhezję, ruch i szlaki sygnałowe.



**Rysunek 17.** Schemat ilustrujący procesy zachodzące na biomateriale w czasie jego zasiedlania przez komórki [na podstawie 142].

W inżynierii tkankowej prawidłowa adhezja komórek do rusztowania komórkowego jest zagadnieniem fundamentalnym dla podjęcia przez komórki kolejnych funkcji. Procesy adhezji są również ważne dla migracji komórek. Jak pokazują niektóre prace badawcze, wypustki powstałe na brzegu komórki (np. filopodia) są stabilizowane poprzez powstawanie nowych punktów adhezji komórki do macierzy zewnątrzkomórkowej. Procesy te są zależne od aktywacji i grupowania integrzyn [138]. Początkiem takiego połączenia jest odpowiednie zwilżenie materiału, tzw. preadsorpcja (w warunkach *in vitro* z medium hodowlanego) i adsorpcja białek.

Preadsorpcja zachodzi zwykle w czasie kilku pierwszych minut od pierwszego kontaktu materiału z medium hodowlanym (Rysunek 17). Jak wykazały badania Andrade i wsp. [139] materiały polimerowe charakteryzują się wysoką adsorpcją protein na swojej powierzchni. Kolejnym etapem jest wytworzenie trwałych wiązań pomiędzy materiałem i komórką. Siły wiążące obie jednostki to: oddziaływania van der Waalsa, oddziaływania hydrofobowe. Kluczową rolę w adsorpcji pełnią receptory białkowe z błony komórkowej (integryny). Ostatecznie w miejscach zakotwiczenia integrzyn powstają kompleksy białkowe, które są łączone ze szkieletem aktynowym komórek. Z czasem komórki rozplaszczają się na materiale, proliferują i różnicują (Rysunek 17). Ważnym zagadnieniem dla rozwinięcia się

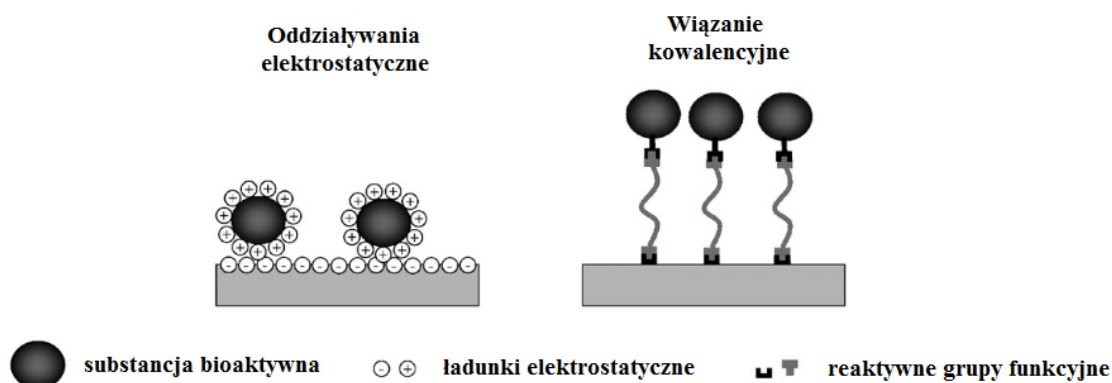
tkanek na rusztowaniach komórkowych jest migracja komórek [140]. Topografia powierzchni biomateriału to kolejna ważna cecha dla dobrej adhezji komórek. Tak na przykład Khosravi i wsp. [141] wykazali, że odpowiednie rozwinięcie powierzchni materiału stymuluje neowaskularyzację, która jest kluczowa dla poprawnej osteogenezy. Udowodniono, że adhezja, aktywność i różnicowanie się komórek były stymulowane przez rozwinięcie powierzchni w skali nano [141].

W praktyce bezpośrednia implantacja biomateriałów wywołuje niespecyficzną odpowiedź immunologiczną organizmu. Reakcja immunologiczna organizmu widoczna jest we wzroście stężenia cytokin prozapalnych i aktywacji neutrofilii. Reakcje immunologiczne na biomateriał mogą z ostrych przekształcić się w przewlekłe, co będzie prowadziło do podjęcia aktywności określonych grup makrofagów w celu usunięcia materiału, co zostało opisane przez Slee i wsp. [142]. Aby temu zapobiec projektuje się rusztowania komórkowe, których skład chemiczny, szczególnie na powierzchni oraz jej topografia zapobiegają reakcjom zapalnym oraz sprzyjają przebudowaniu tkanek. W przypadku elektroprzewodzących włókien skład chemiczny powierzchni włókien oraz jej topografia mogą być regulowane zarówno poprzez dobór odpowiednich parametrów (np. biegunowość napięcia; podrozdział 1.1.2, 1.1.3) jak również post-procesowe modyfikowanie ich powierzchni (podrozdział 1.3.4).

#### **1.3.4 Wybrane metody modyfikacji powierzchni włókien**

Głównym celem modyfikacji powierzchni włókien jak i innych materiałów dla zastosowań w inżynierii tkankowej jest wprowadzenie substancji bioaktywnych i/ lub rozwinięcie powierzchni materiału. W konsekwencji dochodzi także do zmiany takich właściwości powierzchni jak np. zwilżalność czy energia powierzchniowa, co ostatecznie wpływa na adhezję komórek do powierzchni materiału. Taka strategia tworzenia materiałów jest dobrym rozwiązaniem, pozwalającym zachować zarówno odpowiednie parametry wytrzymałościowe materiału, zdeterminowane przez wnętrze materiału, jak też poprawić jego właściwości powierzchniowe.

Substancje aktywne mogą być osadzone na wybranych powierzchniach poprzez fizyczną adsorpcję, łączenia typu receptor-ligand czy łączenia kowalencyjne wybranych substancji (Rysunek 18). W niniejszym rozdziale metody modyfikacji powierzchni zostaną podzielone w zależności od sił wiążących związek na powierzchni materiału. Podane zostaną tylko wybrane przykłady. Warte zauważenia jest, że dobór odpowiedniej metody modyfikacji powierzchni może być podyktowany funkcją jaką osadzana warstwa ma spełnić np. gdy materiał ma mieć działanie antybakteryjne czy powinien szybko, miejscowo uwalniać lek, oddziaływania jonowe mogą być lepszym rozwiązaniem niż wiązania kowalencyjne [143].

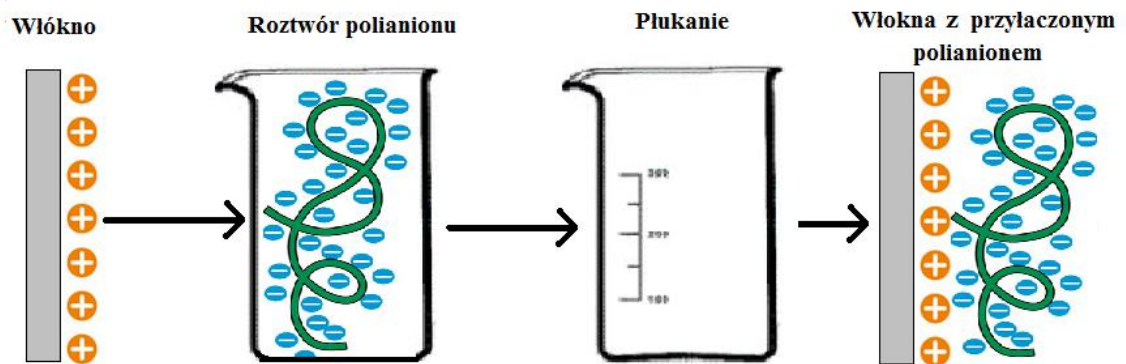


**Rysunek 18.** Schemat ilustrujący oddziaływania elektrostatyczne oraz kowalencyjne umożliwiające osadzenie substancji bioaktywnych na materiałach [na podstawie 152].

Elektroprzędzone włókniny są często poddawane takiej modyfikacji ze względu na ich wysoki stosunek powierzchni do objętości, co daje możliwość efektywnego osadzenia bardzo dużej ilości substancji aktywnych na jednostkę masy materiału. Najprostszą metodą osadzania wybranych substancji na powierzchni włókien jest adsorpcja fizyczna. W tym rodzaju modyfikacji powierzchni wykorzystywane są takie oddziaływania jak: oddziaływania elektrostatyczne, wiązania wodorowe, oddziaływania hydrofobowe czy siły van der Waalsa [144]. Jak zauważono powyżej w niektórych przypadkach adsorpcja fizyczna może być wystarczająca. Do chwili obecnej wykazano, że elektroprzędzone włókniny są efektywną barierą anty-adhezyjną w przypadkach opatrunków pooperacyjnych, ponieważ fizycznie oddzielają ranę od środowiska zewnętrznego [145]. Aby dodatkowo zabezpieczyć ranę przed infekcjami można osadzić na powierzchni włókien różnego rodzaju środki antybakteryjne. Przykładem takich działań jest osadzenie komercyjnie dostępnego leku o nazwie Biteral® na



powierzchni włókien wykonanych z poli( $\epsilon$ -kaprolaktonu) (PCL) [146]. W tym wypadku, na włókninie osadzono kroplę leku i pozostawiono do całkowitego wchłonięcia się. Następnie zauważono, że około 80% leku zostało uwolnione już w ciągu pierwszych 3h, a pozostała część była uwalniania z materiału przez kolejne 18h. Badania *in vivo* przeprowadzono na szczurach. Obserwacje histologiczne potwierdziły poprawę procesu gojenia się rany oraz obniżoną adhezję mikroorganizmów [146]. Inne zespoły badawcze analizowały także układy, w których heparyna i inetrleukina były immobilizowane na powierzchni wieloskładnikowych włókien zawierających poli( $\epsilon$ -kaprolakton) [147]. Jak dowiodły badania, włókna z modyfikowaną powierzchnią efektywnie wpłynęły na ekspresję przez makrofagi antyzapalnego fenotypu, w kontekście morfologii komórek, immunohistochemii czy sekrecji cytokin [147]. Mimo, że metoda fizycznej adsorpcji z roztworu jest prosta i tania, ma też pewne wady. Efektywność tej metody może nie być powtarzalna, a osadzone w ten sposób substancje są bardzo szybko uwalnianie do środowiska zewnętrznego, przez co nie ma możliwości długofalowego i stopniowego ich uwalniania.



**Rysunek 19.** Schemat osadzania polielektrolitów metodą warstwa po warstwie (LbL) [na podstawie 148].

Jednym z rodzajów fizycznej adsorpcji jest tzw. metoda warstwa po warstwie (ang. *layer-by layer assembly*) (LbL) [151], która polega na naprzemiennym osadzaniu polianionów i polikationów na powierzchni materiału (Rysunek 19). Metoda ta opiera się na elektrostatycznych oddziaływaniach pomiędzy polijonami. Bardzo istotna w tej metodzie jest gęstość ładunku na powierzchni materiału. Została ona wykorzystana np. przez Liu i wsp.

[149] oraz Gong i wsp. [150]. Przed osadzaniem polielektrolitów na powierzchni włókien można przeprowadzić hydrolizę materiału w roztworze zasadowym, w celu uzyskania większej liczby aktywnych grup funkcyjnych na powierzchni materiału, a tym samym zwiększenia efektywności procesu [149]. Liu i wsp. [149] zaproponowali osadzenie warstw chitozanu i siarczanu chondroityny na powierzchni filmów wykonanych z poli(tetraftalanu) etylenu (PET) [149]. Badania metodą spektroskopii UV potwierdziły efektywne osadzenie wielu warstw polielektrolitów na powierzchni filmu, a pomiary kąta zwilżania potwierdziły zmianę właściwości powierzchniowych filmu. Zauważono także, że utworzone warstwy mają różną stabilność w od zależności odległości od powierzchni materiału, na którym były osadzane oraz, że mogą być niestabilne w środowisku obojętnym lub zasadowym, ze względu na redukcję oddziaływań pomiędzy polijonami [149]. Podobne prace prowadził Gong i wsp. [150]. W tych badaniach osadzano warstwy siarczanu chondroityny (CS) oraz kolagenu (Col) na powierzchni porowatego rusztowania komórkowego wykonanego z poli(L-laktydu) (PLLA) [150]. Badania *in vitro* przeprowadzone na chondrocytach wykazały, że komórki proliferowały lepiej niż na materiale kontrolnym nie posiadającym warstw CS-Col. Ponadto aktywność chondrocytów w kierunku sekrecji glikozaminoglikanów (GAG) była wyraźnie większa niż na próbkach kontrolnych [150]. Jak udowadniają wymienione prace, jest to efektywna metoda osadzania substancji bioaktywnych na powierzchni materiałów. Dodatkową jej zaletą jest fakt, że związki aktywne są rozpuszczane w rozpuszczalnikach nie wpływających na ich strukturę chemiczną i funkcjonalność.

Metoda typu *wet chemical* (ang.) tj. metoda z zastosowaniem wodnych roztworów reagentów, które umożliwiają utworzenie reaktywnych grup funkcyjnych na powierzchni materiału, jest jedną z popularniejszych metod. Bazuje na przypadkowym, chemicznym cięciu wiązań estrowych molekuł poliestrów znajdujących się na powierzchni włókien. W rezultacie na powierzchni powstają aktywne grupy hydroksylowe i karboksylowe [151]. Zaletą tej metody jest dobra penetracja włókniny czy innych struktur 3D w całej ich objętości, co nie jest często możliwe w przypadku użycia plazmy. Z drugiej strony, charakteryzuje ją kilka poważnych wad. Przede wszystkim może dochodzić do degradacji materiału w wyniku cięcia molekuł, przez co obserwuje się zmniejszenie masy cząsteczkowej, a w rezultacie pogorszenie właściwości mechanicznych. Dodatkowo, metoda

ta charakteryzuje się słabą powtarzalnością i zależnością od takich czynników jak wyjściowa masa cząsteczkowa polimeru czy krystaliczność. Jest to metoda nieselektywna, przez co powoduje powstanie różnych aktywnych grup funkcyjnych. Ponadto pozostałości użytych substancji mogą powodować przypadkowe trawienie powierzchni włókien oraz wywoływanie efektu cytotoksyczności [152]. Przykładem modyfikacji powierzchni tą metodą jest np. wprowadzenie amin pierwszorzędowych na powierzchnię materiału poprzez zastosowanie wodnych roztworów takich diamin jak 1,6-heksadiamina, etylenodiamina czy N-aminoetylo-1,3-propanodiamina [152]. Metody typu *wet chemical* zostały zastosowane także przez Bösingler i wsp. [153] do immobilizacji oksydazy glukozy (GOX) do powierzchni włókien PEO/chitozan. Piai i wsp. [126] przeprowadzili funkcjonalizację powierzchni włókien poli( $\epsilon$ -kaprolaktonu) przy użyciu UV/O<sub>3</sub> oraz aminolizy, tak aby ostatecznie przyłączyć siarczan chondroityny do powierzchni włókien. Badania *in vitro* przeprowadzono na linii ludzkich chondrocytów oraz wykonano analizę ekspresji wybranych genów (*Aggrecan*, *Collagen typ II*, *COMP*, *Sox9*). Niestety w wybranych punktach czasowych nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w ekspresji większości analizowanych genów. Po 24 dniach hodowli zaobserwowano natomiast istotną różnicę w syntezie kolagenu typu I na materiałach z osadzonym siarczanem chondroityny, w porównaniu do próbek kontrolnych [126]. Badania dotyczące osadzania siarczanu chondroityny oraz kolagenu na powierzchniach uprzednio sfunkcjonalizowanych poprzez aminolizę były prowadzone także przez He i wsp. [154].

Innymi metodami aktywowania powierzchni materiału oraz osadzenia na nim substancji bioaktywnych są np. kopolimeryzacja szczepiona (ang. *graft polymerization*), traktowanie zjonizowanymi gazami, promieniowaniem UV czy wyładowanie koronowe [152]. Każda z wymienionych metod ma zarówno swoje zalety jak i wady. Podstawowym czynnikiem, który determinuje zastosowanie którejkolwiek z nich jest jej wpływ na strukturę i właściwości materiału. Tak na przykład promieniowanie UV czy tzw. plazma, mogą powodować degradację polimerów.

## 1.4 Podsumowanie

Elektroprzędzenie jest bardzo wydajną metodą formowania włókien, a materiały wykonane tą metodą przypominają pod względem morfologicznym i chemicznym struktury występujące w macierzy zewnątrzkomórkowej tkanek żywych organizmów. Na ostateczną strukturę i właściwości włókien formowanych tą metodą wpływa szereg parametrów, klasyfikowanych jako parametry procesu, parametry roztworu i parametry otoczenia. W literaturze przedmiotu, niewiele prac naukowych dotyczy wpływu biegunowości napięcia na strukturę i morfologię włókien [2, 3]. Są dostępne prace, które na podstawie modelowania teoretycznego tłumaczą zjawiska zachodzące pomiędzy naładowaną elektrycznie dyszą przędzalniczą oraz nośnikami ładunków elektrycznych w strudze polimeru [51-54]. Dostępne są także prace eksperymentalne opisujące wpływ biegunowości napięcia na strukturę włókien (podrozdział 1.1.3). Prace dotyczące orientowania się makrocząsteczek polimerów pod wpływem wybranej biegunowości napięcia były prowadzone przez Stachewicz i wsp. [59] oraz Teradę i wsp. [94]. Powyższe prace wykazały, że molekuly polimerów w elektroprzędzonym roztworze mogą się orientować w zależności od znaku potencjału elektrycznego przyłożonego do dyszy [59]. Dodatkowo zaobserwowano wpływ biegunowości napięcia na stabilność elektroprzędzonego strumienia polimeru [94]. Wymienione prace były prowadzone na roztworach jednego rodzaju polimeru. Nie analizowano mieszanin polimerów, które mają istotne praktyczne zastosowanie. Ponadto w opisanych pracach nie pogłębiono analizy struktury i właściwości tych materiałów.

Do chwili obecnej nie analizowano wpływu biegunowości napięcia na strukturę i właściwości włókien dwuskładnikowych, takich jak mieszanina poli( $\epsilon$ -kapolaktonu) i chitozanu. Układ dwuskładnikowy jest układem bardziej złożonym, przez co zrozumienie wpływu biegunowości napięcia na strukturę i właściwości takich włókien jest konieczne. Włókna dwuskładnikowe mają istotne znaczenie praktyczne, ponieważ łączą zalety polimerów syntetycznych i naturalnych, dlatego warto poddać analizie wpływ biegunowości napięcia na ich właściwości. Przypuszcza się, że zastosowanie odpowiedniej biegunowości napięcia wpłynie na układ PCL-chitozan oraz na ekspozycję grup aminowych na powierzchni materiału, a tym samym na właściwości powierzchniowe włókien i interakcje komórka-biomateriał.

Aby poprawić interakcje biomateriału z komórkami, rusztowania komórkowe mogą być poddawane różnym modyfikacjom powierzchni. Substancje immobilizowane na powierzchni materiałów mogą mieć także efekt leczniczy czy stymulujący komórki do podjęcia aktywności. Prace badawcze były prowadzone także w tym zakresie [77, 114, 115] (podrozdział 1.3.4). Nie wiązano jednak efektywności immobilizowania substancji bioaktywnych na powierzchni włókien ze zmianami składu chemicznego powierzchni włókien, wynikających z zastosowania odpowiednich parametrów formowania materiałów metodą elektroprzędzenia. Warto zauważyć, że dostępne prace literaturowe opisują w większości immobilizowanie molekuł na próbkach litych [149, 154] czy liofilizatach [150]. Prace, które skupiają się na elektroprzędzonych włóknach dotyczą zazwyczaj włókien wykonanych z jednego polimeru, a osadzanie związków biologicznie aktywnych odbywa się metodą *wet chemical*, która w tak porowatym materiale może pozostawiać związki toksyczne oraz doprowadzić do wyraźnego obniżenia masy cząsteczkowej [126]. Dlatego też w niniejszej rozprawie doktorskiej podjęto próbę weryfikacji efektywności immobilizacji poprzez fizyczną adsorpcję, po uprzedniej zmianie składu chemicznego powierzchni włókien poprzez zastosowanie odpowiedniej biegunowości napięcia w procesie elektroprzędzenia.



## Rozdział II

---

## 2 CEL I ZAKRES PRACY

Brak danych literaturowych na temat wpływu biegunowości napięcia na strukturę i właściwości dwuskładnikowych włókien zawierających polielektrolity (np. chitozan), spowodował wyznaczenie następujących celów badawczych pracy:

Głównym celem pracy jest weryfikacja wpływu dwóch zaproponowanych układów biegunowości napięcia na strukturę i właściwości dwuskładnikowych włókien poli( $\epsilon$ -kaprolakton)/ chitozan. Dodatkowym celem pracy jest zbadanie wpływu biegunowości napięcia na właściwości powierzchniowe włókien. W ramach tego celu podjęto następujące wątki:

- Poddano analizie zmiany w strukturze i właściwościach włókien poli( $\epsilon$ -kaprolakton)/ chitozan pod wpływem zastosowanej biegunowości napięcia. Badano włókna o trzech wybranych proporcjach tych składników.
- Poddano analizie efektywność post-procesowej modyfikacji powierzchni włókien w zależności od zastosowanej biegunowości napięcia. Modyfikacja powierzchni włókien polegała na fizycznej adsorpcji siarczanu chondroityny do powierzchni włókien.
- Określono wpływ zmian wywołanych zastosowaniem odpowiedniej biegunowości napięcia na odpowiedź komórkową w warunkach *in vitro*.

Celem dodatkowym był dobór odpowiednich parametrów procesowo-materiałowych umożliwiających formowanie włókien poli( $\epsilon$ -kaprolakton)/ chitozan z perspektywy głównego celu pracy doktorskiej.

- Istotną kwestią, było systematyczne zbadanie wpływu rozpuszczalnika na strukturę, morfologię i właściwości dwuskładnikowych włókien zawierających polielektrolity, z punktu widzenia głównego celu pracy doktorskiej. Ocenie poddano dwa rodzaje rozpuszczalników oraz przeprowadzono dokładną charakterystykę materiałów. Wyniki pozwoliły na wybór jednego z rozpuszczalników do dalszych badań.



Zakres pracy obejmuje:

- przegląd literatury dotyczącej wpływu biegunowości napięcia zastosowanej w czasie elektroprzędzenia na strukturę i właściwości włókien, a w szczególności włókien zawierających polielektrolity;
- doświadczalną optymalizację parametrów procesu elektroprzędzenia, a w szczególności, parametrów roztworu tj. typu rozpuszczalnika dla wybranego układu polimerów,
- doświadczalną analizę wpływu biegunowości napięcia na proces formowania włókien poli( $\epsilon$ -kaprolakton)/ chitozan oraz na ich strukturę i wybrane właściwości,
- doświadczalną analizę efektywności przyłączenia substancji bioaktywnych (tu: siarczanu chondroityny) do powierzchni włókien w zależności od zastosowanej biegunowości napięcia w czasie formowania włókien,
- analizę odpowiedzi komórkowej na zmiany w strukturze i właściwościach materiałów indukowane zastosowaniem różnej biegunowości napięcia,
- zaproponowanie praktycznego wykorzystania uformowanych materiałów.

## 2.1 TEZY BADAWCZE

1. Biegunowość napięcia zastosowana w procesie elektroprzędzenia włókien poli( $\epsilon$ -kapolakton)/chitozan wpływa na ich strukturę, morfologię i właściwości.
2. Zastosowanie odpowiedniej biegunowości napięcia przyłożonego do dyszy w procesie elektroprzędzenia poprawia wydajność modyfikacji powierzchni włókien metodą fizycznej adsorpcji siarczanu chondroityny.
3. Modyfikacja powierzchni włókien poli( $\epsilon$ -kapolakton)/ chitozan przy użyciu siarczanu chondroityny korzystnie wpływa na aktywność, morfologię i proliferację komórek.

## Rozdział III

---

---

## 3 CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

### 3.1 Materiały

W niniejszej pracy do przygotowania włókien zastosowano następujące polimery:

- Chitozan (CHT) (448869, Sigma Aldrich),  $M_w = 50\ 000-190\ 000\ \text{g/mol}$ , DDA~84%,
- Poli( $\epsilon$ -kapolakton) (PCL) (440744, Sigma Aldrich)  $M_n = 80\ 000$ ,
- Siarczan chondroityny (CS)(C9819, Sigma Aldrich).

Użyte rozpuszczalniki to:

- 98.5% 1, 1, 1, 3, 3, 3-heksafluoro-2-propanol (HFIP) (Iris Biotech GmbH),
- Kwas octowy (AA) (Avantor Performance Materials) 98-100% CZDA
- Kwas mrówkowy (FA) (Avantor Performance Materials) 98-100% CZDA.

### 3.2 Formowanie włókien metodą elektroprzędzenia

Na etapie doboru rozpuszczalnika do formowania włókien poli( $\epsilon$ -kapolakton)/chitozan wykonano trzy mieszaniny tych polimerów oraz próbki kontrolne składające się tylko z poli( $\epsilon$ -kapolaktonu) lub chitozanu. Mieszaniny polimerów miały kolejno 5, 10 i 25% w/w chitozanu. Wykonano dwa rodzaje roztworów tych polimerów, w jednym rozpuszczalnikiem był HFIP, a w drugim kwas octowy i mrówkowy (AA/FA) w proporcji 1:1. Na początku chitozan był rozpuszczany w łaźni wodnej o temperaturze 50°C przez około 24h. Następnie, po schłodzeniu roztworu do temperatury otoczenia, dodano odpowiednią ilość PCL i pozostawiono do wymieszania przez 24h.

Roztwory do formowania włókien z drugiej części pracy, tj. analizy wpływu biegunowości zostały przygotowane w taki sam sposób, jednak w tym wypadku rozpuszczalnikiem był tylko HFIP.

Proces elektroprzędzenia wykonano w komorze o poziomym układzie dysz przędzalniczych i z zastosowaniem dwóch różnych zasilaczy wysokiego napięcia. Całkowite

stężenie polimeru w roztworach wynosiło od 3-5% w/w dla mieszanin polimerów oraz 1% w/w dla roztworu chitozanu i 5% dla roztworu PCL. Stężenia te zostały wyznaczone doświadczalnie, w procesie optymalizacji parametrów roztworu. W zależności od mieszaniny polimerów roztwory były formowane z zastosowaniem następujących parametrów:

- napięcia 14-20 kV o ujemnym (-) lub dodatnim (+) znaku potencjału elektrycznego na dyszy,
- szybkości podawania roztworu 500-2000  $\mu\text{L/h}$ ,
- odległości dysza – kolektor 8-10 cm,
- szybkości obrotowej ok. 350 rpm kolektora o średnicy 40 mm,
- temperatury otoczenia ok. 22 °C,
- wilgotności  $\sim 35\pm 5\%$ .

Kolektor był zawsze elementem uziemionym, a jego rotacja nie powodowała kierunkowania się włókien. Jako dyszy przędzalniczej użyto igły 23G. W Tabeli 4 oraz Tabeli 5 podano szczegółowe dane próbek.

**Tabela 4.** Oznaczenia i parametry procesu formowania włókien poli( $\epsilon$ -kaprolakton)/chitozan na etapie optymalizacji warunków formowania.

Nazwa próbki	Proporcja PCL/ chitozan	Stężenie roztworu w/w (%)	Rodzaj rozpuszczalnika	Napięcie (kV)	Szybkość przepływu ( $\mu$ L/h)
<b>PH</b>	100 : 0	5	98.5% HFIP	12	1000
<b>5H</b>	95 : 5	5	98.5% HFIP	15	1000
<b>10H</b>	90 : 10	4	98.5% HFIP	17	1000
<b>25H</b>	75 : 25	3	98.5% HFIP	20	1200
<b>CHT H</b>	0 : 100	1	98.5% HFIP	15	1200
<b>PA</b>	100 : 0	10	1: 1 AA/ FA	12	1000
<b>5A</b>	95 : 5	10	1: 1 AA/ FA	18	800
<b>10A</b>	90 : 10	9	1: 1 AA/ FA	19	600
<b>25A</b>	75 : 25	8	1: 1 AA/ FA	20	500
<b>CHT A</b>	0 : 100	3	1: 1 AA/ FA	-	-

**Tabela 5.** Oznaczenia i parametry procesu formowania włókien poli( $\epsilon$ -kaprolakton)/chitozan na etapie analizy wpływu biegunowości napięcia.

Nazwa próbki	Proporcja PCL/ chitozan	Stężenie roztworu w/w (%)	Rodzaj rozpuszczalnika	Napięcie (kV)	Szybkość przepływu ( $\mu$ L/h)
<b>P+</b>	100 : 0	5	98.5% HFIP	12	1000
<b>5+</b>	95 : 5	4	98.5% HFIP	15	1000
<b>10+</b>	90 : 10	3,5	98.5% HFIP	17	1000
<b>25+</b>	75 : 25	2,5	98.5% HFIP	20	1500
<b>CHT+</b>	0 : 100	1	98.5% HFIP	15	2000
<b>P-</b>	100 : 0	5	98.5% HFIP	12	1000
<b>5-</b>	95 : 5	4	98.5% HFIP	15	1000
<b>10-</b>	90 : 10	3,5	98.5% HFIP	17	1000
<b>25-</b>	75 : 25	2,5	98.5% HFIP	20	1500
<b>CHT-</b>	0 : 100	1	98.5% HFIP	15	2000

Materiały, które ostatecznie były poddane modyfikacji powierzchni poprzez adsorpcję siarczanu chondroityny (CS) zostały oznaczone dodatkowo poprzez dodanie oznaczenia CS przy każdym skrócie nazwy próbki.

### 3.2.1 Immobilizacja siarczanu chondroityny na włóknach poli( $\epsilon$ -kaprolakton)/ chitozan

Próbki każdego materiału zostały pocięte na równe fragmenty i umieszczone w wodzie dejonizowanej na 1h, w celu odpowiedniego zwilżenia powierzchni. Następnie zostały one zanurzone w 0,5 M roztworze NaCl, który zawierał rozpuszczony siarczan chondroityny (CS) w stężeniu 1 mg/ml. Po 20 minutach, próbki były wyjęte z roztworu CS i wstępnie płukane w 0,2 M NaCl. Ostatecznie próbki płukano wodą dejonizowaną. Próbki pozostawiono do wolnego odparowania wody, a ostatecznie umieszczono je na 24 h w suszarce próżniowej.

## 3.3 Metody badawcze

### 3.3.1 Pomiar lepkości roztworów reometrem stożkowym

Właściwości reologiczne roztworów PCL/CHT były analizowane za pomocą reometru stożkowego Brookfield DV-III Ultra. Pomiary zostały wykonane w temperaturze 22 °C z szybkością ścinania 15 s<sup>-1</sup>. Szybkość ścinania występującą w dyszy przedziałniczej przy danej szybkości przepływu można wyznaczyć na podstawie wzoru,

$$\gamma = 4Q/\pi r^3 \quad (5)$$

gdzie  $\gamma$  to szybkość ścinania, Q jest przepływ objętościowy, r to promień wewnętrzny igły [155].

### 3.3.2 Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)

Morfologia włókien oraz rozkład średnic włókien został wyznaczony ze zdjęć uzyskanych metodą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM). Próbki były obrazowane przy pomocy mikroskopu Jeol JSM- 6010 PLUS/LV In- Touch Scope <sup>TM</sup>, po uprzednim napyleniu próbek złotem. Zastosowano napięcie 10kV. Średnice włókien były wyznaczone na podstawie 100 pomiarów z różnych zdjęć SEM dla danej próbki przy pomocy programu ImageJ. Następnie wyniki poddano analizie przy użyciu programu Origin 8.



### 3.3.3 Mikroskopia sił atomowych (AFM)

Mikroskopia sił atomowych (AFM) została wykonana w celu analizy różnic w topografii powierzchni włókien uformowanych z zastosowaniem wybranych biegunowości napięcia oraz przed i po adsorpcji siarczanu chondroityny. Obrazowanie metodą AFM wykonano za pomocą urządzenia NT-MDT Ntegra AFM, wyposażonym w sondę (ang. *cantilever*) (HA\_NC; NT-MDT). Drgania sondy miały ustalonej amplitudzie i częstotliwości. Częstotliwość drgań sondy wynosiła 245 kHz, a częstotliwość skanowania wynosiła 0,3 Hz. Pomiary wykonano w powietrzu.

### 3.3.4 Mikroskopia sił atomowych z zintegrowanym systemem spektroskopii w podczerwieni (AFM-IR)

Celem zastosowania metody AFM-IR było określenie separacji faz ze szczegółowym rozkładem składników mieszaniny PCL/CHT zarówno we włóknach formowanych metodą elektroprzędzenia jak i filmach w pierwszym etapie prac badawczych, tj. optymalizacji parametrów roztworu. Pomiar został przeprowadzony za pomocą nanoIR2 (Analysis Instruments, Inc., Santa Barbara CA) wyposażonego w sondę (ang. *cantilever*) PR-EX- nIT2. Nominalna stała sztywności i częstotliwość rezonansowa sondy w powietrzu wynosiły odpowiednio 0,07-0,4 Nm<sup>1</sup> i 13 ± 4 kHz. Zebrane zostały obrazy 3D topografii powierzchni w trybie kontaktowym. W celu zebrania lokalnego widma IR przeprowadzono analizę spektroskopową w zakresie 900-4000 cm<sup>1</sup> o rozdzielczości spektralnej 8 cm<sup>-1</sup>. Średnica wiązki wynosiła około 100 μm przy liczbie falowej 1645 cm<sup>-1</sup>, a moc została ustawiona na maksymalnie 5%. Mapy IR pojedynczej liczby falowej uzyskano stosując filtr pasmowy 20 kHz, wyśrodkowany przy 55 kHz. Mapy rozkładu chemicznego uzyskano przy częstotliwości skanowania 0,12 Hz. Próbki włókien zostały zebrane na płytkę krzemową, a filmy wybranych roztworów zostały wykonane metodą wylania roztworu. Pomiary wykonano w temperaturze otoczenia.

### 3.3.5 Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fourier'a (FT-IR)

Technikę FT-IR zastosowano w celu weryfikacji obecności określonych grup funkcyjnych w analizowanych włókninach oraz w celu analizy interakcji pomiędzy PCL a chitozanem. Pomiarzy zostały wykonane na urządzeniu Nicolet 8700 FT-IR Spectrometer. Pomiarzy wykonano w cyklu 32 skanów na próbkę w zakresie częstotliwości 800-3800  $\text{cm}^{-1}$ . Numeryczną dekonwolucję funkcją Gaussa została przeprowadzona dla wiązania karbonylowego w zakresie 1700-1770  $\text{cm}^{-1}$ , w celu analizy oddziaływań międzymolekularnych dla wybranych próbek PCL/CHT oraz próbki kontrolnej PCL. Dekonwolucję wykonano za pomocą oprogramowania Origin 8.

### 3.3.6 Skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC)

W celu analizy zmian stopnia krystaliczności PCL wynikających z zastawiania różnych systemów rozpuszczalników (etap I badań) oraz różnych biegunowości napięcia (etap II badań) zastosowano metodę DSC. Dodatkowo określono temperatury charakterystyczne. Pomiarzy wykonano na urządzeniu Perkin Elmer PYRIS-1, a analizę wyników za pomocą oprogramowania Origin 8. Pomiarzy zostały przeprowadzone w cyklu grzania w zakresie temperatury od 20°C do 100°C z szybkością grzania 10°C/ min. Masa próbek wynosiła około 2,5 mg. Krystaliczność PCL została obliczona ze wzoru,

$$x_c = \Delta H_f / \Delta H_f^0 \quad (6)$$

gdzie  $\Delta H_f$  to ciepło topnienia fazy krystalicznej PCL z próbki znormalizowane do jej masy, a  $\Delta H_f^0$  to ciepło topnienia fazy krystalicznej PCL o  $x_c = 100\%$ . Jako wartość  $\Delta H_f^0$  przyjęto 136 J/g [156]. Temperatura topnienia ( $T_m$ ) PCL została wyznaczona jako wartość odpowiadająca maksimum efektu endotermicznego.

### 3.3.7 Spektroskopia fotoelektronów w zakresie promieniowania X (XPS)

Spektroskopia fotoelektronów w zakresie promieniowania X (XPS) została wykonana w celu analizy różnic w składzie chemicznym powierzchni włókien uformowanych z zastosowaniem wybranych biegunowości napięcia. Pomiarzy zostały wykonane za pomocą

urządzenia PHI 5000VersaProbe, wyposażonym w monochromatyczną anodę Al. Zastosowano źródło o energii promieniowania 1486,6 eV. Analizę przeprowadzono energią wiązki 15 eV dla widm pomiarowych, przy kącie pomiaru 90° w relacji do powierzchni próbki. Pomiary wykonano w 5 różnych miejscach próbki, a wyniki końcowe przedstawiono jako średnią z tych pomiarów.

### **3.3.8 Pomiar kąta zwilżania**

Pomiary kąta zwilżania zostały wykonane za pomocą urządzenia Goniometr OCA15 (Data Physics). Pomiary zostały przeprowadzone w celu analizy właściwości powierzchniowych włókien. Wszystkie pomiary zostały wykonane w temperaturze otoczenia (ok. 22°C). Pomiary zostały wykonane metodą kropli osadzonej o objętości 1  $\mu$ l, bezpośrednio po osadzeniu kropli. Cieczą użytą do pomiarów była woda dejonizowana. Prezentowane dane pomiarów kąta zwilżania są średnią z 11 pomiarów dla każdego materiału.

### **3.3.9 Statyczna próba rozciągania**

W celu wyznaczenia modułu Younga analizowanych włókien wykonano statyczną próbę rozciągania na urządzeniu Lloyd EZ50 wyposażonym w specjalne uchwyty, odpowiednie do zastosowanych małych obciążeń. Z włókien o grubości 100-150  $\mu$ m wycięto próbki o szerokości 5 mm. Obciążenie początkowe zostało ustalone na poziomie 0,2 N, a próbki rozciągano z szybkością 5 mm/min. Pomiary wykonano w temperaturze otoczenia i wilgotności ok. 35 $\pm$ 5 %. Wybrane próbki analizowano także w powyższy sposób po uprzedniej inkubacji przez 24h w roztworze PBS w temperaturze 37°C. W obliczeniach modułu Younga analizowanych włókien nie uwzględniono porowatości włókien.

### **3.3.10 Badania *in vitro* na wybranych liniach komórkowych**

Badania *in vitro* zostały wykonane w celu określenia cytotoksyczności uformowanych materiałów oraz ewentualnych różnic w odpowiedzi komórkowej na zmiany w ich strukturze i właściwościach wywołanych zastosowaniem różnej biegunowości napięcia. Badania *in vitro* wykonano także na etapie optymalizacji parametrów

elektroprzewodnia włóknin PCL/CHT. Badania prowadzono na dwóch liniach komórkowych na etapie optymalizacji parametrów procesu i na etapie badań wpływu biegunowości napięcia i adsorpcji substancji bioaktywnych. W niniejszej pracy do badań *in vitro* zastosowano linię komórkową mysich fibroblastów L929 oraz osteoblastów linii MG63.

Do butelki hodowlanej T75 wysiano  $1 \times 10^6$  komórek, a następnie dodano medium hodowlane złożone z  $\alpha$ -MEM suplementowanym w 10% v/v surowicą bydlęcą (FBS), w 1% v/v penicyliną oraz w 1% w/w streptomecyną. W przypadku komórek linii MG63 medium dodatkowo zawierało glutaminę. Komórki były hodowane w inkubatorze, w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Po kilku dniach hodowli, gdy osiągnięto 80% konfluencji, komórki zostały odklejone od powierzchni naczynia hodowlanego za pomocą 0,05% roztworu trypsyny, odwirowane (L929: 100xg przez 5 minut; MG63: 170xg przez 5 minut) i wysiane na materiały. Wybrane materiały były uprzednio wycięte z włókniny (1 cm<sup>2</sup>), wysterylizowane 70% roztworem etanolu oraz promieniowaniem UV i ostatecznie umieszczone w dołkach hodowlanych na 48 dołkowej płytce hodowlanej. Na próbki wysiano od 8000 - 20 000 komórek/cm<sup>2</sup>, w zależności od czasu planowanej hodowli i linii komórkowej. Takie same ilości komórek wysiano do dołka hodowlanego bez materiału, który stanowił kontrolę (TCP). Ostatecznie dołki dopełniono medium hodowlanym. Płytki hodowlane zostały umieszczone w inkubatorze do czasu pomiaru. Medium hodowlane było wymieniane co 2 dni.

### 3.3.11 Analiza cytotoksyczności

O cytotoksyczności uformowanych materiałów wnioskowano pośrednio z testu aktywności mitochondrialnej analizowanych linii komórkowych. W tym celu zastosowano test MTT. W tej metodzie enzymy NAD(P)H rozkładają barwnik tetrazolowy tj. 3-(4,5-bromek dimetylotiazol-2-ilo) -2,5-difenylo-tetrazoliowy do nierozpuszczalnego formazanu. Po wyznaczonych czasach hodowli komórek na materiałach usunięto z dołków medium hodowlane. Następnie dodano 300  $\mu$ l niesuplementowanego medium DMEM i 100  $\mu$ l roztworu MTT (5mg/ml). Następnie, płytki wielodołkowe umieszczono w inkubatorze na kolejne 3-4 godziny. Po tym czasie usunięto roztwór z dołków i zalano izopropanolem w celu wypłukania formazanu z komórek. Po 10 minutach na mieszadle horyzontalnym, z każdego z dołków odciągnięto 150  $\mu$ l i przeniesiono do płytki 96 dołkowej w celu

wykonania pomiaru absorbancji. Absorbancję roztworów zmierzono za pomocą urządzenia Thermo Scientific Multiscan Go przy długości fali 570 nm.

### **3.3.12 Analiza proliferacji komórek**

Proliferację komórek analizowano przy pomocy testu CyQuant Cell Proliferation Assay Kit (ThermoFisher Scientific). W każdym punkcie czasowym wyznaczonym do badań, próbki materiałów z komórkami zostały odsączone z medium oraz były przechowywane w  $-75^{\circ}\text{C}$ , do momentu analizy. Po rozmrożeniu, przygotowano roztwór roboczy odpowiedni dla szacowanej ilości komórek na materiale i zgodny ze wskazaniami producenta. Roztwór roboczy składał się z buforu, wody dejonizowanej oraz CyQuant GR. Do każdej z próbek dodano 200  $\mu\text{l}$  roztworu roboczego, po 5 minutach przeniesiono po 150  $\mu\text{l}$  roztworu z próbek do płytki 96 dołkowej i wykonano pomiar absorbancji przy długości fali 520 nm.

### **3.3.13 Obrazowanie elementów cytoszkieletu komórkowego metodą mikroskopii fluorescencyjnej**

Aby zobrazować rozwinięcie cytoszkieletu aktynowego komórek oraz jądra komórkowe próbki poddano procedurze utrwalania i barwienia. Po uprzednim odsączeniu medium hodowlanego i płukaniu próbek roztworem PBS do dołków dodano 200  $\mu\text{l}$  3% roztworu paraformaldehydu (PFA). Po 20 minutach usunięto roztwór PFA, próbki przepłukano PBS i na 5 minut zalano 0,1% roztworem Tritonu w celu nadtrawienia błony komórkowej, dla lepszej penetracji barwnikiem. Ostatecznie, rozrobiony zgodnie ze wskazaniami producenta roztwór Alcian Green (2 krople/ ml) został wlany do dołków z próbkami na 30 minut. Po odsączeniu tego barwnika, próbki zostały także zalane roztworem 4',6-diamidyno-2-fenylindolu (DAPI) w celu wybarwienia jąder komórkowych. Po 5 minutach odsączono płyn, próbki zalano PBS i tak przechowywano w temperaturze  $+4^{\circ}\text{C}$  do momentu obrazowania. Próbki były obrazowane za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego Leica DMI3000B.

### 3.3.14 Obrazowanie morfologii komórek metodą skaningowej mikroskopii elektronowej

Aby zobrazować morfologię komórek hodowanych na analizowanych materiałach wykonano zdjęcia metodą skaningowej mikroskopii elektronowej. Po zakończeniu hodowli, materiały zostały przepłukane PBS i zanurzone w 200 µl 2,5% roztworu aldehydu glutarowego. Po około 1h, roztwór odciągnięto, a w jego miejsce wleto pierwszy roztwór z szeregu etanolowego. Szereg etanolowy wykonano na roztworach o stężeniu od 50 do 100% etanolu, przez 20 minut każdy. Po odsączeniu ostatniego roztworu etanolu, materiały zanurzone w roztworze heksametylodisilazanu (HDMS) z etanolem w proporcji 1 : 2 , a po 20 minutach kolejnym roztworem HDMS/etanol o proporcji 2 : 1. Ostatecznie, tak przygotowane próbki zostały zanurzone w czystym HDMS i pozostawione do wolnego odparowania na 24 h. Po tym czasie próbki zostały napyłone złotem i zobrazowane metodą SEM przy użyciu urządzenia Jeol JSM- 6010 PLUS/LV In- Touch Scope.

### 3.3.15 Analiza bakteriobójczości

W celu analizy bakteriobójczości włóknin PCL/CHT wykonanych z dwóch zaproponowanych systemów rozpuszczalników na etapie optymalizacji procesu, wykonano test na bakteriiach *E.coli* DH5α gram-ujemnych. Bakterie zostały rozpuszczone w proporcji 1:1000 w 10 ml medium hodowlanego i hodowane przez 24h. Następnie próbki wybranych włóknin o średnicy 20 mm każda, zostały umieszczone w falkonach i zalane taką samą ilością zawiesiny bakterii. Następnie tak przygotowane falkony umieszczono w inkubatorze z wytrząsarką w 37°C. OD600 roztworów monitorowano co godzinę. Po 8 h inkubacji, 100 µl zawiesiny bakterii zostało na płytkach agarowych i tak inkubowane w 37 °C przez 24 h. Ostatecznie zliczono ilość kolonii na każdej próbce i obliczono stopień inhibicji z równania [157]

$$\text{stopień inhibicji} = \frac{(C-E)}{C} \times 100\% \quad (7)$$

gdzie C to średnia liczba żywych komórek w grupie kontrolnej, a E to średnia liczba żywych komórek w próbkach z materiałami PCL/CHT.

# Rozdział IV

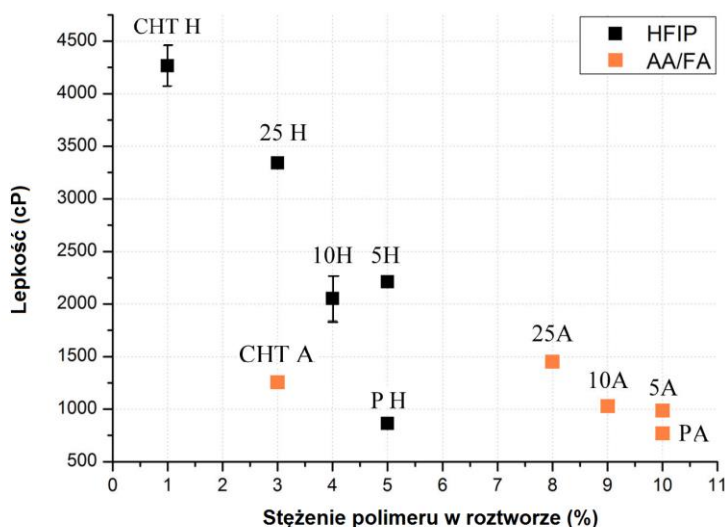
---

## 4 Wyniki i dyskusja

### 4.1 Dobór rozpuszczalnika do formowania włókien poli( $\epsilon$ -kapolakton)/chitozan

W podrozdziale 5.1 przedstawiono wyniki uzyskane na etapie optymalizacji parametrów procesu elektroprzędzenia wybranych mieszanin PCL/CHT w odniesieniu do włókien PCL oraz CHT, z punktu widzenia głównych celów niniejszej pracy doktorskiej. Analizie poddano różnice w strukturze, właściwościach i odpowiedzi komórkowej na materiałach uformowanych z HFIP oraz roztworu AA/FA w proporcji 1:1. W rezultacie przeprowadzonych na tym etapie analiz, dokonano wyboru jednego z rozpuszczalników do dalszych badań.

#### 4.1.1 Analiza właściwości reologicznych roztworów poli( $\epsilon$ -kapolakton)/chitozan

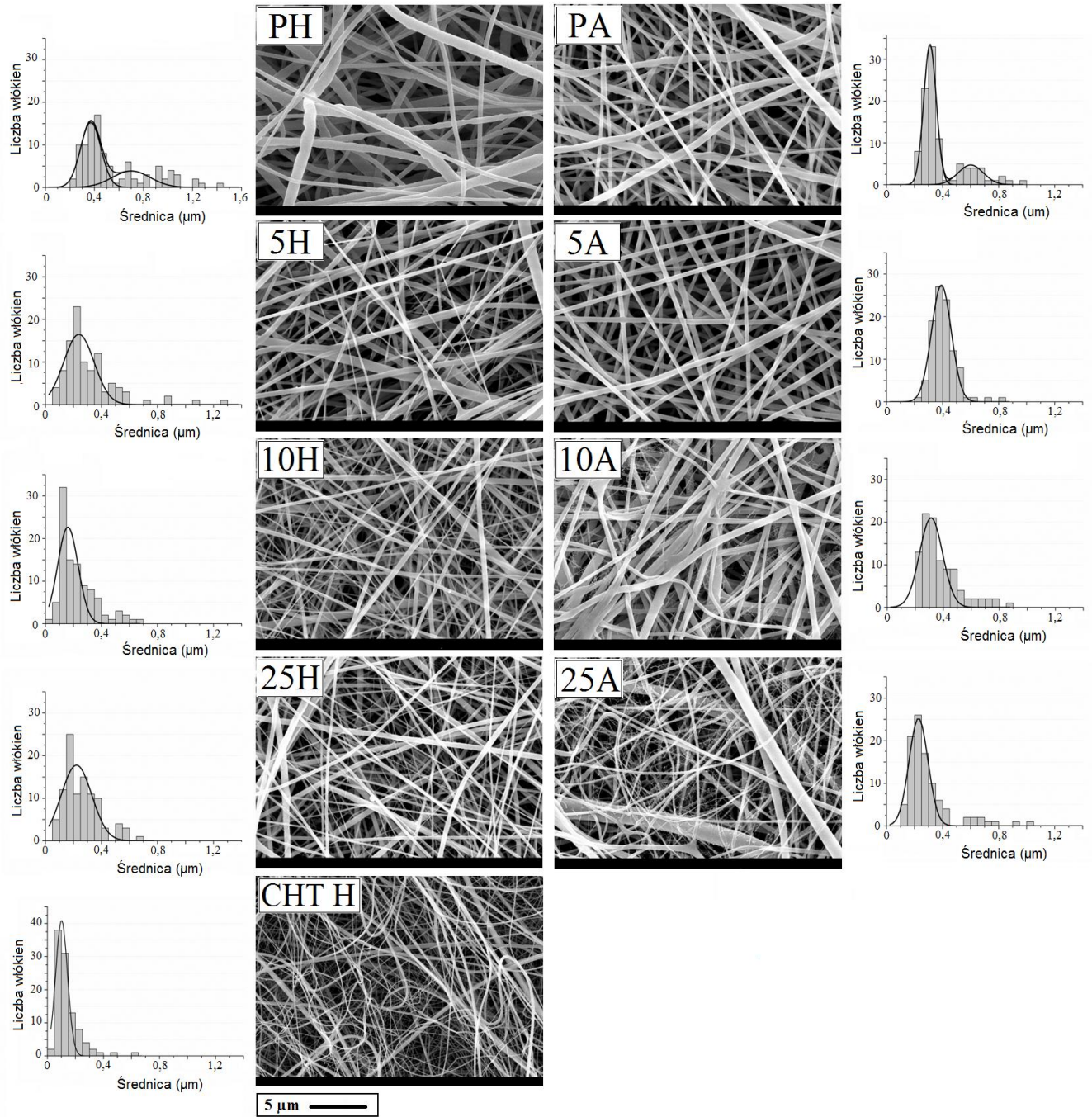


**Rysunek 20.** Wyniki pomiarów lepkości roztworów PCL/CHT (5, 10 oraz 25% w/w chitozanu) oraz próbek kontrolnych (P; CHT) wykonanych z dwóch rodzajów rozpuszczalników: HFIP oraz AA/FA.



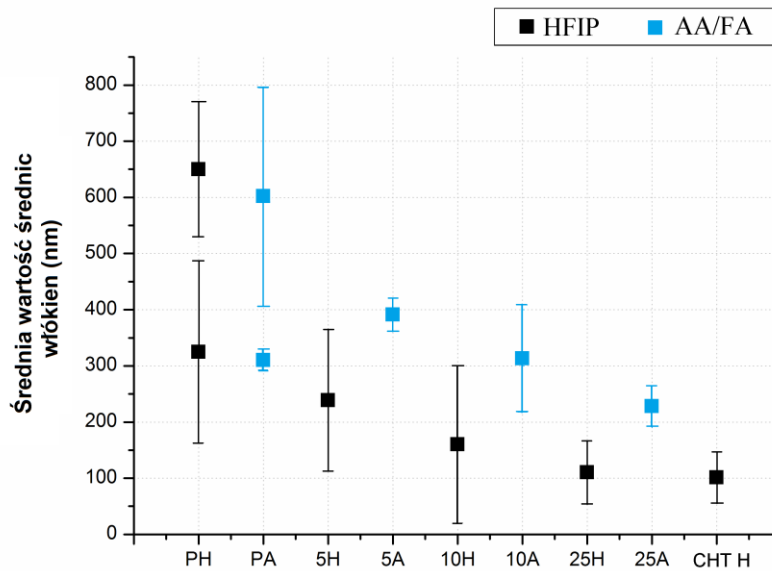
Wyniki pomiaru lepkości roztworów PCL/CHT przeznaczonych do elektroprzędzenia zostały zaprezentowane na Rysunek 20. Można zauważyć, że roztwory PCL/CHT wykonane z zastosowaniem HFIP jako rozpuszczalnika osiągają wyraźnie wyższą lepkość przy znacznie niższym stężeniu polimeru w roztworze. Na przykład, roztwór zawierający 5% w/w chitozanu wykonany w AA/FA, wykazuje lepkość ok. 1000 cP (przy stężeniu całkowitym polimeru 10% w/w), podczas gdy ta sama mieszanina wykonana z HFIP, aby była możliwa do uformowania we włókna musi osiągnąć lepkość rzędu 2250 cP (stężenie całkowite polimeru 5% w/w). Z powyższych danych wynika, że HFIP jest lepszym rozpuszczalnikiem dla tej mieszaniny polimerów. Prawdopodobnie w HFIP makrocząsteczki polimerów osiągają bardziej rozprostowane, nieskłębione konformacje łańcucha, co w konsekwencji powoduje większy opór roztworu przy płynięciu. Jak widać, typ zastosowanego rozpuszczalnika ma bardzo duży wpływ na lepkość roztworów. W przypadku rozpuszczalnika AA/FA, konformacja molekuł analizowanych polimerów jest bardziej skłębiona, co skutkuje koniecznością osiągnięcia wyższego stężenia polimeru w roztworze, aby doprowadzić do efektywnego splątania się molekuł w celu ostatecznego stworzenia strugi roztworu. W tym przypadku oddziaływania polimer- rozpuszczalnik są słabsze, a oddziaływania wodorowe wewnątrzcząsteczkowe dominują, czego wynikiem jest skłębiona forma molekuly polimeru [40, 158]. Ponadto, na splątanie molekuł mogą wpływać także takie czynniki jak stężenie, temperatura czy szybkość ścinania, wynikiem czego są najczęściej perturbacje w czasie elektroprzędzenia tj. zapychanie się dyszy przędzalniczej. Im mniejsze jest światło dyszy wskutek zapychania, tym większe siły ścinające (Równanie 5). Ponadto łańcuchy chitozanu prawdopodobnie tworzą sole z resztami kwasowymi rozpuszczalników (kwas octowy i kwas mrówkowy). W takim przypadku łańcuchy chitozanu są jeszcze bardziej skłonne do skłębienia się, co znajduje potwierdzenie np. w pracy Honma i wsp. [158]. Efekt ten przejawia się w relatywnie niewielkich zmianach lepkości wraz ze wzrostem stężenia chitozanu w roztworach wykonanych w mieszaninie kwasów (AA/FA), w porównaniu do roztworów uformowanych z HFIP. Wyraźnie widać także, że wraz ze zwiększeniem zawartości chitozanu w roztworach, rośnie jego lepkość. Efekt ten występuje w obu rodzajach rozpuszczalników.

### 4.1.2 Morfologia włókien



**Rysunek 21.** Obrazy SEM dwuskładnikowych włókien PCL/CHT oraz próbek kontrolnych (PCL, CHT). Wykresy ilustrują rozkłady średnic włókien dla każdej z próbek.

Rysunek 21 ilustruje obrazy SEM dla wszystkich analizowanych próbek. Jak widać wszystkie uformowane próbki były utworzone z ciągłych włókien, pozbawionych defektów morfologicznych czy powierzchniowych, takich jak np. koraliki. W przypadku włókien PCL wykonanych z obu rodzajów rozpuszczalników, wyraźnie widać bimodalny rozkład średnic włókien. W przypadku mieszanin PCL/CHT rozkłady średnic włókien są raczej jednomodalne, a wartość średnia jest wyraźnie mniejsza w porównaniu do próbki kontrolnej PCL (Rysunek 22).

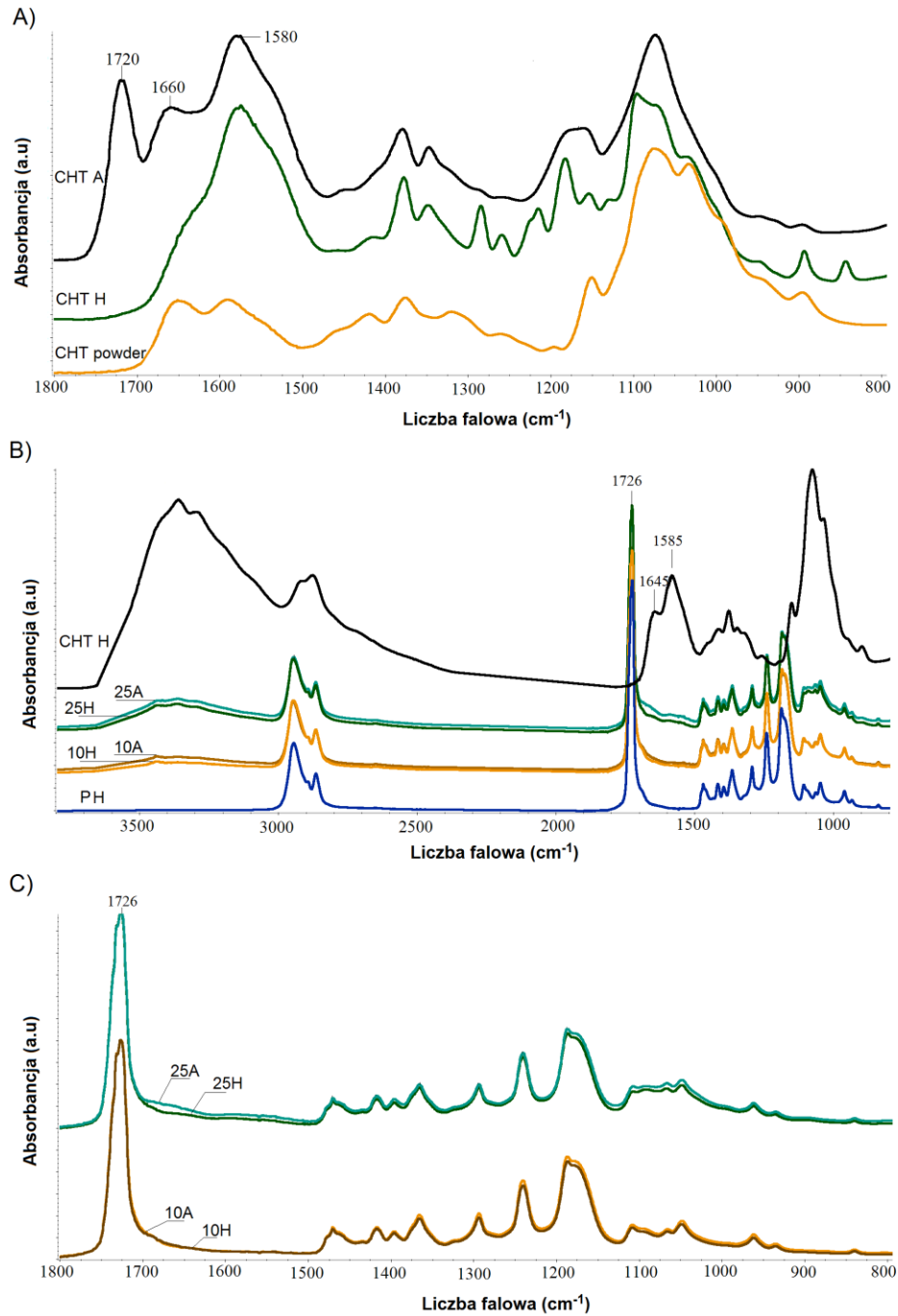


**Rysunek 22.** Wartości średnia średnic włókien analizowanych próbek PCL/CHT w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika.

Jak pokazuje Rysunek 22 na grubość włókien PCL/CHT wpływa zarówno stężenie chitozanu w roztworze jak i zastosowany rozpuszczalnik. Wraz ze wzrostem stężenia chitozanu w roztworze w obu układach rozpuszczalników, średnica włókien zmniejsza się. Jest to zjawisko obserwowane przez wielu badaczy [93]. Jest to związane ze wzrostem gęstości ładunku w roztworze, w tym wypadku wnoszonym przez polikationy chitozanu. W konsekwencji zwiększają się oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy zewnętrznym polem elektrycznym a strugą roztworu, przez co włókna są cieńsze. W wypadku mieszanin PCL/CHT kluczowym czynnikiem wpływającym na ten parametr jest stężenie chitozanu. Ponadto można zauważyć, że wartości średnie grubości włókien są zazwyczaj mniejsze dla

materiałów uformowanych z HFIP niż z AA/FA. Dodatkowo, włókniny uformowane z AA/FA charakteryzuje gęsta siatka bardzo cienkich włókien, szczególnie widoczna na zdjęciach próbek 10A i 25A. Wynika to prawdopodobnie z akumulacji relatywnie dużej ilości ładunków w roztworach PCL/CHT uformowanych z mieszaniny kwasów [28, 56]. Po przekroczeniu krytycznej ilości ładunków na powierzchni strugi doszło do wielostrumieniowego przędzenia roztworu co zostało wyjaśnione w podrozdziale 1.1.3.

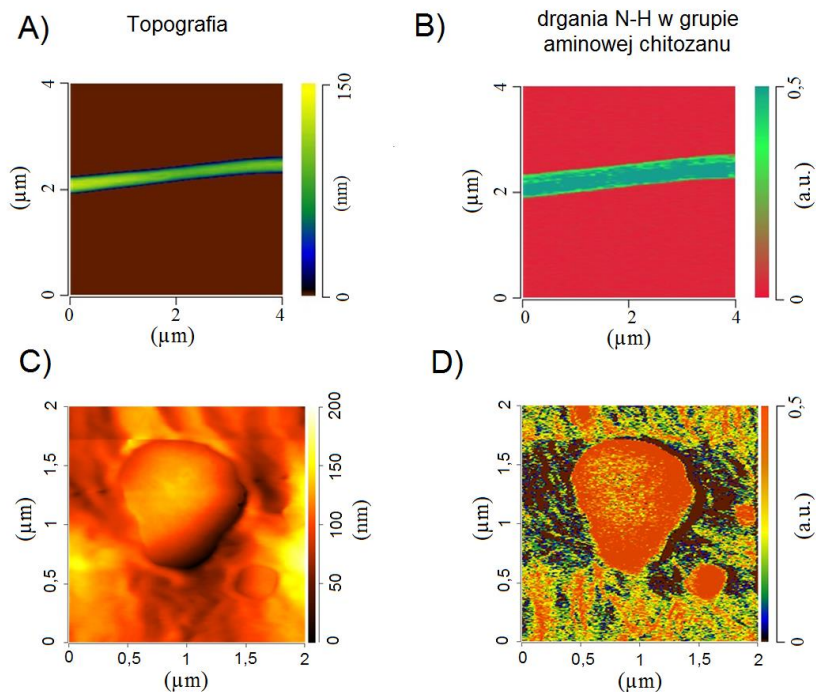
### 4.1.3 Struktura molekularna i nadmolekularna



**Rysunek 23.** A) Widma FTIR próbek chitozanu wykonanych metodą wylania roztworu oraz próbki nieprzetworzonego proszku chitozanu; B) Widma FT-IR wybranych dwuskładnikowych próbek PCL/CHT oraz próbek kontrolnych; C) Widma wybranych próbek w tzw. zakresie *fingerprint*.

Widma FT-IR wybranych próbek zostały przedstawione na Rysunek 23. Aby zweryfikować hipotezę dotyczącą pojawienia się soli amoniowych w próbkach na skutek interakcji polijonów chitozanu z resztami kwasowymi rozpuszczalników dodatkowo wykonano filmy z tych mieszanin, a uzyskane wyniki przedstawiano na Rysunek 23A. Analiza interakcji polimer- polimer i polimer- rozpuszczalnik została oparta o analizę tzw. regionu charakterystycznego (ang. *fingerprint*), mieszczącego się poniżej  $1800\text{ cm}^{-1}$  (Rysunek 23A i C). Wyraźne interakcje rozpuszczalnika z molekułami chitozanu są widoczne na widmach FT-IR próbek filmów tych roztworów (Rysunek 23A). Widmo w zakresie  $1720\text{ cm}^{-1}$  widoczne w próbce CHTA, pochodzi prawdopodobnie od drgań grup karbonylowych w solach utworzonych przez polikationy chitozanu i reszty kwasowe. Tworzenie octanu chitozanu i mrówczanu chitozanu zostało wcześniej opisane przez Yamamoto i wsp. [159]. Jednak w przypadku widm włókien PCL/CHT obserwowane jest nałożenie sygnałów pochodzących od obu związków (Rysunek 23B oraz C). W zakresie charakterystycznym widać pewne przesunięcie widma pochodzącego od drgań w grupie aminowej ( $1575\text{ cm}^{-1}$ ) w porównaniu do widma próbki kontrolnej chitozanu ( $1595\text{ cm}^{-1}$ ), co wskazuje na interakcje składników mieszaniny. Prawdopodobnie występują tam wiązania wodorowe pomiędzy grupami karbonylowymi i hydroksylowymi pochodzącymi od PCL a grupami aminowymi chitozanu.

Analiza widm włókien w zakresie  $800\text{-}3800\text{ cm}^{-1}$  (Rysunek 23B) ujawniła widma charakterystyczne dla wiązania N-H w zakresie liczby falowej  $3364\text{ cm}^{-1}$  oraz nakładające się na nie widmo od drgań rozciągających O-H w rejonie liczby falowej  $3295\text{ cm}^{-1}$  [100, 158-160, 162]. Widma w zakresie  $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  pochodzą od drgań C=O w pierwszorzędowym wiązaniu amidowym, a widma w zakresie  $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$  pochodzą od drgań wiązania N-H w aminie pierwszorzędowej oraz pierwszorzędowej grupie amoniowej [159, 160]. Widoczne jest także widmo, pochodzące od wiązania glikozydowego ( $1080\text{ cm}^{-1}$ ). W przypadku PCL widoczne jest wyraźne widmo w zakresie liczby falowej  $1725\text{ cm}^{-1}$ , pochodzące od drgań rozciągających w wiązaniu karbonylowym [158]. W przypadku analizowanych widm FT-IR próbek włókien PCL/CHT wykonanych z różnych rozpuszczalników nie stwierdzono wyraźnych różnic.

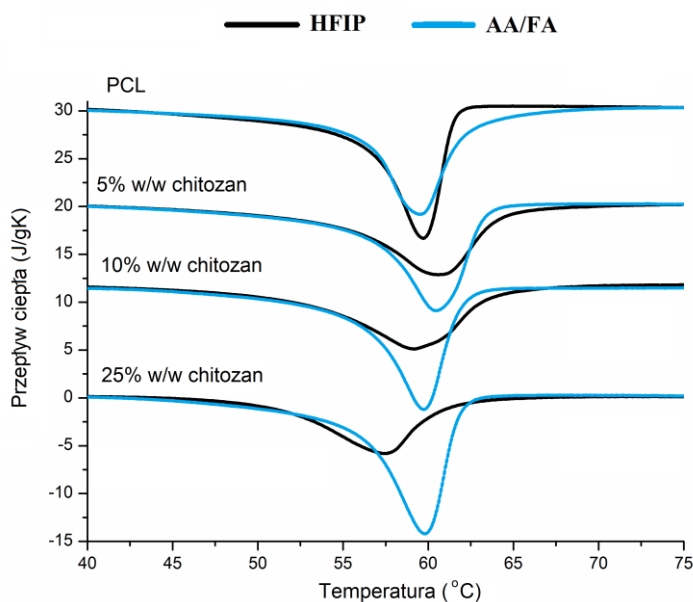


**Rysunek 24.** Obrazy topografii powierzchni uzyskane metodą AFM-IR A) pojedynczego włókna 10A; C) filmu roztworu 10A. Obrazy ilustrujące rozmieszczenie składników wykonane w zakresie drgania wiązania N-H ( $1645\text{ cm}^{-1}$ ): B) włókna 10A; D) filmu roztworu 10A.

Rysunek 24 prezentuje kontrast fazowy we włóknach i filmach dwuskładnikowych PCL/CHT zilustrowane metodą topografii AFM-IR. W przypadku AFM, charakterystyka topografii oraz separacji faz włókien poniżej 500 nm i posiadających pewną krzywiznę powierzchni jest problematyczna. Dlatego podjęto próbę pośredniej analizy zjawisk zachodzących w wybranych roztworach PCL/CHT. Jak pokazują wyniki obrazowania, włókna 10A są homogeniczne pod względem fazowym oraz topografii powierzchni (Rysunek 24A i B). Wyniki mapowania próbki włókna w zakresie liczby falowej  $1645\text{ cm}^{-1}$  pokazują równomierne rozmieszczenie chitozanu we włóknie w skali w jakiej był wykonany pomiar (Rysunek 24B). Niewielki spadek intensywności sygnału przy granicy włókna jest najprawdopodobniej spowodowany cylindryczną krzywizną włókna, a nie zmianami w dystrybucji chitozanu. W tym miejscu, mniejsza ilość materiału pomiędzy substratem a sondą w porównaniu do środka włókna, wynikająca z jego okrągłego przekroju, może dać taki efekt. Efekt separacji faz w roztworach polielektrolitów w obecności soli jest zjawiskiem



znanym [158]. Taka separacja faz jest widoczna w przypadku analizowanych filmów 10A (Rysunek 24 C i D). W środku obrazu widoczne jest sferyczne skupisko jednej fazy. Jak wykazało mapowanie próbki metodą AFM-IR w zakresie liczby falowej  $1645\text{ cm}^{-1}$  odpowiadającej drganiom zginającym wiązania N-H, w tym miejscu obecny jest chitozan. W przypadku włókien takiego zjawiska nie zaobserwowano w takim wymiarze. Może to być spowodowane zarówno czułością metody jak i szybkością parowania rozpuszczalnika. Rozpuszczalnik paruje wyraźnie szybciej z cienkiej strugi roztworu niż z roztworu wylanego na szkiełko laboratoryjne. W przypadku filmu uzyskanego metodą wylania roztworu, parowanie rozpuszczalnika jest powolne, dlatego makrocząsteczki mają czas na reorganizację, co może prowadzić do wyraźnej separacji fazowej, stąd obecność domen danej fazy. Dane literaturowe dowodzą, że PCL i CHT nie są polimerami mieszalnymi na poziomie cząsteczkowym. Jednak jak wiadomo stopień zdyspergowania mieszanin tych polimerów może być bardzo wysoki i jest silnie zależny od metody ich przygotowania [160, 161]. Uzyskane wyniki pozwalają potwierdzić wpływ rozpuszczalnika na separację faz.

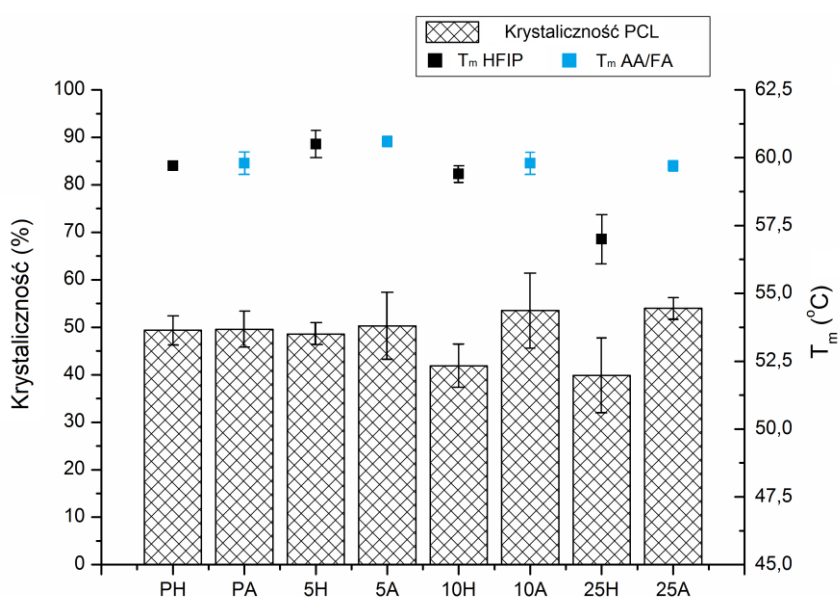


**Rysunek 25.** Termogramy DSC próbek PCL/CHT w trybie ogrzewania próbki z szybkością  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

O interakcjach pomiędzy molekułami PCL a chitozanu można wnioskować z wyników uzyskanych metodą DSC (Rysunek 25, Rysunek 26). Rysunek 25 pokazuje, że



jedyna przemiana endotermiczna jaka jest obserwowana na krzywych przepływu ciepła jest związana z obecnością PCL. Dodatkowo Rysunek 26 potwierdza, że obecność chitozanu wpływa na krystaliczność PCL, co zostało dowiedzione także w innych pracach [100, 162]. Spadek krystaliczności PCL wraz ze wzrostem zawartości chitozanu we włóknach uformowanych z HFIP jest prawdopodobnie związany z obecnością relatywnie sztywnych łańcuchów chitozanu, będących fizycznymi przeszkodami w krystalizacji PCL. Ograniczenia w mobilności chitozanu wynikają z faktu, że zakres temperaturowy w jakim przeprowadzona była analiza jest istotnie poniżej temperatury zeszklenia chitozanu wynoszącej ok. 203 °C [163].

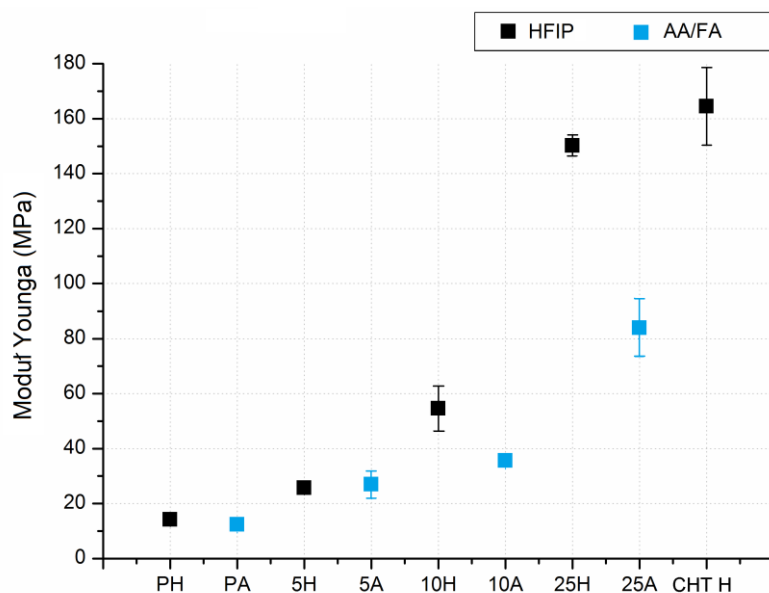


**Rysunek 26.** Wyniki pomiaru krystaliczności PCL oraz temperatury topnienia w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika oraz zawartości chitozanu. Przedstawiono wyniki próbek kontrolnych (PH, PA) oraz włókien dwuskładnikowych.

Ponadto, mając na uwadze relatywnie silne wiązania wodorowe pomiędzy grupami karboksylowymi PCL a grupami aminowymi chitozanu w roztworach wykonanych w HFIP, spodziewamy się wyraźnego ograniczenia mobilności molekuł PCL uwięzionych pomiędzy fazą szklistą chitozanu. Gdyby molekuly składników włókien ze sobą nie oddziaływały, nie obserwowano by redukcji krystaliczności PCL wraz ze wzrostem zawartości chitozanu. Podobne wyniki uzyskał Senda i wsp. [100], który wykazał spadek krystaliczności PCL o 8%

po dodaniu 20% w/w chitozanu. Takie utrudnienia w krystalizacji skutkują także w ostatecznie mniejszych krystalitach PCL i/lub mniejszej doskonałości krystalitów, co manifestuje się niższą temperaturą topnienia (Rysunek 25, Rysunek 26). Wzrost krystaliczności PCL w mieszaninach formowanych z AA/FA nie odpowiada temu schematowi. Jest to prawdopodobnie spowodowane obecnością soli powstałych w roztworach. Powstałe octany i mrówczany chitozanu mogą stanowić heterozarodki krystalizacji PCL. W połączeniu z wyższym punktem wrzenia kwasów niż HFIP oraz formowaniem się grubszych włókien z AA/FA, dłuższy jest także czas, w którym może zachodzić krystalizacja.

#### 4.1.4 Właściwości mechaniczne

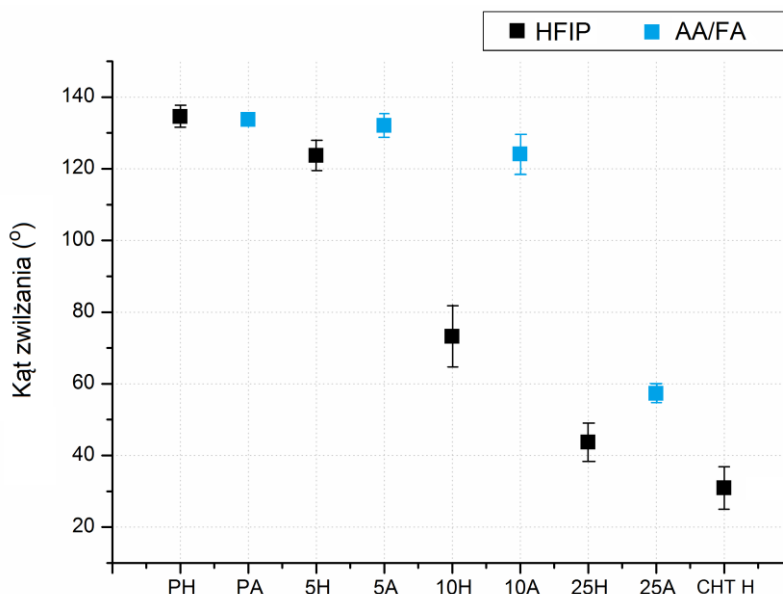


**Rysunek 27.** Moduł Younga uzyskany z analizy wyników statycznej próby rozciągania.

Jak wynika ze statycznej próby rozciągania, wzrost zawartości chitozanu powoduje wzrost modułu Younga włókien PCL/CHT (Rysunek 27). Uzyskane wyniki są w zgodzie z danymi literaturowymi [164]. Ponadto, wyniki pokazują wyraźną zależność parametrów wytrzymałościowych analizowanych włókien od zastosowanego rozpuszczalnika. Wyniki próbek przygotowanych z HFIP wykazują wyraźnie wyższy moduł Younga w porównaniu do próbek uformowanych z AA/FA oraz wyraźny wzrost tej różnicy wraz ze wzrostem

zawartości chitozanu w próbce. Przypuszcza się, że jest to związane z mniejszą średnicą włókien formowanych z HFIP (Rysunek 22). Dodatkowo, jak można wnioskować z danych literaturowych, jest to związane z silną orientacją makromolekuł oraz krystalitów w ultra cienkich włóknach [165]. Nie można także wykluczyć wpływu soli (octanów i mrówczanów) na parametry wytrzymałościowe włókien uformowanych z AA/FA. Obecność soli mogła zredukować wiązania wodorowe pomiędzy składnikami włókien, w konsekwencji zwiększając mobilność molekuł [159]. Te wyniki są zgodne z danymi uzyskanymi metodą FT-IR (Rysunek 23).

#### 4.1.5 Zwilżalność materiałów



**Rysunek 28.** Kąt zwilżania włókien PCL/CHT w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika.

Wyniki zaprezentowane na Rysunek 28 pokazują wyraźną redukcję kąta zwilżania w zależności od zawartości chitozanu w próbce, co jest zgodne z danymi literaturowymi [160]. Za wzrost zwilżalności materiałów są tu przede wszystkim odpowiedzialne grupy aminowe w strukturze chitozanu. Ponadto, wyraźna jest zależność zwilżalności materiału od zastosowanego rozpuszczalnika. W przypadku zastosowania HFIP jako rozpuszczalnika zwilżalność materiałów jest zawsze wyższa niż w przypadku włókien uformowanych

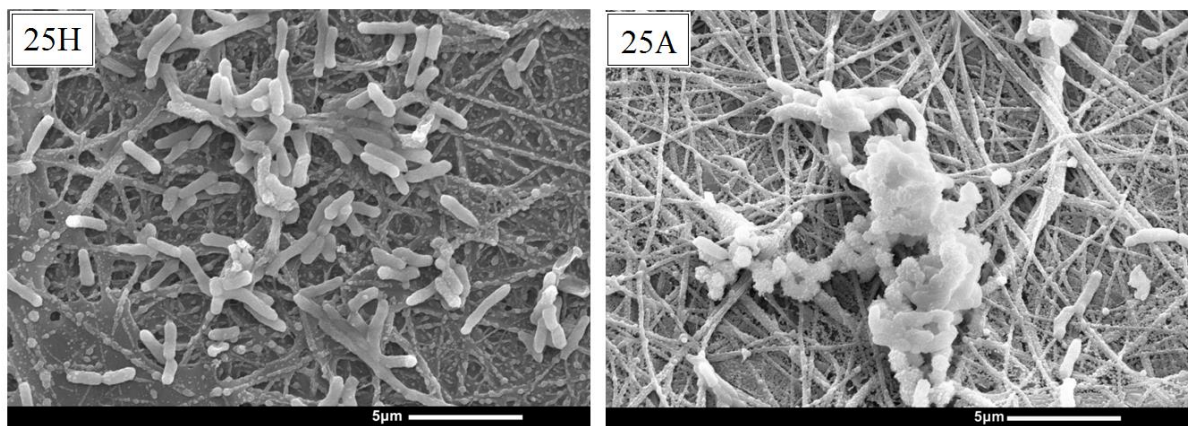
z AA/FA. Prawdopodobnie wynika to z mniejszej zawartości wolnych grup aminowych w strukturze włókien wykonanych z mieszaniny kwasów na skutek tworzenia się soli chitozanu. Jak pokazują symulacje przeprowadzone przez Klośa i Pakułę [166], w obecności jonów soli molekuly polielektrolitów przyjmują bardziej skłębione konformacje, co redukuje energię układu oraz zmniejsza ilość obciążonych dodatnim ładunkiem elektrycznym grup aminowych. Naturalnie, takie zjawisko nie występuje w próbkach uformowanych z HFIP, co skutkuje wyższą zwilżalnością. Ponadto, w zależności od jakości rozpuszczalnika i wartości pH-pK<sub>0</sub>, łańcuchy polielektrolitów mogą osiągać różne konformacje [68]. W takim wypadku analizowane próbki mogą różnić się ilością grup aminowych obecnych na powierzchni włókien.

#### 4.1.6 Badania biologiczne

W celu weryfikacji wpływu rozpuszczalnika na właściwości bakteriobójcze chitozanu we włóknach dwuskładnikowych wykonano test bakteriobójczości na bakterii *E. coli*. Jak wiadomo z danych literaturowych efekt bakteriobójczy chitozanu jest związany z jego masą cząsteczkową oraz stopniem deacetylacji, jak również z takimi czynnikami zewnętrznymi jak np. pH, wilgotność [81, 167]. Na podstawie wyników analizy próbki 25% w/w chitozanu można stwierdzić, że uformowane włókniny mogą powodować inhibicję wzrostu bakterii *E. coli*. Ponadto porównując intensywność tego efektu na analizowanych próbkach możemy stwierdzić, że efekt bakteriobójczy jest porównywalny dla włókien o tym samym składzie, a uformowanych z różnych rozpuszczalników (Tabela 6).

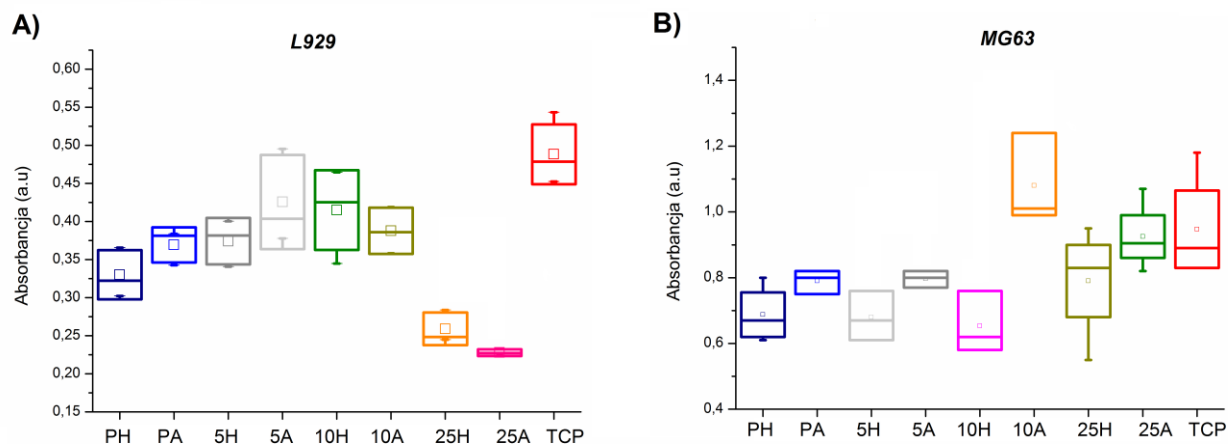
**Tabela 6.** Wyniki testu na bakteriobójczość wybranych włókien PCL/CHT w kontakcie bezpośrednim z bakterią *E.coli*. Wyniki średniej liczby kolonii bakterii oraz procent inhibicji wzrostu bakterii.

	Próbka				
	10H	10A	25H	25A	Control
<i>Średnia liczba kolonii bakterii na włókninie</i>	154,2±74,3	123,3±26,4	71,2 ±19,2	72,3 ±2,5	186 ±75,7
<i>Inhibicja wzrostu bakterii w stosunku do kontroli (%)</i>	18,6 ±9,5	30,3±12,1	59±15,6	57,2±14,2	-



**Rysunek 29.** Obrazy SEM wybranych próbek PCL/CHT po inkubacji przez 24h w zawiesinie bakterii *E.coli*.

Jak widać na Rysunek 29 bakterie *E.coli* rozprzestrzeniają się na analizowanych włókninach w inny sposób. Na próbkach uformowanych z HFIP bakterie są rozłożone równomiernie na powierzchni włókniny, podczas gdy na próbkach uformowanych z mieszaniny kwasów obserwowany jest efekt skłębienia bakterii (efekt flokulacji) (Rysunek 29). Prawdopodobnie za ten efekt na włóknach uformowanych z mieszaniny kwasów odpowiedzialna jest obecność soli chitozanu. Niektóre prace badawcze wykazują, że efekt bakteriobójczy pochodnych chitozanu jest związany z DS, który wpływa na pKa molekuł chitozanu co prowadzi do wyższej protonacji w porównywalnych warunkach pH (167).



**Rysunek 30.** Wyniki testu cytotoksyczności analizowanych dwuskładnikowych włókien PCL/CHT oraz próbek kontrolnych (PCL) po 24h hodowli komórek A) mysich fibroblastów linii L929; B) ludzkich osteoblastów linii MG63.

W celu weryfikacji wpływu zastosowanego rozpuszczalnika na cytotoksyczność materiałów wykonano badania *in vitro* na wybranych liniach komórkowych, mysich fibroblastach linii L929 i ludzkich osteoblastach linii MG63, w odniesieniu do kontroli TCP. Wyniki badań próby w kontakcie bezpośrednim po jednym dniu hodowli prezentuje Rysunek 30. Jak widać na wykresach większość analizowanych próbek była nietoksyczna dla wybranych linii komórkowych. Jako próg toksyczności przyjmuje się poziom 70% przeżywalności komórek w stosunku do kontroli [109]. Jedynie próbki 25H i 25A w kontakcie z fibroblastami wykazały efekt cytotoksyczny oraz próbka 10H w kontakcie z osteoblastami. Generalnie nie zaobserwowano wyraźnej różnicy w cytotoksyczności materiałów w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika. Jedyną statystycznie istotną różnicę zaobserwowano dla próbki z 10% w/w chitozanu w kontakcie z osteoblastami. Po 24h hodowli na próbce 10A zaobserwowano wyraźnie wyższą żywotność komórek MG63 niż tożsamej próbki wykonanej z HFIP. W przypadku hodowli osteoblastów zaobserwowano niewielką różnicę w żywotności komórek w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika (Rysunek 30B).

#### 4.1.7 Podsumowanie

W pierwszym etapie pracy doktorskiej zoptymalizowano parametry elektroprzędzenia mieszanin PCL/CHT w celu uformowania jednorodnych włókien jedno- i dwuskładnikowych. Dodatkowo przeanalizowano wpływ wybranych rozpuszczalników: (1,1,1,3,3,3 heksafluoro-2-propanolu (HFIP) oraz mieszaniny kwasu octowego i mrówkowego(AA/FA)) na morfologię, strukturę wewnętrzną i wybrane właściwości włókien. Włókniny uformowane z HFIP charakteryzują się wyraźnie cieńszymi włóknami, wyższą hydrofilowością i adhezją komórek. Prawdopodobnie większość zaprezentowanych różnic pomiędzy materiałami wykonanymi z różnych rozpuszczalników wynika z interakcji grup aminowych z pozostałymi składnikami roztworów. Jak wykazano na tym etapie, w mieszaninie kwasów mogą powstawać sole amoniowe chitozanu. Obecność soli chitozanu powoduje zwiększenie krystaliczności PCL, co wynika prawdopodobnie z tego iż powstałe sole pełnią funkcję heterozarodków dla krystalizacji PCL. W próbkach uformowanych z HFIP, krystaliczność PCL spada wraz ze zwiększaniem zawartości chitozanu w mieszaninie. Obecność soli prowadzi także do redukcji modułu Younga i zwilżalności włókien. Wzrost cytotoksyczności materiałów zawierających 25% w/w chitozanu dla linii fibroblastów koreluje z najsilniejszym efektem bakteriobójczym w porównaniu do próbek z mniejszą ilością chitozanu. Prawdopodobnie jest to związane z utrudnioną adhezją komórek na skutek niewystarczającej zwilżalności materiału i jego wysokiej sztywności. Jak wykazano struktura i właściwości włókien PCL/CHT silnie zależą od zastosowanego rozpuszczalnika.

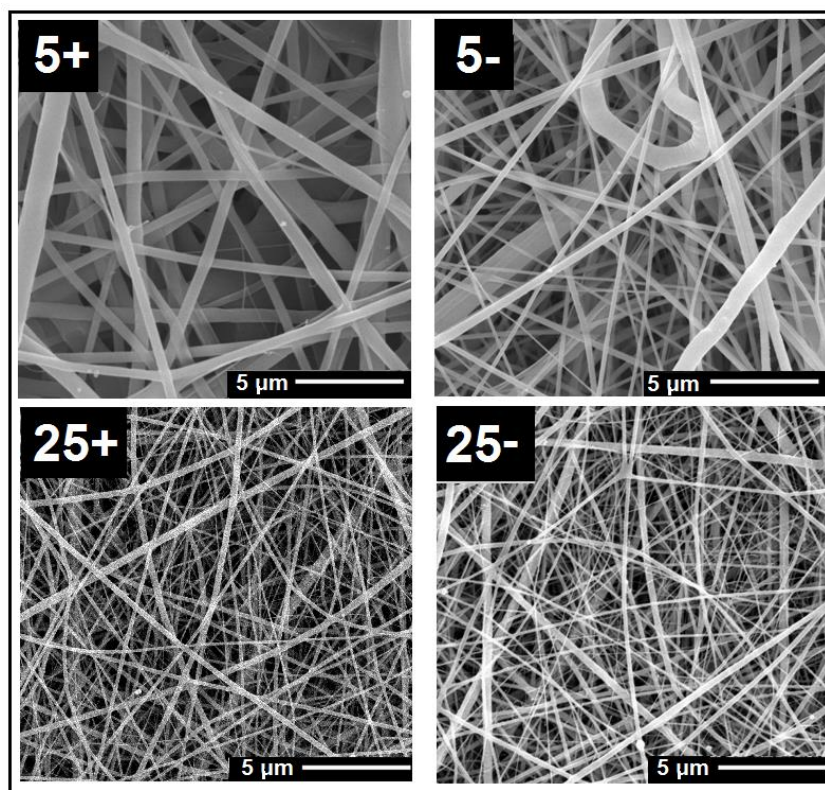
Na podstawie zaprezentowanych wyników uznano, że do dalszych badań włókna PCL/CHT będą formowane jedynie z HFIP. Brak soli amoniowych w przypadku włókien uformowanych z HFIP, pozwoli na obserwację orientacji łańcuchów chitozanu i/lub zmiany jego interakcji z molekułami PCL na skutek zastosowanej biegunowości napięcia.



## 4.2 Analiza wpływu biegunowości napięcia na strukturę i wybrane właściwości włókien poli( $\epsilon$ -kaprolakton)/chitozan

Na tym etapie prac skupiono się wyłącznie na analizie wpływu biegunowości napięcia na strukturę i właściwości dwuskładnikowych włókien PCL/CHT. Analizie poddano takie same mieszaniny PCL/CHT jak na etapie optymalizacji parametrów procesu tj. 5%, 10% i 25% w/w chitozanu w próbce. Zastosowano układ do elektroprzędzenia, w którym dysza przędzalnicza była podłączona do źródła wysokiego napięcia, a kolektor, na który zbierano włókna, był uziemiony. Do dyszy przykładano ujemny lub dodatni znak potencjału elektrycznego.

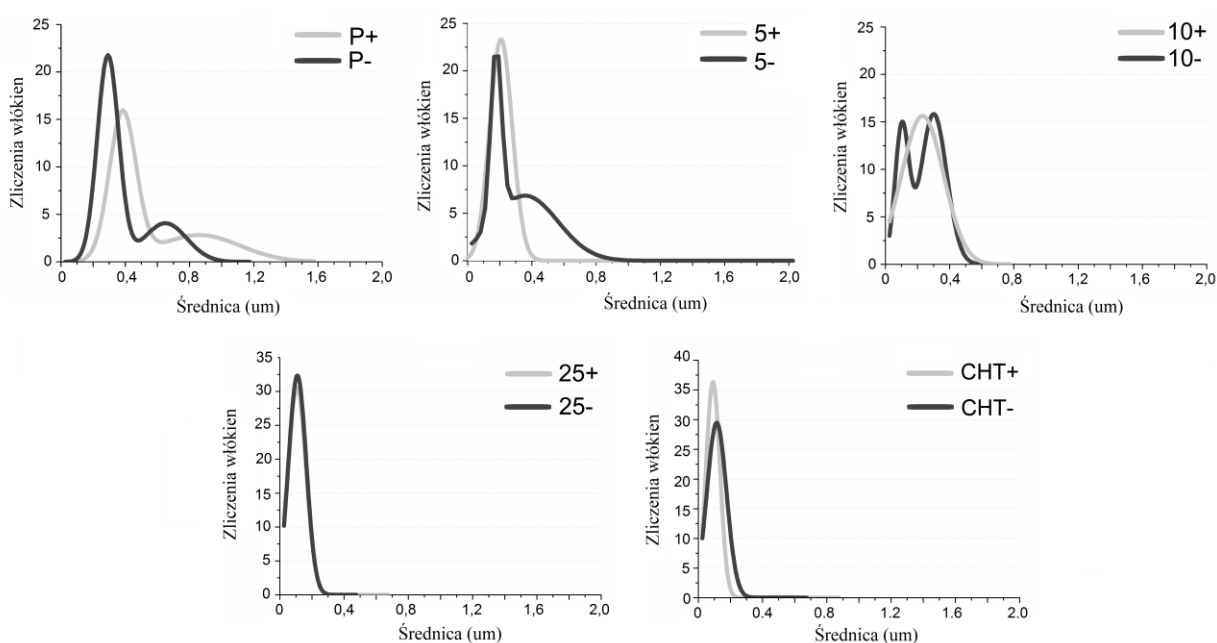
### 4.2.1 Morfologia włókien



**Rysunek 31.** Obrazy SEM wybranych włókien PCL/CHT wykonanych z różną biegunowością napięcia.



Analiza obrazów uzyskanych metodą SEM ujawniła bardzo istotną różnicę pomiędzy próbkami PCL/CHT uformowanymi z zastosowaniem wybranej biegunowości napięcia (Rysunek 31, Rysunek 32). Rysunek 32 obrazuje rozkłady średnic włókien analizowanych próbek PCL/CHT. Można zauważyć, że próbki kontrolne PCL charakteryzuje bimodalny rozkład średnic włókien. Zmiana rozkładu średnic włókien z bimodalnego na jednomodalny jest obserwowana po dodaniu chitozanu, który powoduje wzrost przewodności elektrycznej roztworu na skutek wprowadzenia dodatkowych nośników ładunku elektrycznego jakimi są protonowane grupy aminowe łańcucha chitozanu.



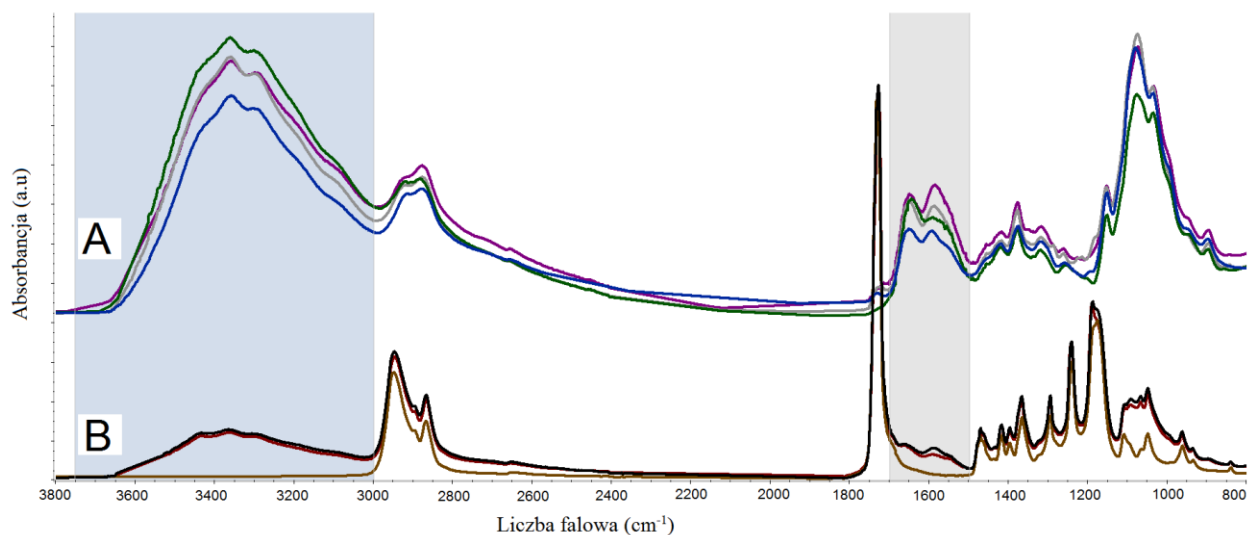
**Rysunek 32.** Rozkład średnic włókien próbek PCL/CHT wykonanych z różną biegunowością napięcia.

Jednomodalny rozkład średnic włókien pojawia się w próbkach o niskich zawartościach chitozanu (5 oraz 10% w/w) uformowanych z zastosowaniem dodatniego znaku potencjału elektrycznego na dyszy. Taki rozkład obserwowany jest także dla próbek 25% w/w chitozanu uformowanych w obu analizowanych układach biegunowości napięcia. Rozkład bimodalny jest obserwowany tylko dla próbek 5- oraz 10-. Jak widać typowym rozkładem dla próbek kontrolnych chitozanu jest rozkład jednomodalny (Rysunek 32). Obserwowana dla próbek 5- oraz 10- bimodalność wynika prawdopodobnie z efektywnego skompensowania ładunku elektrycznego polisacharydu przez ładunek przyłożony do dyszy

przędzalniczej, co powoduje podobieństwo do rozkładu próbki kontrolnej PCL. Dla próbek 25+ oraz 25- obserwowany jest jednomodalny rozkład średnic włókien, charakterystyczny dla próbek kontrolnych CHT, co świadczy o tym, że ładunek chitozanu nie może być efektywnie skompensowany przez ładunek przyłożony do dyszy przędzalniczej. Uzyskane wyniki są zgodne z rezultatami uzyskanymi przez Terada i wsp. [94].

#### 4.2.2 Struktura molekularna i nadmolekularna

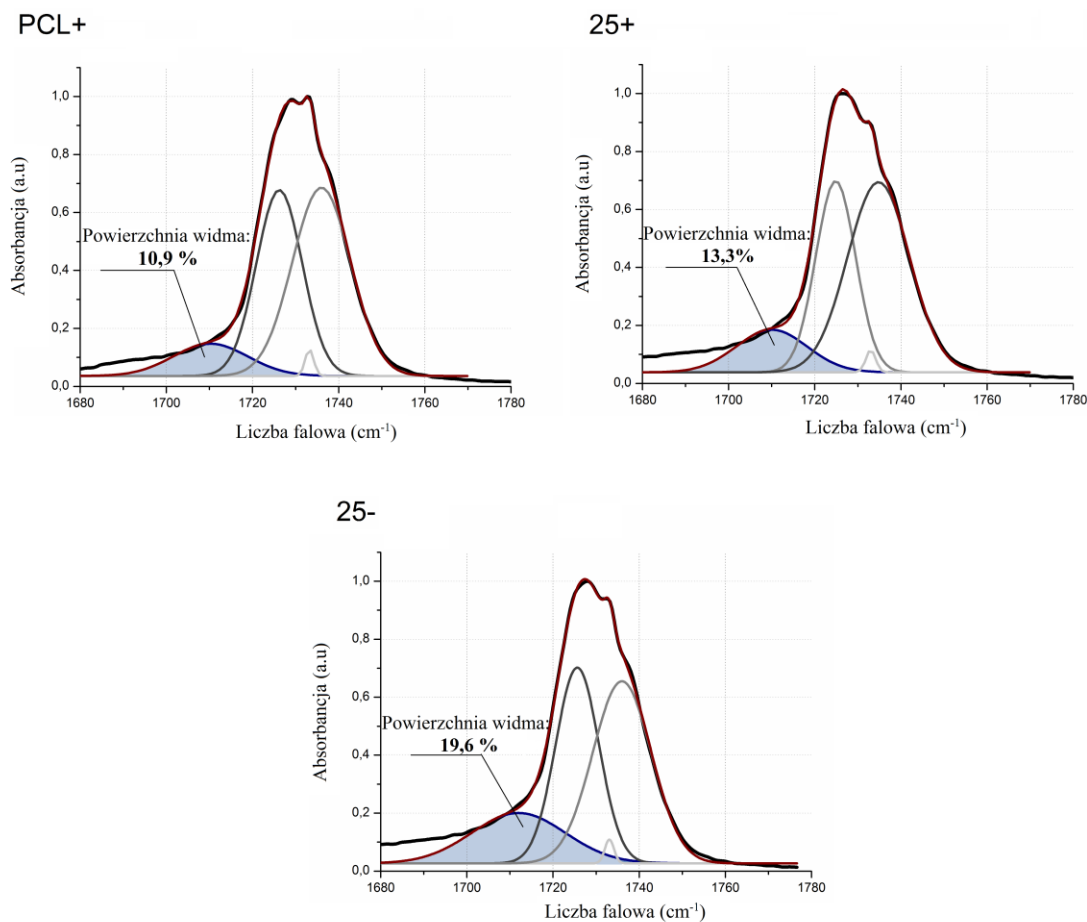
Rysunek 33 przedstawia widma FT-IR próbek PCL/CHT. Na widmie PCL można zauważyć silny sygnał od wiązania karbonylowego ( $1725\text{ cm}^{-1}$ ) [100, 104, 158]. W przypadku chitozanu można zaobserwować charakterystyczne widma w zakresie liczby falowej  $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  oraz  $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$  pochodzące kolejno od drgań w grupie karbonylowej w pierwszorzędowym wiązaniu amidowym oraz od drgań N-H w grupie amoniowej i aminie pierwszorzędowej [99].



**Rysunek 33.** Widma FT-IR wybranych próbek PCL/CHT: A) włókna CHT- (fioletowy), CHT+ (szary), CHT+CS (niebieski) oraz CHT-CS (zielony); B) włókna PCL (jasno brązowy), 25- (czarny), 25+ (brązowy).

Rysunek 33B ujawnia pewne różnice w intensywności widma w zakresie liczby falowej  $1590\text{ cm}^{-1}$ , wskazując na większą zawartość chitozanu na powierzchni włókien

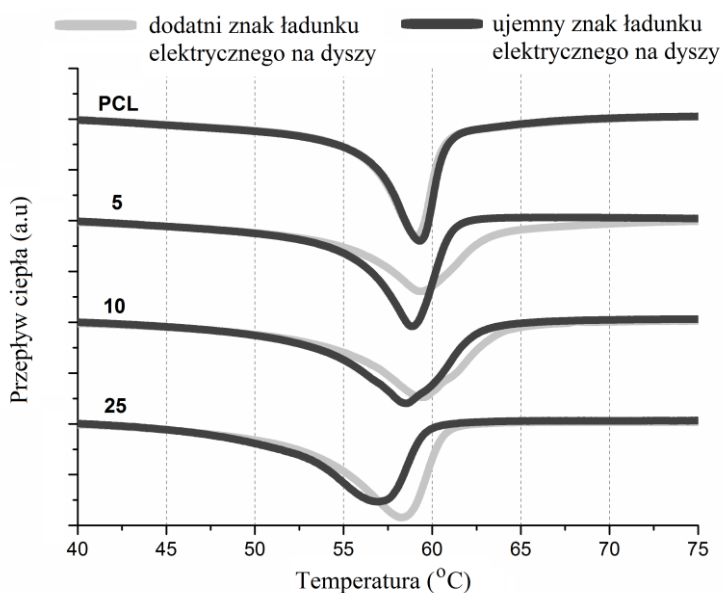
uformowanych w układzie z ujemnym znakiem potencjału elektrycznego na dyszy przędzalniczej. Próbki 5% i 10% w/w chitozanu nie wykazały na widmach FT-IR, żadnych wyraźnych różnic w intensywności czy przesunięciach sygnałów. W przypadku próbki kontrolnej chitozanu (CHT-), zaobserwowano wzrost absorpcji w zakresie liczby falowej  $1590\text{ cm}^{-1}$ , co może świadczyć o zwiększonej zawartości grup aminowych na powierzchni włókien. Jednocześnie, absorpcja w zakresie liczby falowej  $1650\text{ cm}^{-1}$  wzrosła dla próbek po modyfikacji powierzchni CS. Widmo w zakresie  $3364\text{ cm}^{-1}$  pochodzi od drgań wiązania N-H nakładającego się z drganiami pochodzącymi od wiązania O-H w zakresie  $3295\text{ cm}^{-1}$  (Rysunek 33B). Przedstawione wyniki FT-IR prezentują nieznaczne różnice pomiędzy intensywnością widm w zakresie  $3000\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$  w przypadku obu próbek włókien chitozanu (Rysunek 33A). Może to wskazywać na absorpcję wody i/ lub tworzenie kompleksów CHT-CS [99]. Prawdopodobnie przez śladową ilość zaadsorbowanego CS, nie jest możliwe wyszczególnienie widm pochodzących od tego związku. Widma charakterystyczne dla CS powinny być widoczne w zakresie pasm  $1232\text{ cm}^{-1}$  oraz  $851\text{ cm}^{-1}$ , które są przypisane do drgań wiązania C-O-S. Ponadto drgania pochodzące od amidu I powinny być widoczne w zakresie  $1632\text{ cm}^{-1}$  [126].



**Rysunek 34.** Dekonwolucja widma w zakresie liczby falowej 1680-1780 cm<sup>-1</sup>. Widmo zawiera cztery składowe: z maksimum 1710 cm<sup>-1</sup> (niebieskie), 1726 cm<sup>-1</sup> (ciemny szary), 1733 cm<sup>-1</sup> (szary) i 1736 cm<sup>-1</sup> (jasny szary). Udział procentowy przypisany do widma 1710 cm<sup>-1</sup> opisuje relację powierzchni tego widma do powierzchni całego widma w zakresie 1680-1780 cm<sup>-1</sup>.

Aby uzyskać dodatkowe informacje z analizy widm FT-IR, przeprowadzono dekonwolucję widma w zakresie 1680-1780 cm<sup>-1</sup> (Rysunek 34). Widmo w tym zakresie pochodzi od drgań rozciągających w wiązaniu karbonylowym (C=O). Jak wiadomo z danych literaturowych widmo PCL w tym zakresie jest złożone z czterech składowych o różnych maksimach [100, 158]. Zgodnie z danymi literaturowymi składowa 1725 cm<sup>-1</sup> pochodzi od drgań molekularnych w fazie krystalicznej, a składowa 1735 cm<sup>-1</sup> jest związana z drganiami w fazie amorficznej. Składowa z maksimum intensywności 1710 cm<sup>-1</sup> jest wiązana z drganiami grupy karbonylowej oddziaływującej z łańcuchami chitozanu [100]. Jak

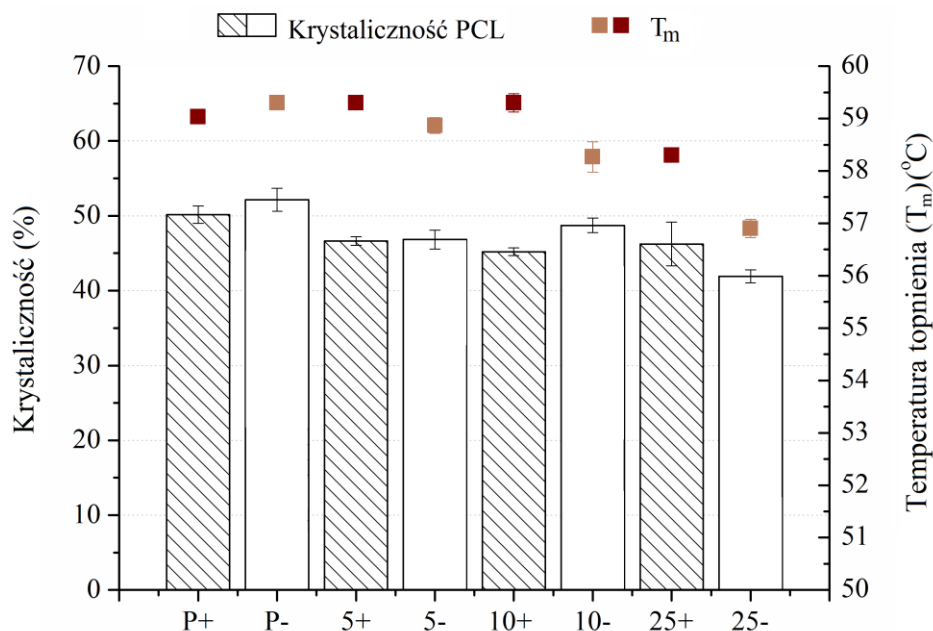
wyraźnie widać na Rysunek 34 obecne jest także widmo z maksimum  $1732\text{ cm}^{-1}$ . Prawdopodobnie pochodzi ono od drgań w tak zwanej fazie ang. *rigid amorphous* (RAF), będącej fazą pośrednią pomiędzy fazą krystaliczną a fazą amorficzną [168]. Jak wskazują wyniki prezentowane na Rysunek 34 największy udział widma  $1710\text{ cm}^{-1}$  w stosunku do całej powierzchni widma w zakresie  $1680\text{-}1780\text{ cm}^{-1}$  zaobserwowano dla próbki 25-. Jest to dowód na zwiększenie oddziaływań pomiędzy molekułami PCL a chitozanu poprzez zastosowanie napięcia z ujemnym znakiem potencjału elektrycznego na dyszy. Taka biegunowość napięcia prowadzi do efektywnej redukcji ładunku w roztworze, co skutkuje zwiększeniem interakcji z molekułami PCL. Prawdopodobnie efektem opisanych zmian w interakcjach makromolekuł polimerów są opisane zmiany w rozkładach średnic włókien (Rysunek 32).



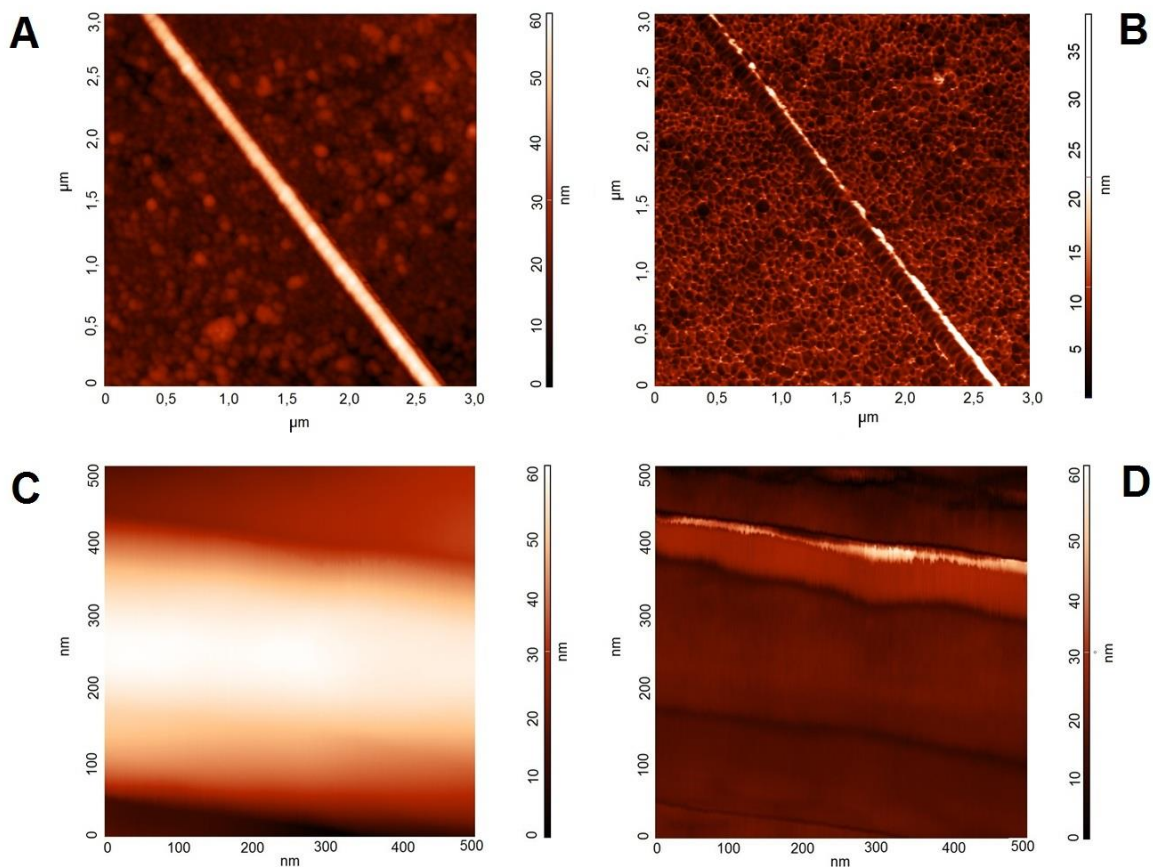
**Rysunek 35.** Krzywe DSC dwuskładnikowych próbek PCL/CHT oraz próbek kontrolnych PCL uformowanych z zastosowaniem różnej biegunowości napięcia w procesie elektroprzędzenia.

Aby przeanalizować wpływ biegunowości napięcia na krystaliczność PCL, wykonano pomiary DSC, których wyniki przedstawia Rysunek 35 oraz 36. Jak się spodziewano, biegunowość napięcia nie wpływa na krystaliczność i temperaturę topnienia próbek kontrolnej PCL. Jednak w przypadku mieszanin PCL/CHT uformowanych z różną

biegunowością napięcia można zaobserwować taki efekt. Jak wiadomo, w zależności od proporcji składników, mieszanina PCL/CHT może ulegać separacji faz [100, 104, 158]. Jednak jak wykazano wcześniej (5.1.3), w cienkich, elektroprzędzonych włóknach z powodów kinetycznych może nie dochodzić do takiej separacji. Jak pokazuje Rysunek 36 wraz ze zwiększeniem zawartości chitozanu we włóknach dochodzi do spadku temperatury topnienia PCL. Efekt jest bardziej wyraźny dla próbek uformowanych z zastosowaniem ujemnego znaku potencjału elektrycznego na dyszy przędzalniczej. Wyniki pomiarów DSC są zgodne z danymi FT-IR i potwierdzają zmianę interakcji molekuł PCL-chitozan w zależności od zastosowanej biegunowości napięcia. Analizując wyniki pomiarów metodą DSC nie zaobserwowano wyraźnego wpływu biegunowości napięcia na krystaliczność PCL. Próbki 5+ oraz 5- nie wykazują statystycznie istotnych różnic w krystaliczności. Z kolei w próbkach 10 oraz 25% w/w chitozanu zaobserwowano statystycznie istotne różnice w krystaliczności PCL. Próbkę 10- charakteryzuje wyższa krystaliczność PCL niż próbkę 10+. W przypadku próbek 25% w/w chitozanu obserwowana jest odwrotna zależność, tj. próbka 25- wykazuje niższą krystaliczność PCL niż próbka 25+.



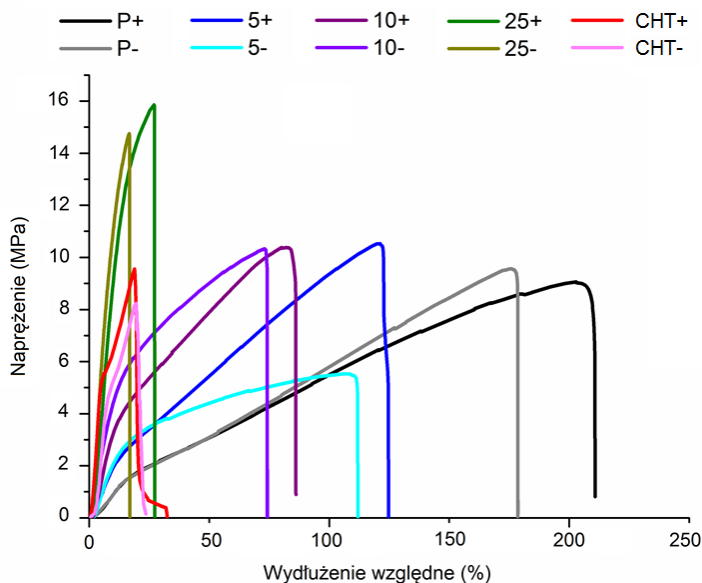
**Rysunek 36.** Temperatura topnienia i zawartość fazy krystalicznej w PCL w analizowanych dwuskładnikowych próbkach PCL/CHT oraz próbkach kontrolnych PCL.



**Rysunek 37.** Obrazy AFM separacji faz (B, D) oraz topografii powierzchni (A, C) wybranych dwuskładnikowych próbek PCL/CHT. 25+ (A, B) oraz 25- (C, D).

Wyniki obrazowania separacji faz i topografii powierzchni metodą AFM potwierdziły brak separacji faz w analizowanych włóknach PCL/CHT, zarówno w tych uformowanych z dodatnim, jak i tych uformowanych z ujemnym znakiem potencjału elektrycznego na dyszy przędzalniczej. Nie zauważono także żadnych różnic w rozwinięciu powierzchni analizowanych włókien (Rysunek 37).

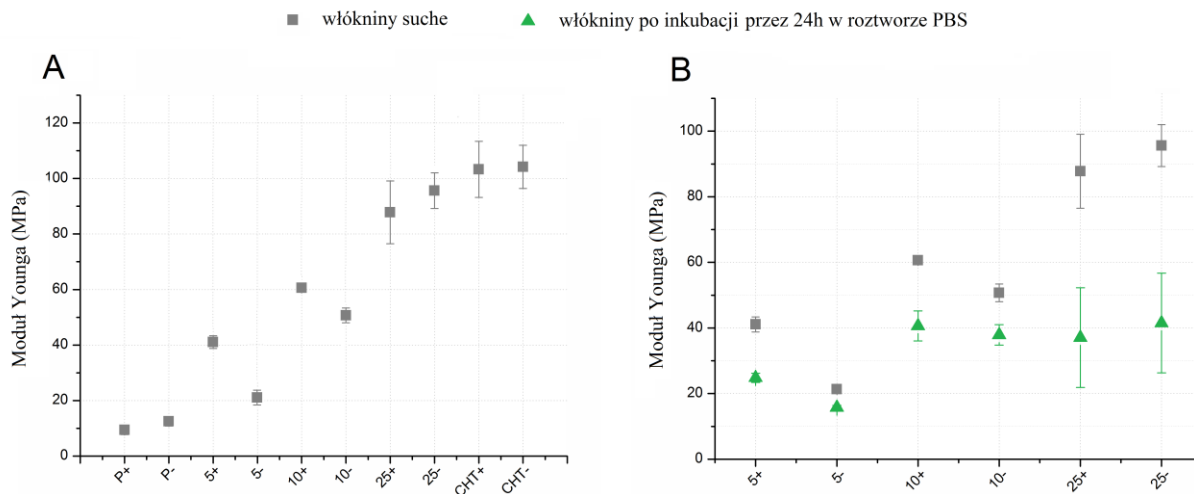
### 4.2.3 Właściwości mechaniczne



**Rysunek 38.** Reprezentatywne krzywe rozciągania dwuskładnikowych próbek PCL/CHT oraz próbek kontrolnych w statycznej próbie rozciągania.

Jak obrazuje Rysunek 38 maksymalne wydłużenie przy zerwaniu analizowanych próbek PCL/CHT zmniejsza się wraz ze wzrostem zawartości chitozanu w mieszaninie. Próbki PCL charakteryzuje wydłużenie względne sięgające 200% początkowej długości próbki, przy czym maksymalne naprężenia zrywające mieszczą się w zakresie 8-10 MPa. Obecność chitozanu we włóknach spowodowała wyraźną redukcję wytrzymałości na rozciąganie. Wydłużenie względne próbek PCL/CHT wynosi kolejno około 120%, 70% i 25% w porównaniu do długości początkowej dla próbek zawierających kolejno 5, 10 i 25% w/w chitozanu. Zaobserwowano, także niewielki wpływ biegunowości napięcia na wytrzymałość na rozciąganie tych próbek. Próbki uformowane w układzie z napięciem o ujemnym znaku potencjału elektrycznego na dyszy, charakteryzowało zazwyczaj nieznacznie niższe wydłużenie przy zerwaniu (Rysunek 38). Może być to związane ze zwiększonymi interakcjami PCL-chitozan we włókninach uformowanych z ujemnym znakiem potencjału elektrycznego na dyszy.



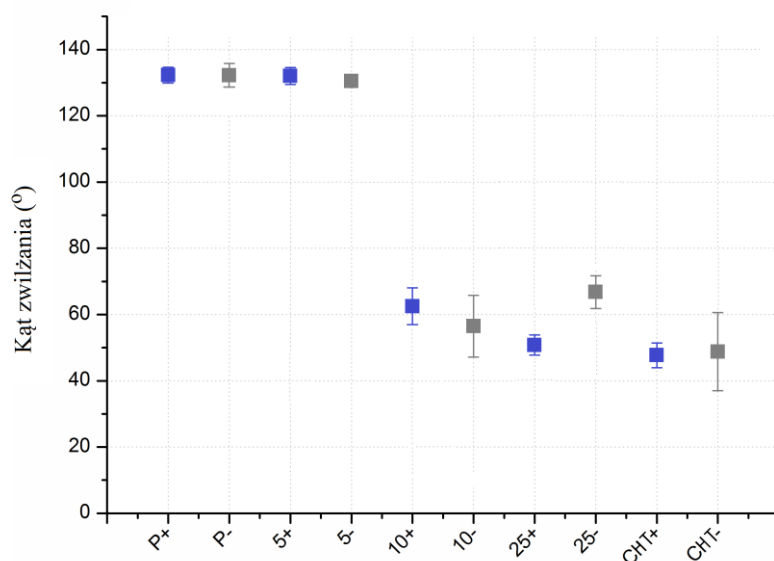


**Rysunek 39.** Moduł Younga dwuskładnikowych włókien PCL/CHT uformowanych z różną biegunowością napięcia. Analizowano próbki suche(A) oraz po inkubacji w roztworze PBS przez 24h w 37°C (B) w porównaniu do próbek suchych.

Z wyników statycznej próby rozciągania wyznaczono moduły Younga dla wszystkich analizowanych próbek. Wykonano także próby dla tych materiałów po inkubacji przez 24h w warunkach podwyższonej temperatury i wilgotności, aby sprawdzić jak zmieniają się właściwości włókien w warunkach zbliżonych do warunków *in vivo* (Rysunek 39). Uzyskane wyniki obrazują wyraźny wzrost modułu Younga wraz ze wzrostem zawartości chitozanu we włóknach, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi w innych pracach badawczych [161]. Jak pokazują wyniki, biegunowość napięcia nie wpływa na moduł Younga włókien PCL. Jednak w przypadku włókien PCL/CHT, już przy najniższym analizowanym stężeniu kationów chitozanu, okazuje się, że jest to czynnik kluczowy dla właściwości wytrzymałościowych włókieniny. Próbki 5- charakteryzował niższy o prawie 10 MPa moduł Younga, w porównaniu do próbek 5+ (Rysunek 39A). Zewnętrzne pole elektryczne o dodatnim znaku potencjału elektrycznego prowadzi do zwiększenia oddziaływania pomiędzy molekułami chitozanu, przez co otrzymane włókna są cieńsze, a ich moduł Younga wyższy. Interpretacja ta jest zgodna z wynikami uzyskanymi dla próbek 25+ oraz 25-, które nie wykazują istotnych różnic w rozkładzie średnic włókien (Rysunek 32) oraz wartości modułu Younga (Rysunek 39).

Ponadto, w wyniku inkubacji próbek w warunkach podwyższonej wilgotności i temperatury obserwowany jest spadek właściwości wytrzymałościowych wszystkich próbek (Rysunek 39B). Najbardziej wyraźny spadek modułu Younga w tych warunkach zaobserwowano dla próbki 25% w/w chitozanu. Ten efekt może wynikać z absorpcji wody przez próbkę.

#### 4.2.4 Właściwości powierzchni



**Rysunek 40.** Kąt zwilżania włókien PCL/CHT uformowanych przy różnym znaku potencjału elektrycznego na dyszy przędzalniczej.

Jak pokazuje Rysunek 40, biegunowość napięcia nie wpływa na zwilżalność większości analizowanych włókien PCL/CHT, tj. 5+/5- oraz 10+/10-. Z kolei, w przypadku próbki 25% w/w chitozanu efekt biegunowości napięcia ma statystycznie istotne znaczenie na zwilżalność materiału. Próbki 25- są bardziej hydrofobowe niż próbki 25+. Ten efekt także można wytłumaczyć większymi oddziaływaniami międzymolekularnymi PCL i chitozanu. Zwiększone interakcje pomiędzy molekułami tych polimerów, prowadzą do maskowania hydrofilowego charakteru chitozanu.

#### 4.2.5 Podsumowanie

Uzyskane wyniki pozwoliły wykazać istotny wpływ biegunowości napięcia na strukturę i właściwości dwuskładnikowych włókien PCL/CHT. Jak ustalono, zastosowanie napięcia o ujemnym znaku potencjału elektrycznego na dyszy przedziałniczej powoduje zwiększenie interakcji pomiędzy molekułami PCL i chitozanu, przypuszczalnie poprzez redukcję ładunku chitozanu oraz oddziaływań odpychających pomiędzy jego molekułami. W konsekwencji, formowane są włókna o średniej grubości większej niż włókna uformowane przy dodatnim znaku ładunku elektrycznego przyłożonego do dyszy. Włókniny uformowane z różną biegunowością napięcia różnią się krystalicznością PCL, właściwościami mechanicznymi oraz zwilżalnością.

### 4.3 Analiza wpływu biegunowości napięcia na efektywność przyłączenia substancji bioaktywnych do powierzchni włókien poli( $\epsilon$ -kaprolakton)/chitozan

Na tym etapie pracy badawczej podjęto próbę modyfikacji powierzchni włókien scharakteryzowanych w podrozdziale 5.2 poprzez fizyczną adsorpcję polianionów siarczanu chondroityny.

#### 4.3.1 Skład chemiczny powierzchni włókien

W celu wykazania zmian w składzie chemicznym powierzchni włókien PCL/CHT w zależności od zastosowanej biegunowości napięcia, zastosowano technikę spektroskopii fotoelektronów w zakresie promieniowania rentgenowskiego (XPS). Analiza XPS nie wykazała różnic pomiędzy próbkami 25+ i 25-. Stężenie atomów azotu, pochodzącego ze struktury chemicznej chitozanu było takie samo dla obu próbek (Tabela 7). W przypadku próbek po adsorpcji CS zaobserwowano niewielką różnicę w stężeniu atomów azotu na powierzchni włókien. Na próbkach 25- stężenie to było nieznacznie wyższe niż na próbkach 25+. Azot jest także pierwiastkiem budującym molekułę siarczanu chondroityny. Wyniki te mogą świadczyć o tym, że biegunowość napięcia mogła nieznacznie wpłynąć na efektywność modyfikacji powierzchni włókien PCL/CHT poprzez fizyczną adsorpcję.

Pomiary stężenia atomów siarki okazały się nieskuteczne, ze względu na zbyt małe stężenie tego pierwiastka na powierzchni włókien, które było poniżej progu detekcji tą metodą.

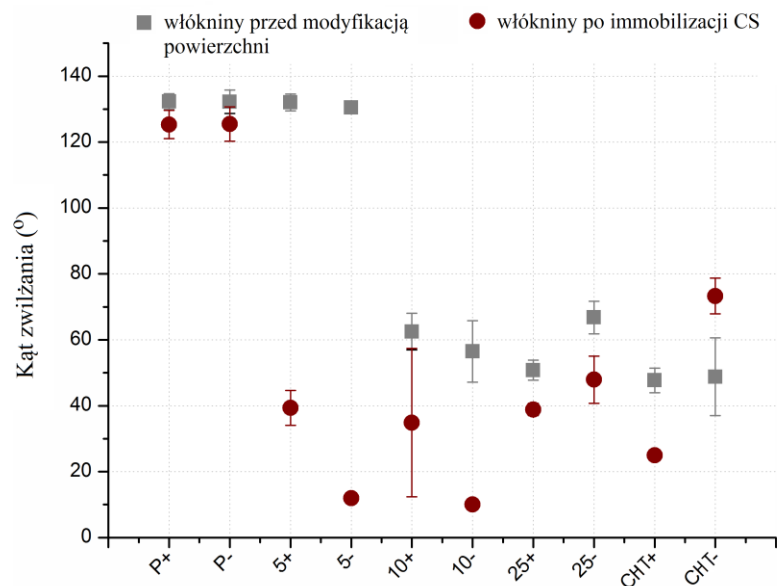
**Tabela 7.** Skład chemiczny próbek 25% w/w chitozanu uformowanych z różną biegunowością napięcia oraz przed i po adsorpcji CS.

Stężenie atomów na powierzchni analizowanych włókien (AT%)				
Próbka	C	O	N	S
25+	74.5±0.4*	23.9±0.3*	1.6±0.2*	-
25-	74.4±0.5*	24.4±0.4*	1.5±0.2*	-
25+ CS	72.3±0.7*	25.0±0.6*	2.1±0.3*	poniżej progu detekcji
25- CS	71.3±0.8*	25.7±0.6*	2.7±0.2*	poniżej progu detekcji

\*odchylenie standardowe

#### 4.3.2 Zwilżalność materiałów

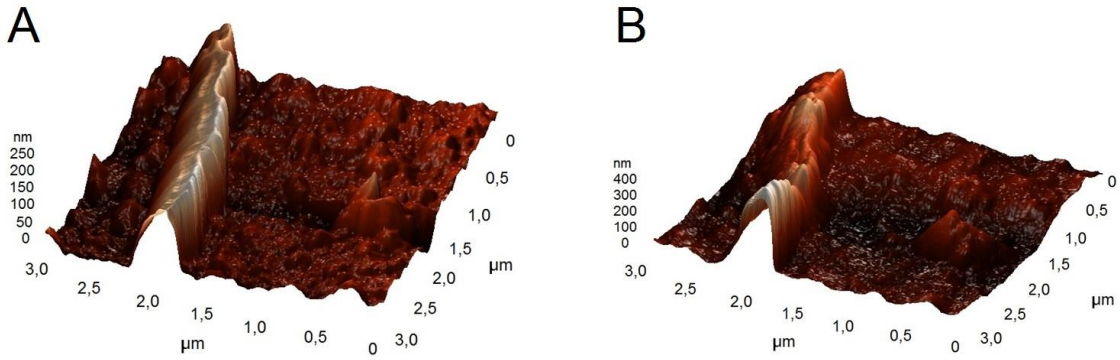
W przypadku próbki kontrolnej PCL, można zauważyć, że nieznaczna ilość siarczanu chondroityny mogła zostać zaadsorbowana na powierzchni włókien, jednak nie wpłynęło to istotnie na zwilżalność tych włókien. Jak pokazują wyniki, efektywna adsorpcja CS jest związana z obecnością chitozanu w analizowanych włóknach. Ponadto, próbki 5- oraz 10-, charakteryzuje wyraźnie większa zwilżalność, niż próbki 5+ oraz 10+ po adsorpcji CS. Po adsorpcji CS najwyraźniej zmieniła się zwilżalność próbek 5% w/w chitozanu, z próbki bardzo hydrofobowej (CA~130°C) do materiału zupełnie zwilżalnego (5+ CA~40° lub 5- CA~15°). W przypadku pozostałych próbek efekt ten także występuje, jednak nie jest już tak wyraźny (Rysunek 41). Prawdopodobnie na skutek zwiększonych interakcji molekuł PCL-CHT, chitozan jest bardziej równomiernie rozmieszczony w dwuskładnikowych włóknach, przez co przed adsorpcją CS jego efekt hydrofilowy jest niewidoczny. Jednak w przypadku włókien 25+ oraz 25-, efekt ten nie jest tak wyraźny, ponieważ ładunek chitozanu nie jest efektywnie kompensowany przez ładunki elektryczne z dyszy przędzalniczej (podrozdział 5.2.1). Niewielkie różnice w zwilżalności próbek 25+ oraz 25- są zgodne z wynikami pomiarów XPS uzyskanych dla tych próbek (podrozdział 5.3.1).



**Rysunek 41.** Kąt zwilżania dwuskładnikowych włókien PCL/CHT i próbek kontrolnych (P+/P-, CHT+/CHT-) po immobilizacji CS na powierzchni włókien w porównaniu do kąta zwilżania przed modyfikacją powierzchni.

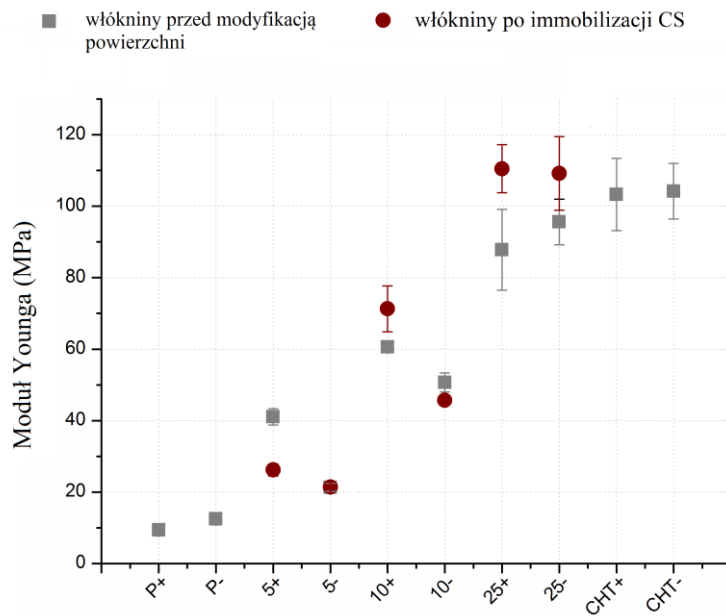
#### 4.3.3 Topografia powierzchni włókien

W związku z tym, iż nie stwierdzono wpływu biegunowości napięcia na topografię powierzchni włókien PCL/CHT (podrozdział 5.2.2), przeprowadzono dodatkowo analizę zmiany ich topografii po adsorpcji CS. Efektywną adsorpcję siarczanu chondroityny do powierzchni włókien zawierających 25% w/w chitozanu potwierdziła analiza topografii powierzchni tych włókien metodą AFM (Rysunek 42). Obrazy uzyskane metodą AFM pokazują, że próbkę przed adsorpcją CS charakteryzuje jednorodna powierzchnia o niewielkim zróżnicowaniu (Rysunek 42A). Po adsorpcji CS powierzchnia jest wyraźnie bardziej rozwinięta (Rysunek 42B). Taki sam efekt obserwowano w przypadku pozostałych próbek.



**Rysunek 42.** Obrazy AFM topografii powierzchni włókna zawierającego 25% w/w chitozanu uformowanego w układzie z dyszą podłączoną do napięcia o ujemnym znaku potencjału elektrycznego przed (A) i po osadzeniu CS na powierzchni włókien (B).

#### 4.3.4 Właściwości mechaniczne



**Rysunek 43.** Moduł Younga dwuskładnikowych włóknin PCL/CHT oraz próbek kontrolnych uformowanych przy różnej biegunowości napięcia przed i po adsorpcji siarczanu chondroityny (CS).

Jak widać na Rysunek 43, po adsorpcji siarczany chondroityny (CS) próbki 10% oraz 25% w/w chitozanu wykazują podobne wartości modułu Younga jak przed osadzeniem CS. Jedynie próbka 5+ wykazała wyraźny spadek modułu Younga w stosunku do tej wartości przed adsorpcją CA. Zmiany w wartości tego parametru mogą być wynikiem absorpcji wody. Nie zaobserwowano korelacji modułu Younga włókien po adsorpcji CS w zależności od zastosowanej biegunowości napięcia.

#### **4.3.5 Podsumowanie**

Jak pozwoliły ustalić pomiary metodą XPS, wpływ biegunowości napięcia na efektywność adsorpcji CS jest nieznaczny. Jednak już niewielkie ilości adsorbowanego siarczany chondroityny powodują wyraźny wzrost hydrofilowości analizowanych powierzchni. Naturalnie, jak wykazało obrazowanie metodą AFM, topografia powierzchni włókien zmienia się po zaadsorbowaniu CS. Ponadto nieznacznie zmieniają się właściwości wytrzymałościowe włókien. Nie ustalono jednak wyraźnej korelacji tego parametru po adsorpcji CS z zastosowaną biegunowością napięcia.

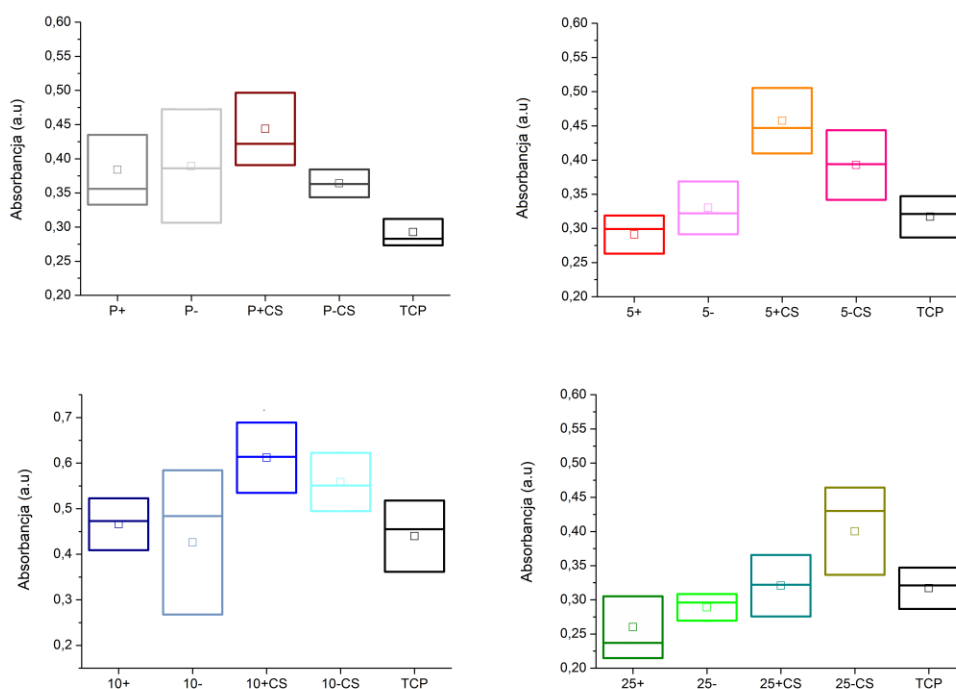
### **4.4 Analiza odpowiedzi komórkowej w warunkach *in vitro* na wybrane właściwości włókien poli( $\epsilon$ -kaprolakton)/chitozanu formowanych z zastosowaniem różnej biegunowości napięcia**

W celu weryfikacji cytotoksyczności dwuskładnikowych włókien uformowanych z różną biegunowością napięcia na wybrane linie komórkowe wykonano badania *in vitro*. Przeprowadzono badania cytotoksyczności i proliferacji komórek linii L929, oraz poddano analizie ich morfologię poprzez obrazowanie metodą SEM oraz metodą mikroskopii fluorescencyjnej.

#### **4.4.1 Analiza cytotoksyczności włókien**

Aby określić cytotoksyczność uformowanych materiałów PCL/CHT zastosowano test MTT. Jest to pośrednia metoda oceny stopnia cytotoksyczności materiałów poprzez ocenę

aktywności komórkowych enzymów metabolicznych. Test MTT pozwala określić aktywność enzymu mitochondrialnego jakim jest dehydrogenaza bursztynianowa. Mitochondrialna dehydrogenaza przekształca żółtą sól tetrazolową (bromek 3-(4,5-dimetylo-triazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazolu) do fioletowego formazanu. Formazan nie rozpuszcza się w wodzie, dlatego aby wypłukać go z komórek należy użyć rozpuszczalnika organicznego. Należy pamiętać, że tylko żywe komórki przekształcają sól tetrazolową do formazanu.

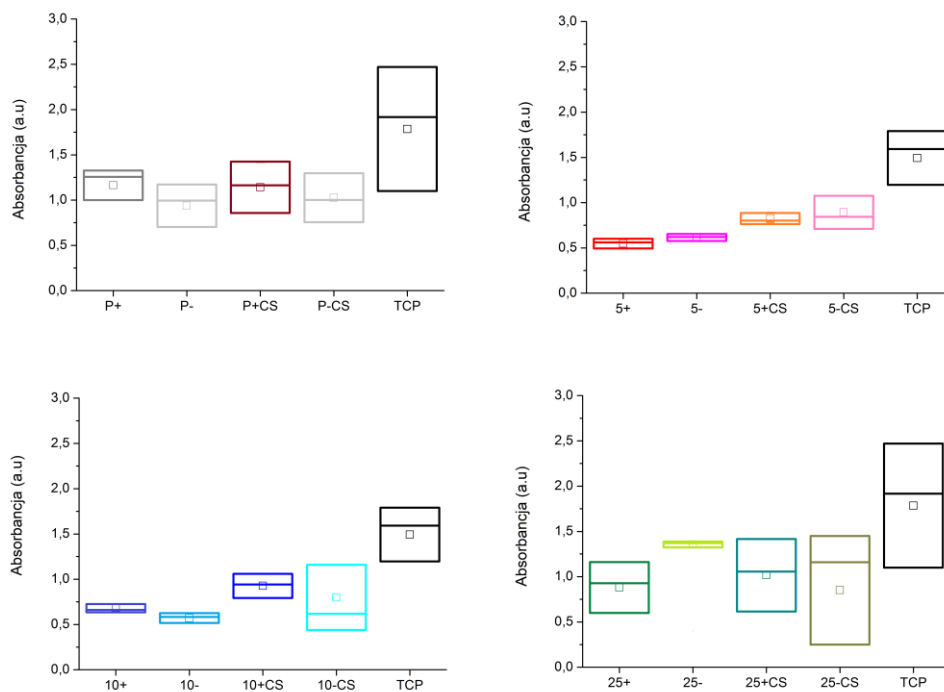


**Rysunek 44.** Wyniki testu MTT wykonanego na komórkach L929 po 1 dniu hodowli.

Jak pokazują wyniki testu MTT wykonane na włókninach PCL/CHT i próbkach kontrolnych (Rysunek 44) wszystkie analizowane włókniny są materiałami nietoksycznymi. Za poziom cytotoxycznosci przyjmuje się poziom 70% przeżywalności komórek w stosunku do próbki kontrolnej. Uzyskane wyniki pokazują, że po 24 godzinach hodowli, materiały nie wykazały efektu cytotoxycznego, przeżywalność fibroblastów była na poziomie kontroli lub wyraźnie wyższa. Po 1 dniu hodowli nie zaobserwowano wpływu biegunowości napięcia na cytotoxycznosc materiałów (Rysunek 44). W przypadku próbki kontrolnej jaką był PCL, nie zauważono statystycznie istotnego efektu zarówno po zmianie biegunowości jak i po adsorpcji siarczanu chondroityny. W przypadku próbek 5% w/w chitozanu widać, że



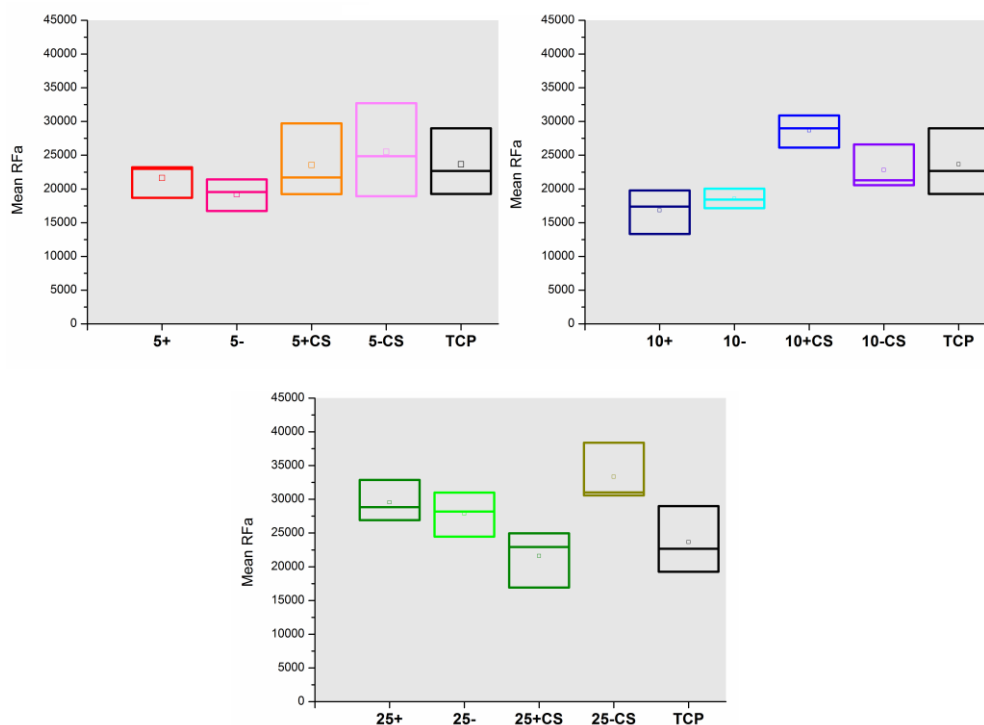
zastosowanie różnej biegunowości napięcia nie wpływa bezpośrednio na odpowiedź komórkową. Przedstawione wyniki są zgodne z pomiarem zwilżalności włókien (Rysunek 41). Włókniny przed adsorpcją CS (5+, 5-) nie wykazują różnic w hydrofilowości, co jest zgodne z brakiem różnic pomiędzy wynikami testu MTT dla tych próbek. Próbki po adsorpcji mają wyraźnie różną zwilżalność (Rysunek 40), jednak jest ona już na tyle wysoka w obu wypadkach, że nie obserwujemy się różnicy w przeżywalności komórek na tych materiałach. Opisana zależność, występuje także w próbkach zawierających 10% w/w chitozanu, tylko w nieco mniejszym zakresie, ze względu na początkowe, mniejsze różnice w zwilżalności materiałów. Uzyskane wyniki, pośrednio dowodzą, że biegunowość napięcia może wpłynąć na odpowiedź komórkową w ciągu 24 h hodowli, poprzez wpływ na adsorpcję siarczanu chondroityny.



**Rysunek 45.** Wyniki testu MTT na linii mysich fibroblastów L929 po 3 dniach hodowli komórkowej.

Aby ocenić efekt biegunowości napięcia na odpowiedź komórkową w przy dłuższych czasach hodowli, wykonano analizę aktywności mitochondrialnej po 3 dniach. Po tym czasie widać, że we wszystkich materiałach następuje spowolnienie namnażania się komórek

w stosunku do kontroli. W przypadku próbek kontrolnych PCL nie obserwuje się różnic w odpowiedzi komórkowej pomiędzy próbkami P+ oraz P-. Próbki 5% w/w chitozanu, podobnie jak po 1 dniu hodowli nie wykazały różnic zależnych od zastosowanej biegunowości napięcia. Adsorpcja siarczanu chondroityny wyraźnie zwiększyła żywotność komórek, w porównaniu do materiałów kontrolnych, przy czym nie obserwuje się już większej różnicy pomiędzy próbkami 5+CS a 5-CS (Rysunek 45). Po 3 dniach hodowli, jedynie na próbkach 25% w/w chitozanu można zaobserwować efekt biegunowości napięcia na aktywność mitochondrialną komórek L929. Próbki 25% w/w chitozanu wykazują statystycznie istotną różnicę w żywotności komórek. W tym przypadku po 3 dniach hodowli żywotność komórek L929 na próbkach 25- była wyższa niż na próbkach 25+.



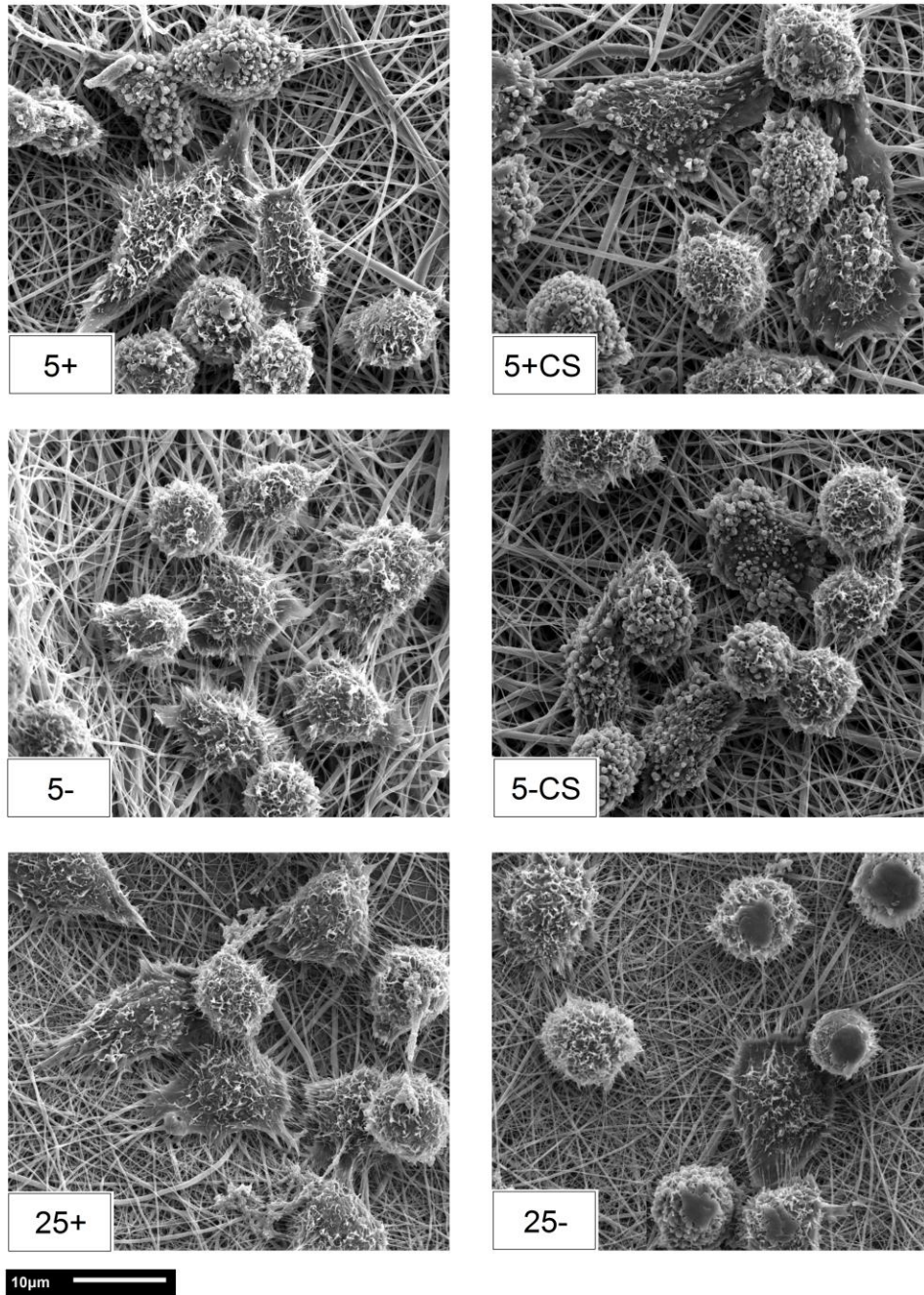
**Rysunek 46.** Wyniki testu proliferacji komórek po 1 dniu hodowli na wybranych materiałach.

Aby ustalić wpływ biegunowości napięcia na proliferację komórek wykonano test CyQuant. W tej metodzie barwniki łączą się bezpośrednio z DNA komórek, dzięki czemu można bezpośrednio wnioskować o ilości komórek na próbce. Jest to metoda komplementarna w stosunku do testu MTT. Wyniki testu na proliferację komórek (Rysunek

46) po 1 dniu hodowli są zbliżone do wyników uzyskanych za pomocą testu MTT (Rysunek 44). Pomiędzy próbkami wykonanymi z zastosowaniem różnej biegunowości napięcia nie zauważono żadnych statystycznie istotnych różnic. Najwyraźniejszy przyrost proliferacji fibroblastów zaobserwowano w przypadku próbki 10 % w/w chitozanu po adsorpcji siarczanu chondroityny.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że zmiany w strukturze i właściwościach dwuskładnikowych włókien PCL/CHT wywołane zastosowaniem różnej biegunowości napięcia nie wpływają bezpośrednio na odpowiedź komórkową.

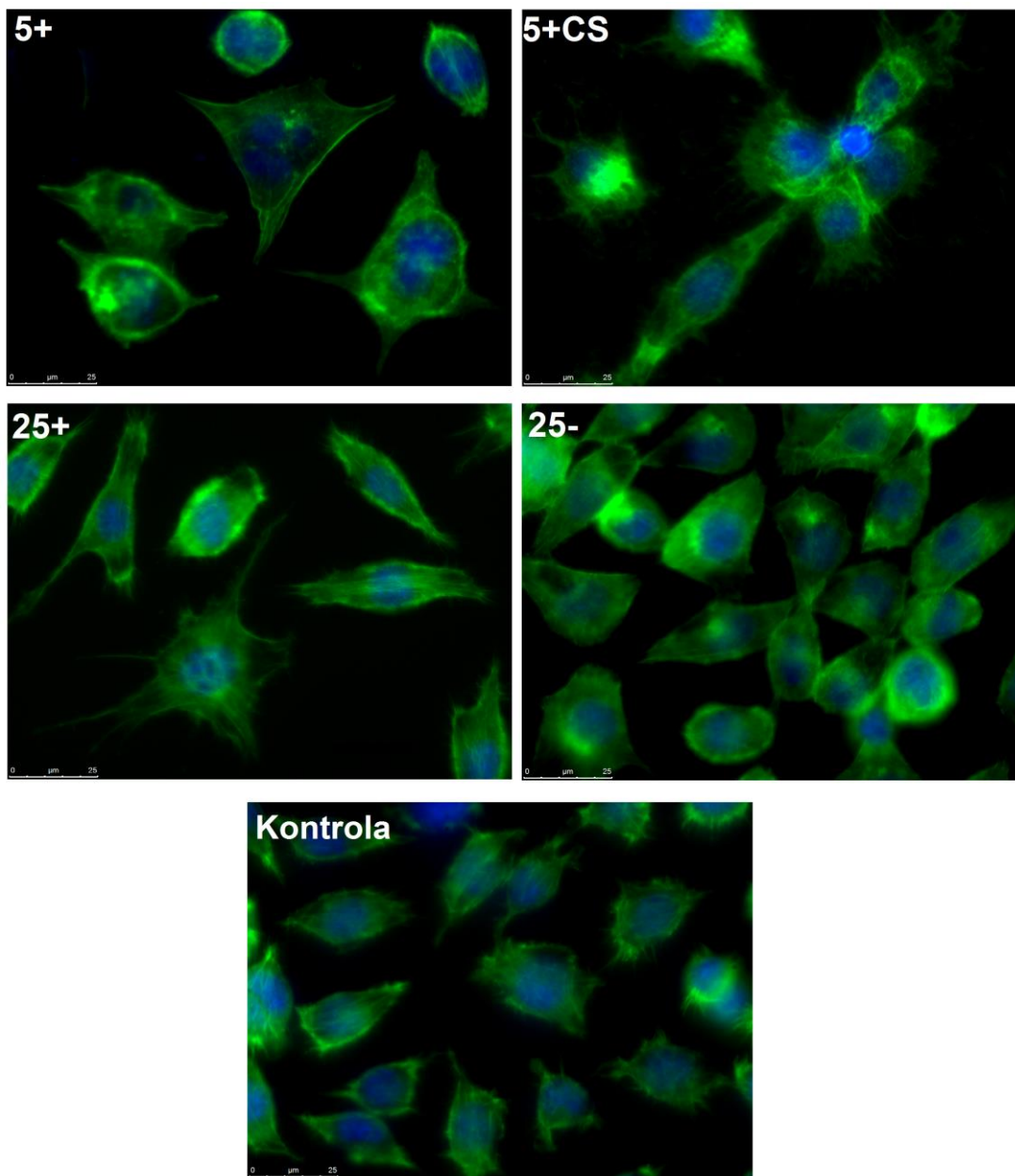
#### 4.4.2 Analiza morfologii komórek



**Rysunek 47.** Obrazy SEM komórek L929 hodowanych w warunkach *in vitro* przez 3 dni.

Zastosowanie metody SEM pozwoliło na analizę morfologii fibroblastów na badanych materiałach PCL/CHT. Wyniki prezentowane na Rysunek 47 są reprezentatywne dla wszystkich analizowanych próbek. Jak obrazuje Rysunek 47 na wszystkich materiałach

obecne są komórki, które mają kształt kulisty jak i takie, które są dobrze rozplaszczone i nieregularne w swoim kształcie. Obecność komórek o morfologii kulistej świadczy o aktywnym dzieleniu się komórek. Z kolei komórki dobrze rozplaszczone to komórki dojrzałe. Na wszystkich zdjęciach można zauważyć cienkie wypustki cytoplazmatyczne z ciała komórki, nazywane filopodiami. Filopodia umożliwiają komórkom rozpoznawanie podłoża, migrację oraz interakcje komórka-komórka. Obecność tych struktur świadczy o prawidłowym rozwoju komórek oraz potencjale w kierunku dalszego zasiedlania włókniny. Na zdjęciach wyraźnie widać, że komórki nie tylko osiadają na powierzchni materiału, ale także starają się penetrować włókninę.



**Rysunek 48.** Obrazy uzyskane metodą mikroskopii fluorescencyjnej wybranych próbek PCL/CHT zasiedlonych komórkami L929 po 3 dniach hodowli.

Analiza wykonana metodą mikroskopii fluorescencyjnej pozwoliła na zobrazowanie cytoszkieletu aktynowego (zielony) oraz jąder komórkowych (niebieski) (Rysunek 48). Jak pokazuje obraz próbki kontrolnej, fibroblasty osiągają prawidłowy, rozplaszczony kształt. Wybarwione na zielono elementy szkieletu aktynowego są równomiernie rozmieszczone w komórce. Ponadto w każdej z nich widać wyraźnie wybarwione na niebiesko jądro

komórkowe. Komórki hodowane na włókninach PCL/CHT mają podobną morfologię. Wyraźnie widać, że obecne są jeszcze skupiska komórek okrągłych, ulegających dalszemu podziałowi. Kształt niektórych komórek jest już wyraźnie wrzecionowaty, charakterystyczny dla dojrzałych fibroblastów. Przedstawione zdjęcia nie ujawniają wyraźnych różnic pomiędzy próbkami. Komórki przyjmują podobną morfologię zarówno na materiałach uformowanych z różną biegunowością napięcia (Rysunek 48: 25+ oraz 25-) jak i na materiałach po adsorpcji CS (próbki 5+ oraz 5+CS).

#### **4.4.3 Podsumowanie**

Jak pokazują wyniki przeprowadzonych badań *in vitro*, wszystkie uformowane materiały są biozgodne i nie wywołują efektu cytotoksycznego. Zastosowane techniki badawcze (tj. test MTT, CyQuant, barwienia fluorescencyjne oraz obrazowanie SEM) nie wykazały istotnych statystycznie różnic w aktywności mitochondrialnej komórek, żywotności oraz ich w morfologii zależności od biegunowości napięcia jakie zastosowano do uformowania włóknin PCL/CHT. Nieznaczne różnice w odpowiedzi komórkowej pomiędzy próbkami były możliwe do zaobserwowania po osadzeniu siarczanu chondroityny, ale tylko na próbkach zawierających najwięcej chitozanu (tj. próbkach 25% w/w chitozanu).



## 5 WNIOSKI KOŃCOWE

W wyniku przeprowadzonych prac badawczych przeanalizowano wpływ biegunowości napięcia na strukturę i właściwości włókien PCL/CHT. Ponadto, podjęto próby wykazania wpływu biegunowości napięcia na efektywność post-procesowej modyfikacji powierzchni włókien poprzez fizyczną adsorpcję siarczanu chondroityny. Dodatkowo, w pierwszym etapie prac wykonano analizy mające na celu dobór odpowiedniego rozpuszczalnika z punktu widzenia głównych celów pracy doktorskiej. Wykonane badania pozwoliły potwierdzić tezy postawione w niniejszej pracy doktorskiej. Ustalono, że:

- wybór odpowiedniego rozpuszczalnika dla roztworów zawierających polielektrolity przeznaczonych do elektroprzędzenia jest bardzo istotny, ponieważ polielektrolit może tworzyć związki z jonami rozpuszczalnika, co w konsekwencji wpływa na proces elektroprzędzenia i właściwości włókien;
- w mieszaninie kwasów (AA/FA) mogą powstawać sole amoniowe chitozanu, których obecność prowadzi do redukcji modułu Younga i zwilżalności włókien;
- włókniny uformowane z HFIP charakteryzują się wyraźnie mniejszą średnicą włókien i wyższą hydrofilowością,
- większość ujawnionych różnic pomiędzy włókninami PCL/CHT uformowanymi z różnych rozpuszczalników wynika z różnic w konformacji molekuł jakie przyjmują w danym rozpuszczalniku;
- zastosowanie napięcia o ujemnym znaku potencjału elektrycznego na dyszy przędzalniczej powoduje zwiększenie interakcji pomiędzy PCL i chitozanem poprzez neutralizację dodatniego ładunku chitozanu, co w konsekwencji zmniejsza siły odpychające pomiędzy jego molekułami;
- zastosowanie ujemnego znaku potencjału elektrycznego na dyszy przędzalniczej powoduje otrzymanie włókien o średniej grubości większej niż włókna uformowane z dodatnim znakiem ładunku elektrycznego przyłożonego do dyszy, co jest konsekwencją neutralizacji dodatniego ładunku chitozanu;
- włókniny PCL/CHT uformowane z różną biegunowością napięcia różnią się strukturą krystaliczną, właściwościami mechanicznymi oraz zwilżalnością;



- efekt biegunowości napięcia na strukturę i właściwości włókien PCL/CHT jest zależny od zawartości chitozanu w mieszaninie;
- wykonane materiały PCL/CHT nie są cytotoksyczne, a zmiany we właściwościach włókien, indukowane zmianą biegunowości napięcia nie wpływają w większym stopniu na odpowiedź komórkową w analizowanym zakresie czasowym,
- wykonane badania pozwoliły nie tylko na obserwacje, ale i próbę interpretacji wpływu biegunowości napięcia na strukturę i właściwości dwuskładnikowych włókien zawierających polielektrolity, co otwiera drogę do wykorzystania tego parametru w projektowaniu ich właściwości.

## 6 PERSPEKTYWY

Elektroprzędzenie jest techniką formowania włókien, która obecnie jest na tyle rozwinięta, że pozwala na formowanie materiałów do różnych zastosowań na skalę masową. Nie mniej jednak, aby stworzyć materiał do zastosowań medycznych, filtracji wody czy gromadzenia energii niezbędne jest uzyskanie materiałów, których właściwości będą powtarzalne. W przypadku elektroprzędzenia, na ostateczne właściwości materiału wpływa znaczna liczba parametrów, które wzajemnie od siebie zależą. Aby świadomie nimi sterować, bardzo ważne jest dokładne poznanie tych zależności. Ważnym parametrem w kontekście formowania włókien zawierających polielektrolity jest biegunowość napięcia. Oddziaływania odpychające pomiędzy ładunkami elektrycznymi w strudze polimeru i pomiędzy nimi a ładunkami na dyszy przędzalniczej, mogą prowadzić do separacji faz lub różnych interakcji międzymolekularnych, na skutek czego włókniny wykazują różne właściwości. Zastosowanie odpowiedniej biegunowości napięcia jako czynnika wpływającego na właściwości powierzchniowe włókien może mieć duże znaczenie np. w wydajności modyfikacji powierzchni materiałów do zastosowania jako nośniki substancji aktywnych. Wpływanie na ekspozycję odpowiednich grup funkcyjnych na powierzchni wieloskładnikowych włókien, może zwiększyć efektywność przyłączenia substancji stymulujących wzrost i aktywność komórek. Oczywiście, dostępnych jest wiele metod immobilizacji substancji biologicznie aktywnych do powierzchni włókien, jednak każde z nich mają swoje wady. Wybór substancji jaka ma być osadzona na wybranym materiale ogranicza zazwyczaj metody jakimi można się posłużyć. Wybór konkretnych rozpuszczalników i warunków procesu (jak np. pH, temperatura) mogą istotnie wpłynąć na działanie takich substancji jak np. białka enzymatyczne. Ponadto, nawet jeśli warunki procesu nie wpłyną na aktywność tych substancji, to może dojść do wyraźnego ograniczenia ich działania na skutek zablokowania grup aktywnych w wiązaniach kowalencyjnych ze związkami tworzącymi powierzchnię materiału. Dlatego też, w niektórych przypadkach uzasadnione jest wykorzystanie fizycznej adsorpcji czy oddziaływań jonowych do osadzenia wybranych substancji na materiale. Mimo, że metoda nie zapewnia trwałego wiązania, to umożliwia w miejscu implantacji szybkie uwolnienie substancji aktywnych i nie doprowadza do obniżenia skuteczności tych substancji. W tym kontekście biegunowość napięcia w procesie elektroprzędzenia może być kluczowa dla właściwości włókien zawierających

polielektrolity. Elektroprzędzone włókniny, których właściwości można projektować poprzez zastosowanie odpowiednich parametrów procesu, takich jak biegunowości napięcia, są bardzo dobrym materiałem na opatrunki medyczne czy filtry wody. Cechy włóknin takie jak np. wysoki stosunek powierzchni do masy próbki jest dodatkowym atutem dla immobilizacji substancji aktywnych. Ponadto efekt oddziaływań elektrostatycznych w czasie elektroprzędzenia można wykorzystać także to redukcji bądź zwiększenia efektu hydrofobowości powierzchni czy projektowania właściwości wytrzymałościowych materiałów. Dziś ma to szczególne znaczenie, ponieważ transfer produktów uformowanych metodą elektroprzędzenia ze skali laboratoryjnej do przemysłowej, nie jest fikcją, a rzeczywistością. Coraz więcej firm oferuje produkty wykonane tą techniką do tworzenia produktów medycznych. Jednak niezrozumienie zjawisk zachodzących w tym procesie może znacząco wpłynąć na jakość i powtarzalność materiałów, a na pewno na świadome projektowanie ich właściwości. Ponadto, umiejętność wpływania na właściwości materiałów poprzez zastosowanie odpowiedniej biegunowości napięcia, może mieć znaczenie ekonomiczne dla jednostek zajmujących się komercyjnym tworzeniem włóknin. Ostatecznie może przełożyć się to także na obniżenie kosztów i większą powszechną dostępność np. opatrunków z enzymami bakteriobójczymi czy filtrów wody.

## 7 Spis skrótów

**PCL** - poli( $\epsilon$ -kaprolakton)

**CHT** - chitozan

**HFIP** - 1,1,1,3,3,3-heksafluoro-2-propanol

**AA** - kwas octowy (ang. *acetic acid*)

**FA** - kwas mrówkowy (ang. *formic acid*)

**CS** - siarczan chondroityny

**SEM** - skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. *Scanning Electron Microscopy*)

**XPS** - spektroskopia fotoelektronów w zakresie promieniowania X (ang. *X-ray photoelectron spectroscopy*)

**AFM** - mikroskopia sił atomowych (ang. *Atomic Force Microscopy*)

**AFM-IR** - mikroskopia sił atomowych z zintegrowanym systemem spektroskopii w podczerwieni

**FT-IR** - spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fourier'a (ang. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

**TEM** - transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. *Transmission Electron Microscopy*)

**DSC** - skaningowa kalorymetria różnicowa (ang. *Differential Scanning Calorimetry*)

**DLS** - metoda dynamicznego rozpraszania światła (ang. *Dynamic Light Scattering*)

**DS** - stopień zastąpienia (ang. *degree of substitution*)

**DDA** – stopień deacetylacji

w/w – proporcje w ujęciu wagowym

$\gamma_1$  - napięcie powierzchniowe

$\gamma_1^p$  - składowa polarna

$\gamma_1^d$  – składowa dyspersyjna

**pKa** – miara mocy kwasu

**c\*** - stężenie krytyczne splątania molekuł (ang. *overlap concentration*)

$\eta$  - lepkość graniczna

**R** - średnia odległość pomiędzy końcami łańcuchów polimerów

**C<sub>e</sub>** - stężenie krytyczne splątania molekuł w roztworach częściowo rozcieńczonych

**M** - masa cząsteczkowa

**K** – parametr zmieniający się w zależności od rozpuszczalnika, polimeru i temperatury układu (równanie Marka-Houwinka-Sakurady)

$\alpha$  - parametr zmieniający się w zależności od rozpuszczalnika, polimeru i temperatury układu (równanie Marka-Houwinka-Sakurady)

**l<sub>B</sub>** – odległość Bjerrum

$\epsilon$  - stała dielektryczna

**k<sub>B</sub>** - stała Boltzmana

**T** – temperatura absolutna

**e** - ładunek elektryczny

**T<sub>m</sub>** - temperatura topnienia fazy krystalicznej

**T<sub>g</sub>** - temperatura zeszklenia  
**ΔH<sub>f</sub>** - ciepło topnienia fazy krystalicznej  
**x<sub>c</sub>** - zawartość fazy krystalicznej  
**ΔH<sub>f</sub><sup>0</sup>** - to ciepło topnienia fazy krystalicznej PCL o  $x_c = 100\%$   
**σ<sub>B</sub>** - naprężenie  
**ε<sub>B</sub>** - odkształcenie  
**γ** - szybkość ścinania  
**Q** - przepływ objętościowy  
**r** - wewnętrzny promień igły  
**RAF** - faza pośrednia pomiędzy fazą krystaliczną a fazą amorficzną tzw. *rigid amorphous*  
**PGA** - poli(glikolid)  
**PA6** - poliamid-6 (nylon 6)  
**PLLA** - poli(L-laktyd)  
**PLGA** - poli(laktyd-co-glikolid)  
**PET** - poli(tetraftalan) etylenu  
**GAG** - glikozaminoglikany  
**GlcNAc** - N-acetyloglukozamina  
**Col.** - kolagen  
**GOX** - oksydaza glukozy  
**LbL** - metoda osadzania warstwa po warstwie (ang. *layer-by layer assembly*)  
**L929** - linia komórkowa mysich fibroblastów  
**MG63** - linia komórkowa osteoblastów  
**MTT** - test kolorymetryczny do określenia aktywności metabolicznej komórek  
**CyQuant** - test kolorymetryczny do określenia żywotności komórek  
**iPSC** - indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste  
**α-MEM** - medium hodowlane  
**DMEM** - medium hodowlane ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
**FBS** - surowica bydlęca  
**TCP** - ang. *tissue culture plastic*  
**ECM** - macierz zewnątrzkomórkowa (ang. *extracellular matrix*)  
**PFA** - paraformaldehyd  
**HDMS** - heksametylodisilazan  
**C** - średnia liczba żywych komórek w grupie kontrolnej  
**E** - średnia liczba żywych komórek w próbkach z materiałami PCL/CHT

## 8 Spis tabel

<b>Tabela 1.</b> Udział procentowy atomów tlenu O(1s) oraz azotu N(1s) na powierzchni włókien PA6 uformowanych z zastosowaniem ujemnego i dodatniego potencjału znaku elektrycznego na dyszy przędzalniczej. Wyniki uzyskane metodą XPS przy kącie padania wiązki 0° i 75° do płaszczyzny zebranych włókien [59]. .....	29
<b>Tabela 2.</b> Ważniejsze grupy polimerów stosowanych w inżynierii tkankowej [110]. .....	49
<b>Tabela 3.</b> Wybrane właściwości pol( $\epsilon$ -kapolaktonu) [110, 111]. .....	51
<b>Tabela 4.</b> Oznaczenia i parametry procesu formowania włókien poli( $\epsilon$ -kapolakton)/chitozan na etapie optymalizacji warunków formowania .....	70
<b>Tabela 5.</b> Oznaczenia i parametry procesu formowania włókien poli( $\epsilon$ -kapolakton)/chitozan na etapie analizy wpływu biegunowości napięcia .....	71
<b>Tabela 6.</b> Wyniki testu na bakteriobójczość wybranych włókien PCL/CHT w kontakcie bezpośrednim z bakterią <i>E.coli</i> . Wyniki średniej liczby kolonii bakterii oraz procent inhibicji wzrostu bakterii .....	92
<b>Tabela 7.</b> Skład chemiczny próbek 25% w/w chitozanu uformowanych z różną biegunowością napięcia oraz przed i po adsorpcji CS .....	108

## 9 Spis rysunków

<b>Rysunek 1.</b> Schemat układu do formowania włókien metodą elektroprzędzenia [na podstawie ].....	16
<b>Rysunek 2.</b> Schemat ilustrujący etapy tworzenia się strugi roztworu w czasie procesu elektroprzędzenia [na podstawie ].....	17
<b>Rysunek 3.</b> Schemat przykładowego toru ruchu strugi polimeru pod wpływem zewnętrznego pola elektrycznego [1].....	18
<b>Rysunek 4.</b> Schemat ilustrujący trzy układy roztworów polimerów: a) rozcieńczony (ang. <i>dilute</i> ); b) częściowo rozcieńczony z brakiem splątania molekuł (ang. <i>semidilute unentangeled</i> ), c) częściowo rozcieńczony ze splątaniem molekuł (ang. <i>semidilute entangeled</i> ) [].....	21
<b>Rysunek 5.</b> Obrazy SEM ilustrujące powierzchnię włókien polistyrenowych o masie cząsteczkowej 190 000g/ mol, uformowanych z tetrachdrofuranu (THF) w różnych warunkach wilgotności otoczenia: a) 25 % ; b) 31-38 % ; c) 40-45% ; d) 50-59% ; e) 60-72% [47].....	23
<b>Rysunek 6.</b> Schemat ilustrujący mechanizmy transportu ładunków elektrycznych w czasie elektroprzędzenia [53]. .....	26
<b>Rysunek 7.</b> Schemat ilustrujący transport jonów w strudze roztworu w zależności od zastosowanego układu: A) elektroda zanurzona w roztworze; B) wysokie napięcie przyłożone do dyszy przędzalniczej o dodatnim znaku ładunku elektrycznego; C) elektroda płytkowa [53]. .....	27
<b>Rysunek 8.</b> Obrazy uzyskane techniką transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) ilustrujące rozkład składników włókien: a) próbka kontrolna (mieszanina polimerów F127/PEO; b) próbka zawierająca sole metali - F127/ PEO/MS [57]. .....	28
<b>Rysunek 9.</b> Schemat ilustrujący typowe konformacje molekuł polielektrolitu o stopniu polimeryzacji $N=304$ oraz o stopniu obciążenia ładunkiem elektrycznym $f= 1/3$ . Obciążone ujemnym znakiem potencjału elektrycznego molekule polielektrolitu są oznaczone kolorem niebieskim, molekule neutralne są oznaczone kolorem szarym, a obciążone dodatnim ładunkiem elektrycznym kontr jony są oznaczone na czerwono []. .....	33
<b>Rysunek 10.</b> Schemat struktury chemicznej chitozanu.....	35

<b>Rysunek 11.</b> Zdjęcie przedstawiające koniec dyszy przedziałniczej w czasie elektroprzędzenia: a) wielostrumieniowe przędzenie roztworu chitozanu przy napięciu +14kV; b) utworzony stożek Taylora i jednostrumieniowe przędzenie roztworu chitozanu przy napięciu -14kV [94].	38
<b>Rysunek 12.</b> Wpływ przyłożonego napięcia elektrycznego na agregowanie molekuł chitozanu w roztworze. a) układ eksperymentalny z elektrodą Pt zanurzoną w roztworze; b) c) rozkład wielkości cząstek przed przyłożeniem napięcia; d) rozkład wielkości cząstek po przyłożeniu napięcia +16kV; e) rozkład wielkości cząstek po przyłożeniu napięcia -16kV [94].	39
<b>Rysunek 13.</b> Schemat ilustrujący cykl postępowania w leczeniu metodami inżynierii tkankowej [na podstawie ].	43
<b>Rysunek 14.</b> Schemat ilustrujący tematy dotyczące inżynierii tkankowej w jakich dokonał się wyraźny postęp na przestrzeni ostatnich lat [na podstawie ].	47
<b>Rysunek 15.</b> Struktura chemiczna poli( $\epsilon$ -kapolaktonu).	50
<b>Rysunek 16.</b> Struktura chemiczna siarczanu chondroityny.	52
<b>Rysunek 17.</b> Schemat ilustrujący procesy zachodzące na biomateriale w czasie jego zasiedlania przez komórki [na podstawie 142].	54
<b>Rysunek 18.</b> Schemat ilustrujący oddziaływania elektrostatyczne oraz kowalencyjne umożliwiające osadzenie substancji bioaktywnych na materiałach [na podstawie 152].	56
<b>Rysunek 19.</b> Schemat osadzania polielektrolitów metodą warstwa po warstwie (LbL) [na podstawie ].	57
<b>Rysunek 20.</b> Wyniki pomiarów lepkości roztworów PCL/CHT (5, 10 oraz 25% w/w chitozanu) oraz próbek kontrolnych (P; CHT) wykonanych z dwóch rodzajów rozpuszczalników: HFIP oraz AA/FA.	80
<b>Rysunek 21.</b> Obrazy SEM dwuskładnikowych włókien PCL/CHT oraz próbek kontrolnych (PCL, CHT). Wykresy ilustrują rozkłady średnic włókien dla każdej z próbek.	82
<b>Rysunek 22.</b> Wartości średnia średnic włókien analizowanych próbek PCL/CHT w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika.	83
<b>Rysunek 23.</b> A) Widma próbek chitozanu wykonanych metodą wylania roztworu oraz próbki nieprzetworzonego proszku chitozanu; B) Widma FT-IR wybranych	



dwuskładnikowych próbek PCL/CHT oraz próbek kontrolnych; C) Widma wybranych próbek w tzw. zakresie <i>fingerprint</i> . .....	85
<b>Rysunek 24.</b> Obrazy topografii powierzchni uzyskane metodą AFM-IR A) pojedynczego włókna 10A; C) filmu roztworu 10A. Obrazy ilustrujące rozmieszczenie składników wykonane w zakresie drgania wiązania N-H ( $1645\text{ cm}^{-1}$ ): B) włókna 10A; D) filmu roztworu 10A.....	87
<b>Rysunek 25.</b> Termogramy uzyskane metodą DSC próbek PCL/CHT w trybie ogrzewania próbki z szybkością $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . .....	88
<b>Rysunek 26.</b> Wyniki pomiaru krystaliczności PCL oraz temperatury topnienia w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika oraz zawartości chitozanu. Przedstawiono wyniki próbek kontrolnych (PH, PA) oraz włókien dwuskładnikowych. ....	89
<b>Rysunek 27.</b> Moduł Younga uzyskany z analizy wyników statycznej próby rozciągania. ...	90
<b>Rysunek 28.</b> Kąt zwilżania włókien PCL/CHT w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika.....	91
<b>Rysunek 29.</b> Obrazy SEM wybranych próbek PCL/CHT po inkubacji przez 24h w zawiesinie bakterii <i>E.coli</i> . .....	93
<b>Rysunek 30.</b> Wyniki testu cytotoksyczności analizowanych dwuskładnikowych włókien PCL/CHT oraz próbek kontrolnych (PCL) po 24h hodowli komórek A) mysich fibroblastów linii L929; B) ludzkich osteoblastów linii MG63.....	94
<b>Rysunek 31.</b> Obrazy SEM wybranych włókien PCL/CHT wykonanych z różną biegunowością napięcia. ....	96
<b>Rysunek 32.</b> Rozkład średnic włókien próbek PCL/CHT wykonanych z różną biegunowością napięcia. ....	97
<b>Rysunek 33.</b> Widma FT-IR wybranych próbek PCL/CHT: A) włókna CHT- (fioletowy), CHT+ (szary), CHT+CS (niebieski) oraz CHT-CS (zielony); B) włókna PCL (jasno brązowy), 25- (czarny), 25+ (brązowy). .....	98
<b>Rysunek 34.</b> Dekonwolucja widma w zakresie liczby falowej $1680\text{-}1780\text{ cm}^{-1}$ . Widmo zawiera cztery składowe: z maksimum $1710\text{ cm}^{-1}$ (niebieskie), $1726\text{ cm}^{-1}$ (ciemny szary), $1733\text{ cm}^{-1}$ (szary) i $1736\text{ cm}^{-1}$ (jasny szary). Udział procentowy przypisany do widma $1710\text{ cm}^{-1}$ opisuje relację powierzchni tego widma do powierzchni całego widma w zakresie $1680\text{-}1780\text{ cm}^{-1}$ . .....	100

<b>Rysunek 35.</b> Krzywe DSC dwuskładnikowych próbek PCL/CHT oraz próbek kontrolnych PCL uformowanych z zastosowaniem różnej biegunowości napięcia w procesie elektroprzędzenia. ....	101
<b>Rysunek 36.</b> Temperatura topnienia i zawartość fazy krystalicznej w PCL w analizowanych dwuskładnikowych próbkach PCL/CHT oraz próbkach kontrolnych PCL.....	102
<b>Rysunek 37.</b> Obrazy AFM separacji faz (B, D) oraz topografii powierzchni (A, C) wybranych dwuskładnikowych próbek PCL/CHT. 25+ (A, B) oraz 25- (C, D). ....	103
<b>Rysunek 38.</b> Reprezentatywne krzywe rozciągania dwuskładnikowych próbek PCL/CHT oraz próbek kontrolnych w statycznej próbie rozciągania.....	104
<b>Rysunek 39.</b> Moduł Younga dwuskładnikowych włókien PCL/CHT uformowanych z różną biegunowością napięcia. Analizowano próbki suche(A) oraz po inkubacji w roztworze PBS przez 24h w 37°C (B) w porównaniu do próbek suchych. ....	105
<b>Rysunek 40.</b> Kąta zwilżania włókien PCL/CHT uformowanych przy różnym znaku potencjału elektrycznego na dyszy przędzalniczej. ....	106
<b>Rysunek 41.</b> Kąta zwilżania dwuskładnikowych włókien PCL/CHT i próbek kontrolnych (P+/P-, CHT+/CHT-) po immobilizacji CS na powierzchni włókien w porównaniu do kąta zwilżania przed modyfikacją powierzchni.....	109
<b>Rysunek 42.</b> Obrazy AFM topografii powierzchni włókna zawierającego 25% w/w chitozanu uformowanego w układzie z dyszą podłączoną od napięcia o ujemnym znaku potencjału elektrycznego przed (A) i po osadzeniu CS na powierzchni włókien (B). ....	110
<b>Rysunek 43.</b> Moduł Younga dwuskładnikowych włókien PCL/CHT oraz próbek kontrolnych uformowanych przy różnej biegunowości napięcia przed i po adsorpcji siarczanu chondroityny (CS).....	110
<b>Rysunek 44.</b> Wyniki testu MTT wykonanego na komórkach L929 po 1 dniu hodowli.....	112
<b>Rysunek 45.</b> Wyniki testu MTT na linii mysich fibroblastów L929 po 3 dniach hodowli komórkowej. ....	113
<b>Rysunek 46.</b> Wyniki testu proliferacji komórek po 1 dniu hodowli na wybranych materiałach.....	114
<b>Rysunek 47.</b> Obrazy SEM komórek L929 hodowanych w warunkach <i>in vitro</i> przez 3 dni.	116
<b>Rysunek 48.</b> Obrazy uzyskane metodą mikroskopii fluorescencyjnej wybranych próbek PCL/CHT zasiedlonych komórkami L929 po 3 dniach hodowli.....	118

## 10 Bibliografia

---

<sup>1</sup>Reneker, D. H., Yarin, A. L., Fong, H., Koombhongse, S. Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. *Journal of Applied physics* 2000, 87(9), 4531-4547.

<sup>2</sup>Teo, W. E., Ramakrishna, S. A review on electrospinning design and nanofiber assemblies. *Nanotechnology* 2006, 17(14), R89.

<sup>3</sup>Sundarrajan, S., Tan, K. L., Lim, S. H., Ramakrishna, S. Electrospun nanofibers for air filtration applications. *Procedia Engineering* 2014, 75, 159-163.

<sup>4</sup>Abdelgawad, A. M., Hudson, S. M., Rojas, O. J. Antimicrobial wound dressing nanofiber mats from multicomponent (chitosan/silver-NPs/polyvinyl alcohol) systems. *Carbohydrate polymers* 2014, 100, 166-178.

<sup>5</sup>Khorshidi, S., Solouk, A., Mirzadeh, H., Mazinani, S., Lagaron, J. M., Sharifi, S., Ramakrishna, S. A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering applications. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 2016, 10(9), 715-738.

<sup>6</sup>Pierini, F., Lanzi, M., Nakielski, P., Pawłowska, S., Urbanek, O., Zembrzycki, K., Kowalewski, T. A. Single-material organic solar cells based on electrospun fullerene-grafted polythiophene nanofibers. *Macromolecules* 2017, 50(13), 4972-4981.

<sup>7</sup>Gilbert, W. De Magnete, Magneticisque Corporibus, et de Magno Magnete Tellure (On the Magnet and Magnetic Bodies, and on That Great Magnet the Earth), 1628, London, Peter Short.

<sup>8</sup>Boys, C. V. On the Production, Properties, and some suggested Uses of the Finest Threads. *Proceedings of the Physical Society* 1887. 9: 8–19.

<sup>9</sup>Cooley, J.F. Patent GB 06385. Improved methods of and apparatus for electrically separating the relatively volatile liquid component from the component of relatively fixed substances of composite fluid. 19th May 1900

<sup>10</sup>Cooley, J. F. *et al.* Apparatus for electrically dispersing fluids. U.S. Patent 692,631 Issue date: February 4, 1902

<sup>11</sup>Morton, W.J. *et al.* Method of dispersing fluids. U.S. Patent 0,705,691 Issue date: July 29, 1902

<sup>12</sup>Formhals, Anton *et al.* Process and apparatus for preparing artificial threads. U.S. Patent 1,975,504 Issue date: October 2, 1934

<sup>13</sup>Formhals, Anton *et al.* Method and apparatus for spinning. U.S. Patent 2,349,950 Issue date: May 30, 1944

<sup>14</sup>Norton, C.L. Method and apparatus for producing fibrous or filamentary material. U.S. Patent 2,048,651 Issue date: July 21, 1936

<sup>15</sup>Zeleny, J. The Electrical Discharge from Liquid Points, and a Hydrostatic Method of Measuring the Electric Intensity at Their Surfaces. *Physical Review* 1914. 3 (2): 69–91.

- 
- <sup>16</sup>Taylor, G. Disintegration of Water Drops in an Electric Field. *Proceedings of the Royal Society A* 1964. **280** (1382): 383–397.
- <sup>17</sup>Taylor, G. Electrically Driven Jets. *Proceedings of the Royal Society A* 1969. **313** (1515): 453–475.
- <sup>18</sup>Taylor, G. The Force Exerted by an Electric Field on a Long Cylindrical Conductor. *Proceedings of the Royal Society A* 1966. **291** (1425): 145–158
- <sup>19</sup>Air Filtration with Electrospun Nanofibers. *electrospintech.com*. opublikowane on-line: 2017-11-07.
- <sup>20</sup>Simon, Eric M. FINAL REPORT: FIBROUS SUBSTRATES FOR CELL CULTURE (R3RR03544A), 1988, Available ResearchGate.
- <sup>21</sup>Doshi, J., Reneker, D. H. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Journal of Electrostatics* 1995. 35 (2–3): 151–160.
- <sup>22</sup>Ghorani, B., Tucker, N. Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. *Food Hydrocolloids* 2015, 51, 227-240.
- <sup>23</sup>Haider, A., Haider, S., Kang, I. K. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry* 2015.
- <sup>24</sup>Taylor, G. Disintegration of water drops in an electric field. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences* 1964; 280 : 383-97.
- <sup>25</sup>Reznik, S.N, Yarin, A.L, Theron, A., Zussman, E. Transient and steady shapes of droplets attached to a surface in a strong electric field. *Journal of Fluid Mechanics* 2004;516 : 349-77.
- <sup>26</sup>Graessley WW, editor. *Advances in polymer science*, vol. 16. New York: Springer; 1974. p. 179.
- <sup>27</sup>Shenoy, S. L., Bates, W. D., Frisch, H. L., Wnek, G. E. Role of chain entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solutions: good solvent, non-specific polymer–polymer interaction limit. *Polymer* 2005, 46(10), 3372-3384.
- <sup>28</sup>Reneker, D. H., Yarin, A. L. Electrospinning jets and polymer nanofibers. *Polymer* 2008, 49(10), 2387-2425.
- <sup>29</sup>Koombhongse S, Liu W, Reneker DH. Flat polymer ribbons and other shapes by electrospinning. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics* 2001;39:2598-606.
- <sup>30</sup>Ziabicki A. *In fundamentals of fiber formation*. New York: Wiley; 1976.
- <sup>31</sup>Dulnik, J., Kołbuk, D., Denis, P., Sajkiewicz, P. The effect of a solvent on cellular response to PCL/gelatin and PCL/collagen electrospun nanofibres. *European Polymer Journal* 2018, 104, 147-156.
- <sup>32</sup>Urbanek, O., Sajkiewicz, P., Pierini, F., Czerkies, M., Kołbuk, D. Structure and properties of polycaprolactone/chitosan nonwovens tailored by solvent systems. *Biomedical Materials* 2017, 12(1), 015020.
- <sup>33</sup>Kanani, A. G., Bahrami, S. H. Effect of changing solvents on poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanofibrous webs morphology. *Journal of Nanomaterials* 2011, 2011, 31.

- 
- <sup>34</sup>Casasola, R., Thomas, N. L., Trybala, A., Georgiadou, S. Electrospun poly lactic acid (PLA) fibres: effect of different solvent systems on fibre morphology and diameter. *Polymer* 2014, 55(18), 4728-4737.
- <sup>35</sup>Rai, P., Rosen, S. L. An empirical relation between the Mark–Houwink–Sakurada constants. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 1997, 35(12), 1985-1987.
- <sup>36</sup>Liu, H., Hsieh, Y. L. Ultrafine fibrous cellulose membranes from electrospinning of cellulose acetate. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 2002, 40(18), 2119-2129.
- <sup>37</sup>Koski, A., Yim, K., Shivkumar, S. Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning. *Materials Letters* 2004, 58(3-4), 493-497.
- <sup>38</sup>Gupta, P., Elkins, C., Long, T. E., Wilkes, G. L. Electrospinning of linear homopolymers of poly (methyl methacrylate): exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent. *Polymer* 2005, 46(13), 4799-4810.
- <sup>39</sup>Tanford C. Physical chemistry of macromolecules. NY: Wiley; 1961.
- <sup>40</sup>McKee, M. G., Wilkes, G. L., Colby, R. H., Long, T. E. Correlations of solution rheology with electrospun fiber formation of linear and branched polyesters. *Macromolecules* 2004, 37(5), 1760-1767.
- <sup>41</sup>Mo, X. M., Xu, C. Y., Kotaki, M. E. A., Ramakrishna, S. Electrospun P (LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation. *Biomaterials* 2004, 25(10), 1883-1890.
- <sup>42</sup>Katti, D. S., Robinson, K. W., Ko, F. K., Laurencin, C. T. Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: Optimization of fabrication parameters. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: 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* 2004, 70(2), 286-296.
- <sup>43</sup>Fallahi, D., Rafizadeh, M., Mohammadi, N., Vahidi, B. Effect of applied voltage on jet electric current and flow rate in electrospinning of polyacrylonitrile solutions. *Polymer international* 2008, 57(12), 1363-1368.
- <sup>44</sup>Theron, S. A., Zussman, E., Yarin, A. L. Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polymer solutions. *Polymer* 2004, 45(6), 2017-2030.
- <sup>45</sup>Yang, Y., Jia, Z., Li, Q., Guan, Z. Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polyethylene oxide solution. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical insulation* 2006, 13(3), 580-585.
- <sup>46</sup>Tripatanasuwat, S., Zhong, Z., Reneker, D. H. Effect of evaporation and solidification of the charged jet in electrospinning of poly (ethylene oxide) aqueous solution. *Polymer* 2007, 48(19), 5742-5746.
- <sup>47</sup>Casper, C. L., Stephens, J. S., Tassi, N. G., Chase, D. B., Rabolt, J. F. Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process. *Macromolecules* 2004, 37(2), 573-578.
- <sup>48</sup>Su, Y., Lu, B., Xie, Y., Ma, Z., Liu, L., Zhao, H., ... Xiong, Y. Temperature effect on electrospinning of nanobelts: the case of hafnium oxide. *Nanotechnology* 2011, 22(28), 285609.
- <sup>49</sup>Wang, C., Chien, H. S., Hsu, C. H., Wang, Y. C., Wang, C. T., Lu, H. A. Electrospinning of polyacrylonitrile solutions at elevated temperatures. *Macromolecules* 2007, 40(22), 7973-7983.

- 
- <sup>50</sup>Givens, S. R., Gardner, K. H., Rabolt, J. F., Chase, D. B. High-temperature electrospinning of polyethylene microfibers from solution. *Macromolecules* 2007, 40(3), 608-610.
- <sup>51</sup>Schreuder-Gibson, H. L., Gibson, P., Tsai, P., Gupta, P., Wilkes, G. *Cooperative charging effects of fibers from electrospinning of electrically dissimilar polymers*. VIRGINIA POLYTECHNIC INST AND STATE UNIV BLACKSBURG DEPT OF CHEMICAL ENGINEERING 2005.
- <sup>52</sup>Liu, L., Dzenis, Y. A. Analysis of the effects of the residual charge and gap size on electrospun nanofiber alignment in a gap method. *Nanotechnology* 2008, 19(35), 355307.
- <sup>53</sup>Collins, G., Federici, J., Imura, Y., Catalani, L. H. Charge generation, charge transport, and residual charge in the electrospinning of polymers: a review of issues and complications. *Journal of Applied physics* 2012, 111(4), 044701.
- <sup>54</sup> Tsai, P.P., Schreuder-Gibson, H. Effect of electrospinning material and conditions upon residual electrostatic charge of polymer nanofibers. *J Textile Apparel, Technol Manage* 2001, vol. 1. Special issue: The Fiber Society Spring 2001 Conference, Raleigh NC
- <sup>55</sup>Catalani, L. H., Collins, G., Jaffe, M. Evidence for molecular orientation and residual charge in the electrospinning of poly (butylene terephthalate) nanofibers. *Macromolecules* 2007, 40(5), 1693-1697.
- <sup>56</sup>Huebner, A. L., Chu, H. N. Instability and breakup of charged liquid jets. *Journal of Fluid Mechanics* 1971, 49(2), 361-372.
- <sup>57</sup>Tsaroom, A., Matyjaszewski, K., Silverstein, M. S. Spontaneous core-sheath formation in electrospun nanofibers. *Polymer* 2011, 52(13), 2869-2876.
- <sup>58</sup>Ma, H., Chen, G., Zhang, J., Liu, Y., Nie, J., Ma, G. Facile fabrication of core-shell polyelectrolyte complexes nanofibers based on electric field induced phase separation. *Polymer* 2017, 110, 80-86.
- <sup>59</sup>Stachewicz, U., Stone, C. A., Willis, C. R., Barber, A. H. Charge assisted tailoring of chemical functionality at electrospun nanofiber surfaces. *Journal of Materials Chemistry* 2012, 22(43), 22935-22941.
- <sup>60</sup>Supaphol, P., Mit-Uppatham, C., Nithitanakul, M. Ultrafine electrospun polyamide-6 fibers: Effect of emitting electrode polarity on morphology and average fiber diameter. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 2005, 43(24), 3699-3712.
- <sup>61</sup>Tong, H. W., Wang, M. Electrospinning of fibrous polymer scaffolds using positive voltage or negative voltage: a comparative study. *Biomedical Materials* 2010, 5(5), 054110.
- <sup>62</sup>Tong, H. W., Wang, M., Lu, W. W. Enhancing the biological performance of osteoconductive nanocomposite scaffolds through negative voltage electrospinning. *Nanomedicine* 2013, 8(4), 577-589.
- <sup>63</sup>Bonino, C. A., Efimenko, K., Jeong, S. I., Krebs, M. D., Alsberg, E., Khan, S. A. Three-dimensional electrospun alginate nanofiber mats via tailored charge repulsions. *Small* 2012, 8(12), 1928-1936.
- <sup>64</sup>Kilic, A., Oruc, F., Demir, A. Effects of polarity on electrospinning process. *Textile Research Journal* 2008, 78(6), 532-539.
- <sup>65</sup>Wu, C. M., Chiou, H. G., Lin, S. L., Lin, J. M. Effects of electrostatic polarity and the types of electrical charging on electrospinning behavior. *Journal of Applied Polymer Science* 2012, 126(S2), E89-E97.

- 
- <sup>66</sup>Kilic, A., Oruc, F., Demir, A. Effects of polarity on electrospinning process. *Textile Research Journal* 2008, 78(6), 532-539.
- <sup>67</sup>Schiessel, H. The physics of chromatin. *Journal of Physics: Condensed Matter* 2003, 15(19), R699.
- <sup>68</sup>Dobrynin, A. V. Theory and simulations of charged polymers: From solution properties to polymeric nanomaterials. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2008, 13(6), 376-388.
- <sup>69</sup>Liao, Q., Dobrynin, A. V., Rubinstein, M. Molecular dynamics simulations of polyelectrolyte solutions: osmotic coefficient and counterion condensation. *Macromolecules* 2003, 36(9), 3399-3410.
- <sup>70</sup>Limbach, H. J., Holm, C., Kremer, K. Structure of polyelectrolytes in poor solvent. *Europhysics Letters* 2002, 60(4), 566.
- <sup>71</sup>Chang, R., Yethiraj, A. Dilute solutions of strongly charged flexible polyelectrolytes in poor solvents: Molecular dynamics simulations with explicit solvent. *Macromolecules* 2006, 39(2), 821-828.
- <sup>72</sup>Chang, R., Yethiraj, A. Strongly charged flexible polyelectrolytes in poor solvents: molecular dynamics simulations with explicit solvent. *The Journal of chemical physics* 2003, 118(14), 6634-6647.
- <sup>73</sup>Jeon, J., Dobrynin, A. V. Necklace globule and counterion condensation. *Macromolecules* 2007, 40(21), 7695-7706.
- <sup>74</sup>Rubinstein, M., Colby, R. H. *Polymer physics* (Vol. 23). New York: Oxford University Press 2003.
- <sup>75</sup>Pamies, R., Cifre, J. H., De La Torre, J. G. Brownian dynamics simulation of polyelectrolyte dilute solutions under shear flow. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 2007, 45(1), 1-9.
- <sup>76</sup>Carrillo, J. M. Y., Dobrynin, A. V. Molecular dynamics simulations of polyelectrolyte adsorption. *Langmuir* 2007, 23(5), 2472-2482.
- <sup>77</sup>Messina, R. Effect of image forces on polyelectrolyte adsorption at a charged surface. *Physical Review E* 2004, 70(5), 051802.
- <sup>78</sup>Reddy, G., Chang, R., Yethiraj, A. Adsorption and dynamics of a single polyelectrolyte chain near a planar charged surface: Molecular dynamics simulations with explicit solvent. *Journal of chemical theory and computation* 2006, 2(3), 630-636.
- <sup>79</sup>Rinaudo, M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in polymer science* 2006, 31(7), 603-632.
- <sup>80</sup>Leedy, M. R., Martin, H. J., Norowski, P. A., Jennings, J. A., Haggard, W. O., Bumgardner, J. D. Use of chitosan as a bioactive implant coating for bone-implant applications. In *Chitosan for biomaterials II* (pp. 129-165). Springer 2011, Berlin, Heidelberg.
- <sup>81</sup>No, H. K., Park, N. Y., Lee, S. H., & Meyers, S. P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International journal of food microbiology* 2002, 74(1-2), 65-72.
- <sup>82</sup>El Ghaouth, A., Arul, J., Grenier, J., & Asselin, A. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathology* 1992, 82(4), 398-402.

- 
- <sup>83</sup>Lehr, C. M., Bouwstra, J. A., Schacht, E. H., Junginger, H. E. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *International journal of Pharmaceutics* 1992, 78(1-3), 43-48.
- <sup>84</sup>Ong, S. Y., Wu, J., Moochhala, S. M., Tan, M. H., Lu, J. Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties. *Biomaterials* 2008, 29(32), 4323-4332.
- <sup>85</sup>He, P., Davis, S. S., Illum, L. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *International journal of pharmaceutics* 1998, 166(1), 75-88.
- <sup>86</sup>Chung, Y. C., Chen, C. Y. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresource technology* 2008, 99(8), 2806-2814.
- <sup>87</sup>Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., Chiellini, E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in polymer science* 2011, 36(8), 981-1014.
- <sup>88</sup>Croisier, F., Jérôme, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal* 2013, 49(4), 780-792.
- <sup>89</sup>Rinaudo, M., Pavlov, G., Desbrieres, J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer* 1999, 40(25), 7029-7032.
- <sup>90</sup>Rinaudo, M., Pavlov, G., Desbrieres, J. Solubilization of chitosan in strong acid medium. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization* 1999, 5(3), 267-276.
- <sup>91</sup>Cooper, A., Bhattarai, N., Zhang, M. Fabrication and cellular compatibility of aligned chitosan–PCL fibers for nerve tissue regeneration. *Carbohydrate Polymers* 2011, 85(1), 149-156.
- <sup>92</sup>Coburn, J. M., Gibson, M., Monagle, S., Patterson, Z., Elisseff, J. H. Bioinspired nanofibers support chondrogenesis for articular cartilage repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012, 109(25), 10012-10017.
- <sup>93</sup>Shalumon, K. T., Anulekha, K. H., Chennazhi, K. P., Tamura, H., Nair, S. V., Jayakumar, R. Fabrication of chitosan/poly (caprolactone) nanofibrous scaffold for bone and skin tissue engineering. *International journal of biological macromolecules* 2011, 48(4), 571-576.
- <sup>94</sup>Terada, D., Kobayashi, H., Zhang, K., Tiwari, A., Yoshikawa, C., Hanagata, N. (2012). Transient charge-masking effect of applied voltage on electrospinning of pure chitosan nanofibers from aqueous solutions. *Science and technology of advanced materials*, 13(1), 015003.
- <sup>95</sup>Tong, H. W., Wang, M. Negative voltage electrospinning and positive voltage electrospinning of tissue engineering scaffolds: a comparative study and charge retention on scaffolds. *Nano LIFE* 2012, 2(01), 1250004.
- <sup>96</sup>Wu, L. Q., Gadre, A. P., Yi, H., Kastantin, M. J., Rubloff, G. W., Bentley, W. E., ... & Ghodssi, R. Voltage-dependent assembly of the polysaccharide chitosan onto an electrode surface. *Langmuir* 2002, 18(22), 8620-8625.
- <sup>97</sup>Ohkawa, K., Cha, D., Kim, H., Nishida, A., Yamamoto, H. Electrospinning of chitosan. *Macromolecular Rapid Communications* 2004, 25(18), 1600-1605.
- <sup>98</sup>Wan, Y., Lu, X., Dalai, S., Zhang, J. Thermophysical properties of polycaprolactone/chitosan blend membranes. *Thermochimica Acta* 2009, 487(1-2), 33-38.



- 
- <sup>99</sup>Van der Schueren, L., Steyaert, I., De Schoenmaker, B., De Clerck, K. Polycaprolactone/chitosan blend nanofibres electrospun from an acetic acid/formic acid solvent system. *Carbohydrate Polymers* 2012, 88(4), 1221-1226.
- <sup>100</sup>Senda, T., He, Y., Inoue, Y. Biodegradable blends of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) with  $\alpha$ -chitin and chitosan: specific interactions, thermal properties and crystallization behavior. *Polymer international* 2002, 51(1), 33-39.
- <sup>101</sup>Min, B. M., Lee, S. W., Lim, J. N., You, Y., Lee, T. S., Kang, P. H., Park, W. H. Chitin and chitosan nanofibers: electrospinning of chitin and deacetylation of chitin nanofibers. *Polymer* 2004, 45(21), 7137-7142.
- <sup>102</sup>De Vrieze, S., Westbroek, P., Van Camp, T., Van Langenhove, L. Electrospinning of chitosan nanofibrous structures: feasibility study. *Journal of Materials Science* 2007, 42(19), 8029-8034.
- <sup>103</sup>Geng, X., Kwon, O. H., Jang, J. Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials* 2005, 26(27), 5427-5432.
- <sup>104</sup>Bhattarai, N., Edmondson, D., Veiseh, O., Matsen, F. A., Zhang, M. Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. *Biomaterials* 2005, 26(31), 6176-6184.
- <sup>105</sup>Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J. Tissue engineering. *Science* 1993, 260, 920-926.
- <sup>106</sup>Noh, S., Myung, N., Park, M., Kim, S., Zhang, S. U., Kang, H. W. 3D bioprinting for tissue engineering. In *Clinical Regenerative Medicine in Urology* (pp. 105-123). Springer 2018, Singapore.
- <sup>107</sup>Sharma, R. R., Pollock, K., Hubel, A., McKenna, D. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion* 2014, 54(5), 1418-1437.
- <sup>108</sup>Hamazaki, T., El Rouby, N., Fredette, N. C., Santostefano, K. E., Terada, N. Concise review: induced pluripotent stem cell research in the era of precision medicine. *Stem Cells* 2017, 35(3), 545-550.
- <sup>109</sup>Norma Europejska: PN-EN ISO 10993 Biologiczna ocena wyrobów medycznych.
- <sup>110</sup>Ulery, B. D., Nair, L. S., Laurencin, C. T. Biomedical applications of biodegradable polymers. *Journal of polymer science Part B: polymer physics* 2011, 49(12), 832-864.
- <sup>111</sup>O'Brien, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials today* 2011, 14(3), 88-95.
- <sup>112</sup>Rasperini, G., Pilipchuk, S. P., Flanagan, C. L., Park, C. H., Pagni, G., Hollister, S. J., Giannobile, W. V. 3D-printed bioresorbable scaffold for periodontal repair. *Journal of dental research* 2015, 94(9\_suppl), 153S-157S.
- <sup>113</sup>Caló, E., Khutoryanskiy, V. V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal* 2015, 65, 252-267.
- <sup>114</sup>Gautam, S., Chou, C. F., Dinda, A. K., Potdar, P. D., Mishra, N. C. Surface modification of nanofibrous polycaprolactone/gelatin composite scaffold by collagen type I grafting for skin tissue engineering. *Materials Science and Engineering* 2014: C, 34, 402-409.
- <sup>115</sup>Ren, X., Feng, Y., Guo, J., Wang, H., Li, Q., Yang, J., Li, W. Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Chemical Society Reviews* 2015, 44(15), 5680-5742.

- 
- <sup>116</sup>Ardeshirzadeh, B., Anaraki, N. A., Irani, M., Rad, L. R., Shamshiri, S. Controlled release of doxorubicin from electrospun PEO/chitosan/graphene oxide nanocomposite nanofibrous scaffolds. *Materials Science and Engineering: C* 2015, 48, 384-390.
- <sup>117</sup>DeForest, C. A., Tirrell, D. A. A photoreversible protein-patterning approach for guiding stem cell fate in three-dimensional gels. *Nature materials* 2015, 14(5), 523.
- <sup>118</sup>Yang, C., Tibbitt, M. W., Basta, L., Anseth, K. S. Mechanical memory and dosing influence stem cell fate. *Nature materials* 2014, 13(6), 645.
- <sup>119</sup>Anderson, J. M., Rodriguez, A., Chang, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. In *Seminars in immunology* 2008 (Vol. 20, No. 2, pp. 86-100). Academic Press.
- <sup>120</sup>Khademhosseini, A., Langer, R. A decade of progress in tissue engineering. *Nature protocols* 2016, 11(10), 1775.
- <sup>121</sup>Doudna, J. A., Charpentier, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014, 346(6213), 1258096.
- <sup>122</sup><http://www.tmc.edu/news/2018/08/utmb-researchers-successfully-transplant-bioengineered-lung/>
- <sup>123</sup>Katz, A. R. Evaluation of tensile and absorption properties of polyglycolide sutures. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1970, 131, 701-716.
- <sup>124</sup>Reed, T. M. Allofix1 freeze-dried cortical bone pins as an alternative to synthetic absorbable polymeric pins: A preliminary study in short Z bunionectomies. *The Journal of foot and ankle surgery* 1999, 38(1), 14-23.
- <sup>125</sup>Otto, J., Binnebösel, M., Pietsch, S., Anurov, M., Titkova, S., Öttinger, A. P., ... & Klinge, U. Large-pore PDS mesh compared to small-pore PG mesh. *Journal of Investigative Surgery* 2010, 23(4), 190-196.
- <sup>126</sup>Piai, J. F., da Silva, M. A., Martins, A., Torres, A. B., Faria, S., Reis, R. L., ... & Neves, N. M. Chondroitin sulfate immobilization at the surface of electrospun nanofiber meshes for cartilage tissue regeneration approaches. *Applied Surface Science* 2017, 403, 112-125.
- <sup>127</sup>Sajkiewicz, P., Heljak, M. K., Gradys, A., Choińska, E., Rumiński, S., Jaroszewicz, T., Bissenik I., Świączkowski, W. Degradation and related changes in supermolecular structure of poly (caprolactone) in vivo conditions. *Polymer Degradation and Stability* 2018, 157, 70-79.
- <sup>128</sup>Huang, M. H., Li, S., Vert, M. Synthesis and degradation of PLA-PCL-PLA triblock copolymer prepared by successive polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone and dl-lactide. *Polymer* 2004, 45(26), 8675-8681.
- <sup>129</sup>Choi, S. H., Park, T. G. Synthesis and characterization of elastic PLGA/PCL/PLGA tri-block copolymers. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 2002, 13(10), 1163-1173.
- <sup>130</sup>Bölgen, N., Menciloğlu, Y. Z., Acatay, K., Vargel, I., Pişkin, E. In vitro and in vivo degradation of non-woven materials made of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanofibers prepared by electrospinning under different conditions. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 2005, 16(12), 1537-1555.
- <sup>131</sup>Liu, C. Z., Czernuszka, J. T. Development of biodegradable scaffolds for tissue engineering: a perspective on emerging technology. *Materials Science and Technology* 2007, 23(4), 379-391.

- 
- <sup>132</sup>Henson, F. M., Getgood, A. M., Caborn, D. M., McIlwraith, C. W., Rushton, N. Effect of a solution of hyaluronic acid–chondroitin sulfate–N-acetyl glucosamine on the repair response of cartilage to single-impact load damage. *American journal of veterinary research* 2012, 73(2), 306-312.
- <sup>133</sup>Yeh, M. K., Cheng, K. M., Hu, C. S., Huang, Y. C., Young, J. J. Novel protein-loaded chondroitin sulfate–chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. *Acta biomaterialia* 2011, 7(10), 3804-3812.
- <sup>134</sup>Piai, J. F., Rubira, A. F., Muniz, E. C. Self-assembly of a swollen chitosan/chondroitin sulfate hydrogel by outward diffusion of the chondroitin sulfate chains. *Acta Biomaterialia* 2009, 5(7), 2601-2609.
- <sup>135</sup>Kundu, A., Kishore, N. 1, 1, 1, 3, 3, 3-hexafluoroisopropanol induced thermal unfolding and molten globule state of bovine  $\alpha$ -lactalbumin: Calorimetric and spectroscopic studies. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules* 2004, 73(4), 405-420.
- <sup>136</sup>Mysliwski, W.A., Podstawy Cytofizjologii i Histofizjologii. Rozdział 4 i 5, Wydanie 8, Gdańsk, Akademia Medyczna w Gdańsku, 2007, 70-96.
- <sup>137</sup>Darnell, J. E., Lodish, H. F., Baltimore, D. *Molecular cell biology* (Vol. 2). New York: Scientific American Books 1990.
- <sup>138</sup>Balcerak, A., Wakula, M., Trębińska, A., Grzybowska, E. A. Tumour cell migration and invasion: an impact of cell plasticity and extracellular matrix on metastasis. *Nowotwory. Journal of Oncology* 2016, 66(1), 45-52.
- <sup>139</sup>Andrade, J. D., Hlady, V. Plasma protein adsorption: the big twelve. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1987, 516(1), 158-172.
- <sup>140</sup>Saltzman, W. M., Kyriakides, T. R. Cell interactions with polymers. In *Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)* 2014, (pp. 385-406).
- <sup>141</sup>Khosravi, N., Maeda, A., DaCosta, R.S., Davies, J.E. Nanosurfaces modulate the mechanism of peri-implant endosseous healing by regulating neovascular morphogenesis. *Nat Commun Biol* 2018, 1(1), 72.
- <sup>142</sup>Slee, J. B., Christian, A. J., Levy, R. J., Stachelek, S. J. Addressing the inflammatory response to clinically relevant polymers by manipulating the host response using ITIM domain-containing receptors. *Polymers* 2014, 6(10), 2526-2551.
- <sup>143</sup>Yoo, H. S., Kim, T. G., Park, T. G. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* 2009, 61(12), 1033-1042.
- <sup>144</sup>Yoshida, M., Langer, R., Lendlein, A., Lahann, J. From advanced biomedical coatings to multi-functionalized biomaterials. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews* 2006, 46(4), 347-375.
- <sup>145</sup>Metwally, M., Cheong, Y., Li, T. C. A review of techniques for adhesion prevention after gynaecological surgery. *Current opinion in obstetrics and gynecology* 2008, 20(4), 345-352.
- <sup>146</sup>Bölgen, N., Vargel, I., Korkusuz, P., Menciloğlu, Y. Z., Pişkin, E. In vivo performance of antibiotic embedded electrospun PCL membranes for prevention of abdominal adhesions. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: 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* 2007, 81(2), 530-543.

- 
- <sup>147</sup>Bonito, V., Smits, A. I. P. M., Goor, O. J. G. M., Ippel, B. D., Driessen-Mol, A., Munker, T. J. A. G., ... & Bouten, C. V. C. Modulation of macrophage phenotype and protein secretion via heparin-IL-4 functionalized supramolecular elastomers. *Acta biomaterialia* 2018, 71, 247-260.
- <sup>148</sup> Joseph, N., Ahmadiannamini, P., Hoogenboom, R., Vankelecom, I. F. Layer-by-layer preparation of polyelectrolyte multilayer membranes for separation. *Polymer Chemistry* 2014, 5(6), 1817-1831.
- <sup>149</sup> Liu, Y., He, T., Gao, C. Surface modification of poly (ethylene terephthalate) via hydrolysis and layer-by-layer assembly of chitosan and chondroitin sulfate to construct cytocompatible layer for human endothelial cells. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 2005, 46(2), 117-126.
- <sup>150</sup>Gong, Y., Zhu, Y., Liu, Y., Ma, Z., Gao, C., Shen, J. Layer-by-layer assembly of chondroitin sulfate and collagen on aminolyzed poly (L-lactic acid) porous scaffolds to enhance their chondrogenesis. *Acta biomaterialia* 2007, 3(5), 677-685.
- <sup>151</sup>Yoo, H. S., Kim, T. G., Park, T. G. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* 2009, 61(12), 1033-1042.
- <sup>152</sup>Goddard, J. M., Hotchkiss, J. H. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress in polymer science* 2007, 32(7), 698-725.
- <sup>153</sup>Bösiger, P., Tegl, G., Richard, I. M., Le Gat, L., Huber, L., Stagl, V., ... Fortunato, G. Enzyme functionalized electrospun chitosan mats for antimicrobial treatment. *Carbohydrate polymers* 2018, 181, 551-559.
- <sup>154</sup>He, X., Wang, Y., Wu, G. Layer-by-layer assembly of type I collagen and chondroitin sulfate on aminolyzed PU for potential cartilage tissue engineering application. *Applied Surface Science* 2012, 258(24), 9918-9925.
- <sup>155</sup>Pakravan, M., Heuzey, M. C., Aji, A. Core-shell structured PEO-chitosan nanofibers by coaxial electrospinning. *Biomacromolecules* 2012, 13(2), 412-421.
- <sup>156</sup>Carmona, V. B., de Campos, A., Marconcini, J. M., Mattoso, L. H. C. Kinetics of thermal degradation applied to biocomposites with TPS, PCL and sisal fibers by non-isothermal procedures. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 2014, 115(1), 153-160.
- <sup>157</sup>Moussa, S. H., Tayel, A. A., Al-Hassan, A. A., Farouk, A. Tetrazolium/formazan test as an efficient method to determine fungal chitosan antimicrobial activity. *Journal of Mycology* 2013.
- <sup>158</sup>Honma, T., Senda, T., Inoue, Y. Thermal properties and crystallization behaviour of blends of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) with chitin and chitosan. *Polymer international* 2003, 52(12), 1839-1846.
- <sup>159</sup>Yamamoto, A., Kawada, J., Yui, T., Ogawa, K. Conformational behavior of chitosan in the acetate salt: an X-ray study. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 1997, 61(7), 1230-1232.
- <sup>160</sup>Neves, S. C., Teixeira, L. S. M., Moroni, L., Reis, R. L., Van Blitterswijk, C. A., Alves, N. M., ... & Mano, J. F. Chitosan/Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) blend scaffolds for cartilage repair. *Biomaterials* 2011, 32(4), 1068-1079.
- <sup>161</sup>Sarasam, A., Madihally, S. V. Characterization of chitosan-polycaprolactone blends for tissue engineering applications. *Biomaterials* 2005, 26(27), 5500-5508.
- <sup>162</sup>Homayoni, H., Ravandi, S. A. H., Valizadeh, M. (Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization. *Carbohydrate polymers* 2009, 77(3), 656-661.

---

<sup>163</sup>Sakurai, K., Maegawa, T., Takahashi, T. Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly (N-vinyl pyrrolidone) blends. *Polymer* 2000, *41*(19), 7051-7056.

<sup>164</sup>de Britto, D., de Assis, O. B. Synthesis and mechanical properties of quaternary salts of chitosan-based films for food application. *International journal of biological macromolecules* 2007, *41*(2), 198-203.

<sup>165</sup>Camposeo, A., Greenfeld, I., Tantussi, F., Pagliara, S., Moffa, M., Fuso, F., ... & Pisignano, D. Local mechanical properties of electrospun fibers correlate to their internal nanostructure. *Nano letters* 2013, *13*(11), 5056-5062.

<sup>166</sup>Kłos, J., Pakula, T. Computer simulations of a polyelectrolyte chain with a mixture of multivalent salts. *Journal of Physics: Condensed Matter* 2005, *17*(37), 5635.

<sup>167</sup>Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., Park, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International journal of food microbiology* 2010, *144*(1), 51-63.

<sup>168</sup>Menczel, J. W. B. J., Wunderlich, B. Heat capacity hysteresis of semicrystalline macromolecular glasses. *Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition* 1981, *19*(5), 261-264.