

INSTYTUT PODSTAWOWYCH PROBLEMÓW TECHNIKI
POLSKA AKADAMIA NAUK



**Wpływ warunków elektroprzewodzenia na strukturę
i właściwości jedno- i dwuskładnikowych nanowłókien
polimerowych stosowanych w inżynierii tkankowej**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Dorota Kołbuk

Praca wykonana pod kierunkiem

Dr hab. inż. Pawła Sajkiewicza, Prof. IPPT PAN

w Pracowni Fizyki Polimerów

Zakładu Teorii Ośrodków Ciągłych

WARSZAWA 2012

Rodzicom

Podziękowania

Serdeczne podziękowania promotorowi Prof. Pawłowi Sajkiewiczowi za podjęcie się opieki, cierpliwość oraz pomoc merytoryczną podczas przygotowywania rozprawy.

Wyrazy wdzięczności współpracownikom z Zakładu Mechaniki i Fizyki Płynów IPPT PAN za wszelką życzliwość.

Dr Giuseppino Fortunato, Dr Katharinie Maniura oraz Stefani Lischier dziękuję za uwagi w czasie realizacji badań prowadzonych w ramach stypendium SCIEX w EMPA w Szwajcarii.

Dziękuję również za konsultacje

Prof. Małgorzacie Lewandowskiej Szumieli oraz

Prof. Alinie Sionkowskiej.

Podziękowania wszystkim, którzy wierzyli i wspierali mnie podczas pracy nad tą rozprawą.

Abstract

It is possible to produce one- and two-components fibres in the electrospinning process for tissue engineering applications. The role of the artificial scaffold is to mimic collagen fibres from extracellular matrix in their structure and functions; guarantee growth, migration and proliferation during regeneration natural extracellular matrix.

The first aim of this study is to determine the effect of electrospinning process parameters on morphology, molecular and supermolecular structure of polycaprolactone fibres. Polycaprolactone has good mechanical properties and a relatively long time of degradation. Cytotoxicity, migration, adhesion and cells proliferation in-vitro had been analysed.

The second aim was determination of gelatin addition on the morphology, molecular and supermolecular structure of two-component fibres in terms of cytotoxicity, adhesion and cell proliferation. In comparison, blends with collagen had been prepared.

Fibre morphology is determined using Scanning Electron Microscopy (SEM); molecular structure- Fourier IR Spectroscopy (FTIR) and X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS); hydrophobicity in contact angle measurements; supermolecular structure (crystallinity and molecular orientation) from- Differential Scanning Calorimetry (DSC), Wide Angle X-ray Scattering (WAXS) and Polarizing-Interference Microscope (MPI); Young's modulus in the classical tensile test; in-vitro studies on mouse fibroblasts 3T3 (which are usually used to determine cytotoxicity of materials for medical applications according international norm) and on human MSC additionally. Morphology, spreading, adhesion and cells proliferation had been analysed after immunohistochemical staining on Fluorescence Microscopy and by DNA test.

Systematic studies enable to optimize process parameters to improve adhesion, proliferation and migration of selected cells types, on selected group of polymers. It was shown that the morphology and supermolecular structure of one-component fibres is mainly determined by parameters associated with solution and collector type. Gelatin addition results in significant changes in molecular and supermolecular structure- modifies crystallinity degree and reduces the molecular orientation (fibres collected on drum). It is shown that gelatin effectively reduces fibres hydrophobicity of fibres and is equivalent to collagen, cheap source of arginine-glycine-aspartic acid sequences (RGD) which increases cell adhesion during in-vitro studies. It can be explained by collagen denaturation in contact with polar solvents like hexafluoroisopropanol.

In polycaprolactone/gelatin blends ratio of gelatin to PCL was optimized from the point of view cells spreading, adhesion, activity and proliferation.

Streszczenie

Metoda elektroprzędzenia umożliwia formowanie jedno i dwuskładnikowych włókien, znajdujących zastosowanie w inżynierii tkankowej. Rolą sztucznego podłoża komórkowego jest tymczasowe odtworzenie funkcji włókien kolagenowych, umożliwienie prawidłowego wzrostu, migracji oraz proliferacji komórek do czasu regeneracji naturalnej matrycy międzykomórkowej.

Pierwszym celem pracy było określenie wpływu parametrów procesu elektroprzędzenia na morfologię, strukturę molekularną i nadmolekularną włókien jednoskładnikowych na przykładzie polikaprolaktonu, wyróżniającego się dobrymi właściwościami mechanicznymi oraz relatywnie długim czasem degradacji. Sprawdzono cytotoksyczność oraz proliferację komórek na wytworzonych podłożach w badaniach in-vitro.

Drugim celem było zbadanie wpływu dodatku żelatyny na morfologię oraz strukturę molekularną i nadmolekularną włókien dwuskładnikowych w kontekście cytotoksyczności, adhezji i proliferacji komórek. Porównawczo badania prowadzono na włóknach z dodatkiem kolagenu.

Morfologię włókien określono z użyciem skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM); strukturę molekularną- fourierowska spektroskopia w podczerwieni (FTIR) oraz rentgenowska spektroskopia fotoelektronów (XPS); hydrofobowość za pomocą pomiaru kąta zwilżania; strukturę nadmolekularną metodami różnicowej kalorymetrii skaningowej DSC, szerokokątowej dyfrakcji rentgenowskiej (WAXS) oraz polaryzacyjno-interferencyjnego mikroskopu optycznego (MPI); moduł Younga w klasycznej próbie rozciągania; badania komórkowe in-vitro przeprowadzono na liniach mysich 3T3 (używanych do określania cytotoksyczności materiałów do zastosowań medycznych zgodnie z obowiązującą normą) oraz dodatkowo na ludzkich MSC.

Przeprowadzone systematyczne badania pozwoliły na zoptymalizowanie parametrów elektroprzędzenia w celu poprawy adhezji, proliferacji oraz migracji wybranych typów komórek, na wybranej grupie polimerów. Wykazano, że na morfologię i strukturę nadmolekularną włókien jednoskładnikowych wpływ mają głównie parametry związane z roztworem oraz typ kolektora. Natomiast dodatek żelatyny znacznie zmienia strukturę nadmolekularną- modyfikuje stopień krystaliczności oraz obniża orientację molekularną w przypadku zbierania włókien na bęben. Pokazano, że żelatyna skutecznie zmniejsza hydrofobowość podłoża oraz jest równoważnym z kolagenem, tanim źródłem sekwencji aminokwasów arginina- glicyna- kwas asparginowy (RGD) podnoszących adhezję komórek w badaniach in-vitro. Ta ostatnia właściwość żelatyny wynika z faktu, że kolagen ulega denaturacji do żelatyny w silnie polarnym rozpuszczalniku jakim jest heksafluoroizopropanol.

W mieszankach polikaprolakton/żelatyna zoptymalizowano udział żelatyny dla dobrego rozplaszczania, adhezji, aktywności oraz proliferacji komórek.

Spis treści

1. WPROWADZENIE	4
2. PRZEGLĄD LITERATURY	7
2.1. Inżynieria tkankowa.....	7
2.2. Rola i funkcje ECM.....	9
2.3. Interakcje komórka- ECM	12
2.4. Sztuczne rusztowania komórkowe	13
2.5. Reakcje zachodzące na granicy faz komórka- rusztowanie komórkowe	14
2.6. Polimery wykorzystywane do formowania rusztowań komórkowych	15
2.6.1. Poliestry	15
2.6.2. Polimery naturalne.....	18
2.7. Metody wytwarzania rusztowań komórkowych.....	21
2.8. Modyfikacje podłoża komórkowych.....	23
2.9. Proces elektroprzędzenia	25
2.9.1. Aparatura	26
2.9.2. Podstawy procesu	26
2.9.3. Parametry procesu oraz ich wpływ na morfologię i strukturę włókien.....	29
2.9.3.1. Parametry roztworu	31
2.9.3.2. Parametry aparaturowe	37
2.9.3.3. Środowisko zewnętrzne.....	39
2.10. Wpływ dodatku biopolimeru na morfologię i strukturę włókien dwuskładnikowych	40
2.11. Hodowla komórek na włókninach formowanych metodą elektroprzędzenia.....	42
2.12. Krytyczne podsumowanie literatury	45
2.12. 1. Włókna jednoskładnikowe	45
2.12.2. Włókna dwuskładnikowe	47
3. CEL PRACY.....	48
4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	49
4.1. Materiały	49
4.2. Metoda formowania włókien	49
4.3. Metodyka badań	50
4.3.1. Analiza właściwości roztworów	51
4.3.2. Badania morfologii	51
4.3.3. Badania struktury molekularnej	52
4.3.4. Badania struktury nadmolekularnej.....	53

4.3.5. Właściwości mechaniczne	57
4.3.6. Badania biologiczne	57
4.3.6.1. Linie komórkowe: 3T3 oraz MSC.....	58
4.3.6.2. Cytotoksyczność i adhezja komórek	59
4.3.6.3. Stopień proliferacji komórek	60
4.4. Wyniki i dyskusja	60
4.4.1. Analiza włókien i włókniń jednoskładnikowych.....	60
4.4.1.1. Morfologia włókien przędzionych z różnych rozpuszczalników	60
4.4.1.2.1. Morfologia włókien zależnie od stężenia polimeru oraz napięcia	62
4.4.1.2.2. Struktura molekularna	66
4.4.1.2.3. Struktura nadmolekularna.....	67
4.4.1.2.4. Właściwości mechaniczne włókniń.....	72
4.4.1.2.5. Badania biologiczne z wykorzystaniem komórek 3T3 oraz MSC	73
4.4.1.3. Podsumowanie wyników badań włókien jednoskładnikowych	80
4.4.2. Analiza włókien i włókniń dwuskładnikowych.....	82
4.4.2.1. Właściwości roztworów	82
4.4.2.2. Morfologia włókien	84
4.4.2.3. Porowatość włókniń.....	87
4.4.2.4. Struktura molekularna.....	88
4.4.2.5. Struktura nadmolekularna.....	91
4.4.2.6. Właściwości mechaniczne	98
4.4.2.7. Badania biologiczne na komórkach 3T3 oraz MSC	99
4.4.2.8. Podsumowanie wyników badań włókien dwuskładnikowych.....	114
5. WNIOSKI KOŃCOWE.....	116
Dodatek 1.....	118
Dodatek 2.....	119
Spis rysunków	121
Spis tabel	124
Bibliografia.....	125

Spis skrótów

- 3T3**- linia fibroblastów mysich
- AFM**- mikroskop sił atomowych (*ang. Atomic Force Microscopy*)
- ATR**- wielokrotne odbicie osłabione (*ang. Attenuated Total Reflection*)
- CG**- przewodnictwo kontaktowe (*ang. Contact Guidance*)
- Col**- kolagen
- Da**- dalton
- DCM**- dichlorometan
- DMF**- dimetyloformamid
- DNA** - kwas deoksyrybonukleinowy (*ang. Deoxyribonucleic Acid*)
- DNA test**- test stopnia proliferacji na bazie fluorescencji środka bis-benzimidazol
- DSC**- skaningowa kalorymetria różnicowa (*ang. Differential Scanning Microscopy*)
- ECM**- macierz międzykomórkowa (*ang. Extracellular Matrix*)
- FA**- płytka przylegania (*ang. Focal Adhesion*)
- FM**- mikroskop fluorescencyjny (*ang. Fluorescence Microscopy*)
- FTIR** - fourierowska spektroskopia w podczerwieni (*ang. Fourier IR Spectroscopy*)
- Ge**- żelatyna
- HFIP**- heksafluoroizopropanol
- MPI**- mikroskop optyczny polaryzacyjno interferencyjny
- MSC**- ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste (*ang. Mesenchymal Stem Cells*)
- MTT**- test redukcji soli tetrazolowej (bromek 3-[4,5-dimetylotiazolo-2-ilo]-2,5-difenylo-tetrazolio-wy)
- M_w**- średnia wagowa masa cząsteczkowa
- M_n**- średnia liczbowa masa cząsteczkowa
- PAN**- poliakrylonitryl
- PBS**- sól fizjologiczna buforowana fosforanami (*ang. Phosphate Buffered Saline*)
- PCL**- polikaprolakton
- PEG/PEO**- politlenek etylenu
- PGA**- poliglikolid
- PHB**- polihydroksymaślan
- PLA**- polilaktyd
- PLCL**- kopolimer polilaktyd/polikaprolakton
- PLGA**-kopolimer polilaktyd/poliglikolid
- PU**- poliuretan
- PVA**- polialkohol winylowy
- RGD**- sekwencja aminokwasów arginina- glicyna- kwas asparaginowy
- SEM**- elektronowy mikroskop skaningowy (*ang. Scanning Electron Microscopy*)
- TCP**- płytka hodowlana (*ang. Tissue Culture Plastic*)
- TEM**- elektronowy mikroskop transmisyjny (*ang. Transmission Electron Microscopy*)
- TFE**- trifluoroetanol
- T_g**- temperatura zeszklenia
- w/w**- proporcje wagowo
- WAXS**- szerokokątowa dyfrakcja rentgenowska (*ang. Wide Angle X-ray Scattering*)
- XPS**- rentgenowska spektroskopia fotoelektronów (*ang. X-ray photoelectron Spectroscopy*)

1. WPROWADZENIE

Głównym składnikiem matrycy międzykomórkowej (*ang. Extracellular Matrix ECM*) są włókna kolagenowe tworzące trójwymiarowe rusztowanie dla komórek. Sztuczne podłoże komórkowe (*ang. scaffold*) ma na celu tymczasowe odtworzenie funkcji włókien kolagenowych, by umożliwić prawidłowy wzrost, migrację, proliferację komórek, a jednocześnie dać czas komórkom na wytworzenie własnej ECM. Morfologia, architektura, właściwości powierzchni- wpływająca na nie struktura molekularna oraz struktura nadmolekularna i bezpośrednio z nią związana sztywność materiałów używanych jako podłoża komórkowe są jednymi z istotnych właściwości mających wpływ na zachowanie komórek. Na konieczność łączenia wiedzy nauk biologicznych, chemii oraz fizyki w celu formowania funkcjonalnych podłoży do regeneracji tkanki, na początku lat 90 jako pierwszy zwrócił uwagę Langer [1].

W części literaturowej starano się wyjaśnić podstawowe zagadnienia i pojęcia inżynierii tkankowej, pokazać role i funkcje ECM w tkankach, mechanizmy interakcji komórek z macierzą (Rozdziały 2.1-2.3). W kolejnej części pokazano wymogi jakie muszą spełniać sztuczne (polimerowe) podłoża wykorzystywane w inżynierii tkankowej, reakcje jakie zachodzą na granicy faz komórka- podłoże komórkowe (Rozdziały 2.5 i 2.6). Krótko scharakteryzowano szeroko stosowane poliestry alifatyczne oraz biopolimery wykorzystywane w inżynierii tkankowej, ze szczególnym uwzględnieniem PCL, żelatyny oraz kolagenu (Rozdział 2.6). Poliestry alifatyczne wyróżniają się relatywnie długim czasem degradacji i dobrymi właściwościami mechanicznymi. Natomiast biopolimery takie jak kolagen, żelatyna, fibronektyna, w których naturalnie występują określone sekwencje aminokwasów np. RGD (arginina- glicyna- kwas asparaginowy), odpowiadające za przyczepność komórka-ECM w tkankach, podnoszą funkcjonalność podłoża w badaniach in-vitro. W inżynierii tkankowej obserwuje się duże zainteresowanie poliestrami także ze względu na biodegradację, dobre właściwości mechaniczne. Jednakże ich duża hydrofobowość utrudnia adhezję komórek. W celu podniesienia hydrofilowości do polimerów syntetycznych dodawane są biopolimery.

W Rozdziałach 2.7 i 2.8 krótko opisano metody formowania podłoży komórkowych oraz ich obróbki w celu podniesienia funkcjonalności w badaniach in-vitro.

W części dotyczącej procesu elektroprzędzenia wykazano, że proces ten jest wydajną metodą pozwalającą na wytworzenie włókien, kształtem i formą przypominających włókna kolagenowe w naturalnej ECM. Formowanie włókien wymaga optymalizacji parametrów

procesu, związanych z roztworem (polimer, rozpuszczalnik), aparaturą oraz środowiskiem zewnętrznym (Rozdział 2.9.3). Parametry te wpływają na morfologię oraz strukturę molekularną i nadmolekularną włókien.

Opis wpływu parametrów procesu na morfologię i strukturę molekularną oraz nadmolekularną podzielono na dwie części. Pierwsza dotyczy analizy włókien jednoskładnikowych (Rozdział 2.9.3), druga natomiast włókien dwuskładnikowych- polimer syntetyczny/biopolimer (Rozdział 2.10). W Rozdziale 2.11 przedstawiono wyniki badań nad wpływem parametrów procesu elektroprzędzenia na funkcjonalności włókien jako podłoża komórkowe w badaniach in-vitro.

W literaturze (Rozdziały 2.8-2.11), pomimo zgodności co do wpływu parametrów elektroprzędzenia na morfologię, topografię włókien oraz na proliferację i adhezję komórek na formowanych podłożach, brakuje systematycznych danych opisujących wpływ parametrów przędzenia na strukturę nadmolekularną oraz jej wpływ na funkcjonalność włókien w badaniach in-vitro (Rozdział 2.12). Odnalezione fragmentaryczne dane są niespójne, często sprzeczne. Analizowana jest najczęściej wyłącznie morfologia formowanych włókien.

W ostatnich kilku latach coraz bardziej liczne są próby podniesienia funkcjonalności podłoży poprzez dodatek do polimeru syntetycznego biopolimeru występującego naturalnie w ECM. Opis współdziałania obu składników na poprawę właściwości biologicznych formowanych włókien jest jednak bardzo fragmentaryczny. Nie ma danych opisujących mechanizmy oddziaływań w odniesieniu do hydrofilowości, mieszalności, struktury molekularnej i odpowiedzi komórek. Większość prac skupia się na analizie dodatku kolagenu i oparciu wzrostu proliferacji komórek o samą obecność kolagenu, bez analizy struktury molekularnej czy nadmolekularnej.

Niniejsza praca ma charakter eksperymentalny. W części doświadczalnej, w Rozdziałach 4.4.1 i 4.4.2 określono wpływ parametrów procesu elektroprzędzenia na morfologię, strukturę molekularną oraz nadmolekularną włókien jednoskładnikowych na przykładzie coraz częściej wykorzystywanego polikaprolaktonu, wyróżniającego się dobrymi właściwościami mechanicznymi oraz relatywnie długim czasem degradacji. Sprawdzone cytotoksyczność oraz proliferację komórek hodowanych na wytworzonych podłożach w badaniach in-vitro. Morfologię włókien określono z użyciem SEM; strukturę molekularną- FTIR oraz XPS; hydrofobowość za pomocą pomiaru kąta zwilżania; strukturę nadmolekularną metodami DSC, WAXS oraz MPI; moduł Younga w klasycznej próbie rozciągania. Badania komórkowe in-vitro przeprowadzono na liniach mysich fibroblastów

3T3 (używanych do określania cytotoksyczności materiałów do zastosowań medycznych zgodnie z obowiązującą normą) oraz dodatkowo na ludzkich mezenchymalnych komórkach macierzystych MSC.

Zbadano wpływ dodatku biopolimeru na morfologię oraz strukturę molekularną i nadmolekularną włókien dwuskładnikowych (Rozdział 4.4.2), w kontekście cytotoksyczności, adhezji i proliferacji komórek. Jako biopolimeru w pracy używano żelatyny, powszechnie dostępnej pochodnej kolagenu. Porównawczo badania prowadzono również na próbkach z dodatkiem kolagenu. W żelatynie, podobnie jak w innych białkach ECM występują sekwencje RGD podnoszące adhezję komórek.

Morfologię włókien dwuskładnikowych, podobnie jak jednoskładnikowych określono z użyciem SEM; strukturę molekularną- oddziaływanie charakterystycznych grup w PCL z grupami biopolimeru za pomocą FTIR oraz XPS; hydrofobowość za pomocą pomiaru kąta zwilżania; strukturę nadmolekularną- krystaliczność oraz orientację kryształów metodami DSC, WAXS; właściwości mechaniczne- moduł Younga w klasycznej próbie rozciągania. Badania cytotoksyczności, adhezji oraz proliferacji komórek na wytworzonych podłożach przeprowadzono na liniach 3T3 oraz porównawczo na MSC (Rozdział 4.4.2).

Przeprowadzone systematyczne badania pozwoliły na zoptymalizowanie parametrów elektroprzewodzenia w kontekście adhezji, proliferacji oraz migracji wybranych typów komórek, na wybranej grupie polimerów (wnioski końcowe w Rozdziale 5).

2. PRZEGLĄD LITERATURY

2.1. Inżynieria tkankowa

Inżynieria tkankowa jest młodą, dynamicznie rozwijającą się dziedziną nauki. Nowe możliwości regeneracji chorych lub uszkodzonych tkanek stworzone dzięki stosowaniu metod inżynierii tkankowej sprawiają, iż znajduje ona coraz szersze zastosowanie w medycynie [2]. Jej zaletami w stosunku do metod transplantologii oraz chirurgii rekonstrukcyjnej jest brak powikłań związanych z możliwością odrzutu przeszczepu. Dodatkowym atutem są niższe koszty leczenia oraz krótszy czas rekonwalescencji. Z rozwojem inżynierii tkankowej związane są zatem ogromne nadzieje pacjentów i lekarzy.

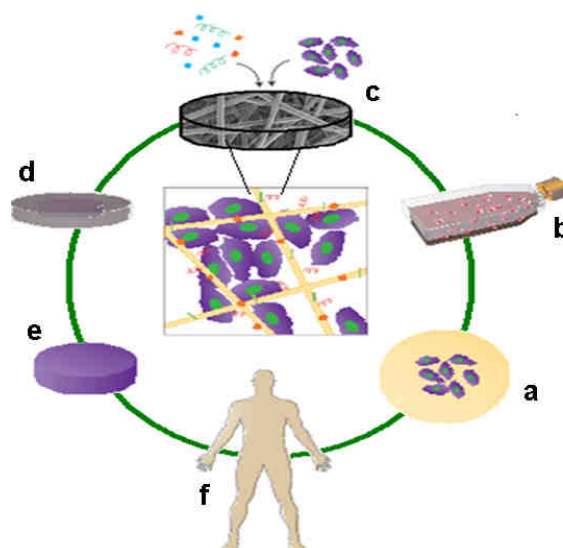
Inżynieria tkankowa jest interdyscyplinarną dziedziną, łączącą w sobie podstawy inżynierii, nauk przyrodniczych (biologia, biochemia, chemia) i medycznych w celu uzyskania biologicznych substytutów, które mają za zadanie regenerację, utrzymanie lub poprawę funkcji tkanek [1,3].

Na duże możliwości tego typu rozwiązań, jako pierwszy zwrócił uwagę Langer w 1993 roku. W pracy zatytułowanej „*Tissue Engineering*” opisał możliwości, jakie daje wykorzystanie biozgodnych, biodegradowalnych tworzyw sztucznych. Zwrócił uwagę na konieczność wytwarzania matryc zbliżonych swą architekturą- trójwymiarowością do naturalnej matrycy międzykomórkowej ECM, z jednoczesnym zachowaniem odpowiednich właściwości mechanicznych [1]. Inżynierię tkankową zdefiniował, jako interdyscyplinarną dziedzinę wykorzystującą osiągnięcia nauk przyrodniczych oraz nowoczesne technologie do konstruowania materiałów biologicznych mogących przywrócić, utrzymać i/lub usprawnić funkcjonowanie tkanek czy narządów.

Wyróżnić można trzy trendy w hodowli komórek [4]. W pierwszym, wykorzystuje się wyizolowane komórki lub substrat komórek wszczepiając je bezpośrednio w celu regeneracji uszkodzonej tkanki lub narządu. Inną metodą jest wstrzyknięcie czynników indukujących wzrost, odbudowę tkanki- czynników wzrostu, różnicowania się. Obie te metody mają jednak bardzo ograniczone możliwości; wykorzystywane mogą być tylko w przypadku niewielkich ubytków i dysfunkcji tkanek. Dającym najwięcej możliwości rozwiązaniem jest hodowla in vivo komórek na trójwymiarowych rusztowaniach.

Metoda ta obejmuje izolację komórek, namnażanie w środowisku in- vitro, wysiew i hodowlę komórek na trójwymiarowych podłożach (rusztowaniach). W kolejnym etapie całość jest umieszczana w bioreaktorze, w którym w odpowiednim środowisku

czynników wzrostu i pożywek hodowlanych następuje wzrost i proliferacja komórek. Tak przygotowane podłoże może zostać wszczepiane w miejsce ubytku określonej tkanki (Rysunek 1) [4].



Rysunek 1. Etapy w badaniach in-vitro: a) pobranie komórek od pacjenta b) namnażanie komórek in-vitro w butelce hodowlanej c) posiew komórek wraz z czynnikami wzrostu na rusztowaniach komórkowych 3D, d) hodowla komórek na rusztowaniach w warunkach in-vitro e) hodowla w bioreaktorach, e) transplantacja produktu inżynierii tkankowej w celu odbudowy ubytku u pacjenta

Materiały, które przeznaczone są do zastosowań medycznych, podlegają określonym badaniom chemicznym oraz fizykochemicznym. Kolejny etap obejmuje badania biologiczne opisane w normie ISO 10993-5 "Badania cytotoksyczności: metody in-vitro" [5], a także w europejskiej normie Farmakopee [6]. Badania biologiczne in-vitro materiałów obejmują zazwyczaj określenie stopnia cytotoksyczności, adhezji, proliferacji, niekiedy różnicowanie na liniach komórkowych zatwierdzonych i przechowanych w Europejskiej Kolekcji Hodowli Komórek (ECACC) lub Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórek (ATCC).

Stosowane linie komórkowe można podzielić na 2 grupy: linie komórkowe ciągłe oraz linie pierwotne. Linie komórkowe ciągłe charakteryzują się nieograniczonym czasem życia. Są to komórki nowotworowe, wyróżniające się nieskończoną zdolnością pasażowania (prolifracji), powtarzalnością genotypu. Na nich przeprowadza się badania cytotoksyczności. Do tej grupy należą mysie fibroblasty 3T3 (CCL 163 (Balb/3T3 clone A31) oraz wiele innych [5].

Linie komórkowe pierwotne są znacznie trudniejsze w hodowli, co wynika z określonego czasu życia (określona liczba pasaży po której komórki ulegają odróżnicowaniu).

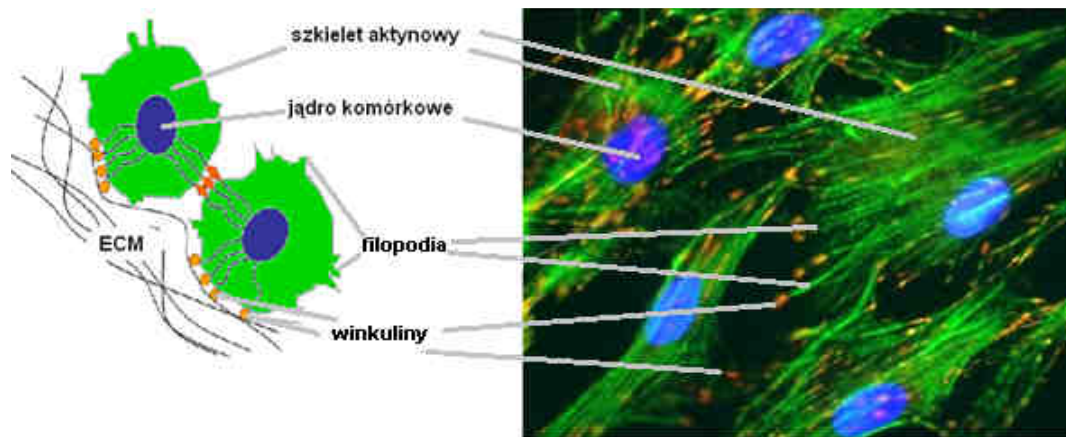
Na szczególną uwagę zasługują mezenychmalne komórki macierzyste (nazywane także komórkami pnia) należące do komórek pierwotnych. Wyróżnia je brak zróżnicowania oraz zdolność do nieograniczonej liczby podziałów, dających w efekcie komórki o wyższym stopniu specjalizacji. Dzieli się je na zarodkowe oraz somatyczne (dawcą jest dorosły organizm). Mezenychmalne komórki macierzyste mają ograniczoną zdolność do różnicowania tj. tylko w ściśle określone typy komórek np. w komórki kostne.

2.2. Rola i funkcje ECM

Jak się przekonali naukowcy z początku XX wieku, hodowla tkanek jest znacznie trudniejsza niż hodowla komórek. Na płaskim podłożu butelki hodowlanej komórki po pewnym czasie dezorganizują się i obumierają. Jak zatem wzrost komórek wygląda w tkankach żywych organizmów?

Najbardziej podstawowymi interakcjami w organizmach wielokomórkowych są reakcje odpowiedzialne za utrzymywanie komórek razem. Jest to możliwe dzięki połączeniom komórka-komórka oraz komórka-substancja międzykomórkowa (*ang. Extracellular Matrix ECM*) [7]. Adhezję międzykomórkową, komórka-ECM, zapewniają integryny obecne na powierzchni błon komórkowych oraz białkowe i polisacharydowe łańcuchy obecne w ECM.

Komórka stanowi najmniejszą, zorganizowaną jednostkę żywej materii. Aktywny szkielet utrzymuje określony kształt komórki, a jądro komórkowe zawiera informację genotypu komórkowego (DNA). Związane z punktami adhezji białka, tworzące płytkę przylegania (*ang. Focal Adhesion-FA*), takie jak winkuliny, tworzą system połączeń pomiędzy komórką a ECM [8,9]. Włókna szkieletu aktynowego (*ang. stress fibres*) odpowiadają za komunikację wewnątrzkomórkową oraz umożliwiają przenoszenie obciążeń z komórki na włókna ECM. Filopodia czyli wypustki błony cytoplazmatycznej tworzone są podczas migracji komórek [10,11].



Rysunek 2. Wizualizacja komórki z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego [na podstawie ⁴]

Namnażanie komórek, tzw. proliferacja następuje w procesie mitozy. Namnożone dwie komórki z jednej, ulegają ponownym podziałom, prowadzącym do powstania populacji (zbioru) komórek.

W regulowaniu proliferacji poprzez wpływanie na zapoczątkowanie i przebieg cyklu komórkowego bardzo ważną rolę odgrywają zjawiska kontaktowe oraz substancje biologicznie czynne działające poprzez płyny tkankowe [¹²].

ECM jest złożonym kompleksem makrocząsteczek włóknistych takich jak kolagen i elastyna oraz substancji podstawowej zbudowanej z:

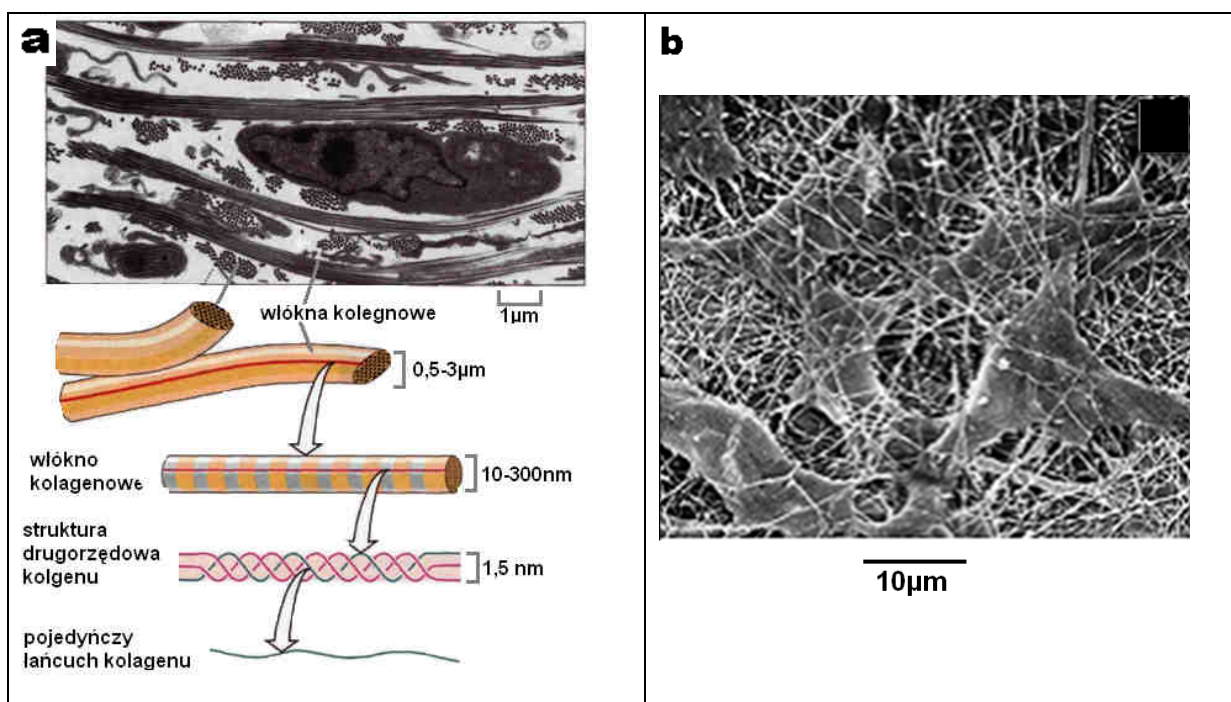
- glikoprotein: fibronektyna (mechanizm działania szczegółowo opisany w pracy [¹³]), fibrylina, entaktyna
- glikozaminoglikanów: kwas hialuronowy, siarczany (chondroidyny, heparany, heparyny, kerataniny)

ECM bierze udział w transdukcji sygnałów między komórkami, utrzymaniu ich kształtu, w procesach migracji i wzroście komórek. Poza rolę ściśle biologiczną, nadaje tkance również odpowiednie funkcje mechaniczne. Włókna kolagenowe zapewniają wytrzymałość na rozciąganie; pozostałe związki wypełniają wolne przestrzenie i zapobiegają kompresji [¹⁴]. Głównym składnikiem włóknistym ECM jest kolagen. Można wyróżnić ok. 20 typów kolagenu, jednakże kolagen typu I stanowi 70-90% całego kolagenu występującego w organizmie. W tkankach, włókna kolagenowe zapewniają właściwości wytrzymałościowe oraz podtrzymują funkcje biologiczne [¹⁵].

Charakterystycznymi cechami typowej cząsteczki kolagenu jest jej długość, sztywność oraz trójniciowa skręcona struktura, w której trzy łańcuchy polipeptydowe są skręcone wokół siebie. Uporządkowane struktury drugorzędowe, o średnicy 10-300 nm i długości wielu mikrometrów, mogą łączyć się w jeszcze grubsze włókna kolagenowe (struktura

trzeciorzędowa) (Rysunek 3a). Kolagen typu I składa się z dwóch łańcuchów $\alpha 1$ oraz jednego $\alpha 2$ [4].

Komórki znajdujące się w tkance łącznej, na drodze złożonych procesów, są w stanie wytworzyć kolagen; następnie porządkują go tworząc macierz międzykomórkową (Rysunek 3b). Podczas tworzenia kolagenu wszystkie cząsteczki są syntetyzowane wewnątrz komórek i wydzielane na drodze egzocytozy. Jeżeli agregaty te powstawałyby jeszcze przed wydzielaniem, komórki zablokowałyby się własnymi produktami. W przypadku kolagenu komórka omija to niebezpieczeństwo dzięki sekrecji cząsteczek kolagenu w formie prekursorowej, zwanego prokolagenem, z dodatkowymi peptydami na końcach cząsteczki, zapobiegającymi agregacji we włókienka kolagenowe. Zewnątrzkomórkowy enzym (kolagenaza) odcina końcowe peptydy, co pozwala agregować cząsteczkom dopiero w przestrzeni pozakomórkowej [14].



Rysunek 3. Kolagen w tkankach: a) włókna kolagenowe w naturalnej tkance (przekrój poprzeczny) oraz schemat budowy kolagenu [16], b) włókna kolagenowe oraz fibroblasty rogówki szczura [17]

Macierz pozakomórkowa wytwarzana jest przez następujące typy komórek:

- fibroblasty- w większości tkanek; trójwymiarowa sieć, która rozciąga się pomiędzy komórką narządu a naczyniami włosowatymi i chłonnymi
- chondrocyty- chrząstki
- osteoblasty- kości
- miofibroblasty-wytwarzają składniki substancji pozakomórkowej
- adipocyty (komórki tłuszczowe) - gromadzą lipidy

2.3. Interakcje komórka- ECM

Wyróżnić możemy dwa rodzaje połączeń występujących w tkankach: połączenia komórka-ECM oraz połączenia komórka-komórka. Połączenia te możemy podzielić również na trzy grupy, zgodnie z pełnionymi funkcjami:

- zwierające- desmosomy i hemidesmosomy (zapewniają odporność mechaniczną). Z punktu widzenia połączeń komórka ECM stanowią najbardziej istotną grupę połączeń.
- komunikacyjne jonowo-metaboliczne (pozwalają przechodzić cząsteczkom pomiędzy komórkami).
- zamykające/nieprzepuszczalne (tworzą nieprzepuszczalną, integralną barierę) [12].

Połączenia zwierające bezpośrednio uczestniczą w interakcjach komórka-macierz. Połączenia te zachodzą przy udziale struktur takich jak: filamety aktynowe cytoszkieletu; płytkowe struktury łączące filamety z błonami; składniki błonowe bezpośrednio zaangażowane w proces przylegania. W każdym z tych typów znajdują się wyspecjalizowane białka adhezyjne. Do białek adhezyjnych należą: integryny, kadheryny, cząsteczki należące do nadrodziny immunoglobulin oraz selektyny [14].

Integryny stanowią najbardziej istotną grupę białek biorących udział w interakcji komórka-ECM [18]. Są one heterodimerycznymi receptorami, o dwóch podjednostkach powiązanych niekowalencyjnie. Wyróżnia się podjednostkę alfa, zbudowaną z około 1000 aminokwasów oraz podjednostkę beta w skład, której wchodzi około 750 aminokwasów. Każda podjednostka jest typem śródbłonowych glikoprotein. Integryny obejmują rodzinę około 20 receptorów o zróżnicowanej swoistości. Charakteryzuje je niska specyficzność, dzięki czemu mogą one wiązać kilka różnych spokrewnionych cząsteczek macierzy. Właściwości te umożliwiają integrynom zarówno uczestnictwo w interakcjach międzykomórkowych jak i wiązaniach typu komórka-macierz. Jednym z czynników niezbędnych do funkcjonowania integryn jest obecność dwuwartościowych kationów wapnia i magnezu [14].

Do białek macierzy, które wiążą się z integrynami należą: fibronektyna, laminina, kolagen i witronektyna. Wiążą one również białka osocza, trombinę i fibrynogen, cząsteczki immunoglobulinopodobne. Integryny wiążą krótkie sekwencje aminokwasowe swoich ligandów z sekwencjami aminokwasów obecnych w ECM takimi jak RGD (arginina- glicyna- kwas asparaginowy) i jej modyfikacje [11].

Z integrynami po stronie komórki związane są białka adhezyjne, między innymi winkuliny, tworząc kompleksy FA [4].

2.4. Sztuczne rusztowania komórkowe

Pojęciem podłoża komórkowego (rusztowania) (ang. scaffold) określa się zewnętrzną matrycę ECM otaczającą komórki w tkankach. Jej głównym zadaniem jest fizyczne wspieranie komórek oraz regulacja ich namnażania, różnicowania i morfogenezy [19]. Naturalna regeneracja uszkodzonych tkanek jest praktycznie niemożliwa, jeśli komórki nie są zaopatrzone w substytut ECM. W miejscu uszkodzenia tkanki umieszcza się rusztowanie komórkowe, na którym w warunkach in-vitro zostały uprzednio wysiane i namnożone komórki danej tkanki.

Sztuczne podłoże komórkowe w odtworzeniu tkanki spełnia wiele istotnych funkcji [20,21]:

- Mechaniczna podpora dla komórek i tkanek,
- Scalanie komórek tkanki,
- Wpływanie na kształt i ruch komórek,
- Wpływanie na rozwój i różnicowanie się komórek,
- Kierowanie funkcjami komórek poprzez specyficzne sygnały (komórkowe receptory adhezyjne).

Polimery wykorzystywane na rusztowanie komórkowe powinny charakteryzować się:

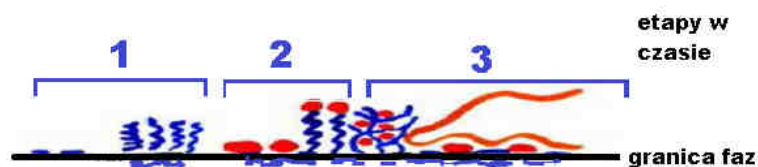
- Biokompatybilnością- cecha określająca wszystkie materiały, które mają kontakt z tkanką; materiał w obecności tkanki powinien pozostać nietoksyczny i nie wywołać reakcji systemu immunologicznego [22].
- Bioresorbowalnością- zdolność biomateriału do rozłożenia się drogą aktywności komórkowej i w konsekwencji do częściowego lub całkowitego zaniku [23]. Bioresorbowalne polimery charakteryzuje określony czas biodegradacji do niecytotoksycznych i łatwych do usunięcia produktów rozkładu (zgodnie z 9 częścią normy PN-EN ISO 10993 [5]). Degradacja podłoży komórkowych powinna przebiegać w sposób kontrolowany. Zbyt szybka degradacja może powodować nie tylko przedwczesną utratę własności mechanicznych, lecz także uwalnianie w krótkim czasie znacznej ilości produktu degradacji, przekraczającej zdolność organizmu do jego wydalania. Bezpośrednim tego skutkiem jest wówczas przedłużający się stan zapalny. Z drugiej jednak strony degradacja materiału nie powinna być zbyt powolna. W warunkach optymalnych, implant polimerowy powinien ulegać stopniowej resorpcji, przebiegającej zgodnie z postępującym procesem odnawiania tkanki [24].
- Odpowiednimi właściwościami mechanicznymi- właściwymi charakterystycznymi dla danego typu tkanki. Do celów aplikacji tkanki miękkiej: mięśni, naczyń krwionośnych itp.

najczęściej używane są polimery. Uzupełnianie ubytków w tkance twardej wymaga zastosowania polimerów, ceramiki, a nawet metali o znacznie wyższych właściwościach mechanicznych [6]. Dobrymi właściwościami mechanicznymi charakteryzują się polimery syntetyczne. Należą do nich m.in. poliestry.

- Określonymi właściwościami powierzchniowymi, w tym także strukturą chemiczną wpływającą na adhezję komórka- podłoże komórkowe [4] (więcej w Rozdziale 5)
- Wysokim stopniem porowatości otwartej, umożliwiającej swobodną migrację komórek, dostarczenie komórkom składników odżywczych i usuwanie produktów metabolizmu komórek [4].

2.5. Reakcje zachodzące na granicy faz komórka- rusztowanie komórkowe

Interakcja pomiędzy komórką a ECM odgrywa kluczową rolę w zachowaniu komórek w tkankach oraz na powierzchni polimerów wykorzystywanych jako podłoże (rusztowanie) komórkowe. Te interakcje modulują wiele aspektów zachowania komórek: rozplaszczanie, migrację, proliferację, różnicowanie, metabolizm. Podczas opracowywania nowych metod formowania materiałów wykorzystywanych w inżynierii tkankowej, fundamentalne zrozumienie interakcji na granicy faz komórka-materiał wydaje się bardzo istotne. Złożoność zachodzących zjawisk czyni to zadanie niełatwym. Przewidzenie i kontrola reakcji pomiędzy komórką a materiałem wciąż nie jest całkowicie wyjaśniona, mimo wielu prac doświadczalnych i modelowych [25].



Rysunek 4. Zjawiska zachodzące na granicy komórka- materiał (na podstawie [26])

Zjawiska zachodzące na granicy komórka- materiał można podzielić na trzy etapy (Rysunek 4) [7, 26, 27]:

- 1) Pierwszy etap obejmuje zwilżanie materiału, tzw. preadsorpcja (w warunkach in-vitro przez medium hodowlane) oraz adsorpcję białek. Zjawiska te zachodzą w ciągu kilku sekund po wysianiu komórek.
- 2) Drugi etap związany jest z powstawaniem wiązań komórka- materiał. Zachodzi on w dłuższym czasie i jest etapem nieodwracalnym. Siły adhezji związane są z siłami van

der Walssa, z oddziaływaniem hydrofobowym pomiędzy komórką a warstwą zaabsorbowanych białek na powierzchni. W zależności od odległości komórki od powierzchni biomateriału role zaczynają odgrywać receptory białkowe- intergryny występujące w błonie komórkowej.

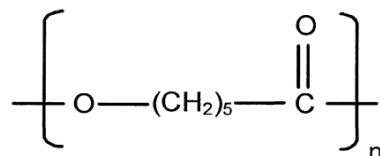
- 3) W miejscu zakotwiczenia integrzyn tworzą się kompleksy białkowe (FA), które są pomostem łączącym integralny z włóknami aktynowymi szkieletu komórkowego. Po kilku godzinach komórki ulegają rozpląszczeniu na materiale, zaczynają proliferować, migrować, a po kilku dniach-tygodniach mogą również się różnicować.

2.6. Polimery wykorzystywane do formowania rusztowań komórkowych

W inżynierii tkankowej wykorzystuje się biodegradowalne polimery syntetyczne: PCL, PLA, PGA, ich kopolimery, rzadziej: PHB, PU oraz polimery naturalne (biopolimery) np.: kolagen, żelatyna, fibrynogen, chitozan [4, 28]. W ostatnich latach, w celu podniesienia funkcjonalności, formowane są również podłoża komórkowe z mieszanin polimerów syntetycznych oraz biopolimerów.

2.6.1. Poliestry

Polikaprolakton (PCL) należy do grupy liniowych, niepolarnych polimerów biodegradowalnych. Jest wysokokrystalicznym poliestrem o temperaturze topnienia 60 °C oraz temperaturze zeszklenia -60°C. Degradacja PCL zachodzi znacznie wolniej niż degradacja PLA. Dlatego też PCL jest często wykorzystywany jako długoterminowy implant czy podłoże komórkowe [29, 30]. Ze względu na dobre właściwości mechaniczne oraz stosunkowo długi czas degradacji zainteresowanie PCL stale rośnie.

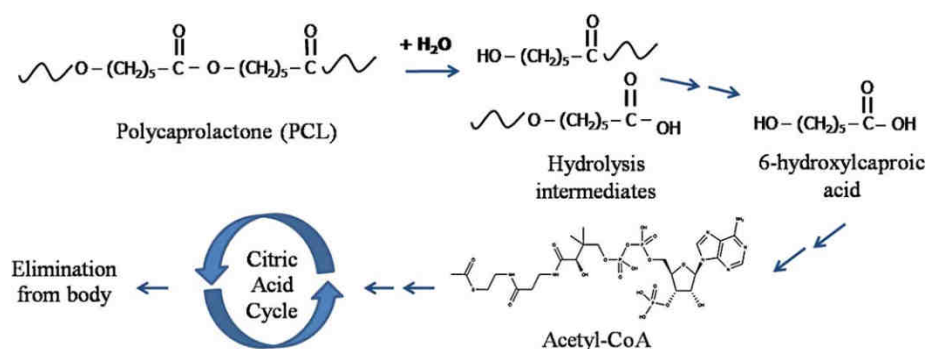


Rysunek 5. Struktura chemiczna polikaprolaktonu

Reakcja polimeryzacji kaprolaktonu przebiega kilkuetapowo. W pierwszym etapie następuje zainicjowanie reakcji. W kolejnym etapie, po dostarczeniu odpowiedniej ilości monomeru oraz katalizatora, następuje dalszy wzrost łańcucha polimerowego, aż do uzyskania pożądanej masy cząsteczkowej polimeru.

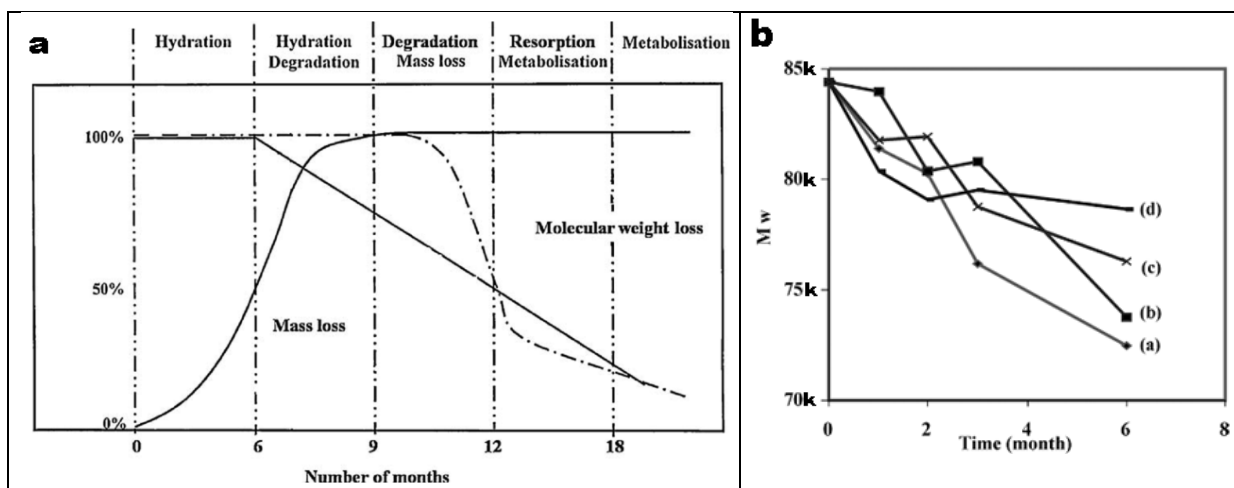
Obecnie, dopracowane przez producentów technologie produkcji PCL, pozwalają na uzyskiwanie znacznego skrócenia czasów przebiegu reakcji oraz umożliwiają kontrolowanie mas cząsteczkowych uzyskiwanych polimerów.

Degradacja PCL zachodzi poprzez hydrolizę masową. W pierwszym etapie następuje hydroliza PCL do 6-hydroksyowego kwasu kapronowego i acetylu koenzymu A, w kolejnym ich usuwanie z organizmu podczas cyklu kwasu cytrynowego (Rysunek 6) [31].



Rysunek 6. Degradacja PCL poprzez masową hydrolizę pośrednio do 6-hydroksyowego kwasu kapronowego i acetylu koenzymu A które są usuwane z organizmu podczas cyklu kwasu cytrynowego [31]

Na rysunku 7a przedstawiono masową i molekularną utratę wagi w czasie dla PCL [32]. Reakcje zachodzą etapowo: wstępne nawodnienie (0-6 miesięcy), degradacja poprzez hydrolizę oraz utratę masy (6-12 miesięcy), resorpcja (po 12 miesiącach) i metabolizm (po 18 miesiącach).

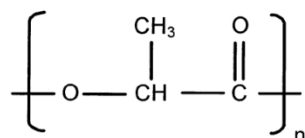


Rysunek 7. a) Schemat masowej i molekularnej utraty wagi w czasie degradacji PCL. b) Zmiany w Mw w wyniku degradacji w warunkach in-vitro włókien przedzionych z różnym dodatkiem DMF, o różnej średnicy (a) średnica włókien 196 nm [32]; (b) średnica włókien 250 nm; (c) średnica włókien 300 nm; (d) średnica włókien 689 nm [33]

Czas degradacji w warunkach in-vivo oraz in-vitro zależy silnie od średniej średnicy włókien- im cieńsze włókna tym krótszy czas degradacji. (Rysunek 7b) [33].

Czas degradacji PCL w warunkach in vivo jest nieco dłuższy niż w warunkach in-vitro i wynosi ok. 24-36 miesięcy [28].

Polilaktyd (PLA) jest drugim co do popularności poliestrem używanym w inżynierii tkankowej. W warunkach in-vitro ulega biodegradacji w wyniku hydrolizy. Występuje w kilku izomerycznych odmianach: semi-krystaliczny D(-) (PDLA), semi-krystaliczny L(+) (PLLA) oraz amorficzny D,L (PDLLA).



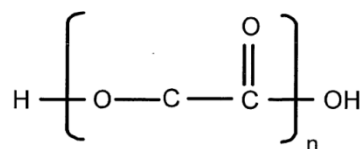
Rysunek 8. Struktura chemiczna PLA

PLLA degraduje w wyniku hydrolizy, w wyniku której powstaje kwas mlekowy. Badania wskazują, że na skutek biodegradacji, PLLA degraduje do L(+) kwasu mlekowego (substancji, które są obecne w ludzkim ciele), dlatego też jest on częściej używany w aplikacjach inżynierii tkankowej niż PDLA [34]. W organizmie kwas mlekowy L(+) przechodzi do wątroby, tam jest konwertowany do kwasu pirogronowego i po reakcji z kwasem cytrynowym rozpuszczany jest do wody i dwutlenku węgla [35]. Polilaktyd znalazł szerokie zastosowanie w inżynierii biomedycznej. Podczas degradacji wydzielany kwas mlekowy prowadzi do obniżenia pH środowiska sąsiadującego z polimerem. Takie zakwaszenie środowiska może mieć negatywny wpływ na zachowanie komórek, prowadząc nawet do stanów zapalnych [36]. Ponadto, regiony o wysokiej krystaliczności mogą nierównomiernie biodegradować prowadząc do wywołania stanu zapalnego otaczających tkanek. Nie zanotowano jednak tego zjawiska przy małych objętościach użytego jako podłoża komórkowe tego materiału. Część źródeł wskazuje na brak jakiegokolwiek inwazyjności produktów biodegradacji PLA.

Biodegradacja PLLA w warunkach in-vitro zachodzi w ciągu kilku lat, natomiast w warunkach in-vivo znacznie szybciej, tj. w ciągu 8-10 miesięcy [31]. Czas degradacji zależy silnie od masy cząsteczkowej, polidispersji, procesu przetwarzania oraz architektury podłoża [37]. PLLA w porównaniu do PDLA charakteryzuje się lepszymi właściwościami mechanicznymi dzięki krystaliczności (10-40%), większej od krystaliczności PDLA oraz wysokiej temperaturze topnienia wynoszącej 65°C [38].

Poliglikolid (PGA) jest biodegradowalnym poliestrem alifatycznym. Został wykorzystany do produkcji nici chirurgicznych w 1960 roku przez firmę Dexon. PGA jest polimerem

wysokokrystalicznym (45-55%) o temperaturze topnienia 220-225°C i temperaturze zeszklenia (Tg) równej 35-40°C. Charakteryzuje się wysoką wytrzymałością i stosunkowo krótkim czasem degradacji. Ze względu na duży udział fazy krystalicznej jest on nierozpuszczalny w większości rozpuszczalników organicznych, z wyjątkiem perfluorowanych alkoholi.



Rysunek 9. Struktura chemiczna PGA

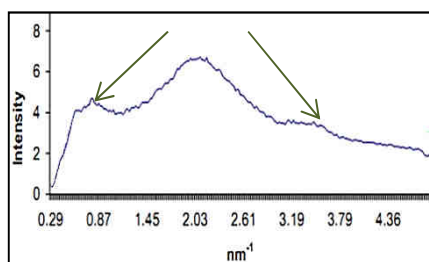
Kopolimery poliestrów są często komponowane w celu powiązania właściwości obu polimerów. Przykładowo połączenie PCL i PLA umożliwia wytworzenie polimeru o dobrych właściwościach mechanicznych i krótszym czasie degradacji niż w przypadku czystego PCL.

2.6.2. Polimery naturalne

Polimery naturalne stosowane w inżynierii tkankowej to przykładowo cieszący się dużym zainteresowaniem kolagen, żelatyna, elastyna oraz fibronektyna.

Kolagen typu I jest głównym składnikiem włóknistym tkanek, dlatego większość prac eksperymentalnych skupia się na analizie tego typu biopolimeru. Kolagen jako składnik ECM wyróżnia się niską antygenowością, brakiem cytotoksyczności, wysokim powinowactwem do wody, dobrą kompatybilnością komórkową, dość dużą dostępnością z różnych źródeł [39]. Jak każde białko, kolagen składa się z kilkudziesięciu aminokwasów połączonych wiązaniami peptydowymi.

Kolagen wykazuje częściową, niewielką krystaliczność związaną z drugorzędowością struktury. Rysunek 10 obrazuje profil radialny rentgenogramów WAXS kolagenu pochodzącego ze ścięgien szczurów [40].



Rysunek 10. Profil radialny z rentgenogramu WAXS kolagenu z ogonów szczurzych, z pikami pochodzącymi od kryształów w 0,84 oraz 3,5 nm⁻¹ oraz amorficznym halo z maksimum w 2,1 nm⁻¹ [40]

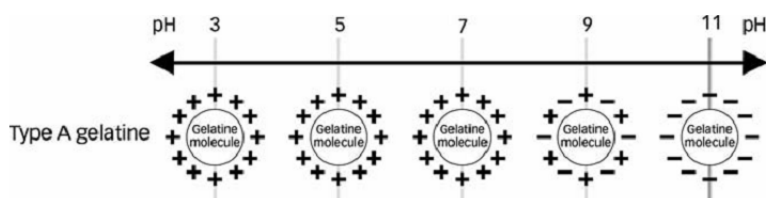
Struktura chemiczna (rodzaje grup aminokwasowych) kolagenu typu I jest bardziej zbliżona do żelatyny typu A niż żelatyny typu B (Tabela 1). Kolagen jest materiałem bardzo wrażliwym na temperaturę, pH środowiska [41] oraz wilgotność. W pracach na temat białek podejrzewa się denaturację kolagenu w środowisku silnie polarnych rozpuszczalników takich jak HFIP, TFE [42]. Degradacja enzymatyczna kolagenu w środowisku in-vitro zachodzi w ciągu 2-24 tygodni, zależnie od jego stopnia usieciowania.

Tabela 1. Aminokwasy: rodzaje, ilość (na 1000) oraz polarność występujące w żelatynie ze świńskiej skóry typu A i B oraz kolagenie bydłęcym [43, 44]

Aminokwas	Żelatyna typu A	Żelatyna typu B	Kolagen typu I (bydłęcy)	Polarność, łańcuchy boczne
Alanina	112	117	114	Niepolarna, alifatyczna
Arginina	49	48	51	Zasadowa, aminowa
Aspargina	16	0	16	Polarna, amidowa
Kwas asparginowy	29	46	29	Kwas, karboksylowa
Kwas glutaminowy	48	72	48	Kwas, karboksylowa
Glutamina	25	0	25	Polarna, amidowa
Glicyna	330	335	332	Niepolarna
Histydyna	4	4,2	4,4	Polarna, imodozol
Hydroksyprolina	91	93	104	Cykliczna, alifatyczna
Hydroksylizyna	6,4	4,3	5,4	Zasada, aminowa
Izoleucyna	10	11	11	Niepolarna, alifatyczna
Leucyna	24	24,3	24	Niepolarna, alifatyczna
Lizyna	27	28	28	Zasadowa, aminowa
Metionina	3,6	3,9	5,7	Niepolarna
Phenylalanine	14	14	13	Aromatyczna, niepolarna
Prolina	132	124	115	Cykliczna, aromatyczna
Seryna	35	33	35	Hydoksylowa, polarna
Treonona	18	18	17	Hydoksylowa, polarna
Tyrozyna	2,6	1,2	4,4	Aromatyczna, polarna
Walina	26	22	22	Niepolarna, aromatyczna

Z danych literaturowych wynika, że, rzędowość kolagenu się za pomocą FTIR [45], można jednak spotkać się również z opinią o małej wiarygodności tych wyników [46].

Żelatyna (Ge) powstaje w wyniku denaturacji kolagenu. W przypadku denaturacji w środowisku kwaśnym mówi się o Ge typu A, natomiast w zasadowym o żelatynie typu B [47]. Punkt izoelektryczny Ge typu A mieści się w zakresie 6- 9 pH, natomiast Ge typu B 4,7- 5,6 pH..Oznacza to, że przykładowo dla żelatyny typu A ładunek całkowity cząsteczki wynosi zero przy 6-9 pH. Poniżej tego punktu pewne grupy Ge mogą przyjmować ładunek dodatni, a powyżej ujemny. Wynika z tego, że Ge jest bardzo wrażliwa na pH środowiska (Rysunek 11).



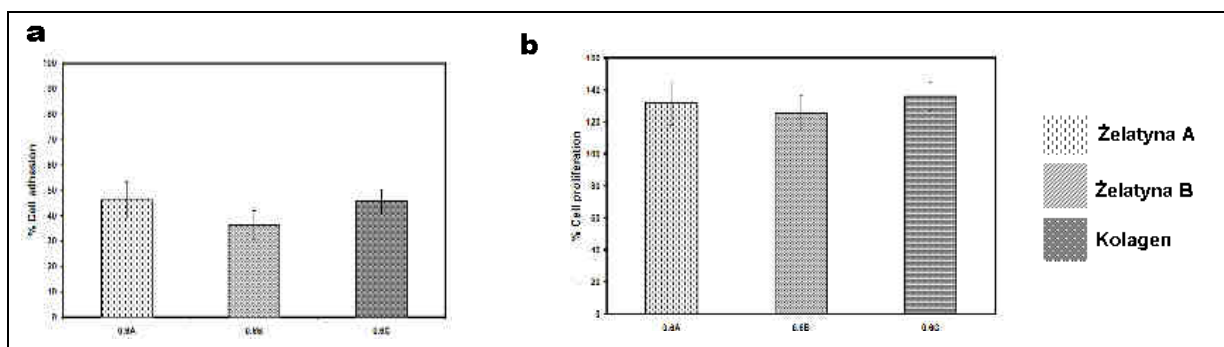
Rysunek 11. Naładowanie makrocząsteczek żelatyny przy różnym pH [47]

Temperatura zeszklenia Ge zależy silnie od jej rodzaju oraz zawartości wilgoci. Dla żelatyny typu A ze świńskiej skóry przechowywanej w warunkach pokojowych wyznaczono, że T_g wynosi ok $48,8^\circ\text{C}$ [48].

Ge pod wpływem wody ulega spęcznieniu, dlatego aby zmniejszyć ten efekt poddaje się ją sieciowaniu chemicznemu np. genipiną, glutaraldehydem [49]. Genipina jest środkiem naturalnym, nietoksycznym, dlatego sieciowanie nią poleca się w zastosowaniach biomedycznych polimerów.

W wielu pracach podejmowane są próby sieciowania Ge czy kolagenu metodami chemicznymi i fizycznymi. W wielu wypadkach metody te są jednak niewystarczające, aby po usieciowaniu struktury 3D mogły zachować swój kształt w warunkach in-vitro. Poliestry mogą być wystarczającym czynnikiem stabilizacji makrocząsteczek żelatyny, przy zachowaniu odpowiedniej proporcji obu składników [50].

Pojawiają się nieliczne prace starające się porównać pozytywny wpływ Ge i kolagenu na proliferację komórek. Różnice w stopniu proliferacji mysich fibroblastów hodowanych na podłożach z Ge typu A, Ge typu B oraz kolagenu są niewielkie (Rysunek 12) [51].



Rysunek 12. Adhezja a) i proliferacja b) fibroblastów na podłożach żelatynowych i kolagenowych [51]

Elastyna jest nierozpuszczalnym w wodzie biopolimerem, obojętnym chemicznie, składających się z kilku kowalencyjnie połączonych cząsteczek. Odgrywa znaczącą rolę w tkankach, w których elastyczność jest kluczowa. Zatem jest głównym składnikiem ścian tętnic, żył, więzadeł, płuc, oraz jelit. Zazwyczaj tkanki zawierające elastynę zawierają również kolagenowe włókna. W inżynierii tkankowej jest znacznie rzadziej stosowana niż kolagen [52].

Fibronektyna jest glikoproteina występującą w ECM, odpowiedzialną za interakcje z integrzynami. We krwi występuje w postaci globularnego białka biorącego udział wraz z fibryną w procesie odbudowy zniszczonej tkanki. Wykorzystuje się ją jako dodatek podczas formowania podłoża komórkowych [4, 26].

2.7. Metody wytwarzania rusztowań komórkowych

Struktura naturalnego ECM jest wzorem do innowacyjnego wykorzystywania, przekształcania, udoskonalania metod produkcji włókien oraz porowatych struktur. Motywuje także do opracowywania nowych technik formowania i obróbki powierzchniowej polimerów.

Architektura podłoża komórkowego, decydująca o jego funkcjonalności, ściśle wiąże się z wykorzystanym materiałem, metodą formowania determinującą kształt, rozmiar, topografię powierzchni. Prowadzone badania wskazują, że topografia powierzchni istotnie wpływa na zachowanie komórek, ich adhezję oraz proliferację [11]. Struktura naśladująca naturalne ECM może znacznie poprawić adaptację komórek w badaniach in vivo [53].

Podłoża komórkowe 3D mogą być formowane wykorzystując metody wytwarzania włókien, modyfikując tradycyjne metody przetwarzania polimerów lub modelując struktury zgodnie z projektem trójwymiarowego kształtu (Tabela 1).

Tabela 2. Popularne metody formowania rusztowań komórkowych [54, 55]

	Formowanie włókien	Formowanie metodami tradycyjnymi	Formowanie metodami szybkiego wytwarzania
1	Przędzenie ze stopu	Spienianie	Drukowanie 3D
2	Elektroprzędzenie	Separacja faz	Stereolitografia
3	Samoorganizacja	Wymywanie	Spiekanie Laserowe

Formowanie włókien metodą przędzenia ze stopu umożliwia tworzenie ciągłych włókien mikronowej grubości. Uzyskane włókna są mechanicznie rozciągane podczas nawijania na bęben lub kilka bębnow i przechowywane w zwojach. Średnica wytworzonych włókien jest determinowana przez stopień wytłaczania oraz szybkość nawijania (odpowiednia stała szybkość wyciągania). Szybkość przędzenia ze stopu ma również wpływ na krystaliczność włókien, właściwości mechaniczne oraz szybkość degradacji. Zbierane na bęben włókna są później cięte na kawałki, obrabiane i formowane w struktury o określonej architekturze, zgodnie z zastosowaniem w inżynierii tkankowej. Możliwe jest tworzenie struktur o dużej porowatości, pozwalającej na swobodną migrację komórek [31].

Wytworzone metodami formowania ze stopu włókna posłużyły prekursorom inżynierii tkankowej do wytworzenia podłoża do regeneracji kości oraz chrząstki [1]. W ślad za grupą Langerę poszło w ostatnim czasie wiele grup badawczych i naukowych. Jednakże tylko

Wagnerowi oraz Schmelzeisenowi udało się wytworzyć struktury, które można było skomercjalizować [56,57]. Przykładowo, wytworzone z PGA metodą ekstruzji, orientowane włókniny są wykorzystywane w rekonstrukcji tkanki nerwowej [58].

Proces elektroprzedzenia jest obecnie jedną z najczęściej wykorzystywanych metod wytwarzania włókien nanometrycznych oraz submikronowych do zastosowań w inżynierii tkankowej. Obserwowany wzrost zainteresowania wynika z fleksybilności procesu, możliwości formowania włókien z różnego rodzaju polimerów, wykorzystywanych w medycynie jak również w innych dziedzinach nanotechnologii i przemysłu. Technikę tę spośród innych wyróżnia prostota aparatury jak również relatywnie szybki czas wytworzenia produktu. Aparatura może być w różny sposób modyfikowana, udoskonalana by tworzyć struktury o określonych parametrach chemicznych i mechanicznych. Zaletą metody jest również możliwość produkowania włókien na niewielkie potrzeby laboratoryjne- badawcze, jak również na skalę przemysłową. Porównując właściwości otrzymanych podłoży komórkowych z podłożami wytworzonymi metodami samoorganizacji oraz separacji faz, elektroprzedzone rusztowania wyróżnia porowatość otwarta (bardzo ważny czynnik z punktu migracji komórek oraz czynników odżywczych i metabolicznych), a także możliwość sterowania właściwościami morfologii, topografii, struktury molekularnej i nadmolekularnej.

Proces elektroprzedzenia zostanie dokładniej omówiony w kolejnym rozdziale (Rozdział 9).

Samorganizacja (*ang. self assembly*) jest procesem spontanicznej (raptownej) organizacji w ściśle określone, makroskopowe agregaty, tworzące nanometryczne struktury włókniste. Samoorganizacja jest indukowana przez słabe wiązania np.: jonowe, hydrofobowe interakcje, siły van der Waalsa, wodno indukowane wiązania wodorowe. Proces samoorganizacji umożliwia tworzenie nanoporowatych struktur 3D, ściśle naśladujących porowatość i całościowo strukturę naturalnego ECM. Proces samoorganizacji jest prowadzony w środowisku roztworów soli i soli fizjologicznych, co pozwala na zredukowanie cytotoksyczności [7,31].

Spienianie gazem polega na nasyceniu polimeru np. CO₂ lub N₂ pod wysokim ciśnieniem. Metodą tą są wytwarzane podłoża jedno składnikowe jak również kompozytowe (polimer-ceramika). Do zalet niewątpliwie należą: brak konieczności użycia rozpuszczalnika, brak ryzyka związanego z możliwością pozostania porogenu oraz niska temperatura procesu (brak ryzyka degradacji polimeru podczas formowania. Ograniczeniem tej metody jest często rozmiar porów (zbyt małe), jak również ich rozmieszczenie [59,60].

Separacja faz może następować na skutek mieszania dwóch niemieszalnych lub częściowo mieszalnych polimerów, mieszania roztworów o różnych stężeniach lub w wyniku zmiany temperatury [7, 31, 32].

Wymywanie cząstek (aglomeratów cząstek, soli lub porogenów) łączy się z wieloma różnymi technikami takimi jak: odlewanie z roztworu [31], separacja faz. Wymywanymi cząsteczkami mogą być sól, cukier lub specjalnie przygotowane cząstki, rozprowadzone w polimerze, polimer rozpuszczalny w danym rozpuszczalniku, a później wymywane by uzyskać zamierzoną trójwymiarową strukturę. Największą zaletą tak tworzonych podłoży jest wysoki, kontrolowany stopień porowatości, niestety nie zawsze otwartej. Istnieje również ryzyko niecałkowitego wymycia porogenu [7].

Metody szybkiego wytwarzania (*ang. rapid prototyping*) pozwalają na tworzenie struktur o skomplikowanej budowie na bazie danych opracowanych w programach 3D-CAD bezpośrednio, bez użycia form odlewniczych. Podłoże komórkowe formuje się przez nakładanie polimeru warstwa po warstwie, zgodnie z przekrojem poprzecznym obiektu. Grubość warstw waha się od 0,05-02mm. Komercyjnie dostępne są trzy grupy urządzeń RP. Pierwsza grupa odnosi się do urządzeń wykorzystujących lasery, w których możliwa jest fotopolimeryzacja ciekłego monomeru lub spiekanie sproszkowanych materiałów. Druga grupa urządzeń „drukuję” podłoże nanosząc substancje wiążące na sproszkowany materiał lub bezpośrednio wosk na platformę. Istnieją też systemy przetwarzające termicznie lub chemicznie materiał przechodzący przez dyszę [11].

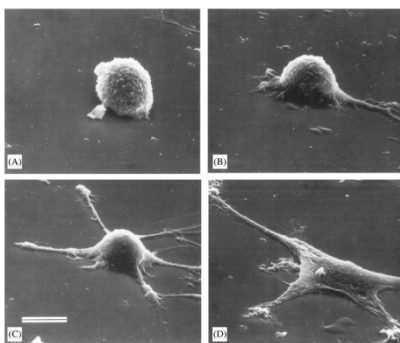
2.8. Modyfikacje podłoży komórkowych

Hydrofilowość, topografię powierzchni, wielkość porów oraz sprężystość podłoży komórkowych, a w konsekwencji aktywność komórkową, można modyfikować poprzez dodatkową obróbkę.

Hydrofilowość podłoży w dużym stopniu decyduje o adhezji komórek. Badania adhezji komórek do materiałów polimerowych pokazują większe rozplaszczanie komórek na materiałach o niskiej energii powierzchniowej (hydrofilowa powierzchnia) [61]. Jednakże, energia ta musi być kontrolowana, ponieważ materiały zbyt hydrofilowe (przypominające żele) obniżają adhezję komórek. Pomiędzy komórką, a zbyt hydrofilowym (polarnym) polimerem tworzą się siły odpychające. Przeprowadzone badania modelowe wskazują, że grupy amidowe, karboksylowe i estrowe wpływają znacząco na adhezję komórek, w porównaniu do grup metylowych, o mniejszej polarności, a więc bardziej hydrofobowych. W celu podniesienia hydrofilowości podłoża poddaje się je najczęściej działaniu plazmy [4].

Ciesząc się dużym zainteresowaniem metodą podniesienia adhezji komórkowej hydrofobowych podłoży, coraz częściej wykorzystywaną, jest także adsorbcja protein obecnych w naturalnym ECM lub tworzenie podłoży z dodatkiem polimerów zawierających te proteiny. Obecność biopolimeru: kolagenu, fibronektyny, witronektyny lub fibrynogenu nie tylko zwiększa hydrofilowość podłoża, ale również podnosi aktywność komórkową poprzez sekwencję RGD [62]. RGD są receptorami integrzyn i dzięki temu promują adhezję komórka-podłoże. Szczegółową analizę mechanizmu podnoszenia adhezji do podłoża poprzez modyfikację polimerów grupami RGD można znaleźć w pracy Hersela [63].

Rysunek 13 przedstawia fibroblasty hodowane na podłożu o różnej zawartości grup RGD. Autor pracy [64] przeprowadził analizę wzrostu migracji, rozplaszczania komórek oraz ilości formowanych filopodiów.

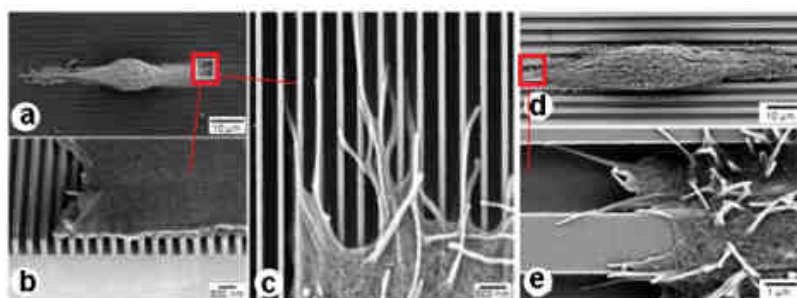


Rysunek 13. Rozplaszczanie fibroblastów regulowane stężeniem RGD na powierzchni a) 0.1, b) 1, c) 10, d) 100 fmol/cm² [64]

Na migrację i proliferację komórek znacząco wpływa również wielkość porów. Czynniki te modyfikuje się poprzez wymywanie jednego ze składników wytworzonego podłoża lub poprzez tworzenie struktur z dodatkiem biopolimeru, który ulega bioadsorpcji szybciej niż poliester. W literaturze nie ma zgodności co do odpowiedniej wielkości porów właściwej do swobodnej migracji danego typu komórek [65].

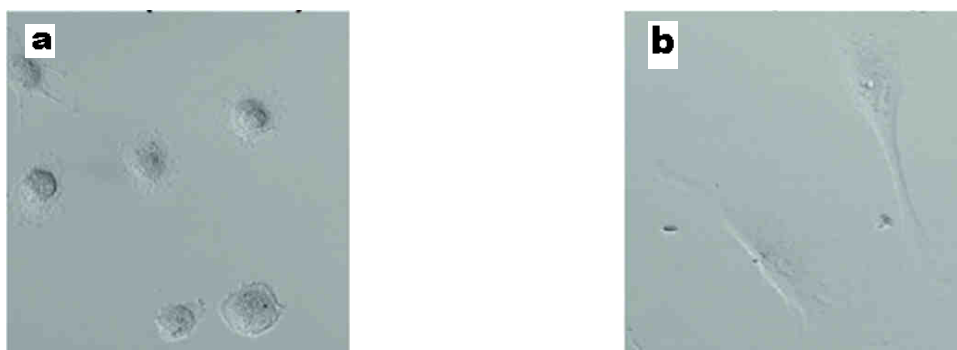
Topografia determinuje miejsce zakotwiczenia komórek [66]. Przeprowadzone przez Johsona badania wskazują, że komórki rozplaszczają się zgodnie z kierunkiem orientacji makroskopowej materiału. Zjawisko to określane jest przewodnictwem kontaktowym CG (*ang. contact guidance*) (Rysunek 14) [67].

Wytwarzanie filopodiów i lamelopodiów odpowiedzialnych za migrację jest w dużym stopniu uzależnione od CG. W celu wyróżnienia danego kierunku, do podłoża, przykładane są siły mechaniczne. W wyniku takich działań, dochodzi do zmian właściwości podłoża i kierunkowania szkieletu aktynowego komórek zgodnie z kierunkiem działania tych sił [68].



Rysunek 14. Komórki na podłożach o zróżnicowanej teksturze a-c) cienkie paski d-e) grube paski [68]

W pracy [69] badano zachowanie fibroblastów w zależności od sztywności podłoża. Można zauważyć, że na zbyt miękkich podłożach komórki wykazują bardzo słabo rozwinięty szkielet aktynowy, podczas gdy na sztywnych podłożach, kształt szkieletu wskazuje na chęć migracji komórek (Rysunek 15). W celu zmian sztywności podłoży poddaje się je najczęściej sieciowaniu chemicznemu lub fizycznemu.



Rysunek 15. Morfologia fibroblastów na podłożach z poliakrylamidu pokrytego kolagenem typu I o module Younga a) 2,1kPa, b) 68kPa [69]

2.9. Proces elektroprzędzenia

Zjawisko tworzenia się elektrospreju zauważył i opisał jako pierwszy Rayleigh w 1882 roku [70]. Odkrył on, że kropla pod wysokim napięciem rozpada się na małe krople, na skutek gradientu napięcia znanego jako „niestabilność Rayleigha”. Metodą tą wkrótce zainteresowali się Zeleny [71] oraz Dole [72]. Drozin zauważył, że krople rozszczepiane w polu elektrycznym przypominają swym wyglądem i właściwościami aerozole [73]. Proces elektroprzędzenia został opracowany jako przedłużenie badań nad elektrosprejem. Podstawy fizyczne i mechanizm procesu są bardzo zbliżone, jednakże efektem elektrospreju są krople, a produktem elektroprzędzenia ciągłe włókna.

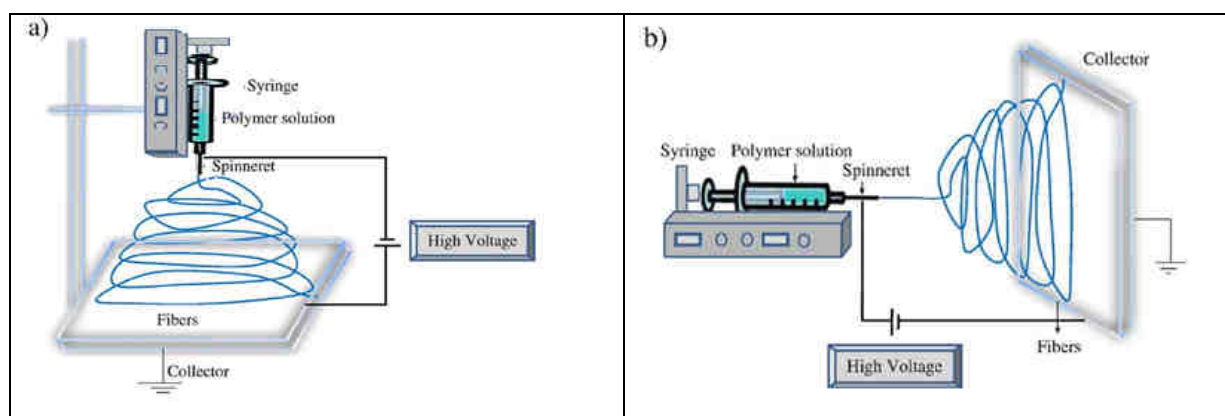
Po kilkudziesięciu latach upadającego zainteresowania elektroprzędzeniem, na nowo proces zaczął cieszyć się zainteresowaniem po ukazaniu się patentu Formhalsa w 1934 roku [74]. Znalazł się w nim opis wytwarzania włókien celulozowych z wykorzystaniem elektroprzędzenia. Na początku lat 90 wytworzone nanometryczne włókna polietylenowe

wskazały nową drogę poszukiwań i zastosowań [75, 76]. Ukazało się wiele prac Yarina oraz Renekera mających na celu zrozumienie fizyki i modelowanie procesu. Obecnie, elektroprzędzenie jest procesem szeroko wykorzystywanym w nanotechnologii, medycynie jak również w przemyśle tekstylnym i rolnictwie. Prace modelowe pozwalają na lepsze zrozumienie procesu [77-81].

2.9.1. Aparatura

Aparatura do formowania włókien metodą elektroprzędzenia składa się ze źródła wysokiego napięcia w zakresie 1-30kV, podajnika roztworu polimerowego (najczęściej strzykawka z igłą), pompy z kontrolowanym przepływem oraz kolektora (Rysunek 16).

Możemy wyróżnić dwa podstawowe typy pracy procesu: pionowy (Rysunek 16 a) oraz poziomy (Rysunek 16 b) [82].



Rysunek 16. Schemat elektroprzędzenia w modzie a) pionowy, b) poziomy [82]

W zależności od potrzeb wykorzystuje się różne typy kolektorów: płyty, bębny, druty [83]. W celu podniesienia wydajności procesu stosowane są również układy z wieloma dyszami podającymi polimer [84].

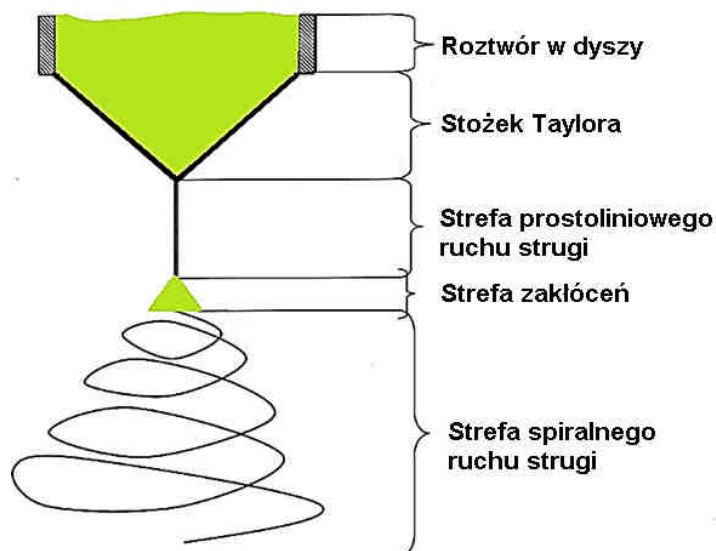
Aparaturę umieszcza się zwykle w komorach laminarnych, w pomieszczeniach z kontrolowaną temperaturą oraz wilgotnością powietrza.

2.9.2. Podstawy procesu

Wybrany roztwór polimeru umieszczany jest w strzykawce, do dyszy (igły) przykładane jest wysokie napięcie. Wywołane przyłożonym napięciem siły elektrostatyczne wywołują przemieszczenie się ładunków w płynie przewodzącym w kierunku kolektora. Siła przyciągania ładunków do kolektora wywołuje zniekształcenie kropli roztworu znajdującej się w dyszy. Pompa dozująca roztwór oraz przekroczenie krytycznej wartości natężenia pola inicjują wypływ roztworu przewodzącego w kierunku kolektora. Płyn pod wpływem

przyłożonego napięcia ulega rozciągnięciu w ciekłą strugę. Podczas opadania na płytkę zbiorczą odparowuje rozpuszczalnik, a tworzące się włókna są zbierane na kolektorze [85].

Podczas formowania włókien metodą elektroprzędzenia można wyróżnić kilka stref (Rysunek 17), bardziej szczegółowo omówionych poniżej.



Rysunek 17. Strefy na drodze formowania włókien w polu elektrostatycznym (na podstawie [85])

1. Roztwór w kanalik dyszy

W pierwszej strefie formowania włókien, w kanaliku dyszy następuje wstępna orientacja makrocząsteczek roztworu związana z poprzecznym gradientem prędkości. W tym przypadku, stopień orientacji określany jest przez stosunek poprzecznego gradientu prędkości do stałej dyfuzji rotacyjnej lub iloczynu poprzecznego gradientu prędkości przepływu strumienia roztworu i czasu relaksacji. Zatem stopień orientacji strumieniowej w cieczy opuszczającej kanalik dyszy zwiększa się wraz ze wzrostem szybkości przepływu i długości kanalika [85, 86].

2. Tworzenie stożka Taylora

Kropla roztworu po opuszczeniu dyszy podlega działaniu pola elektrostatycznego i przybiera kształt stożka. Ładunek pola zrównoważony jest przez siły napięcia powierzchniowego roztworu, kropla zmienia kształt ze sferycznego na stożkowy. Tworzy się tzw. stożek Taylora o kącie 49.3 stopnia [86].

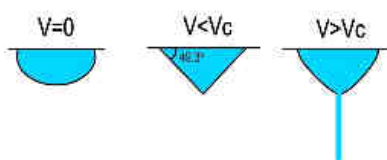
Na skutek działania pola elektrostatycznego następuje gromadzenie się ładunków na powierzchni stożka roztworu, przy czym gęstość ładunku wzrasta na wierzchołku stożka do chwili przekroczenia wartości krytycznej, przy której polaryzacja osiąga wartość przekraczającą pod względem energetycznym napięcie powierzchniowe roztworu. Gęstość ładunku zgromadzonego na wierzchołku stożka Taylora, równoważącą pod względem energetycznym wartość napięcia powierzchniowego roztworu polimeru, nosi nazwę

polaryzacji krytycznej V_c . Po przekroczeniu wartości polaryzacji krytycznej ($V > V_c$) następuje płynięcie lepko-sprężystego roztworu ze stożka Taylora i zachodzi obniżenie gęstość ładunku elektrostatycznego na powierzchni strugi. Taylor wykazał, że V_c można określić jako [85, 86]:

$$V_c^2 = 4 \left(\frac{H^2}{L^2} \right) \left(\ln \frac{2L}{R} - 1.5 \right) (0.117 \pi R \gamma)$$

gdzie: V_c - polaryzacja krytyczna, H - odległość dyszy od kolektora, L - długość dyszy, R - promień dyszy, γ - napięcie powierzchniowe roztworu.

Po przekroczeniu V_c roztwór przybiera formę liniowej strugi stacjonarnej, ulegającej rozciąganiu w polu elektrycznym (Rysunek 18). Wielkość tej strugi liniowej jest zależna od parametrów roztworu.



Rysunek 18. Zmiany kształtu kropli pod wpływem przykładanej siły gdzie V -polaryzacja roztworu, V_c – polaryzacja krytyczna [87]

3. Prostoliniowa struga roztworu

Strefa prostoliniowego odcinka strugi roztworu, po opuszczeniu „stożka Taylora” jest poddana oddziaływaniu pola elektrostatycznego, w wyniku którego na powierzchni strugi następuje gromadzenie się ładunków elektrostatycznych, wywołujących w warstwie powierzchniowej strugi polaryzację. W części powierzchniowej, strugi roztworu powstaje dipolowa (dwubiegunowa) warstwa elektryczna. W warstwie tej zawsze jeden rodzaj ładunków jest zwrócony w kierunku na zewnątrz powierzchni a drugi do wnętrza strugi. Powstający w wyniku generowania ładunków elektrostatycznych, stan naładowania strugi roztworu jest określony gęstością powierzchniową ładunków oraz wartością potencjału elektrycznego. Gęstość powierzchniowa ładunków jest zróżnicowana na długości prostoliniowego odcinka strugi, co wynika z prawa Coulomba, biorąc pod uwagę pole elektrostatyczne wytworzone przez anodę połączoną z dyszą i katodą (lub „ziemią”) połączoną z elementem odbierającym włókna [85, 86].

W procesie formowania włókien, w silnym polu elektrostatycznym, rozciąganie strugi osiąga bardzo wysokie wartości. Gdy struga roztworu ma charakter prostoliniowy wartość rozciągu wynosi około 1000 razy [85].

4. Zakłócenia w prostoliniowej strudze

Nagromadzone spolaryzowane ładunki na prostoliniowym odcinku strugi współdziałają z wytworzonym polem elektrostatycznym i na pewnej ściśle określonej długości strugi powstaje krytyczna wartość ładunku elektrostatycznego, inicjująca wytworzenie dużego gradientu płynięcia strugi roztworu. W tych warunkach następuje uwolnienie kohezji wewnętrznej w strudze, a roztwór zaczyna gwałtownie płynąć powodując zawirowanie prostoliniowego odcinka strugi. Efekt zawirowania obserwuje się w postaci stożka. Zmiana prostoliniowego ruchu strugi roztworu w stożkowy ruch spiralny wynika ze zmiany stanu energetycznego układu. Gdy struga poddawana jest zginaniu, rozciąg osiąga wartość około 25000 razy [85, 86].

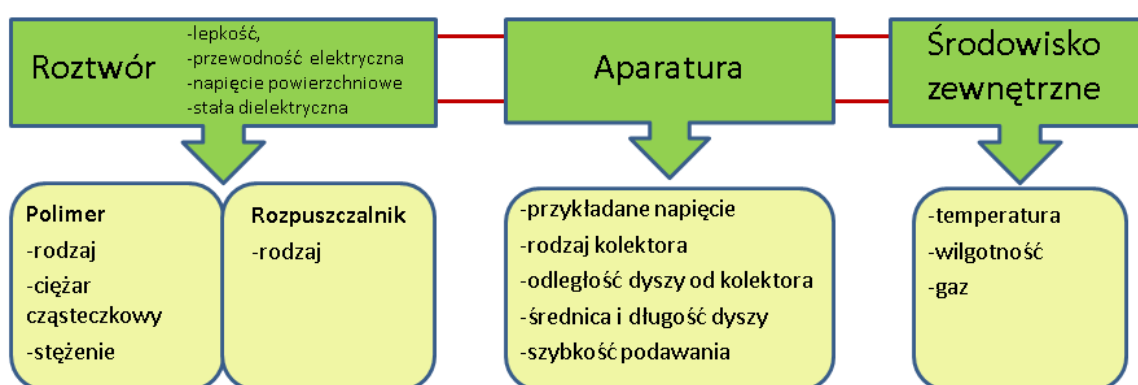
5. Spiralny ruch strugi roztworu i odparowanie rozpuszczalnika

Zwoje spirali roztworu polimeru są efektem przekroczenia wartości energii kohezji wewnętrznej prostoliniowego odcinka strugi przez wartość energii pola elektrostatycznego. W wyniku tych zmian energetycznych następuje zawirowanie prostoliniowego odcinka strugi, tworząc stożek spiralnych zwoi o wzrastającej średnicy.

Opisy przyczyn i efektów niestabilności w spiralnym stożku strugi można odnaleźć w wielu pracach Renekera [77, 78, 80].

2.9.3. Parametry procesu oraz ich wpływ na morfologię i strukturę włókien

Wyróżnić możemy około 15 parametrów procesu elektroprzędzenia. Parametry te można podzielić na związane z: roztworem, aparaturą oraz środowiskiem zewnętrznym (Rysunek 19) [85, 88].



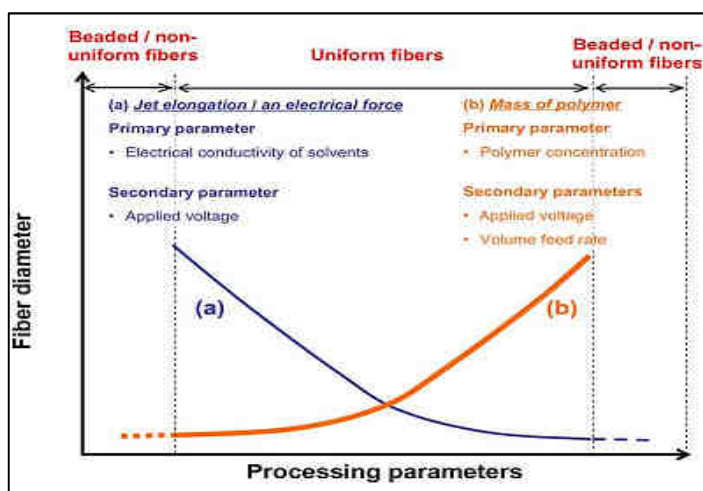
Rysunek 19. Parametry procesu elektroprzędzenia wpływające na morfologię i strukturę włókien (na podstawie [85])

Na morfologię włókien składają się: średnica, porowatość rozwinięcie powierzchni pojedynczych włókien jak również ułożenie włókien względem siebie- kształt, orientacja, ułożenie (odseparowanie, posklejanie), porowatość całej włókniny. Morfologię włókien

i włókien najczęściej określa się z analizy obrazów SEM. Jak wynika z wielu źródeł, średnica włókien formowanych w procesie elektroprzędzenia waha się od 50-2000nm w zależności od parametrów roztworu- rodzaju polimeru, rozpuszczalnika, jak również parametrów aparaturowych [91].

Podczas elektroprzędzenia z zadanego roztworu, jednorodne na długości włókna udaje się uzyskać tylko w wąskim zakresie parametrów procesu. Wszystkie parametry procesu muszą być zoptymalizowane, by formować włókniny pozbawione koralików, o określonej grubości pojedynczych włókien [83].

Jedną z pierwszych prób systematycznego opisu wpływu parametrów procesu na morfologię włókien podjął Ramakrishna (Rysunek 20) [89].



Rysunek 20. Średnica włókien w zależności od parametrów związanych (a) z siłami działającymi na strugę roztworu (b) z masą polimeru [89]

Parametry procesu wpływające na grubość przędzionych włókien podzielono na te, które wpływają na wydłużenie strugi- siły elektryczne (niebieska linia), oraz wynikające z masy polimeru (pomarańczowa linia). Każde z nich zaś na: pierwszorzędowe (*primary*) charakteryzujące się większym znaczeniem z powodu silniejszych oddziaływań oraz drugorzędowe (*secondary*)- odgrywające mniejszą rolę podczas formowania włókien. Pierwszorzędowe związane są z roztworem- przewodność elektryczna roztworów oraz stężenie polimeru. Drugorzędowe związane są z przykładanym napięciem oraz szybkością podawania. Im przewodność elektryczna roztworu i/lub przykładane napięcie mniejsze, tym otrzymywane włókna są grubsze, a po przekroczeniu pewnego minimum zamiast włókien formowane są krople (niebieska linia). Wzrost stężenia polimeru, szybkości podawania oraz wzrost przykładanego napięcia prowadzi jednocześnie do niesienia większej masy polimeru i w konsekwencji do tworzenia grubszych włókien (pomarańczowa linia). Zbyt mała przewodność elektryczna roztworu i/lub zbyt małe stężenie polimeru prowadzi do tworzenia

się koralików. Zatem po obu stronach, zarówno przy zbyt wysokich parametrach związanych z rozciąganiem strugi, jak i zbyt niskich związanych z masą polimeru (stężenie, szybkość podawania, przyłożone napięcie) w wyniku elektroprzędzenia mogą być formowane koraliki zamiast włókien. Tworzenie włókien wymaga optymalizacji zarówno parametrów pierwszorzędowych (właściwa przewodność elektryczna, odpowiednie stężenie polimeru-parametry związane z roztworem), jak również drugorzędowych (przykładane napięcie oraz szybkość podawania), wynikających z czynników związanych z aparaturą. Parametry pierwszorzędowe wydają się decydujące podczas formowania jednorodnych włókien.

Również Deizel zwrócił uwagę, że formowanie jednorodnych włókien silniej zależy od stężenia polimeru, niż od przykładanego napięcia [90]. Zbyt wysokie przykładane napięcie może prowadzić do tworzenia koralików.

W następnych podrozdziałach zostanie omówiony wpływ parametrów roztworu, aparatury oraz środowiska zewnętrznego na morfologię oraz strukturę nadmolekularną formowanych włókien.

2.9.3.1. Parametry roztworu

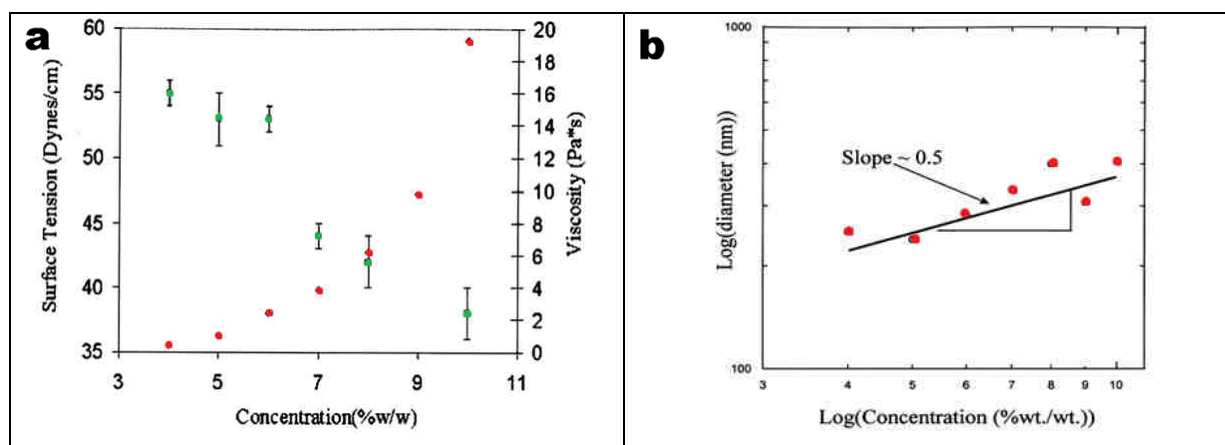
Na właściwości roztworu wpływ mają rodzaj i stężenie polimeru oraz właściwości rozpuszczalnika. Lepkość, przewodność elektryczna, napięcie powierzchniowe, stała dielektryczna roztworów związane z rodzajem rozpuszczalnika i polimeru są często krytycznymi cechami danego roztworu, wpływającymi na morfologię i strukturę formowanych włókien.

Lepkość roztworu jest jednym z najistotniejszych parametrów wpływających na formowanie włókien. Związane jest to z zjawiskiem splątania łańcuchów polimerowych. Przy zbyt małych stężeniach/masach cząsteczkowych brak splątań nie daje możliwości zachowania ciągłości strugi polimerowej i napięcie powierzchniowe prowadzi do powstania kropli (tzw. niestabilność Rayleigha). Potrzebna jest pewna krytyczna koncentracja splątań, aby tworzyć jednorodne na długości włókna.

W celu formowania włókien lepkość roztworu polimerowego musi mieścić się w określonym przedziale, zależnym od rodzaju rozpuszczalnika, typu i stężenia polimeru [91]. Wpływ powyższych czynników na morfologię włókien na przykładzie tlenku polietylenu (PEO) jako jeden z pierwszych określił Fong [92]. Poniżej określonej wartości lepkości, w wyniku przedzenia wodnego roztworu PEO, zamiast włókien formowały się koraliki. Ze zwiększeniem lepkości liczba koralików zmniejszała się. Koraliki zmieniały kształt

z okrągłego na eliptyczny, a po przekroczeniu krytycznej wartości możliwe było wytworzenie jednorodnych włókien różnej grubości (zależnej również od stężenia roztworu).

W pracy [90] na przykładzie roztworu wodnego PEG określono wpływ **stężenia polimeru na lepkość, napięcie powierzchniowe** oraz średnicę formowanych włókien. Lepkość, a z nią średnica włókien, wzrasta wraz ze stężeniem polimeru. Napięcie powierzchniowe roztworu maleje wraz ze stężeniem, co wpływa na efektywniejsze działanie sił przykładanego napięcia i tworzenie jednorodnych na długości włókien (Rysunek 21 a, b).



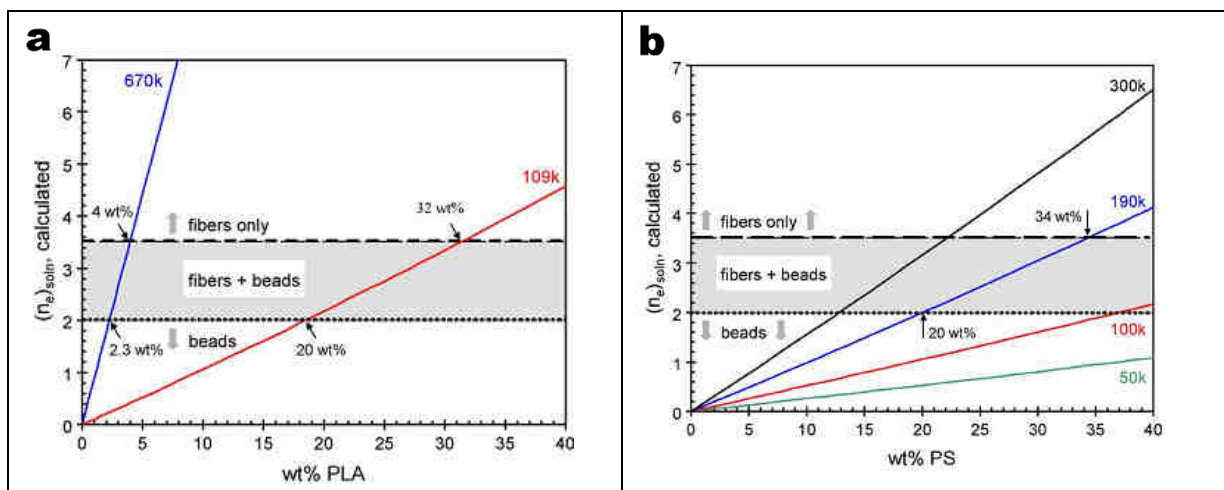
Rysunek 21. Zależności a) napięcia powierzchniowego (zielone punkty) oraz lepkości roztworu (czerwone punkty), b) średnicy włókien od stężenia PEG w wodzie [90]

Na formowanie jednorodnych, wolnych od koralików włókien znaczny wpływ mają właściwości roztworu związane nie tylko ze stężeniem, ale również z **masą cząsteczkową** polimeru. W literaturze światowej, w których opisuje się przedzenie PVA o różnej średniej masie cząsteczkowej M_w . Przy tym samym stężeniu PVA w roztworze, brak splątania makrocząsteczek spowodowany zastosowaniem polimeru o zbyt niskiej M_w prowadzi do formowania kropelek (elektrosprej) lub włókien z koralikami [93].

Dla wybranych polimerów i rozpuszczalników określono wpływ **masy cząsteczkowej** oraz **stężenia polimeru** na splątanie makrocząsteczek wyznaczając współczynnik $(n_e)_{soln}$ [94].

$$(n_e)_s = M_w / (M_e)_s$$

Gdzie: $(M_e)_s$ jest średnią masą subłańcucha pomiędzy splataniami łańcuchów polimeru w roztworze, M_w średnią wagową masą cząsteczkową. Poziome linie na wykresie wyznaczają zakres elektrospreju (*beads*), włókien z koralikami (*fibre+beads*) oraz włókien (Rysunek 22 a i b). Przecięcie ukośnej linii (niebieska, czerwona, czarna, zielona) związanej z M_w polimeru z poziomymi liniami $(n_e)_s$ określa zakres stężeń, w których mogą być przedzione włókna bez koralików. Przykładowo dla PLA o M_w 670k powyżej 4%, natomiast dla M_w 109k powyżej 32% (Rysunek 22 a) formowane są jednorodne włókna.



Rysunek 22. Przędzenie włókien w zależności od czynnika n_e oraz M_w dla a) PLA, b) PS [94]

PLA w różnych **stężeniach** przędzono z DCM [95]. Wraz ze wzrostem stężenia odnotowano wzrost **lepkości** roztworu, **napięcia powierzchniowego** oraz spadek **przewodności elektrycznej**. Średnia średnica włókien wzrosła wraz ze stężeniem polimeru, znacznie wzrósł również rozrzut średnicy. W pewnym zakresie stężeń możliwe było podniesienie przewodności elektrycznej poprzez dodatek pirydyny.

Napięcie powierzchniowe roztworów silnie zależy od napięcia powierzchniowego rozpuszczalnika oraz stężenia i masy cząsteczkowej polimeru. Przy zbyt małych stężeniach roztworów, napięcie powierzchniowe rozpuszczalnika jest często większe niż oddziaływania pomiędzy słabo splątanymi cząstkami polimeru. Konsekwencją są koraliki. Odpowiadanie napięcie powierzchniowe oraz lepkość związana ze stężeniem polimeru, umożliwia równomierny rozkład przykładanego napięcia pomiędzy cząsteczkami polimeru i tworzenie jednorodnych na długości włókien [96]. Wraz ze wzrostem stężenia poliesterów średnia średnica włókien wzrasta [82, 88, 109]. Stosowanie rozpuszczalników o odpowiedniej przewodności elektrycznej, stałej dielektrycznej, lepkości w dużym stopniu podnosi efektywność przykładanych do roztworu sił [91].

Roztwory o wyższej **przewodności elektrycznej** przenoszą więcej ładunków elektrycznych podczas elektroprzędzenia. Duża gęstość ładunków powoduje wzrost siły rozciągającej strugę poprzez wzrost sił odpychających pomiędzy ładunkami jednoimiennymi. W końcowej strefie przędzenia, pomiędzy powstającymi włóknami generowana jest silniejsza siła odpychająca. Zaletą tworzenia roztworów o dobrej przewodności jest zatem brak konieczności stosowania wysokich napięć (zaburzających stabilność układu) oraz formowanie dość cienkich włókien. W celu podniesienia małej przewodności elektrycznej rozpuszczalników dodawany jest często DMF. Jest on jednak środkiem nierozpuszczającym dla większości polimerów, dlatego możliwe jest dodawanie małej ilości tego

składnika; w przeciwnym razie mogą tworzyć się w strukturze koraliki [97]. Na **przewodność elektryczną** roztworów wpływ ma również stosowanie polielektrolitycznych polimerów o dużym ładunku elektrycznym, takich jak Ge [43] oraz dodatek soli (np. NaCl) [53].

Tworzenie włókien z rozpuszczalników o wysokiej **stałej dielektrycznej** pozwala na formowanie jednorodnych włókien, jednakże podobnie jak w przypadku przewodności elektrycznej, zbyt duża stała dielektryczna prowadzi do niestabilności układu i koralików [33].

Prace na temat zakresu przedzenia (*ang. window process*) pojawiły się również dla innych układów- polimer/rozpuszczalnik [33, 91, 98].

Formowane włókna mają zazwyczaj średnicę o przekroju koła, jednakże z niektórych polimerów formowane są włókna wstążkowe. Fenomen formowania włókien wstążkowych został opisany na przykładzie Ge. Na skutek odparowania rozpuszczalnika z powierzchni strugi tworzy się „skórka”, która pod wpływem ciśnienia ulega spłaszczeniu [80, 91].

Na powierzchni włókien podczas elektroprzedzenia w niektórych warunkach tworzą się **pory**, determinujące właściwości fizyczne i chemiczne włókien. Porowatość powierzchniowa wynika z zastosowanego rozpuszczalnika lub może być związana ze środowiskiem zewnętrznym. Przykładowo, porowate włókna PCL otrzymano dodając do roztworu niewielką ilość dimetylosulfotlenku [99].

Znacznie mniej danych literaturowych dotyczy badań wpływu parametrów roztworu na strukturę nadmolekularną charakteryzowaną m.in. przez **stopień krystaliczności i/oraz orientację molekularną**.

Lee [97] wyznaczył krystaliczność dla folii oraz włókien PCL używając WAXS. Badania wykazały niższy **stopień krystaliczności** włókien niż folii. Ponadto na profilach zaobserwowano spadek stosunku intensywności pików (I_{110}/I_{200}), pochodzących od kryształów w PCL we włóknach, w porównaniu z profilami radialnymi folii, co opisano jako dowód deformacji kryształów PCL we włóknach (deformacja komórki elementarnej PCL). Rentgenogramy pochodzące od włókien PCL wskazują na częściową orientację łańcuchów wzdłuż osi włókna.

W literaturze można znaleźć prace odnoszące się do badania stopnia **krystaliczności** zależnie od stosowanego **rozpuszczalnika**. Z danych DSC oraz spektroskopii Ramana określono znacznie niższy stopień krystaliczności włókien PCL przedzionych z chloroformu niż HFIP [128]. W pracy nie uwzględniono jednak różnej średnicy formowanych włókien wynikającej z różnych właściwości obu roztworów.

Wpływ **średniej wagowej masy cząsteczkowej M_w** na **orientację molekularną** włókien określono na przykładzie PVA [100]. Badania WAXS wskazują na wyższy stopień

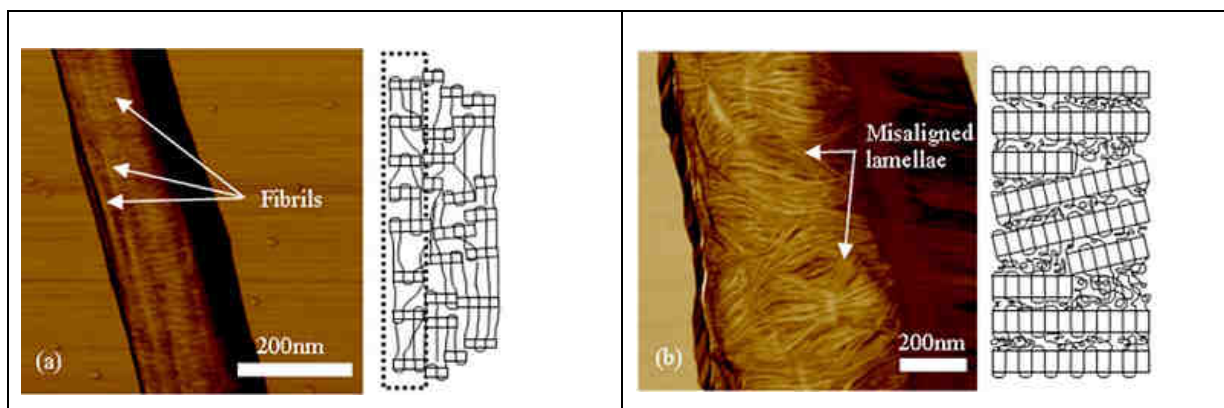
orientacji we włóknach z PVA o większej masie cząsteczkowej. Przekłada się to również na krystaliczność włókien- im większa masa cząsteczkowa tym wyższa krystaliczność.

Nie znaleziono prac, w których szacuje się ilościowo czynnik orientacji lub stopień orientacji molekularnej włókien wytworzonych w procesie elektroprzędzenia.

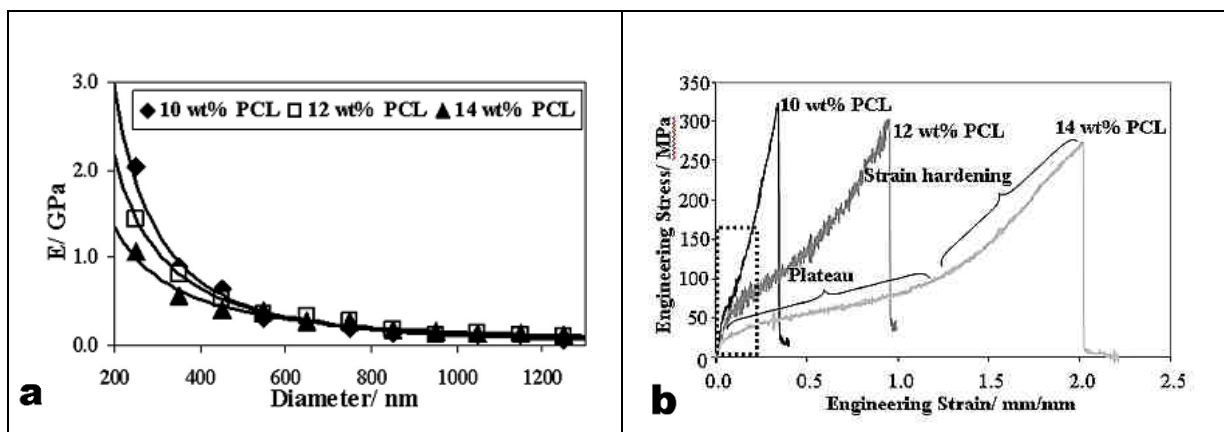
Dwójłomność optyczna odzwierciedla stopień krystaliczności oraz orientacji molekularnej. W nielicznych pracach podjęto próbę analizy dwójłomności optycznej włókien. W pracy Renekera za pomocą mikroskopu optycznego (w polu ciemnym) stwierdzono dwójłomność optyczną włókien PEO wytworzonych metodą elektroprzędzenia [101]. Nie określono stopnia tej dwójłomności. W pracy Greenfelda, zwrócono uwagę na porządkowanie się makrocząstek polimeru już w igle, zgodnie z kierunkiem działania pola elektrycznego [102].

Morfologia oraz struktura molekularna i nadmolekularna pojedynczych włókien wpływa na właściwości mechaniczne włókien/włóknin formowanych metodą elektroprzędzenia.

Badając włókna PCL o różnej średnicy stwierdzono wyższy moduł Younga nanometrycznych włókien niż submikronowych [103]. Zwrócono uwagę na fakt, iż stopień krystaliczności cieńszych włókien, przedzionych z roztworów o niższym stężeniu jest wyższy (co jest sprzeczne z innymi wcześniej omawianymi pracami, zakładającymi wzrost stopnia krystaliczności wraz ze stężeniem polimeru a tym samym średnicą włókien). Autorzy podejrzewają, że również stopień orientacji molekularnej w tych włóknach jest wyższy. Autorzy na podstawie zdjęć AFM wnoszą, że cieńsze włókna wykazują strukturę fibrylną, natomiast grubsze lamelarną (Rysunek 23 a, b). Fibryle składają się z naprzemiennie występujących zorientowanych faz krystalicznej i amorficznej, a lamelarna z gęsto upakowanych lameli i niezorientowanej fazy amorficznej.



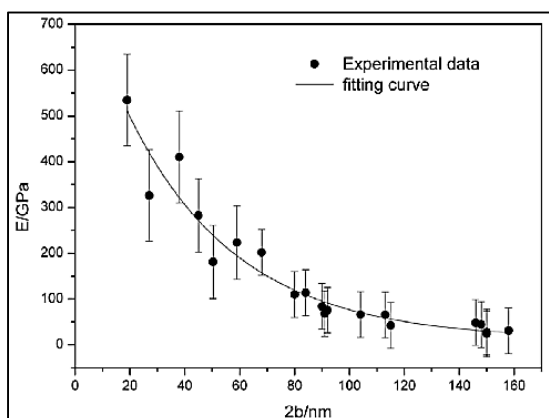
Rysunek 23. Zdjęcia AFM włókien PCL przedzionych z 10% roztworu o średnicy a)150nm, b)450nm [103]



Rysunek 24. a) Moduł Younga w funkcji średnicy włókien, b) siła rozciągająca w funkcji wydłużenia [103]

Spadek modułu Younga wraz ze wzrostem średnicy zaobserwowano dla włókien przedziwnych z roztworów o różnych stężeniach (Rysunek 24 a). Wskazano również na znaczny wpływ stężenia polimeru na stopień wydłużenia, na podstawie włókien tej samej grubości, pochodzących z roztworów o różnym stężeniu oraz niewielki wpływ na wytrzymałość na zerwanie (analizując włókna o podobnej średnicy 300 μ m, mimo różnych stężeń roztworów) (Rysunek 24 b).

Pojedyncze włókna bada się z użyciem AFM w trybie nanoindentacji. Z krzywych wyznaczany jest moduł sprężystości (moduł Younga). Włókna do badań zbierane są najczęściej na krzemową płytkę o określonej wielkości żłobień. Technika tą analizowano m.in. włókna PLLA, PCL, kolagenowe [104]. Badania wykazały, że pojedyncze włókna o średnicy nanometrycznej charakteryzują się znacznie wyższym modułem Younga oraz wyższą odpornością na zginanie niż włókna submikronowe [105].



Rysunek 25. Moduł Younga w funkcji średnicy włókien PVA [106]

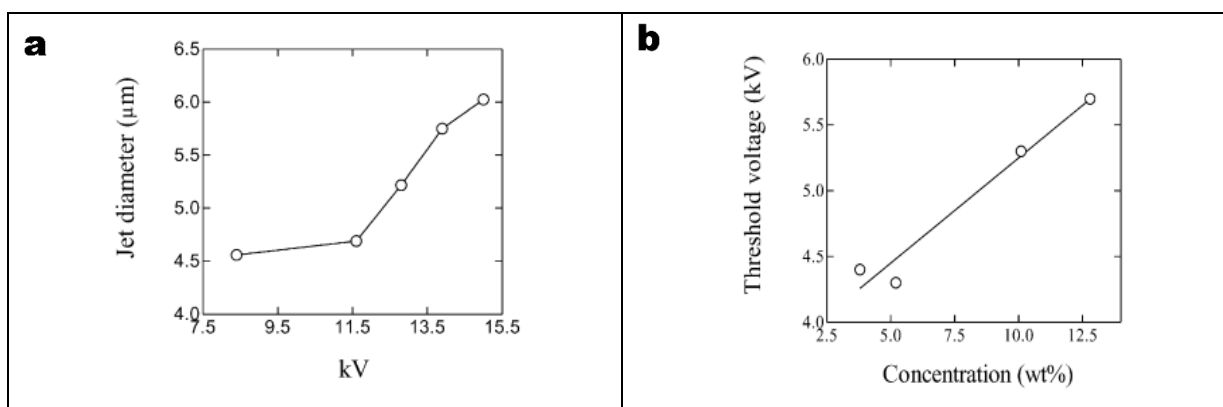
Moduł Younga włókien PVA wyznaczony w wyniku nanoindentacji z użyciem AFM wskazuje na znaczny spadek sprężystości wraz ze wzrostem średnicy włókien [106]. Pomiarzy zostały przeprowadzone na włóknach formowanych z 8% roztworu.

W pracy na temat PVDF oraz PCL zaobserwowano niewielki spadek modułu Younga wraz ze stężeniem roztworu (średnicą włókien) [33,107].

2.9.3.2. Parametry aparaturowe

Jednym z najistotniejszych parametrów aparaturowych podczas elektroprzędzenia jest **przykładane napięcie**. Przyłożone napięcie jest siłą napędową przędzenia włókien przez „przekazanie ładunku” do kropli [91]. Gęstość przyłożonego ładunku, jako ilość ładunków na jednostkę powierzchni kropli polimerowej, opisana jest przez przyłożone napięcie, odległość kolektora od dyszy oraz przewodność roztworu. Jego wartość musi być dostosowana do rodzaju rozpuszczalnika i stężenia polimeru [53].

Demir [108] w pracy dotyczącej przędzenia poliuretanów zauważył, że wraz z **przykładanym napięciem** wzrasta silnie średnica strugi (włókien) (Rysunek 26a), natomiast wartość napięcia krytycznego silnie zależy od stężenia roztworu (Rysunek 26b).



Rysunek 26. a) Zależność średnicy strugi od przykładanego napięcia, b) zależność progowego napięcia od stężenia polimeru [108]

Wykazano, że **przykładane napięcie** ma znaczący wpływ na średnicę włókien PCL przędzonych z HFIP. Zmieniając napięcie z 10kV do 25, średnica włókien wzrosła z 0,8 do 1,6µm, przechodząc przez minimum przy 15kV (0,62µm) [109]. Wraz ze wzrostem przykładanego napięcia w przypadku roztworów o niskiej lepkości wzrasta tendencja formowania koralików PCL [33].

W literaturze przedmiotu nie ma danych opisujących wpływ przykładanego **napięcia na krystaliczność** PCL. Można znaleźć jedynie dane dotyczące krystaliczności w funkcji przyłożonego napięcia dla włókien celulozowych zbieranych na płytę [110]. Wynika z nich, że krystaliczność wzrasta wraz ze wzrostem przyłożonego napięcia, by osiągnąć maksimum po przekroczeniu którego spada. W pracy tłumaczy się to większą dynamiką krystalizacji

w przypadku wyższych napięć, obniżoną po przekroczeniu krytycznego napięcia przez dłuższą drogę opadania włókien.

Wydatek roztworu regulowany jest przez **szybkość podawania** dzięki pompie dozującej. Odpowiednia szybkość podawania jest krytyczna w tworzeniu stożka Taylora. Zbyt duży przepływ roztworu prowadzi do kapania roztworu podczas przedzenia. Zbyt mały może doprowadzić do odparowywania rozpuszczalnika w dyszy i jej zatykania [¹¹¹,¹¹²].

Prowadzono także prace nad optymalizacją **długości dyszy**. Wynika z nich, że stosowanie długich igieł prowadzi do większego stopnia uporządkowania makrocząsteczek w dyszy oraz formowania włókien o mniejszym rozrzucie grubości [¹¹³].

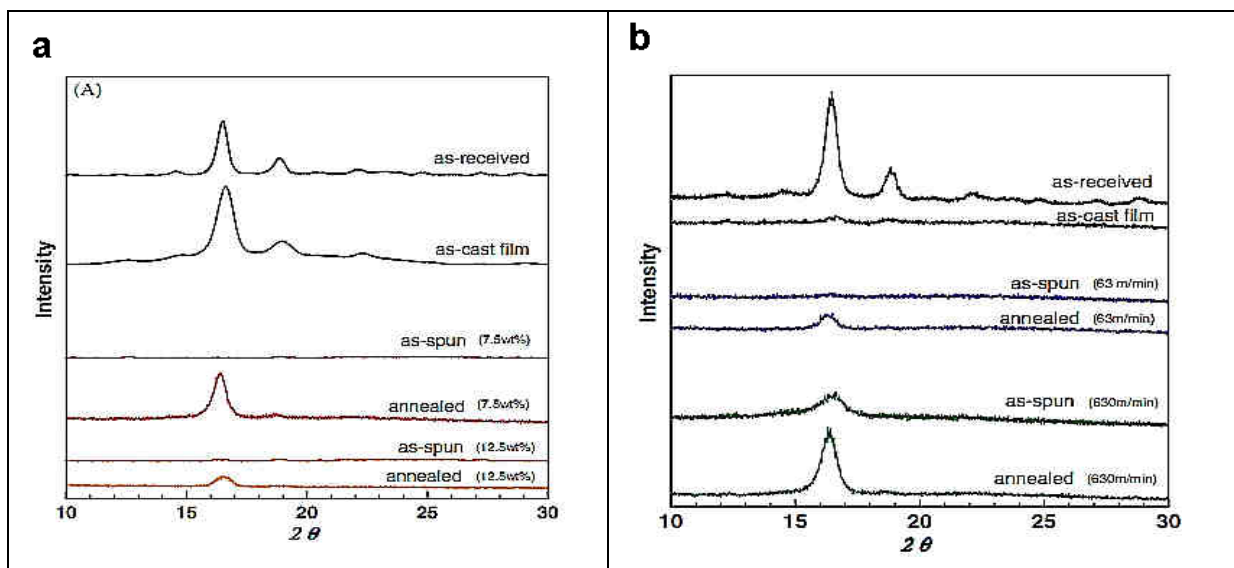
Odpowiednia **odległość pomiędzy dyszą a kolektorem** pozwala na całkowite odparowanie rozpuszczalnika, co wpływa również na morfologię włókniny (posklejane włókna gdy zbyt mała odległość) [⁹¹].

Rodzaj kolektora umożliwia tworzenie włókien o określonej architekturze. Włókna mogą być przedzione na kolektor w kształcie płyty, rotujący z zadaną szybkością bębna, a także siatki i druty dzięki którym tworzy się struktury o większej porowatości [¹¹⁴]. Podczas przedzenia na płytę włókna charakteryzują się przypadkowym ułożeniem.

Zastosowanie bębna prowadzi do tworzenia włókien, w których włókna ułożone są zgodnie z kierunkiem rotacji. Dokładność ułożenia włókien można regulować poprzez szybkość rotacji bębna na który włókna są zbierane oraz przykładane do elektrod napięcie [¹¹⁵,¹¹²]. Zbierane na rotujący bęben włókna wykazują mniejszą średnicę niż włókna zbierane na płytę (przy tych samych pozostałych parametrach), co jest związane z rozciąganiem włókien podczas zbierania.

Poprzez zastosowanie odpowiedniego kolektora można modulować stopień porowatości całkowitej włókien [⁸²]. Zwykle porowatość wynosi od 60-92%, a wielkość porów od 1-465 μm [¹¹⁶].

W pracy nad PLLA [¹¹²] wykazano zmianę krystaliczności wraz ze wzrostem stężenia polimeru oraz stopniem rozciągania, a także wyższą orientację molekularną i krystaliczność włókien zbieranych przy szybkości 630m/min niż 63m/min (Rysunek 27 a, b). Wykazano, wzrost stopnia krystaliczności wraz ze wzrostem stężeniem polimeru, który dodatkowo można zwiększyć przez wygrzewanie (ang. annealed) (Rysunek 27 a). Zauważono, że zbieranie włókien z większą szybkością rotacji bębna prowadzi również do większej krystaliczności, którą również dodatkowo można podwyższyć poprzez wygrzewanie (Rysunek 27 b).



Rysunek 27. Profil radialny WAXS proszku, filmu, włókien oraz włókien rozciąganych PLLA a) w różnych stężeniach z DCM/pirydyna, b) przy różnej szybkości zbierania na bęben [114]

Włókna PAN zbierane na obracający się bęben z szybkością od 0-12,3obr/min wykazują wzrost orientacji molekularnej wraz ze wzrostem szybkości obracania bębna [22]. Modulując szybkość obrotów bębna można zatem otrzymywać włókna o określonej orientacji molekularnej [117]. Orientacja molekularna we włóknach zbieranych na bęben wynika z rozciągania makrocząsteczek podczas odbioru. Wykazano także, że większa szybkość obrotu bębna prowadzi do bardziej równoległego ułożenia włókien pomiędzy sobą.

Powszechnie spotykane w literaturze badania mechaniczne odnoszą się również do całych włókien rozciąganych na tradycyjnych maszynach wytrzymałościowych typu INSTRON. W literaturze spotkać można wartości modułu Younga oraz wytrzymałość na zerwanie odnoszące się do przekroju włókniny lub do właściwego przekroju włókien, co wpływa na duże rozbieżności tych wartości.

Włókniny zbierane na obracający się bęben wykazują wyższą wytrzymałość na zerwanie niż włókniny zbierane na płytę. Związane jest to z wyższą orientacją molekularną włókien zbieranych na bęben oraz wyższym stopniem krystaliczności.[112].

2.9.3.3. Środowisko zewnętrzne

Temperatura powietrza wpływa na szybkość parowania roztworu podczas przedzenia. W podwyższonej temperaturze rozpuszczalnik odparowuje szybciej, krótszy jest czas krystalizacji, co prowadzi do tworzenia włókien o niewielkim stopniu krystaliczności [91].

Wzrost temperatury, podgrzewanie kolektora może prowadzić do formowania porowatych włókien [118].

Wilgotność powietrza oddziałuje na przewodność elektryczną środowiska. Gdy wilgotność wzrasta do 30-50% formowane włókna są znacznie cieńsze, siły rozciągania efektywniejsze, a dzięki temu można przykładać niższe napięcie [91]. Możliwe staje się formowanie z roztworów o dużej lepkości.

Zazwyczaj przedzenie prowadzi się w atmosferze powietrza, możliwe jest również przedzenie w atmosferze innych gazów.

Porowatość na powierzchni może być również wywołana wilgotnością otaczającego środowiska- zmiany wilgotności wywołują zmiany szybkości parowania rozpuszczalnika i w efekcie pory na powierzchni. Wpływ wilgotności na porowatość powierzchniową obrazowano z użyciem AFM [119].

W niewielu laboratoriach temperatura i wilgotność są ściśle kontrolowane, dlatego też niewielu autorów porusza problemy tych parametrów.

2.10. Wpływ dodatku biopolimeru na morfologię i strukturę włókien dwuskładnikowych

Dodatek biopolimeru wywołuje zmiany nie tylko w morfologii włókien, ale również w strukturze molekularnej i nadmolekularnej. W rozdziale tym, szczególną uwagę podczas przeglądu literatury, zwrócono na formowanie włókien PCL (lub innych poliestrów alifatycznych w przypadku braku danych na temat PCL) z dodatkiem żelatyny lub kolagenu.

Wraz z **dodatkiem Ge** stwierdzono znaczny spadek średnicy włókien na przykładzie włókien z PLGA/Ge oraz PLCL/Ge [120]. Dodatkowo odnotowano spadek średnicy włókien oraz porowatości włókniny w przypadku przedzenia **na bęben**, w porównaniu z włóknami przedzionymi z tych samych roztworów **na płytę**.

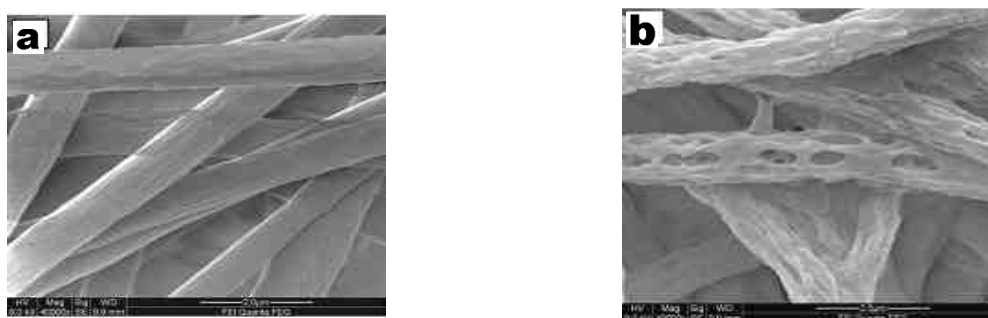
Z punktu wykorzystywania włókien dwuskładnikowych w warunkach in-vitro oraz in-vivo, zagadnienia dotyczące mieszalności (kompatybilności) polimerów, oddziaływania grup chemicznych obu składników wydają się istotne. Jednakże dane literaturowe mieszalności poliestrów i biopolimerów są bardzo fragmentaryczne, a niekiedy sprzeczne.

O mieszalności często wnioskuje się na podstawie temperatury zeszklenia T_g wyznaczonej z krzywych DSC. Wiadomo bowiem, że temperatura zeszklenia mieszanki jest pośrednią temperaturą obu składników i możliwe jest jej teoretyczne wyznaczenie [121]. W przypadku niemieszalności obserwuje się dwie T_g pochodzące od obu składników.

Przykładowo mieszalność jedwabiu i Ge we włóknach udowodniono za pomocą DSC, wskazując na wartość T_g mieszanki pomiędzy wartościami czystych składników [122].

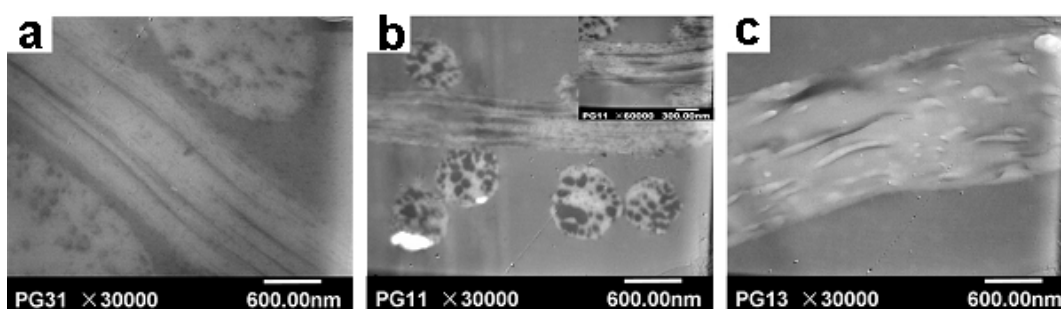
Określenie mieszalności za pomocą DSC nie zawsze jest jednak wiarygodne, gdyż czynniki zewnętrzne takie jak wilgotność powietrza oraz temperatura rzutują na wartość Tg. W pracy Euna mówi się o silnym wpływie wody na wartość Tg dla Ge (zawartość wody znacznie zwiększa Tg) [122]. Ponadto, Tg mieszanin niektórych polimerów przypada w temperaturze topnienia drugiego polimeru np. w układzie PCL/Ge, co znacznie utrudnia wyznaczenie Tg dla Ge.

Badania Zhanga wykazują separację faz PCL/Ge w roztworze TFE. Umieszczenie włókien w roztworze PBS na 7 dni doprowadziło do powstania porów będących skutkiem wymycia Ge (Rysunek 28) [123], co jest dowodem separacji faz, a tym samym wskazuje na brak mieszalności obu składników.



Rysunek 28. Włókna przędzone PCL/Ge z TFE a) bezpośrednio po wyprzędzeniu, b) po 7 dniach wymywania w PBS w 37°C [123]

Badając strukturę włókien PLLA/Ge elektroprzędzonych z TFE również stwierdzono brak mieszalności- wytrącanie się żelatyny. Obrazy TEM wskazują na wytrącanie się żelatyny w pasmach równoległych do osi włókna (Rysunek 29) [124]. Za pomocą XPS określono poszczególne grupy funkcyjne wchodzące w skład włókien.



Rysunek 29. Zdjęcia TEM włókien PLLA:Ge a) 3:1, b) 1:1, c) 1:3 [124]

Analizę FTIR przeprowadzono dla mieszanki chitozan-PEO [125]. Widmo nie wykazuje charakterystycznych pików właściwych dla obu składników. Widoczne są natomiast piki o zmodyfikowanym kształcie wskazujące na zmiany w strukturze obu składników tj. na mieszalność obu składników.

W 2008 roku ukazała się praca o prowokacyjnym tytule „*Electro-spinning of pure collagen nano-fibres – Just an expensive way to make gelatin?*”. Zwrócono w niej uwagę na

działanie silnie polarnych rozpuszczalników w kierunku denaturacji struktury białek. Dotyczy to szczególnie powszechnie stosowanych jako rozpuszczalniki fluorowych alkoholi takich jak HFIP czy TFE. Autorzy twierdzą, że oddziaływanie silnych grup polarnych rozpuszczalnika niszczy słabe wiązania wodorowe odpowiedzialne za strukturę helis [¹²⁶].

Niejako w odpowiedzi na to ukazała się praca [¹²⁷], w której autorzy są zgodni, co do denaturacji kolagenu w obecności HFIP, jednak wskazują na różnice właściwości tak wytworzonych włókien w porównaniu z żelatyną. Twierdzą jednocześnie, że po 15 dniach hodowli komórek na podłożach z dodatkiem żelatyny, nie ma różnicy w stopniu proliferacji w porównaniu z podłożami z dodatkiem kolagenu.

Jedyna praca, w której wyznaczono krystaliczność PCL we włókninach dwuskładnikowych dotyczy włóknin PCL/Ge [¹²⁸]. Wyznaczona z krzywych DSC krystaliczność dla włókien PCL/Ge 50:50 przedzionych z HFIP oraz TFE wynosi odpowiednio 0,20 i 0,25. W tej samej pracy wnioskuje się o mieszalności obu składników na podstawie przesunięcia pików radialnych WAXS (przesunięcie pików 110, 200). Wnioskowanie takie, na podstawie wyników WAXS, wydaje się co najmniej problematyczne.

Na funkcjonalność podłoży polimerowych w badaniach in-vitro wpływ ma również hydrofobowość. Poliestrowe włókna wyróżniają się znaczną hydrofobowością, podczas gdy włókna pochodzenia naturalnego- żelatyna, kolagen- hydrofilowością. Stosowany w pracy PCL jest silnie hydrofobowy, kąt zwilżania wynosi 109° [¹²⁹]. Ge wyprzedziona z HFIP jest natomiast hydrofilowa, kąt zwilżania wynosi 76° [¹³⁰]. Mieszanki włókien syntetycznych i naturalnych są znacznie bardziej hydrofilowe. PCL/Ge, PLGA/Ge 80:20 są zupełnie hydrofilowe, a ich kąt zwilżania wynosi 0-20° [^{131,47}]. Zatem nie obserwuje się addytywności tego czynnika. W literaturze brakuje wyjaśnień tego zjawiska. W niektórych pracach mówi się o porządkowaniu grup niepolarnych biopolimeru w obecności polimeru syntetycznego. W innych, wskazuje się na jonizację żelatyny [^{43,47}].

2.11. Hodowla komórek na włókninach formowanych metodą elektroprzędzenia

W literaturze przedmiotu można spotkać wiele prac przeglądowych na temat zachowania komórek w badaniach in-vitro, na włóknach formowanych metodą elektroprzędzenia, tworzonych z różnych polimerów, roztworów, przy zmiennych parametrach, modyfikując powierzchnie tych polimerów plazmą, grupami RGD, czy tworząc mieszanki polimer syntetyczny/biopolimer, np.: [^{4,7,14,111}].

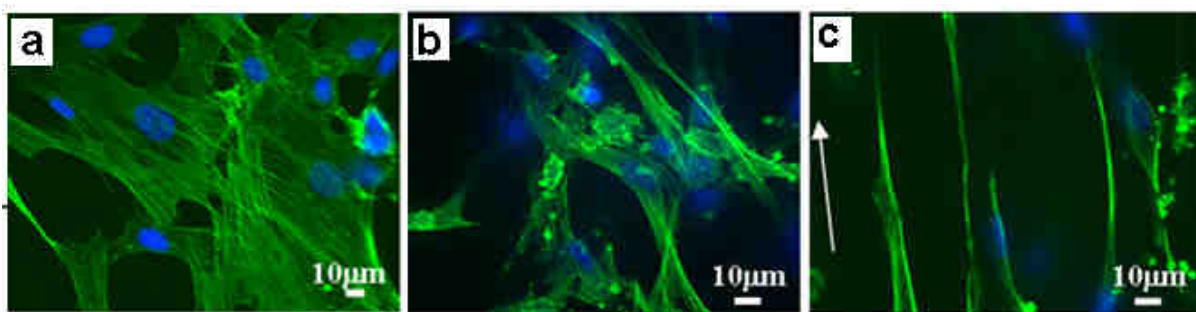
Średnicę włókien PCL z roztworów o stężeniach 8, 15, 20% w HFIP modulowano dodatkowo przykładanym napięciem [109]. Z roztworu o najmniejszym stężeniu formowane były włókna z koralikami. Hodowane na tak formowanych podłożach komórki 3T3 wykazywały wzrost proliferacji wraz ze stężeniem roztworu (8, 15, 20%), co koreluje ze wzrostem średnicy włókien. Natomiast komórki wysiane na włókninach przedzionych z roztworu 8% przy zmiennym przykładanym napięciu, w pierwszych 4 dniach wykazują niezależny stopień proliferacji od przykładanego napięcia, a po 6 dniach spadek proliferacji na włókninach przedzionych przy wysokich napięciach (o większej średnicy włókien). W tej samej pracy mówi się o negatywnym działaniu koralików na proliferację i adhezję 3T3, a stopień proliferacji uzależnia jedynie od morfologii włókien.

Zwiększanie porowatości włóknin poliestrowych poprzez stosowanie różnego rodzaju kolektorów również prowadzi do wzrostu migracji i stopnia proliferacji komórek [132]. Pory są drogami transportu czynników odżywczych (poprzez konwekcję i dyfuzję), a także wolnymi przestrzeniami migracji i odtwarzania (poprzez proliferację) nowej tkanki [11]. Wielkość porów włóknin PCL modyfikując kolektor zwiększono nawet do 10 razy by umożliwić proliferację komórek 3T3. Niestety, w pracy nie oszacowano wzrostu liczby komórek wraz ze wzrostem porowatości [133].

Niektóre tkanki wykazują **równoległe ułożenie włókien** kolagenowych w ECM. Stało się to inspiracją do tworzenia kolektorów pozwalających na takie formowanie włókien metodą elektroprzędzenia, by naśladować to co w naturze. Przykładowo, w ścięgnach i więzadłach siły rozciągające są 200-500 razy wyższe zgodnie z kierunkiem włókien (kierunek w którym siły są transmitowane), niż w kierunku prostopadłym [134]. W chrząstce stawowej, siły rozciągające są wyższe w strefie powierzchniowej, a najwyższe wzdłuż głównego kierunku włókien kolagenowych [135, 136]. Wskazuje się zatem na konieczność formowania anizotropowych struktur, anizotropowością przypominających ECM. Zbieranie na obracający się bęben czy równoległe ułożone do siebie elektrody pozwala na tworzenie takich struktur [4, 82].

Zaobserwowano znaczny wzrost proliferacji i migracji fibroblastów na podłożach PCL o podwyższonej wielkości porów sięgających do 50µm [137]. Dodatkowo efekt migracji komórek zwiększono przez zastosowanie techniki “*layer by layer*”, w której warstwowo przedzie się włókninę oraz posiewa komórkami i cały zabieg powtarza kilka razy.

Wysiane ludzkie komórki nerwowe (*Schwann cells*) na podłożach PCL, po 7 dniach hodowli, układają się zgodnie z kierunkiem ułożenia włókien zbieranych na bęben. Odczytują sygnały z podłoża (zjawisko CG) (Rysunek 30) [138].

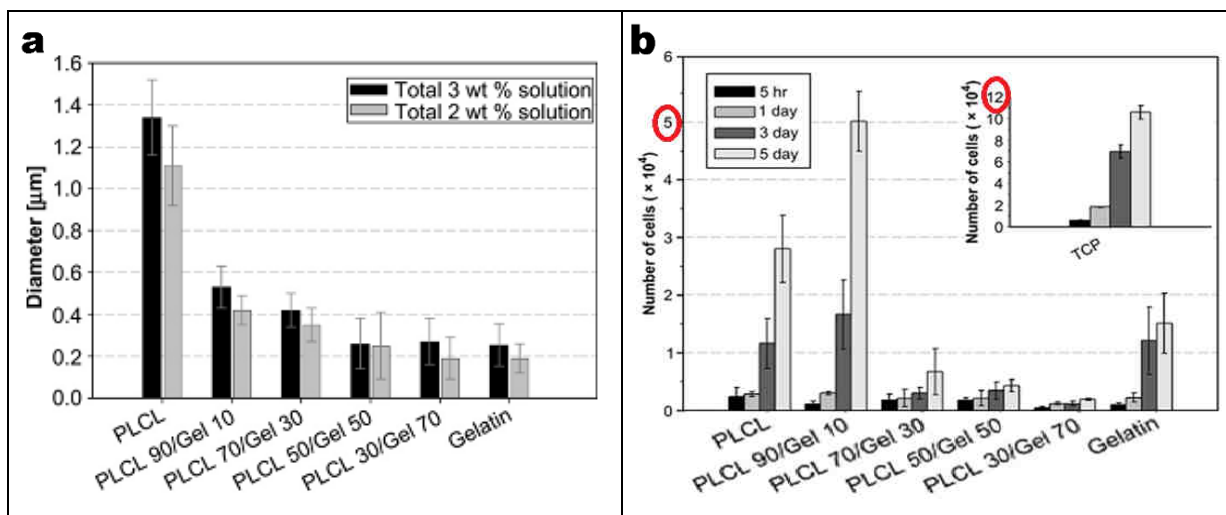


Rysunek 30. Zdjęcia FM komórek po 7 dniach hodowli na a) próbce kontrolnej, b) przypadkowo ułożonych włóknach, c) równoległe ułożonych włóknach [¹³⁸]

Badania dotyczące dodatku Ge w celu podniesienia funkcjonalności włókniny jako podłoża komórkowe odnoszą się najczęściej do arbitralnej, lakonicznie uzasadnionej ilości dodatku Ge.

Jedyna odnaleziona praca, w której formowano włókna w szerokim zakresie dodatku biopolimeru dotyczy włókien PLCL/Ge [¹²⁰]. Na płytę zbierano włókna PLCL:Ge 100:0 90:10, 70:30, 50:50, 30:70, 0:100. Wykazano spadek średnicy włókien (Rysunek 31 a), wzrost porowatości (52-74%) oraz modułu Younga wraz z dodatkiem Ge. Na podstawie danych DSC potwierdzono mieszalność jedynie we włóknach PLCL/Ge 90:10. Według autorów w pozostałych mieszankach nie ma mieszalności obu składników. Przeprowadzone badania wskazały na większą aktywność komórek 3T3 na włókninach PCL/Ge 90:10 niż na czystych PCL i Ge oraz pozostałych mieszankach (Rysunek 31 b). Aktywność ta pozostaje jednak znacznie niższa niż na próbce kontrolnej TCP. Niestety, nie analizowano wpływu dodatku Ge na strukturę nadmolekularną włókien (np. stopienia krystaliczności).

Nerwowe komórki macierzyste (C17.2) wysiane na podłożach PCL oraz PCL/Ge 70:30 po 2, 4, 6 dniach wykazują większą aktywność zmierzoną za pomocą testu MTT na włókninach elektroprzędzonych na bęben (wyróżniony kierunek ułożenia) niż na płytę (przypadkowo ułożenie włókien) [¹²⁹]. Tłumaczy się to większą hydrofilowością podłoża PCL/Ge niż włókniny PCL oraz odczytywaniem przez komórki topografii powierzchni wynikającym ze zjawiska przewodnictwa kontaktowego CG, wydłużaniem szkieletu aktynowego zgodnie z kierunkiem ułożenia włókien. Nie podjęto próby hodowli komórek na podłożach PCL/Ge 50:50 ze względu na zbyt słabe zdaniem autorów właściwości mechaniczne oraz krótki czas degradacji.



Rysunek 31. a) Średnia średnica włókien b) aktywność komórek 3T3 w funkcji dodatku żelatyny dla włókien PLCL/Ge [122]

Komórki nerwowe hodowane na podłożach PLCL/Col wykazały większą aktywność na włókninach przedzionych na bęben, formowanych z kopolimeru syntetycznego z dodatkiem Col typu I i III niż na podłożach wyłącznie z dodatkiem Col I. Włókna zbierane na bęben wyróżniały się wyższymi właściwościami mechanicznymi niż zbierane na płytę. W pracy zilustrowano także zjawisko przewodnictwa adhezyjnego CG [139].

Komórki nowotworowe wysiane na włókninach PCL, PCL/Ge wytworzonych z różnych roztworów (o równych właściwościach) analizowała grupa Harmana [128]. W pracy dowiedziono wskazano zalety dodatku Ge do PCL oraz formowania włókien z HFIP (w porównaniu do TFE). Tworzone włókna dwuskładnikowe PCL/Ge charakteryzują się mniejszą średnicą oraz wyższym modułem Younga w porównaniu z włóknami PCL/Ge przedzionymi z TFE.

W nielicznych pracach podejmuje się temat różnicowania komórek na podłożach wytworzonych metodą elektroprzedzenia. Wykazano, że różnicowanie komórek macierzystych w komórki nerwowe jest bardziej efektywne na podłożach PCL/Col niż na włókninach z czystych PCL i Col [140]. Badania przeprowadzono na włóknach PCL oraz PCL/Col 50:50.

2.12. Krytyczne podsumowanie literatury

2.12. 1. Włókna jednoskładnikowe

Analiza literatury wskazuje, że:

- Parametry procesu elektroprzedzenia związane z roztworem oraz aparaturą analizowane są w bardzo wąskim zakresie. Często przygotowuje się roztwory o 1-3 stężeniach

i przedzie włókna przy stałym (wybrany) napięciu, na płytę lub kolektor. Arbitralnie wybrane parametry, nie koniecznie są optymalne z perspektywy formowania jednorodnych, wolnych od koralików włókien oraz ich zastawania jako podłoża komórkowe [97, 109, 128].

- Zauważa się niespójne, wręcz sprzeczne informacje na temat rodzaju parametrów wpływających na średnicę włókien. Przykładami są prace Diezela [90] oraz Demira [108]. Ten pierwszy wskazał, że średnica włókien zależy logarytmicznie od stężenia polimeru, a przykładane napięcie ma wpływ jedynie na formowanie się koralików. Natomiast Demir wzrost średnicy włókien uzależniał właśnie od przykładanego napięcia. W jeszcze innej pracy mówi się o spadku średnicy włókien wraz z przykładanym napięciem, a po przekroczeniu pewnego minimum, jej wzroście [109].
- Większość analizowanych prac ogranicza się do opisu morfologii, średnicy włókien, czy ich ułożenia [82, 94, 97]. W niektórych pracach porowatość wyznacza się z użyciem porozymetrii rtęciowej, co przy małych średnicach włókien i rozmiarach porów wydaje się być mało wiarygodną metodą [82, 120].
- Dane dotyczące badań struktury nadmolekularnej są bardzo fragmentaryczne. O krystaliczności wnioskuje się z danych DSC, WAXS, jednakże w wielu pracach poza analizą jakościową - stwierdzeniem obecności fazy krystalicznej, nie wyznacza się stopnia krystaliczności [128]. Podobnie z orientacją molekularną- obserwuje się wyraźny brak danych dotyczących wpływu parametrów procesu na orientację włókien. Praca Inai na temat PLLA jest najszerzym odnalezionym w literaturze opisem wpływu parametrów na stopień orientacji molekularnej, niestety również tylko jakościowym [112]. Dla PCL nie odnaleziono w literaturze tego typu danych.
- Moduł Younga pojedynczych włókien wyznaczany jest z danych AFM lub badań rozciągania włókien. Największe kontrowersje budzą wyniki włókien, gdyż autorzy nie zawsze podają czy wyznaczone wartości odnoszą się do faktycznego przekroju włókien we włókninie (z uwzględnieniem porowatości). Obserwuje się również sprzeczność tych danych- w jednych pracach mówi się o wzroście modułu Younga wraz ze średnicą włókien, w innych wręcz przeciwnie [33, 107].
- Brakuje danych literaturowych analizujących wpływ parametrów przedzenia strukturę włókien oraz na adhezję i stopień proliferacji komórek na włókninach jednoskładnikowych. W pracy Bhowmicka [109] stopień proliferacji komórek uzależnia się od stężenia roztworów oraz przykładanego napięcia, mierząc jedynie średnicę włókien.

2.12.2. Włókna dwuskładnikowe

Analiza literatury wskazuje, że:

- W przypadku włókien dwuskładnikowych mnogość parametrów powoduje, że włókna są formowane najczęściej z roztworów o jednym stężeniu, z dodatkiem biopolimeru w arbitralnej ilości ustalonej pod względem funkcjonalności włókien w badaniach in-vitro [¹²³, ¹²⁴, ¹²⁸]. W wielu pracach ustalone proporcje polimer syntetyczny/biopolimer to 50:50, bez uzasadnienia dlaczego w tej proporcji, w innych 70:30.
- Oszacowanie średnicy włókien dwuskładnikowych oraz porowatości ogranicza się również do 1-2 mieszanek w porównaniu z materiałem wyjściowym, za który uznaje się czysty polimer syntetyczny [¹²³, ¹²⁴, ¹²⁸]. Jedyna praca dotycząca włókien dwuskładnikowych, w której szerokim zakresie opisano zmiany średnicy, porowatości, modułu Younga oraz oszacowano aktywność komórkową wraz z dodatkiem Ge dotyczy włókien PLCL/Ge [¹²⁰].
- Wiele sprzecznych informacji można znaleźć na temat mieszalności poliestrów i biopolimerów. W niektórych pracach powołując się na analizę FTIR, WAXS, DSC mówi się o oddziaływaniach pomiędzy tymi polimerami [¹²⁰, ¹²⁸]. W innych wskazuje się na separacje faz oraz brak mieszalności [¹²³, ¹²⁴].
- W literaturze dotyczącej mieszanek brakuje ilościowej analizy struktury włókien. Jedyna praca, w której pokazuje się krystaliczność PCL w mieszanke dotyczy włókien PCL:Ge 50:50 przedzionych na płytę [¹²⁸].
- Generalnie obserwuje się arbitralny dobór stężenia polimeru, kolektora czy przykładanego napięcia [⁴³, ⁴⁷, ¹²⁸, ¹³⁹].
- Stosowanie kosztownego kolagenu podczas wytwarzania włókien jest dość powszechne. W 2008 roku pojawiła się praca wskazująca na denaturację kolagenu w silnie polarnych rozpuszczalnikach, mimo to w ostatnich 3 latach niewiele prac dotyczących przędzenia kolagenu w HFIP czy TFE odnosi się do tego problemu.
- Brakuje wyjaśnienia który z mechanizmów działania biopolimeru (np. żelatyny- RGD, spadek hydrofobowości, zmiana krystaliczności) jest najbardziej istotny w celu podniesienia funkcjonalności włókniny jako podłoża komórkowego w badaniach in-vitro.
- Badania komórkowe prowadzone są również na włókninach formowanych z arbitralnie dobranych proporcji polimeru syntetycznego i żelatyny, na jednym typie komórek [¹³⁰, ¹³²].

3. CEL PRACY

Brak oraz niespójność danych literaturowych na temat parametrów procesu elektroprzedzenia, decydujących o morfologii, strukturze oraz właściwościach formowanych włókien, w kontekście ich funkcjonalności w inżynierii tkankowej, spowodował wyznaczenie następujących celów pracy:

Pierwszym celem jest określenie parametrów procesu elektroprzedzenia mających istotny wpływ na morfologię oraz strukturę nadmolekularną włókien jednoskładnikowych. Cel ten zrealizowano badając włókna formowane z polikaprolaktonu; modyfikując: rodzaj rozpuszczalnika, stężenie polimeru, przykładane napięcie oraz rodzaj kolektora.

- Zasadniczą kwestią, związaną z powyższym celem, był dobór parametrów procesu w celu formowania jednorodnych, wolnych od defektów typu koralu, włókien z polikaprolaktonu i z zastosowaniem wybranych rozpuszczalników.
- Dominującą kwestią była ocena struktury nadmolekularnej włókien jednoskładnikowych: określenie stopnia krystaliczności oraz orientacji molekularnej w zależności od wybranych parametrów procesu.
- Kolejnym zadaniem była ocena wpływu morfologii oraz struktury nadmolekularnej na funkcjonalność włókien jednoskładnikowych jako podłoża komórkowego. W pracy badano cytotoksyczność oraz adhezję i stopień proliferacji komórek w hodowli in-vitro.

Drugim nadrzędnym celem pracy jest określenie wpływu dodatku biopolimeru na morfologię, hydrofobowość oraz strukturę molekularną i nadmolekularną włókien dwuskładnikowych w kontekście funkcjonalności włókien w badaniach in-vitro. Jako biopolimer użyto żelatynę oraz porównawczo kolagen (rekomendowany w literaturze). W ramach tego celu podjęto następujące wątki:

- Ważnym zagadnieniem była analiza wpływu dodatku biopolimeru na morfologię, strukturę molekularną nadmolekularną (krystaliczność oraz stopień orientacji molekularnej kryształów we włóknach) we włóknach. Badano również wpływ biopolimeru na wybrane właściwości włókien tj. hydrofobowość oraz moduł Younga.
- Szczegółowym celem utylitarnym była optymalizacja ilości biopolimeru we włóknach w kontekście funkcjonalności włókien w badaniach in-vitro.
- Próba wyjaśnienia mechanizmu poprawy właściwości biologicznych w wyniku dodatku biopolimeru, a także ustosunkowanie się do dyskusji literaturowej w kwestii zasadności używania żelatyny zamiast kolagenu wydawała się również konieczna.

4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

4.1. Materiały

Metodą elektroprzędzenia zostały wytworzone włókna jednoskładnikowe: z czystego polikaprolaktonu (PCL), żelatyny (Ge) i kolagenu (Col); oraz dwuskładnikowe: PCL/Ge i dodatkowo PCL/Col.

PCL

Polikaprolakton (PCL) jest biozgodnym, biodegradowalnym poliestrem wykorzystywanym w implantologii. Ze względu na długi czas biodegradacji oraz dobre właściwości mechaniczne znajduje coraz szersze zastosowanie w inżynierii tkankowej [31]. W badaniach został wykorzystany PCL o średniej wagowej masie cząsteczkowej $M_w=80000\text{Da}$ (Sigma Aldrich).

Kolagen

Włókna były formowane z użyciem kolagenu (Col) pozyskanego ze ścięgien szczurów na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu, scharakteryzowanego w pracach [141, 142, 143].

Żelatyna

W badaniach użyto Ge typu A (Sigma Aldrich) o średniej wagowej masie cząsteczkowej $M_w=300000\text{Da}$, powstającą w środowisku kwasu, ze świńskiej skóry. Ge typu A charakteryzuje się większym podobieństwem struktury chemicznej (rodzaje grup amidowych) niż Ge typu B (Tabela 1).

Jako podstawowe **rozpuszczalniki** wykorzystano hexafluoro-2-propanol (HFIP); chloroform; 2,2,2 trifluoroetanol (TFE) oraz dodatkowo: dimetyloforamid (DMF) (podwyższenie przewodności elektrycznej) i metanol (podwyższenie stałej dielektrycznej). Wszystkie rozpuszczalniki zakupiono w firmie Sigma Aldrich.

4.2. Metoda formowania włókien

Włókna jedno i dwuskładnikowe formowano metodą elektroprzędzenia. Układ zgodnie z Rysunkiem 16b (strona 26) składał się ze strzykawki z roztworem, pompy dozującej roztwór, źródła wysokiego napięcia oraz kolektora- płyty (**P**) lub bębna (**B**).

Odczynniki odważono na wadze z dokładnością 0,01mg zgodnie z zadaniem stężeniem (stężenie roztworów określano wagowo, w/w). Roztwory przedziano po 48h mieszania polimeru w rozpuszczalniku z użyciem mieszadła mechanicznego. Jako dyszy przedzalnicy używano igły o długości 24mm i średnicy 0,6mm. Szybkość podawania roztworu regulowano

za pomocą pompy medycznej. Włókniny przedziano ze stałej objętości roztworu równej 1,5ml. Włókna zbierano na płytę (**P**) lub wirujący z szybkością 1000 obr/s bęben (**B**). Temperaturę i wilgotność powietrza pozostawały odpowiednio w zakresie 22-24°C, 30-42%.

Pozostałe parametry procesu elektroprzędzenia wytwarzanych włókien zestawiono w tabeli (Tabela 3).

Tabela 3. Włókna jednoskładnikowe- oznaczenia i parametry procesu

	Nazwa próbki	Polimer	Stężenie roztworu w/w[%]	Rodzaj rozpuszczalnika [w/w] *	Napięcie [kV]	Szybkość przepływu [ul/min]	Kolektor	
							P	B
1	PCLCM	PCL	4, 7, 10	chloroform/metanol 75:25	8-18	7, 20	x	
2	PCLCD1	PCL	12-14	chloroform/DMF 75:25	8-15	7	x	
3	PCLCD2	PCL	7-12	chloroform/DMF 50:50	13	7	x	
4	PCLH	PCL	3, 5, 7, 12	HFIP	8-18	7	x	x
5	PCLT	PCL	12	TFE	13	7	x	
6	Ge	Ge	3, 5	HFIP	8-18	7	x	x
7	Col	Col	3	HFIP	13	7	x	

* przykładowo: chloroform/metanol 75:25 oznacza 75% chloroformu, 25% metanolu [w/w]

Tabela 4. Włókna dwuskładnikowe- przedziane z 5% roztworów HFIP z szybkością przepływu 7ul/min

	Nazwa próbki	Mieszanka polimerów *	Napięcie [kV]	Kolektor	
				P	B
1	PG4:1	PCL/Ge 80:20	8-20	x	x
2	PG1:1	PCL/Ge 50:50			
3	PG1:4	PCL/Ge 80:20			
4	PC4:1	PCL/Col 80:20	13	x	x

* przykładowo: PCL/Ge 80:20 oznacza 80% PCL, 20% Ge [w/w] we włóknie

4.3. Metodyka badań

Badania włókien jednoskładnikowych i dwuskładnikowych wytworzonych w różnych warunkach (Tabele 3 i 4) obejmowały:

- Badanie właściwości roztworów (lepkość oraz przewodność elektryczną, jako jedne z najbardziej istotnych parametrów roztworów [¹⁴⁴]), z wykorzystaniem konduktometru oraz wiskozymetru;
- Badanie morfologii: pomiar średnicy włókien, ułożenie włókien oraz architektura włókien. Średnią średnicę włókien oceniono ze zdjęć skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM); średnią porowatość całkowitą włókniny oszacowano odnosząc masę włókniny do masy teoretycznej litego materiału przy znanej objętości próbki; natomiast średnią wielkość porów wyznaczono z korelacji średniej średnicy i oszacowanej porowatości całkowitej;

- Badanie struktury molekularnej: skład chemiczny, oddziaływanie charakterystycznych grup funkcyjnych oceniono za pomocą fourierowskiej spektroskopii w podczerwieni (FTIR); chemię powierzchni włókien z użyciem rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronów (XPS);
- Hydrofobowość włókien oszacowano na podstawie kąta zwilżania;
- Badanie struktury nadmolekularnej: krystaliczność PCL włókien oszacowano z wykorzystaniem różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) oraz szerokokątowej dyfrakcji rentgenowskiej (WAXS); czynnik orientacji molekularnej pojedynczych włókien oszacowano z dwójłomności optycznej wyznaczonej dzięki obrazowaniu mikroskopii polaryzacyjno-interferencyjnej (MPI); orientację kryształów PCL we włókninach z rentgenogramów WAXS;
- Właściwości mechaniczne włókien określono z klasycznej próby rozciągania na maszynie wytrzymałościowej INSTRON.

Uwaga: Wartości liczbowe wraz z odchyleniami, użyte do wyznaczenia zależności 3D zestawiono w tabelach w Dodatku 1.

4.3.1. Analiza właściwości roztworów

Przewodność elektryczna roztworów PCL, Ge, PCL/Ge została zmierzona z wykorzystaniem konduktometru Metrohm 660. Przed pomiarem urządzenie skalibrowano używając wodnego roztworu chlorku potasu o stężeniach 0,0001, 0,001, 0,01 mol/l.

Lepkość roztworów PCL, Ge, PCL/Ge mierzono w układzie stożek-płyta na obrotowym wiskozymetrze MCR 301 (Anton Paar) ze stałą szybkością ścinania 10 s^{-1} w czasie 50s. Wyznaczono, że przy średnicy igły 0,6mm i szybkości przepływu $7 \mu\text{l/h}$ szybkość ścinania w igle wynosi $5,4 \text{ s}^{-1}$ [145].

Na podstawie danych literaturowych wnioskuje się, że przewodność elektryczna oraz lepkość roztworów mieszanin PCL/Col zmienia się wraz z dodatkiem Col podobnie jak w przypadku dodatku Ge w mieszaninach PCL/Ge.

4.3.2. Badania morfologii

Strukturę otrzymanych włókien zobrazowano za pomocą SEM, (HITACHI S-4800). Obserwacje próbek przeprowadzono przy napięciu przyśpieszającym 2-5 keV, w trybie elektronów wtórnych. Przed obserwacją, próbki napyłono złotem przez 3 minuty (napyłarka Polaron SC7640), stosując natężenie prądu 10 mA. Zarejestrowano obrazy przy powiększeniach 1000-50 000 razy. Średnią średnicę włókien wyznaczono zazwyczaj ze

średnic 30 włókien (ze 100, gdy celem było określenie rozrzutu grubości), z wykorzystaniem programu QCapture Pro 6. Zdjęcia SEM umożliwiają również określenie zdefektowania włókien, np. poprzez obecność koralików.

Porowatość całkowitą p wyznaczono szacując objętość włókien V_f we włókninie przy znanych masie włókien m_f oraz masie hipotetycznej litego materiału m_t o objętości równej objętości włókniny. W praktyce sprowadza się to do zależności:

$$p = \frac{V_t - V_f}{V_t} = \left(1 - V_f * \frac{\rho}{m_t}\right) = \left(1 - \frac{m_f}{m_t}\right) \quad (1)$$

gdzie: V_t jest objętością hipotetyczną materiału o grubości równej grubości badanej włókniny (1x4x0,1mm), zaś gęstość ρ wynika z gęstości komponentów (PCL 1,21g/cm³, Ge 1,101g/cm³ [31, 47]).

Średni udział włókien na jednostkę objętości p oraz średnią grubość włókien D wykorzystano do wyznaczenia **średniej wielkości porów** zgodnie z równaniem zaproponowanym w pracy [146], przekształconym do postaci:

$$P = \frac{2D}{(1-p)} \quad (2)$$

gdzie: D jest średnicą średnicą włókien, p - porowatość całkowita włókniny.

4.3. Badania struktury molekularnej

Fourierowska spektroskopia w podczerwieni ATR-FTIR (*ang. Attenuated Total Reflection Fourier IR Spectroscopy*) umożliwia określenie grup funkcyjnych wchodzących w skład materiału oraz oddziaływań tych grup z otoczeniem [147].

Oddziaływania pomiędzy określonymi grupami funkcyjnymi nanowłókien analizowano na podstawie widm zarejestrowanych na spektrofotometrze (Bio-Rad FTS-135). Próbkę o masie ok. 3mg skanowano 32 razy z rozdzielczością 8cm⁻¹ w zakresie liczb falowych 600 - 4000 cm⁻¹. Określono drgania **charakterystycznych grup** dla czystych polimerów oraz podjęto próbę **analizy oddziaływań PCL i biopolimeru** na podstawie przesunięć położenia pików.

Rentgenowska spektroskopia fotoelektronów XPS jest rodzajem spektroskopii elektronowej umożliwiającej analizę jakościową i ilościową **składu chemicznego powierzchni** na grubości poniżej 10nm. Powierzchnia włókien została przebadana na spektrometrze XPS (PHI LS 5600). Spektrometr ten wyposażony jest w lampę MgK α emitującą niemonochromatyczne promieniowanie rentgenowskie o energii 186,6 eV, z energią przejścia 150 i 50 eV. Zmierzone wartości energii wiązań dla poszczególnych

pierwiastków korygowano w odniesieniu do pasma węgla C1s (285 eV), stosowanego jako standard wewnętrzny używany podczas procedury kalibracji pomiaru.

Hydrofobowość włóknin oceniano na podstawie wartości pomiaru statycznego kąta zwilżania. Kąt zwilżania wodą oznaczono metodą kropli 5 μ l kładzonej w temperaturze pokojowej po 4 s. Wartość kąta odczytywano za pomocą goniometru PGX (Fibro System AB). Wynik jest średnią z 3 pomiarów.

4.3.4. Badania struktury nadmolekularnej

Stopień krystaliczności PCL włóknin wyznaczono za pomocą badań kalorymetrycznych DSC (Mettler T 28E, Perkin Elmer Pyris 1). Do kalibracji entalpii i temperatury zastosowano wzorcową próbkę indu. Pomiarów wykonano w atmosferze azotu z wykorzystaniem standardowych tygli aluminiowych. Próbki o masie od 4 do 6 mg ogrzewano z szybkością 10°C/min w zakresie temperatury 10-90°C dla próbek PCL oraz 10-180°C dla próbek: Ge, Col, PCL/Ge oraz PCL/Col. Temperatura topnienia jest średnią z 3 pomiarów. Entalpia topnienia kryształów została wyznaczona z krzywej kalorymetrycznej za pomocą programu Origin. Krystaliczność wyznaczono ze wzoru:

$$X_c = \frac{\int_{t_1}^{t_2} \left(\frac{dH}{dt}\right) dt}{\Delta H^0} \quad (3)$$

gdzie: dH/dt jest strumieniem ciepła na jednostkę masy, ΔH^0 - strumień ciepła dla 100% krystalicznego PCL, przyjęty jako 142,9 J/g [148].

Porównawczo stopień krystaliczności wyznaczono również metoda szerokokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego WAXS. Badanie wykonano z użyciem dyfraktometru (X-ray Oxford Diffraction) wyposażonego w goniometr horyzontalny szerokotorowy oraz katodą $MoK_{\alpha 1}$ $\lambda = 0.70926 \text{ \AA}$. Podstawą analizy wyników WAXS są rozkłady intensywności promieniowania rozproszonego względem kąta ugięcia 2θ (profile radialne na badanej strukturze.).

Z profili radialnych rentgenogramów, wyznaczono stopień krystaliczności PCL. Istota postępowania polega na rozkładzie profilu radialnego na składową część krystaliczną i amorficzną. Do analizy widma wykorzystano program PeakFit firmy Systat Software Inc. Widma amorficzne i krystaliczne odcinano funkcją Pearson VII Area, znając kąty położenia pików charakterystycznych dla kryształów i fazy amorficznej.

Podstawą szacowania **orientacji molekularnej** metodą WAXS jest analizowanie rozkładów intensywności promieni ugiętych na określonych płaszczyznach krystalograficznych w funkcji kąta azymutalnego na badanej strukturze. Ogólnie rzecz biorąc intensywność jest proporcjonalna do liczby płaszczyzn reflektujących pod danym kątem. W przypadku analizy orientacji, wyjściową informacją jest zatem $I_{hkl}(\zeta)$ gdzie ζ jest kątem azymutalnym.

W celu wyznaczenia orientacji osi krystalitów, a tym samym funkcji orientacji osiowej f_c (osiowego współczynnika orientacji) konieczne było wyznaczenie kąta orientacji krystalitu Ψ osi c , względem osi włókna:

$$f = \frac{1}{2}(3\langle \cos^2 \psi \rangle - 1) \equiv 1 - \frac{3}{2}\langle \sin^2 \psi \rangle \quad (4)$$

Przeliczenie kąta azymutalnego na kąt orientacji, określonego jako kąt zawarty pomiędzy normalną do danej rodziny płaszczyzn hkl a osią tekstury, odbywa się poprzez zależność Polanyiego [149], która dla kątów azymutalnych mierzonych od równika przybiera postać:

$$\sin \rho = \sin \delta * \cos \theta \quad (5)$$

gdzie: δ jest kątem azymutalnym mierzonym od równika rentgenogramu; ρ - kąt kierunkowy czyli kąt między normalnymi dla płaszczyzn sieciowych rozpatrywanej rodziny, a płaszczyzną równikową kuli Polanyi' ego, θ - kąt odbłyску reflektującej rodziny płaszczyzn sieciowych.

Znając kąt ρ , z zależność $I(\rho)$, wyznaczyć można kwadrat cosinusa kąta kierunkowego dla danej rodziny płaszczyzn hkl :

$$\langle \cos^2 \rho_{hkl} \rangle = \frac{\int_0^{2\pi} I(\rho) \cos^2 \rho \sin \delta \rho d\rho}{\int_0^{2\pi} I(\rho) \sin \rho d\rho} \quad (6)$$

Z symetrii układu ortogonalnego wynika, że wyznaczenie orientacji osi c jest możliwe na podstawie orientacji tylko jednej rodziny płaszczyzn reflektujących, co sprowadza się do równania:

$$\langle \cos^2 \Psi \rangle = 1 - 2\langle \cos^2 \delta_{hko} \rangle \quad (7)$$

W prowadzonych badaniach do wyznaczenia orientacji osi c wykorzystano refleks (110).

Pomiar dwójłomności optycznej miał na celu określenie czynnika orientacji molekularnej w pojedynczych włóknach. Badanie czynnika orientacji w pojedynczych włóknach wytwarzanych metodą elektroprzędzenia było nowatorskim zadaniem.

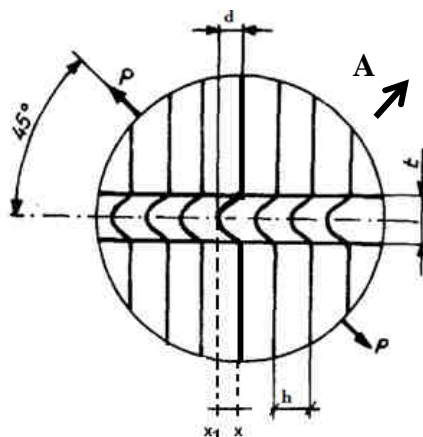
Dwójłomność optyczna jest jedną z podstawowych wielkości charakteryzujących anizotropię włókna. Zależy ona od składu chemicznego i budowy molekularnej w obszarach amorficznych i krystalicznych włókna. Określenie dwójłomności optycznej w materiałach dwufazowych pozwala na określenie **orientacji molekularnej** jednej z faz, mając informację o: orientacji molekularnej w drugiej fazie, udziale fazowym, jak również o dwójłomności właściwej danego polimeru. W pracy [150] wyznaczono dwójłomności właściwej PCL, ponieważ nie odnaleziono jej w danych literaturowych.

Dwójłomność włókien PCL przedzionych na szkiełka mikroskopowe wyznaczono metodą bezpośredniego pomiaru różnicy współczynników załamania za pomocą mikroskopu MPI wyposażonego w pryzmat dwójłomny Wollastona.

Dwójłomność optyczną Δn , wyznaczono z pomiarów odchylenia- d prążków interferencyjnych, w nierozdwojonym obrazie włókna (Rysunek 32), ze wzoru:

$$\Delta n = d\lambda/ht \quad (8)$$

gdzie: λ jest długością fali światła, w tym przypadku białego ($\lambda=0.55\mu\text{m}$), h- odległością międzyprążkową, t- grubością włókna.



Rysunek 32. Obraz włókna w interferencyjnym polu prążkowym przy prostopadłym ustawieniu osi włókna do kierunków prążków interferencyjnych. P,A - kierunki polaryzatora i analizatora, d - odchylenie prążka, h - odległość międzyprążkowa, t - grubość włókna

Włókna zbierane na szkiełka mikroskopowe ustawiono pod kątem 45° do płaszczyzny polaryzacji polaryzatora i jednocześnie równoległe do krawędzi łamiącej pryzmatu (Rysunek 32).

Rejestrowano obraz włókna w polu prążkowym przy powiększeniu 1200x. Aby zwiększyć rozdzielczość mikroskopu, poprzez zmniejszenie kąta załamania na granicy

szkło/powietrze, włókna były umieszczone w immersji (olejek cedrowy o współczynniku załamania $n = 1,515$). Zapisywano zdjęcia, co $1\mu\text{m}$ wzdłuż włókna na odcinku $30\mu\text{m}$. Podczas analizy wyników korzystano z programu QCapture Pro 6. Wychylenie prążka we włóknie mierzono na prążku zerowym. Określano współrzędną x prążka zerowego oraz współrzędną x_1 prążka we włóknie, będącą maksymalnym wychyleniem prążka. Różnica tych dwóch wartości stanowi wyznaczane odchylenie d .

Przyjmuje się, że dla materiałów jednofazowych, dwójłomność optyczna określona jako $\Delta n = (n_e - n_o)$, gdzie n_o i n_e są współczynnikami załamania w kierunku prostopadłym i równoległym do osi anizotropii, jest bezpośrednią miarą orientacji molekularnej:

$$\Delta n = f \cdot \Delta n^0 \quad (9)$$

gdzie: Δn^0 jest dwójłomnością właściwą (różnica pomiędzy współczynnikami załamania w kierunku prostopadłym i równoległym do osi w komórce elementarnej), f - czynnik orientacji molekularnej Hermans'a określony jako:

$$f = \frac{1}{2} (3 \langle \cos^2 \psi \rangle - 1) \quad (10)$$

gdzie: ψ jest kątem pomiędzy osią włókna a osią łańcucha polimeru, uśrednioną po wszystkich cząsteczkach.

W przypadku polimerów dwufazowych- krystaliczno-amorficznych, dwójłomność optyczna zależy od orientacji w fazie krystalicznej oraz amorficznej- f_c , f_a , ale również od udziału obu tych faz- x_c , $(1-x_c)$:

$$\Delta n = x_c \cdot f_c \cdot \Delta n_c^0 + (1-x_c) \cdot f_a \cdot \Delta n_a^0 \quad (11)$$

gdzie: Δn_c^0 , Δn_a^0 są odpowiednio dwójłomnościami właściwymi idealnie zorientowanej fazy krystalicznej i amorficznej.

Z danych dwójłomności optycznej wyznaczono orientację molekularną faz amorficznej i krystalicznej przyjmując, że są one takie same $f_c = f_a = f$. Udział fazowy (stopień krystaliczności), określono z danych kalorymetrycznych DSC dwójłomność właściwa PCL nie jest znana w literaturze, więc nastąpiła konieczność jej wyznaczenia (Dodatek 1). Metoda ta pozwala zatem określić uśrednioną orientację molekularną w pojedynczym włóknie.

4.3.5. Właściwości mechaniczne

Badania właściwości mechanicznych miały na celu wyznaczenie modułu Younga jako jednego z parametrów, który może być istotny podczas hodowli komórek in-vitro [3, 11, 24].

Moduł Younga wyznaczono w próbie statycznego rozciągania wykonanej za pomocą maszyny wytrzymałościowej (Instron 4205).

Z prawa Hooke'a wyznaczono moduł sprężystości wzdłużnej (moduł Younga E), jako stosunek naprężenia σ do odpowiadającego mu wydłużenia względnego ε , w zakresie prostoliniowego przebiegu krzywej rozciągania.

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad (12)$$

W zastosowaniu praktycznym wzór przybiera postać:

$$E = \frac{\Delta F l_0}{A_0 \Delta l} \quad (13)$$

gdzie: ΔF jest przyrostem obciążenia, l_0 - długość początkowa rozciąganej próbki, Δl - odkształcenie bezwzględne, A_0 - początkowy przekrój poprzeczny włókniny (z uwzględnieniem porowatości).

Pomiary prowadzono wg PN-81/C-89034 [151] w temperaturze pokojowej. Próbki w kształcie prostopadłościanów o wymiarach 40 x 10 x 0,1 mm (długość x szerokość x grubość) rozciągano z prędkością 10 mm/min przy długości pomiarowej 15 mm. Wartości podane w pracy są średnią arytmetyczną z 3 pomiarów.

4.3.6. Badania biologiczne

Badanie cytotoksyczności wytworzonych włókien przeprowadzono zgodnie z normą na temat badań in-vitro [5].

Badania biologiczne zostały przeprowadzone na fibroblastach mysich 3T3 oraz ludzkich mezenchymalnych komórkach macierzystych MSC.

W celu wizualizacji morfologii oraz adhezji komórek na powierzchniach wytworzonych materiałów korzystano z mikroskopii fluorescencyjnej FM (barwienie immunohistochemiczne) oraz SEM. Określono także stopień proliferacji komórek przy pomocy testu DNA (Tabela 5).

Tabela 5. Włókniny wybrane do badań biologicznych z uwzględnieniem czasu po którym zostało przeprowadzone badanie (w dniach-d)

	Nazwa próbki	Kolektor		Linia komórkowa		FM [d]	SEM [d]	DNA [d]
		P	B	3T3	MSC			
1	PCLH	x		x		2,3,4,7*	7,12	7,12*
2	PCLH	x			x	2,3		
3	PCLCM	x				2,7		7
4	PCLCM	x			x	2		
5	PG1:4	x	x	x	x	3,7	7,12	7,12
6	PG1:1	x	x	x	x	3,7	7,12	7,12
7	PC4:1	x	x	x	x	3,7	7,12	7,12

*wybrane

4.3.6.1. Linie komórkowe: 3T3 oraz MSC

Mysie fibroblasty 3T3

Komórki 3T3 są najczęściej używanymi komórkami do określania cytotoksyczności materiałów wykorzystywanych w inżynierii tkankowej.

Hodowlę komórek 3T3 prowadzono z użyciem DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium, Aldrich), wzbogaconym 10% surowicą płodową wołową i antybiotykami. 3T3 namnażano w butelkach o powierzchni hodowlanej 25 cm², w temperaturze 37(±1)°C i w atmosferze zawierającej 5% dwutlenku węgla. Gdy komórki pokryły 70-80% powierzchni butelki, fibroblasty pasażowano. Do badań mikroskopowych, włókniny PCL, PCL/Ge mocowano do szalek Petriego (TCP- *ang. Tissue Culture Plastic*) i po 24h sterylizowano 45 min UV. Na tak przygotowane próbki wysiewano ok. 4000 komórek w 200µl DMEM. Komórki wysiano również bezpośrednio na TCP jako próbkę odniesienia.

Ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste MSC

MSC były izolowane z fragmentów tkanki kostnej, które zostały amputowane w czasie planowych zabiegów operacyjnych i były przeznaczone do utylizacji. Na wstępie, pozyskane fragmenty tkanki kostnej były oczyszczane z pozostałości tkanek miękkich oraz naczyń krwionośnych, a następnie były one cięte na niewielkie, 1-3 mm fragmenty. Pozostałości tkanki miękkiej usunięto poddając trawieniu enzymatycznemu przez noc w 4°C, mieszając fragmenty tkanki kostnej używając wirówki. Kawałeczki kości wielokrotnie płukano roztworem PBS, a następnie przepuszczono przez filtr 200µm. Przefiltrowane komórki zostały odizolowane od medium w wirówce przez 15 min w 4°C. Komórki policzono używając cytometru (Casy 1 DT, innovates AG, Reutlingen, Germany). W kolejnym etapie 250 000 komórek w medium hodowlanym wysiano w butelce hodowlanej typu T75 (pożywka hodowlana α-MEM (Sigma) uzupełnioną w określone składniki). Hodowla komórek

przewodzona była w inkubatorze (Nuair) w stałej temperaturze 37°C, wilgotności 95% oraz przy stężeniu 5%.CO₂. W momencie uzyskania pojedynczej warstwy komórek pokrywającej całkowicie dno naczynia hodowlanego komórki były używane do celów eksperymentalnych. Ze względu na konieczność użycia bardzo dużej liczby komórek osteogennych, używano komórki pochodzące zarówno z hodowli pierwotnych jak i komórki z pierwszego pasażu. W każdym pojedynczym doświadczeniu używane były komórki wyizolowane z tkanki jednego pacjenta.

Na odpowiednio przygotowane włókniny wysiewano 4000 komórek MSC w 200 µl medium hodowlanego. Komórki wysiano również na TCP jako próbce odniesienia.

4.3.6.2. Cytotoksyczność i adhezja komórek

Mikroskop fluorescencyjny FM jest mikroskopem świetlnym opartym na zjawisku fluorescencji i fosforescencji, powszechnie wykorzystywanym do wizualizacji komórek. Podczas obrazowania FM wykorzystano immunohistochemiczne barwienie komórek. Zdjęcia zarejestrowano przy pomocy kamery (Axio Imager M1, Carl Zeiss AG Co) z oprogramowaniem AxioVision.

Procedura barwienia

Próbki zaklasyfikowane do obserwacji przemyto 2 razy PBS. Następnie dodano roztwór utwardzający na bazie PBS. Po 30 minutach próbki dwukrotnie przemywano czystym PBS. Barwienie jąder komórkowych oraz szkieletu aktynowego nastąpiło w wyniku barwienia roztworem: Actin 488 i Dapi w PBS przez 60 minut. Przed obserwacją próbek na mikroskopie ponownie przemyto je PBS.

Dodatkowo badano **adhezję komórek** oraz rozplaszczanie określono wykorzystując barwienie immunohistochemiczne białka **b-aktyny obecnego w winkulinach**.

Ze względu na trójwymiarowość podłoży w celu **z zilustrowania adhezji komórki** do włókniny użyto SEM. Podłoża przemywano 2 razy PBS, następnie utwardzano roztworem paraformaldehydu w PBS. Ponownie przemyto 2 razy PBS i moczono w 70%, 80%, 94%, 100% roztworze etanolu odpowiednio przez 30, 60, 60, 60 minut. Na koniec do każdej próbki dodano 100µl hexametyldisiloxanu i pozostawiono do wysuszenia pod wyciągiem na 24 godziny. Przed przymocowaniem do stolika mikroskopowego, próbki napyłano 3min złotem.

4.3.6.3. Stopień proliferacji komórek

Stopień proliferacji komórek 3T3 oraz MSC określano korzystając z testu DNA. Ekstraktowano DNA z jąder komórkowych dodając 150 μ l wody do każdego dołka hodowlanego. Do mieszaniny wody i DNA dodano roztwór Hoechst (bis-benzimidazol). Wynikiem badania był pomiar ekstynkcji fali o długości 460nm na spektrofotometrze (FLx800 Bio-Tek), wykonany dla każdej z badanych próbek odniesiony do próbki kontrolnej (Control TCP). Wynik jest średnią pomiarów z 3 próbek.

4.4. Wyniki i dyskusja

Analizowano jedno- i dwuskładnikowe włókna formowane metodą elektroprzędzenia.

4.4.1. Analiza włókien i włóknin jednoskładnikowych

4.4.1.1. Morfologia włókien przędzonych z różnych rozpuszczalników

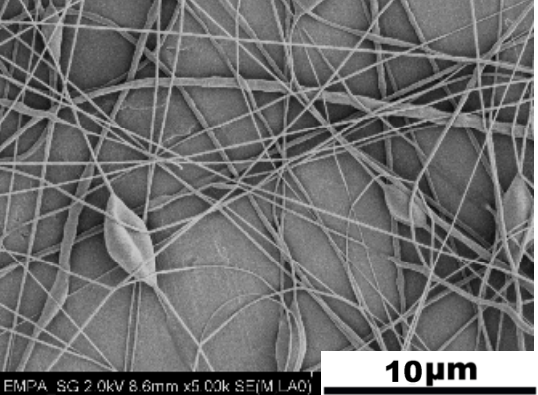
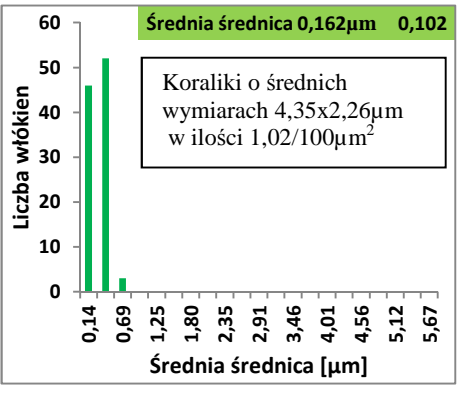
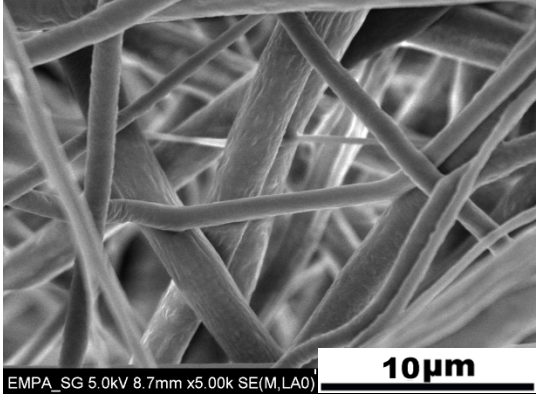
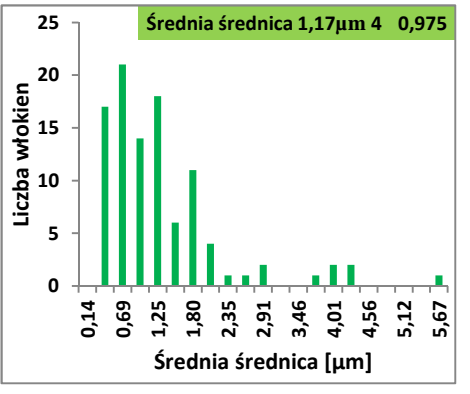
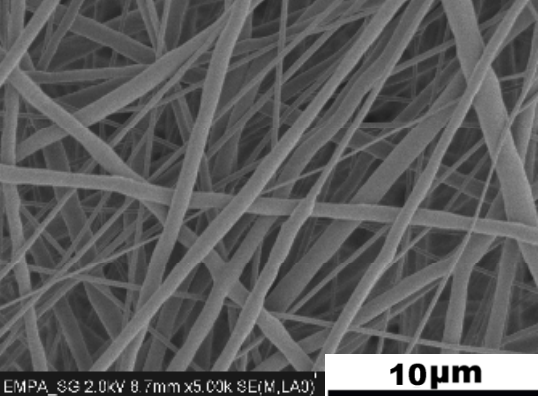
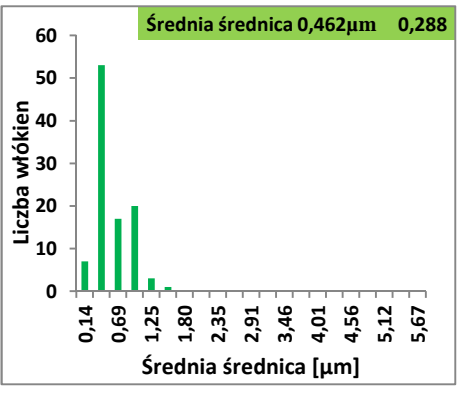
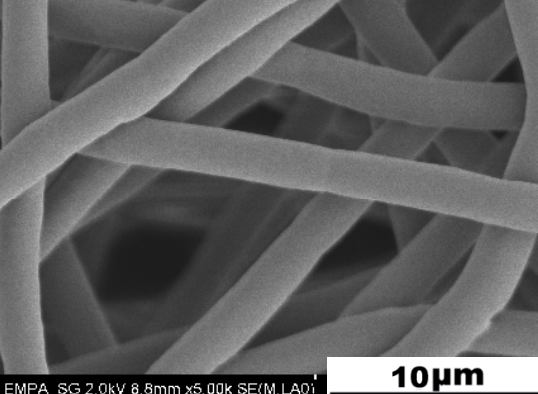
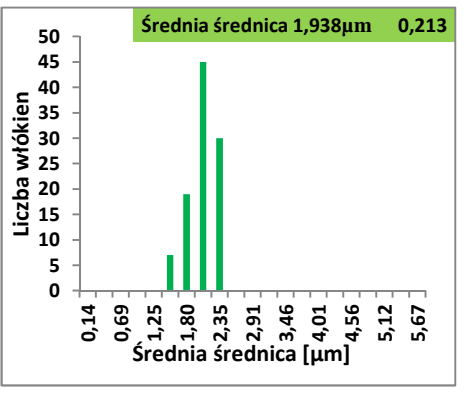
Podjęto próbę określenia wpływu rodzaju rozpuszczalnika na morfologię włókien jednoskładnikowych PCL. Zdjęcia SEM przedstawiają włókna PCL przędzone przy stałych: stężeniu (12%), przyłożonym napięciu (13kV), szybkości podawania (7 μ l/min), ale z różnych rozpuszczalników (Tabela 7) zgodnie z recepturą (Tabela 3 na stronie 52).

Wykorzystane rozpuszczalniki: chloroform/metanol 75:25 (CM), chloroform/DMF 50:50 (CD2), TFE, HFIP różnią się m.in. przewodnością elektryczną oraz stałą dielektryczną, które są istotne z punktu widzenia procesu elektroprzędzenia (Tabela 6).

Tabela 6. Właściwości wybranych rozpuszczalników-dane literaturowe [¹²⁸]

Rozpuszczalnik	Temperatura wrzenia [°C] w 25°C	Napięcie powierzchniowe [mN/m]	Stała dielektryczna	Moment dipolowy Debaya
Chloroform	61,7	26,5	4,8	1,15
HFIP	59,15	16,1	16,7	1,58
TFE	78,2	21,1	27	2,44
Metanol	64,5	22,3	33	1,6
DMF	153	37,1	38,3	3,8

Tabela 7. Morfologia włókien PCL elektroprzędzonych z różnych rozpuszczalników

Rodzaj rozpuszczalnika	Morfologia włókien	Rozrzut średnicy włókien
CD2		
CM		
TFE		
HFIP		

Najcieńsze włókna PCL otrzymano z rozpuszczalnika CD2 (Tabela 3). Ich średnia średnica to 160nm, zmierzona jako średnia wartość włókien o średnicach od 95nm do 690nm. W morfologii tych włókien można zauważyć koraliki, które uznaje się za defekt. Na powierzchnię $1\mu\text{m}^2$ przypada 1,02 koralika o kształcie zniekształconej elipsy.

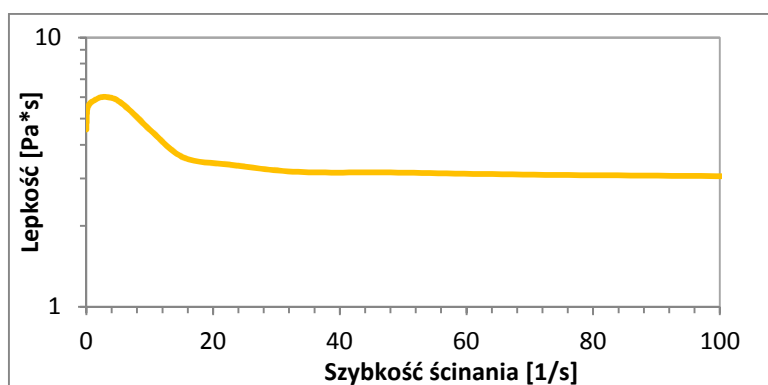
Włókna PCLCM, przędzone z mieszaniny chloroform/metanol, charakteryzują się większą średnią średnicą, dużym rozrzutem średnicy oraz brakiem koralików w porównaniu z włóknami PCLCD2. Rozpuszczalnik CM jest poza tym mniej toksyczny niż CD2 (z dodatkiem DMF), a rozwinięcie powierzchni tych włókien wydawała się być funkcjonalnym czynnikiem z perspektywy aplikacji w inżynierii tkankowej.

Włókna przędzone z TFE są cieńsze i bardziej nierównomierne na długości niż włókna przędzone z HFIP. Wynika to z większego momentu dipolowego oraz większej stałej dielektrycznej TFE. Przyłożone pole elektryczne jest bardziej efektywne, gdy większy jest moment dipolowy rozpuszczalnika.

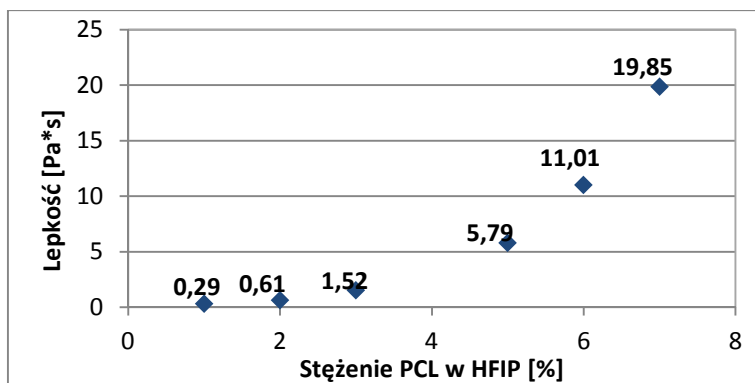
Perspektywa dodatku biopolimeru (tworzenie włókien dwuskładnikowych) wyselekcjonowała HFIP jako rozpuszczalnik, w którym rozpuszczalny jest PCL jak również biopolimery. W porównaniu z włóknami PCL przędzonymi z TFE, włókna PCL z HFIP charakteryzują się większą równomiernością średnicy na długości włókna. Wyróżniają je także bardzo mały rozrzut średnicy w porównaniu z włóknami formowanymi z innych rozpuszczalników.

4.4.1.2.1. Morfologia włókien zależnie od stężenia polimeru oraz przyłożonego napięcia

Przed przystąpieniem do procesu elektroprzędzenia z wybranych rozpuszczalników, zbadano lepkość i przewodność elektryczną roztworów PCL na przykładzie roztworów PCL w HFIP o stężeniach 3, 5, 7% (włókniny PCLH) (Rysunki 33- 35).



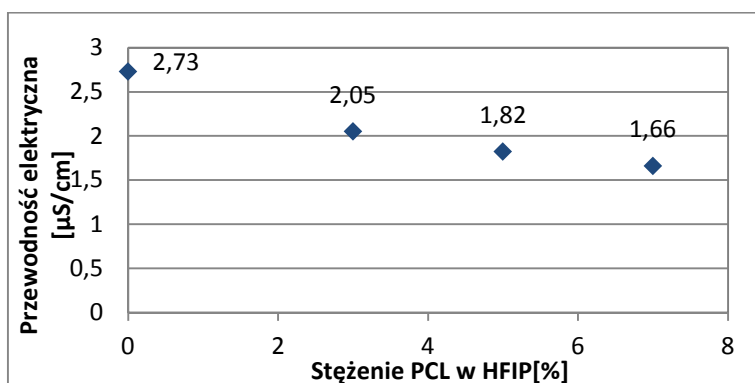
Rysunek 33. Przykład zależności lepkości w funkcji szybkości ścinania (roztwór 5%PCL w HFIP)



Rysunek 34. Lepkość roztworów w funkcji stężenia PCL w HFIP (przy szybkości ścinania $5,4 \text{ s}^{-1}$)

Zależność lepkości od szybkości ścinania wskazuje na nienewtonowski charakter (Rysunek 33). Spadek lepkości roztworu 5% PCL w HFIP ze wzrostem szybkości ścinania związany jest z orientowaniem się makrocząsteczek podczas ścinania. Oceniono, że podczas przedzenia, szybkość ścinania wewnątrz dyszy wynosiła ok. $5,4 \text{ s}^{-1}$.

Rysunek 34 przedstawia zależność lepkości od stężenia roztworu. Wzrost lepkości wraz ze stężeniem polimeru związany jest z większym splątaniem makrocząsteczek i dzięki temu silniejszymi oddziaływaniami makrocząsteczek między sobą.



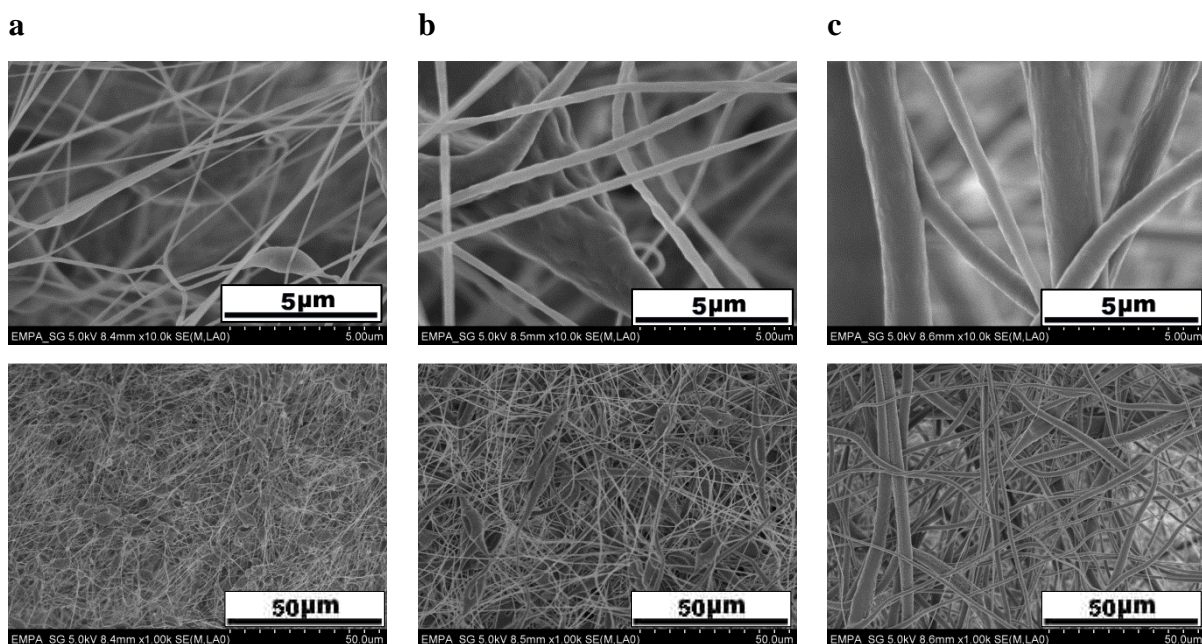
Rysunek 35. Zależność przewodności elektrycznej roztworów w funkcji stężenia PCL w HFIP

Wraz ze wzrostem stężenia PCL w HFIP maleje przewodność elektryczna ze względu na niepolarność polimeru (Rysunek 35). Większy udział niepolarnych, nieprzewodzących cząstek wywołuje obniżenie sumarycznej przewodności elektrycznej roztworu.

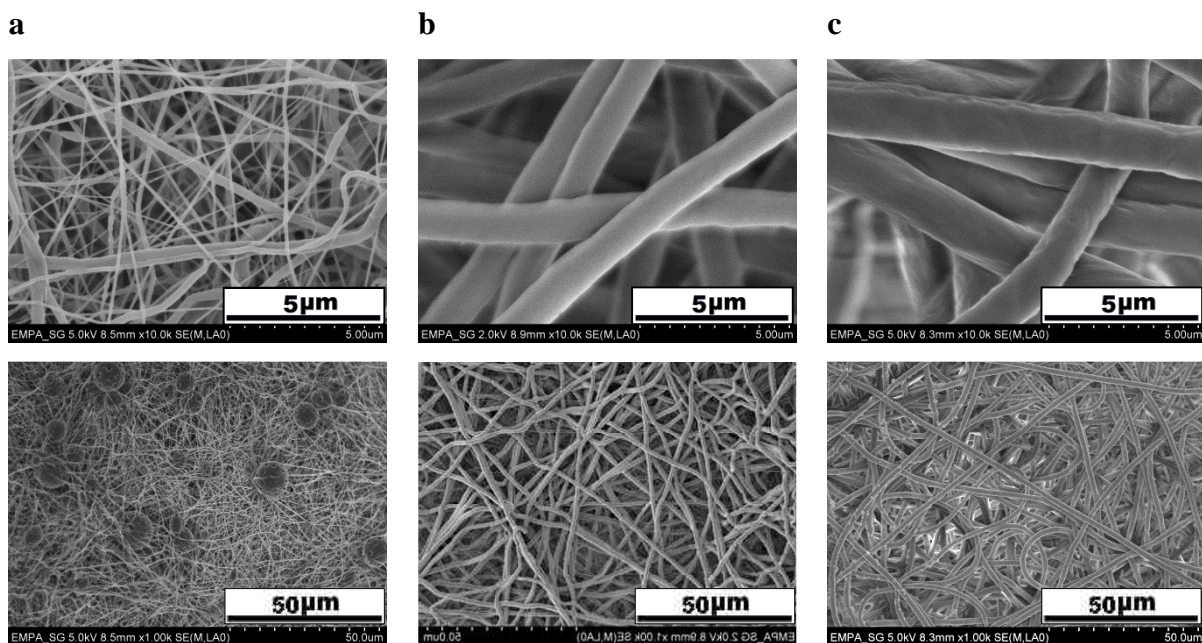
Na płytę przedziano jednoskładnikowe włókniny PCL z HFIP (włókna PCLH) oraz włókniny PCL z CM (włókna PCLCM) zmieniając stężenie roztworu. Rysunki 36 i 37 przedstawiają zdjęcia SEM włókien PCLH, PCLCM wyprzedzonych z przyłożeniem określonego napięcia, z roztworów o różnym stężeniu

Włókna PCLH wykazują mniejsze rozwinięcie powierzchni widoczne jako mniejsze rozwinięcie powierzchni w porównaniu z włóknami PCLCM. Zauważyć można również

większą jednorodność średnicy włókien PCLH na długości, mniej defektów- zgrubień i koralików. Przy niskich stężeniach obserwuje się koraliki osadzone na cienkich włóknach. W przypadku PCLCM są to koraliki o przekroju elipsy, natomiast dla PCLH o przekroju koła.

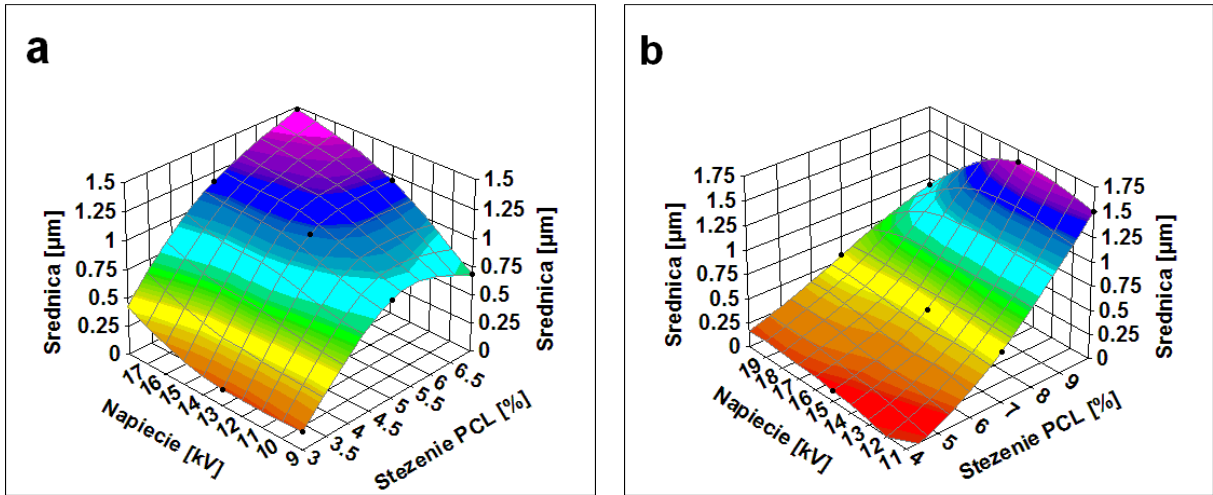


Rysunek 36. Morfologia włókien PCLCM a) 4%, b) 7%, c) 10% przy napięciu 15kV.



Rysunek 37. Morfologia włókien PCLH a) 3%, b) 5%, c) 7%. przy napięciu 13kV

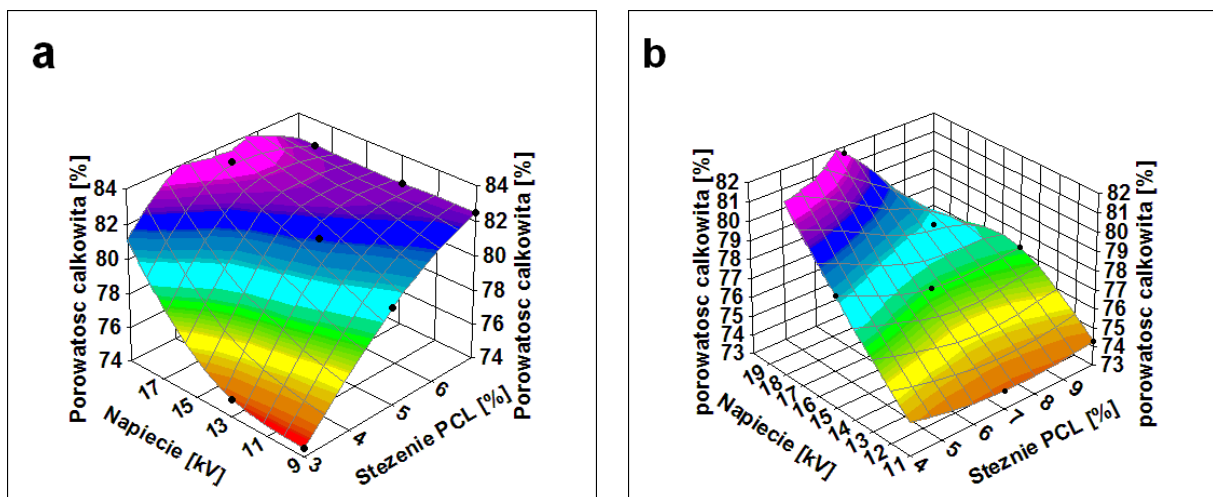
Rysunek 38 obrazuje zależność średniej grubości od stężenia roztworu oraz przykadanego napięcia włókien PCLH oraz PCLCM.



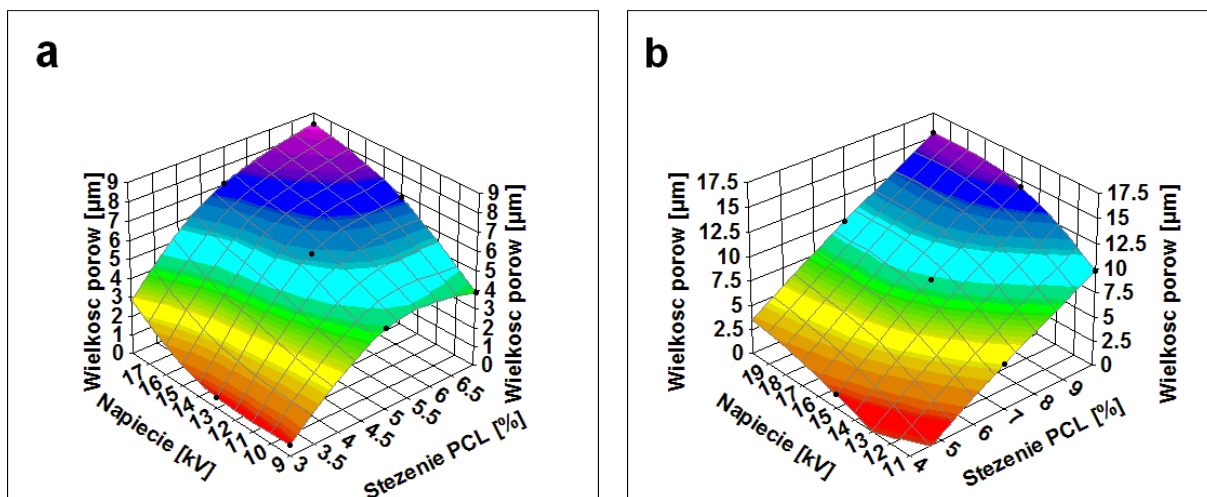
Rysunek 38. Średnia średnica w funkcji przyłożonego napięcia oraz stężenia PCL a) PCLH, b) PCLCM

Średnia średnica włókien silnie zależy od stężenia PCL, słabiej od przykładanego napięcia (Rysunek 37 a, b). Średnica włókien wzrasta wraz ze stężeniem roztworu, co związane jest ze wzrostem lepkości roztworów. Trudno doszukiwać się zależności wpływu przykładanego napięcia na średnicę włókien PCLH oraz PCLCM, przedzielonych z roztworów o różnych stężeniach.

Na Rysunkach 39 i 40 pokazano średnią porowatość całkowitą włókien oraz średnią średnicę włókien porów dla włókien PCLH oraz PCLCM.



Rysunek 39. Średnia porowatość całkowita włókien w funkcji przyłożonego napięcia oraz stężenia PCL a) PCLH, b) PCLCM



Rysunek 40. Średnica porów włókien w funkcji przyłożonego napięcia oraz stężenia PCL a) PCLH, b) PCLCM

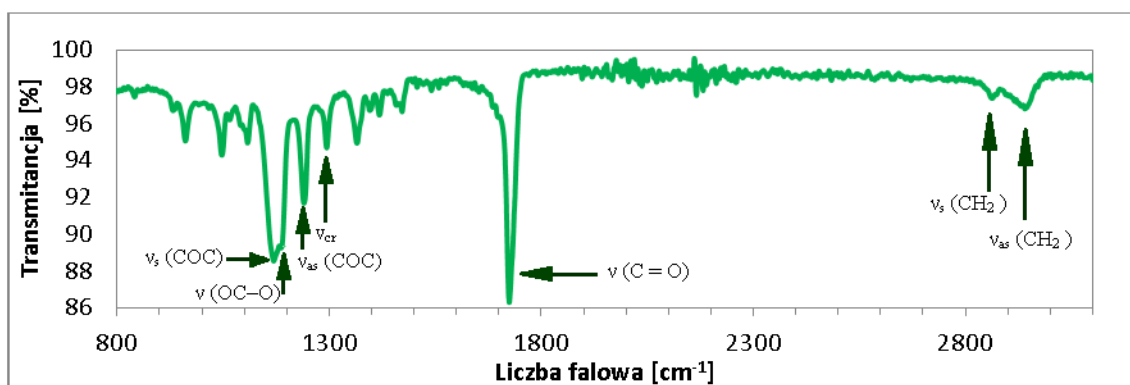
Porowatość całkowita oraz wielkość porów włókien PCLH, PCLCM wzrasta ze stężeniem polimeru oraz przyłożonym napięciem. Koreluje to z grubością włókien- im grubsze włókna tym większa porowatość całkowita i większy średni rozmiar porów. Maksymalna porowatość włókien PCLCM oraz PCLH jest dość zbliżona i wynosi odpowiednio 82, 84%. Wielkość porów włókien PCLCM jest większa niż PCLH, na co wpływ ma większa średnia średnica włókien oraz większy rozrzut grubości w przypadku włókien PCLCM.

Zgodnie z przyjętym modelem, maksymalna wielkość porów jest równa trzykrotnej średniej wielkości porów [145].

Wyznaczenie porowatości całkowitej dla włókien z koralikami (małe stężenie polimeru w roztworze) odnosi się do całkowitej masy włókniny (łącznie z koralikami), dlatego też wyznaczona wartość może być nieco zafałszowana i w rzeczywistości nieco wyższa.

4.4.1.2.2. Struktura molekularna

Analiza FTIR potwierdza występowanie charakterystycznych grup funkcyjnych obecnych w PCL oraz dwufazowość PCL- obecność fazy amorficznej v_{am} i krystalicznej v_{cr} w analizowanych włóknach. Zgodnie z danymi literaturowymi [152] widoczne piki (Rysunek 41) zostały przypisane oscylacjom konkretnych grup chemicznych (Tabela 8).

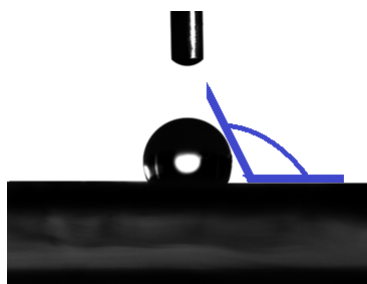


Rysunek 41 Profil FTIR dla PCL

Tabela 8. FTIR dla PCL

Położenie (cm^{-1})	Drżenie	Oznaczenie
2949	Rozciąganie asymetrycznych CH_2	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$
2865	Rozciąganie symetrycznych CH_2	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$
1727	Rozciąganie grup karbonylowych	$\nu(\text{C}=\text{O})$
1293	Rozciąganie C–O i C–C w fazie krystalicznej	ν_{cr}
1240	Rozciąganie asymetrycznych COC	$\nu_{\text{as}}(\text{COC})$
1190	Rozciąganie OC–O	$\nu(\text{OC}-\text{O})$
1170	Rozciąganie symetrycznych COC	$\nu_{\text{s}}(\text{COC})$
1157	Rozciąganie C–O i C–C w fazie amorficznej	ν_{am}

PCL jest polimerem silnie hydrofobowym, zmierzony kąt zwilżania to $128 \pm 4^\circ$ dla włókien przedzionych na płytę oraz $119 \pm 4^\circ$ dla włókien przedzionych na bęben z 5%PCLH. PCL jest polimerem niepolarnym co bezpośrednio wpływa na brak powinowactwa do wody.



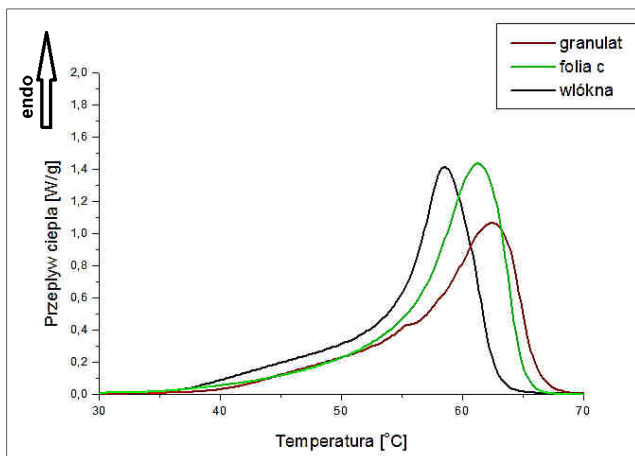
Rysunek 42. Pomiar zwilżania włókniny PCL (5%PCLH P)

4.4.1.2.3. Struktura nadmolekularna

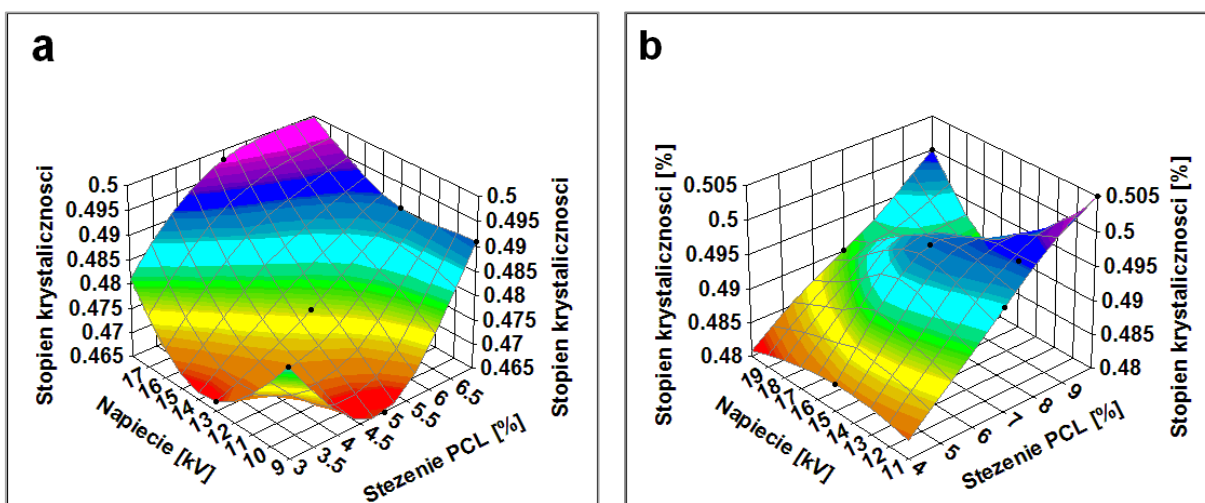
Analizę struktury nadmolekularnej włókien prowadzono przede wszystkim z użyciem DSC w zakresie temperatur $20-90^\circ\text{C}$. Rysunek 43 ilustruje zależność przepływu ciepła w funkcji temperatury dla włókniny (5%PCLHP przedzionej przy napięciu 13kV), w porównaniu do folii odlanej z tego samego roztworu i granulatu PCL. W zakresie $30-65^\circ\text{C}$, obserwuje się endotermiczny pik związany z topnieniem kryształów w: granulacie, folii, włóknach- z

maksimum odpowiednio w 62, 61, 58°C. Ze względu na dynamikę procesu elektroprzędzenia, czas krystalizacji PCL we włóknach jest znacznie krótszy niż w folii. Kryształy we włóknach są zatem mniejsze i bardziej zdefektowane niż w folii.

Wydłużone lewe ramię piku, zaczynające się już w temperaturze 30°C, jest skutkiem topnienia najmniejszych i najbardziej zdefektowanych kryształów (30-60°C).



Rysunek 43. Przebieg krzywej DSC ogrzewania dla granulatu, folii oraz włókien PCL (5%PCLH, 13kV)



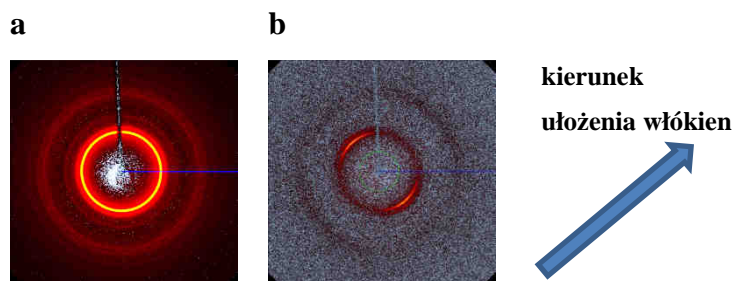
Rysunek 44. Stopień krystaliczności określony z krzywej DSC w funkcji przyłożonego napięcia oraz stężenia PCL a) PCLH, b) PCLCM

Stopień krystaliczności włókien PCLH oraz PCLCM wyznaczono z danych kalorymetrycznych. Krystaliczność włókien PCL jest mniejsza niż krystaliczność folii odlewanych z tego samego roztworu: 0.52, 0.54, 0.48 odpowiednio dla granulatu, folii oraz włókien (Rysunek 43). Stopień krystaliczności włókien PCLH oraz PCLCM (Rysunek 44) rośnie wraz ze wzrostem stężenia i nieznacznie zmienia się z przyłożonym napięciem, co koreluje z zależnością dla grubości włókien. Dla włókien 3%PCLH, przy stosunkowo niskim napięciu 11kV, krystaliczność jest nieoczekiwanie wysoka, na co wpływ mogą mieć pojawiające się koraliki. Krystalizacja podczas przedzenia z roztworów o większym stężeniu

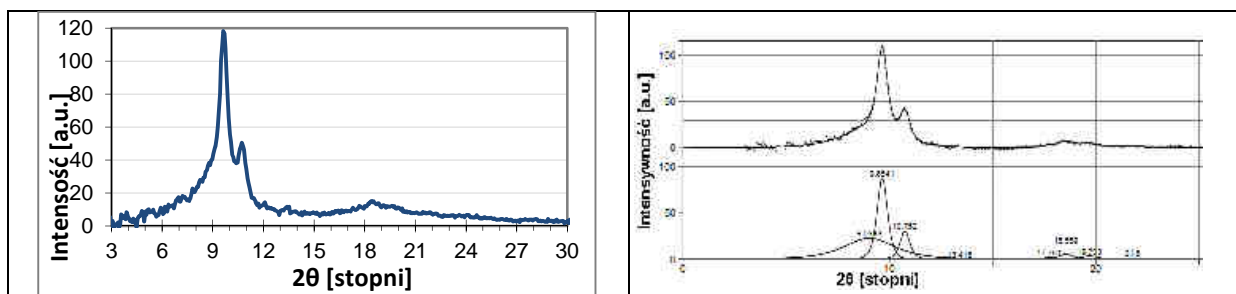
zachodzi w większej masie (koncentracja makrocząstek większa). Tworzą się grubsze włókna o wyższym stopniu krystaliczności. W roztworach o większym stężeniu makrocząsteczki polimeru mają krótszą drogę migracji, większą zdolność aglomeracji i porządkowania w kryształy, co zwiększa krystaliczność.

Porównawczo przeprowadzono badanie krystaliczności z wykorzystaniem WAXS dla włókniny 5%PCLH B przedzianej na bęben w odniesieniu do przedzianej na płytę (PCLH P) (obie przy napięciu 13kV). Na Rysunku 45 pokazano rentgenogram dla włókien PCLH przedzianych na bęben oraz na płytę.

Z zarejestrowanych rentgenogramów odczytano profile radialne (Rysunek 46). Profile te pokazują szereg pików pochodzących od kryształów PCL: (110) pod kątem $2\theta = 9.65$ stopni; (200) pod kątem $2\theta = 10.75$ stopni; (210) pod kątem $2\theta = 13.4$ stopni; (120) pod kątem $2\theta = 17.28$ stopni; (310) pod kątem $2\theta = 18.40$ stopni; (220) pod kątem $2\theta = 19.50$ stopni; (207) pod kątem $2\theta = 20.0$ oraz amorficzne halo z maksimum pod kątem $2\theta = 9.0$ stopni. W wyniku aproksymacji funkcjami Pearsona VII zbadano, że krystaliczność włókien PCLH zbieranych na płytę jest mniejsza niż tych zbieranych na obracający bęben i odpowiednio wynosi: 0.43 (PCLH P); 0,524 (PCLH B).



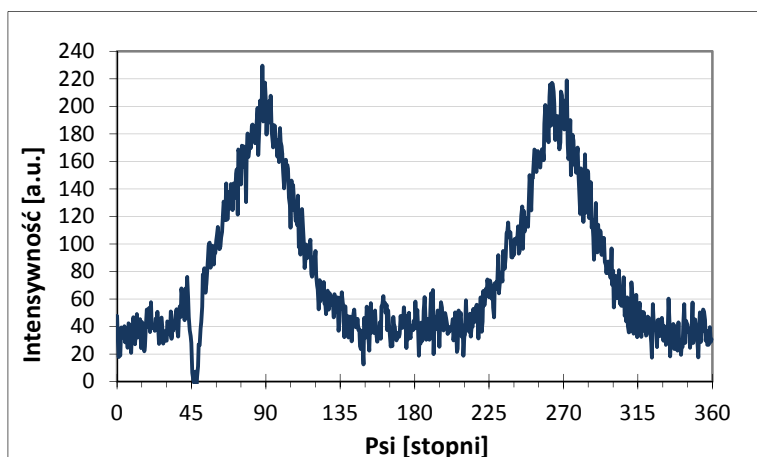
Rysunek 45. Rentgenogramy włókien 5%PCLH zbieranych a) na płytę oraz b) na bęben (zaznaczony kierunek ułożenia włókien) przy 13kV



Rysunek 46 a) Profil radialny uśredniono po kącie azymutalnym, b) przykładowa aproksymacja profilu

Na podstawie profili azymutalnych WAXS oszacowano stopień orientacji molekularnej kryształów PCL. Wyznaczona orientacja molekularna we włóknach PCLH zbieranych na bęben określona z profilu kąta azymutalnego (Rysunek 47), wynosi 0,424. Z uwagi na sposób

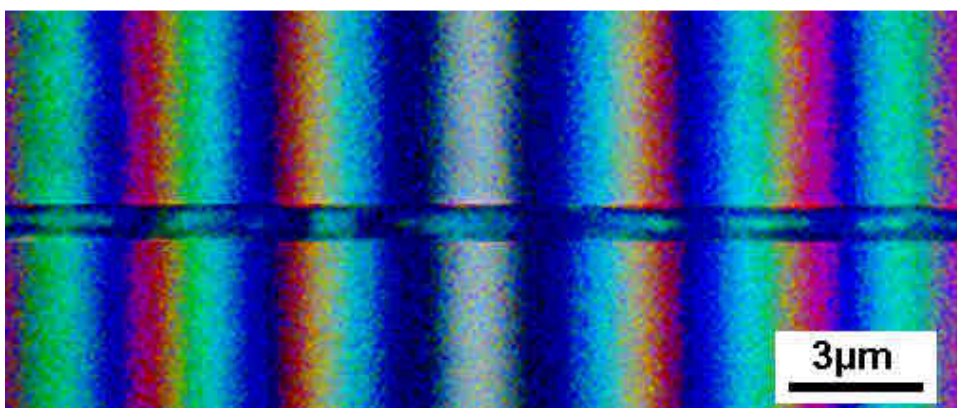
ułożenia włókien i metodykę, ocena ta nie jest możliwa dla włókien przędzonych na płytę (brak wyróżnionego kierunku ułożenia włókien).



Rysunek 47. Profil azymutalny refleksu (110) dla włókien 5%PCL przędzonych na bęben

Podjęto próbę oceny czynnika orientacji molekularnej metodą oceny dwójłomności optycznej dla pojedynczych włókien zbieranych na płytę (materiały opublikowane w pracy [150]).

Średnia dwójłomność optyczna została określona dla włókien PCLCM oraz PCLCD1 przędzonych z roztworów o różnych stężeniach oraz przy różnych napięciach (Tabela 3).



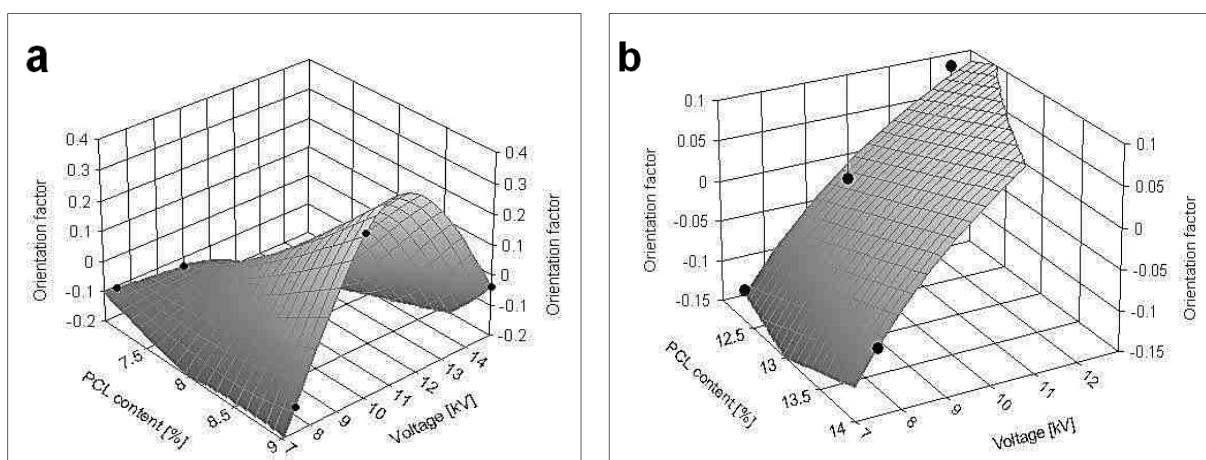
Rysunek 48. Włókno PCL w CD1 w polu prążkowym przy użyciu światła białego (7,5kV)

Przykładowy obraz pojedynczego włókna PCLCD1 w polu prążkowym (Rysunek 48) wskazuje na niejednorodność dwójłomności optycznej wzdłuż osi włókna. W miejscu gdzie brak odchylenia prążków materiał jest izotropowy. Odchylenie prążka w prawo świadczy o dodatniej dwójłomności, czyli $n_{\parallel} > n_{\perp}$; natomiast, gdy $n_{\parallel} < n_{\perp}$ dwójłomność jest ujemna. Dwójłomność dodatnia oznacza orientację cząsteczek wzdłuż osi włókna, zaś dwójłomność ujemna przeciwnie.

Tabela 9. Średnie wartości dwójłomności optycznej oraz orientacji molekularnej włókien PCLCM oraz PCLCD1

Nazwa próbki	Napięcie [kV]	Średnia dwójłomność optyczna	Odchylenie średniej dwójłomności optycznej od wartości średniej	Średni współczynnik orientacji
7%PCL CM	7,5	-0,018	0,005	-0,110
7%PCL CM	10	-0,022	0,007	-0,131
9%PCL CM	7,5	-0,019	0,011	-0,119
9%PCL CM	10	0,052	0,039	0,326
9%PCL CM	15	-0,006	0,003	-0,040
12%PCL CD1	7,5	-0,024	0,033	-0,144
12%PCL CD1	10	-0,008	0,003	-0,032
12%PCL CD1	12,5	0,021	0,046	0,085
14%PCL CD1	7,5	-0,011	0,011	-0,069

Analiza wpływu parametrów elektroprzędzenia na orientację molekularną wskazuje wzrost wartości współczynnika orientacji wraz z przyłożonym napięciem oraz stężeniem polimeru w roztworze (Rysunek 49a, b). Można zauważyć lokalne maksimum wartości orientacji molekularnej wraz ze wzrostem przyłożonego napięcia. Wpływ przykładanego napięcia na orientację molekularną jest znacznie silniejszy niż na średnicę włókien oraz porowatość włókien (Rysunki 38 i 39)

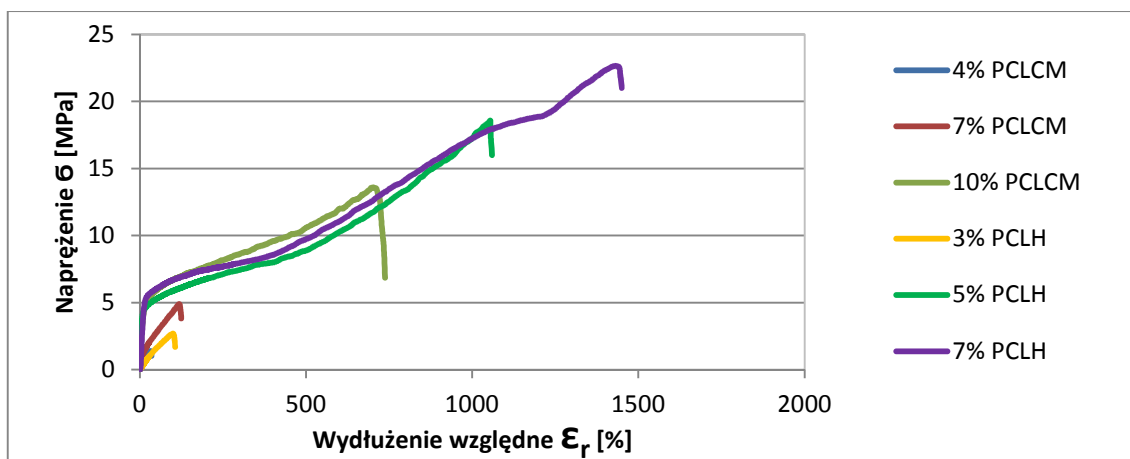


Rysunek 49. Średnia wartość orientacji molekularnej pojedynczych włókien, wyznaczona metodą dwójłomności optycznej, w funkcji przyłożonego napięcia oraz stężenia roztworów a) PCLCM b) PCLCD2

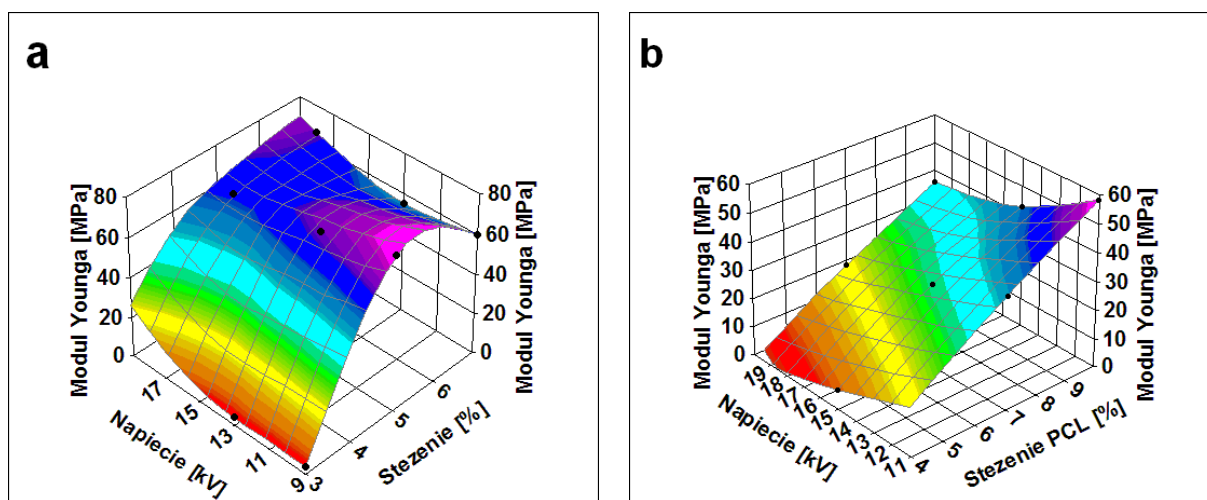
Na podstawie profili azymutalnych WAXS oraz pomiarów dwójłomności optycznej stwierdzono, że włókna zbierane na płytę nie wykazują orientacji molekularnej lub jest ona bardzo słaba. Podczas gdy, w wyniku zbierania na obracający się bęben następuje uporządkowanie makrocząsteczek na skutek rozciągania. Orientacja molekularna silnie zależy zatem od sposobu zbierania włókien.

4.4.1.2.4. Właściwości mechaniczne włókien

Włókniny PCLH i PCLCM rozciągano w maszynie wytrzymałościowej Instron. Rysunek 50 obrazuje zależność naprężenia σ (przykładanej siły przeliczonej na jednostkę powierzchni) od wydłużenia ϵ . Dla włókien PCLH oraz PCLCM można zaobserwować wzrost naprężenia zrywającego wraz ze wzrostem stężenia polimeru. Wytrzymałość na zerwanie oraz moduł Younga włókien PCLH jest wyższy niż włókien PCLCM, co jest związane najprawdopodobniej z dużym rozrzutem średnicy włókien PCLCM.



Rysunek 50. Naprężenie w funkcji wydłużenia włókien PCLH oraz PCLCM.



Rysunek 51. Moduł Younga w funkcji przyłożonego napięcia i stężenia PCL a) PCLH, b) PCLCM

Moduł Younga określa sprężystość polimeru. Obserwuje się wzrost modułu Younga wraz ze stężeniem roztworu dla włókien PCLCM (Rysunek 51 b). Włókniny PCLH wykazują wzrost modułu Younga do osiągnięcia maximum po przekroczeniu, którego obserwowano nieznaczny spadek sprężystości (Rysunek 51 a). Obniżenie sprężystości przy wyższych stężeniach może wynikać z większej niejednorodności włókien na długości. Na niskie wartości modułu przy małych stężeniach (3% PCLH oraz 4% PCLCM) wpływa obecność

koralek. Wzrost modułu Younga włókien PCLH oraz PCLCM wraz ze stężeniem roztworów koreluje w dużym stopniu ze wzrostem średnicy włókien oraz krystaliczności (Rysunki 38 i 44 na stronach 76, 71).

Podobne zależności tj. wzrost sprężystości z lokalnym maksimum wraz ze stężeniem polimeru opisano w literaturze dla włókien PCL [33] oraz PVDF [107].

4.4.1.2.5. Badania biologiczne z wykorzystaniem komórek 3T3 oraz MSC

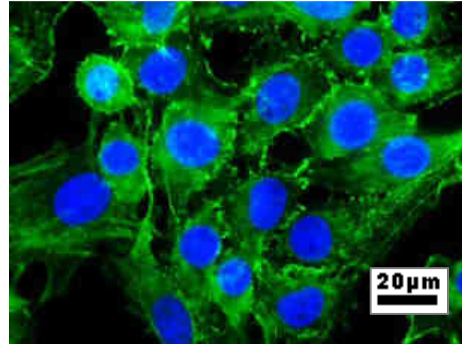
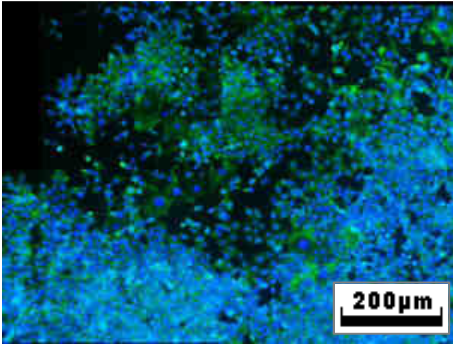
Przeprowadzono hodowle fibroblastów mysich 3T3 używanych jako wskaźniki cytotoxyczności materiałów biomedycznych zgodnie z określoną normą [5] oraz dodatkowo ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych MSC na włókninach PCLH, PCLCM przedzionych z roztworów o różnych stężeniach, ze zmianą przykładanego napięcia. Po 2 dniach hodowli korzystając z procedury barwienia immunohistochemicznego oceniono kształt, rozplaszczanie, rozmieszczenie komórek oraz sprawdzono cytotoxyczność komórek.

Rysunek 52 przedstawia morfologię komórek 3T3 po **2 dniach hodowli** zarejestrowaną za pomocą FM. Zdjęcia komórek 3T3 na TCP wykazują charakterystyczną budowę. Wysiane komórki rozplaszczają się prawidłowo na podłożu, nie są zainfekowane. Szkielet komórkowy wykazuje charakterystyczne włókna aktywne (*ang. stress fibres- SF*) oraz filopodia odpowiedzialne za migrację komórek. Komórki 3T3 wysiane na włóknach PCLH oraz PCLCM nie wykazują właściwego rozplaszczania oraz filopodiów; przybrały kształt kulisty oraz charakteryzują się niewielkim rozwinięciem szkieletu aktywnego. Ułożone są w skupiskach, nierównomiernie na włókninie. Wszystkie wytworzone podłoża są niecytotoxyczne, jednak niewielkie rozwinięcie szkieletu aktywnego świadczy o słabej aktywności oraz adhezji komórek.

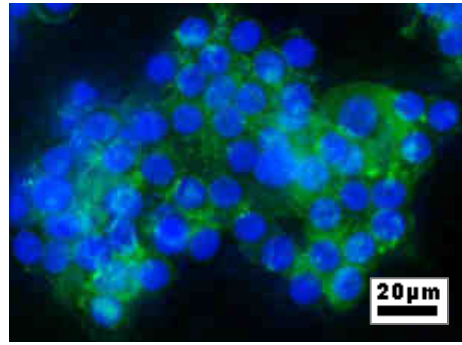
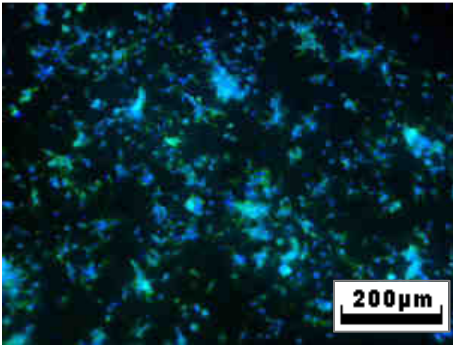
Komórki 3T3 wysiane na włókninie PCLH formowanej na bęben wykazują ułożenie szkieletu aktywnego zgodnie z kierunkiem ułożenia włókien (Rysunek 52 i). Wydłużony szkielet aktywny zgodnie z włóknami świadczy o odczytywaniu przez komórki informacji z topografii włókniny- zjawisko opisane także w literaturze CG [153].

Sprawdzono także rozplaszczanie komórek po **7 dniach hodowli** (Rysunek 53). Wybrane zdjęcia wskazują na nieco większe rozwinięcie szkieletu aktywnego. Komórki pokrywają ok. 65% powierzchni włóknin, jednak nadal pozostają rozlokowane blisko siebie, tworząc aglomeraty

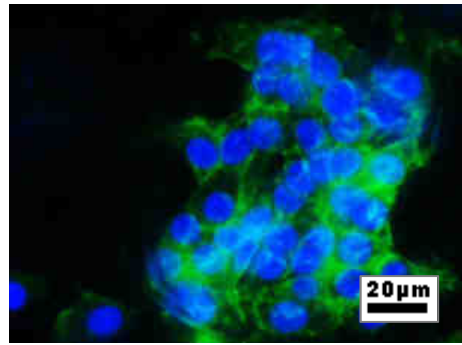
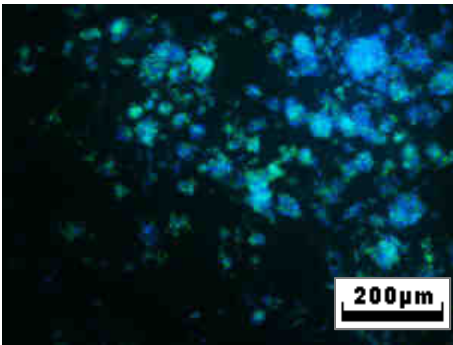
a



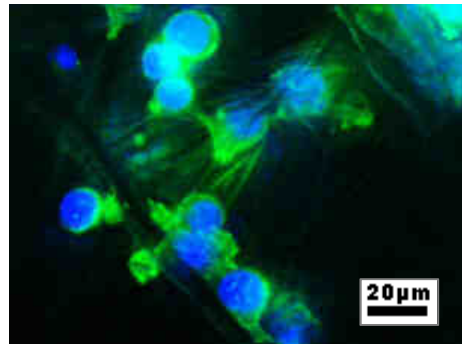
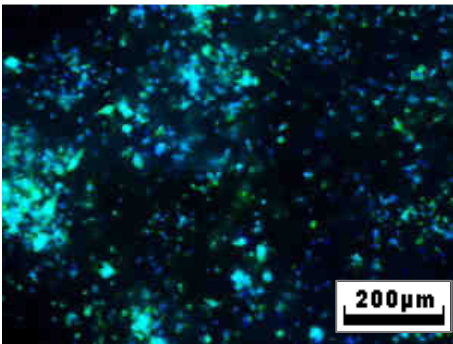
b



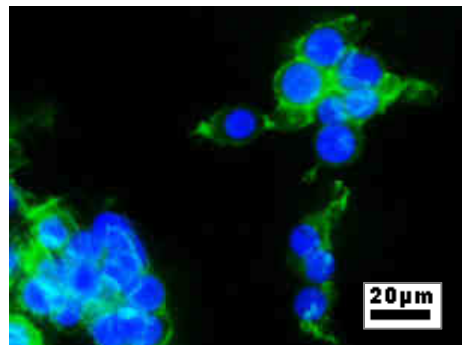
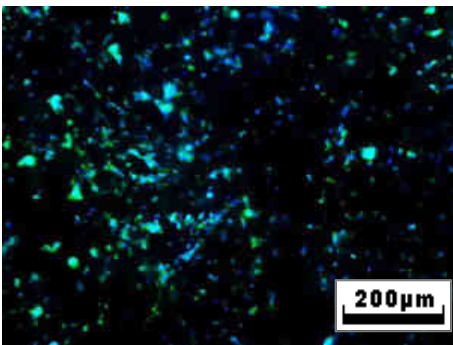
c

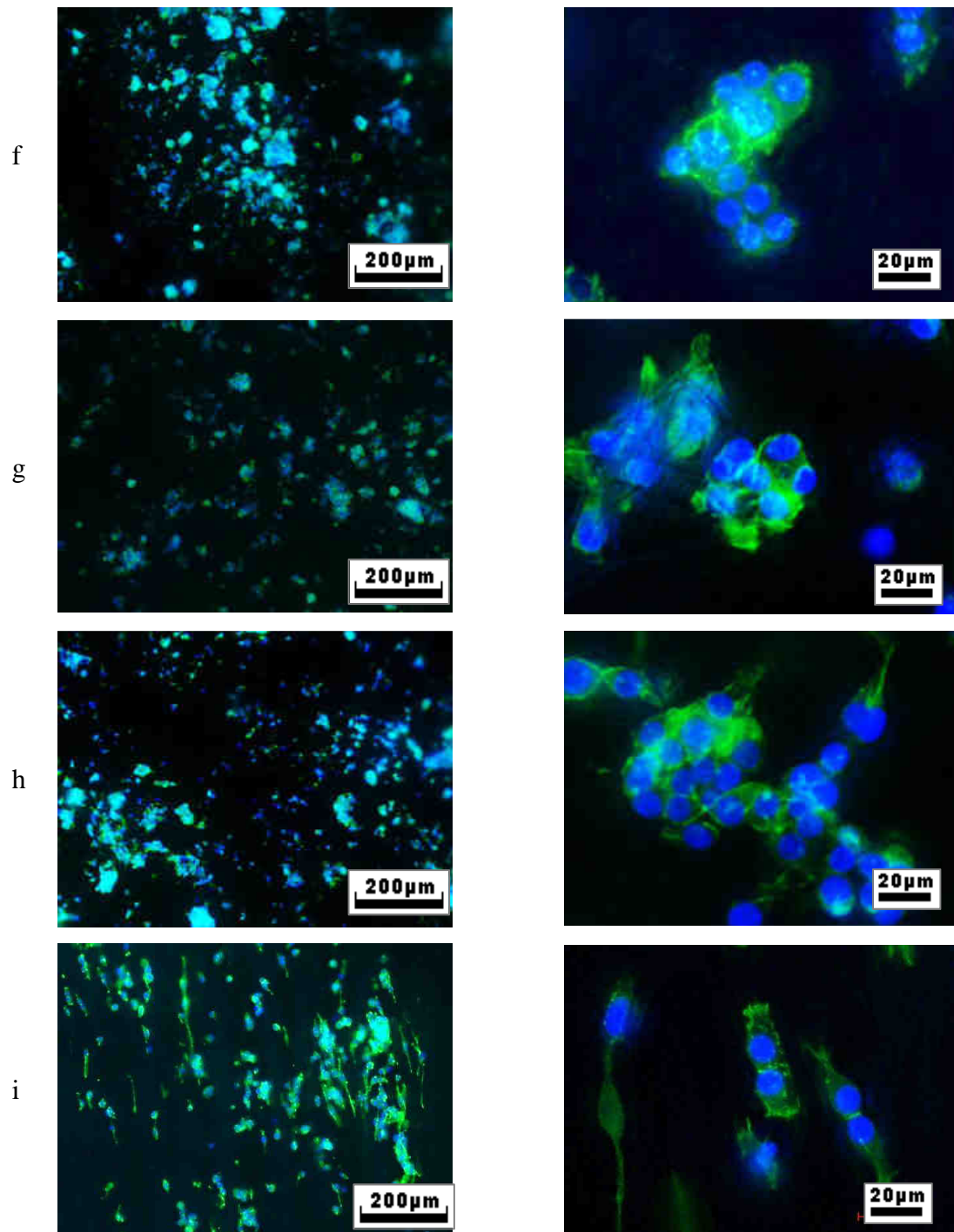


d

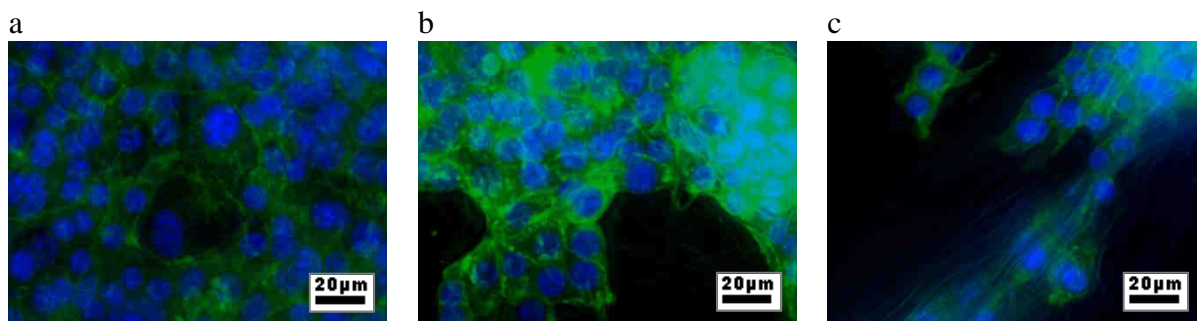


e



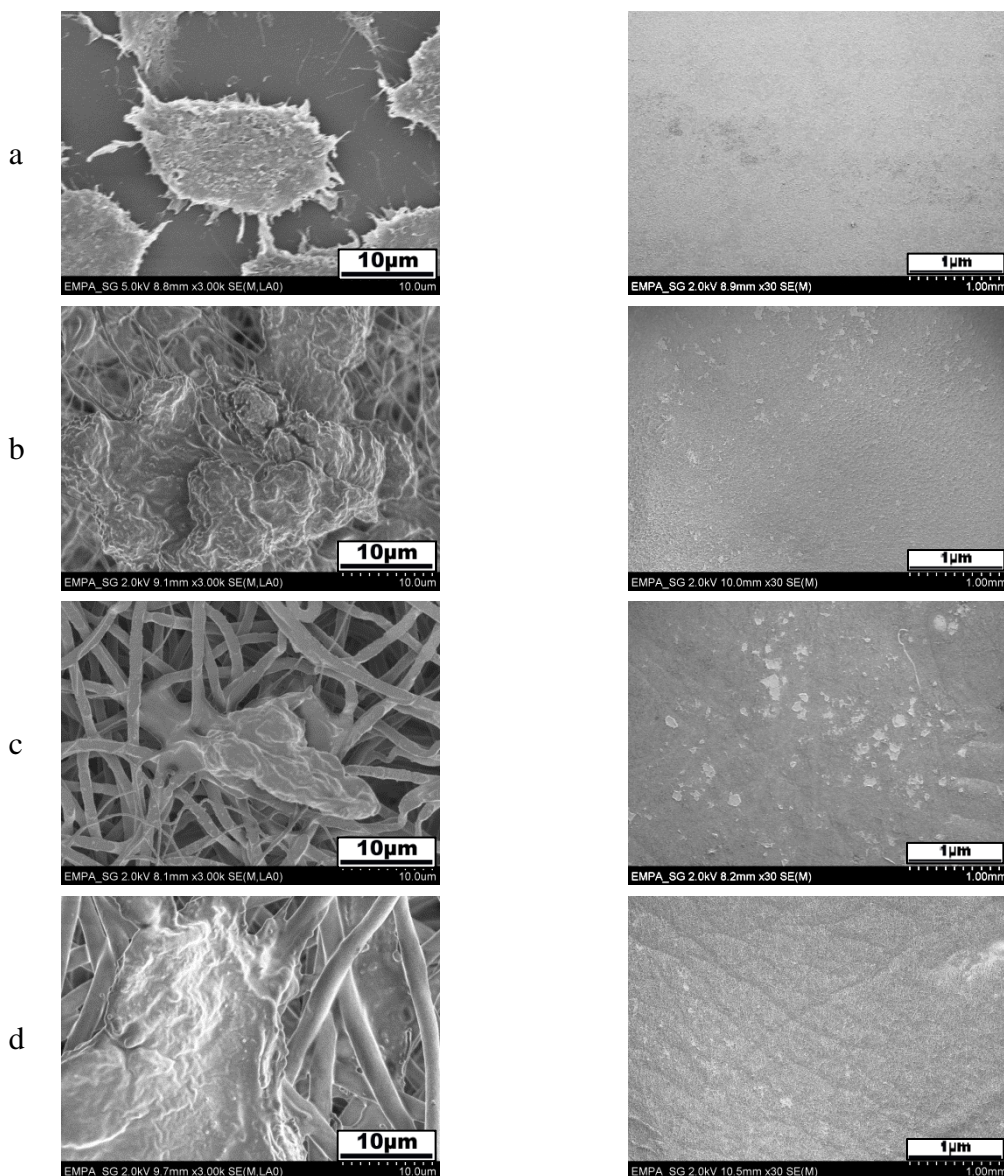


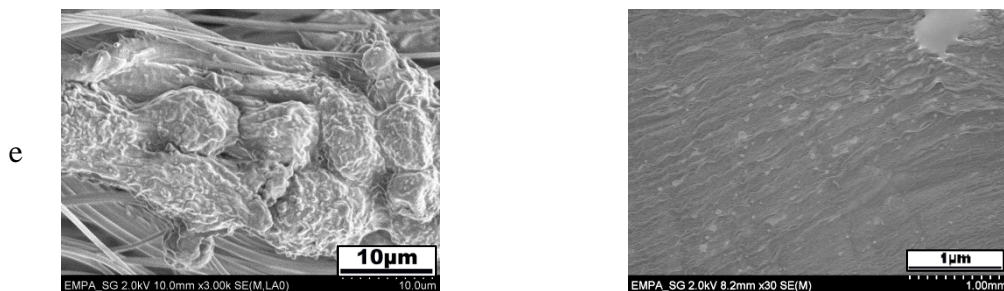
Rysunek 52. Morfologia komórek 3T3 po 2 dniach hodowli na a) TCP oraz włókninach PCLCM b) 4%, c) 7%, d) 10%, e) 13% i PCLH f) 3%, g) 5%, h) 7% oraz 5%PCLH przędzonych na bęben



Rysunek 53. Morfologia komórek 3T3 po 7 dniach hodowli na a) TCP oraz włókninach b) 5%PCLH P c) 5%PCLH B

Zdjęcia SEM pozwalają na przestrzenne zobrazowanie morfologii i adhezji komórek 3T3. Na Rysunku 54 zamieszczono zdjęcia komórek na podłożach PCLH przedzionych w różnych warunkach. Komórki aglomerują- skupiska widoczne są przy małych jak i dużych powiększeniach. Rozwinięcie szkieletu aktynowego jest niewielkie, nie są widoczne filopodia, co świadczy o ograniczonej migracji komórek (Rysunek 54).

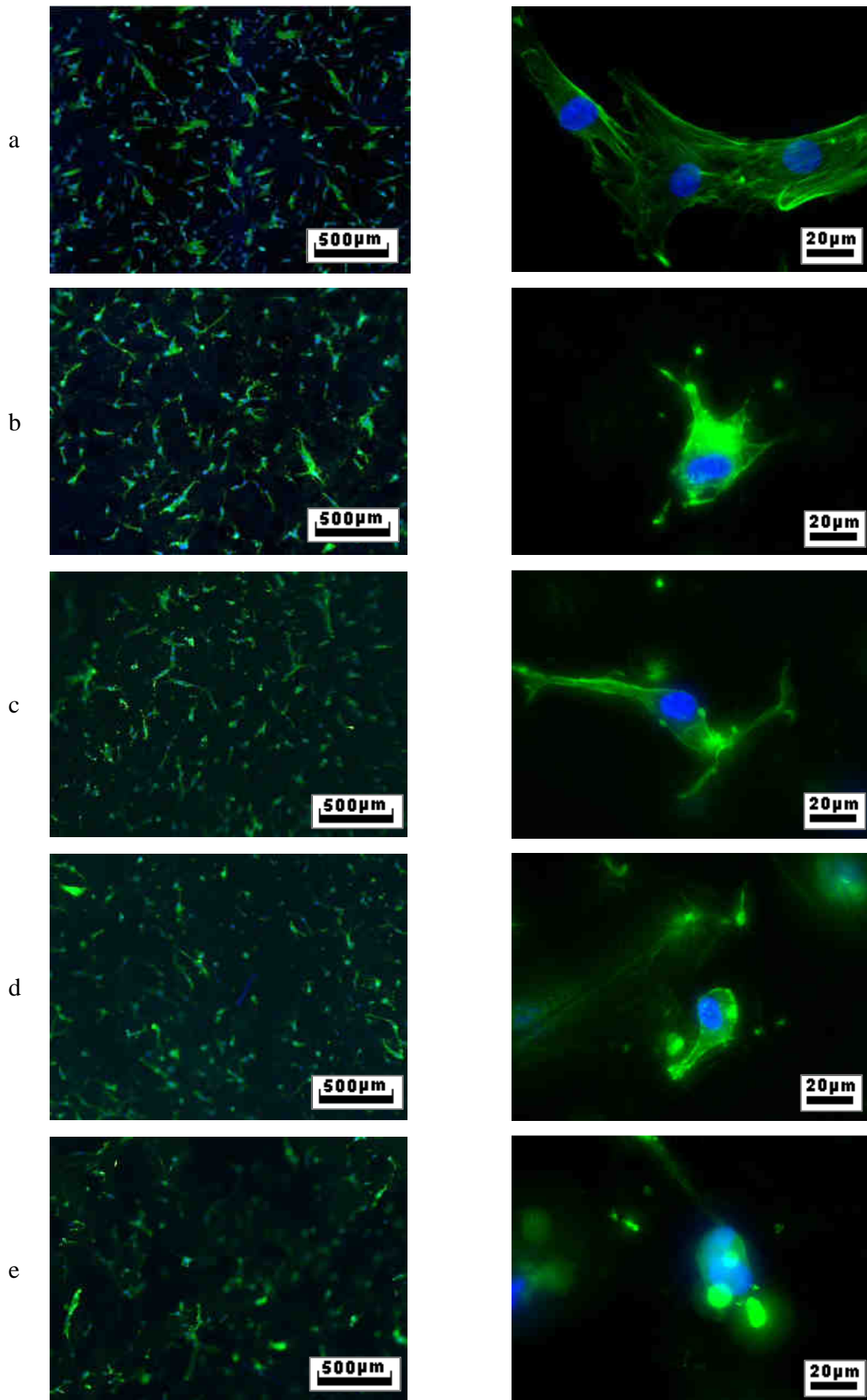


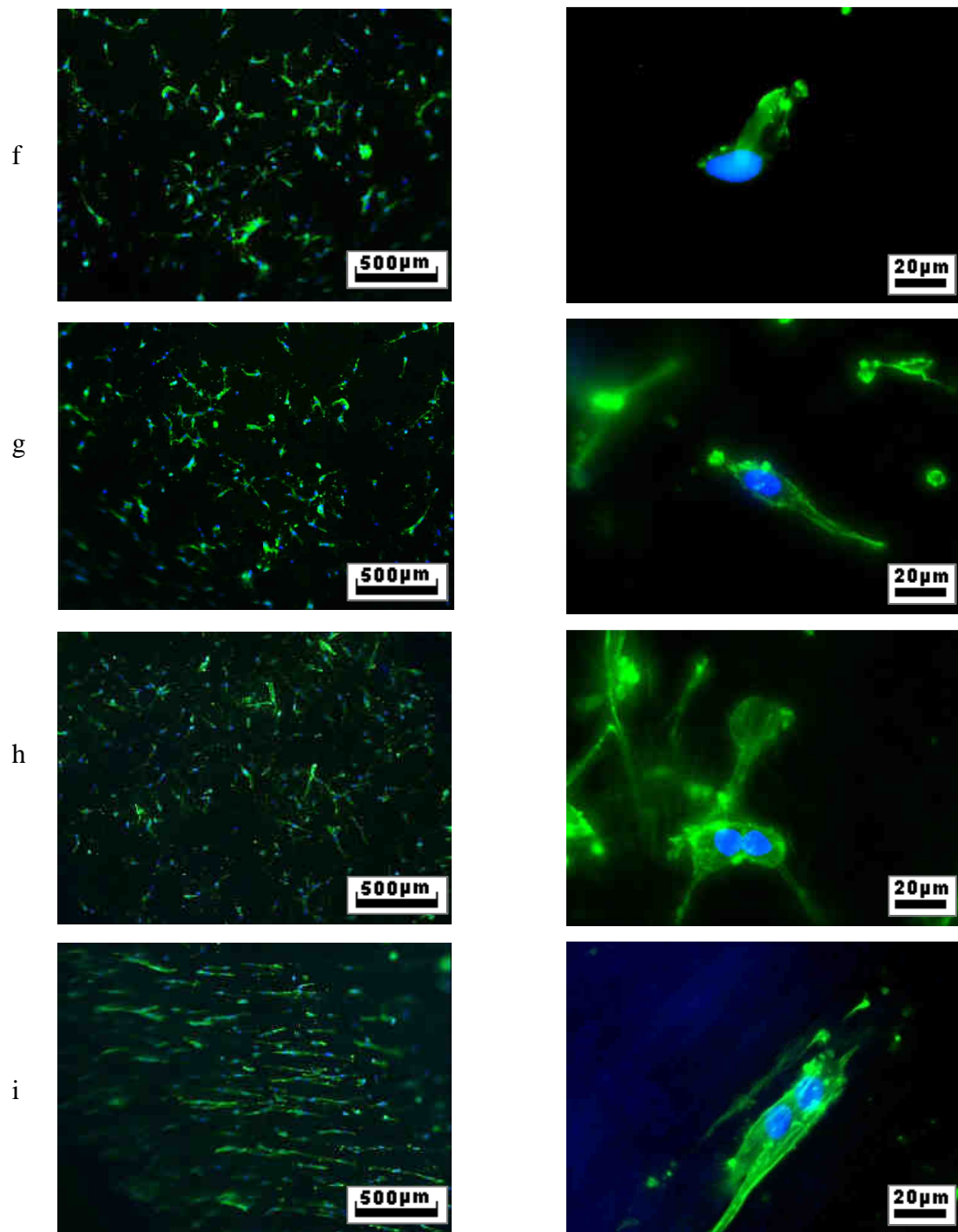


Rysunek 54. Morfologia komórek 3T3 hodowli na a) TCP oraz włókninach b) 3%PCLH P c) 5%PCLH P, d) 7%PCLH P e) 5%PCLH B po 7 dniach (w różnych powiększeniach)

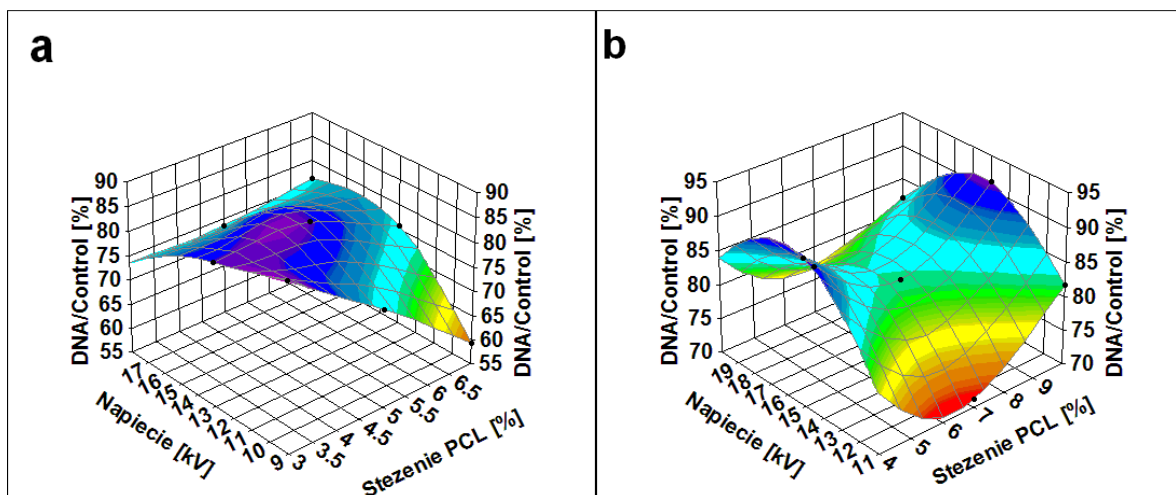
Rysunek 55 a obrazuje budowę ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych MSC wysianych na TCP. Można zauważyć charakterystyczne włókna aktynowe oraz filopodia. Zdjęcie jest potwierdzeniem wysiania zdrowych komórek, prawidłowo się rozplaszczających i migrujących. Obrazy FM (Rysunek 55b-h) komórek MSC po 2 dniach hodowli na włókninach PCLH oraz PCLCM, wskazują na mniejsze rozminięcie szkieletu aktynowego niż na TCP. Jednocześnie wykazują mniejszą chęć kolonizacji niż w przypadku komórek 3T3. Szkielet aktynowy komórek MCS jest tylko nieco lepiej rozwinięty niż komórek 3T3. Podłoża PCLH oraz PCLCM pozostają niecytotoksyczne dla komórek MSC. Komórki MSC są rozmieszczone bardziej równomiernie niż komórki 3T3. Adhezja i rozplaszczanie są również większe niż w przypadku 3T3. Rozplaszczanie świadczy o większej aktywności metabolicznej komórek oraz większej gotowości do kolejnych podziałów.

Dodatkowo komórki MSC wysiane na włókninę PCLH formowaną na bęben wykazują ułożenie szkieletu aktynowego zgodnie z kierunkiem ułożenia włókien (zjawisko CG) (Rysunek 55 i). Wydłużony szkielet aktynowy zgodnie z włóknami świadczy o dobrej komunikacji komórki z podłożem.





Rysunek 55. Morfologia komórek MSC po 2 dniach hodowli na TCP a) oraz włókninach PCLCM b) 4%, c) 7%, d) 10%, e) 13% i PCLH f) 3%, g) 5%, h) 7%przędzonych na płytę; i) 5%PCLH na bęben



Rysunek 56. Test DNA po 7 dniach hodowli komórek 3T3 na włókninach a) PCLH, b) PCLCM w stosunku do próbki kontrolnej TCP

Proliferację komórek 3T3 na podłożach PCLH oraz PCLCM po 7 dniach hodowli in-vitro oceniono za pomocą testu DNA odnoszącego się do ilości DNA zawartego w jądrach komórkowych (Rysunek 56). W przypadku włóknin PCLH (Rysunek 56 a) stopień proliferacji jest wyraźnie niższy dla próbek przedzionych z roztworu o wysokim stężeniu, przy małym napięciu. Zależność ilości komórek dla PCLCM w funkcji stężenia roztworu oraz przykładanego napięcia wskazuje na większy stopień proliferacji komórek na podłożach przedzionych przy ok. 15kV. Włókna wytwarzane w tych warunkach wykazują większą orientację molekularną oraz wyższy stopień krystaliczności PCL, niż w pozostałych warunkach. Dla włóknin PCLH maksimum proliferacji włókien przedzionych z tych samych stężeń obserwujemy przy 13kV przykładanego napięcia. Przy małych stężeniach (cienkie włókna i koraliki) notuje się relatywnie wysoki stopień proliferacji.

Generalnie jednak stopień proliferacji komórek po 7 dniach na włókninach PCLH, PCLCM jest mniejszy niż na próbce kontrolnej. Uwzględniając odchylenie standardowe można uznać, że na wszystkich próbkach stopień proliferacji jest dość zbliżony (Dodatek 1).

4.4.1.3. Podsumowanie wyników badań włókien jednoskładnikowych

Ocena wpływu parametrów elektroprzędzenia na morfologię i strukturę nanowłókien została przeprowadzona na podstawie włókien jednoskładnikowych wytworzonych z czystego PCL. Złożoność procesu elektroprzędzenia czyni to zadanie niełatwym. Na podstawie przeprowadzonych badań można wyciągnąć następujące wnioski:

- Morfologia włókien PCL silnie zależy od stężenia polimeru oraz rodzaju rozpuszczalnika- jego stałej dielektrycznej oraz przewodności elektrycznej. DMF oraz metanol skutecznie podnoszą przewodność elektryczną roztworów PCL w chloroformie.

- Przędzenie włókien bez koralików z PCL o średniej wagowej masie cząsteczkowej $M_w=80000\text{Da}$ z rozpuszczalników HFIP oraz chloroform/metanol (CM) jest możliwe powyżej 5% stężenia roztworu. Włókna przędzone z HFIP są bardziej jednorodne na długości niż przędzone z chloroform/metanol (CM), charakteryzują się mniejszym rozwinięciem powierzchni oraz mniejszym rozrzutem średnicy. Minimalne napięcie przy którym możliwe jest przędzenie to ok 8kV. Pełną stabilność procesu osiąga się w 10kV. Powyżej 20kV siła przykładanego napięcia jest zbyt duża przy zadanym przepływie i przędzenie staje się impulsowe.
- Wzrost lepkości roztworów wraz ze wzrostem stężenia roztworów przekłada się na wzrost średniej grubości włókien. PCL jest polimerem niepolarnym, co powoduje, że w przypadku wzrostu stężenia polimeru, następuje spadek przewodnictwa elektrycznego, co dodatkowo wpływa na wzrost grubości włókien. W zależności od rodzaju roztworu możliwe jest tworzenie włókien nanometrycznych, jak również submikronowych.
- Parametry aparaturowe tj. przyłożone napięcie nie wpływają tak silnie jak parametry roztworu na morfologię nanowłóknin. Zbierane na płytę włókna wykazują brak wyróżnionego kierunku ułożenia, podczas gdy włókna zbierane na bęben układają się w kierunku zgodnym z kierunkiem rotacji bębna.
- Stwierdzono istnienie korelacji pomiędzy krystalicznością a grubością włókien. Im grubsze włókna przy przędzeniu z roztworu o większym stężeniu, tym większy stopień krystaliczności ze względu na krystalizację w większej masie. Krystaliczność koreluje wraz ze średnicą włókien niezależnie od rodzaju rozpuszczalnika.
- Zaobserwowano wyraźny wzrost stopnia krystaliczności przy zastosowaniu jako kolektora obracającego się bębna w porównaniu do nieruchomej płyty, co wiąże się ze zjawiskiem orientowania się molekuł podczas elektroprzędzenia na bęben. W efekcie orientowania makrocząsteczek formowanie kryształów zachodzi z większą łatwością.
- Włókna zbierane na bęben wykazują orientację molekularną. Natomiast włókna zbierane na płytę wskazują bardzo niewielki, zmienny czynnik orientacji molekularnej wzdłuż osi włókna (badania dwójłomności). Orientacja molekularna we włóknach jest zatem głównie efektem rozciągania podczas zbierania włókien na bęben. Orientowanie makrocząsteczek przez przykładane napięcie jest bardzo słabe.
- Właściwości mechaniczne włókien są zależne od struktury molekularnej- im wyższy stopień krystaliczności tym wyższy moduł Younga- dla włókien przędzonych z roztworów

o większym stężeniu, dla układu PCL/HFIP zaobserwowano lokalne maksimum modułu Younga. Obecność koralików w strukturze znacznie obniża właściwości mechaniczne.

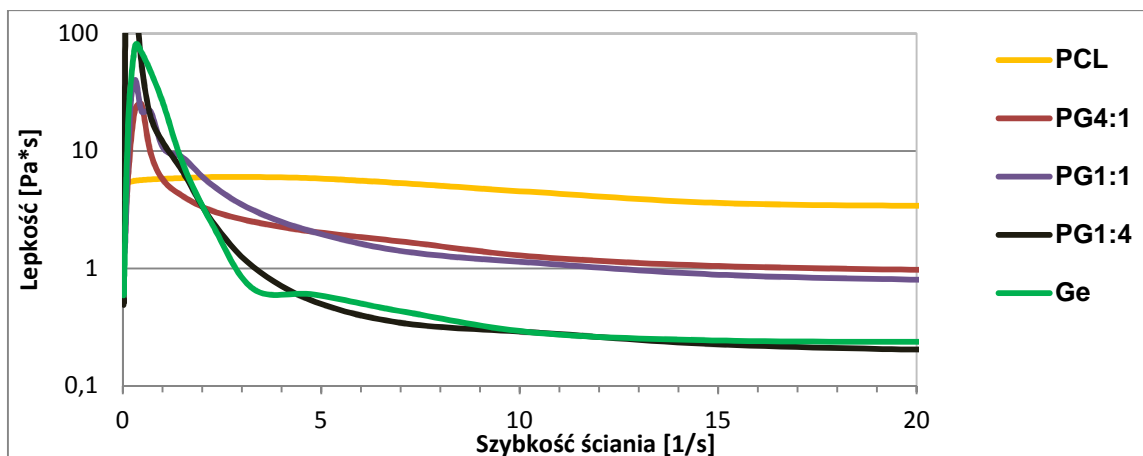
- Pomiar kąta zwilżania wskazuje na silną hydrofobowość włókien PCL, niekorzystną w hodowli komórek 3T3 oraz MSC w warunkach in-vitro.
- Uzyskane wyniki badań biologicznych in-vitro (cytotoksyczność, adhezja, proliferacja) wskazują, iż niezależnie od warunków przedzenia, włókniny z czystego PCL nie stanowią funkcjonalnego podłoża dla komórek. Nie zauważono znaczących zmian w stopniu proliferacji w zależności od parametrów formowania włóknin (stężenie polimeru, rodzaj rozpuszczalnika). Obecność koralików nie zmniejszyła zdolności komórek do proliferacji. Szkielet aktynowy komórek 3T3, po 7 dniach hodowli, pozostał słabo rozwinięty, a komórki przybrały kulisty kształt i wykazują dużą chęć kolonizacji. Komórki MSC mają więcej punktów adhezji- lepiej niż komórki 3T3- rozwinięty szkielet aktynowy, lepszą dyspersję na włókninach. Widoczne jest wydłużenie szkieletu aktynowego komórek wysianych na włókninach zbieranych na bęben, zgodnie z kierunkiem ułożenia włókien.

4.4.2. Analiza włókien i włóknin dwuskładnikowych

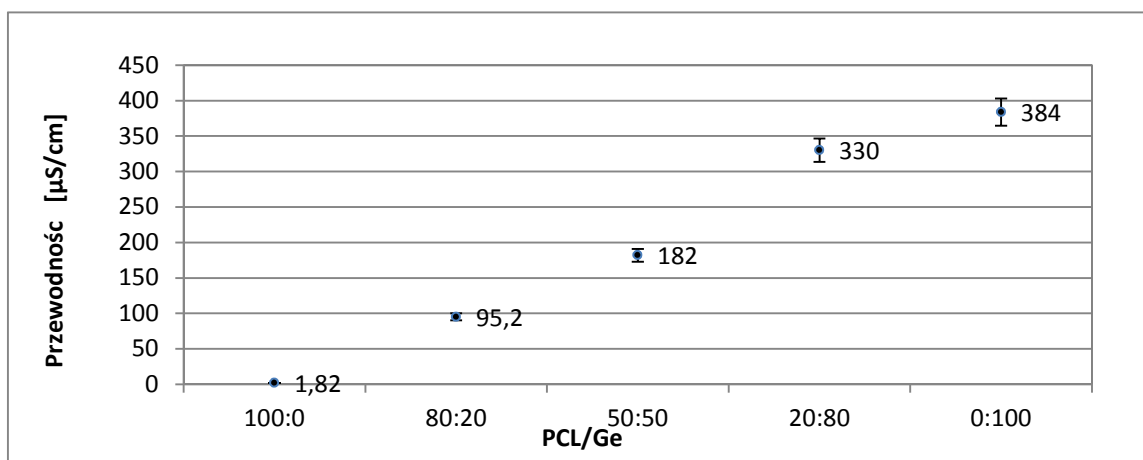
W wyniku analizy wpływu parametrów przedzenia na morfologię i strukturę molekularną włókien jednoskładnikowych, dobrano parametry przedzenia w układzie polimer/HFIP. Na podstawie badań, w celu tworzenia włókien wolnych od koralików, przyjęto stężenie roztworów na poziomie 5% oraz przykładane napięcie 13kV. Badania biologiczne wskazały na niedostateczną aktywność i proliferację komórek na włókninach PCL ze względu na dużą hydrofobowość, mimo różnicowania: morfologii, struktury molekularnej oraz sztywności włókien poprzez zmianę parametrów procesu. Dodatek biopolimeru ma na celu podniesienie hydrofilowości w kontekście adhezji komórek. Z literatury wiadomo, że biopolimery podnoszą aktywność biologiczną podłoży poprzez sekwencje RGD. Dodatkowo, żelatyna ulega szybciej degradacji niż poliestry, co może prowadzić do wzrostu porowatości włókniny w warunkach in-vitro.

4.4.2.1. Właściwości roztworów

W celu charakterystyki roztworów zostały zmierzone lepkość oraz przewodność elektryczna jedno- i dwuskładnikowych roztworów o stężeniu 5%.



Rysunek 57. Zależność lepkości w funkcji szybkości ścinania dla PCL, Ge oraz mieszanin PCL/Ge



Rysunek 58. Przewodność elektryczna roztworów PCL, Ge, PCL/Ge w HFIP

Rysunek 57 przedstawia zależność lepkości w funkcji szybkości ścinania dla PCL, PG4:1, PG1:1, PG1:4 oraz Ge. W mieszkankach PCL/Ge oraz czystej Ge pod wpływem sił ścinających następuje gwałtowny wzrost do osiągnięcia maksimum, po przekroczeniu którego, obserwuje się stopniowy spadek lepkości. Wzrost jest przypuszczalnie spowodowany orientowaniem makrocząsteczek, żelowaniem żelatyny w obecności wody pod wpływem przykładowych sił. Taki chwilowy wzrost lepkości określa się zjawiskiem reopeksji.

Przy szybkości ścinania $5,4s^{-1}$ (wyznaczonej szybkości ścinania w igle), lepkość dla mieszanek jest znacznie niższa niż dla czystego PCL i wynosi 0.5, 0.8, 2.3Pa*s odpowiednio dla PG4:1, PG1:1, PG1:4. Lepkość roztworu PG1:4 jest zbliżona do lepkości czystej Ge (2.7Pa*s).

Przewodność elektryczną mieszanek w funkcji stosunku PCL/Ge przedstawiono na Rysunku 58. Roztwór PCL w HFIP z uwagi na niepolarność polimeru wykazuje niezbyt wysoką przewodność elektryczną. Wraz ze wzrostem udziału Ge w roztworze, na skutek długich, silnie polarnych łańcuchów Ge przewodność elektryczna wzrasta.

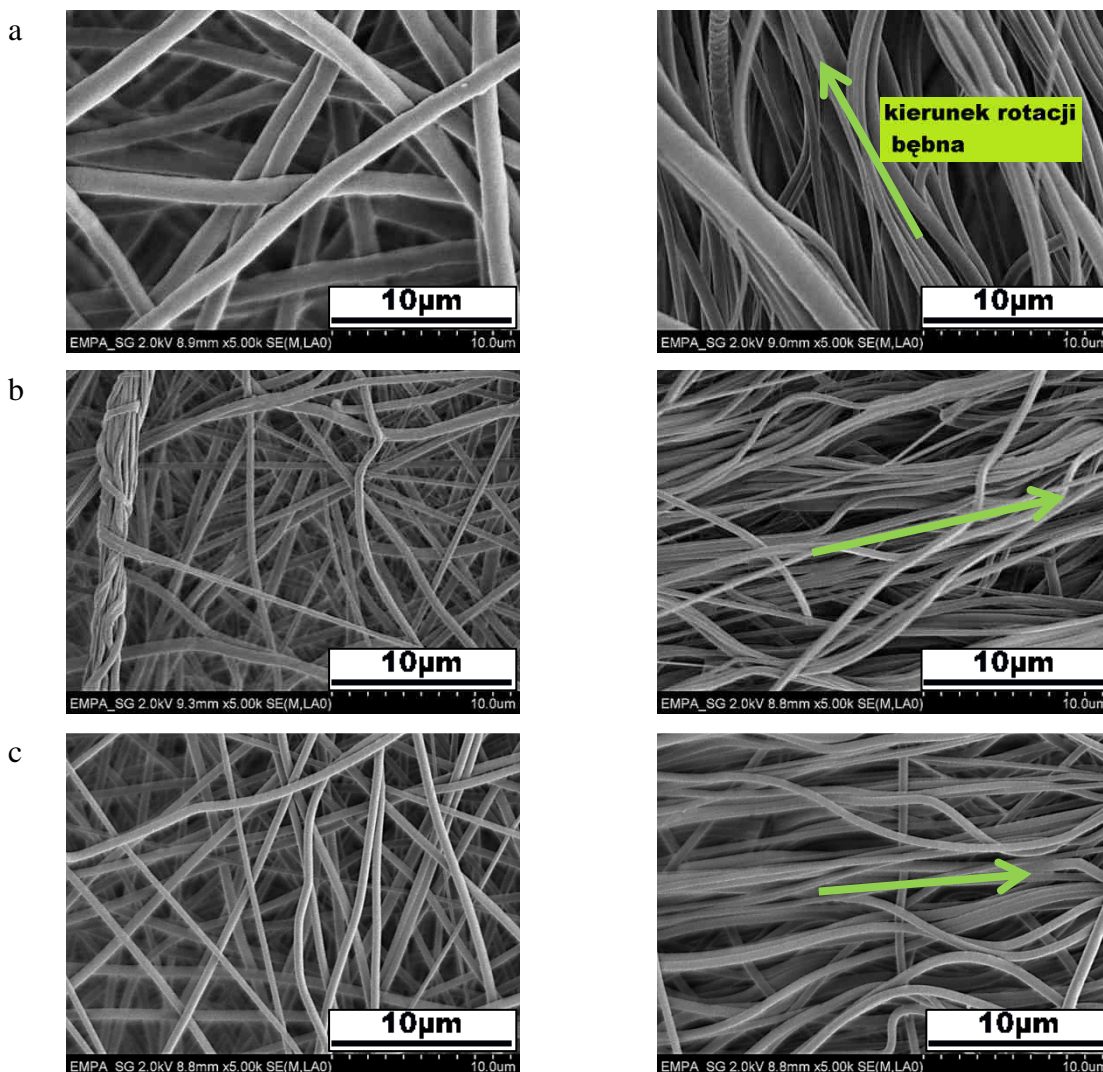
Ze względu na podobieństwo struktury cząsteczkowej Ge i Col przewiduje się, że lepkość oraz przewodność mieszanin PCL/Col jest zbliżona do PCL/Ge.

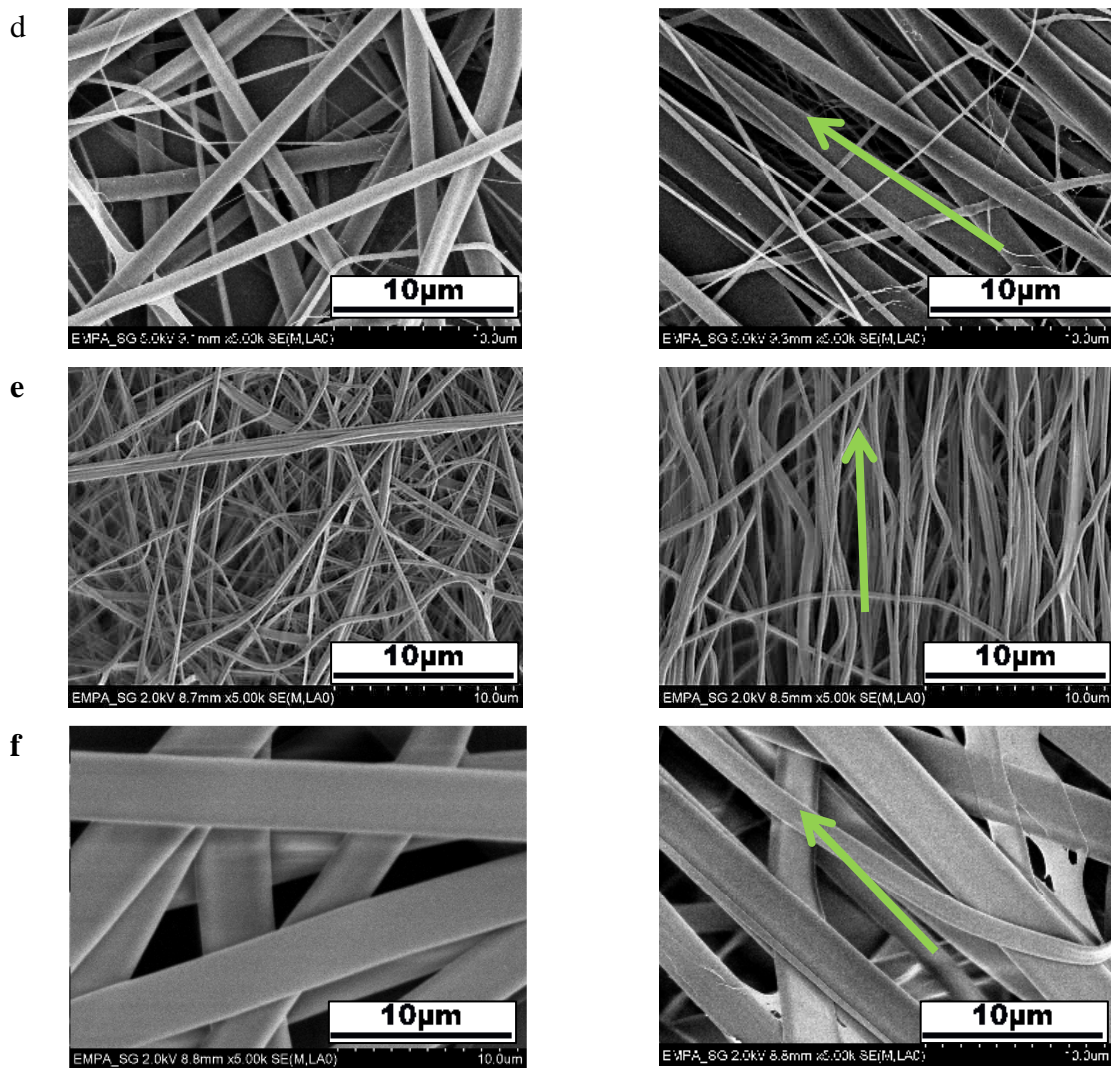
4.4.2.2. Morfologia włókien

Zdjęcia SEM (Rysunki 60 i 61) obrazują morfologię włókien dwuskładowych: PG4:1, PG1:1, PG1:4, PC oraz jednoskładnikowych PCL, Ge, Col (jako próbki odniesienia) przędzonych z HFIP na płytę **P** oraz rotujący bęben **B** (Tabela 10).

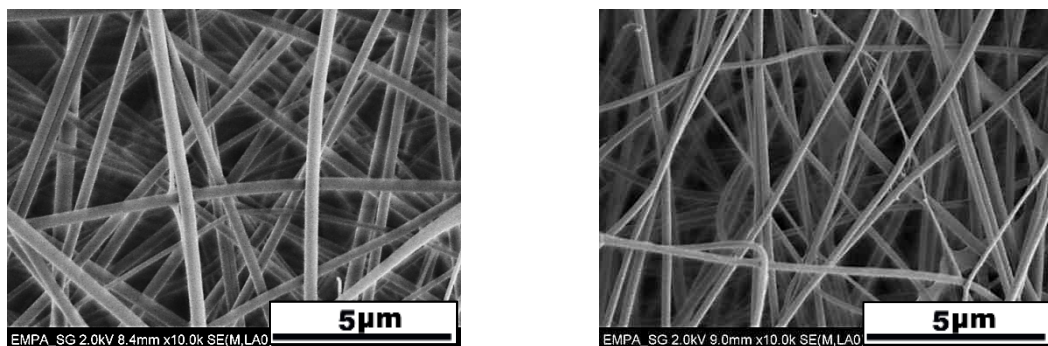
Tabela 10. Włókniny jedno i dwuskładnikowe wybrane do badań

	Próbki	Stężenie w/w [%]	Rodzaj kolektora	
			P	B
1	PCL, Ge	5	x	x
2	Ge3, Col3	3	x	
3	PG4:1, PG1:1, PG4:1, PG1:4, PC4:1	5	x	x





Rysunek 59. Morfologia włókien jednoskładnikowych oraz dwuskładnikowych a) PCL, b) PG4:1, c) PG1:1, d) PG1:4, e) PC4:1, f) Ge przedzionych na płytę (lewa kolumna) i bębna (prawa kolumna)

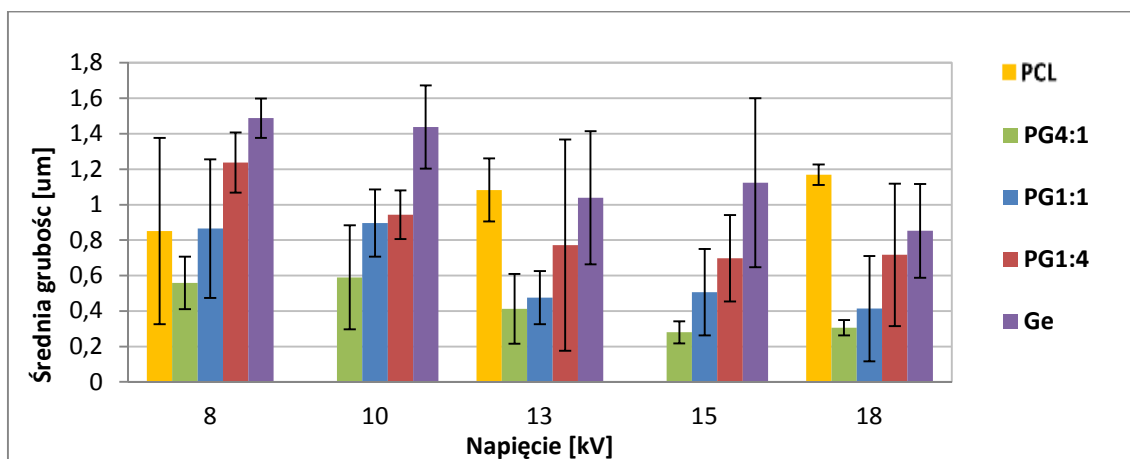


Rysunek 60. Morfologia włókien jednoskładnikowych a)Ge3, b)Col3 przedzionych na płytę

Morfologia jest podstawowym parametrem, który rozważa się w ocenie przydatności materiału jako podłoże komórkowe stosowane w inżynierii tkankowej. Zdjęcia SEM (Rysunek 59) wskazują, że dobrane parametry przędzenia umożliwiają formowanie jednorodnych włókien, bez koralików i defektów powierzchniowych. Powierzchnia włókien

wolna jest od porów, zdjęcia SEM wskazują na niewielkie rozwinięcie powierzchni. Włókna zbierane na bęben układają się w jednym, wyróżnionym kierunku zgodnym z kierunkiem rotacji bębna (Rysunek 59 prawa kolumna), podczas gdy włókna zbierane na płytę ułożone są przypadkowo (Rysunek 59 lewa kolumna).

Można zauważyć, że wraz ze wzrostem udziału Ge w mieszaninie PCL/Ge zmienia się przekrój włókien z okrągłego na wstążkowy.



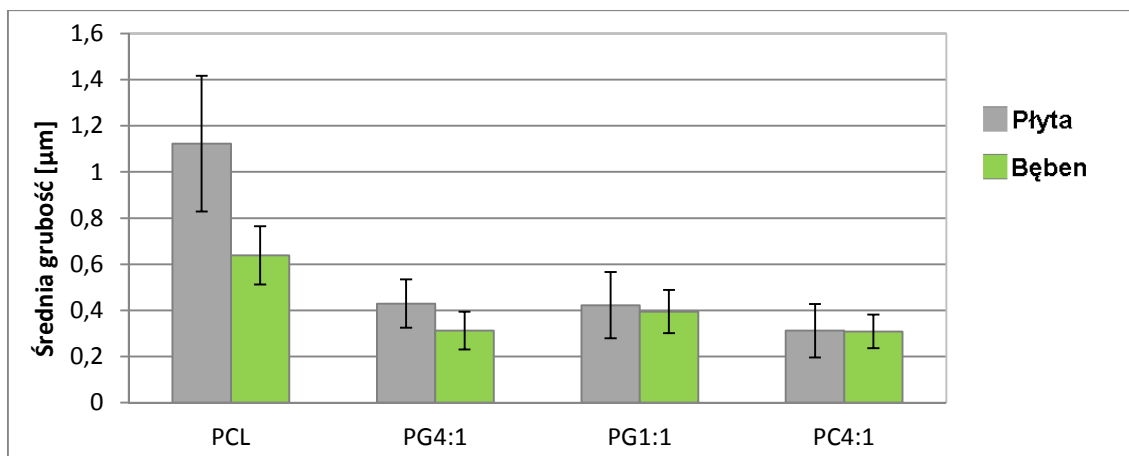
Rysunek 61. Średnia grubość włókien PCL, PG4:1, PG1:1, PG4:1, Ge przedzianych na płytę w funkcji przykładanego napięcia.

Rysunek 61 obrazuje zależność średniej grubości włókien przedzianych na płytę w funkcji przykładanego napięcia. Dla wybranego (dowolnego) przykładanego napięcia można zauważyć, że wraz z dodatkiem małej ilości Ge (PG4:1) średnica włókien znacznie maleje w stosunku do włókien przedzianych z czystego PCL. Następnie, wraz ze wzrostem ilości Ge we włóknach, średnica rośnie, by osiągnąć maksimum dla czystej Ge (wstążkowy kształt włókien). Najcieńsze włókna otrzymano z roztworu PG4:1. Wstążki włókien Ge są nieco szersze niż PG4:1 (Rysunek 57).

Na skutek dodatku Ge do PCL zmieniają się właściwości reologiczne roztworu, wzrasta przewodność (Rysunki 57 i 58). Im większa przewodność elektryczna roztworów tym efektywniejsze działanie sił rozciągających podczas procesu wytwarzania włókien.

Obserwowany spadek średniej grubości włókien PG1:4 oraz Ge, wraz ze wzrostem przykładanego napięcia, może być wynikiem efektywniejszego działania sił przykładanego pola elektrycznego, ale również krótszą drogą pokonywaną przez wirującą strugę. Im krótsza droga, tym mniejsze rozplaszczanie włókien.

Obserwacje mechanizmu tworzenia się wstążkowych włókien w zależności od rodzaju oraz stężenia polimeru analizowano w pracach Renekera [154, 155].

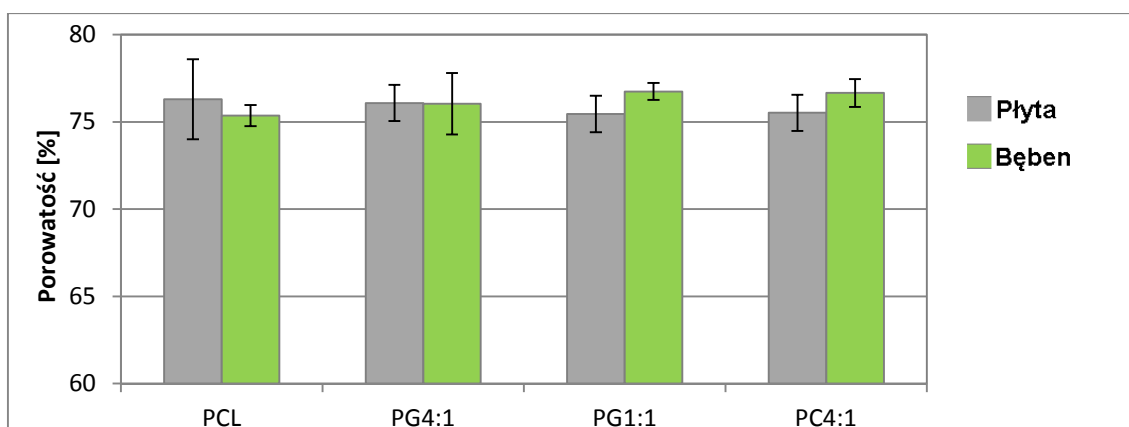


Rysunek 62. Średnia grubość włókien PCL, PG4:1, PG1:1, PC4:1 przędzonych na płytę oraz na bęben.

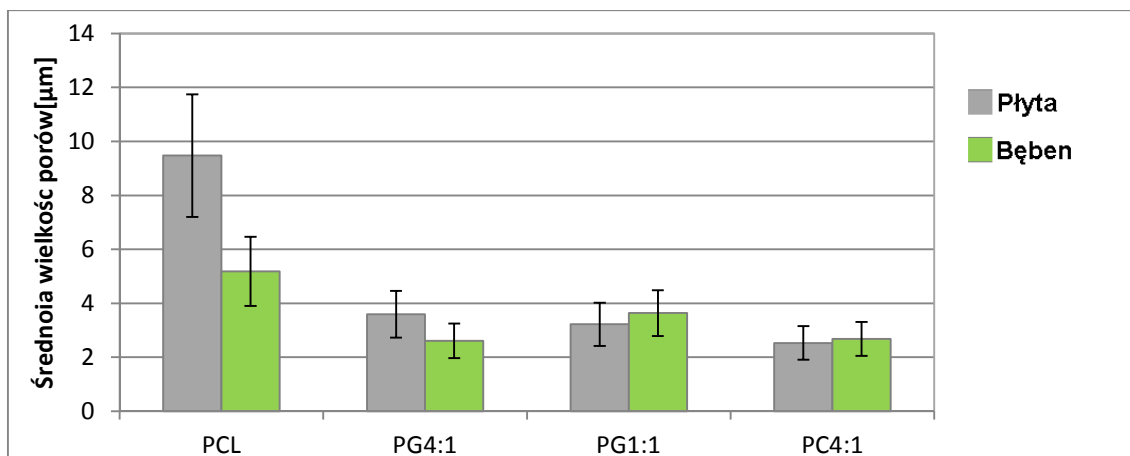
Rysunek 62 obrazuje średnią grubość włókien dwuskładnikowych PG4:1, PG1:1, PC4:1 w porównaniu do włókien PCL przędzonych na płytę oraz bęben przy 13kV (włókna o przekroju kołowym). Można zauważyć, że włókna przędzone na obracający się bęben mają mniejszą średnicę niż przędzone na płytę. Podczas przędzenia na obracający się bęben powstaje dodatkowe rozciąganie włókien, które obniża średnią wartość grubości.

4.4.2.3. Porowatość włókien

Porowatość oraz średnia wielkość porów włókien przędzonych na płytę i na bęben, oszacowana zgodnie z zaproponowaną metodyką, wynosiła ok 76%. Włókniny dwuskładnikowe wykazują mniejszy średni rozmiar porów niż włókniny z PCL (Rysunki 63 i 64). Koreluje to ze średnią grubością włókien- im cieńsze włókna tym mniejsza porowatość całkowita i mniejszy średni rozmiar porów. Wg. [146] szacuje się, że maksymalna wielkość porów jest trzykrotnie większa niż wyznaczana wartość średnia. Przykładowo dla PG4:1 przędzonego na płytę jest to 10,5μm, natomiast dla przędzonego na bęben ok 8,5μm.



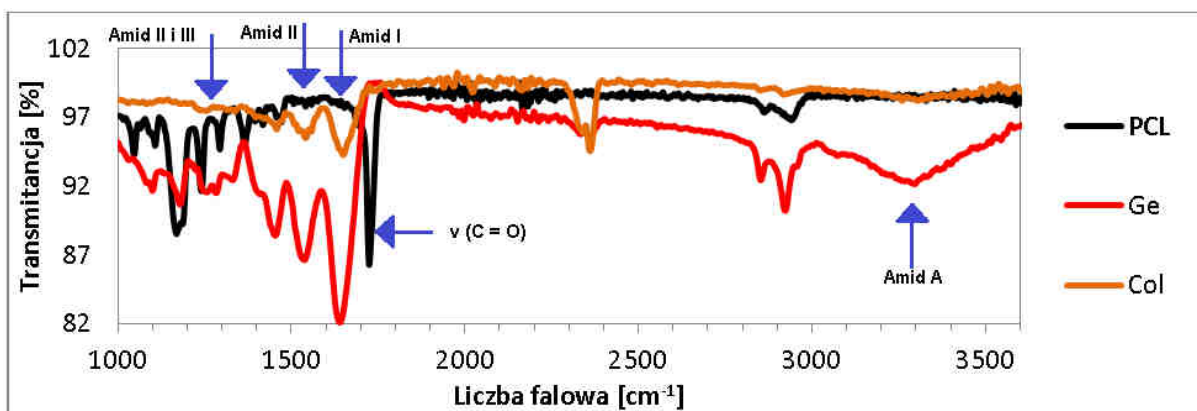
Rysunek 63. Średnia porowatość PCL, PG4:1, PG1:1, PC4:1 włókien przędzonych na płytę oraz na bęben.



Rysunek 64. Średnia wielkość porów PCL, PG4:1, PG1:1, PC4:1 włókien przędzonych na płytę oraz na bęben.

4.4.2.4. Struktura molekularna

Rysunek 65 obrazuje profil FTIR dla włókien jednoskładnikowych, w zakresie istotnych liczb falowych. Zauważyć można charakterystyczne piki pochodzące od oscylacji określonych grup- dla PCL związane z fazą krystaliczną oraz fazą amorficzną, dla Ge z poszczególnymi amidami. Wartości liczb falowych związane z pikami charakterystycznymi przyporządkowano zgodnie z danymi literaturowymi (Tabele 8 i 11).



Rysunek 65. Profil FTIR dla włókien jednoskładnikowych- PCL, Ge oraz Col w zakresie 1000-3700cm⁻¹.

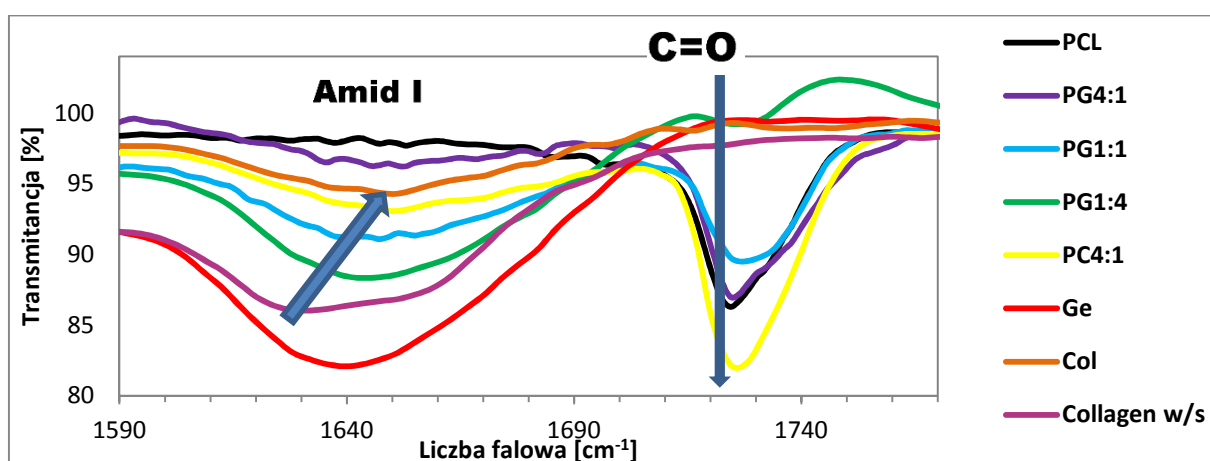
Widmo FTIR w zakresie grup karbonylowych (1710-1750cm⁻¹) (Rysunek 66) włókien dwuskładnikowych PCL/Ge, może dostarczać informacji o oddziaływaniach molekularnych obu składników. Pik w zakresie grup karbonylowych we włóknach dwuskładnikowych, w porównaniu z tym samym pikiem w czystym PCL, ulega deformacji oraz nieznacznemu przesunięciu ku wyższym liczbom falowym. Może to być dowodem oddziaływań tych grup z grupami karboksylowymi występującymi w biopolimerach. W literaturze można znaleźć tego rodzaju opis odnośnie innych mieszanek. Uznaje się, że zmodyfikowany kształt piku i/lub jego przesunięcie świadczy o częściowej mieszalności obu polimerów [¹⁵⁶, ¹⁵⁷].

Tabela 11. Charakteryzacja pików żelatyny oraz kolagenu [¹⁵²],[¹⁵⁸].

	Położenie (cm ⁻¹)	Drganie	Pochodzenie
Żelatyna	3300	Rozciąganie N-H,	Drganie od grupy Amidowej A
	1636- 1640	Absorbcja H ₂ O, rozciąganie C=O	Drganie od grupy Amidowej I
	1542 -1544	Zginanie N-H i rozciąganie C-H	Drganie od grupy Amidowej II
	1240	Rozciąganie C-N i zginanie rozciągające N-H	Drganie od grup Amidowych III I
Kolagen	3313	Rozciąganie N-H	Drganie od grupy Amidowej A
	3085	Rozciąganie C-H ₂	Drganie od grupy Amidowej B
	1632	Absorbcja H ₂ O, rozciąganie C=O	Drganie od grupy Amidowej I
	1551	Zginanie N-H i rozciąganie C-H	Drganie od grupy Amidowej II
	1239	Rozciąganie C-N i zginanie rozciągające N-H	Drganie od grup Amidowych III I

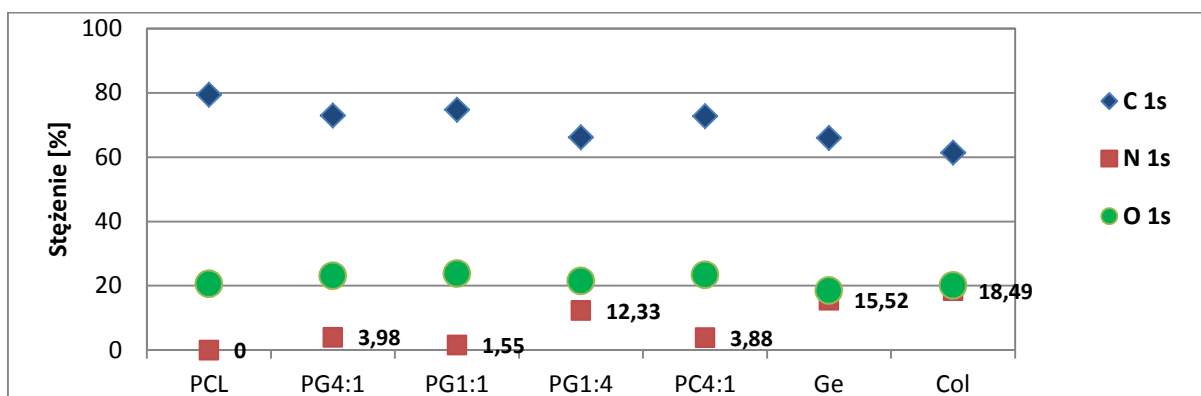
Z kolei na podstawie pików pochodzących od drgań związanych z grupą amidową I, można wnioskować o strukturze trzeciorzędowej- udziale helis i kłębków w biopolimerach. Kolagen przed przędzeniem (Collagen w/s) wykazuje pik przy niższych liczbach falowych (Rysunek 66) niż kolagen przędzony Col co świadczy o udziale potrójnych helis w materiale wyjściowym oraz ich zaniku w przypadku włókien przędzonych.

We włóknach dwuskładnikowych pik związany z drganiami od grupy amidowej I, przesunięty jest ku wyższym liczbom falowym w porównaniu tym samym pikiem w Ge/Col (Rysunek 65). Zgodnie z [¹⁴³,¹⁵⁹] oznacza to, że udział helis w strukturze włókien dwuskładnikowych jest mniejszy niż w czystych Ge czy Col. W literaturze mówi się nawet o całkowitym zaniku struktury drugorzędowej w środowisku silnie polarnego HFIP [¹²⁶,¹⁶⁰].



Rysunek 66. Profil FTIR dla włókien dwuskładnikowych w porównaniu z włóknami jednoskładnikowymi w zakresie 1590-1770cm⁻¹.

Niezależnie od badań FTIR pozwalających wnioskować o strukturze chemicznej włókien, przeprowadzono również badania XPS, dzięki którym możliwe jest oznaczenie składu chemicznego powierzchni włókien. Przebadano powierzchnię włókien dwuskładnikowych w porównaniu do PCL oraz Ge. Spektra XPS włókien PCL wykazują piki związane z atomami C oraz O; od włókien Ge i Col dodatkowo- z atomami N. Włókna dwuskładnikowe wykazują, zatem udział C, O, N. Rysunek 67 przedstawia procentowo ilość danego pierwiastka dla włókien jedno i dwuskładnikowych. Zależność zawartości N na powierzchni we włóknach dwuskładnikowych jest nieliniowa w stosunku do udziału Ge we włóknie. We włóknach PG4:1 jest więcej azotu na powierzchni niż we włóknach PG1:1. Może być to wynikiem efektu dyfuzji Ge ku powierzchni przy małej zawartości tego składnika. Niewielka ilość N na powierzchni PG1:1 może być spowodowana gradientem Ge we włóknach, większym udziałem grup COO- na powierzchni (w wyniku oddziaływań niepolarnych grup Ge z niepolarnymi PCL), niż grup zawierających N. Zawartość pierwiastków C, O, N na powierzchni włókien PG4:1 oraz Col jest zbliżona do ich udziału odpowiednio w PG4:1 i Ge.



Rysunek 67. Stężenie C, N, O w funkcji składu powierzchni włókien na podstawie danych XPS

W silnie polarnym HFIP dochodzi do dezorientowania niektórych oddziaływań w biopolimerach co może powodować rozfałdowanie powierzchni białka, przenikanie HFIP do wnętrza białka, a tym samym większą ruchliwość i reakcyjność makrocząsteczek co potwierdzają dane literaturowe [160]. Badanie przestrzennej budowy białek poleca się z użyciem spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) lub elektronowego dichroizmu kołowego (ECD).

Hydrofobowość włóknin (Tabela 12) została określona za pomocą pomiaru kąta zwilżania. Czysty PCL jest silnie hydrofobowy, natomiast Ge wykazuje hydrofilowość na poziomie kąta zwilżania 70°. Kropla wody położona na włókninie dwuskładnikowej PG4:1, PG1:1 znikająca na tyle szybko, że kąt zwilżania określony został jako zerowy- super

hydrofilowy materiał. Jest to zaskakujące zjawisko, gdyż nie ma addytywności zjawiska hydrofobowości. Podobne spostrzeżenia opisano w pracy Zhanga [131].

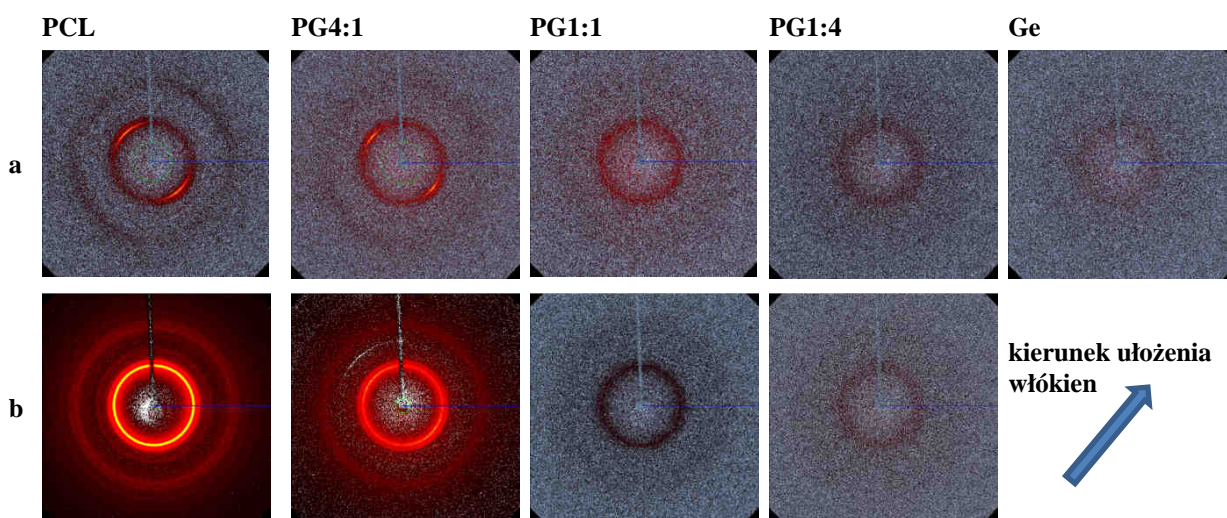
Ge zawiera grupy polarne jak i niepolarne [47], zatem mimo powinowactwa do wody wypadkowo nie jest zupełnie hydrofilowa. W mieszkach PCL/Ge może dochodzić do powinowactwa grup niepolarnych PCL i niepolarnych Ge, oddziaływań między nimi. Możliwe też, że na powierzchni włókien bardziej aktywne są grupy polarne Ge o powinowactwie do polarnego rozpuszczalnika HFIP, a tym samym do wody.

Tabela 12. Kąt zwilżania włókien.

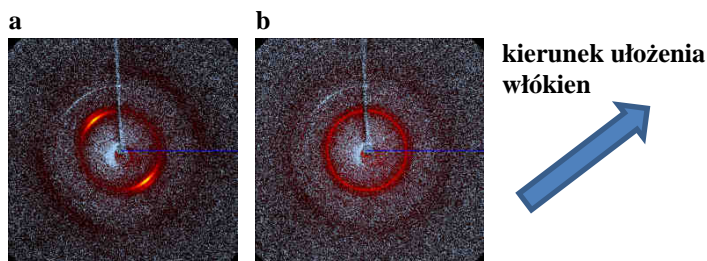
PCL	PG4:1	PG1:1	PG1:4	Ge
128°	0°	0°	30°	70°

4.4.2.5. Struktura nadmolekularna

Strukturę nadmolekularną włókien analizowano metodami WAXS oraz DSC. Rysunki 68 i 69 ilustrują rentgenogramy zarejestrowane dla włókien PCL, Ge oraz włókien dwuskładnikowych PG4:1, PG1:1, PG4:1, PC1:4 zbieranych na bęben oraz na płytę. Profil radialny WAXS czystego PCL pokazuje szereg refleksów pochodzących od płaszczyzn kryształów PCL: (110) pod kątem $2\theta = 9.65$ stopni; (200) pod kątem $2\theta = 10.75$ stopni; (210) pod kątem $2\theta = 13.4$ stopni; (120) pod kątem $2\theta = 17.28$ stopni; (310) pod kątem $2\theta = 18.40$ stopni; (220) pod kątem $2\theta = 19.50$ stopni; (207) pod kątem $2\theta = 20.0$ oraz amorficzne halo z maksimum pod kątem $2\theta = 9.0$ stopni. Ge pozostaje amorficzna- widoczne jest wyłącznie szerokie halo z maksimum w $2\theta = 8.77$ stopni (Rysunki 70 i 71).



Rysunek 68. WAXS włókien PCL, PG4:1, PG1:1, PG1:4 oraz Ge przedzianych na a) bębnie (zaznaczony kierunek ułożenia włókien), b) na płycie

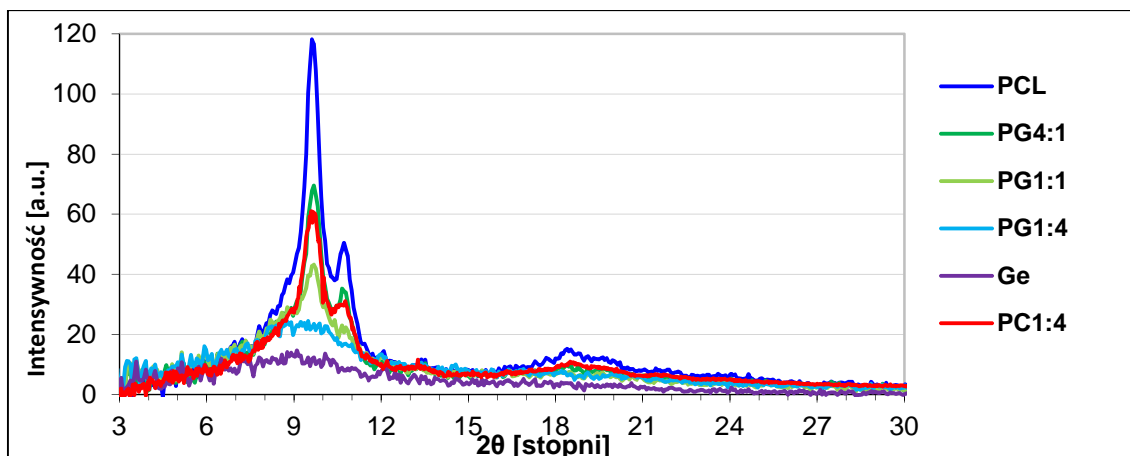


Rysunek 69. WAXS włókien PC4:1 przędzonych a) na bęben (zaznaczony kierunek ułożenia włókien, b) na płytę

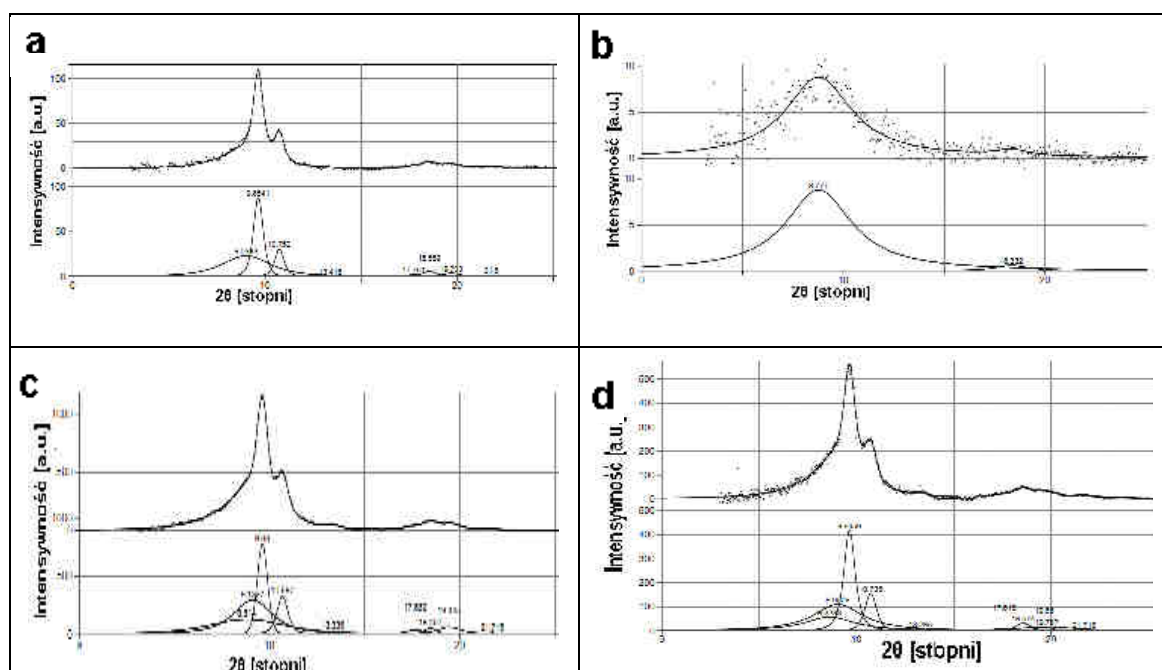
Profile radialne włókien dwuskładnikowych wykazują refleksy pochodzące od fazy krystalicznej PCL jak również amorficzne halo od PCL oraz Ge (Rysunek 70).

Profile radialne włókien PC4:1 (Rysunek 70) uwidaczniają te same refleksy co włókniny PG4:1, tzn. refleksy od kryształów PCL, fazy amorficznej PCL oraz szerokie halo, z maksimum przy ok. 10 stopniach, scharakteryzowane również w Ge jako pochodzące od fazy amorficznej. Obserwacje te wskazują na degradację Col w środowisku HFIP do Ge. W przypadku natywnej struktury kolagenu zwykle obserwuje się refleksy od fazy krystalicznej. Sugestie degradacji kolagenu w środowisku silnie polarnych rozpuszczalników, o czym wspomniano przy okazji wyników FTIR, można odnaleźć w literaturze [¹²⁶,¹²⁷].

W celu oszacowania krystaliczności PCL we włóknach konieczna była aproksymacja profili radialnych funkcjami Pearson VII. Powierzchnie pików pochodzących od fazy krystalicznej PCL odniesione do całkowitego rozpraszania pochodzącego zarówno od kryształów jak i fazy amorficznej dają informację o krystaliczności PCL we włóknach dwuskładnikowych. Rysunek 71 przedstawia schemat aproksymacji profili radialnych dla PCL, Ge, PG4:1 oraz PC4:1 przędzonych na bęben. W przypadku włókien odbieranych na bęben, wykazujących dużą orientację molekularną, wyznaczenie krystaliczności odbyło się po wcześniejszym uśrednieniu azymutalnym.



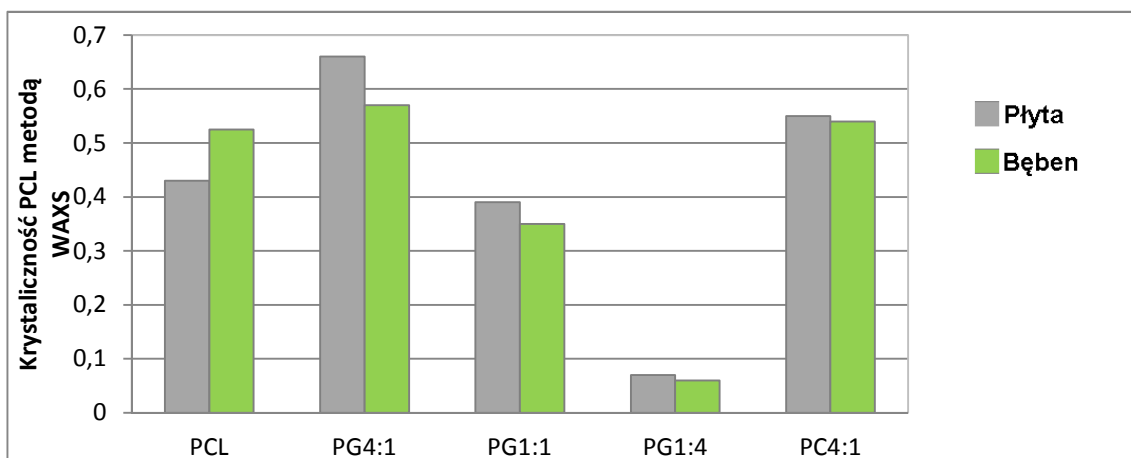
Rysunek 70. Profile radialne wyznaczone z WAXS dla włókien PCL, PG4:1, PG1:1, PG1:4, PC4:1, Ge przędzonych na bęben



Rysunek 71. Aproksymacja profili radialnych WAXS na przykładzie a)PCL, b)Ge, c)PG4:1, d)PC4:1 przędzonych na bęben

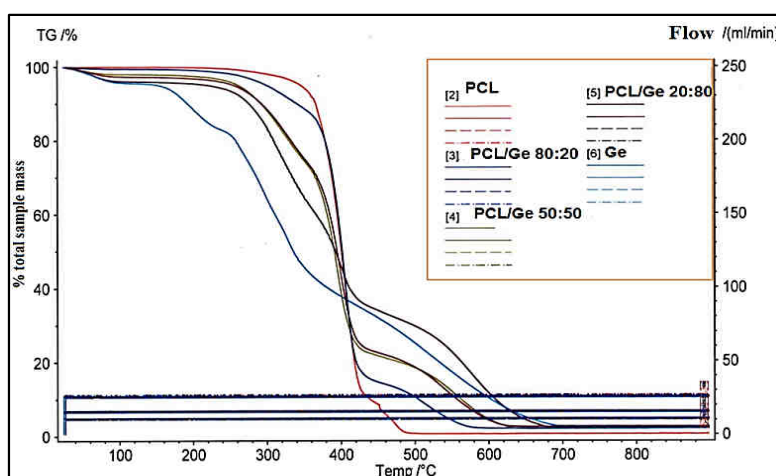
Rysunek 72 ilustruje stopień krystaliczności PCL wyznaczony z profili radialnych dla próbek PCL, PG4:1, PG1:1, PG1:4 oraz PC4:1. Można zauważyć wzrost krystaliczności PCL dla włókien dwuskładnikowych z małą ilością biopolimeru zbieranych na płytę jak i na bęben – PG4:1, PC4:1, w porównaniu z włóknami jednoskładnikowymi PCL. Po przekroczeniu pewnej ilości biopolimeru krystaliczność maleje (PG1:1, PG1:4). Wzrost krystaliczności przy małych ilościach biopolimeru może być tłumaczony oddziaływaniami hydrofobowymi. W układzie PCL/biopolimer odnotowuje się bowiem również pewną procentową zawartość wody, związana z biopolimerem. Badania TGA wykazują udział wody na poziomie 5% (Rysunek 73). PCL przy małej zawartości Ge ma zatem stosunkowo dużą swobodę ruchliwości swoich niepolarnych makrocząstek, starając się odseparować od

polarnej wody, co może prowadzić do dodatkowej siły napędowej tworzenia agregatów krystalicznych.

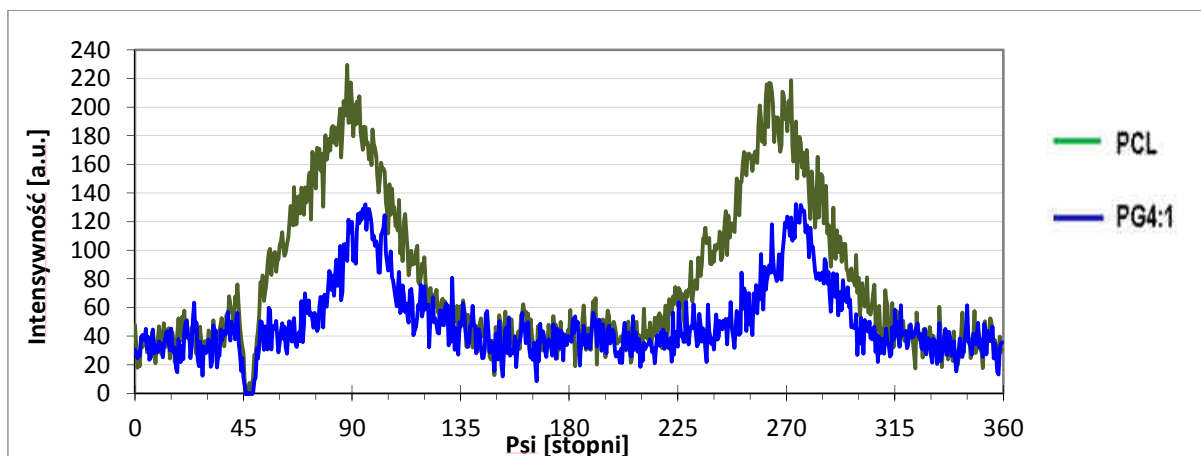


Rysunek 72. Stopień krystaliczności PCL wyznaczony metodą WAXS dla PCL, PG4:1, PG1:1, PG1:4 oraz PC4:1 dla włókien przędzonych na płytę oraz na bęben

Jak wykazano w pierwszej części pracy dotyczącej włókien jednoskładnikowych, odbiór na bęben wywołuje orientację molekularną, a tym samym prowadzi do wzrostu krystaliczności, w porównaniu z włóknami zbieranymi na płytę (brak orientacji molekularnej). We włóknach dwuskładnikowych mamy jednak odwróconą sytuację- wyższą krystaliczność PCL we włóknach przędzonych na płytę niż na bęben (Rysunek 72). Fakt ten może wynikać z efektywniejszego działania sił hydrofobowych prowadzących do wzrostu krystaliczności PCL w przypadku braku orientacji makrocząsteczek, tj. w przypadku zbierania włókien na płytę. Oddziaływania hydrofobowe zachodzą pomiędzy niepolarnymi makrocząsteczkami PCL, które mają tendencję do aglomeracji w środowisku silnie polarnej wody. Zjawisko hydrofobowej aglomeracji opisywane jest również dla białek (Ge, Col), które zawierają zarówno aminokwasy polarne jak i niepolarne [161].



Rysunek 73. Ubytek masy w funkcji temperatury dla włókien PCL, PG4:1, PG1:1, PG1:4, Ge przędzonych na bęben



Rysunek 74. Profile azymutalne dla włókien PCL i PG4:1 przędzonych na bęben

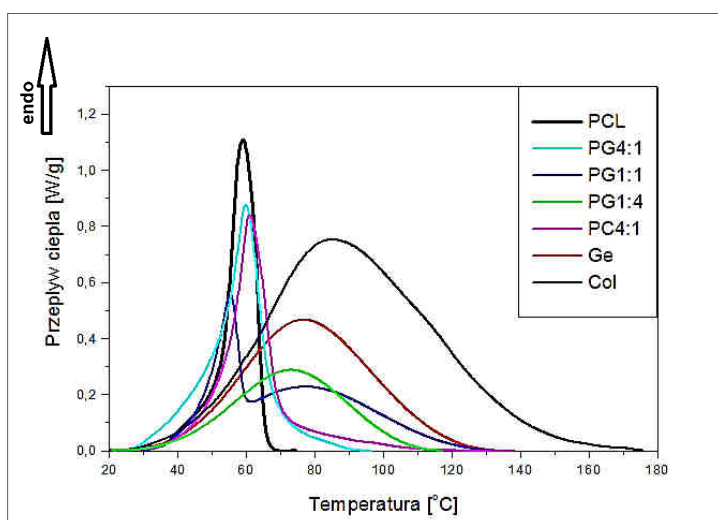
Profile azymutalne (Rysunek 74) rentgenogramów WAXS włókien zbieranych na bęben pozwalają oszacować orientację molekularną faz krystalicznej i amorficznej PCL (Tabela 13). Biorąc pod uwagę, że faza amorficzna orientuje się zwykle słabiej niż krystaliczna, można uznać w pewnym przybliżeniu, że jest to orientacja fazy krystalicznej. Wyznaczony czynnik orientacji f_c dla włókien PCL zbieranych na bęben wynosi 0,424. Dodatek Ge lub Col obniża orientację PCL (Tabela 13). Próbki z dużą zawartością Ge (PG1:4) nie wykazują orientacji f_c . W przypadku włókien zbieranych na płytę nie można było wyznaczyć stopnia orientacji molekularnej z powodu przypadkowego ułożeniem włókien w próbce. Wyniki uzyskane metodą pomiaru dwójłomności optycznej dla włókien jednoskładnikowych, pozwalają jednak stwierdzić, że włókna zbierane na płytę charakteryzują się bardzo słabą orientacją molekularną lub jej brakiem. Orientacja molekularna włókien PCL zbieranych na płytę została szerzej opisana na podstawie badań dwójłomności w podrozdziale na temat struktury nadmolekularnej włókien jednoskładnikowych (Rozdział 4.4.1.2.4.).

Tabela 13. Czynnik orientacji molekularnej f_c części krystalicznej PCL określony z WAXS

PCL	PG4:1	PG1:1	PG1:4	PC4:1
0,424	0,307	0,051	0	0,397

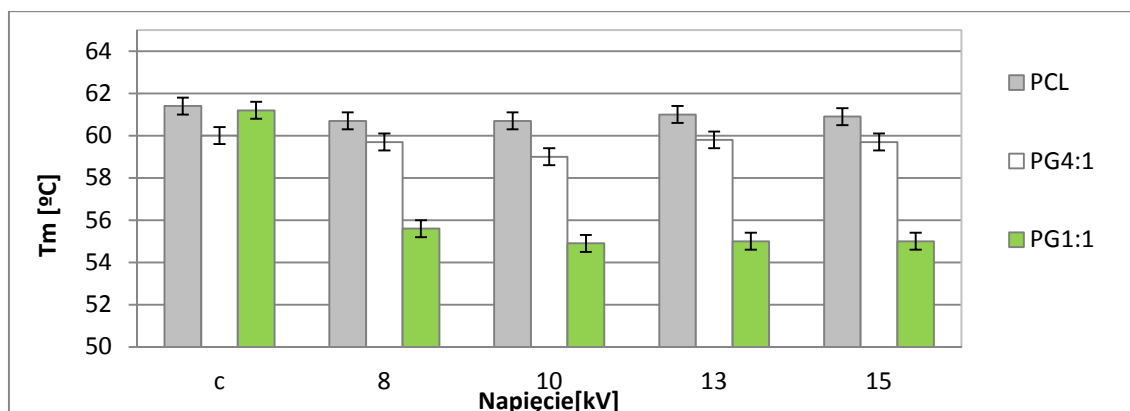
O strukturze nadmolekularnej można dodatkowo wnioskować z danych DSC. Włókniny PG4:1, PG1:1, PG1:4, PG1:4, PC oraz Ge ogrzewano w zakresie 10-180°C (Rysunek 75). Próbka czystego PCL wykazuje endotermiczny pik w zakresie 30-70°C z maksimum w temperaturze 59°C odpowiadający topnieniu fazy krystalicznej. Szeroki pik w zakresie 30-170 °C, 30-130 °C obserwuje się odpowiednio dla Ge oraz Col. Pik ten związany jest z parowaniem wody oraz przemiana helisa-kłębek (analiza TGA- Rysunek 73), co potwierdzają dane literaturowe [162]. Krzywa kalorymetryczna włókien dwuskładnikowych

jest złożeniem efektów ciepłych od PCL oraz Ge. Jej kształt zależy od proporcji PCL/Ge we włóknach. Krzywa dla włókien PG1:1 jest wyraźnym złożeniem dwóch pików- pierwszy pochodzi od topnienia kryształów PCL, a drugi związany jest ze zmianami w Ge. Dla PG4:1, PC4:1 zauważyć można główny pik pochodzący od topnienia kryształów PCL, a dla PG4:1 pik związany z Ge. Udział Ge, Col w próbkach PG4:1, PC4:1 widoczny jest jako przedłużone prawe ramię pików pochodzących od głównego składnika.



Rysunek 75. Krzywe DSC przepływu ciepła w funkcji temperatury

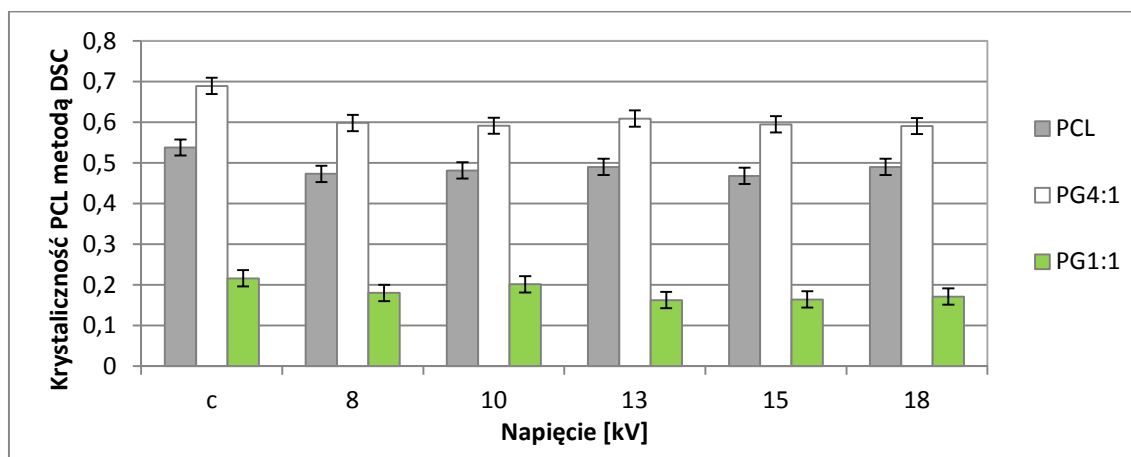
Na Rysunkach 77 i 78 przedstawiono zależność temperatury topnienia oraz stopnia krystaliczności od przykładowego podczas elektroprzędzenia napięcia. Wynika z niego, że przykładowe napięcie nie ma znaczącego wpływu na temperaturę topnienia kryształów PCL we włóknach z danego roztworu. Można jednak zauważyć silny wpływ dodatku Ge. Zarówno dla włókien, jak i dla folii, dodatek Ge obniża temperaturę topnienia PCL. Dla włókien PG1:1 obserwuje się spadek temperatury o ok. 5,5°C. Można zatem przyjąć hipotezę, że Ge utrudnia krystalizację PCL, prowadząc do zmniejszenia rozmiarów kryształów i/lub ich doskonałości.



Rysunek 76. Temperatury topnienia kryształów PCL we włóknach PCL, PG4:1, PG1:1 przedzianych na płytę oraz folii PCL (c), przy różnych napięciach

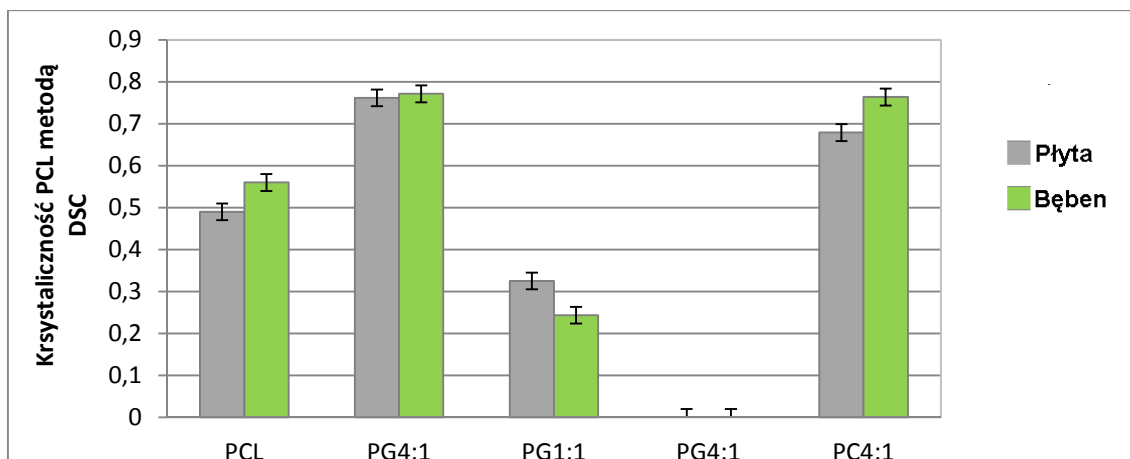
Temperatura topnienia kryształów PCL we włóknach jest nieco niższa niż temperatura w foliach odlanych z roztworów (Rysunek 76). Świadczy to o mniejszej doskonałości kryształów- czas krystalizacji PCL był krótszy podczas formowania włókien metodą elektroprzędzenia z powodu szybkiego odparowania rozpuszczalnika.

Zmiana krystaliczności PCL w funkcji przykładanego napięcia we włóknach PCL, PG4:1, PG1:1 jest nieznaczna i mieści się w granicy odchylenia standardowego (Rysunek 77).



Rysunek 77. Krystaliczność metodą DSC włókien PCL, PG4:1, PG1:1 przy różnych napięciach przedzionych na płytę oraz folii PCL (c)

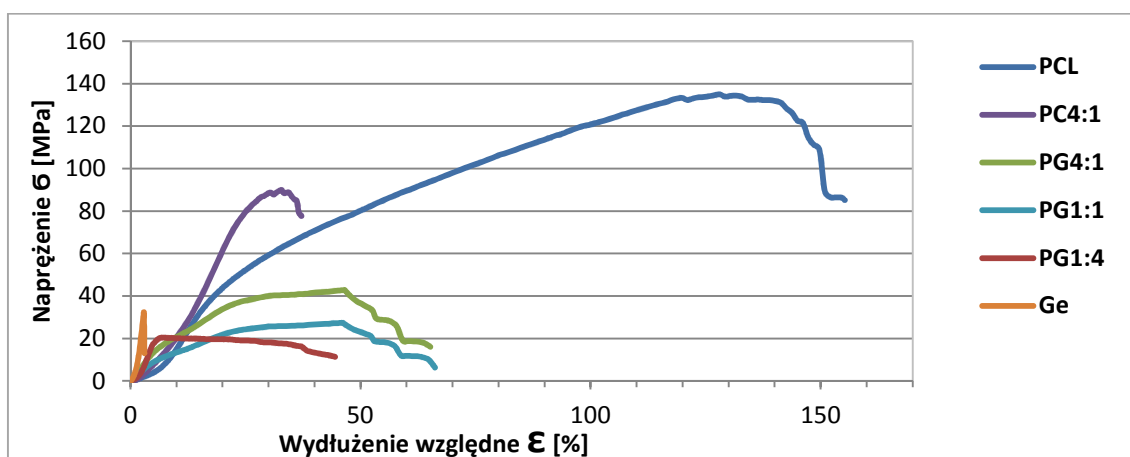
Krystaliczność włókien przedzionych na płytę oraz na bęben, wyznaczona z krzywych DSC została zilustrowana na Rysunku 78. DSC potwierdza większą krystaliczność PCL we włóknach przedzionych na bęben niż na płytę, oszacowaną także z analizy WAXS. Badania DSC potwierdzają wzrost krystaliczności dla włókien z małą ilością dodatku biopolimeru (PG4:1, PC4:1) oraz spadek krystaliczności dla PG1:1. Badania DSC nie pozwalają jednak na wyszczególnienie piku krystalizacji PCL we włóknach PG1:4. Z danych WAXS wiadomo, że PCL w tych włóknach krystalizuje na poziomie ok. 5%. Stopień krystaliczności zmierzony metodą DSC jest nieco wyższy niż wyznaczony z profili radialnych WAXS, jednakże oba pomiary potwierdzają trend zmian krystaliczności PCL we włóknach wraz z ilością biopolimeru. Wyjątek stanowią włókna PG4:1 przedzione na bęben. Wyznaczony stopień krystaliczności tych włókien jest znacznie wyższy niż oszacowany z profili radialnych WAXS. Wpływ na to może mieć sama specyfika pomiaru, tzn. w przypadku WAXS mierzony jest stopień krystaliczności w temperaturze pokojowej. Natomiast podczas ogrzewania próbki (metoda DSC), mogło dojść do dokrystalizowania PCL. Można postawić zatem hipotezę większej wydajności tego mechanizmu w przypadku włókien o wyższej orientacji molekularnej (przedzionych na bęben), niż włókien o braku lub nieznacznej orientacji (przedzione na płytę, z dużą ilością Ge).



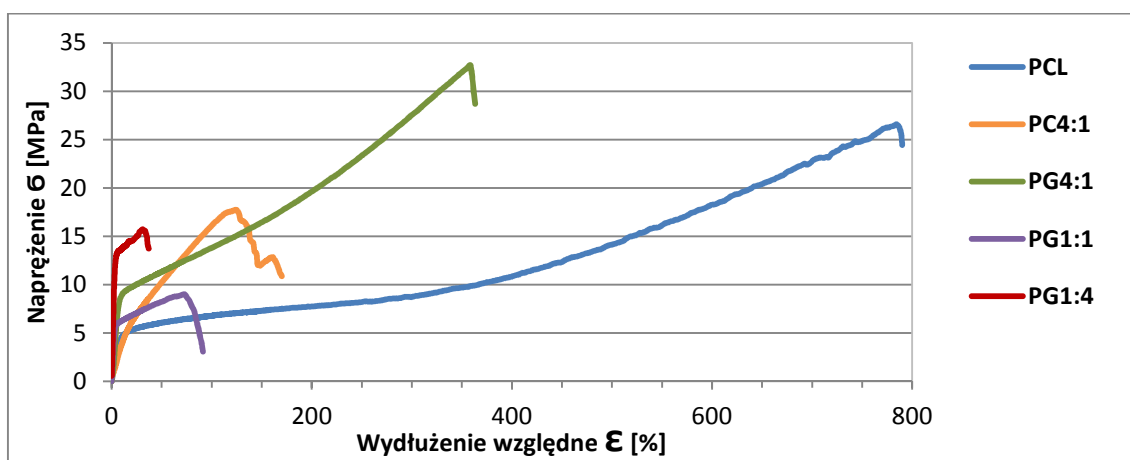
Rysunek 78. Kryształiczność PCL wyznaczona metodą DSC dla włókien PCL, PG4:1, PG1:1, PC4:1 przędzonych na płytę oraz na bęben

4.4.2.6. Właściwości mechaniczne

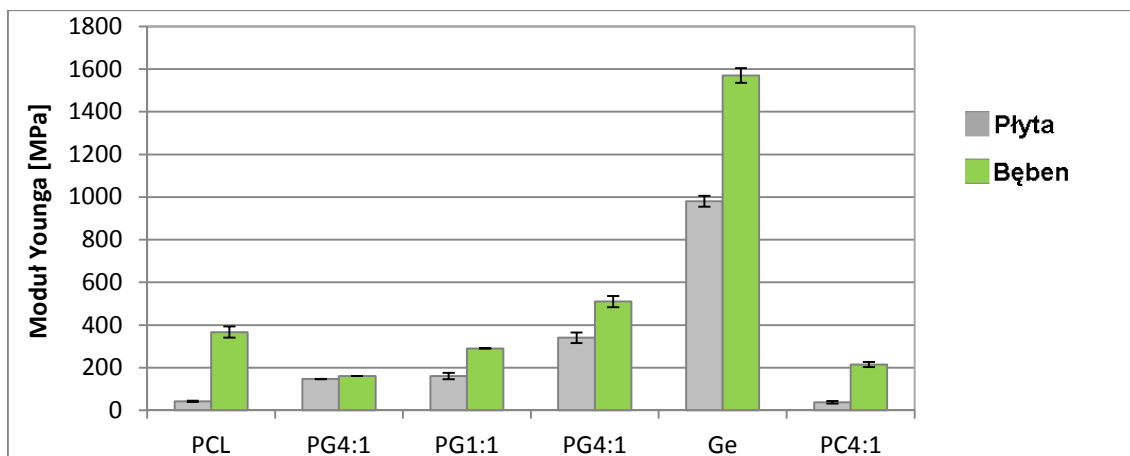
Rysunki 79 i 80 przedstawiają krzywe rozciągania w statycznej próbie rozciągania włókien przędzonych na bęben oraz na płytę.



Rysunek 79. Napężenie σ w funkcji wydłużenia względnego ϵ dla włókien przędzonych na bęben



Rysunek 80. Napężenie σ w funkcji wydłużenia względnego ϵ dla włókien przędzonych na płytę



Rysunek 81. Moduł Younga dla włókien przędzonych na bęben oraz na płytę z roztworów PCL, PG4:1, PG1:1, PC4:1, Ge

Ze względu na aplikację w inżynierii tkankowej rozważany jest wyłącznie moduł Younga wytwarzanych włókien. Z literatury wiadomo, że na sztywność włókien wpływ mają orientacja molekularna, stopień krystaliczności, a w przypadku materiałów dwuskładnikowych również sztywność makrocząsteczek obu substratów.

Wraz z dodatkiem Ge w porównaniu z czystym PCL, dla włókien zbieranych na płytę, nie wykazujących orientacji molekularnej, obserwuje się nawet 3-4 krotny wzrost sztywności. Wynika to z addytywności modułów Younga obu składników (Ge- wysoki moduł Younga). Natomiast włókniyny dwuskładnikowe PG4:1, PG1:1, PC4:1 zbierane na bęben wykazują niższą sztywność niż włókniyna PCL. Jest to związane ze zmniejszaniem się wraz z dodatkiem biopolimeru orientacji molekularnej oraz stopnia krystaliczności PCL we włóknach. Takie zmiany w strukturze nadmolekularnej są bezpośrednią przyczyną spadku modułu Younga.

Trudno dyskutować relatywnie niski moduł Younga włókien PC4:1 przędzonych na płytę. Można jednak wnioskować, że wynika on z niskiego modułu Younga czystego Col, na co wskazują dane literaturowe [¹⁶³].

4.4.2.7. Badania biologiczne na komórkach 3T3 oraz MSC

Przeprowadzono hodowle 3T3 oraz MSC na włókninach dwuskładnikowych: PG4:1, PG1:1, PC4:1 przędzonych na płytę oraz na bęben, w odniesieniu do włókien czystego PCL. Po 3 dniach hodowli korzystając z procedury barwienia immunohistochemicznego oceniono kształt, wielkość, rozmieszczenie komórek oraz sprawdzono cytotoksyczność.

(Włókniyny PG1:4 oraz Ge zostały wykluczone ze względu na utratę struktury 3D w warunkach długoterminowej hodowli komórek metodą in-vitro).

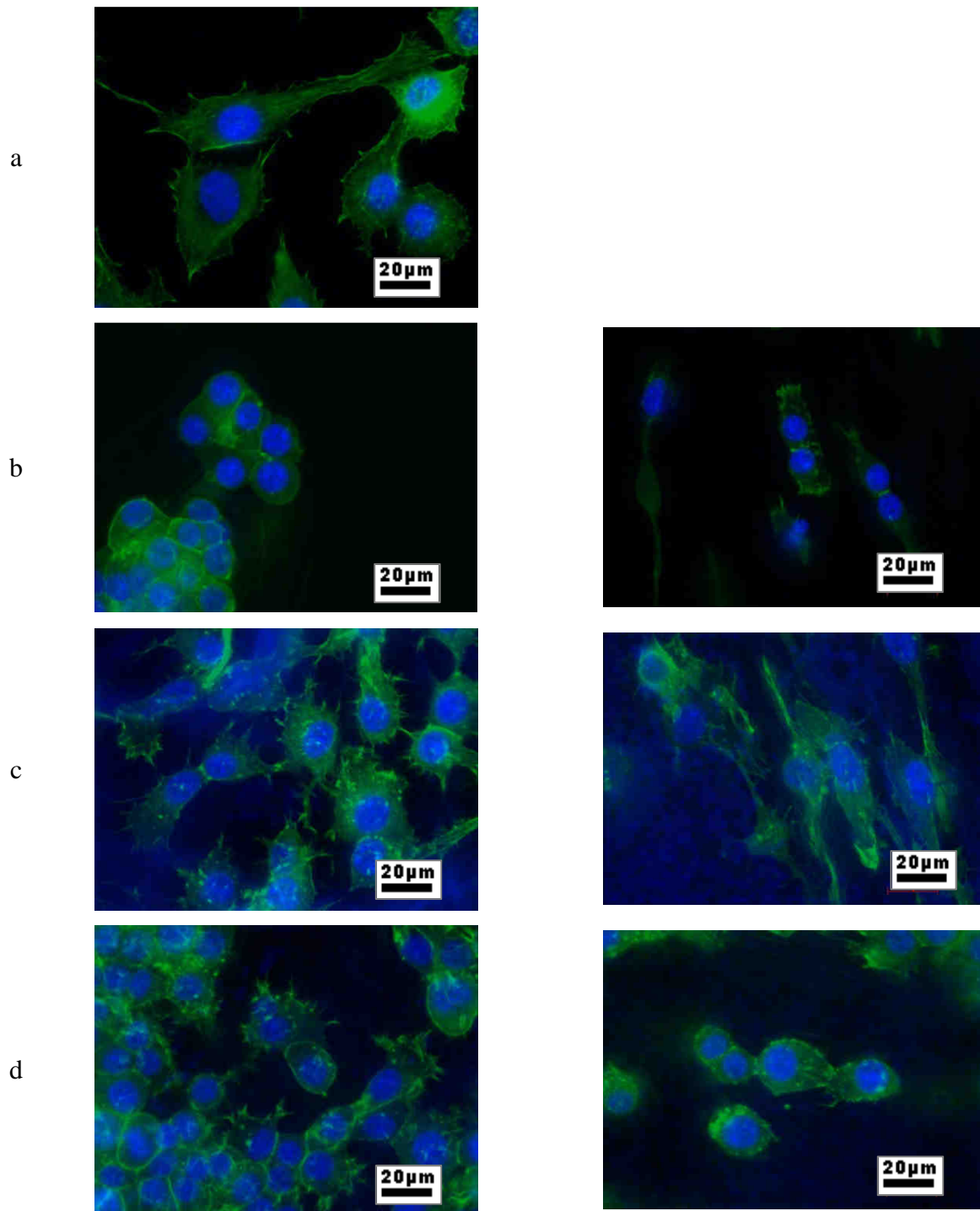
Rysunki 82 i 83 przedstawiają morfologię komórek 3T3 po 3 dniach hodowli zarejestrowaną z użyciem FM. Komórki wysiane na płytce kontrolnej TCP wykazują

właściwą sobie budowę-rozpłaszczają się prawidłowo na podłożu, nie są zainfekowane, szkielet komórkowy składa się z charakterystycznych włókien aktywnych oraz cytoplazmatycznych wypustek- filopodiów odpowiedzialnych za migrację (Rysunek 82 a). Komórki 3T3 wysiane na włóknach PCL przybrały kształt kulisty. Charakteryzują się niewielkim rozwinięciem szkieletu aktywnego. Ułożone są w aglomeratach, nierównomiernie na próbce. Natomiast komórki wysiane na podłożach dwuskładnikowych wyróżniają się większym rozwinięciem szkieletu aktywnego, kształtem charakterystycznym dla tego rodzaju komórek. Można również zauważyć, że wytworzyły liczne filopodia odpowiedzialne za migrację (Rysunek 82 c-d) dzięki, czemu są równomiernie rozmieszczone na powierzchni próbki (Rysunek 83 c-d).

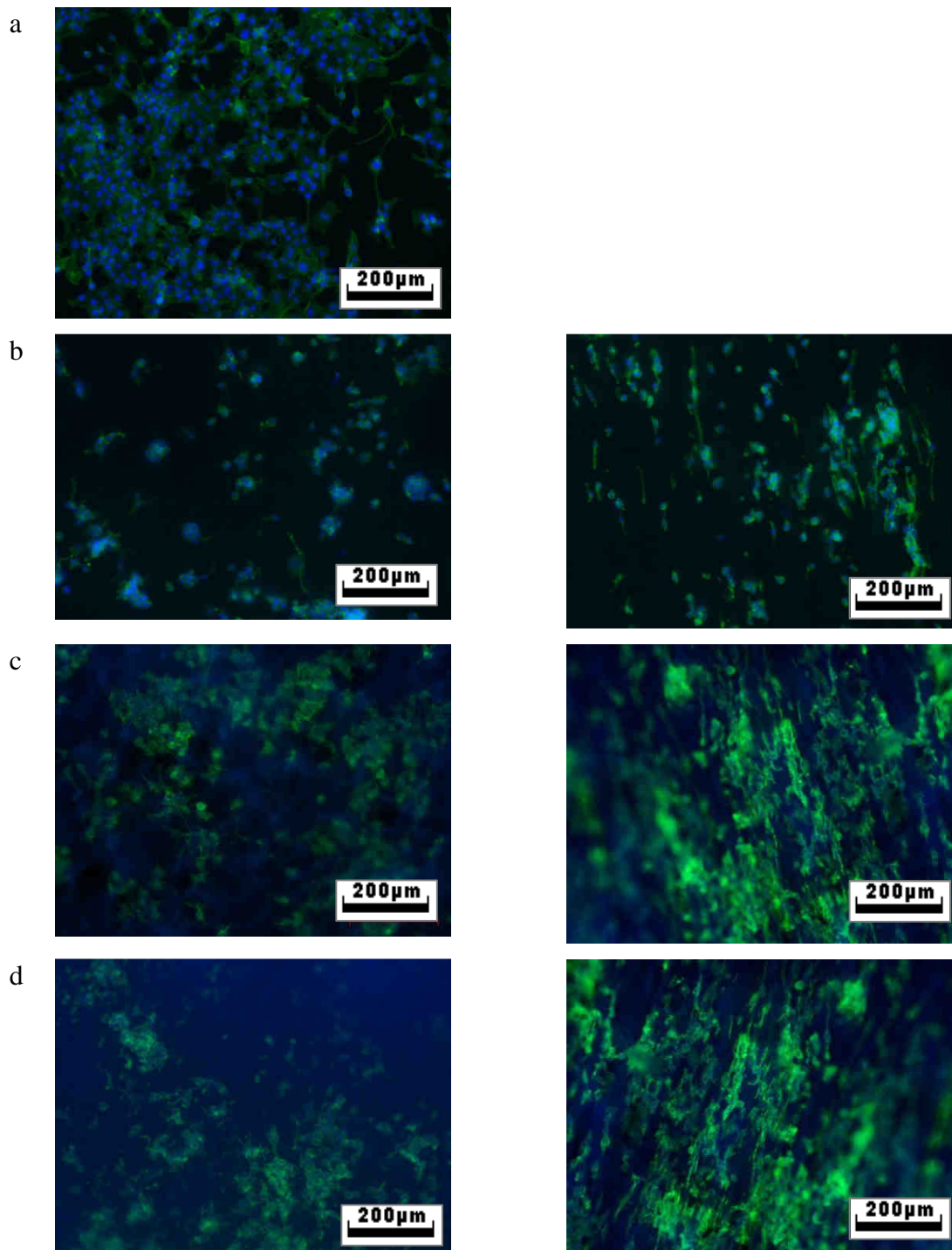
3T3 hodowane na włókninach dwuskładnikowych zbieranych na obracający bęben charakteryzują się znacznie bardziej wydłużonym- wrzecionowatym szkieletem aktywnym (Rysunek 82 prawa kolumna) niż na włóknach zbieranych na płytę (Rysunek 82 lewa kolumna). Szkielet aktywny wyciągnięty jest zgodnie z kierunkiem ułożenia włókien (a tym samym kierunkiem rotacji bębna). Wszystkie wytworzone podłoża są niecytotoksyczne, a duże rozwinięcie szkieletu aktywnego na włókninach dwuskładnikowych jest dowodem dobrej adhezji komórek do podłoża oraz gotowości do migracji i proliferacji.

Komórki charakteryzowały się dobrą adhezją do podłoża, wytworzyły wiele punktów adhezji (FA). Ze względu jednak na stosunkowo niewielki rozmiar komórek, związane z FA winkuliny są słabo widoczne. Załączono więc tylko kilka poglądowych zdjęć (Rysunek 84 prawa kolumna).

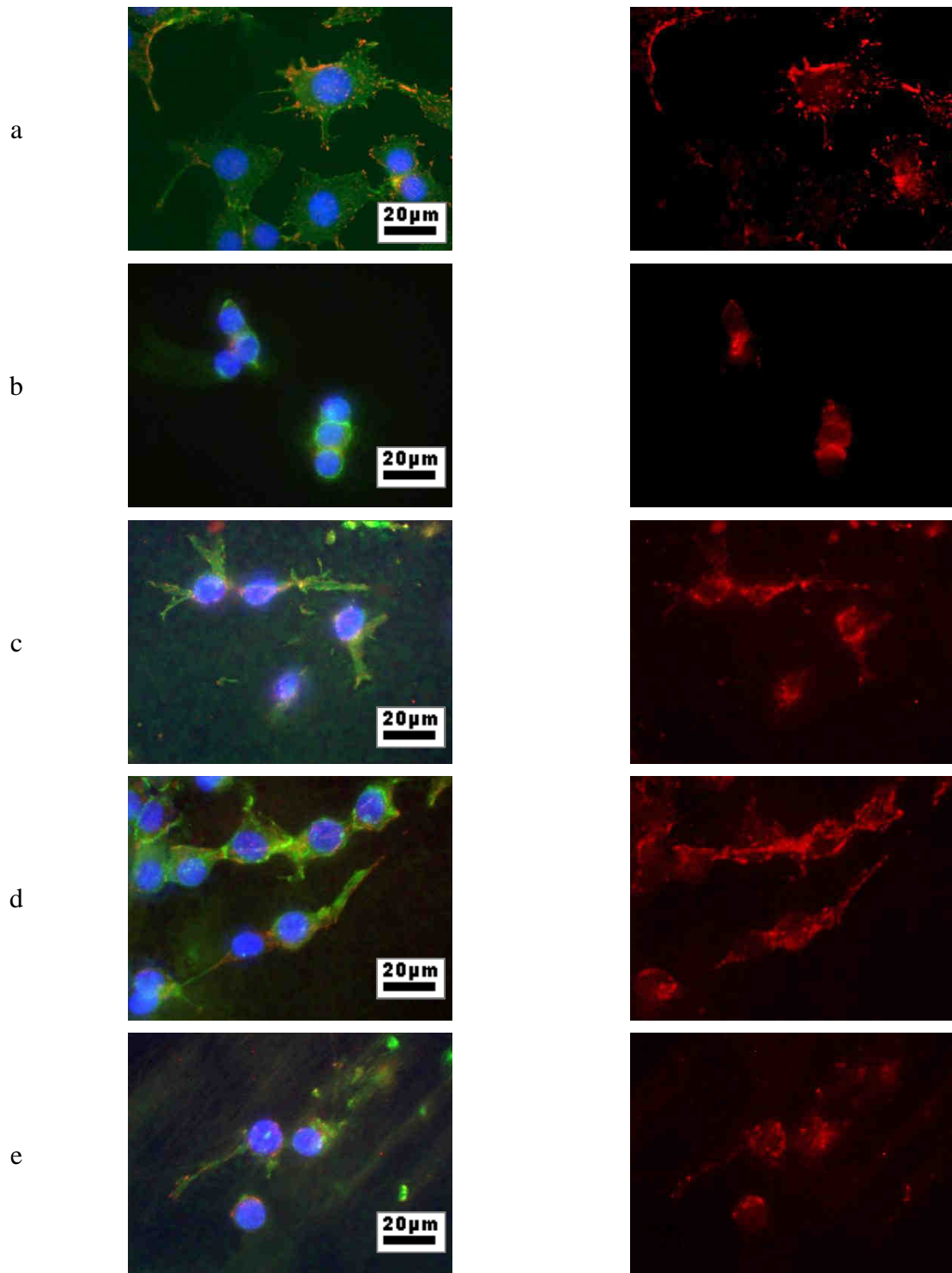
Po 7 dniach hodowli komórki 3T3 (Rysunek 85) pokryły niemal całą powierzchnię włóknin; można zauważyć niezainfekowane, prawidłowo proliferujące komórki. Na włókninach jednoskładnikowych PCL komórki pozostały w aglomeratach, natomiast na włókninach dwuskładnikowych wytworzyły liczne filopodia i rozprzestrzeniły się na całej włókninie.



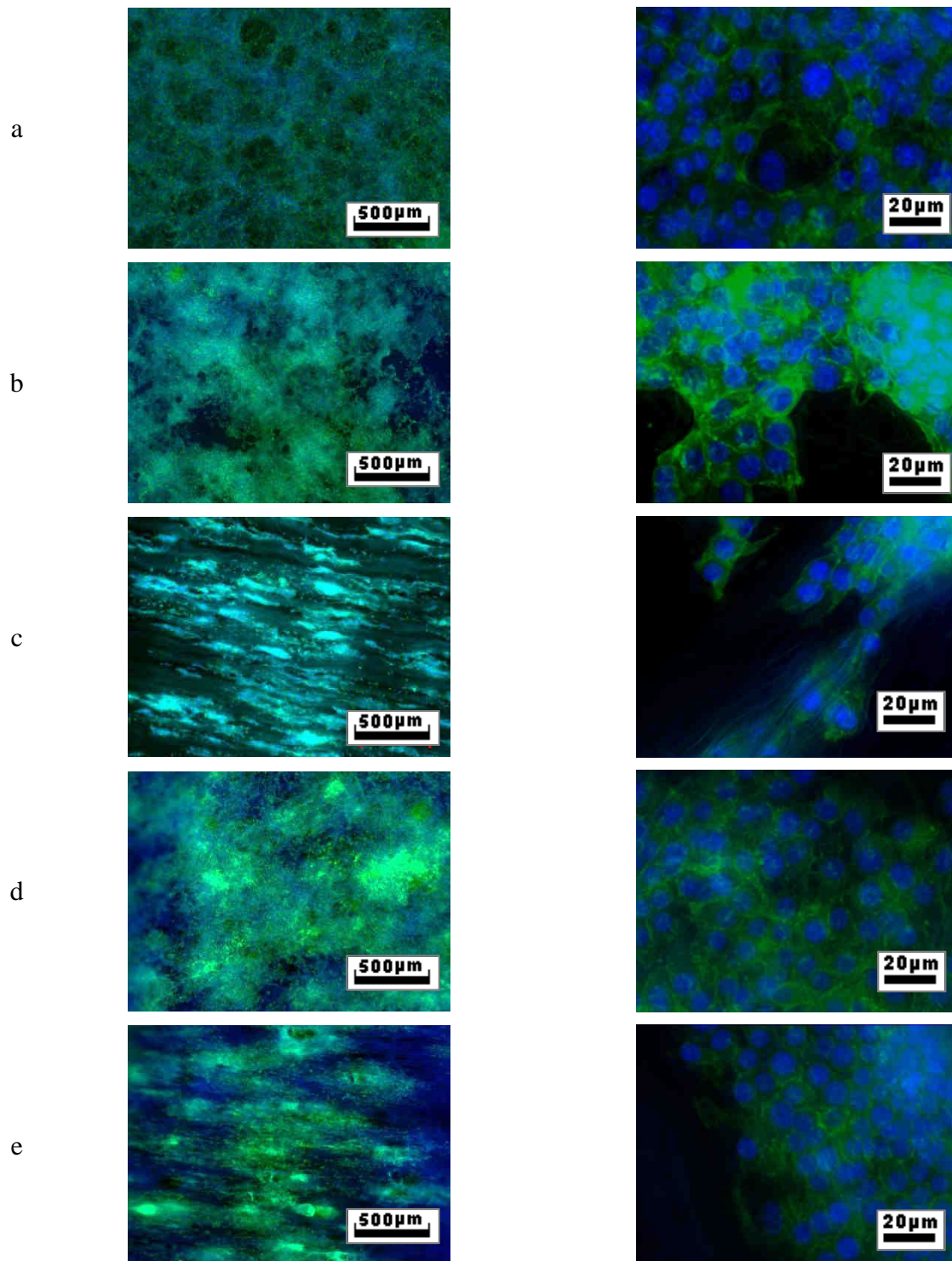
Rysunek 82. Morfologia komórek 3T3 po 3 dniach hodowli na a) TCP oraz włókninach b) PCL c) PG4:1 P, d) PG1:1, e) PC4:1 przędzonych na płytę (lewa kolumna) oraz przędzonych na bęben (prawa kolumna)



Rysunek 83. Morfologia komórek 3T3 po 3 dniach hodowli na a) TCP oraz włókninach b) PCL c) PG 4:1 d) PG1:1 przędzonych na płytę (lewa kolumna) oraz przędzonych na bęben (prawa kolumna)

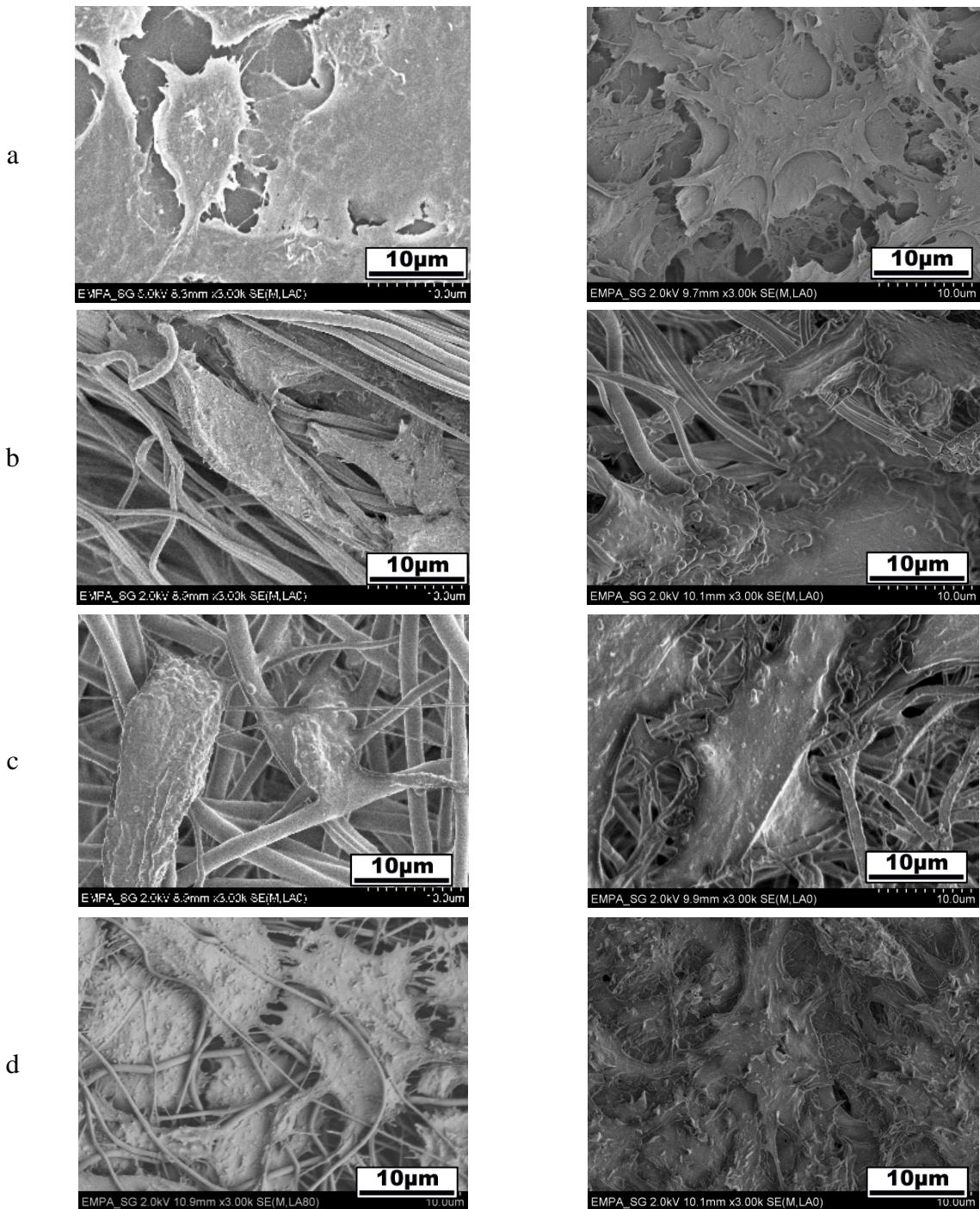


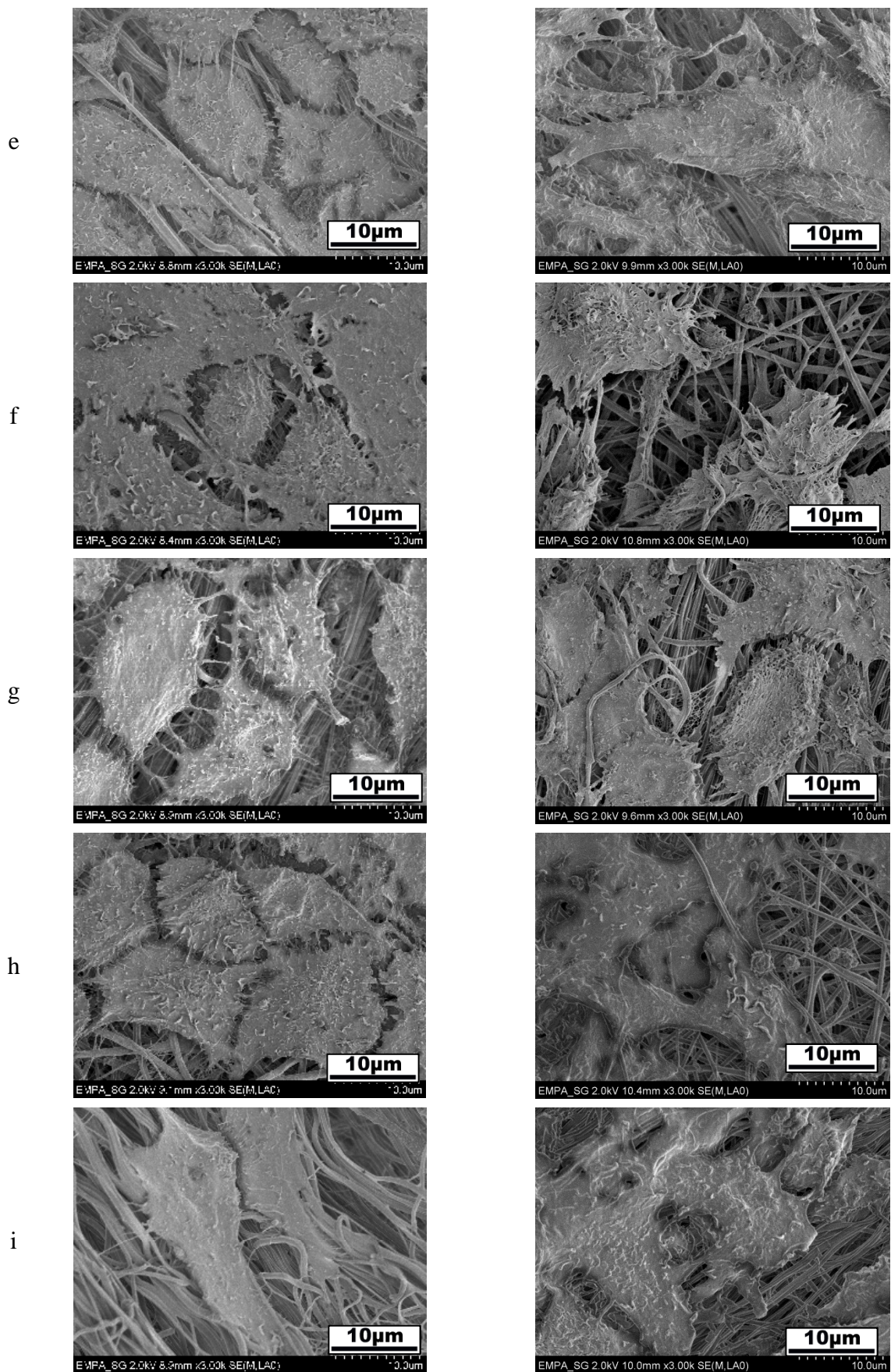
Rysunek 84. Morfologia komórek 3T3 po 4 dniach hodowli na a) TCP oraz włókninach b) PCLH P, c) PG 4:1 P, d) PG1:1 P, e) PC4:1 P (winkuliny kolumna prawa)



Rysunek 85. Morfologia komórek 3T3 po 7 dniach hodowli na a) TCP oraz włókninach b) PCLH P, c) PCLH B, d) PG 4:1 P e) PG4:1B

Mikroskopia SEM komórek 3T3 po 3 dniach hodowli (Rysunek 86) pozwala na trójwymiarową wizualizację komórek. Zdjęcia potwierdzają dobrą adhezję fibroblastów do włókien. Na niektórych zdjęciach uchwycono chęć migracji komórek w głąb włókniny (Rysunek 86 c,d), szczególnie dobrze widoczny jest ten efekt po 11 dniach hodowli (Rysunek 86 kolumna prawa). Można jednak zauważyć, że wielkość porów nie zawsze jest wystarczająca by relatywnie duże komórki mogły swobodnie migrować.





Rysunek 86. Morfologia komórek 3T3 na a) TCP oraz włókninach b) PCL P, c) PCL B, d) PG4:1 P, e) PG4:1B, f) PG1:1 P, g) PG1:1 B, h) PC4:1 P, i) PC4:1B. (po 7 dniach- kolumna lewa, po 11 dniach- kolumna prawa)

Porównawczo na płytkę kontrolną oraz na włókniny wysiano zdrowe, niezainfekowane, prawidłowo proliferujące i migrujące ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste MSC. Na Rysunku 87a dla komórek MSC wysianych kontrolnie na TCP można wyszczególnić (analogicznie jak dla komórek 3T3) jądro komórkowe oraz rozplaszczony szkielet aktywny z licznymi filopodiami.

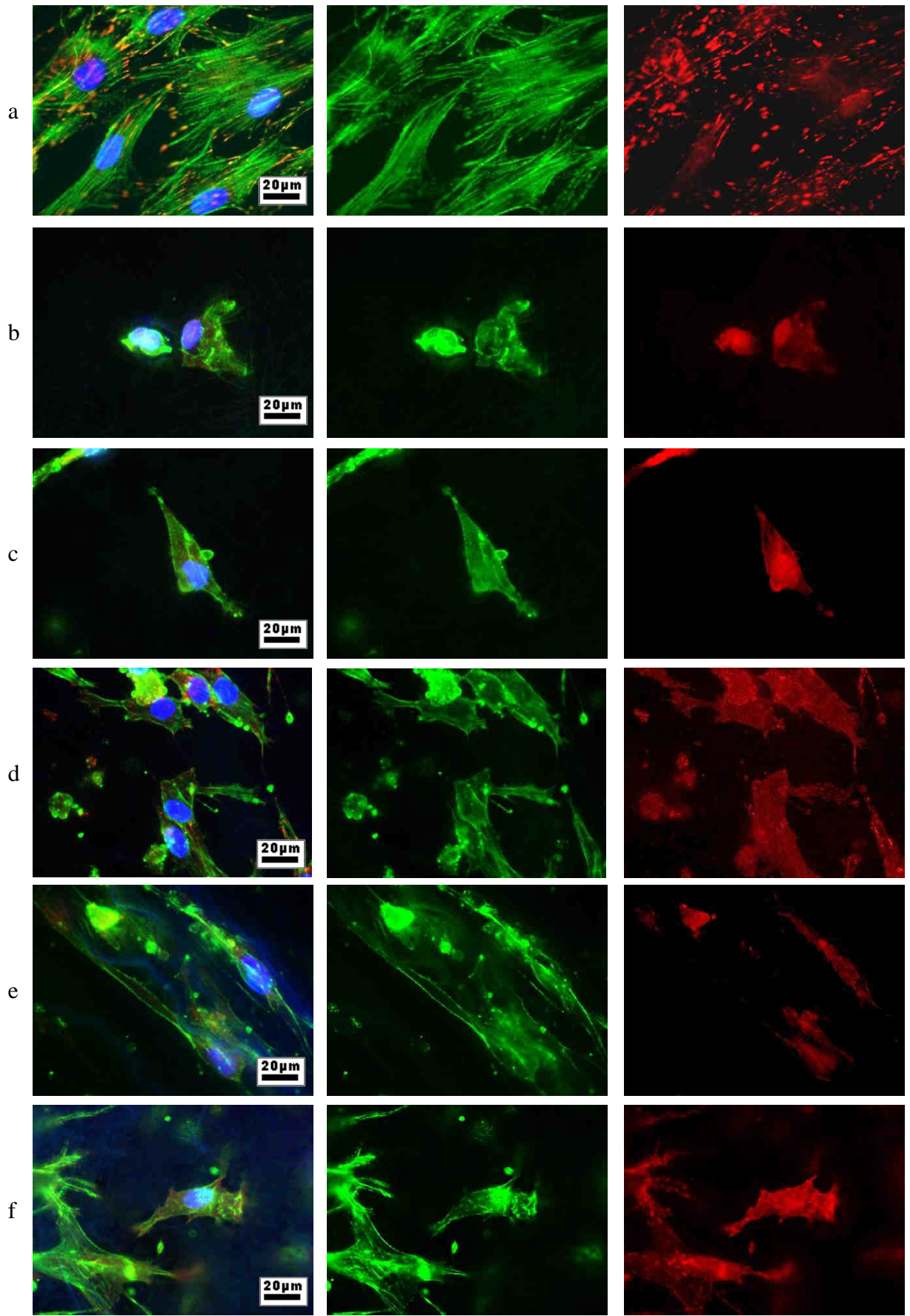
Obrazy FM (Rysunki 87 i 88) przedstawiają komórki MSC po 3 dniach hodowli na włókninach PG4:1. PG1:1 PC4:1 przedzionych na płytę oraz na bęben, w odniesieniu do włókniń czystego PCL. Podłoża te są niecytotoksyczne dla komórek MSC, szkielet aktywny jest nieco lepiej rozwinięty niż komórek 3T3.

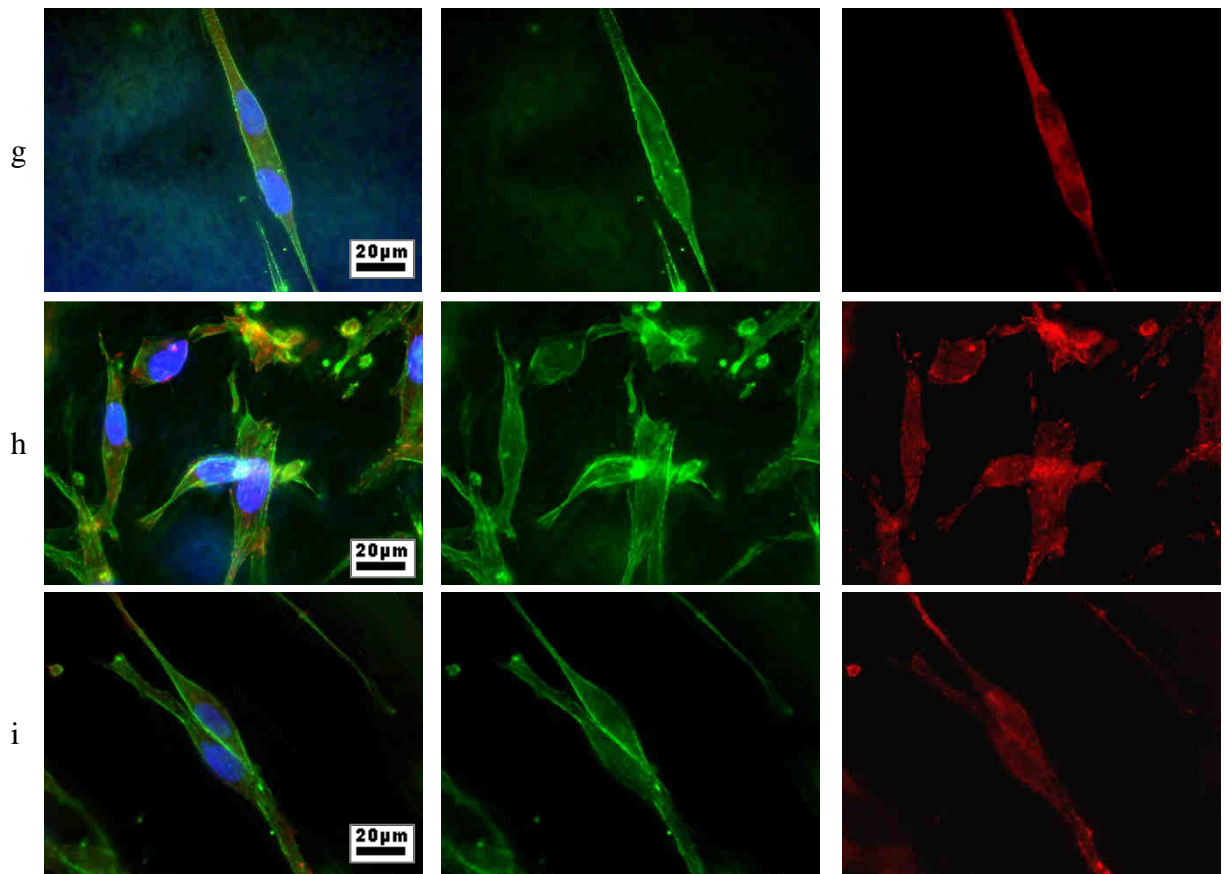
Komórki MSC dodatkowo barwiono immunohistochemicznie po 4 dniach by zobrazować punkty adhezji- winkuliny (czerwony marker na zdjęciach) (Rysunek 87 trzecia kolumna) Na wszystkich dwuskładnikowych podłożach można zauważyć wiele punktów adhezji. Duża ilość winkulin znajdująca się na powierzchni komórek, wysianych na podłożach dwuskładnikowych, związana jest najprawdopodobniej z sekwencjami RGD obecnymi w biopolimerach, co jest opisywane w literaturze [¹⁶²]. Ilościowe określenie stopnia adhezji (winkulin) na drodze analizy obrazu nie jest możliwe ze względu na trójwymiarowość podłoża jak i samych komórek.

Dodatkowo na zdjęciach z FM przy dużym powiększeniu można zauważyć włókna aktywny (ang. stress fibres) świadczące o dobrej komunikacji wewnątrz komórki (szczególnie dobrze widoczne na Rysunku 87 c,d,f,h- kolumna II). Filopodia świadczące o migracji MSC są bardziej wykształcone na włóknach dwuskładnikowych niż na jednoskładnikowych. Rozplaszczenie komórek na podłożach dwuskładnikowych wzrasta najprawdopodobniej ze względu na hydrofilowość włókniń. Dobra adhezja i rozplaszczenie wskazuje na aktywność metaboliczną komórek oraz gotowość do kolejnych podziałów.

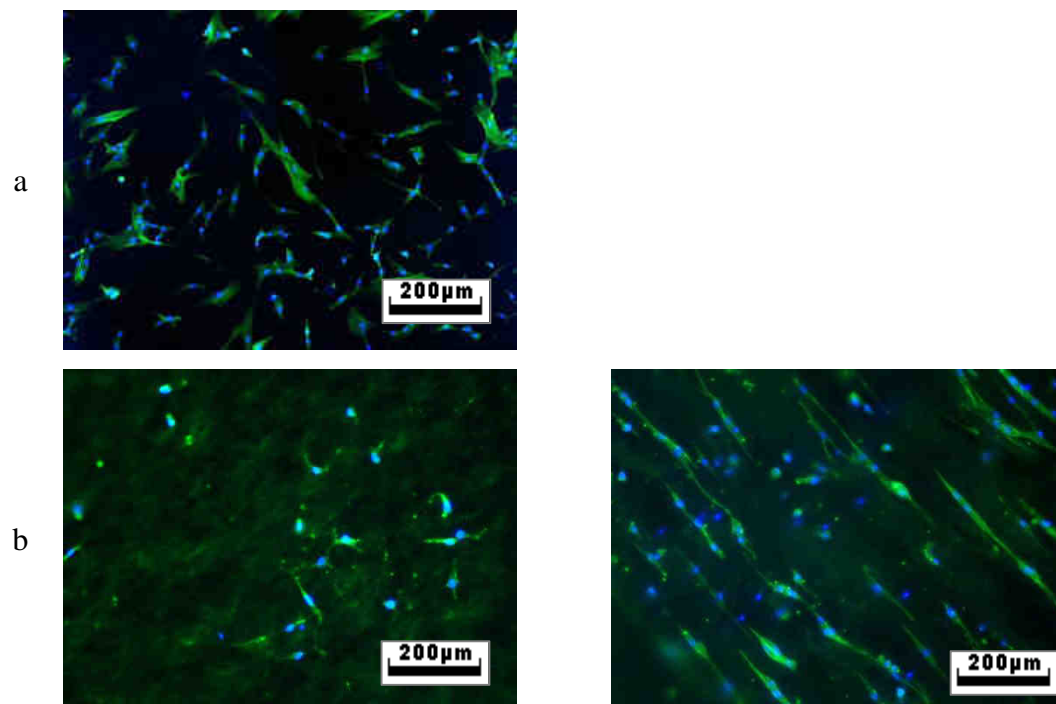
MSC wysiane na włókninach zbieranych na bęben, ułożone są zgodnie z kierunkiem ułożenia włókien (komórki przybrały kształt wrzecionowaty), co związane jest ze zjawiskiem CG odnoszącym się do odczytywania przez komórki sygnałów z topografii podłoża.

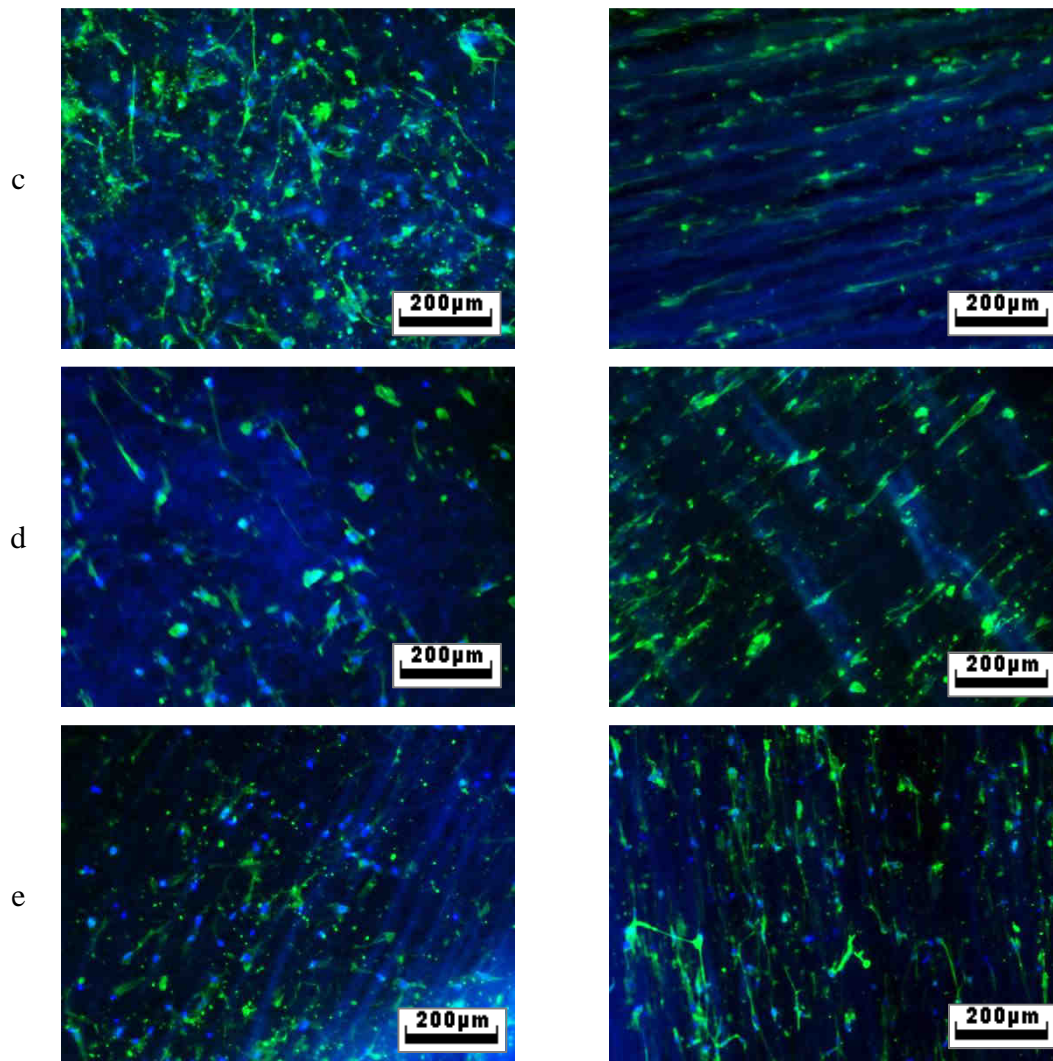
Przy mniejszych powiększeniach można zauważyć, że komórki MSC są rozmieszczone bardziej równomiernie niż wcześniej analizowane komórki 3T3 (Rysunek 88).





Rysunek 87. Morfologia komórek MSC po 3 dniach hodowli na a) TCP oraz włókninach b) PCL P, c)PCL B, d) PG4:1 P, e) PG4:1B, f) PG1:1 P, g) PG1:1 B, h) PC4:1 P, i) PC4:1 B (kolumna I-cała komórka, II-szkielet aktynowy, III- winkuliny)

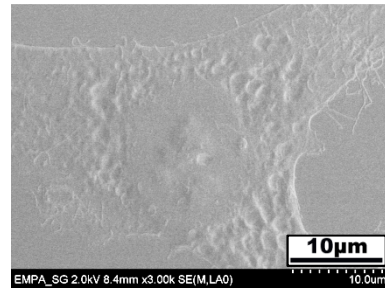
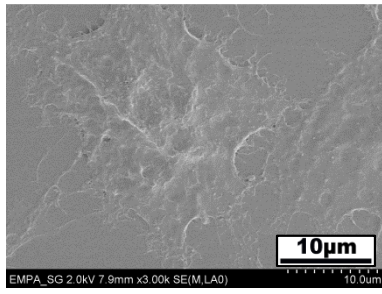




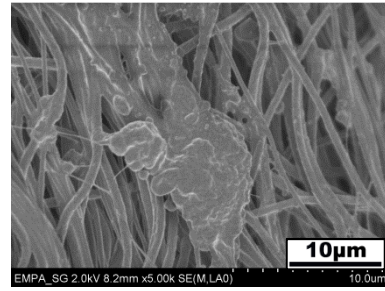
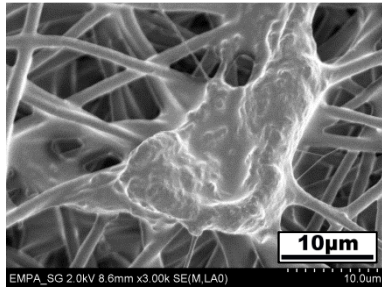
Rysunek 88. Morfologia komórek MSC po 3 dniach hodowli na a) TCP oraz włókninach b) PG4:1 P, c) PG1:1, d) PC4:1 przedzionych na płytę (lewa kolumna) oraz przedzionych na bęben (prawa kolumna)

Trójwymiarowe obrazy pojedynczych komórek MSC po 7 dniach hodowli przedstawiono na Rysunku 89. Na zdjęciach włóknin dwuskładnikowych można zauważyć dobre rozplaszczenie i migrację komórek w głąb włóknin. Wrzecionowaty kształt komórek związany z CG widoczny jest wyraźnie na włókninach zbieranych na bęben (Rysunek 89 lewa kolumna). Po 12 dniach hodowli na włókninach dwuskładnikowych pokrycie powierzchni włóknin komórkami było niemal całkowite (zdjęć w pracy nie zamieszczono).

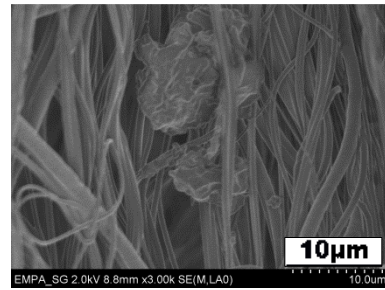
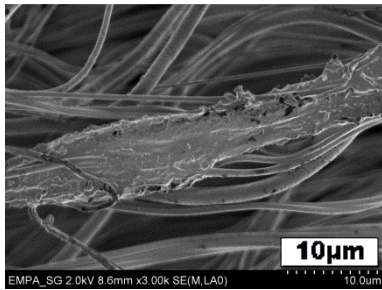
a



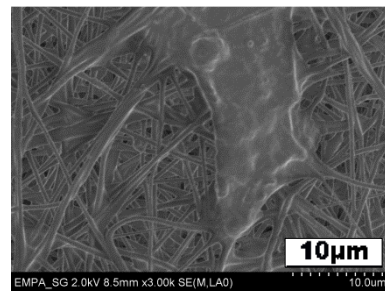
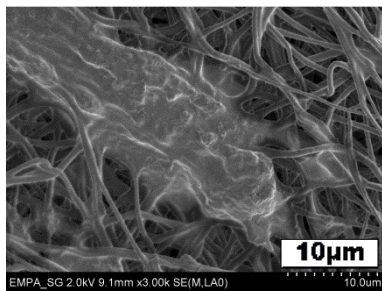
b



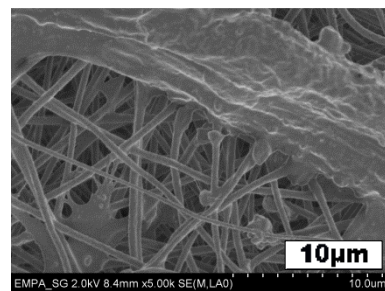
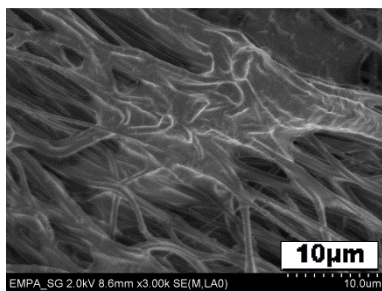
c



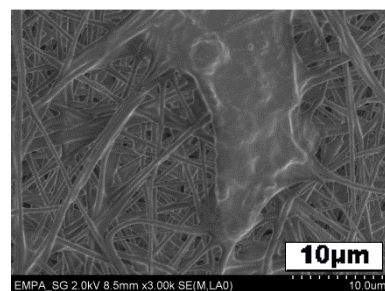
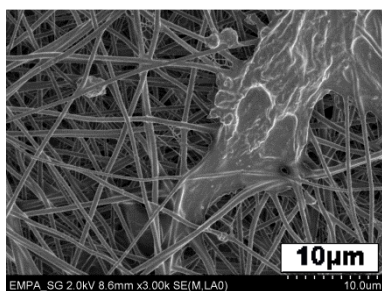
d



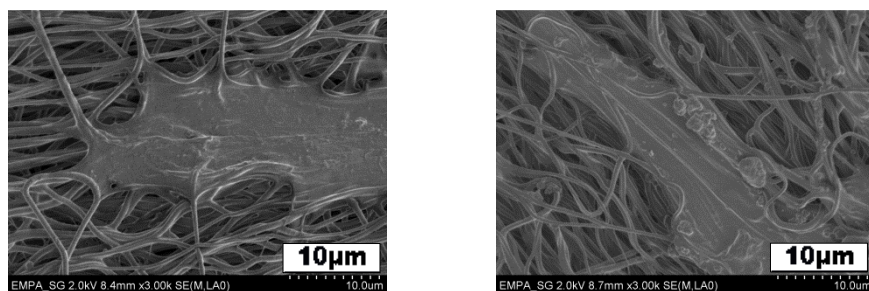
e



f



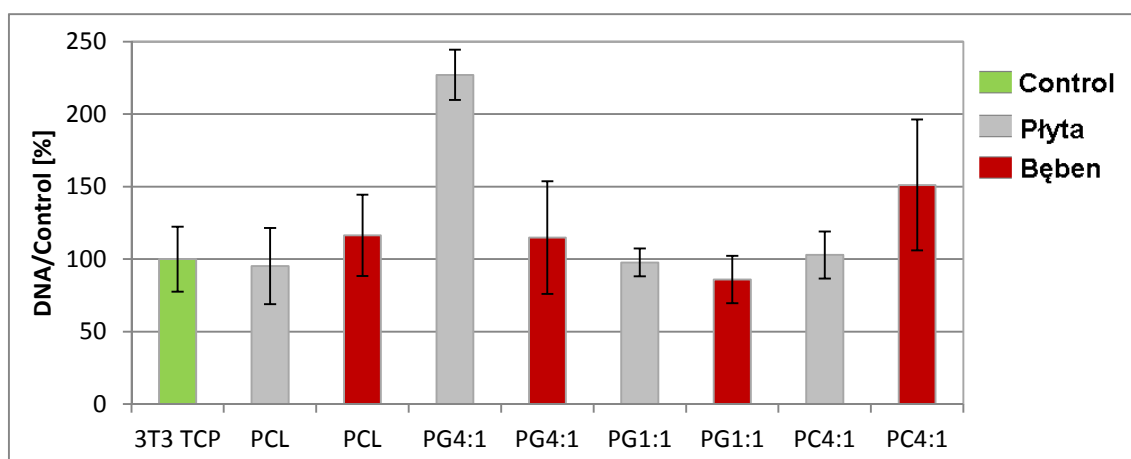
g



Rysunek 89. Morfologia komórek MSC w trakcie hodowli na a) TCP oraz włókninach b) PCL P, c) PCL B, d) PG4:1 P, e) PG4:1B, f) PG1:1 P, g) PG1:1 B, h) PC4:1 P, i) PC4:1B

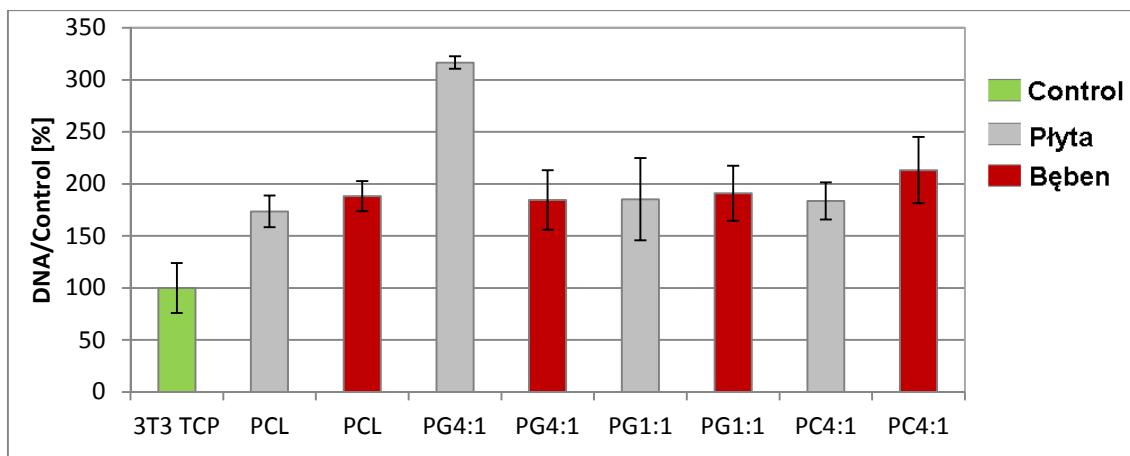
Test DNA pozwala na określenie stopnia proliferacji komórek odnosząc się do ilości DNA znajdującego się w jądrach komórkowych. Określono stopień proliferacji względem próbki kontrolnej TCP komórek 3T3 oraz MSC wysianych na włókninach PCL, PG4:1, PG1:1, PC4:1, przedzionych na bęben oraz płytę.

Po 7 dniach hodowli odnotowano wyższy stopień proliferacji na 3D włókninach niż na płytkach TCP. Wzrost stopnia proliferacji na włókninach PG4:1 zbieranych na płytę jest ponad 2-krotny. Duży stopień proliferacji odnotowano także na włókninach PC4:1 P. Dodatek biopolimeru w ilości 20% jest efektywnym sposobem podniesienia stopnia proliferacji komórek. Włókniny te charakteryzują się relatywnie dużym udziałem atomów azotu N na powierzchni włókien (badania XPS), świadczącym o dużym udziale żelatyny na powierzchni oraz wysokim stopniem krystaliczności (badania WAXS i DSC). Włókniny PG1:1 nie są tak funkcjonalne dla komórek, na co wpływ może mieć mały udział atomów azotu N na powierzchni włókien, a tym samym mała ilość grup RGD w porównaniu z PG4:1 oraz niska krystaliczność PCL.



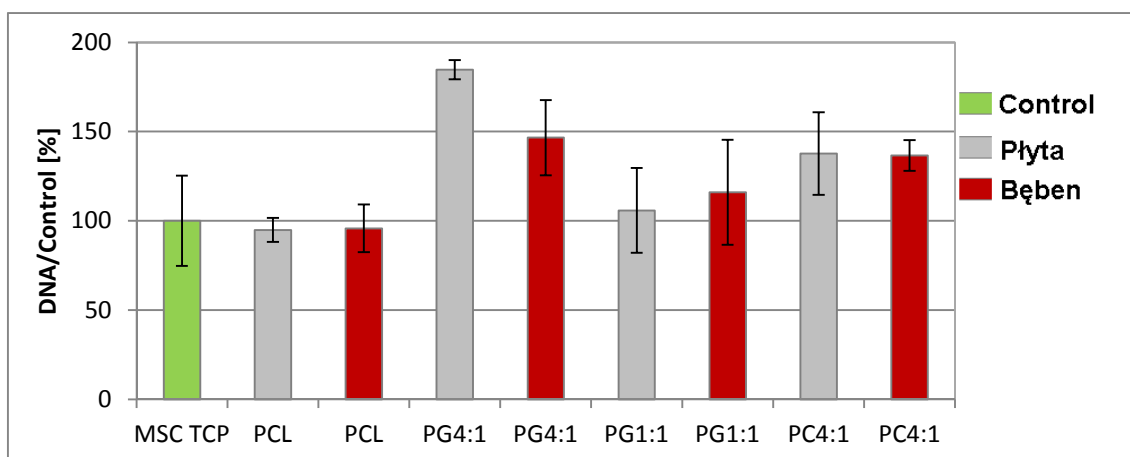
Rysunek 90. Test DNA po 7 dniach hodowli

Po 12 dniach hodowli włókniny PG4:1 oraz PC4:1 nadal znacznie się wyróżniają (Rysunek 91). Natomiast stopień proliferacji komórek wysianych na PCL jest zbliżony do stopnia proliferacji na pozostałych włókninach.



Rysunek 91. Test DNA po 12 dniach hodowli komórek 3T3

Ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste MSC na włókninach dwuskładnikowych po 7 dniach wykazują większą aktywność niż komórki 3T3 (Rysunek 92). Jedynie na włókninach jednoskładnikowych PCL stopień proliferacji jest niższy niż na kontrolnej TCP.



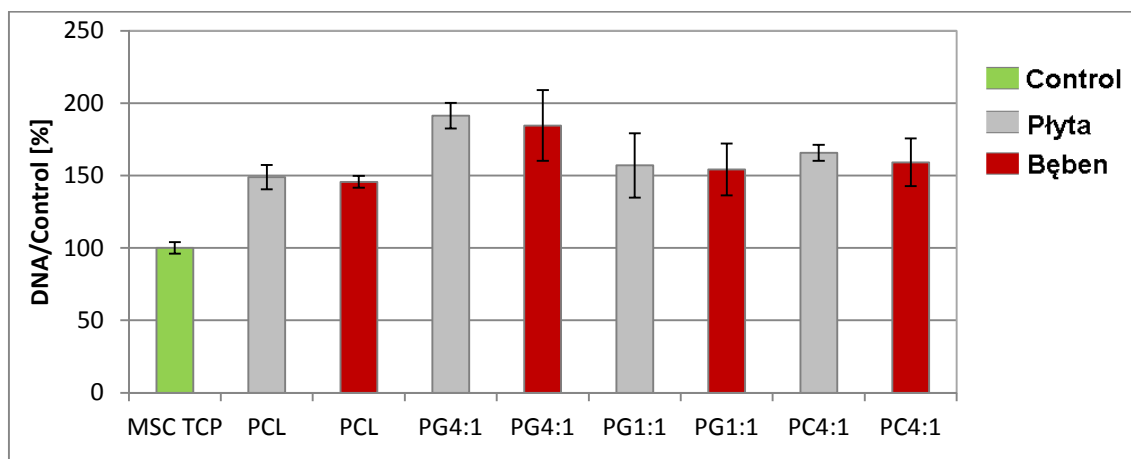
Rysunek 92. Test DNA po 7 dniach hodowli komórek MSC

Po 12 dniach wszystkie wytworzone podłoża są bardziej efektywne niż TCP (Rysunek 93). Może być to związane z migracją komórek w głąb włókniny. Włóknina PG4:1 zbierana na płytę pozostaje najbardziej efektywnym podłożem podnoszenia stopnia proliferacji w warunkach in-vitro, jednakże przewaga nad innymi próbkami nie jest tak duża jak w przypadku komórek 3T3. Na wszystkich podłożach dwuskładnikowych stopień proliferacji jest wyższy niż na próbce kontrolnej oraz włókninach jednoskładnikowych PCL.

Relatywnie wysoki stopień proliferacji komórek MSC, jak również 3T3, po 12 dniach hodowli na włókninach PCL może wynikać z różnic w porowatości. Średnia wielkość porów włóknin jednoskładnikowych to odpowiednio 9,5, 5,2 μ m dla PCL zbieranych na płytę, PCL

zbieranych na bęben; podczas gdy średnia wielkość porów włókien dwuskładnikowych (ze względu na najmniejszą średnicę włókien) zawiera się pomiędzy 2.5-3.8µm.

Prawdopodobnie wzrost funkcjonalność podłoży dwuskładnikowych następować może podczas samego namnażania komórek w warunkach in-vitro/in vivo, na skutek szybszej degradacji/bioresorpcji biopolimeru, a tym samym wzrostu porowatości. W przypadku włókien o dużej krystaliczności np. PG4:1 P szybkość biodegradacji jest znacznie mniejsza niż w przypadku włókien z dużym udziałem fazy amorficznej.



Rysunek 93. Test DNA po 12 dniach hodowli komórek MSC

4.4.2.8. Podsumowanie wyników badań włókien dwuskładnikowych

Ocena wpływu parametrów elektroprądzenia na morfologię i strukturę molekularną i nadmolekularną włókien została przeprowadzona na podstawie włókien PCL/Ge oraz porównawczo PCL/Col. Zgodnie z przeprowadzonymi badaniami można wypunktować następujące wnioski:

- Możliwe jest formowanie jednorodnych, wolnych od koralików włókien z 5 % roztworów PCL/Ge, PCL/Col. Dodatek biopolimeru silnie wpływa na lepkość roztworu oraz przewodność elektryczną, co rzutuje na średnicę włókien. Przy danym stężeniu i dodatku biopolimeru średnica włókien tylko nieznacznie zmienia się wraz z przykładanym podczas przedzienia napięciem.
- Badania FTIR wskazują na interakcję molekularną PCL i biopolimeru we włóknach dwuskładnikowych (modyfikacja kształtu piku pochodzącego od grup karbonylowych C=O).
- Z profili FTIR wynika również, że w kolagenie rozpuszczanym w HFIP następują zmiany struktury, widoczne jako przesunięcie piku od grupy amidowej I. Jednocześnie badania WAXS wykazują, że amorficzne halo od Col (występuje przy tych samych kątach co dla

Ge) i nie są widoczne piki od kryształów Col. Na podstawie tych danych wnioskuje się o degradacji Col w środowisku silnie polarnego HFIP.

- Analiza XPS wskazuje na lokalne maksimum zawartości atomów azotu na powierzchni włókien dwuskładnikowych przy dodatku małej ilości Ge. Może być to wywołane przemieszczaniem grup amidowych Ge ku powierzchni włókien- gdy udział Ge we włóknach jest relatywnie mały, a nawet częściową separacją faz.
- Dodatek biopolimeru prowadzi do całkowitej hydrofilowości włókien, co związane jest najprawdopodobniej z przemieszczaniem ku powierzchni polarnych grup biopolimeru jako skutek oddziaływania niepolarnych aminokwasów biopolimeru z niepolarnym PCL oraz/lub polarnych Ge z grupami polarnymi wody.
- Krystaliczność włókien dwuskładnikowych zależy wyłącznie od udziału i krystaliczności PCL, ponieważ biopolimer we włóknach jest całkowicie amorficzny. Wzrost krystaliczności PCL przy niewielkim udziale Ge jest przypuszczalnie spowodowany oddziaływaniami hydrofobowymi. Natomiast przy większej zawartości Ge uwidacznia się dezorientujący wpływ Ge na krystaliczność PCL.

Na stopień krystaliczności wpływ poza dodatkiem biopolimeru ma również rodzaj zastosowanego kolektora oraz w niewielkim stopniu przyłożone napięcie.

- Orientacja molekularna we włóknach przedzionych na bęben zależy silnie od dodatku biopolimeru- im większy jego udział tym orientacja mniejsza.
- Na wysoki moduł Younga włókien dwuskładnikowych wpływ ma sztywność łańcuchów biopolimeru oraz wysoka krystaliczność PCL (w przypadku małego udziału biopolimeru we włóknach przedzionych na płytę).
- Dodatek biopolimeru znacznie podnosi stopień adhezji, rozplaszczania, rozwinięcia szkieletu aktywnego komórek 3T3 oraz MSC. Najwyższy stopień proliferacji zaobserwowano dla włókien PG4:1 przedzionych na płytę. Włókna te wyróżniają się maksymalnym stopniem krystaliczności (z porównaniem z pozostałymi wytworzonymi włóknami) oraz wysokim stężeniem grup amidowych na powierzchni (sekwencje amidowe RGD odpowiedzialne za adhezję). Włókna PC4:1 wykazują niższy stopień proliferacji komórek niż na włóknach PG4:1 wytworzonych tych samych warunkach.

5. WNIOSKI KOŃCOWE

Metoda elektroprzędzenia daje szerokie możliwości formowania trójwymiarowych, niecytotoksycznych włókien PCL, PCL/Ge, PCL/Col o zróżnicowanej morfologii i strukturze, mogących znaleźć zastosowanie w inżynierii tkankowej.

- Wykonane badania dowodzą, że największy wpływ na morfologię i strukturę molekularną włókien/włókniń, mają parametry związane z roztworem (rodzaj i stężenie polimeru; rodzaj rozpuszczalnika) oraz rodzajem kolektora.
- Przyjmując kryterium braku defektów typu koraliki w morfologii włókien jednoskładnikowych i dwuskładnikowych, wyznaczono zakres formowania włókien z wybranych polimerów i rozpuszczalników. Formowanie włókien z roztworów PCL w zakresie stężeń od 5 do 10% umożliwia formowanie jednoskładnikowych włókien o średniej średnicy od 0,6 do 1,86 μm .
- Pokazano możliwości pomiaru orientacji molekularnej włókien z użyciem WAXS oraz metodą mikroskopii polaryzacyjno-interferencyjnej. Orientacja molekularna we włóknach jest głównie związana ze zbieraniem włókien na bęben, podczas gdy przykładane napięcie odgrywa niewielką rolę.

Wyznaczenie czynnika orientacji molekularnej w pojedynczym włóknie, wytworzonym metodą elektroprzędzenia, jest nieopisane dotychczas w literaturze.

- Wykazano niski stopień adhezji, proliferacji oraz aktywności komórkowej na włóknach jednoskładnikowych PCL; brak znaczącego wpływu parametrów przędzenia, pomimo zmian w morfologii i strukturze. Włókna te wydają się być jedynie dobrą drogą obrony przed powstawaniem tzw. biofilmu (niekontrolowane namnażanie fibroblastów, uniemożliwiające odbudowę tkanki właściwej).
- Średnica włókien dwuskładnikowych przędzonego z 5% roztworu zależy od udziału biododatku, w mniejszym stopniu od przykładanego podczas elektroprzędzenia napięcia.
- Krystaliczność i orientacja molekularna włókien dwuskładnikowych zależy od udziału biopolimeru oraz od sposobu odbierania włókien. Dodatek żelatyny w ilości 20%, w porównaniu z włóknami jednoskładnikowymi, znacznie podwyższa krystaliczność (w przypadku zbierania włókien na płytę) oraz orientację molekularną kryształów PCL (w przypadku zbierania włókien na bęben). Na wysoki stopień orientacji

molekularnej najbardziej znaczący wpływ ma odbiór włókien na bęben, nieznacznie od przykładanego podczas elektroprzędzenia napięcia.

- Dodatek biopolimeru we włóknach dwuskładnikowych zwiększa hydrofilowość, a dzięki sekwencjom RGD w swej strukturze, korzystanie wpływa na adhezję, rozplaszczanie, migrację komórek 3T3 oraz MSC. Wykazano, iż optymalny (20%) udział biopolimeru staje się naturalną „siłą napędową” proliferacji i aktywności komórkowej. Wytworzono próbki trzy krotnie podnoszące stopień proliferacji w porównaniu z próbką kontrolną. Stwierdzono, że bardzo ważną rolę na aktywność komórek na wytworzonych włókninach dwuskładnikowych ma zjawisko hydrofilowości oraz wysokiej krystaliczności, natomiast zastąpienie żelatyny kolagenem nie ma tak istotnego wpływu.
- Zastosowanie kolagenu wydawało się korzystne w celu nadania funkcjonalności włókniny jako podłoże komórkowe, jednakże badania WAXS oraz FTIR wskazały na denaturację kolagenu do żelatyny w środowisku HFIP, zanik krystaliczności a tym samym niemal całkowitą równorzędność struktury nadmolekularnej Ge i Col.
- Na podstawie przeprowadzonych badań wnioskuje się, że korzystny wpływ żelatyny (w ilości 20% w włóknach przedzionych na płytę), na rozplaszczanie oraz proliferację komórek, wynikać może z obecności sekwencji RGD oraz wysokiego stopnia krystaliczności rzutującego na wysoki moduł Younga.
- Badania stopnia proliferacji oraz obrazy SEM komórek hodowanych na podłożach wytworzonych metodą elektroprzędzenia wskazują, że wielkość porów włóknin była relatywnie mała względem wielkości komórek. Istnieje zatem niezaspokojona ciekawość zbadania wpływu dodatku biopolimeru w połączeniu z podniesieniem stopnia porowatości-wielkości porów. Dane dotyczące innych metod formowania podłoży komórkowych wykazują bowiem, że dla zwiększenia proliferacji komórek (poza odpowiednimi czynnikami związanymi z właściwościami powierzchni- chemicznymi oraz mechanicznymi) konieczna jest również optymalizacja wielkości porów.

Dodatek 1

Tabela I. Dane wykorzystywane do wykresów 3D charakterystyki włókien PCL elektroprzędzonych z HFIP (PCLH)

stężenie PCL [%]	napięcie [kV]	średnica [μm]	odchylenie stand. średnicy	porowatość całkowita [%]	odchylenie stand. por. całkowitej	średnia wielkość porów [μm]	stopień krystaliczności	odchylenie stand. st. kryстал.	moduł Younga	odchylenie stand. m. Younga	test DNA	odchylenie stand. testu DNA
3	9	0,151	0,0813	74,46	1,52	1,183	0,488	1,38	3,94	0,445	94,86	13,31
3	13	0,142	0,0657	75	1,45	1,135	0,467	1,336	4,01	0,9	75,72	10,327
5	9	0,851	0,052	79,6	1,47	8,348	0,464	1,328	76,95	19,45	61,98	17,42
5	13	1,083	0,177	81,5	0,26	11,724	0,477	1,364	67,5	3,54	67,2	4,18
5	18	1,169	0,158	83,7	0,47	14,157	0,498	1,463	60,67	4,04	81,55	12,84
7	9	0,684	0,058	82,5	1,06	7,814	0,492	1,504	59,67	15,89	65,01	2,12
7	13	1,2	0,233	82,4	2,3	13,636	0,49	1,396	55	7	78,12	11,32
7	18	1,579	0,216	82,5	1,5	4,827	0,5	1,428	66,4	17	83,56	4,83

Tabela II. Dane wykorzystywane do wykresów 3D charakterystyki włókien PCL elektroprzędzonych z CM (PCLCM)

stężenie PCL [%]	napięcie [kV]	średnica [μm]	odchylenie stand. średnicy	porowatość całkowita [%]	odchylenie stand. por. całkowitej	średnia wielkość porów [μm]	stopień krystaliczności	odchylenie stand. st. kryстал.	moduł Younga	odchylenie stand. m. Younga	test DNA	odchylenie stand. testu DNA
4	15	0,15	0,037	78,76	2,39	1,412	0,484	0,0145	6,81	1,21	90,9	11,92
7	11	0,605	0,151	74	0,159	4,652	0,495	0,0148	39,23	3,06	82,2	15,21
7	15	1,011	0,253	77,04	1,24	8,81	0,498	0,0149	28,77	2,71	84,1	10,06
7	20	0,901	0,225	81,64	0,7	9,819	0,490	0,0147	18,25	1,06	93,8	10,84
10	11	1,255	0,314	74,31	1,01	9,771	0,505	0,0151	58	7	87,2	12,85
10	15	1,646	0,411	77,2	0,16	14,437	0,482	0,0144	42	5,75	91,8	5,39
10	20	1,86	0,465	75,93	0,97	15,451	0,5	0,015	35,71	4,46	101	21,94

Dodatek 2

Procedura wyznaczania dwójłomności właściwej [150]

Dwójłomność właściwa fazy krystalicznej została wyznaczona na podstawie polaryzowalności poszczególnych wiązań występujących w PCL.

W wyznaczeniu wartości dwójłomności właściwej kryształów niezbędna jest analiza ułożenia łańcuchów polimeru. PCL krystalizuje w komórce ortogonalnej o wymiarach $a = 0,7496$ nm, $b = 0,4974$ nm and $c = 1,7297$ nm [164]. Zgodnie z przyjętym modelem Bittigera komórka elementarna składa się z dwóch łańcuchów, względem siebie przeciwnie odwróconych (tzw. “up” and “down”).

Polaryzowalność α_m wzdłuż osi krystalograficznej m została wyznaczona z zależności:

$$\alpha_m = \sum b_{ti} * \sin^2 \theta_{im} + \sum b_{li} * \cos^2 \theta_{im} \quad (1)$$

gdzie: b_{li} i b_{ti} są polaryzowalnością i -tego wiązania wzdłuż oraz prostopadle do osi wiązania, a θ_{im} jest kątem pomiędzy wiązaniami a osią m w komórki elementarnej.

Równanie Lorentza-Lorenza opisuje zależność pomiędzy polaryzowalnością α a współczynnikiem załamania n_m , wzdłuż m 'tej osi krystalograficznej:

$$\frac{n_m^2 - 1}{n_m^2 + 2} = \frac{4\pi N \rho_c}{3M} \alpha_m \quad (2)$$

gdzie: ρ_c jest gęstością kryształów, M – masa molekularna komórki elementarnej, N – liczba Avogadro.

Polaryzowalności wiązań, b_{li} i b_{ti} , wzdłużnej i normalnej do i -tej osi przyjęto z Bunna [165]. Kąty θ_{im} pomiędzy poszczególnymi wiązaniami wyznaczono korzystając z danych o komórce elementarnej PCL. Do obliczeń przyjęto gęstość fazy krystalicznej ρ_c 1.20 g/cm³ [166] oraz masę cząsteczkowa komórki $M = 128$.

Dwójłomność właściwa fazy krystalicznej, Δn_c^0 została wyliczona z zależności:

$$\Delta n_c^0 = n_c - \frac{(n_a + n_b)}{2} \quad (3)$$

gdzie: n_a , n_b , n_c są odpowiednio współczynnikami załamania wzdłuż a , b , c osi krystalograficznych.

Dwójłomność właściwą fazy amorficznej Δn_a^0 , niezbędną do wyznaczenia orientacji molekularnej, wyznaczono korzystając z modelu opracowanego przez Cakmaka [167]:

$$\frac{\Delta n_c^0}{\Delta n_a^0} = \frac{\rho_c}{\rho_a} \quad (4)$$

gdzie: ρ_a jest gęstością fazy amorficznej przyjętą 1.021g/cm^3 [168].

Tabela I. zawiera wyznaczone współczynniki załamania n_a , n_b , n_c , wzdłuż osi krystalograficznych a, b, oraz c, jak również dwójłomność właściwa fazy krystalicznej i amorficznej Δn_c^0 , and Δn_a^0 , wyznaczone z równań (1-4).

Tabela I. Wartości opisujące właściwości optyczne PCL.

Parametr	Wyznaczona wartość
n_a	1,230
n_b	1,167
n_c	1,376
Δn_c^0	0,177
$\Delta n_{ca} = n_c - n_a$	0,146
$\Delta n_{cb} = n_c - n_b$	0,209
$\Delta n_{ba} = n_b - n_a$	-0,063
Δn_a^0	0,151

Spis rysunków

Rysunek 1. Etapy w badaniach in-vitro: a) pobranie komórek od pacjenta b) namnażanie komórek in-vitro w butelce hodowlanej c) posiew komórek wraz z czynnikami wzrostu na rusztowaniach komórkowych 3D, d) hodowla komórek na rusztowaniach w warunkach in-vitro e) hodowla w bioreaktorach, e) transplantacja produktu inżynierii tkankowej w celu odbudowy ubytku u pacjenta...	8
Rysunek 2. Wizualizacja komórki z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego [na podstawie ⁴]	10
Rysunek 3. Kolagen w tkankach: a) włókna kolagenowe w naturalnej tkance (przekrój poprzeczny) oraz schemat budowy kolagenu, b) włókna kolagenowe oraz fibroblasty rogówki szczura.....	11
Rysunek 4. Zjawiska zachodzące na granicy komórka- materiał.....	14
Rysunek 5. Struktura chemiczna polikaprolaktonu.....	15
Rysunek 6. Degradacja PCL poprzez masową hydrolizę pośrednio do 6-hydroksyowego kwasu kapronowego i acetylu koenzymu A które są usuwane z organizmu podczas cyklu kwasu cytrynowego.....	16
Rysunek 7. a) Schemat masowej i molekularnej utraty wagi w czasie degradacji PCL. b) Zmiany w M_w w wyniku degradacji w warunkach in-vitro włókien przędzonych z różnym dodatkiem DMF, o różnej średnicy (a) średnica włókien 196 nm []; (b) średnica włókien 250 nm; (c) średnica włókien 300 nm; (d) średnica włókien 689 nm.....	16
Rysunek 8. Struktura chemiczna PLA.....	17
Rysunek 9. Struktura chemiczna PGA.....	18
Rysunek 10. Profil radialny z rentgenogramu WAXS kolagenu z ogonów szczykowych, z pikami pochodzącymi od kryształów w 0,84 oraz 3,5 nm ⁻¹ oraz amorficznym halo z maksimum w 2,1 nm ⁻¹ [⁴⁰]	18
Rysunek 11. Naładowanie makrocząsteczek żelatyny przy różnym pH [⁴⁷]	20
Rysunek 12. Adhezja a) i proliferacja b) fibroblastów na podłożach żelatynowych i kolagenowych [⁵¹]	20
Rysunek 13. Rozpłaszczanie fibroblastów regulowane stężeniem RGD na powierzchni a) 0.1, b) 1, c) 10, d) 100 fmol/cm ² [⁶⁴]	24
Rysunek 14. Komórki na podłożach o zróżnicowanej teksturze a-c) cienkie paski d-e) grube paski [⁶⁸]	25
Rysunek 15. Morfologia fibroblastów na podłożach z poliakrylamidu pokrytego kolagenem typu I o module Younga a) 2,1kPa, b) 68kPa [⁶⁹]	25
Rysunek 16. Schemat elektroprzędzenia w modzie a) pionowy, b) poziomy [⁸²]	26
Rysunek 17. Strefy na drodze formowania włókien w polu elektrostatycznym (na podstawie [⁸⁵])...	27
Rysunek 18. Zmiany kształtu kropli pod wpływem przykładanej siły gdzie V-polaryzacja roztworu, Vc –polaryzacja krytyczna.....	28
Rysunek 19. Parametry procesu elektroprzędzenia wpływające na morfologię i strukturę włókien (na podstawie [⁸⁵]).....	29
Rysunek 20. Średnica włókien w zależności od parametrów związanych (a) z siłami działającymi na strugę roztworu (b) z masą polimeru [⁸⁹]	30
Rysunek 21. Zależności a) napięcia powierzchniowego (zielone punkty) oraz lepkości roztworu (czerwone punkty), b) średnicy włókien od stężenia PEG w wodzie [⁹⁰]	32
Rysunek 22. Przędzenie włókien w zależności od czynnika n_e oraz M_w dla a) PLA, b) PS [⁹⁴]	33
Rysunek 23. Zdjęcia AFM włókien PCL przędzonych z 10% roztworu o średnicy a) 150nm, b) 450nm [¹⁰³]	35
Rysunek 24. a) Moduł Younga w funkcji średnicy włókien, b) siła rozciągająca w funkcji wydłużenia [¹⁰³]	36
Rysunek 25. Moduł Younga w funkcji średnicy włókien PVA.....	36
Rysunek 26. a) Zależność średnicy strugi od przykładanego napięcia, b) zależność progowego napięcia od stężenia polimeru [¹⁰⁸]	37
Rysunek 27. Profil radialny WAXS proszku, filmu, włókien oraz włókien rozciąganych PLLA a) w różnych stężeniach z DCM/pirydyna, b) przy różnej szybkości zbierania na bęben [¹¹⁴]	39
Rysunek 28. Włókna przędzone PCL/Ge z TFE a) bezpośrednio po wyprzędzeniu, b) po 7 dniach wymywania w PBS w 37°C [¹²³]	41

Rysunek 29. Zdjęcia TEM włókien PLLA:Ge a) 3:1, b) 1:1, c) 1:3 [¹²⁴].....	41
Rysunek 30. Zdjęcia FM komórek po 7 dniach hodowli na a) próbce kontrolnej, b) przypadkowo ułożonych włóknach, c) równolegle ułożonych włóknach [¹³⁸].....	44
Rysunek 31. a) Średnia średnica włókien b) aktywność komórek 3T3 w funkcji dodatku żelatyny dla włókien PLCL/Ge [¹²²].....	45
Rysunek 32. Obraz włókna w interferencyjnym polu prążkowym przy prostopadłym ustawieniu osi włókna do kierunków prążków interferencyjnych. P,A - kierunki polaryzatora i analizatora, d - odchylenie prążka, h - odległość międzyprążkowa, t - grubość włókna.....	55
Rysunek 33. Przykład zależności lepkości w funkcji szybkości ścinania (roztwór 5% PCL w HFIP)..	62
Rysunek 34. Lepkość roztworów w funkcji stężenia PCL w HFIP (przy szybkości ścinania 5,4 s ⁻¹).....	63
Rysunek 35. Zależność przewodności elektrycznej roztworów w funkcji stężenia PCL w HFIP	63
Rysunek 36. Morfologia włókien PCLCM a) 4%, b) 7%, c) 10% przy napięciu 15kV.....	64
Rysunek 37. Morfologia włókien PCLH a) 3%, b) 5%, c) 7%. przy napięciu 13kV.....	64
Rysunek 38. Średnia średnica w funkcji przyłożonego napięcia oraz stężenia PCL a) PCLH, b) PCLCM.....	65
Rysunek 39. Średnia porowatość całkowita włóknin w funkcji przyłożonego napięcia oraz stężenia PCL a) PCLH, b) PCLCM	65
Rysunek 40. Średnica porów włóknin w funkcji przyłożonego napięcia oraz stężenia PCL a) PCLH, b) PCLCM.....	66
Rysunek 41 Profil FTIR dla PCL.....	67
Rysunek 42. Pomiar zwilżania włókniny PCL (5%PCLH P)	67
Rysunek 43. Przebieg krzywej DSC ogrzewania dla granulatu, folii oraz włókien PCL (5%PCLH, 13kV).....	68
Rysunek 44. Stopień krystaliczności określony z krzywej DSC w funkcji przyłożonego napięcia oraz stężenia PCL a) PCLH, b) PCLCM	68
Rysunek 45. Rentgenogramy włókien 5%PCLH zbieranych a) na płytę oraz b) na bęben (zaznaczony kierunek ułożenia włókien) przy 13kV	69
Rysunek 46 a) Profil radialny uśredniono po kącie azymutalnym, b) przykładowa aproksymacja profilu.....	69
Rysunek 47. Profil azymutalny refleksu (110) dla włókien 5%PCL przedzionych na bęben.....	70
Rysunek 48. Włókno PCL w CD1 w polu prążkowym przy użyciu światła białego (7,5kV)	70
Rysunek 49. Średnia wartość orientacji molekularnej pojedynczych włókien, wyznaczona metodą dwójłomności optycznej, w funkcji przyłożonego napięcia oraz stężenia roztworów a) PCLCM b) PCLCD2.....	71
Rysunek 50. Naprężenie w funkcji wydłużenia włóknin PCLH oraz PCLCM.....	72
Rysunek 51. Moduł Younga w funkcji przyłożonego napięcia i stężenia PCL a) PCLH, b) PCLCM	72
Rysunek 52. Morfologia komórek 3T3 po 2 dniach hodowli na a) TCP oraz włókninach PCLCM b) 4%, c) 7%, d) 10%, e) 13% i PCLH f) 3%, g) 5%, h) 7% oraz 5%PCLH przedzionych na bęben	75
Rysunek 53. Morfologia komórek 3T3 po 7 dniach hodowli na a) TCP oraz włókninach b) 5%PCLH P c) 5%PCLH B	76
Rysunek 54. Morfologia komórek 3T3 hodowli na a) TCP oraz włókninach b) 3%PCLH P c) 5%PCLH P, d) 7%PCLH P e) 5%PCLH B po 7 dniach (w różnych powiększeniach)	77
Rysunek 55. Morfologia komórek MSC po 2 dniach hodowli na TCP a) oraz włókninach PCLCM b) 4%, c) 7%, d) 10%, e) 13% i PCLH f) 3%, g) 5%, h) 7% przedzionych na płytę; i) 5%PCLH na bęben	79
Rysunek 56. Test DNA po 7 dniach hodowli komórek 3T3 na włókninach a) PCLH, b)PCLCM w stosunku do próbki kontrolnej TCP	80
Rysunek 57. Zależność lepkości w funkcji szybkości ścinania dla PCL, Ge oraz mieszanin PCL/Ge	83
Rysunek 58. Przewodność elektryczna roztworów PCL, Ge, PCL/Ge w HFIP	83
Rysunek 59. Morfologia włókien jednoskładnikowych oraz dwuskładnikowych a) PCL, b) PG4:1, c) PG1:1, d) PG1:4, e) PC4:1, f) Ge przedzionych na płytę (lewa kolumna) i bęben (prawa kolumna) ..	85
Rysunek 60. Morfologia włókien jednoskładnikowych a)Ge3, b)Col3 przedzionych na płytę.....	85
Rysunek 61. Średnia grubość włókien PCL, PG4:1, PG1:1, PG4:1, Ge przedzionych na płytę w funkcji przykładanego napięcia.....	86

Rysunek 62. Średnia grubość włókien PCL, PG4:1, PG1:1, PC4:1 przedzionych na płytę oraz na bęben.....	87
Rysunek 63. Średnia porowatość PCL, PG4:1, PG1:1, PC4:1 włókien przedzionych na płytę oraz na bęben.....	87
Rysunek 64. Średnia wielkość porów PCL, PG4:1, PG1:1, PC4:1 włókien przedzionych na płytę oraz na bęben.....	88
Rysunek 65. Profil FTIR dla włókien jednoskładnikowych- PCL, Ge oraz Col w zakresie 1000-3700cm ⁻¹	88
Rysunek 66. Profil FTIR dla włókien dwuskładnikowych w porównaniu z włóknami jednoskładnikowymi w zakresie 1590-1770cm ⁻¹	89
Rysunek 67. Stężenie C, N, O w funkcji składu powierzchni włókien na podstawie danych XPS.....	90
Rysunek 68. WAXS włókien PCL, PG4:1, PG1:1, PC4:1 oraz Ge przedzionych na a) bęben (zaznaczony kierunek ułożenia włókien), b) na płytę.....	91
Rysunek 69. WAXS włókien PC4:1 przedzionych a) na bęben (zaznaczony kierunek ułożenia włókien), b) na płytę.....	92
Rysunek 70. Profile radialne wyznaczone z WAXS dla włókien PCL, PG4:1, PG1:1, PG1:4, PC4:1, Ge przedzionych na bęben.....	93
Rysunek 71. Aproksymacja profili radialnych WAXS na przykładzie a)PCL, b)Ge, c)PG4:1, d)PC4:1 przedzionych na bęben.....	93
Rysunek 72. Stopień krystaliczności PCL wyznaczony metodą WAXS dla PCL, PG4:1, PG1:1, PG1:4 oraz PC4:1 dla włókien przedzionych na płytę oraz na bęben.....	94
Rysunek 73. Ubytek masy w funkcji temperatury dla włókien PCL, PG4:1, PG1:1, PG1:4, Ge przedzionych na bęben.....	94
Rysunek 74. Profile azymutalne dla włókien PCL, PG4:1 przedzionych na bęben.....	95
Rysunek 75. Krzywe DSC przepływu ciepła w funkcji temperatury.....	96
Rysunek 76. Temperatury topnienia kryształów PCL we włóknkach PCL, PG4:1, PG1:1 przedzionych na płytę oraz folii PCL (c), przy różnych napięciach.....	96
Rysunek 77. Krystaliczność metodą DSC włókien PCL, PG4:1, PG1:1 przy różnych napięciach przedzionych na płytę oraz folii PCL (c).....	97
Rysunek 78. Krystaliczność PCL wyznaczona metodą DSC dla włókien PCL, PG4:1, PG1:1, PC4:1 przedzionych na płytę oraz na bęben.....	98
Rysunek 79. Naprężenie σ w funkcji wydłużenia względnego ϵ dla włókien przedzionych na bęben.....	98
Rysunek 80. Naprężenie σ w funkcji wydłużenia względnego ϵ dla włókien przedzionych na płytę.....	98
Rysunek 81. Moduł Younga dla włókien przedzionych na bęben oraz na płytę z roztworów PCL, PG4:1, PG1:1, PC4:1, Ge.....	99
Rysunek 82. Morfologia komórek 3T3 po 3 dniach hodowli na a) TCP oraz włóknkach b) PCL c) PG4:1 P, d) PG1:1, e) PC4:1 przedzionych na płytę (lewa kolumna) oraz przedzionych na bęben (prawa kolumna).....	101
Rysunek 83. Morfologia komórek 3T3 po 3 dniach hodowli na a) TCP oraz włóknkach b) PCL c) PG4:1 d) PG1:1 przedzionych na płytę (lewa kolumna) oraz przedzionych na bęben (prawa kolumna).....	102
Rysunek 84. Morfologia komórek 3T3 po 4 dniach hodowli na a) TCP oraz włóknkach b) PCLH P, c) PG4:1 P, d) PG1:1 P, e) PC4:1 P (winkuliny kolumna prawa).....	103
Rysunek 85. Morfologia komórek 3T3 po 7 dniach hodowli na a) TCP oraz włóknkach b) PCLH P, c) PCLH B, d) PG4:1 P c) PG4:1B.....	104
Rysunek 86. Morfologia komórek 3T3 na a) TCP oraz włóknkach b) PCL P, c) PCL B, d) PG4:1 P, e) PG4:1B, f) PG1:1 P, g) PG1:1 B, h) PC4:1 P, i) PC4:1B. (po 7 dniach- kolumna lewa, po 11 dniach- kolumna prawa).....	106
Rysunek 87. Morfologia komórek MSC po 3 dniach hodowli na a) TCP oraz włóknkach b) PCL P, c)PCL B, d) PG4:1 P, e) PG4:1B, f) PG1:1 P, g) PG1:1 B, h) PC4:1 P, i) PC4:1 B (kolumna I-cała komórka, II- szkielek aktynowy, III- winkuliny).....	109
Rysunek 88. Morfologia komórek MSC po 3 dniach hodowli na a) TCP oraz włóknkach b) PG4:1 P, c) PG1:1, d) PC4:1 przedzionych na płytę (lewa kolumna) oraz przedzionych na bęben (prawa kolumna).....	110
Rysunek 89. Morfologia komórek MSC w trakcie hodowli na a) TCP oraz włóknkach b) PCL P, c)PCL B, d) PG4:1 P, e) PG4:1B, f) PG1:1 P, g) PG1:1 B, h) PC4:1 P, i) PC4:1B.....	112

Rysunek 90. Test DNA po 7 dniach hodowli.....	112
Rysunek 91. Test DNA po 12 dniach hodowli komórek 3T3	113
Rysunek 92. Test DNA po 7 dniach hodowli komórek MSC	113
Rysunek 93. Test DNA po 12 dniach hodowli komórek MSC	114

Spis tabel

Tabela 1. Aminokwasy: rodzaje, ilość (na 1000) oraz polarność występujące w żelatynie ze świńskiej skóry typu A i B oraz kolagenie bydłęcym	19
Tabela 2. Popularne metody formowania rusztowań komórkowych	21
Tabela 3. Włókna jednoskładnikowe- oznaczenia i parametry procesu.....	50
Tabela 4. Włókna dwuskładnikowe- przedzione z 5% roztworów HFIP z szybkością przepływu 7μl/min	50
Tabela 5. Włókniny wybrane do badań biologicznych z uwzględnieniem czasu po którym zostało przeprowadzone badanie (w dniach-d).....	58
Tabela 6. Właściwości wybranych rozpuszczalników-dane literaturowe [¹²⁸].....	60
Tabela 7. Morfologia włókien PCL elektroprzędzonych z różnych rozpuszczalników.....	61
Tabela 8. FTIR dla PCL	67
Tabela 9. Średnie wartości dwójłomności optycznej oraz orientacji molekularnej włókien PCLCM oraz PCLCD1	71
Tabela 10. Włókniny jedno i dwuskładnikowe wybrane do badań.....	84
Tabela 11. Charakteryzacja pików żelatyny oraz kolagenu [¹⁵²].....	89
Tabela 12. Kąt zwilżania włóknin.....	91
Tabela 13. Czynniki orientacji molekularnej fc części krystalicznej PCL określony z WAXS.....	95

Bibliografia

- ¹ R. Langer, J. P. Vacanti, **Tissue Engineering**; Science 1993, 260(5110): 920- 926;
- ² A. Kaźnica, R. Joachimiak, T. Drewa, T. Rawo, J. Deszczyński, **New Trends In Tissue Engineering**; Arthroscopy And Joint Surgery 2007, 3: 11-16;
- ³ M. Magdalena Grolik, S. Fiejdasz, **Materiały dla Inżynierii Tkankowej**; Materiały Konferencyjne-Majówka Młodych Biomechaników Ustroń, 2008: 59-64;
- ⁴ T. Dvir, B. P. Timko, D.S. Kohane, R. Langer, **Nanotechnological Strategies for Engineering Complex Tissues**; Nature Nanotechnology 2011, 6: 13–22;
- ⁵ Norma Europejska: PN-EN ISO 10993 **Biologiczna Ocena Wyrobów Medycznych**;
- ⁶ S. Stokłosa, **Hodowla Tkanek i Komórek**; Warszawa, PWN 2004; 35-46;
- ⁷ R. Lanza, R. Langer, J. Vacanti, **Principles of Tissue Engineering**; Part I, 3 Edit., Academic Press 2007: 3-99;
- ⁸ S.H. Lo, **Focal Adhesions: What's New Inside**; Developmental Biology 2006, 294: 280–291;
- ⁹ J.A. Sanz-Herrera, E. Reina-Romo, **Cell-Biomaterial Mechanical Interaction in the Framework of Tissue Engineering: Insights, Computational Modeling and Perspectives**; International Journal Of Molecular Sciences 2011, 12, 8217-8244;
- ¹⁰ J.T. Parsons, K.H. Martin, J.K. Slack, J.M. Taylor, S.A. Weed, **Focal Adhesion Kinase: A Regulator of Focal Adhesion Dynamics And Cell Movement**; Oncogene 2000, 19:5606-5613;
- ¹¹ J.P. Fisher, A.G. Mikos, J.D. Bronzino, **Tissue Engineering**; chapter 3,5,8 2007;
- ¹² W.A. Myśliwski, **Podstawy Cytofizjologii i Histofizjologii**; Rozdziały 4 i 5, Wydanie 8, Gdańsk, Akademia Medyczna w Gdańsku, 2007: 70-96;
- ¹³ D. Krzyżanowska-Gołąb, A. Lemańska-Perek, I. Kaźnik-Prastowska, **Fibronectin as an Active Component of the Extracellular Matrix**; Postepy Hig. Med. Dosw. 2007, 61: 655-663;
- ¹⁴ B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis ,M. Raff , K. Roberts , P. Walter, **Molecular Biology of The Cell**; Chapter 11, 5 Edition, Garland Science 2007;
- ¹⁵ P. Fratzl; **Collagen: Structure And Mechanics**; Chapter 2, 1 Edition, Springer 2008;
- ¹⁶ B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis , M. Raff, K. Roberts , P. Walter, **Podstawy Biologii Komórki**; Warszawa, PWN, 2009;
- ¹⁷ T. Nishida, K. Yasumoto, T. Otori, J. Desaki, **The Network Structure of Corneal Fibroblasts in The Rat as Revealed by Scanning Electron Microscopy Investigative**; Ophthalmol. Vis. Sci. 1988, 29: 1887–90;
- ¹⁸ M.C. Siebers, P.J. Ter Brugge, X.F. Walboomers, J.A. Jansena, **Integrins as Linker Proteins Between Osteoblasts and Bone Replacing Materials**; A Critical Review Biomaterials 2005, 26:137–146;

-
- ¹⁹ U. Meyer, T. Meyer, J. Handschel, H.P. Wiesmann, **Fundamentals Of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**; Part A and D, 1 Edition, Springer 2009: 3-57,455-495;
- ²⁰ M. Sokolsky-Papkov, K. Agashi, A. Olaye, K. Shakesheff, A.J. Domb, **Polymer Carriers For Drug Delivery in Tissue Engineering**; *Advanced Drug Delivery* 2007, 59: 187–206;
- ²¹ M.M. Grolik, S. Fiejdasz, **Materiały dla Inżynierii Tkankowej**; *Materiały Konferencyjne-Majówka Młodych Biomechaników Ustroń*, 2008: 59-64;
- ²² G.E. Wnek, G.L. Bowlin, **Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering**, Definicja: *Biocompatibility Testing*, 2 Edition, Informa Healthcare 2008: 170-178;
- ²³ www.dentonet.pl; Definicja: *Bioresorbowalność*;
- ²⁴ M. Nałęcz, **Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna T. 4 „Biomateriały”**; Warszawa, Akademicka Oficyna Wydawnicza Exit 2003;
- ²⁵ P.P. Zilla, H.P. Greisler, **Tissue Engineering of Vascular Prosthetic Grafts**; Chapter 54 R.G. Landes Co. 1999: 583-597;
- ²⁶ M. Katsikogianni, Y.F. Missirlis, **Concise Review of Mechanisms of Bacterial Adhesion To Biomaterials and of Techniques Used in Estimating Bacteria- Material Interactions**; *European Cells And Materials* 2004, 8: 37-57;
- ²⁷ K.N. Ekdahl, J.D. Lambris, H. Elwing, D. Ricklin, P.H. Nilsson, Y. Teramura, I.A. Nicholls, B. Nilsson, **Innate Immunity Activation on Biomaterial Surfaces: A Mechanistic Model and Coping Strategies**; *Advanced Drug Delivery* 2011, 63:1042-1050;
- ²⁸ C.Z. Liu, J.T. Czernuszka, **Materials Perspective Development of Biodegradable Scaffolds for Tissue Engineering: A Perspective on Emerging Technology**; *Materials Science And Technology* 2007, 23(4): 379-392;
- ²⁹ Y. Ikada, H. Tsuj, **Biodegradable Polyesters For Medical and Ecological Applications**; *Macromol. Rapid Commun.* 2000, 21: 117-132;
- ³⁰ S.C. Woodward, P.S. Brewer, F. Moatamed, A. Schindler, C.G. Pitt, **The Intracellular Degradation of Poly-epsilon-caprolactone**; *J. Biomed. Mater. Res.* 1985,19: 437-44;
- ³¹ M.A. Woodruff, D. W. Hutmacher, **The Return of a Forgotten Polymer-Polycaprolactone in the 21st Century**; *Progress in Polymer Science* 2010, 35: 1217-1256;
- ³² D. Hutmacher, **Scaffold Design and Fabrication Technologies for Engineering Tissues – State of the Art and Future Perspectives**; *J. Biomater. Sci. Polym.* 2001; 12: 107-24;
- ³³ N. Bölgen, Y. Z. Menceloglu, K. Acatay, I. Vargel, E. Piskin, **In-vitro And In-vivo Degradation of Non-Woven Materials Made of Poly(e-caprolactone) Nanofibers Prepared by Electrospinning Under Different Conditions**; *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 2005, 16(12): 1537-1555;
- ³⁴ I. Engelberg, J. Kohn, **Physico- Mechanical Properties of Degradable Polymers Used in Medical Applications: A Comparative Study**; *Biomaterials* 1991, 12(3): 292-304;

-
- ³⁵ C. Agrawal, R. Ray, **Biodegradable Polymeric Scaffolds for Musculoskeletal Tissue Engineering**; *Journal of Biomedical Materials Research* 2001, 55(2): 141-150;
- ³⁶ E. Sachlos, J.T. Czernuszka, **Making Tissue Engineering Scaffolds Work**; *European Cells And Materials* 2003, 5: 29-40;
- ³⁷ D. Hutmacher, **Scaffolds in Tissue Engineering Bone and Cartilage**; *Biomaterials* 2000, 21(24): 2529-2543;
- ³⁸ E. Sachlos, J. Czernuszka J. **Making Tissue Engineering Scaffolds Work. Review: the Application of Solid Freeform Fabrication Technology to the Production of Tissue Engineering Scaffolds**; *European Cells and Materials Journal* 2003, 5:29-40;
- ³⁹ S. Sell, C. Barnes, M. Smith, M. McClure, P. Madurantakam, J. Grant, M. Mcmanus, G. Bowlin; **Extracellular Matrix Regenerated: Tissue Engineering Via Electrospun Biomimetic Nanofibers**; *Polym. Int.* 2007, 56: 1349-1360;
- ⁴⁰ A. Sionkowska, M. Wisniewski, J. Skopinska, C.J. Kennedy, T.J. Wess; **Molecular Interactions in Collagen and Chitosan Blends**; *Biomaterials* 2004, 25: 795–80;
- ⁴¹ L.A. Munishkina, C. Phelan, V.N. Uversky, A.L. Fink; **Conformational Behavior and Aggregation of Synuclein in Organic Solvents: Modeling the Effects of Membranes**; *Biochemistry* 2003, 42: 2720-2730;
- ⁴² A. Kundu, N. Kishore, **1,1,1,3,3,3- Hexafluoroisopropanolinduced Thermal Unfolding and Molten Globule State of Bovine -Lactalbumin: Calorimetric and Spectroscopic Studies**; *Biopolymers* 2004, 73: 405–420;
- ⁴³ P. I. Rose, **Gelatine in Encyclopedia of Polymer Science and Engineering**; Wiley and Sons 1987, 3 P: 488–513.
- ⁴⁴ R. M. Hafidz, R. N. Yaakob, C. M. Amin, I. Noorfaizan; **Chemical and Functional Properties of Bovine and Porcine Skin Gelatin**; *International Food Research Journal* 2011, 18: 813-817;
- ⁴⁵ K. Tsunoda, M. Sugiura, M. Sonoyama, H. Yajima, T. Ishii, J. Taniyama, H. Itoh, **Characterization of Water Contribution to Excimer Laser Ablation of Collagen**; *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2001, 145: 195–200;
- ⁴⁶ B.C. Vidal, M. Luiza, S. Mello; **Collagen Type I Amide I Band Infrared Spectroscopy**; *Micron* 2011, 42: 283–289;
- ⁴⁷ R. Schrieber, H. Gareis, **Gelatine Handbook**; Chapter 2, Wiley-Vch Verlag Gmbh & Co. Kga, Weinheim 2007: 45-118;
- ⁴⁸ Y. Li, H. Jia, Q. Cheng, F. Pana, Z. Jianga, **Sodium Alginate–Gelatin Polyelectrolyte Complex Membranes with both High Water Vapor Permeance and High Permselectivity**, *Journal of Membrane Science* 2011, 375: 304–312;
- ⁴⁹ S. Panzavolta, M. Gioffrè, M. Letizia, C. Gualandi, L. Foroni, A. Bigi, **Electrospun Gelatin Nanofibers: Optimization of Genipin Cross-Linking to Preserve Fiber Morphology after Exposure to Water**; *Acta Biomaterialia* 2011, 7: 1702–1709;

-
- ⁵⁰ Y.Z. Zhang, J. Venugopa, Z.M. Huang, C.T. Lim, S. Ramakrishna, **Crosslinking of the Electrospun Gelatin Nanofibers**; *Polymer* 2006, 47: 2911–2917;
- ⁵¹ J. Ratanavaraporn, S. Damrongsakkul, N. Sanchavanakit, T. Banaprasert, S. Kanokpanont, **Comparison of Gelatin and Collagen Scaffolds for Fibroblast Cell Culture**; *Journal Of Metals, Materials and Minerals* 2006, 16(1): 31-36;
- ⁵² L. Duca, N. Floquet, A. J. P. Aliz, B. Haye, L. Debelle, **Elastin as a Matrikine**; *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2004, 49: 235-244;
- ⁵³ W.J. Li, Rabie M. Shanti, Rocky S. Tuan, **Nanotechnologies for the Life- Scaffolds in Tissue Engineering**; Chapter 3, *Sciences Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA* 2007:135-187;
- ⁵⁴ P. D. Dalton, T. Woodfield, D. W. Hutmacher, **Polymer Scaffolds for Tissue Engineering**; *Biomaterials* 2009 30: 2420-2423;
- ⁵⁵ Q.Z. Chena, S.E. Harding, N.N. Ali, A.R. Lyon, A.R. Boccaccini, **Biomaterials in Cardiac Tissue Engineering: Ten Years of Research Survey**; *Materials Science and Engineering* 2008, 59 (1–6): 1–37;
- ⁵⁶ R. Schmelzeisen, R. Schimming, M. Sittinger, **Making Bone: Implant Insertion into Tissue-Engineered Bone for Maxillary Sinus Floor Augmentation – A Preliminary Report**; *J Cranio-Maxillofac Surg* 2003, 31:34–9;
- ⁵⁷ M. Wagner, N. Kiapur, M. Wiedmann-Al-Ahmad, U. Hubner, A. Al- Ahmad, R. Schon, et al, **Comparative in-vitro Study of the Cell Proliferation of Ovine and Human Osteoblast-Like Cells on Con- Ventionally and Rapid Prototyping Produced Scaffolds Tailored for Application as Potential Bone Replacementmaterial**, *J Biomed Mater Res Part A* 2007, 83:1154–64;
- ⁵⁸ Y.T. Kim, V.K. Haftel, S. Kumar, R.V. Bellamkonda, **The Role of Aligned Polymer fiber-Based Constructs in the Bridging Of Long Peripheral Nerve Gaps**; *Biomaterials* 2008, 29: 3117–27;
- ⁵⁹ B. Krause, G. Koops, N. Van Der Vegt, M. Wessling, M. Wubbenhorst, J. Van Turnhout Ultralow, **Dielectrics Made by Supercritical Foaming of Thin Polymer Films**. *Advanced Materials* 2002, 14(15):1041;
- ⁶⁰ B. Krause, H. Sijbesma, P. Munuklu, N. Van Der Vegt, M Wessling, **Bicontinuous Nanoporous Polymers By Carbon Dioxide Foaming**. *Macromolecules* 2001, 34(25): 8792-8801;
- ⁶¹ D. Falconnet, G. Csucs, H. M. Grandina, M. Textor, **Surface Engineering Approaches to Micropattern Surfaces for Cell-Based Assays**; *Biomaterials* 2006, 27: 3044–3063;
- ⁶² Y. Feng, M. Mrksich, **The Synergy Peptide PHSRN and the Adhesion Peptide RGD Mediate Cell Adhesion Through a Common Mechanism**; *Biochemistry* 2004, 43:15811- 1582;
- ⁶³ U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler, **RGD Modified Polymers: Biomaterials for Stimulated Cell Adhesion and Beyond**; *Biomaterials* 2003, 24: 4385–4415;
- ⁶⁴ S. Massia, J. Hubbell, **An RGD Spacing of 440nm is Sufficient for Integrin Avb3-mediated Fibroblast Spreading and 140nm for Focal Contact Fiber Formation**; *J. Cell. Biol.* 1991, 114: 1089–1100;

-
- ⁶⁵ K.F. Leonga, C.K. Chuaa, N. Sudarmadji, W.Y. Yeonga, **Engineering Functionally Graded Tissue Engineering Scaffolds**; Journal Of The Mechanical Behavior Of Biomedical Materials 2008 1: 140-152;
- ⁶⁶ W.E. Johnson, A. Wootton, A. El Haj, S.M. Eisenstein, A.S. Curtis, S. Robert; **Topographical Guidance of Intervertebral Disc Cell Growth in-vitro: Towards the Development of Tissue Repair Strategies for the Anulus fibrosus**; Eur. Spine. J. 2006, 15: S389-S396;
- ⁶⁷ A. Teixeira, G. Abrams, P. Bertics, C. Murphy, P. Nealey, **Epithelial Contact Guidance on Well-Defined Micro- and Nanostructured Substrates**; J. Cell. Sci. 2003, 116: 1881–1892;
- ⁶⁸ A.S. Nathan, B. M. Baker, N.L. Nerurkar, R.L. Mauck Mechano; **Topographic Modulation of Stem Cell Nuclear Shape on Nanofibrous Scaffolds**; Acta Biomaterialia 2011 7: 57–66;
- ⁶⁹ R.G.M Breuls, T.U Jiya, T.H Smit, **Stiffness Influences Cell Behavior: Opportunities for Skeletal Tissue Engineering**; Open Orthop J. 2008, 2: 103–109;
- ⁷⁰ L. Rayleigh, **On the Equilibrium of Liquid Conducting Masses Charged with Electricity**; Phil. Mag. 1882, 14: 184;
- ⁷¹ J. Zeleny, **Instability Of Electrified Liquid Surface**; Phys. Rev. 1917, 10: 1–8;
- ⁷² M. Dole, L. Mack, R. Hines, **Gas Phase Macroions**; Molecular Beams Of Macroions. J. Chem. Phys. 1968, 49: 2240-2249;
- ⁷³ V.G. Drozin, **The Electrical Dispersion of Liquids as Aerosols**; J. Colloid Interface Sci. 1955, 10: 158-164;
- ⁷⁴ A. Formhals, **US Patent, 1,975,504**, 1934;
- ⁷⁵ L. Larrondo, R. Manley, **Electrostatic Fiber Spinning From Polymer Melts. 2. Examination of the Fow Feld in an Electrically Driven Jet**; J. Polym. Sci. Part B- Polym. Phys. 1981, 19: 921-932;
- ⁷⁶ L. Larrondo, R. Manley, **Electrostatic Fiber Spinning From Polymer Melts. 3. Electrostatic Deformation of a Pendant Drop of Polymer Melt**, J. Polym. Sci. Part B- Polym. Phys. 1981, 19: 933-940;
- ⁷⁷ A.L. Yarin, S. Koombhongse, D. H. Reneker, **Bending Instability in Electrospinning of Nanofibers**; J. Appl. Phys. 2001, 89: 3018-3028;
- ⁷⁸ D.H. Reneker, A.L Yarin, H. Fong, S. Koombhongse, **Bending Instability of Electrically Charged Liquid Jets of Polymer Solutions in Electrospinning**; J. Appl. Phys. 2000, 87: 4531-4547;
- ⁷⁹ T. A. Kowalewski, S. Blonski, S. Barral, **Experiments and Modelling of Electrospinning Process**; Bull. Polish Acad. Sci. 2005, 53: 385-399;
- ⁸⁰ D.H. Reneker, AL. Yarin, **Electrospinning Jets and Polymer Nanofibers**; Polymer 2008, 49: 2387-2425;
- ⁸¹ C.J. Thompson, G.G. Chase, A.L. Yarin, D.H. Reneker, **Effects of Parameters on Nanofiber Diameter Determined from Electrospinning Model**; Polymer 2007, 48: 6913-6922;

-
- ⁸² N. Bhardwaj, S C. Kundu; **Electrospinning: A Fascinating Fiber Fabrication Technique**; *Biotechnology Advances* 2010, 28: 325-347;
- ⁸³ W.E. Teo, S. Ramakrishna **A Review on Electrospinning Design and Nanofibre Assemblies**; *Nanotechnology* 2006, 17:R89-R10;
- ⁸⁴ Y. Srivastava, M. Marquez, T. Thorsen, **Multijet Electrospinning of Conducting Nanofibers from Microfluidic Manifolds**; *Journal of Applied Polymer Science* 2007, 106: 3171–3178;
- ⁸⁵ B. Łaszkiwicz; **Nanowłókna**; Łódź, Politechnika Łódzka 2004;
- ⁸⁶ K. Garg, G. L. Bowlin, **Electrospinning Jets and Nanofibrous Structures**; *Biomicrofluidics* 2011, 5, 013403:1-19;
- ⁸⁷ S. Koombhongse, Ph.D. thesis, University of Akron, 2001;
- ⁸⁸ Z.M. Huan, Y.Z. Zhang, M. Kotaki, S. Ramakrishna, **A Review on Polymer Nanofibers by Electrospinning and their Applications in Nanocomposites**; *Composites Science and Technology* 2003, 63: 2223-225;
- ⁸⁹ S.H. Tana, R. Inai, M. Kotaki, S. Ramakrishna, **Systematic Parameter Study For Ultra-fine Fiber Fabrication via Electrospinning Proces**; *Polymer* 2005, 46: 6128-6134;
- ⁹⁰ J. M. Deitzel, J. Kleinmeyer, D. Harris, N.C.B. Tan, **The Effect of Processing Variables on the Morphology of Electrospun Nanofibers and Textiles**; *Polymer* 2001, 42: 261-272;
- ⁹¹ S. Ramakrishna, **An Introduction to Electrospinning and Nanofibers**; World Scientific Publishing Company 2005;
- ⁹² H. Fong, I. Chun, D.H. Reneker, **Beaded Nanofibers Formed During Electrospinning**; *Polymer* 1999, 40: 4585-4592;
- ⁹³ J. Tao, S. Shivkuma, **Molecular Weight Dependent Structural Regimes During the Electrospinning of PVA**; *Materials Letters* 2007, 61: 2325–2328;
- ⁹⁴ Suresh L. Shenoy, W. Douglas Bates, Harry L. Frisch ,Gary E. Wneka, **Role of Chain Entanglements on fiber Formation During Electrospinning of Polymer Solutions: Good Solvent, Non-Specific Polymer–Polymer Interaction Limit**; *Polymer* 2005, 46: 3372-3384;
- ⁹⁵ Z. Jun, H. Hou, A. Schaper, J. H. Wendorff, A. Greiner, **Poly-L-lactide nanofibers by electrospinning - Influence of solution viscosity and electrical conductivity on fiber diameter and fiber morphology**; *e-Polymers* 2003, 9: 1-9;
- ⁹⁶ C. Mit-uppatham, M. Nithitanakul, P. Supaphol, **Ultrafine Electrospun Polyamide-6 Fibers:Effect of Solution Conditions on Morphology and Average Fiber Diameter**; *Macromol. Chem. Phys.* 2004, 205: 2327–2338;
- ⁹⁷ K.H. Lee, H.Y. Kim, M.S. Khil, Y.M. Ra, D.R. Lee, **Characterization of Nano-Structured Poly(e-caprolactone) Nonwoven Mats Via Electrospinning**; *Polymer* 2003, 44: 1287–1294;
- ⁹⁸ H.Q. Liu, Y.L. Hsieh, **Ultrafine Fbrous Cellulose Membranes from Electrospinning of Cellulose Acetate**; *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 2002, 40: 2119-2129;

-
- ⁹⁹ D. Lubasová, L. Martinová, D. Mareková, P. Kostecká, **Cell Growth On Porous And Non-Porous Polycaprolactone Nanofibers**; Olomouc, Czech Republic, 12-14.2010;
- ¹⁰⁰ B. Ding, H.Y. Kim, S.C. Lee, C.L. Shao, D.R. Lee, S. J. Park, G.B. Kwag, K.J. Choi, **Preparation And Characterization of a Nanoscale Poly(vinyl alcohol) Fiber Aggregate Produced by an Electrospinning Method**, J. Polym. Sci. Part. B- Polym. Phys. 2002, 40: 1261-1268;
- ¹⁰¹ D.H. Reneker, A.L. Yarin, E.Zussman, H. Xu, **Electrospinning of Nanofibers from Polymer Solutions and Melts**; Advances In Applied Mechanics 2007, 41: 99-107;
- ¹⁰² I. Greenfeld, A. Arinstein, K. Fezzaa, M.H. Rafailovich, E. Zussman, **Polymer Dynamics in Semidilute Solution During Electrospinning: A Simple Model and Experimental observations**; Physical Review 2011, 84: 041806-15;
- ¹⁰³ C. T. Lim, E. P. Tan, S. Y. Ng; **Effects of Crystalline Morphology on the Tensile Properties of Electrospun Polymer Nanofibers**; Applied Physics Letters 2008, 8: 1419081-3;
- ¹⁰⁴ E.P.S. Tan, C. T. Lim, **Nanoindentation Study Of Nanofibers**; Applied Physics Letters 2005, 87:123106-09;
- ¹⁰⁵ E.P.S. Tan, S.Y. Ng, C.T. Lim, **Tensile testing of a single ultrafine polymeric fiber**; Biomaterials 2005, 26: 1453–1456;
- ¹⁰⁶ Q. Fu, Y. Jin, X. Song, J. Gao, X. Han, X. Jiang, Q. Zhao, D. Yu, **Size-Dependent Mechanical Properties Of PVA Nanofibers Reduced Via Air Plasma Treatment**; Nanotechnology 2010, 21: 095703-08;
- ¹⁰⁷ K. Gao, X. Hu, Ch. Dai, T. Yi, **Crystal Structures of Electrospun PVDF Membranes and its Separator Application for Rechargeable Lithium Metal Cells**; Materials Science And Engineering B 2006,131: 100–105;
- ¹⁰⁸ M.M. Demir, I. Yilgor, E. Yilgor, B. Erman, **Electrospinning of Polyurethane Fibers**. Polymer 2002, 43: 3303-3309;
- ¹⁰⁹ S. Bhowmick, A. Fowler, S.B. Warner, M. Toner ,M. Chen, R. Sitaula, J. Green, B. Chen; **Bio-Active Bandages**; Project No: F03-Md15; National Textile Center Annual Report: 11, 2004;
- ¹¹⁰ S.L. Zhao, X.H. Wu, L.G. Wang, Y. Huang, **Electrospinning of Ethyl-Cyanoethyl Cellulose/Tetrahydrofuran Solutions**. J. Appl. Polym. Sci. 2004, 91: 242-246;
- ¹¹¹ X.M. Mo, C.Y. Xu, M. Kotaki, S. Ramakrishna, **Electrospun P(LLA-CL) Nanofiber: A Biomimetic Extracellular Matrix For Smooth Muscle Cell And Endothelial Cell Proliferation**; Biomaterials 2004, 25(10): 1883-90;
- ¹¹² R. Inai, M. Kotaki, S. Ramakrishna, **Structure and Properties of Electrospun PLLA Single Nanofibres**; Nanotechnology 2005, 16(2): 1025-1029;
- ¹¹³ Ch. Wang, Y.W. Cheng, C.H. Hsu, H.S. Chien, S.Y. Tsou, **How To Manipulate the Electrospinning Jet With Controlled Properties to Obtain Uniform Fibers with the Smallest Diameter?—A Brief Discussion of Solution Electrospinning Process**; J. Polym. Res.2010: 1-13;
- ¹¹⁴ P. J. Brown, K. Stevens, **Nanofibers and Nanotechnology in Textiles: Continuous Yarns from Electrospun Nanofibers**; Chapter 3, Woodhead Publishing And The Textile Institute 2007: 46-69;

-
- ¹¹⁵ D. Li, G. Ouyang, J.T. Mccann, Y. Xia, **Collecting Electrospun Nanofibers with Patterned Electrodes**; Nano Lett. 2005, 5: 913-916;
- ¹¹⁶ A. Thorvaldsson, H. Stenhamre, P.L. Gatenholm, P. Walkenström, **Electrospinning of Highly Porous Scaffolds for Cartilage Regeneration**; Biomacromolecules 2008, 9: 1044-1049;
- ¹¹⁷ S.F. Fennessey, R.J. Farris, **Fabrication of Aligned and Molecularly Oriented Electrospun Polyacrylonitrile Nanofibers and the Mechanical Behavior of Their Twisted Yarns**, Polymer 2004, 45: 4217-4225;
- ¹¹⁸ C. H. Kim, Y. H. Jung, H. Y. Kim, D. Rae Lee, N. Dharmara, K. E. Choi, **Effect of Collector Temperature on the Porous Structure of Electrospun Fibers**; Macromolecular Research 2006, 14 (1): 59-65;
- ¹¹⁹ C.L. Casper, J.S. Stephens, N.G. Tassi, D.B Chase, J.F Rabolt, **Controlling Surface Morphology of Electrospun Polystyrene Fibers: Effect of Humidity and Molecular Weight in the Electrospinning Process**; Macromolecules 2004, 37: 573-578;
- ¹²⁰ J. Lee, G. Tae, Y. Ha Kim, I.S. Park, S.H. Kim, S. Hyun Kim, **The Effect Of Gelatin Incorporation Into Electrospun Poly(l-lactide-co-3-caprolactone) Fibers on Mechanical Properties and Cytocompatibility**; Biomaterials 2008, 29: 1872-1879;
- ¹²¹ D.I. Bower, **An Introduction to Polymer Physics**; Chapter 12, Cambridge, Cambridge University Press 2002: 343-368;
- ¹²² E.S. Gil, D.J. Frankowski, M.K. Bowman, A.O. Gozen, S.M. Hudson, R.J. Spontak, **Mixed Protein Blends Composed Of Gelatin And Bombyx Mori Silk Fibroin: Effects Of Solvent-Induced Crystallization And Composition**; Biomacromolecules 2006, 7: 728-735;
- ¹²³ Y.Z. Zhang, Y. Feng, Z.M. Huang, S. Ramakrishna, C.T. Lim, **Fabrication of Porous Electrospun Nanofibres**; Nanotechnology 2006, 17: 901-908;
- ¹²⁴ X. Yang, Q. Xu, G. Sui, Q. Ca, X. Deng, **Structure and Wettability Relationship of Coelectrospun Poly (L-Lactic acid)/Gelatin Composite Fibrous Mat**; Polym. Adv. Technol. 2011, 22: 2222-2230;
- ¹²⁵ B. Duan, C.H. Dong, X.Y. Yuan, K.D. Yao, **Electrospinning of chitosan solutions in acetic acid with polyethylene oxide**; J. Biomat. Sci.-Polym. E. 2004, 15: 797-811;
- ¹²⁶ D.I. Zeugolis, S.T. Khewd, E.S.Y. Yew, A.K. Ekaputr, Y.W. Tong, L.Y.L. Yung, D.R.W. Hutmacher, C. Sheppar, M. Raghunath, **Electro-Spinning of Pure Collagen Nano-Fibres – Just an Expensive Way to Make Gelatin?**; Biomaterials 2008, 29(15): 2293-2305;
- ¹²⁷ B.S. Jha, C.E. Ayres, J.R. Bowman, T.A. Telemeco, S.A. Sell, G.L. Bowlin, D.G. Simpson; **Electrospun Collagen: A Tissue Engineering Scaffold With Unique Functional Properties in a Wide Variety of Applications**; Journal of Nanomaterials 2011: 1-15;
- ¹²⁸ O.Hartman, Ch. Zhang, E.L. Adams, M.C. Farach-Carson, N.J. Petrelli, B.D. Chasesa, J.F. Rabolt, **Biofunctionalization of Electrospun PCL-Based Scaffolds with Perlecan Domain IV Peptide to Create a 3-D Pharmacokinetic Cancer Model**; Biomaterials 2010, 31(21): 5700-5718;

-
- ¹²⁹ L. Ghasemi-Mobarakeh, M.P. Prabhakaran, M. Morshed, M.H. Nasr-Esfahani, S. Ramakrishna, **Electrospun Poly(3-caprolactone)/Gelatin Nanofibrous Scaffolds for Nerve Tissue Engineering**; *Biomaterials* 2008, 29: 4532-4539;
- ¹³⁰ Y. Zhang, H. Ouyang, C. Teck Lim, S. Ramakrishna, **Electrospinning of Gelatin Fibers And Gelatin/PCL Composite Fibrous Scaffolds**; Wiley Interscience 2004, 8: 156-165;
- ¹³¹ Y. Zhang, H. Ouyang, C.T. Lim, S. Ramakrishna, Z.M. Huang, **Electrospinning of Gelatin Fibers and Gelatin/PCL Composite Fibrous Scaffolds**; *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* 2005, 72B: 156-165;
- ¹³² A. Thorvaldsson, H. Stenhamre, P.L. Gatenholm, P. Walkenström, **Electrospinning of Highly Porous Scaffolds for Cartilage Regeneration**; *Biomacromolecules* 2008, 9: 1044-1049;
- ¹³³ C. Vaquette, J.J. Cooper-White, **Increasing Electrospun Scaffold Pore Size with Tailored Collectors for Improved Cell Penetration**; *Acta Biomaterialia* 2011, 7: 2544-2557;
- ¹³⁴ J.H. Lee, H.W. Jung, I.K. Kang, H.B. Lee, **Cell Behaviour on Polymer Surfaces with Different Functional Groups**; *Biomaterials* 1994, 15: 705-71;
- ¹³⁵ T. Bhardwaj, R.M. Pilliar, M.D. Grynopas, R.A. Kandel, **Effect of Material Geometry on Cartilagenous Tissue Formation in-vitro**; *J. Biomed. Mater. Res.* 2001, 57: 190-199;
- ¹³⁶ S. Zhang, **Fabrication of Novel Biomaterials Through Molecular Self- Assembly**; *Nat. Biotechnol.* 2003, 21: 1171-1178;
- ¹³⁷ J.K. Hong, S.V. Madihally, **Three-Dimensional Scaffold Of Electrospayed fibers With Large Pore Size For Tissue Regeneration**; *Acta Biomater* 2010, 6 (12): 4734-42;
- ¹³⁸ S.Y. Chew, R. Mi, A. Hoke, A. Kam, W. Leong, **The Effect of the Alignment of Electrospun Fibrous Scaffolds on Schwann Cell Maturation**; *Biomaterials* 2008, 29(6): 653-661
- ¹³⁹ E. Kijenska, M.P. Prabhakaran, W. Swieszkowski, K.J. Kurzydowski, S. Ramakrishna, **Electrospun Bio-Composite P(LLA-CL)/Collagen I/Collagen III Scaffolds for Nerve Tissue Engineering**, *Inc. J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl Biomater* 2012, 100b: 1093-1102;
- ¹⁴⁰ J.M.Hackett, T.T.Dang,E.C. Tsai, X.Cao, **Electrospun Biocomposite Polycaprolactone/Collagen Tubes as Scaffolds for Neural Stem Cell Differentiation**; *Materials* 2010, 3: 3714-3728;
- ¹⁴¹ A. Sionkowska, J. Skopinska-Wisniewska, M. Wisniewski, **Collagen-Synthetic Polymer Interactions in Solution and in Thin films**; *Journal Of Molecular Liquids* 2009, 145: 135-138;
- ¹⁴² A. Sionkowska, J. Skopinska, M. Wisniewski, **Photochemical Stability of Collagen/Poly (vinyl alcohol) Blends**; *Polymer Degradation And Stability* 2004, 83: 117-125;
- ¹⁴³ M. Wisniewski, A. Sionkowska, H. Kaczmarek, S. Lazare, V. Tokarev, C. Belin, **Spectroscopic Study of a KRF Excimer Laser Treated Surface of the Thin Collagen films**; *Journal Of Photochemistry And Photobiology A: Chemistry* 2007,188: 192-199;
- ¹⁴⁴ Y. You, S. Jin Lee, B.M. Min, W. Ho Park, **Effect of Solution Properties on Nanofibrous Structure of Electrospun Poly(lactic-co-glycolic acid)**; *Journal Of Applied Polymer Science* 2006, 99: 1214-1221;

-
- ¹⁴⁵ M. Pakravan, M.C. Heuzey, A. Ajji, **Core–Shell Structured PEO-Chitosan Nanofibers by Coaxial Electrospinning**; *Biomacromolecules* 2012, 13: 412–42;
- ¹⁴⁶ G. E. Simmonds, J. D. Bomberger, M. A. Bryner, **Designing Nonwovens to Meet Pore Size Specifications**; *Journal Of Engineered Fibres And Fabrics* 2007, 2(1): 1-15;
- ¹⁴⁷ Strona internetowa: www.chemia.uj.edu.pl/dydaktyka/IR_Instrukcja.doc
- ¹⁴⁸ T. Kunugi, H. Watanabe, M. Hashimoto, **Dynamic Mechanical Properties of Poly(p-phenyleneterephthalamide) Fiber**; *J. Appl. Polym. Sci.* 1979; 24(4): 1039–51;
- ¹⁴⁹ G. W. Urbańczyk, **Mikrostruktura Włókna: Badanie Orientacji Wewnętrznej**, WNT, 1986: 120-156;
- ¹⁵⁰ D. Kolbuk, P. Sajkiewicz, T. Kowalewski, **Optical Birefringence and Molecular Orientation of Electrospun Polycaprolactone Fibers by Polarizing-Interference Microscopy**; *European Polymer Journal* 2012, 48(12): 275-283;
- ¹⁵¹ Norma: PN-81/C-89034 **Tworzywa sztuczne. Oznaczanie cech wytrzymałościowych przy statycznym rozciąganiu**
- ¹⁵² T. Elzein, M. Nasser-Eddine, Ch. Delaite, S. Bistac, P. Dumas, **FTIR Study of Polycaprolactone Chain Organization At Interfaces**; *Journal Of Colloid And Interface Science* 2004, 273, 381–387;
- ¹⁵³ X.F. Walboomers, H. J.E. Croes, L. A. Ginsel, J. A. Jansen, **Contact Guidance of Rat Fibroblasts on Various Implant Materials**; *John Wiley & Sons. Inc.* 1999: 204-212;
- ¹⁵⁴ S. Koombhongse, W. Liu, D.H. Reneker, **Flat Polymer Ribbons and Other Shapes by Electrospinning**; *Journal Of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 2001, 39 (21): 2598-2606;
- ¹⁵⁵ D.H. Renekera, A.L. Yarin, **Electrospinning Jets and Polymer Nanofibers**; *Polymer* 2008, 49(10): 2387-2425;
- ¹⁵⁶ Y. Xu, X. Wang, J. Rajak, D. L. Kaplan, **Preparation and properties of biodegradable foams from starch acetate and poly(tetramethylene adipate-co-terephthalate)**, *Carbohydrate Polymers* 59 (2005) 521–529;
- ¹⁵⁷ X. HOU, Z. Bao-Long, F. SHE, C. Yuan-Lu, S. Ke-Yu, Y. Kang-De, **Surface of gelatin modified poly(L-lactic acid) film**, *Chinese journal of polymer science* 2003, vol. 21, no3, pp. 277-283;
- ¹⁵⁸ A. Sionkowska, J. Kozłowska, **Characterization of Collagen/Hydroxyapatite Composite Sponges as a Potential Bone Substitute**; *International Journal of Biological Macromolecules* 2010, 47: 483-487;
- ¹⁵⁹ C.S. Ki, D.H. Baek, K.D. Gang, K.H. Lee, I.C. Um, Y.H. Park, **Characterization Of Gelatin Nanofiber Prepared from Gelatin–Formic Acid Solution**; *Polymer* 2005, 46: 5094–5102;
- ¹⁶⁰ A. Gałat, **O formowaniu się unikalnych struktur przestrzennych białek**, *Zagadnienia Biofizyki Współczesnej* 1985 (10) 115-150;
- ¹⁶¹ Patrick L. Graham; **Chemia Medyczna**; Warszawa, WNT 2003: 58-60;

-
- ¹⁶² Y.Z. Zhang, J. Venugopal, Z.M. Huang, C.T. Lim, S. Ramakrishna, **Crosslinking of The Electrospun Gelatin Nanofibers**; *Polymer* 47 (2006) 2911–2917
- ¹⁶³ M. Li, M.J. Mondrinos, M. R. Gandhi, F.K. Ko, A.S. Weiss, P.I. Lelkes, **Electrospun Protein Fibers as Matrices for Tissue Engineering**; *Biomaterials* 2005, 26(30);
- ¹⁶⁴ H. Bittiger, R.H. Marchessault, W.O. Niegisch; **Crystal Structure Of Poly-E-Caprolactone**; *Acta Cryst.* 1970, B26, 1923;
- ¹⁶⁵ Ch. Bunn, **Chemical Crystallography**; Oxford University Press, 1961: 313;
- ¹⁶⁶ Y. Chatani, Y. Okita, H. Tadokoro, Y. Yamashita, **Structural Studies of Polyesters III. Crystal Structure of Poly-e-caprolactone**; *Polymer Journal* 1970, 1:555;
- ¹⁶⁷ M. Cakmak, **Intrinsic Birefringence of Poly ether ether ketone**, *J. Polym. Sci. Part C* 1989, 27:119-121;
- ¹⁶⁸ J.E. Mark, **Polymers Handbook**, New York, 1996: 411;